

黄色黄素抑制人白血病 HL-60 细胞内蛋白激酶 CK2 的实验研究^{*}

林小聪¹⁾ 刘新光^{1)**} 阮 杰¹⁾ 陈小文^{1,2)} 梁念慈¹⁾

(¹⁾ 广东医学院生物化学与分子生物学研究所, 湛江 524023; ²⁾ 深圳市儿童医院儿科研究所, 深圳 518026)

摘要 蛋白激酶 CK2 在寻找抗肿瘤及抗病毒药物方面是一个具有吸引力的分子靶点, 其特异性抑制剂具有潜在的临床应用价值. 通过测定药物作用后转移到 CK2 底物上[γ -³²P]ATP 的放射性活度, 探讨黄色黄素对重组人 CK2 全酶以及细胞内 CK2 活性的影响; 采用多重 RT-PCR 检测 CK2 α 、 α' 和 β 亚基的 mRNA 表达水平; Lineweaver-Burk 作图法分析 CK2 的酶动力学机制. 发现黄色黄素能显著抑制重组人 CK2 全酶($IC_{50}=0.86 \mu\text{mol/L}$)以及 HL-60 细胞内的 CK2 活性, 其作用效果均强于阳性对照 TBB. 另外, 黄色黄素作用 2h 可使 CK2 α 和 α' 亚基的 mRNA 表达下降, 对 β 亚基则无明显的影响. 酶动力学分析表明, 黄色黄素与 ATP 呈竞争性抑制 CK2 的活性, 与酪蛋白则呈混合性抑制 CK2 的活性. 研究说明, 黄色黄素是一种有效的细胞内蛋白激酶 CK2 抑制剂.

关键词 蛋白激酶 CK2, 黄色黄素, HL-60 细胞

学科分类号 Q555⁺.7, Q814.9, R963

蛋白激酶 CK2, 又可称为酪蛋白激酶 2 或 II (casein kinase 2 or II), 是一种在真核细胞中普遍存在的多功能的丝 / 苏氨酸蛋白激酶. 全酶是由 2 个催化亚基(α 和 / 或 α')及 2 个调节亚基(β)所组成的异源四聚体, 主要有 $\alpha_2\beta_2$ 、 $\alpha'_2\beta_2$ 或 $\alpha\alpha'\beta_2$ 3 种形式^[1,2]. 与别的蛋白激酶不同, CK2 既能利用 ATP 又能利用 GTP 作为磷酸供体, 而且具有罕见的高基础活性^[1,2]. CK2 的 α 和 α' 基因可能是原癌基因^[3]. 在许多实体瘤、白血病和病毒感染性疾病的细胞中蛋白激酶 CK2 的活性均增高^[4,5]. 某些肿瘤组织中, CK2 活性的增高可能与其瘤细胞的分化程度及一些侵袭性行为如转移等有关^[4]. 有研究表明, CK2 与 HIV-1 的生命周期关系十分密切, CK2 可在 HIV-1 的复制、转录及裂解细胞等功能的调控中起重要作用, 一些 CK2 抑制剂具有抗 HIV-1 活性^[6]. 最近, Sarno 等^[7]指出: CK2 在寻找抗肿瘤及抗病毒药物方面是一个具有吸引力的分子靶点, 其特异性抑制剂具有潜在的临床应用价值. 为了寻找有效的 CK2 抑制剂, 我们曾观察 22 种化合物(其中异喹啉类 4 种, 苯并咪唑 / 苯并三唑及其类似物 4 种, 葱醌类 9 种及黄酮类 5 种)对体外重组人 CK2 全酶活性的影响, 从中筛选出 11 种体外对 CK2 有明显抑制作用的化合物, 其中黄色黄素的作用效果最强. 但目前尚无黄色黄素作用于蛋白激酶 CK2 的报道.

黄色黄素是一种从败酱科植物黑水缬草以及玄参科植物金鱼草中所提取的黄酮类化合物, 为金黄色结晶性固体, 不溶于水, 而溶于甲醇、乙醇、二甲基亚砜(DMSO)等有机溶剂, 具有抗炎、抗菌、抗病毒、降血脂等多种生物学活性^[8,9]. 为了进一步筛选细胞内的 CK2 抑制剂, 本文以黄色黄素作为研究对象, 探讨其对人白血病 HL-60 细胞内蛋白激酶 CK2 的抑制作用及其机制, 为寻找新型的抗肿瘤和抗病毒药物奠定良好的基础.

1 材料与方法

1.1 药品及主要试剂

黄色黄素(溶于 DMSO, DMSO 终浓度 $\leq 0.1\%$)为 Aldrich 公司产品; 四溴 -2- 氮杂苯并咪唑(TBB)(溶于 DMSO, DMSO 终浓度 $\leq 0.1\%$)由波兰 Shugar 教授惠赠; 5,6- 二氯 -1- β - 呋喃糖苯并咪唑(DRB)为 Calbiochem 公司产品; 组蛋白 III S、多聚谷氨酸和酪氨酸复合物(Poly(Glu : Tyr) 4 : 1)、肝素、精胺、二巯基苏糖醇(DTT)、苯甲基磺酰氟(PMSF)以及多肽底物 R₃AD₂SD₅ 购自 Sigma 公司; P81 磷酸

^{*}教育部科学技术研究重点项目(03096).

^{**} 通讯联系人. Tel: 0759-2388535, E-mail: xgliu@gdmc.edu.cn

收稿日期: 2006-07-16, 接受日期: 2006-08-16

纤维素滤纸为 Whatman 产品; $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 为北京福瑞生物医学工程公司生产; Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司; 一步法 RT-PCR 反应试剂盒为 QIAGEN 公司产品; 其余为国产分析纯试剂.

