

同, DHAP明显增加红细胞的 ADI和 D_{max} ,表明 DHAP能增加红细胞变形性,这有利于红细胞通过毛细血管,减少细胞间的叠连,降低血液粘度,疏通微循环,从而活血化瘀。这一现象与以往临床观察发现 DHAP能改善 IUGR患者血液流变学的结果相吻合^[1]。总之,本结果表明, DHAP改善微循环的作用,不仅与其增强 VEC刚性和降低其弹性,加强其屏障作用有关,同时也与 DHAP增加红细胞变形性有关。本实验将生物力学概念引入血液流变学相关研究,从细胞变形性、粘弹性变化的角度分析了活血化瘀中药的可能作用机制,具有重要的理论和实用价值,也是血液流变学活性药物筛选的一种实用方法。

参考文献:

[1] 黄引平,马庭元. 青心酮治疗胎儿宫内生长迟缓的临床疗效及

- 作用机理的研究 [J]. 中华妇产科杂志, 1993, 28(3): 333-336.
- [2] 黄引平,叶笃筠,马庭元,等. 青心酮对妊娠征患胎盘血管壁一氧化氮合成和血浆内皮素的影响 [J]. 中华妇产科杂志, 1996, 31: 667-670.
- [3] 洪志刚,叶笃筠,刘声远. 青心酮对豚鼠气道反应性影响 [J]. 实用肺科杂志, 1998, 5(4): 12-14.
- [4] 潘德顺,于江洲,郝天玲,等. 红细胞生成素 3'-增强子片段对内皮细胞低氧时环加氧酶-2基因表达的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 1998, 14(6): 608-611.
- [5] 冯元桢. 生物力学: 活组织的力学特性 [M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1986.
- [6] Eskin S G, McIntire L V. Hemodynamic effects in atherosclerosis and thrombosis [J]. Semin Thromb Hemost, 1988, 14: 170-174.
- [7] Kuchan M J, Frangos J A. Role of calcium and calmodulin in force-induced nitric oxide production in endothelial cells [J]. Am J Physiol, 1994, 266: c628-636.

槲皮素对重组人蛋白激酶 CK2全酶的抑制作用及其动力学分析

刘新光,梁念慈*

(广东医学院生物化学与分子生物学研究所,广东 湛江 524023)

摘要:目的 观察槲皮素对重组人蛋白激酶 CK2全酶的直接作用及其酶动力学机制。方法 利用基因工程克隆、表达和纯化获得重组人蛋白激酶 CK2 α 和 β 亚基,在体外等摩尔数混合构成有最大生物活性的重组 CK2全酶,在不同条件下测定 CK2的活性。CK2活性通过测定转移到 CK2底物上的 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 的 ^{32}P 放射活度来检测。结果 重组人蛋白激酶 CK2是一种 Ca^{2+} 、cAMP和 cGMP等第二信使非依赖性蛋白激酶,与天然 CK2的性质一致。槲皮素对重组人 CK2全酶具有很强的抑制作用, IC_{50} 为 522 nmol/L,抑制作用大于 CK2已知抑制剂 DRB和 A3。槲皮素对重组人蛋白激酶 CK2的动力学研究表明:它与 ATP和酪蛋白分别呈竞争性和非竞争性抑制作用。结论 槲皮素是 CK2有效抑制剂,该抑制作用可能是槲皮素抗肿瘤作用又一分子机制,为今后筛选更有效的 CK2抑制剂提供了一种较为简便的筛选方法。

关键词: 蛋白激酶 CK2;重组蛋白;全酶;槲皮素; IC_{50} ;酶动力学

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)07-0626-04

Inhibitory effect of quercetin on recombinant human protein kinase CK2 holoenzyme and its kinetics analysis

LIU Xin-guang, LIANG Nian-ci

(Institute of Biochemistry & Molecular Biology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China)

Abstract Object To study the direct effect of quercetin on recombinant human protein kinase CK2 holoenzyme and its kinetics. **Methods** Recombinant human protein kinase CK2 α and β subunits were cloned and expressed by gene engineering, and were purified. The two subunits were mixed at the same molar ratio, thus reconstituting CK2 holoenzyme, which displayed the maximum bioactivity. The CK2 activity was assayed by detecting incorporation of ^{32}P of $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ into the substrate in the various condi-

