蛋白激酶 C 的抑制剂

刘世英 蒋宇扬* 曹健 刘峰 马丽 赵玉芬

(清华大学化学系生命有机磷化学与化学生物学教育部重点实验室, 北京 100084; 河南工业大学, 郑州 450052; 北京生物医药研究所, 北京 100091; 清华大学深圳研究生院广东省化学生物学重点实验室, 深圳 518055)

* 联系人, E-mail: Jiangyuy@mails.tsinghua.edu.cn

摘要 蛋白激酶催化将三磷酸腺苷(ATP) γ 位磷酸基转移到蛋白质侧链的羟基上, 从而在将胞外信号透过质膜传送到细胞质以及通过核膜传送到细胞核信号途径中起重要的作用. 蛋白激酶 C(PKC)是一大类磷脂依赖的丝/苏氨酸激酶. 目前为止至少发现 12 个亚基, 各个亚基有不同的组织分布和功能. 由于它们与许多疾病有不同程度的关系, 如癌症、炎症、自免疫失调、心脏病等, 因此, 一些能够封闭 PKC 活性及阻断细胞因子与受体结合, 或干扰信号转导通路的 PKC 抑制剂就有可能开发成为新药. 为此人们致力于开发特异蛋白激酶特别是亚基特异性抑制剂用于疾病治疗. PKC 结构有 4 个保守区, 针对抑制作用不同保守位点, 以及运用不同的抑制机理, 人们已取得了一些成绩, 有些抑制剂已进入临床实验. 本文根据抑制剂与 PKC 作用位点、机理, 综述近年来 PKC 抑制剂的发展.

关键词 蛋白激酶 C 抑制剂 信号转导

蛋白激酶 C(PKC)是动物细胞内信号转导中重要的酶. 它是一族磷脂依赖的丝/苏氨酸激酶, 由二酰甘油(DAG)、 Ca^{2+} 等第二信使激活. 一旦激活, PKC 磷酸化蛋白底物并引发许多细胞内反应^[1]. 由激素、蛋白因子启动的信号转导, 经过分布于不同组织中的 PKC 的传递, 在各种生命现象中发挥着广泛而重要的作用. PKC 分子结构分为 N-端调节区和 C-端催化区, 调节区和催化区之间由一多肽连接, 当 ATP 和/或底物与催化区结合时, 这个多肽充当铰链而使调节区、催化区旋转, 但激酶二级结构不受影响^[2]. 氨基酸序列中有 4 个保守区(C1~C4), 分别与二酰甘油 Ca^{2+} , ATP 和底物结合. C1, C2 区位于调节区, C3, C4 位于催化区. 这四个保守区分别由 5 个可变区(V1~V5)隔开. 现已发现 PKC 有 12 个亚型(α , β , β , γ , δ , ϵ , ζ , η , θ , ι , λ , μ), 每个亚型有不同的组织分布和功能. 据调节区结构、激活条件不同, 将 PKC 分为四大类: Ca^{2+} 依赖型或传统型 PKC(cPKC: α , β , β , γ); 非 Ca^{2+} 依赖型或新型 PKC(nPKC: δ , ϵ , η , θ); 非典型 PKC(aPKC: ξ , ι , λ); PKC μ (介于 nPKC 和 aPKC 之间)^[3].

PKC 有着广泛的底物谱, 能使代谢途径的关键酶类、离子通道及细胞膜离子泵磷酸化, 使与信号转导有关的蛋白质磷酸化, 使调控基因表达的转录因子或翻译有关因子, 如 c-Fos, NF- κ B 等磷酸化, 从而影响内分泌腺和外分泌腺的分泌、神经递质的释放、凋亡、神经元可塑性、心肌收缩、平滑肌张力改变和代

谢途径调节, 在免疫反应及炎症过程中也起作用. PKC 还参与调控细胞的增殖与分化. 但 PKC 的过度表达与某些恶变和肿瘤转移有密切关系. 如 PKC β 的过表达导致心肌症、心脏病、糖尿病心血管综合症、癌症, PKC α 的过表达导致肿瘤的增殖和转化, PKC μ 会导致肺癌, PKC ϵ 促进肿瘤形成等^[4-7]. 因此, 寻找 PKC 抑制剂, 特别是发现有亚型特异性的 PKC 抑制剂已引起国内外的关注. 从生理角度看, 蛋白激酶抑制剂至少有 3 个抑制机理: (1) 假底物机理, (2) 腺嘌呤模拟物机理, (3) 利用除了活性位点的其他表面将酶锁定成非活性构象. 本文介绍了 PKC 抑制剂这些年的进展. 以下 PKC 抑制剂的设计是针对几个保守区的.