1.2 克隆、表达和纯化人 CK2 α' 和 β 亚基

人 CK2 α' 和 β 亚基 cDNA 重组质粒 pTCKA' 和 pTCKB 的克隆与测序见文献[10,11]. 重组人 CK2 α' 和 β 亚基的原核表达、纯化与鉴定参见文献[10,12].

1.3 体外重组人 CK2 的活性测定

酶反应总体积为 35 μl , 反应混合液中含 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.2, 150 mmol/L KCl, 10 mmol/L MgCl_2 , 10 $\mu\text{mol/L}$ ATP, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ $1.85\times 10^4\text{Bq}$ (比活 $1.85\times 10^{17}\text{Bq/mol}$), 去磷酸化酪蛋白 2 g/L. 反应温度为 30 $^{\circ}\text{C}$. 将纯化的重组人 CK2 α' 与 β 亚基按等摩尔(14 pmol)混合构成重组人 CK2 全酶. 加 10 μl 重组 CK2 全酶启动酶反应, 反应 10 min 后取 30 μl 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 $^{\circ}\text{C}$ 烤干后, 加闪烁液于液闪仪计数, 每组同时做 3 个平行管. CK2 的酶活性以 pmol/min 表示, 代表每分钟催化 1 pmol $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 上的 ^{32}P 转移到底物上所需的酶量.

1.4 细胞与细胞培养

人早幼粒细胞白血病 HL-60 细胞系购自中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所. HL-60 细胞培养于含有 10% 灭活的超级新生牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 RPMI1640 完全培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度孵箱中孵育, 隔天换液, 每 2~4 天传代 1 次.

1.5 台盼蓝拒染法检测细胞增殖

取对数生长期的 HL-60 细胞, 调整细胞浓度为 $2.0\times 10^5/\text{ml}$, 接种于 24 孔板. 细胞经黄色黄素处理后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度孵箱中孵育, 然后按 1:10(体积比)加入 0.4% 的台盼蓝, 染色 2~3 min, 每组同时做 3 个平行孔, 在光学显微镜下做活细胞记数, 绘制生长曲线, 计算细胞增殖抑制率.

1.6 细胞总蛋白的提取和定量

取对数生长期细胞, 调整细胞浓度为 $1.0\times 10^6/\text{ml}$, 接种于 6 孔板. 黄色黄素作用细胞 2 h 后, 1 000 r/min 离心 5 min 收集细胞; D-hank's 洗涤 2 次, 按 100 μl /孔加入细胞裂解液(含 40 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 1 mmol/L EDTA, 125 mmol/L

NaCl, 1% NP-40(体积比), 1 mmol/L Na_3VO_4 , 1 mmol/L DTT, 1 mg/L 抑胰肽酶, 1 mg/L 抑胃酶素, 1 mg/L 亮肽酶素和 1 mmol/L PMSF), 以旋涡混合器剧烈振荡, 置于碎冰上冰浴 30 min, 然后 4 $^{\circ}\text{C}$, 13 000 g 离心 20 min. 上清液转移至另一 EP 管, 取少量上清以 BSA 作标准蛋白, 按常规的考马斯亮蓝法进行蛋白质定量, 其余保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 备用, 3 天内有效.

1.7 细胞内 CK2 的活性测定

酶反应总体积为 35 μl , 反应混合液中含 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.2, 150 mmol/L KCl, 10 mmol/L MgCl_2 , 10 $\mu\text{mol/L}$ ATP, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ $3.7\times 10^4\text{Bq}$ (比活 $1.85\times 10^{17}\text{Bq/mol}$)和 1 mmol/L CK2 特异性多肽底物 $\text{R}_3\text{AD}_3\text{SD}_3$. 反应温度为 30 $^{\circ}\text{C}$. 每反应管加入 20 μl 细胞提取总蛋白(含等量细胞总蛋白 4 μg /管), 以 15 μl 反应混合液启动酶反应, 每组同时做 6 个平行管. 其余的处理与体外重组人 CK2 的活性测定相同.

1.8 多重反转录 PCR 检测 CK2 各亚基 mRNA 表达

用 Trizol 试剂抽提 HL-60 细胞总 RNA 并进行 RNA 定量. 按 QIAGEN 一步法 RT-PCR 反应试剂盒说明书进行 cDNA 的合成以及 PCR 扩增. 反应条件为: 50 $^{\circ}\text{C}$ 反转录 30 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 热激活 15 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min. 反应体系用 β -actin 作为内参照. 引物用 DNASTar 软件进行设计, 由上海生工生物工程公司合成. CK2 α' 上游引物: 5' TGA AGC CAG TGA AGA AAA AGA AGA 3'; 下游引物: 5' TAA CAT ACA GCC CAA ACT CCA CAT 3'; 扩增产物长度为 458 bp. CK2 β 上游引物: 5' ATC CAC GCC CGC TAC ATC CTT A 3'; 下游引物: 5' ACC GTA GAG CCT GGG CAC AAA CT 3'; 扩增产物长度为 321 bp. CK2 α 上游引物: 5' GTG GTG GAA TGG GGA AAT CAA GA 3'; 下游引物: 5' GTA TCG GGA AGC AAC TCG GAC AT 3'; 扩增产物长度为 501 bp. β -actin 上游引物: 5' AGG CCA ACC GCG AGA AGA TG 3', 下游引物: 5' CGG CCA GCC AGG TCC AGA 3', 扩增产物长度为 211 bp. PCR 产物于 2% 琼脂糖凝胶电泳观察拍照, 并用图像分析软件 Labwork 进行光密度积分值分析.

1.9 体外重组人 CK2 的酶动力学分析

选择 3 种不同浓度的黄色黄素(0, 1, 2 $\mu\text{mol/L}$)进行实验分组. 在固定酪蛋白浓度为 2 g/L、

ATP浓度为 10, 20, 40, 80 $\mu\text{mol/L}$ 情况下, 测定体外重组人 CK2 的活性(相当于反应速度). 或在固定 ATP 的浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 、改变酪蛋白浓度(1, 2, 4, 8 g/L)条件下, 测定重组人 CK2 活性. 每个样品同时做 3 个平行管, 采用 Lineweaver-Burk 作图法求出酶动力学参数表观 K_m 和表观 $V_{\max}$, 以此判断黄色黄素对 CK2 抑制作用类型.