* 收稿日期: 2001-10-08

基金项目: 广东省自然科学基金 (011766); 广东医学院标志性成果扶持项目

作者简介: 刘新光 (1964-), 男, 江西九江人, 博士, 副教授, 硕士生导师, 现任广东医学院医学检验系副主任, 生化教研室主任。1999年毕业于中山医科大学生物化学与分子生物学专业, 获医学博士学位。主要研究方向是肿瘤生化、蛋白激酶的分子生物学与生化药理学, 目前负责省、厅、市和学院级科研项目 7项, 以第一作者发表科研论文 26篇, 获湛江市科技进步一等奖 1项 (第一完成人)。Tel (0759) 2388582, 个人主页 <http://home.gdmc.edu.cn/jyx/fjian/person/lxg.htm> E-mail: xig.liu@gdmc.edu.cn

tions. **Results** The recombinant human protein kinase CK2 was the second messenger (Ca^{2+} , cAMP and cGMP) independent protein kinase, the characterization and function of the reconstituted holoenzyme were consistent with those of native CK2. It was found that quercetin strongly inhibited the holoenzyme activity of recombinant human protein kinase CK2 with an IC_{50} of 522 nmol/L, which was much more effective than DRB and A3, known as CK2 special inhibitors. Kinetic studies of quercetin on recombinant human protein kinase CK2 showed the inhibition was competitive with ATP and noncompetitive with casein. **Conclusion** Quercetin is a potent inhibitor of recombinant human protein kinase CK2. The inhibition may be another molecular mechanism of antitumor effect of quercetin. This study provides a simple and rapid screening method for the development of more effective inhibitors of recombinant human protein kinase CK2.

Key words protein kinase CK2; recombinant protein; holoenzyme; quercetin; IC_{50} ; enzyme kinetics

蛋白激酶 CK2 曾称为酪蛋白激酶 2, 是一种真核细胞普遍存在的信使非依赖性丝氨酸蛋白激酶, 由两个催化亚基 (α 或 α') 和两个调节亚基 (β) 组成的不均一四聚体 ($\alpha\beta_2, \alpha'\beta_2$ 或 $\alpha\alpha'\beta_2$)^[1~3]。蛋白激酶 CK2 的重要特点之一就是可磷酸化的底物有 200 余种, 且底物不断增加, 这些底物在细胞的许多方面起重要作用, 但真正作用至今仍不清楚^[1~3]。此外, 与正常和静止细胞相比, 转化和正在增殖的细胞蛋白激酶 CK2 活性升高^[1~3]。有研究表明^[4,5]: CK2 的 α 或 α' 基因可能是原癌基因。最近有学者指出^[1,6]: CK2 可能是肿瘤和艾滋病治疗的分子靶点之一, 其特异性抑制剂具有潜在的临床治疗价值。

槲皮素 (3, 3', 4', 5, 7-五羟黄酮, quercetin, Que) 是一种广泛存在于植物中的黄酮类化合物, 对人体健康具有许多有益作用, 如祛痰、止咳、平喘、心血管保护、抗血小板聚集、抗癌、抗溃疡、抗变态反应、抗病毒、抗炎作用以及白内障预防等广泛的药理作用^[7~9]。还可抑制乳腺癌、白血病、结肠癌、卵巢癌、鳞癌、子宫内膜癌、胃癌和非小细胞肺癌等细胞的生长, 一些动物和人的初步资料表明也可抑制肿瘤生长, 使之已成为一种有应用潜力的抗癌化合物^[7,9]。由于 CK2 的活性与增殖相关, 抑制细胞增殖可能会影响 CK2 活性。为了探讨槲皮素对 CK2 的作用机制, 本文在已克隆表达人 CK2 α 和 β 亚基的基础上^[10~13], 研究了槲皮素对纯化的重组人 CK2 全酶活性的直接作用及其动力学。

