

二苯乙烯类化合物对蛋白激酶 C 的抑制作用

徐 光 张礼萍* 陈力芳 胡昌奇*

(上海医科大学基础医学院生物化学教研室, *药学院天然药物化学教研室, 上海 200032)

提要 报道 15 种二苯乙烯类化合物对蛋白激酶 C(PKC)活性的影响。其中从中药金雀根中分得的 3 种二苯乙烯类低聚体 α -viniferin, kobophenol A 和 miyabenol C, 它们抑制 PKC 的 IC_{50} 分别为 62.5, 52.0 和 27.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。另外 6 种含酚羟基的二苯乙烯化合物对 PKC 也显示不同程度的抑制作用, 但当酚羟基全甲基化或全乙酰化后其抑制作用大大降低甚至消失。酶动力学研究证明 miyabenol C 对 PKC 的抑制作用属于非竞争性抑制。

关键词 二苯乙烯类; 蛋白激酶 C; 金雀根

磷脂、 Ca^{2+} 依赖性的蛋白激酶 C(PKC)在调控细胞膜信息传递方面的关键作用已被广泛接受^(1,2)。人们设想 PKC 抑制剂有可能发展成为一类新型的抗肿瘤药物⁽³⁾, 近年来确实已经发现一些 PKC 抑制剂有抑制肿瘤生长的活性。另有一些实验则提出 PKC 抑制剂还有抗炎、抗皮肤增生的作用。人们希望从天然资源, 如微生物代谢产物、海洋生物、苔藓植物和种子植物中寻找 PKC 抑制剂^(4,5)。天然的二苯乙烯类化合物是一类酚性化合物, 有抗菌、消炎、抗肿瘤等多种生理活性, 分布于某些植物科属中, 它们对 PKC 的活性有何影响尚未见报道。我们用大鼠脑中提取的 PKC 对大量中草药进行筛选时发现: 蓼科的虎杖、何首乌、大黄和豆科的金雀根有抑制 PKC 的作用, 而且活性成分多数为二苯乙烯类化合物。本文报道 15 种二苯乙烯类化合物对 PKC 的作用, 初步探讨其化学结构与生物活性的关系。

材 料 与 方 法

试剂与药品 磷脂酰丝氨酸(PS)购自 BDH 化学试剂公司; 组蛋白 III-s、二油酰甘油酯(diolein, DAG)、ATP 购自美国 Sigma 公司; γ - ^{32}P -ATP 购自北京福瑞生物工程公司, 其它试剂为国产分析纯。

二苯乙烯类化合物均为本实验室提取纯化的单体。其中 polydatin 和 resveratrol 从虎杖(*Polygonum cuspidatum*)根茎中分得; rhapontine 和 rhapontine genin 从波叶大黄(*Rheum hotaonse*)根茎中分得; 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside 从何首乌(*Polygonum multiflorum*)根中分得; pallidol, α -viniferin, miyabenol C 和 kobophenol A 从金雀根(*Caragana sinica*)中分得。其余甲基化物和乙酰化物由相应的天然产物制备。所有化合物结构都经化学和光谱方法鉴定确认。

PKC 纯化 取 150~180 g Wistar 雄性大鼠的大脑用改良的 Kikkawa 方法纯化^(6,7)。

PKC 活性测定 通过 $r\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ 中 ^{32}P 掺入组蛋白生成磷酸化组蛋白的量测定 PKC 的活力。反应混合物总体积 250 μl , 含有 20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tri-HCl, pH 7.5, 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgAc_2 , 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2 , 50 μg 组蛋白 III-s, 20 μl 脂质体(含磷脂酰丝氨酸 10 μg , 二油酰甘油酯 1 μg), 部分纯化的 PKC 30 μg , $r\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ 7.4×10^8 Bq, ATP 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。以 EGTA 代替 CaCl_2 和脂质体作为对照管。30 $^\circ\text{C}$ 保温反应 10 min, 加冰冷的 25% 三氯醋酸 1 ml 终止反应。0.45 μm 孔径的微孔滤膜收集沉淀, 5% 三氯醋酸洗 3 次, 滤膜烘干后于基本闪烁液中, 测定 cpm, 每个样品测定管作双复管。