1.10 统计学分析

以 SPSS 11.0 软件做统计学数据处理, 实验结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组资料采用 one-way ANOVA 分析, 组间的比较用 Dunnett's t 检验.

2 结 果

2.1 重组人 CK2 全酶的性质鉴定

将重组人 CK2 α' 与 β 亚基等摩尔(14 pmol)混合后构成的重组全酶, 具有与天然 CK2 一致的性质, 可用酪蛋白作底物. 而用组蛋白III S 和 TPK 的底物 Poly(Glu : Tyr)4 : 1 作底物时, CK2 的活性则很低(表 1). 另外, 重组人 CK2 全酶的活性受到肝素和 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 2).

Table 1 Recombinant human CK2 holoenzyme activity was assayed under the different kinds of substrate

Group	Substrate	CK2 activity /(pmol•min ⁻¹)	% of control
1	Casein 2 g/L (control)	2.99±0.15	100.0
2	Histone (0.5 g/L)	0.34±0.10**	11.2
3	Poly(Glu : Tyr) (0.4 g/L)	0.05±0.03**	1.7

** $P<0.01$ compared with control. $n=3$ in each group.

Table 2 Effect of six additives on recombinant human CK2 holoenzyme

Group	Additives	CK2 activity /(pmol•min ⁻¹)	% of control
1	None (control)	2.99±0.15	100.0
2	Heparin (8 mg/L)	1.36±0.13**	45.6
3	DRB (40 $\mu\text{mol/L}$)	1.26±0.04**	42.2
4	Spermine (2.5 mmol/L)	4.22±0.13**	141.2
5	Ca^{2+} (5 mmol/L)	2.91±0.14	97.2
6	cAMP (10 $\mu\text{mol/L}$)	3.15±0.09	105.4
7	cGMP (10 $\mu\text{mol/L}$)	2.98±0.18	99.5

** $P<0.01$ compared with control. $n=3$ in each group.

2.2 TBB 和黄色黄素对重组人 CK2 全酶活性的影响

向反应体系中分别加入 0.50、0.75、1.00、1.25、1.50、2.00 $\mu\text{mol/L}$ 的 TBB 和黄色黄素, 实验结果表明, TBB 和黄色黄素对重组人 CK2 全酶有较强的抑制作用. TBB 的抑制率分别为(28.7±

10.7) %、(36.9±5.8) %、(43.0±14.7) %、(58.1±7.7) %、(66.8±9.4) %、(78.3±5.1) %; 黄色黄素的抑制率分别为(38.5±1.6) %、(45.9±0.6) %、(49.3±7.2) %、(53.6±5.6) %、(66.5±3.9) %、(84.1±4.3) %, 且随着其浓度的不断增加 CK2 全酶活性逐渐降低, 呈现浓度依赖性关系(图 1). 根据半数效量概率单位

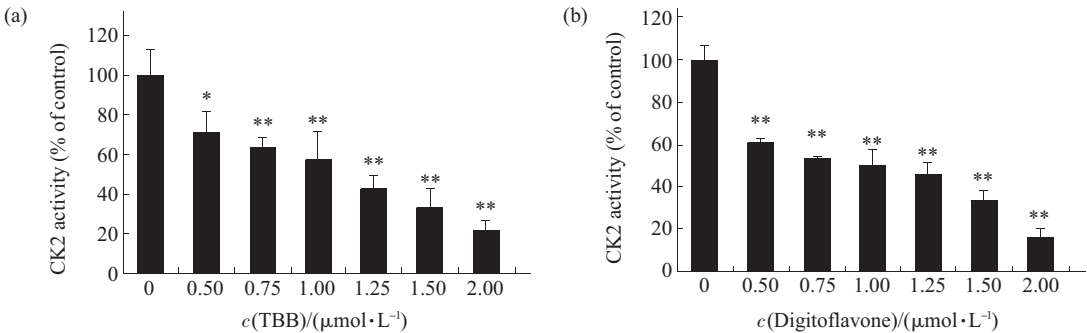


Fig. 1 Effects of digitoflavone on recombinant CK2 holoenzyme activity

Recombinant human CK2 holoenzyme was treated with the indicated concentrations of (a) TBB, (b) digitoflavone. Enzymatic assays were carried out as indicated in **Materials and methods**. Each bar displays the $\bar{x}\pm s$ of the percentage of control CK2 activity from three tubes. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with control.

法^[13]计算的 IC_{50} 值分别为 $0.96 \mu\text{mol/L}$ 和 $0.86 \mu\text{mol/L}$, 由此可见, 黄色黄素对重组人 CK2 全酶的作用效果要强于 TBB.

2.3 台盼蓝拒染法检测黄色黄素对 HL-60 细胞体外增殖的影响

选取不同的时间, 应用台盼蓝拒染法对黄色黄素作用后 HL-60 细胞的体外生长作连续的时效以及量效观察. 实验结果表明(图 2): $10 \sim 80 \mu\text{mol/L}$

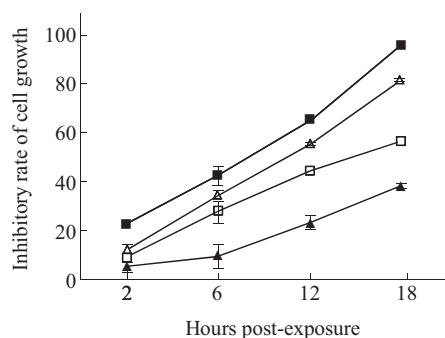


Fig. 2 Effects of digitoflavone on the growth of HL-60 cells
HL-60 cells were treated for the indicated times with 10 (▲—▲), 20(□—□), 40 (△—△) and 80 (■—■) $\mu\text{mol/L}$ of digitoflavone

的黄色黄素作用后, HL-60 细胞的体外增殖受到明显的抑制, 并呈现剂量依赖性和时间依赖性关系. $10, 20, 40, 80 \mu\text{mol/L}$ 的黄色黄素作用 18 h 对细胞增殖的抑制率分别为 $(38.2 \pm 2.0) \%$, $(56.5 \pm 2.5) \%$, $(81.5 \pm 1.2) \%$ 和 $(95.8 \pm 2.1) \%$.