1 材料和方法

1.1 材料: 槲皮素、肝素、精胺, ATP 为 Sigma 公司产品。5, 6-二氯- β -咪喃糖苯并咪唑 (DRB) 和 *N*-(2-氨基乙基)-5-氯萘-1-磺胺 (A3) 为 Calbiochem 公司产品, P81 磷酸纤维素滤纸为 Whatman 产品。 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 为北京亚辉生物医学工程公司生产, 其余为国产分析纯产品。

1.2 方法

1.2.1 人 CK2 α 和 β 亚基 cDNA 重组质粒 pTCKA 和 pTCKB 的克隆与测序: 方法见作者以前报道^[10,11]。

1.2.2 重组人 CK2 α 和 β 亚基的原核表达、纯化与鉴定: 方法见文献^[12,13]。

1.2.3 蛋白定量: 按常规的考马斯亮蓝 R-250 染色法, 以牛血清白蛋白作为标准。

1.2.4 蛋白激酶 CK2 的活性测定: 方法见文献^[11,12]。酶反应总体积为 $35\mu\text{L}$, 反应混合液中含 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.2, 150 mmol/L KCl, 10 mmol/L $MgCl_2$, $50\mu\text{mol/L}$ ATP, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 1.85×10^4 Bq (比活 1.85×10^7 Bq/mol), 去磷酸化酪蛋白 2 g/L。反应温度为 30°C 。加 $15\mu\text{L}$ 重组 CK2 全酶启动酶反应, 反应 10 min 后取 $30\mu\text{L}$ 点至直径 2 cm 的 P81 磷酸纤维素滤纸上终止反应, 阴干, 用 85 mmol/L 磷酸洗涤数次, 最后用丙酮洗涤 1 次, 80°C 烤干后, 加闪烁液于液闪仪计数, 每组同时做 3 个平行管。每分钟催化 1 pmol $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 上的 ^{32}P 转移到酪蛋白上所需的酶量为 1 个酶单位。

1.2.5 槲皮素对重组人 CK2 全酶的直接作用与 IC_{50} 的计算: IC_{50} 的计算根据半数效量概率单位法^[14]进行。以浓度的对数为横坐标, 相应浓度抑制率的概率单位为纵坐标, 求出直线回归方程, 并根据方程计算 IC_{50} 值 (50% 抑制时的概率单位为 5)。

1.2.6 酶的动力学分析: 根据 IC_{50} 结果, 选择 3 种不同浓度槲皮素 (0, 250, 1 000 nmol/L) 进行实验分组。在固定酪蛋白浓度为 2 g/L, ATP 浓度从 $12.5 \sim 100\mu\text{mol/L}$ 情况下, 测定 CK2 的活性 (相当于反应速度); 或在固定 ATP 的浓度为 $12.5\mu\text{mol/L}$, 改变酪蛋白浓度 (1~8 g/L) 条件下, 测定 CK2 活性, 每个样品同时做 3 个平行管, 采用 Lineweaver-Burk 作图法求出表现 K_m 和表观 V_{max} 酶动力学参

数,以此判断槲皮素对 CK2抑制作用类型。

1.2.7 统计学处理: 差异的显著性检验采用配对 *t* 检验

2 结果

2.1 重组人蛋白激酶 CK2全酶的构成: 蛋白激酶 CK2在细胞中是由两个催化亚基 (α 或 α')和两个调节亚基 (β)组成的四聚体。为了观察原核表达的人 CK2 α 和 β 亚基能否构成有活性的全酶,作者曾将这两种蛋白按不同的摩尔分子比在体外直接简单地混合,结果显示 α 和 β 亚基等摩尔混合可构成有完全生物活性的全酶^[12,13]。

2.2 重组人 CK2全酶的性质鉴定: 结果见表 1,从中可以看出,混合后的 CK2全酶具有与天然 CK2一致的性质,如可以部分去磷酸化的酪蛋白作底物,而用碱性蛋白组蛋白 III S和酪氨酸蛋白激酶 (TPK)的底物 Poly (Glu-Tyr= 4: 1)作底物时,CK2的活性则很低。重组人 CK2全酶的活性还受到肝素和 CK2特异性抑制剂 DRB的抑制,精胺则有激活作用。而一些第二信使分子如 cAMP, cGMP 和 Ca^{2+} 则对 CK2的活性基本没有影响