结 果

二苯乙烯类化合物对 PKC 的作用

大鼠脑中的 PKC 经部分纯化后仍然是 7 种同工酶的混合物⁽⁸⁾, 我们测定的是化合物对总的 PKC 活力的影响。本实验测定 15 种二苯乙烯类化合物, 当浓度为 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 有 13 个化合物显示抑制作用; 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时有 9 个化合物显示抑制作用, 无显示激活作用的化合物。现将浓度在 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 测得的结果列表 1。

Tab 1 Effect of stilbenoids on rat brain PKC

Stilbenoids (100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)		Inhibition (%)	
Type	Name	Formula	
Monomer	1. Resveratrol	$\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_3$	34
	2. Resveratrol acetate	$\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_6$	0
	3. Polydatin	$\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_8$	38
	4. Polydatin acetate	$\text{C}_{32}\text{H}_{34}\text{O}_{14}$	0
	5. Rhapontin	$\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_8$	10
	6. Rhapontin genin	$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_3$	40
	7. 2,3,5,4'-Tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside	$\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_9$	50
	8. 2,3,5,4'-Tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside acetate	$\text{C}_{34}\text{H}_{36}\text{O}_{16}$	0
Dimer	9. Pallidol	$\text{C}_{28}\text{H}_{22}\text{O}_6$	25
Trimer	10. α -Viniferin	$\text{C}_{42}\text{H}_{32}\text{O}_9$	100
	11. Hexamethoxy α -viniferin	$\text{C}_{48}\text{H}_{44}\text{O}_9$	0
	12. Miyabenol C	$\text{C}_{42}\text{H}_{32}\text{O}_9$	100
	13. Miyabenol C acetate	$\text{C}_{58}\text{H}_{46}\text{O}_{16}$	0
Tetramer	14. Kobophenol A	$\text{C}_{58}\text{H}_{44}\text{O}_{13}$	100
	15. Kobophenol A acetate	$\text{C}_{76}\text{H}_{64}\text{O}_{23}$	0

Note: PKC inhibition (%) are the averages of triplicate experiments.

PKC activity was determined in the presence of 20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl at pH 7.5, 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgAc_2 , 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2 , 50 μg histone type-III-s, 20 μl liposome (10 μg PS, 1 μg DAG), 30 μg PKC, 7.4×10^8 Bq $r\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ in 25 μl . Incubation was carried out for 10 min at 30 $^\circ\text{C}$.

α -Viniferin, miyabenol C 和 kobophenol A 的半数抑制浓度

从中药金雀根中分得的 3 种二苯乙烯低聚体 α -viniferin, miyabenol C, kobophenol A 对 PKC 具有很强的抑制作用, 实验求得半数抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 62.5, 27.5, 52.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 如图 1 所示。

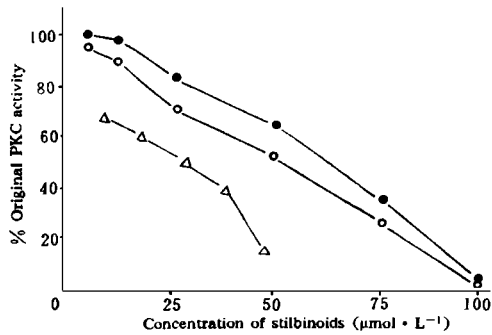


Fig 1 Inhibition of rat brain PKC by α -viniferin(●), kobophenol A(○) and miyabenol C (Δ). PKC activity was determined in the presence of $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ free Ca^{2+} , $40 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ PS, $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATP, $200 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ histone-III-S.