2.4 TBB 和黄色黄素对 HL-60 细胞内 CK2 活性的影响

分别用不同浓度($10, 20, 40$ 和 $80 \mu\text{mol/L}$) 的 TBB 和黄色黄素作用于 HL-60 细胞 2h, 然后裂解细胞提取总蛋白, 取等量的 $4 \mu\text{g}$ 总蛋白测定细胞内 CK2 活性. 结果表明: TBB 和黄色黄素对 HL-60 细胞内的 CK2 活性均有明显的抑制作用, 且随其浓度的不断增加, 对 CK2 活性的抑制率逐渐升高. TBB 的抑制率分别为 $(4.7 \pm 5.9) \%$, $(11.8 \pm 6.3) \%$, $(25.0 \pm 8.6) \%$, $(42.2 \pm 5.5) \%$; 黄色黄素的抑制率分别为 $(24.4 \pm 6.1) \%$, $(31.3 \pm 3.7) \%$, $(49.6 \pm 10.2) \%$, $(73.2 \pm 2.6) \%$, 呈现剂量依赖性关系; 在同等浓度条件下黄色黄素对细胞内 CK2 活性的抑制率均大于 TBB, 由此可见, 黄色黄素的作用效果要强于 TBB (图 3).

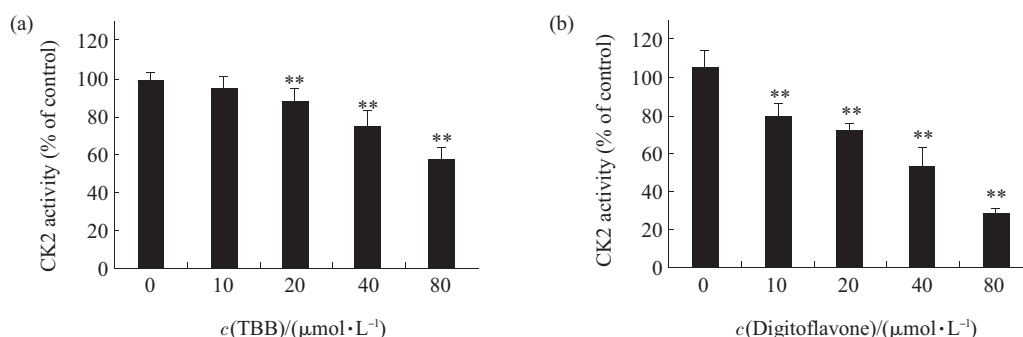


Fig. 3 CK2 activity in lysates of HL-60 cells treated with increasing concentrations of TBB and digitoflavone
HL-60 cells were treated for 2 h with the indicated concentrations of (a) TBB, (b) digitoflavone. Lysates were then assayed for CK2 activity, measured towards the specific peptide $R_3AD_2SD_5$, as described in the **Materials and methods** section. The activity of control cells, treated with solvent, was considered to be 100%. The data were obtained from a single experiment repeated at least six times with similar results. Each bar displays the $\bar{x} \pm s$ of the percentage of control CK2 activity from six tubes. ** $P < 0.01$ compared with control.

2.5 黄色黄素对 CK2 各亚基 mRNA 表达的影响

$80 \mu\text{mol/L}$ 的黄色黄素作用于 HL-60 细胞 2 h 后, 用多重 RT-PCR 的方法检测 CK2 α 、 α' 和 β 亚基的 mRNA 表达情况(图 4), 图像经 Labwork 软件

进行光密度分析(图 5). 结果显示: 与内参照 β -actin 比较, 黄色黄素可以使 CK2 α 亚基的 mRNA 表达减少, α' 亚基的表达轻度下降, 对 β 亚基则无明显的影响.

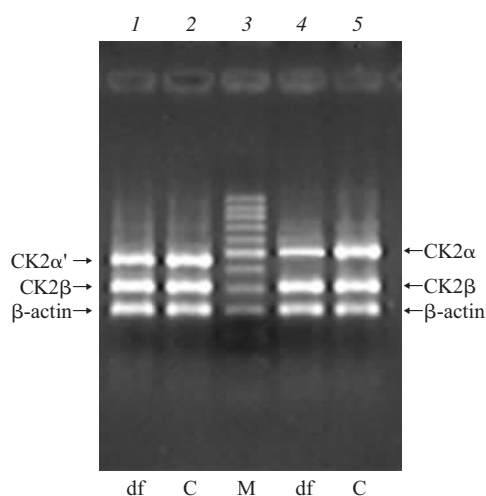


Fig. 4 Effect of digitoflavone on the expression of CK2 α , α' and β subunit mRNA

HL-60 cells were treated for 2 h as follows: control (C; lane 2 and lane 5) or 80 $\mu\text{mol/L}$ digitoflavone (df; lane 1 and lane 4). Cells were lysed and total cellular RNA were extracted. Each isolated RNA sample (1 μg) was then subjected to multiplex RT-PCR. Lane 1 and lane 2 were the PCR products of β -actin (211 bp), CK2 α' (458 bp) and CK2 β (321bp). Lane 3 (M) was 100~1000 bp DNA marker, but the band of 100 bp can not be showed. Lane 4 and lane 5 were the PCR products of β -actin, CK2 α (501 bp) and CK2 β . The arrows indicate the position of these products.