表 1 重组人 CK2全酶的性质

组别	CK2活性 (mU, $\bar{x} \pm s$)	(%)
对照组	1 264.9 ± 95.7	100
+ 组蛋白 (0.5 g/L)- 酪蛋白	52.4 ± 9.5	4.1*
+ poly (Glu-Tyr= 4: 1) 0.4 g/L- 酪蛋白	124.7 ± 24.2	9.9*
+ 肝素 (8 mg/L)	507.0 ± 44.7	40.1*
+ DRB (40 μmol/L)	325.5 ± 71.3	25.7*
+ 精胺 (2.5 mmol/L)	1 840.4 ± 107.1	145.5*
+ Ca^{2+} (5 mmol/L)	1 248.5 ± 63.4	98.7
+ cAMP (10 μmol/L)	1 365.7 ± 112.0	108.0
+ cGMP (10 μmol/L)	1 267.8 ± 108.3	100.2

注: 使用等摩尔数 (14 pmol) 的 CK2 α 和 β 亚基构成 CK2全酶,其活性测定方法见材料与方法。在对照组中酪蛋白作为 CK2的底物,每个数值代表 3次实验的平均值。

与对照组相比: ** *P* < 0.01

2.3 槲皮素对重组人 CK2全酶的直接作用: 向反应体系中加入不同浓度槲皮素,结果见表 2 槲皮素对重组人 CK2全酶有很强的抑制作用,且随着浓度不断增加,对 CK2全酶活性抑制率逐渐升高,呈现浓度依赖性关系,以浓度对数为横坐标,相应浓度抑制率的概率单位为纵坐标,求出直线回归方程为: $Y = 1.8581X - 0.0497$, $r = 0.9561$,因此其 IC_{50} 为 522 nmol/L (log nmol/L 为 2.718)。

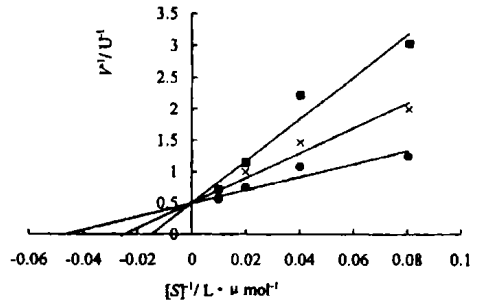
2.4 槲皮素抑制重组人 CK2全酶的动力学分析

表 2 槲皮素对重组人 CK2全酶的影响

浓度 (nmol/L)	log 值	CK2活性 (cpm, $\bar{x} \pm s$)	抑制率 (%)	概率单位
0		15 156 ± 1 076		
125	2.097	14 38 ± 651	5.1	3.355 1
250	2.398	9 14 ± 817	39.7*	4.747 7
500	2.690	6 026 ± 331	60.2*	5.253 3
1 000	3.000	4 037 ± 228	73.4*	5.612 8
2 000	3.301	2 10 ± 131	86.1*	6.080 3
4 000	3.602	1 23 ± 214	91.9*	6.405 1

与 0 nmol/L组相比: ** *P* < 0.01

2.4.1 不同 ATP浓度条件下槲皮素对 CK2活性的影响: 在固定酪蛋白浓度,改变 ATP浓度条件下,进行了槲皮素对 CK2全酶的动力学分析,结果见图 1 槲皮素与 ATP呈现竞争性抑制重组人 CK2活性,以 $1/[S]$ 和 $1/V$ 作图显示酶的动力学结果

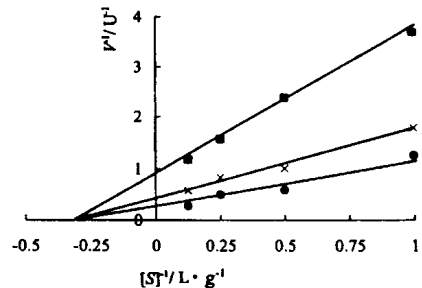


固定酪蛋白浓度为 2 g/L,按图中所示改变 ATP浓度条件下测定不同浓度槲皮素对重组人 CK2全酶的影响,每个值代表 3次实验的平均值。

槲皮素 0 μmol/L (●); 250 nmol/L (×); 1 000 nmol/L (■)