1 与 ATP 竞争的抑制剂

ATP 位于调节区和催化区之间的裂隙里, 通过腺嘌呤部分、铰链区残基、核糖环、C-端起始残基形成的氢键与激酶结合^[2]. 腺嘌呤环的 N-1, N-6 与和 ATP 结合的蛋白激酶铰链区的主链上的 NH 和羰基基团形成氢键, ATP 竞争性抑制剂至少采用了其中一个氢键. 铰链区没被 ATP 占用的主链上的羰基能作为氢键受体与抑制剂结合^[8]. 由于在蛋白激酶中 ATP 结合位点是一个保守位点, 所以成为人们竞相设计、合成抑制剂的作用位点, 但是因为各种不同蛋白激酶

图1 星型孢菌素及类似物的化学结构式

的ATP结合位点相似(现在约有 600 种激酶), 使得其抑制剂缺乏特异性, 另一个问题是抑制剂小分子要能够到达细胞内靶分子. 对于激酶结构, 结合裂隙还有没被ATP占据的区域(疏水区), 这些区域在激酶家族之间表现出结构多样性. 基于靶向这些ATP结合位点保守性差的结构, 对于保守区域抑制剂的特异性提供了结构基础. 已经有了特异靶向特定激酶^[9]或激酶类^[10]的抑制剂^[2].

1.1 星型孢菌素(staurosporine)类抑制剂

星型孢菌素(图 1)是一类由微生物中提炼出的生物碱, 它的选择性不强, 除了抑制PKC, 它还能抑制PKA (cAMP-dependent protein kinases), PKG (cGMP-dependent protein kinases)和TPK (tyrosine protein kinases)^[11]. 改变 staurosporine 吡啶巴唑核成为 R0-31-8220 能使其特异抑制PKC, 将R0-31-8220 碱性侧链改变成如R0-32-0432, R0-32-0557 结构更加紧凑并保持其特异抑制PKC的活性. R0-32-0432 抑制胞外抗原引起的T细胞增殖, 在炎症动物模型中表现出良好的活性^[12]. PKC412 (4 -N-benzoyl staurosporine)抑制PKC特异性比staurosporine强. PKC412 正进入抗肿瘤药物的临床实验. PKC412 通过抑制黑素瘤细胞扩散和血小板聚集活性而抗肿瘤转移^[9]. PKC412 有望成为抗肿瘤转移药物^[13].

1.2 吡啶巴唑

吡啶巴唑类化合物(图 2)中Gö6 976 (2)对PKC抑制特异性最高. 除了对PKC的高特异性, Gö6976 表现出对Ca²⁺依赖的PKC- α , - β (IC₅₀ = 2~6 nmol/L)很好的亚型特异性. 但是这种化合物的溶解度很低, 生物利用度差, 使它不能得到应用^[13]. 图 3 中吡啶巴唑 5~7 在吡啶环的 2 个N原子间有含S原子在内的 3 个原子组成的桥. 用鼠脑中部分纯化的PKC测试, 其IC₅₀

分别为 2, 5, 2.4 nmol/L. 同一测试条件下 Staurosporine的IC₅₀是 6 nmol/L^[11,14].