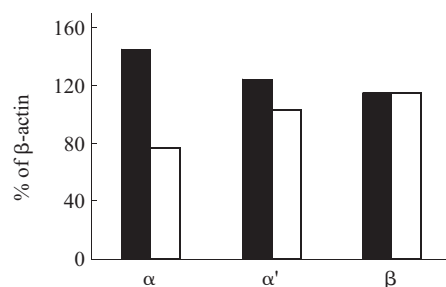


Fig. 5 Densitometric analysis of CK2 α , α' and β subunits multiplex RT-PCR products after treated for 2 h with digitoflavone

Digitoflavone: 0 $\mu\text{mol/L}$ (■); 80 $\mu\text{mol/L}$ (□).

2.6 体外酶动力学分析黄色黄酮对 CK2 直接作用的机制

2.6.1 在不同 ATP 浓度情况下, 黄色黄酮对重组人 CK2 全酶抑制作用的酶动力学分析. 在固定酪蛋白浓度、改变 ATP 的浓度条件下, 进行黄色黄酮对 CK2 的酶动力学研究. 实验结果表明(图 6): 黄色黄酮与 ATP 呈竞争性抑制重组人 CK2 活性, 相应表观 K_m 分别为 6.74、38.89 和 102.43 $\mu\text{mol/L}$, $V_{\max}$ 分别为 28.57、31.25 和 28.57 pmol/min , 根据这些数据计算的抑制常数 K_i 为 0.19 $\mu\text{mol/L}$.

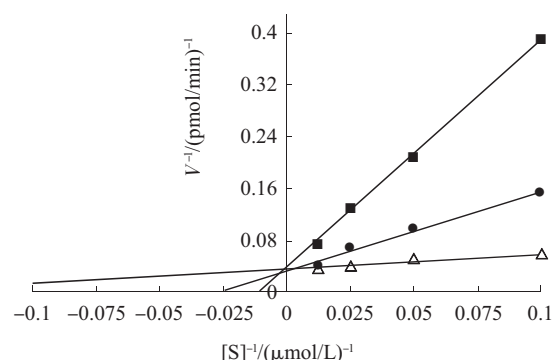


Fig. 6 Lineweaver-Burk plot for kinetic analysis of digitoflavone inhibitory effect on recombinant human CK2 holoenzyme

Digitoflavone: 0 $\mu\text{mol/L}$ ($\triangle$ — $\triangle$); 1 $\mu\text{mol/L}$ ($\bullet$ — $\bullet$); 2 $\mu\text{mol/L}$ ($\blacksquare$ — $\blacksquare$). Casein was at fixed concentration (2 g/L), but ATP was changed at indicated concentrations. Each value represents the mean of the three separate experiments.

2.6.2 在不同酪蛋白浓度情况下黄色黄酮对重组人 CK2 全酶抑制作用的酶动力学分析. 在固定 ATP 的浓度、改变酪蛋白浓度情况下, 进行黄色黄酮对 CK2 的酶动力学研究. 实验结果表明(图 7): 黄色黄酮与酪蛋白呈现以非竞争为主的混合型抑制重组人 CK2 活性, 相应表观 K_m 分别为 0.25、0.88 和 1.17 $\mu\text{mol/L}$, $V_{\max}$ 分别为 38.46、15.87 和 7.46 pmol/min , 根据这些数据计算的抑制常数 K_i 为 0.11 $\mu\text{mol/L}$.

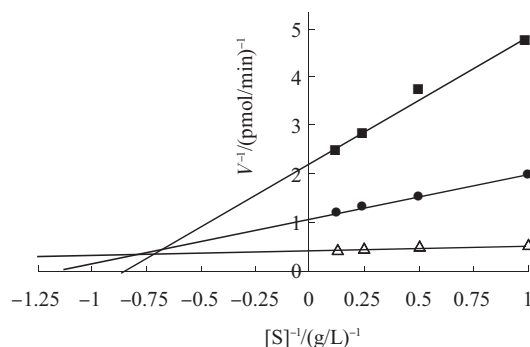


Fig. 7 Lineweaver-Burk plot for kinetic analysis of digitoflavone inhibitory effect on recombinant human CK2 holoenzyme

Digitoflavone: 0 $\mu\text{mol/L}$ ($\triangle$ — $\triangle$); 1 $\mu\text{mol/L}$ ($\bullet$ — $\bullet$); 2 $\mu\text{mol/L}$ ($\blacksquare$ — $\blacksquare$). ATP was at fixed concentration (10 $\mu\text{mol/L}$), but casein was changed at indicated concentrations. The each value represented the mean of the three separate experiments.

3 讨 论

蛋白激酶 CK2 是一种多功能的丝 / 苏氨酸蛋白激酶. 最近有学者指出, 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^[7,14]. 我们通过基因工程方法获得大量有生物学活性的重组人 CK2 α' 和 β 亚基, 然后将 α' 和 β 亚基按等摩尔混合构成重组人 CK2 全酶^[10-12]. 全酶的性质鉴定表明, 重组人 CK2 全酶具有与天然 CK2 一致的性质, 我们以此作为基础来进行以 CK2 作为分子靶点的抑制剂的体外筛选. 然后将筛选到的对重组人 CK2 活性具有抑制作用的化合物作用于肿瘤细胞, 进一步筛选细胞内的 CK2 抑制剂. 这样既可以避免药物筛选的盲目性、提高筛选的效率, 又可以大大地节省成本和工作量.