图 1 Lineweaver-Burk 作图法分析槲皮素对重组人 CK2全酶的抑制作用的动力学

2.4.2 不同酪蛋白浓度情况下槲皮素对 CK2活性的影响: 在固定 ATP的浓度,改变酪蛋白浓度情况下,槲皮素的酶动力学实验结果见图 2 槲皮素与酪蛋白呈非竞争性抑制重组人蛋白激酶 CK2



固定 ATP浓度为 12.5 μmol/L,按图中所示改变酪蛋白浓度条件下不同浓度槲皮素对重组人 CK2全酶的影响,每个值代表 3次实验的平均值。

槲皮素 0 μmol/L (●); 250 nmol/L (×); 1 000 nmol/L (■)

图 2 Lineweaver-Burk 作图法分析槲皮素对重组人 CK2全酶的抑制作用的动力学

2.5 DRB与 A3对重组人 CK2全酶的抑制作用: DRB和 A3是已知对 CK2有抑制作用的两种化合物^[1,2],结果(表 3和 4)表明:它们对重组人 CK2都有较强的抑制作用,其 IC₅₀分别为 10.4 μmol/L和 25.5 μmol/L,说明槲皮素较 DRB和 A3对重组人 CK2全酶的抑制作用更强。

表 3 DRB对重组人 CK2全酶的抑制作用

浓度		CK2活性		抑制率	
(μmol/L)	log 值	(cpm, $\bar{x} \pm s$)		(%)	概率单位
0		20 542 ± 1 272			
5	0.699	13 109 ± 550	36.2 *		4.641 5
10	1.000	9 97 ± 94	51.5 *		5.025 1
20	1.301	7 63 ± 741	62.9 *		5.331 9
40	1.602	6 104 ± 126	70.3 *		5.524 4
80	1.903	3 357 ± 641	83.7 *		5.994 5

IC₅₀ = 10.4 μmol/L; 与 0 μmol/L 组相比: ** P < 0.01

表 4 A3对重组人 CK2全酶的抑制影响

浓度		CK2活性		抑制率	
(μmol/L)	log 值	(cpm, $\bar{x} \pm s$)		(%)	概率单位
0		33 624 ± 2 784			
10	1.000	23 996 ± 1 716	28.6 *		4.446 6
20	1.301	18 415 ± 511	45.2 *		4.874 3
40	1.602	12 358 ± 1 062	63.2 *		5.331 9
80	1.903	9 037 ± 1 441	73.1 *		5.612 8
160	2.204	5 855 ± 172	82.6 *		5.954 2

IC₅₀ = 25.5 μmol/L; 与 0 μmol/L 组相比: ** P < 0.01

3 讨论

蛋白激酶 CK2在肿瘤细胞的生长、增殖和信号传导过程中起重要作用^[1-3]。CK2与 HIV-1的关系非常密切,在 HIV-1的复制、转录及裂解细胞等功能的调控中起着重要作用,CK2抑制剂具有抗 HIV-1活性^[6]。因此有观点认为蛋白激酶 CK2是肿瘤和艾滋病治疗的靶分子之一,CK2的抑制剂具有潜在的抗肿瘤和抗 HIV-1的临床应用价值^[1,6]。

研究表明槲皮素具有抗氧化作用、抗血小板聚集和抗肿瘤作用^[7-9],槲皮素抗肿瘤作用的主要分子机制^[7]是下调突变的 P53蛋白、阻滞肿瘤细胞于 G₁期、抑制 TPK 与 II 型雌激素受体结合、抑制热休克蛋白的产生、抑制 Ras 蛋白表达等。通过槲皮素对 HL-60细胞的影响^[15]的研究,发现其可抑制该白血病细胞的生长,抑制其 TPK、PKC 以及肌醇磷脂的转换作用,说明它可影响信号传递的多个环节。