Miyabenol C 抑制 PKC 类型

以抑制 PKC 活性最显著的 miyabenol C 探讨这类化合物对 PKC 抑制类型。在相同的实验条件下,二种不同浓度的 miyabenol C 对 PKC 活性抑制作用与反应介质中磷脂酰丝氨酸(PS)浓度关系的 Lineweaver-Burk 图及不同浓度 miyabenol C 对 PKC 活性抑制作用的 Dixon 图均显示对 PKC 的抑制作用为非竞争性抑制,如图 2,3 所示。

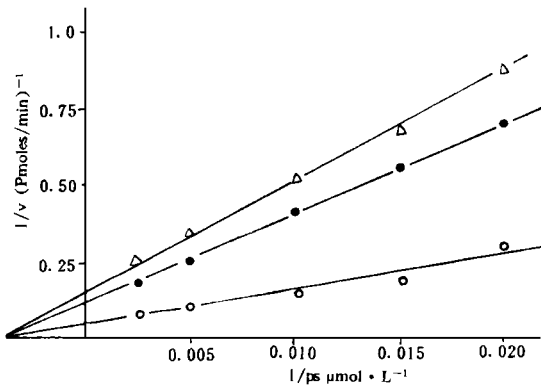


Fig 2 Lineweaver-Burk analysis of phosphoserine (ps) on the inhibition of PKC by miyabenol C. PKC activity was determined in presence of $4 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ DAG, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ca^{2+} , $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATP and the indicated concentrations of PS, miyabenol C was present at $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (○), $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (●), and $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (Δ).

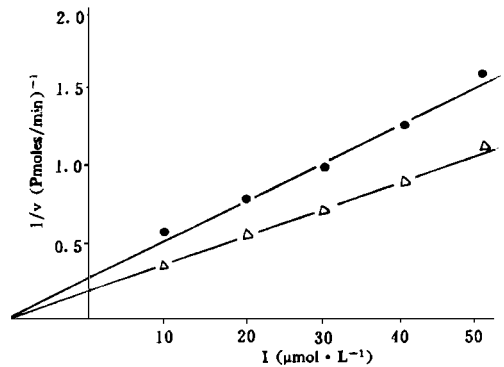


Fig 3 Dixon analysis of the inhibition of PKC by miyabenol C at different concentrations. Histone-III-S $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ (●), $200 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ (Δ).

讨 论

实验结果显示,天然的二苯乙烯类化合物在体外对 PKC 活性具有一定的抑制作用,不论它是单体、二聚体、三聚体或四聚体,也不论它的部分羟基是甲基化的(如 rhapontine)或是接糖

的(如 polydatin)。但从已有的 15 个化合物结构分析,必须具有酚羟基,如果酚羟基全部被甲基化或乙酰化,则抑制作用减弱或消失。三聚体(miyabenol C, α -viniferin)和四聚体(kobophenol A)比单体和二聚体的抑制作用强,说明化合物的基本骨架对抑制作用有很大的影响。酚羟基的连接位置也有很大影响,而不仅仅取决于化合物上酚羟基的多少。因为三聚体 α -viniferin 和二聚体 pallidol 上酚羟基都是 6 个,但前者作用强于后者;四聚体 kobophenol A 上有 10 个酚羟基,但抑制作用不如只含 7 个酚羟基的 miyabenol C。从以往的实验也证明有些黄酮化合物虽然有不少酚羟基,但并不是都具有抑制 PKC 活性的作用⁽⁵⁾。

PKC 是一个紧密相关的蛋白质家族,已有 7 种同工酶被克隆和表达,每一种都有其独特的性质、个体发生学和组织分布。进一步研究可以从所发现的抑制剂到底是选择作用于哪一种同工酶或作用于酶的哪一个区域。图 2,3 显示 miyabenol C 对 PKC 的作用为非竞争性抑制。抑制剂的作用部位可能是控制区域或催化区域。目前多数研究者更注意控制区域,因为作用于该区域的化合物可能更具有特异性和调节意义。合成抗肿瘤药物 tamoxifen 的结构属于二苯乙烯类,已知它是一种作用于控制区域的 PKC 抑制剂⁽⁹⁾。据此推测,天然二苯乙烯类化合物也可能作用于 PKC 的控制区。