蛋白激酶 CK2 可在细胞中起重要的生理功能. 它的一个重要特征就是可磷酸化的蛋白质底物达 300 余种^[13], 且数量还在不断增加, 这是其他蛋白激酶所没有的. 这些底物在 DNA 复制与转录、RNA 加工与翻译、细胞代谢与运动、细胞增殖与分化、癌基因与抑癌基因的调节等方面起重要作用, 而且有些底物是细胞复杂的信号与加工网络系统的重要组成部分^[14,15]. 因此, CK2 被认为具有重要的生命功能, 在细胞调节中处于中心地位^[15].

作为在真核细胞增殖和分化的信号传导途径中起重要作用的 CK2, 利用卤代苯并咪唑/苯并三唑衍生物以及来源于植物有效成分的黄酮类化合物, 去筛选细胞内的 CK2 抑制剂并研究其抗肿瘤作用, 正日益受到重视. Ruzzene 等^[16]发现, 四溴-2-氮杂苯并咪唑(TBB)能够显著地抑制人 T 淋巴细胞白血病 Jurkat 细胞内的 CK2 活性, 抑制细胞的增殖并诱导细胞凋亡. 体外的酶动力学分析表明, TBB 主要是与 ATP 呈竞争性抑制 CK2 的活性^[17,18]. X 射线衍射晶体结构解析提示, TBB 分子凭借其大小与形状陷入 CK2 与 ATP 结合的活性位点, 几乎是完美地填满了 CK2 的疏水性口袋, 从而抑制 CK2 的活性^[7]. Farah 等^[19]的研究表明, 苯并三唑衍生物 5, 6-二氯-1- β -D-呋喃核糖苯并咪唑(DRB)和黄酮类化合物芹黄素, 均可通过抑制 CK2 以及抑制 CK2 所介导的核转录因子 NF- κ B 的激活, 从而诱导结肠癌 HT-29 和 HCT-116 细胞凋亡. 另外, Hessenauer 等^[20]也发现, 芹黄素可在较低的浓度下, 以剂量依赖性的方式抑制细胞内 CK2 的活性和诱导激素耐受性的前列腺癌 PC-3 细胞凋亡. 此外 CK2 成为 HIV-1 转录抑制剂的选择性靶点, 从而将 CK2 的抑制剂与 HIV 的防治联系起来, 引起人们的广泛重视^[21,22].

白血病是一种常见的恶性肿瘤, 占我国癌症总发病数的 5%, 对人体有极大的危害. CK2 与淋巴瘤、白血病等血液系统肿瘤关系密切, 有研究发现, 急性白血病细胞比相应的正常细胞, 其 CK2 活性升高了 3~5 倍^[4]. 另外, 转基因小鼠淋巴细胞中的 CK2 α 亚基的失控表达可导致淋巴瘤, CK2 α 亚基与原癌基因 c-Myc 共表达或在 p53 表达被改变条件下, CK2 α 基因的表达可促进急性淋巴性白血病的发生^[2]. 因此, 我们选择人早幼粒细胞白血病 HL-60 细胞株作为实验模型, 考察黄色黄酮对细胞内 CK2 的抑制作用.

由于黄色黄酮含有多个酚羟基且具有较强的抗氧化作用, 其在细胞内也可还原 MTT 从而干扰显色反应(结果省略, 可提供数据), 因此本实验选择台盼蓝拒染法作为细胞增殖的检测方法. 由于细胞内 CK2 的含量较少、活性较低, 再加上受试的黄色黄酮对 HL-60 细胞增殖的抑制作用明显, 因此我们参考 Ruzzene 等^[16]的方法, 选择较短的药物作用时间 2 h 来测定细胞内的 CK2 活性.

TBB 是目前已知的对体外以及细胞内 CK2 活性均有很强抑制作用的特异性抑制剂^[16,17]. 我们的研究表明, 它对体外重组人 CK2 活性抑制作用的 IC_{50} 值为 0.96 μ mol/L. Sarno 等^[17]曾研究 TBB 对 33 种蛋白激酶的抑制作用, 发现 TBB 仅对 CK2 有明显的抑制作用, 而对其他蛋白激酶的抑制作用较弱或无抑制作用. DRB 和 N-(2-氨基乙基)-5-氯萘-1-磺胺(A3)也是目前公认的 CK2 抑制剂^[14,19,23~25]. 我们以前的研究表明^[26], DRB 和 A3 对重组人 CK2 全酶有较强的抑制作用, 其 IC_{50} 值分别为 10.4 μ mol/L 和 25.5 μ mol/L, 作用效果弱于 TBB. 因此, 我们选择 TBB 作为阳性对照来考察黄色黄酮对重组人 CK2 活性以及 HL-60 细胞内 CK2 活性的影响. 本实验我们观察到, 黄色黄酮对重组人 CK2 全酶的抑制效果(IC_{50} =0.86 μ mol/L)要强于 DRB、A3 和阳性对照 TBB.

我们曾观察 22 种化合物对体外重组人 CK2 全酶活性的影响, 筛选出 11 种体外对 CK2 有明显抑制作用的化合物(5-氯苯并三唑、2-羧基蒽醌、醌茜、1, 2-二氢蒽醌、1, 8-二羟蒽醌、米托蒽醌、3, 6-二羟黄酮、黄色黄酮、山奈酚、大豆甾元和黄芩素, 其 IC_{50} 分别为 22.24、0.81、61.26、8.81、28.76、0.66、27.23、0.86、1.88、2.38、2.54 μ mol/L), 然后将筛选到的这些化合物作用于白血病 HL-60 细胞, 观察它们对细胞内 CK2 活性的影响, 仅发

现黄色黄素和山奈酚(文章另发)对内源性 CK2 活性有明显的抑制作用. 另外, 我们以前的研究也表明, 7 种酪氨酸蛋白激酶抑制剂 Tyrphostin AG372, AG34, AG213, AG1112, AG1109, AG114, AG1478 以及 2 种黄酮类化合物槲皮素、槲皮素-7- 硫酸酯钠盐对重组人 CK2 活性均有较强的抑制作用, 其 IC_{50} 分别为 0.64、1.02、1.12、6.01、9.68、20.79、25.86、0.52 和 1.37 $\mu\text{mol/L}$ ^[27~29]; 但它们对 HL-60 细胞内的 CK2 活性均没有明显的影响. 究其原因可能有两个方面: a. 蛋白激酶 CK2 在细胞内含量较低, 受试化合物在细胞内可能大部分都与其他靶酶或靶蛋白结合, 从而减弱了它们对细胞内 CK2 活性的抑制作用; b. 细胞膜通透性以及抑制剂通过组织的转运效力, 抑制剂的半衰期, 抑制剂在膜和液相中的分配等等, 也会影响到药物对 CK2 的作用效果.