内酰胺系列				
X = H, H	R ₁	R ₂		R ₃
Gö6976(2)	CH ₃	(CH ₂) ₂ CN		H
酰亚胺系列				
X = O	R ₁	R ₂		R ₃
Gö7612(3)	CH ₃	(CH ₂) ₂ CN		OCH ₃
Gö7874(4)	CH ₃	CH ₂ CHOHCH ₂ NMe ₂		OCH ₃

图2 吡啶巴唑类化合物的化学结构式

图3 三原子连接的吡啶巴唑类化合物的化学结构式

1.3 双吡啶马来酰胺

以 staurosporine 为先导化合物, 产生了一系列带有氨基烷基基团的双吡啶马来酰胺(图 4). 与 staurosporine 比较, GF 109203X(图 5)抑制 PKC 与其他很多激酶相比有很高的特异性. GF 109203X 和 staurosporine

图 4 双吲哚马来酰胺类化合物的化学结构式

图 5 GF 109203X 化学结构式

分子模型研究表明在N和相邻吲哚C-2形成的环成为结合阳离子取代基的理想模板,能够接近假设的胺结合位点. R0-32-0432 就是一个成功的例子. R0-32-0556 (10)和R0-32-0557 (11)比 9 的选择性更高. R0-31-6045, 是PKC抑制剂Ro 31-8220 类似物,在体内能阻止分裂素激活的蛋白激酶p70^{s6k}/p85^{s6k},双吲哚马来酰胺衍生物R0-31-6045 在体内能抑制S6K活性, $IC_{50} = 8 \mu\text{mol/L}$ [4,11,15].

图 6 双吲哚马来酰胺大环化合物的化学结构式
<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/972004-328>

1.4 双吲哚马来酰胺大环

新发现的由N,N连接的14~15元环双吲哚马来酰胺大环(图6)的PKC抑制剂也属于staurosporine家族. 与PKA相比, LY 317644 (12)和LY 326449 (13)抑制PKC的选择性强1000多倍. LY 333531 (14)是PKC- β 的特异性抑制剂. 化合物14的实验表明PKC的激活,尤其是 β 亚型,参与了糖尿病的血管综合症的发生,说明选择性地抑制PKC- β 对预防此类综合症的可行性. LY 333531, 对PKC β , 的 IC_{50} 分别是4.7, 5.9 nmol/L, 而抑制PKC其他亚型的 IC_{50} 大多了, 对PKA, 酪蛋白激酶等很多 [11,16].

1.5 单吲哚马来酰胺

将双吲哚马来酰胺R0-31-8220 (15)的1个吲哚基团从马来酰胺部位移到另一个吲哚环的C-2位置而得到的2-烷基吲哚马来酰胺(16~19)(图7)是一些最强的PKC抑制剂. 16~19是PKC- β 的特异抑制剂, 16对PKC- β 的 IC_{50} 是3 nmol/L, 比PKA($IC_{50} = 500 \text{ nmol/L}$)强的多. 化合物16在PKC- β 过表达的情况下体内、体外都有抗癌活性, 16有希望控制肿瘤形成 [11,17].

1.6 Balanol

(-)-Balanol (20)(图8)是一类真菌代谢物,它能够抑制PKC. (-)-Balanol对大多数的PKC亚型的抑制浓度在 nmol/L 范围内,但是选择性不强,在胞内活性差. 改变(-)-Balanol 结构,包括改变苯甲酮和苯胺部分的取代方式,置换中心的 perhydroazepine 环,酰胺键的取代,这些结构变化使得(-)-Balano 类似物(图9)性质得到改进. 苯甲酮部分四邻位取代类型及其酸性是很关键的. 用小环或二环取代 azepine 环得到一些活性更强的物质(21~25). 如吡咯烷(21)比 balanol 活性强. 环戊烷类似物(22)对 PKC- δ , - η 的活

图7 2-烷基咪唑马来酰亚胺化合物的化学结构式

性比balanol强,对于其他的PKC亚型二者活性一样. 化合物 23 对PKC- β , - γ 活性较强,对其他亚型与balanol活性一样. 这些环类似物如balanol对PKA的活性是相同的,而双环类似物如norbornane (24), indane (-)(25)与balanol一样抑制PKC,同时与PKA相比它们表现出对PKC的活性大35~1000倍. 26, 27也表现出很好的活性和选择性. 异戊羧氧甲基四唑衍生物(28)、苄基膦酸酯(29)、甲基酯(30)能够以亚毫摩尔的浓度抑制人类嗜中性粒细胞中PMA诱导的过氧化物的释放^[11].