大黄、何首乌、虎杖和金雀根等都是常用中药,二苯乙烯类是这些中药含有的主要化学成分。发现这类天然化合物具有抑制 PKC 的作用,将有助于用现代生物化学方法阐明这些中药的药理作用原理。这次实验中使用的二苯乙烯类二聚体、三聚体和四聚体都是从中药金雀根中提取分离获得。金雀根有治疗虚损劳热、高血压、关节痛风、妇女月经不调等多种功效⁽¹⁰⁾,在朝鲜民间也用于抗炎⁽¹¹⁾。但未见文献报道它的天然二苯乙烯类具有抗肿瘤活性。因此对金雀根化学成分的抗炎和抗肿瘤作用值得进一步研究,同时这类天然成分也有可能用作研究 PKC 生物活性机理的工具。

参 考 文 献

- Berry N, et al. Protein kinase C and T cell activation. *Eur J Biochem* 1990;189: 205.
- 刘建军,等. PKC 的研究进展. *生物化学与生物物理进展* 1988;15: 422.
- Weinstein B. The origins of human cancer; Molecular mechanisms of carcinogenesis and their implications for cancer prevention and treatment. *Cancer Res* 1988;48: 4135.
- Takahashi I, et al. UCN-01 and UCN-02, new selective inhibitors of protein kinase C. *J Antibiot* 1989;42: 571.
- 徐光,等. 野黄芩甙元及其类似物对蛋白激酶 C 的抑制作用. *上海医科大学学报* 1993;20: 187.
- Kikkawa U, et al. Calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase from rat brain, subcellular, distribution, purification and properties. *J Biol Chem* 1982;257: 13341.
- Ono Y, et al. The structure, expression and properties of additional members of the protein kinase C family. *J Biol Chem* 1988;263: 6972.
- Nishizuka Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 1988;334: 661.
- Su HD, et al. Effect of tamoxifen, a nonsteroidal antiestrogen, on phospholipid/calcium dependent protein kinase and phosphorylation of its endogenous substrate protein from the rat brain and ovary. *Biochem pharmacol* 1985;34: 3649.
- 江苏新医学院编. *中药大辞典(上册)*. 上海科学技术出版社, 1986: 1401.
- Kitanaka S, et al. (+)-Viniferin, an anti-inflammatory compound from *Caragana chamlyugi*. *Chem Pharm Bull* 1990;38: 432.

INHIBITION OF PROTEIN KINASE C BY STILBENOIDS

G Xu, LP Zhang*, LF Chen and CQ Hu*

(Department of Biochemistry, School of Basic Medical Sciences, *Department of Chemistry of Natural Drugs, School of Pharmacy, Shanghai Medical University, Shanghai 200032)

ABSTRACT The effect of 15 stilbenoids on protein kinase C (PKC) was studied in order to search for naturally occurring PKC inhibitors. All these compounds were isolated from Chinese medicines. Three oligomeric stilbenes from *Caragana sinica*, α -viniferin, kobophenol A and miyabenol C, were shown to intensely inhibit the activity of partially purified rat brain PKC with IC_{50} values of 62.5, 52.0, and 27.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. Kinetic analyses revealed that the inhibition was noncompetitive. The other compounds also showed the effect. Monomer stilbenes exhibited PKC inhibitory activity at higher $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ concentrations than oligomeric stilbenes. Whenever they are methylated or acetylated perfectly, the inhibition weakens or disappears.

Key words Stilbenoids; Protein kinase C; *Caragana sinica*