本实验观察到, 黄色黄素可明显抑制 HL-60 细胞内 CK2 的活性并呈剂量依赖性关系, 其作用效果强于阳性对照 TBB. 多重 RT-PCR 的结果表明, 黄色黄素作用 2 h 可使 CK2 α 和 α' 亚基的 mRNA 表达下调, 这揭示了黄色黄素所引起的细胞内 CK2 活性下降可能与 α 和 α' 亚基的 mRNA 表达下调有关.

虽然 CK2 既能以 ATP 也能以 GTP 作为磷酸供体, 但由于其抑制剂多数作用于 ATP 的结合位点, 如 CK2 的卤代苯并咪唑类抑制剂 DRB, 它可以通过封闭 ATP 结合位点中的主要核糖锚定位点, 使 ATP 的核糖环具有较大的流动性, 从而抑制 CK2 的活性^[29], 因此, 我们选用 ATP 作为磷酸供体测定 CK2 的活性. 本实验的酶动力学结果表明, 黄色黄素与 ATP 呈竞争性抑制($K_i=0.19 \mu\text{mol/L}$), 而与酪蛋白则呈非竞争性为主的混合型抑制重组人 CK2 活性($K_i=0.11 \mu\text{mol/L}$). 这揭示了黄色黄素所诱导的细胞内 CK2 活性下降也可能与其阻碍酶与 ATP 及底物的结合有关. 另外, 有研究显示, TBB、芹黄素以及 DRB 均与 ATP 呈竞争性抑制 CK2 的活性, 根据 Lineweaver-Burk 作图法所计算的 K_i 值分别为 0.40、0.74 和 4.50 $\mu\text{mol/L}$ ^[30]. 由此可见, 它们的 K_i 值均大于黄色黄素($K_i=0.19 \mu\text{mol/L}$), 说明黄色黄素对 CK2 ATP 结合位点的竞争性抑制作用要强于目前已知的 CK2 抑制剂 TBB、芹黄素以及 DRB. 本文的结果提示黄色黄素是一种有效的细胞内蛋白激酶 CK2 抑制剂.

参 考 文 献

- Litchfield D W. Protein kinase CK2: Structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem J*, 2003, **369**(Pt1):1~15
- 黄功华, 刘新光, 梁念慈. 蛋白激酶 CK2 的研究进展. *生命的化学*, 2003, **23**(3):169~171
Huang G H, Liu X G, Liang N C. *Chemistry of Life*, 2003, **23**(3):169~171
- Xu X, Landesman-Bollag E, Channavajhala P L, *et al.* Murine protein kinase CK2: gene and oncogene. *Mol Cell Biochem*, 1999, **191** (1~2): 65~74
- Tawfic S, Yu S, Wang H, *et al.* Protein kinase CK2 signal in neoplasia. *Histol Histopathol*, 2001, **16**(2):573~582
- Landesman-Bollag E, Song D H, Romieu-Mourez R, *et al.* Protein kinase CK2: signaling and tumorigenesis in the mammary gland. *Mol Cell Biochem*, 2001, **227**(1-2):153~165
- 李春梅, 刘新光, 梁念慈. 蛋白激酶 CK2 与 HIV 的生命周期. *国外医学临床生物化学与检验分册*, 2002, **23**(4):208~211
Li C M, Liu X G, Liang N C. *Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine Foreign Medical Sciences*, 2002, **23**(4):208~211
- Sarno S, Moro S, Meggio F, *et al.* Toward the rational design of protein kinase casein kinase-2 inhibitors. *Pharmacol Ther*, 2002, **93**:159~168
- 黄华艺, 查锡良. 黄酮类化合物抗肿瘤作用研究进展. *中国新药与临床杂志*, 2002, **21**(7):428~433
Huang H Y, Cha X L. *Chin J New Drugs Clin Rem*, 2002, **21**(7):428~433
- 孙文基, 绳金房. 天然活性成分简明手册. 北京: 中国医药科技出版社, 1998. 357~358
Sun W J, Sheng J F. *A brief Handbook of Bioactive Compounds From Natural Plants*. Beijing: Chinese Medical Pharmacology Science & Technology Press, 1998.357~358
- 陈小文, 刘新光, 梁景耀, 等. 人蛋白激酶 CK2 α' 亚基在大肠杆菌中的克隆、表达及其重组蛋白的纯化及性质鉴定. *中国生物化学与分子生物学报*, 2004, **20**(2): 176~182
Chen X W, Liu X G, Liang J Y, *et al.* *Chin J Biochem Mol Biol*, 2004, **20**(2): 176~182
- 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. *中国生物化学与分子生物学报*, 1999, **15**(2): 228~231
Liu X G, Liang N C, Ma J Q, *et al.* *Chin J Biochem Mol Biol*, 1999, **15**(2): 228~231
- 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. *生物化学与生物物理进展*, 2000, **27**(2): 201~205
Liu X G, Liang N C, Ma J Q. *Prog Biochem Biophys*, 2000, **27**(2): 201~205
- 杨树勤. 中国医学百科全书——医学统计学. 上海: 上海科学技术出版社, 1985. 197~202
Yang S Q. *Chinese Medical Encyclopedia: Medical Statistics*. Shanghai: Shanghai Science & Technology Press, 1985.197~202
- Blanquet P R. Casein kinase 2 as a potentially important enzyme in the nervous system. *Prog Neurobiol*, 2000, **60** (3): 211~246