图8 balanol化学结构式

1.7 N-苯基-2-嘧啶胺类衍生物

N-苯基-2-嘧啶胺类衍生物首先是作为选择性蛋白激酶C抑制剂而设计的,其中许多化合物具有良好的蛋白激酶C抑制作用,在较高的浓度时还可以抑制其他酶. 将格列维克(31)(图10)及其衍生物(32,33)进行三维图像处理并优化,得到3个三维结构,比较3个结构发现:化合物32对蛋白激酶C和蛋白激酶A有很强的抑制作用,化合物31和33与化合物32的不同之处在于前两者苯胺基的2位分别被甲基和正丙

基所取代,从而遮掩了苯胺基中的—NH—,因此可以推测:该苯胺基中的—NH—是体现对蛋白激酶C和蛋白激酶A有强大抑制作用的必需基团^[18].

1.8 Rottlerin

Rottlerin (34)(图11)是一种天然化合物,它抑制PKC δ (IC₅₀ = 5.3 μ mol/L)特异性强于其他的PKC亚型. 但其同时也能抑制酪蛋白激酶和PKA,其IC₅₀分别为30, 78 μ mol/L,比抑制PKC δ 的活性高了十倍多^[4,19].

1.9 H-series 抑制剂

这一类磺酰化合物(图12)除了抑制PKC,还抑制PKA, PKG, MLCK, CK, CK, Calmodulin kinase. CKI-7, KN62, ML-9, H-89, H-9, H-8, H-7抑制PKC的K_i分别是1000, 100, 54, 30, 18, 15, 6 μ mol/L. 磺酰化合物HA-1077抑制PKC的IC₅₀是3.3 μ mol/L,有血管扩张作用^[20].

1.9.1 萘磺酰类

W-7是发现的第一个有药效的萘磺酰化合物,在其基础上,改造结构,发现短烷基链衍生物能对MLCK, PKA, PKG抑制,而相对失去对调钙素的抑制. 在W-7衍生物中ML-9是MLCK的特异抑制剂,对调钙素无任何抑制,ML-7是由ML-9中的氯用碘取代增加了抑制MLCK的活性^[20].

1.9.2 异喹啉磺酰

将W-7中的萘环用异喹啉环代替,生成一系列异喹啉衍生物. 在异喹啉衍生物中H-7是第一个报道有相对特异性、水溶性较好的PKC抑制剂, H-7用来检验PKC在各种细胞类型中的作用. 但同时其抑制PKA, PKG活性也很好. H-9对CK, CK抑制较弱,

图9 balanol类似物的化学结构式

图10 格列维克化学结构式

将其 5-aminoethylsulfonamide链移到异喹啉环的 8 位得到的CKI-6 抑制CK₂, CK₂ 活性增加, CKI-6 氯取代的衍生物CKI-7 特异抑制CKI, CK₂ 的IC₅₀分别为 9.5, 90 μmol/L, 对PKA, Calmodulin kinase₂, PKC 抑制率小于 50%^[20].

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/972004-328>

图12 H-系列化合物化学结构式

1.9.3 1-(5-Isoquinolenesulfonyl)-Homopiperazine

HA-1077 是 *N*-(2-guanidinoethyl)-5-isoquinoline-sulfonamide 的衍生物, HA-1077 抑制 PKC 然后抑制收缩, PKC 参与了大脑内动脉痉挛, PKC 磷酸化 MLC 并与血管舒张有关^[20].

2 双底物抑制剂

将靶酶的两个底物分子合并进一个分子能使底物分子不被其他酶识别, 能提高酶的特异性. 底物分子之一若和结合穴特异结合能得到很好的特异性. 从热力学观点来看, 将两底物的结合位点融合进一个分子而与酶结合其能量与两底物单独与酶结合能量相比占优势. 总的来说, 蛋白激酶双底物抑制剂应具有以下特点才有好的活性: (1) 抑制两种底物与酶结合穴的结合; (2) 根据底物和它们与酶结合接触面的几何、取向特点设计; (3) 至少对一种酶有特异性(这一点尤其重要, 因为很多蛋白激酶的底物是相同的); (4) 有好的生物利用性并且低毒^[21].