我们在获得大量有生物学活性的重组人 CK2的基础上^[12,13],首先进行了 CK2性质鉴定和构成重组全酶(表 1),又首次观察了槲皮素对重组人 CK2全酶的直接作用。结果发现槲皮素对重组 CK2全酶具有很强的抑制作用(表 2),其 IC₅₀仅为 522

nmol/L。进一步的酶动力学结果揭示了槲皮素对 CK2的作用机制,与 ATP 呈现竞争性抑制(图 1),说明槲皮素与 ATP 对重组人 CK2具有竞争性抑制作用,与酪蛋白则呈非竞争性抑制 CK2 活性(图 2)。槲皮素与 ATP 呈竞争性抑制 CK2,提示这种抑制作用可能是槲皮素抑制肿瘤增殖的另一分子机制。

DRB 与 A3 作为已知的蛋白激酶 CK2 的抑制剂^[1,2],尤其是 DRB 是 CK2 的特异性抑制剂,它还可抑制依赖 CK2 的 RNA 聚合酶 II。A3 除了可抑制 CK2 外,还可抑制 CKI,肌浆球蛋白轻链激酶 (MLCK),PKA,PKG,PKC 等蛋白激酶的活性,本实验证实了纯化的重组人 CK2 全酶可受到已知抑制剂的抑制。有意义的是,本实验结果还表明:槲皮素抑制 CK2 的作用 (IC₅₀ 仅为 522 nmol/L) 较 DRB 和 A3 更强,说明槲皮素可能是 CK2 有效的抑制剂。因此本实验为进一步研究槲皮素的作用机制以及应用开发槲皮素提供了重要的实验依据。

参考文献:

- [1] Pinna L A, Meggio F. Protein kinase CK2 ("casein kinase-2") and its implication in cell division and proliferation [J]. Prog Cell Cycle Res, 1997, 3: 77-97.
- [2] Guerra B, Issinger O G. Protein kinase CK2 and its role in cellular proliferation, development and pathology [J]. Electrophoresis, 1999, 20(2): 391-408.
- [3] Tawfic S, Yu S, Wang H, et al. Protein kinase CK2 signal in neoplasia [J]. Histol Histopathol, 2001, 16(2): 573-582.
- [4] Seldin D C, Leder P. Casein kinase II α transgene-induced murine lymphoma: relation to theilenosis in cattle [J]. Science, 1995, 267(5199): 894-897.
- [5] Orlandini M, Semplici F, Ferruzzi R, et al. Protein kinase CK2 α induced by serum as a delayed early gene and cooperates with Ha-ras in fibroblast transformation [J]. J Biol Chem, 1998, 273(33): 21291-21297.
- [6] De Clercq E. Current lead natural products for the chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection [J]. Med Res Rev, 2000, 20(5): 323-349.
- [7] Lamson D W, Brignall M S. Antioxidants and cancer, part 3: quercetin [J]. Altern Med Rev, 2000, 5(3): 196-208.
- [8] 鲍廷铮,王庆伦,廖志辉. 槲皮素的研究近况 [J]. 江西中医学院学报, 1998, 10(2): 90-91.
- [9] 孟德胜,汪仕良. 槲皮素的抗癌作用 [J]. 中草药, 2001, 32(2): 186-188.
- [10] 刘新光,梁念慈,马涧泉. 重组人蛋白激酶 CK2 α 亚基 cDNA 的克隆与测序 [J]. 中山医科大学学报, 1999, 20(2): 158-159.
- [11] 刘新光,梁念慈,马涧泉,等. 重组人蛋白激酶 CK2 β 亚基 cDNA 的克隆与测序 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 1999, 15(2): 228-231.
- [12] 刘新光,梁念慈,马涧泉. 重组人蛋白激酶 CK2 α 亚基的原核表达、纯化与鉴定 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2000, 16(1): 17-22.
- [13] 刘新光,梁念慈,马涧泉. 重组人 CK2 β 亚基的原核表达、纯化与鉴定 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27(2): 201-205.
- [14] 杨树勤. 中国医学百科全书——医学统计学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985.
- [15] Kang T B, Liang N C. Studies on the inhibitory effect of quercetin on the growth of HL-60 leukemic cells [J]. Biochem Pharmacol, 1997, 54(9): 1013-1018.