- 15 Pinna L A. Protein kinase CK2: A challenge to canons. J Cell Sci, 2002, **115**(Pt 20):3873~3878
- 16 Ruzzene M, Penzo D, Pinna L A. Protein kinase CK2 inhibitor 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole (TBB) induces apoptosis and caspase-dependent degradation of haematopoietic lineage cell-specific protein 1 (HS1) in Jurkat cells. Biochem J, 2002, **364**(Pt 1):41~47
- 17 Sarno S, Reddy H, Meggio F, *et al.* Selectivity of 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole, an ATP site-directed inhibitor of protein kinase CK2 ('casein kinase-2'). FEBS Lett, 2001, **496**(1):44~48
- 18 Battistutta R, De Moliner E, Sarno S, *et al.* Structural features underlying selective inhibition of protein kinase CK2 by ATP site-directed tetrabromo-2-benzotriazole. Protein Sci, 2001, **10**(11):2200~2206
- 19 Farah M, Parhar K, Moussavi M, *et al.* 5,6-Dichlororibofuranosylbenzimidazole- and apigenin-induced sensitization of colon cancer cells to TNF-alpha-mediated apoptosis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003, **285**(5):919~928
- 20 Hossenauer A, Montenarh M, Gotz C. Inhibition of CK2 activity provokes different responses in hormone-sensitive and hormone-refractory prostate cancer cells. Int J Oncol, 2003, **22**(6):1263~1270
- 21 De Clercq E. Current lead natural products for the chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. Med Res Rev, 2000, **20**(5):323~549
- 22 De Clercq E. Molecular targets for antiviral agents. J Pharmacol Exp Ther, 2001, **297**:1~10
- 23 Guerra B, Boldyreff B, Sarno S, *et al.* CK2: A protein kinase in need of control. Pharmacol Ther, 1999, **82**:303~313
- 24 Pinna L A, Meggio F. Protein kinase CK2 ("casein kinase-2") and its implication in cell division and proliferation. Prog Cell Cycle Res, 1997, **3**:77~97
- 25 Guerra B, Issinger O G. Protein kinase CK2 and its role in cellular proliferation, development and pathology. Electrophoresis, 1999, **20**(2):391~408
- 26 刘新光, 梁念慈. AG1109 对重组人蛋白激酶 CK2 全酶的抑制作用. 癌症, 2002, **21**(2):153~157
- Liu X G, Liang N C. Chinese Journal of Cancer, 2002, **21**(2):153~157
- 27 李春梅, 刘新光. 蛋白激酶 CK2 抑制剂的研究进展. 国外医学·生理、病理科学与临床分册, 2002, **22**(6):564~548
- Li C M, Liu X G. Foreign Medical Sciences • Section of Pathophysiology and Clinical Medicine, 2002, **22**(6):564~548
- 28 刘新光, 梁念慈. 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. 中草药, 2002, **33**(7):626~629
- Liu X G, Liang N C. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2002, **33**(7):626~629
- 29 刘 文, 刘新光, 梁念慈. 槲皮素-7- 硫酸酯钠盐对重组人蛋白激酶 CK2 全酶的影响. 中国药理学通报, 2002, **18**(3):315~318
- Liu W, Liu X G, Liang N C. Chinese Pharmacological Bulletin, 2002, **18**(3):315~318
- 30 Sarno S, de Moliner E, Ruzzene M, *et al.* Biochemical and three-dimensional-structural study of the specific inhibition of protein kinase CK2 by [5-oxo-5,6-dihydroindolo- (1,2-a)quinazolin-7-yl]acetic acid (IQA) . Biochem J, 2003, **374**(Pt 3):639~646

The Study of Digitoflavone for The Inhibition of Protein Kinase CK2 in HL-60 Cells*

LIN Xiao-Cong¹⁾, LIU Xin-Guang^{1)**}, RUAN Jie¹⁾, CHEN Xiao-Wen^{1,2)}, LIANG Nian-Ci¹⁾

¹⁾ Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China;

²⁾ Pediatrics Institute of Shenzhen Children's Hospital, Shenzhen 518026, China)

Abstract Protein kinase CK2 is an attractive target for anti-neoplastic and antiviral drugs and the inhibitors of CK2 have clinical therapeutic potential. The effect of recombinant human CK2 holoenzyme activity and cellular CK2 activity by digitoflavone was assayed by detecting incorporation of ³²P of [γ -³²P]ATP into the substrate. The mRNA expression of CK2 α , α' and β subunits were detected by multiplex RT-PCR. CK2 kinetic analysis was carried out by using the Lineweaver-Burk plot. Digitoflavone was shown to inhibit strongly the activity of recombinant human CK2 holoenzyme *in vitro* (IC_{50} =0.86 μ mol/L) and endogenous CK2 in HL-60 cells, which was more effective than the positive control 4Br-2-azabenzimidazole (TBB). After being treated for 2 h with digitoflavone, the mRNA expression of CK2 α and α' subunit decreased, while β subunit was not changed

fundamentally. Kinetic studies of digitoflavone on recombinant human CK2 showed that digitoflavone acted as an inhibitor of competitive with ATP and mixed types with casein. These results indicating that digitoflavone is a potent endogenous inhibitor of protein kinase CK2.

Key words protein kinase CK2, digitoflavone, HL-60 cells

*This work was supported by Scientific Technical Research of Ministry of Education(03096).

**Corresponding author . Tel: 86-759-2388535, E-mail: xgliu@gdmc.edu.cn

Received: July 16, 2006 Accepted: August 16, 2006