2.1 磺胺和磺酰苯甲酰衍生物

双底物两部分之间由 2 分子 β -丙氨酸连接. 这类化合物以 IC_{50} 从 0.3 到大于 75 $\mu\text{mol/L}$ 抑制 PKA, PKC. 活性最好的化合物 45 (图 13) 中含 6 个精氨酸残基. (PKC,

PKA 的 K_i 分别是 8, 0.17 $\mu\text{mol/L}$), 只能竞争抑制 ATP. 双底物两部分之间由 $\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{CO}$ -共价连接, 如化合物 46 异喹啉-5-磺胺模拟 ATP, Ser-Arg6 模仿肽底物, PKC, PKA 的 K_i 分别是 0.1, 0.004 $\mu\text{mol/L}$, 但是发现它也和 ATP 竞争抑制酶活性^[21].

图13 磺胺衍生物的化学结构式

2.2 单喹啉马来酰胺衍生物

在马来酰亚胺环带上胺侧链成为单喹啉马来酰胺衍生物(图 14)是另一类双底物抑制剂. 47, 48 抑制

PKC的 $IC_{50} = 8 \text{ nmol/L}$, 比PKA选择性高 26 倍多. 其中 **47** 竞争ATP位置. **48** 中的arginine成为PKC识别的底物^[11].

图 14 单吲哚马来酰胺衍生物的化学结构式

2.3 腺苷-5'-端羧酸肽衍生物

这一类抑制剂将腺苷 5'-端羧酸(AdoC)通过不同的衔接(linker)基团与肽段联结.

这是表 1 中对PKC活性最好的一个化合物 **49**(图 15), 它还抑制其他激酶. 对PKA, PKC, CDPK-1 的 IC_{50} 分别是 $0.12, 0.27, 1.2 \text{ } \mu\text{mol/L}$. 对酪蛋白激酶

图 15 腺苷-5'-端羧酸肽衍生物(**49**)的化学结构式

CK1, CK2 活性低($IC_{50} > 30 \text{ } \mu\text{mol/L}$)^[22].

如果分开测试, ATP和肽段抑制活性很小甚至没有. 然而将它们用X连接起来增加了与酶的反应力, 产生抑制PKA, PKC, CDPK-1 活性. 带电荷的磷酸盐对结合亲和性并未起明显的作用. 其次, 改变脂肪族的长度, 增加了衔接基团的可变性. 这些化合物最大的抑制效应依赖于衔接基团的长度, 也依赖于所连肽链的长度^[22]. 在生理条件下这些化合物的化学性质稳定, 溶解性好. 事实上, 在增加这些小分子肽模拟物细胞膜透性方面还没有真正的进展.

3 C2 区抑制剂

PKC 被激活后, 发生转位现象, PKC 由胞浆转移到质膜上, 其 C2 区结合在特异的活化的 C 激酶受体(Receptor for Activated C Kinase RACK)上, 受体为 PKC 提供一个锚定位点接近底物. PKC 转位被认为是活化的标志之一.

3.1 Sphingolipids (鞘脂类)

Sphingosine(鞘氨醇)(**50**)(图 16)能抑制PKC, 在人类嗜中性粒细胞中表现抗炎症活性. 在鞘氨醇烯丙基 4, 5, 6 位置加入芳基如 **52~54**, 与鞘氨醇相比, 在体外能抑制PKC活性, 在体内能抗炎症. 这类类似物与PKC的反应没有立体化学特异性. Safingol (**51**)二氢鞘氨醇是PKC特异抑制剂, 其 IC_{50} 值在 mmol/L 范

表 1 腺苷-5'-羧酸肽衍生物分子式

抑制剂	连接基因 X
AdoC(β -Ala) ₂ AlaArg ₆	$\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NHCH}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{O})$
AdoC(Dpr) ₂ AlaArg ₆	$\text{NHCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{C}(\text{O})\text{NHCH}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{O})$
AdoC(β -Asp) ₂ AlaArg ₆	$\text{NHCH}_2\text{CH}(\text{COO}^-)\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}(\text{COO}^-)\text{C}(\text{O})\text{NHCH}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{O})$
AdoCGlyArg ₆	$\text{NHCH}_2\text{C}(\text{O})$
AdoC(β -Ala)Arg ₆	$\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{O})$
AdoC(GABA)Arg ₆	$\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{C}(\text{O})$
AdoC(Ahx)Arg ₆	$\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{C}(\text{O})$
AdoC(Aoc)Arg ₆	$\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{O})$
AdoC(Aun)Arg ₆	$\text{NH}(\text{CH}_2)_{10}\text{C}(\text{O})$
AdoC(Ahx)Arg ₄	$\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{C}(\text{O})$
AdoC(Ahx)Arg ₂	$\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{C}(\text{O})$
Arg ₆	—
Ac(Ahx)Arg ₆	—
Ado	—

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/972004-328>

图16 鞘氨醇(50), safingol (51)及 aryl-fused 鞘脂类化合物的化学结构式

围内. Safingol 是在 PKC 调节区与 Ca^{2+} , DAG, PS(phosphatidylserine 磷脂酰丝氨酸)竞争抑制 PKC. Safingol 成为第一个与化疗剂结合使用而投入临床试验的 PKC 特异抑制剂. Safingol 与肿瘤化疗剂治疗肿瘤的机理还不清楚^[11].

3.2 PKC 的转位抑制剂

PKC β 氨基酸序列 218~226 位的 C2 区中 RACK1 结合位点的肽段 $\beta\text{C2-4}$ (Ser-Leu-Asn-Pro-Glu-Trp-Asn-Glu-Thr) 能够抑制 PKC α 转位, 降低了胰岛素对葡萄糖的反应能力^[23]. 肽段 $\beta\text{C2-4-s}$ (Trp-Asn-pro-Glu-Ser-Leu-Asn-Thr) 不能阻止 PKC α 的转位. 实验表明 $\beta\text{C2-4}$ 能抑制 cPKC 转位. 对 Ca^{2+} 不敏感的 PKC ϵ V1 区氨基酸序列 14~21 位的与 RACK 结合的八肽衍生物 $\epsilon\text{V1-2}$ (Glu-Ala-Val-Ser-Leu-Lys-Pro-Thr) 能抑制 PKC ϵ 转位, 降低胰岛素对葡萄糖的反应能力^[23,24]. 而 $\epsilon\text{V1-2-s}$ (Leu-Ser-Glu-Thr-Lys-Pro-Ala-Val) 不能抑制 PKC ϵ 转位. $\beta\text{C2-4}$ 不能抑制依赖葡萄糖的 PKC ϵ 转位, $\epsilon\text{V1-2}$ 不能抑制 PKC β 转位. $\beta\text{C2-4}$, $\epsilon\text{V1-2}$ 两者最大的抑制活性为 5 mol/L. $\beta\text{C2-4}$ 和 $\epsilon\text{V1-2}$ 类肽抑制 PKC 是由于肽段是 PKC α , PKC ϵ 中 C2 区中相应的 RACK1, RACK 结合位点的氨基酸序列, 它们与 C2 区原 RACK1, RACK 结合位点竞争与 RACK1, RACK 结合, 使得 C2 区不能与 RACK1, RACK 结合, 抑制了 PKC α , PKC ϵ 的转位. $\beta\text{C2-1}$ (KQKTKTIK; PKC β (209-216)), $\beta\text{C2-2}$ (MDPGLSDPYVKL; βPKC (186-198)), 和 $\beta\text{C2-4}$ (SLNPEWNET; βPKC (218-226))^[25] 能和 RACK1 结合, 抑制了 C2 区与 RACK1 结合. $\beta\text{C2-1}$, $\beta\text{C2-2}$ 和 $\beta\text{C2-4}$ 特异抑制心脏肌细胞中佛波酯诱导的有 C2 区的 PKC 亚型和胰岛素诱导的

PKC β 的转位. 因此 PKC β 的 C2 区中氨基酸序列 186-198, 209-226 相应肽段是 PKC β 介导功能的特异抑制剂^[21]. 肽段 $\beta\text{IV5-3}$, β V5-3, δV1 , $\eta\text{V1-2}$, rV1 能分别特异抑制 PKC β , PKC β , PKC δ , PKC η , PKC β 转位^[4,19].

4 Isoxazolones (异唑酮)

3-Aryl-4-arylidene-5-isoxazolones (55, 56, 图 17) 是一类在亚毫摩尔浓度范围内抑制 PKC 活性强于其他激酶的化合物. 这些化合物在与 PKC 相关的免疫紊乱疾病起作用. 结合了亲电性基团的 55, 56 化合物发生共价修饰酶而抑制 PKC, 但这还没有得到证实^[11].

图17 异唑酮类化合物的化学结构式

5 假底物肽抑制剂

与 ATP 结合位点相比, 人们对底物结合位点的认识不足, 还没有将底物结合位点充分利用来设计抑制剂, 尽管与底物竞争抑制激酶的化合物和与 ATP 竞争抑制酶的 ATP 模拟物相比有优势: (1) 细胞内高 ATP 浓度减小了 ATP 模拟物效率, (2) 与底物竞争的抑制剂更有特异性^[2]. 丝/苏氨酸蛋白激酶通常识别特异性底物程度很高, 所以合成的假底物肽

直接指向蛋白底物结合位点. 此类抑制肽可以以非激酶蛋白如PKA的抑制蛋白PKI或大多数蛋白激酶的假底物序列为模型建立, 不同类激酶的假底物序列大不相同, 特定激酶不同亚型之间的假底物序列也不同, 假底物肽能特异性抑制激酶. PKC₁₉₋₃₆, PKI₆₋₂₂, CAMKII₂₉₀₋₃₀₉ 分别特异抑制依赖DAG/Ca²⁺的PKC, PKA和CaMKII. 由于这些肽透过膜能力不强, 使之不能到达细胞质里. 通过化学修饰增加其亲脂性, 可以增加其透膜性, 例如N-端豆蔻酰化. 豆蔻酰化PKC₂₀₋₂₈ (*myr* PKC₂₀₋₂₈), PKI₁₄₋₂₂ (*myr* PKI₁₄₋₂₂)对激活剂DAG/Ca²⁺依赖的PKC和PKA作出反应而抑制胰岛素的释放. N-端豆蔻酰化极大改变β细胞中DAG/Ca²⁺依赖的PKC抑制特异性. PKC peptides, PKC₁₉₋₃₆ ¹⁹RFARKGALRQKNVHEVKN³⁶, PKC₂₀₋₂₈ ²⁰FARKGALRQ²⁸, PKC_{shift}, ²⁷RQKNVHEVK³⁵, PKC_{scram}, RRKLQGFAA(PKC₂₀₋₂₈ scrambled), PKC_{scram}与PKC₂₀₋₂₈氨基酸序列一样, 只是打乱了其顺序. PKC_{scram}对β细胞中依赖DAG/Ca²⁺没有抑制活性, 然而其N-端豆蔻酰化后便有了抑制活性. N-端豆蔻酰化的PKC_{shift}对β细胞中依赖DAG/Ca²⁺有抑制活性^[26].

6 C1区抑制剂

Resveratrol (RV)(图 18)是一种来源于包括红酒在内的饮料中的 polyphenolic phytoalexin, 通过加强

内皮的完整性有助于治疗动脉硬化症和心血管疾病, RV调控PKC介导的信号途径而起作用. 发现依赖Ca²⁺的由DAG或佛波酯激活的PKCa与膜结合被RV抑制, 其IC₅₀都是 2 μmol/L. RV的抑制活性与佛波酯浓度有关, 而与Ca²⁺, PS都无关, 说明RV是与PKC的C1区竞争抑制其活性. RV抑制PKCa, 影响PKC的信号途径而保护心血管和内皮^[27].

7 反义寡核苷酸抑制剂

反义寡核苷酸能够抑制单个PKC亚型目的mRNA序列的表达. 由于PKC各亚型结构的相似性, 较难找到适合的特异性药靶. 反义寡核苷酸能够靶向指定的、唯一的PKC亚型的mRNA序列, 使得能够选择性抑制那个PKC亚型的表达^[28,29].

7.1 P=S寡核苷酸

含 20 个碱基的P=S寡核苷酸(IC₅₀是 100~200 nmol/L)(表 2)能够特异抑制人类肺癌细胞A549 中PKCa的mRNA和蛋白表达. 这些寡核苷酸靶向PKCa mRNA的多个不同的位点, 包括AUG翻译密码子和 3'-不被翻译的序列. 这些寡核苷酸的类似物 2'-O-Methyl-寡核苷酸不能抑制PKCa mRNA表达, 表明目的PKCamRNA的减少是RNaseH介导的切割. 这些寡核苷酸用来检验PKCa参与佛波酯诱导细胞粘连分子ICAM-1mRNA水平变化中的作用^[29,30].

图 18 Resveratrol 类化合物的化学结构式

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/972004-328>

表 2 20-mer P=S 寡核苷酸

寡核苷酸 序号	序列 (5'→3')	cDNA 靶标
3520	CCCCAACCACCTCTTGCTCC	5'-Untranslated
3522	AAAACGTCAGCCATGGTCCC	AUG codon
3674	CCGGGAAAACGTCAGCCAT	AUG codon
3890	GTCAGCCATGGTCCCCCCC	AUG codon
3891	CGCCGTGGAGTCGTTGCCCG	Coding (V1)
3682	CTGCCTCAGCGCCCCTTTC	Coding (C1)
3686	AGTCGGTGCAGTGGCTGGAG	Coding (C1)
3687	GCAGAGGCTGGGGACATTGA	Coding (C1)
3886	ATGGGGTGCACAACTGGGG	Coding (C3)
3892	TCAAATGGAGGCTGCCCGGC	Coding (C3)
3521	GTTCTCGCTGGTGAGTTTCA	3'-Untranslated
3526	GGATTCACTTCCACTGCGGG	3'-Untranslated
3527	GAGACCTGAACAGTTGATC	3'-Untranslated
3695	GGGCTGGGAGGTGTTTGT	3'-Untranslated
3875	CACTGCGGGAGGGCTGGGG	3'-Untranslated
3878	AGCCGTGGCCTTAAAATTTT	3'-Untranslated
3879	ATTTTCAGGCCTCCATATGG	3'-Untranslated
3884	AAGAGAGAGACCTGAACAG	3'-Untranslated
3885	GATAATGTTCTTGTTGTAA	3'-Untranslated
3947	TGGAATCAGACACAAGCCGT	3'-Untranslated

7.2 2-MOE 寡核苷酸

有些半衰期很长的PKC亚型使已有的反义寡核苷酸的抑制效果不好，如已有的(P = S)反义寡核苷酸在细胞中代谢，在 48~72 h阶段失效，使抑制PKC亚型困难。寡核苷酸活性受许多因素影响。最重要的两个参数是寡核苷酸与目的mRNA杂交亲合力和寡核苷酸抗胞内核酸酶降解的能力。因此提高这两个参数，有望得到高药效性能的反义寡核苷酸。不仅要改进已有的反义寡核苷酸，而且要发展有效靶向长

半衰期蛋白mRNA的反义寡核苷酸。寡核苷酸抑制蛋白表达的最有力的机理就是它能引起RNase H介导杂交的目的mRNA分裂。寡核苷酸 2-烷基(如 2-MOE)不能使RNase H介导杂交的目的mRNA分裂。在反义寡核苷酸 2-烷基中加入 2-脱氧残基能达到目的。实验表明有 2-MOE结构的寡核苷酸(表 3)比传统的P = S反义寡核苷酸抑制A549 肺癌细胞中PKCa mRNA表达活性至少强 20 多倍[31,32]。

8 结束语

PKC家族为我们提供了疾病治疗靶分子。事实上，我们已经在特异性PKC抑制剂方面取得了一些很好的成果。进一步开发利用具有亚型特异性抑制剂的关键是要更多地了解PKC与人类疾病的关系[33]。传统的肿瘤化疗不分肿瘤细胞和正常细胞。需要找到新的治疗方法靶向肿瘤细胞而对正常细胞无毒。分子生物学方法的应用发现了新型抗癌药物的分子靶。这些分子靶包括在肿瘤恶化、形成、转移中的基因。PKC的过表达会导致乳腺癌、甲状腺癌、神经胶质瘤、黑素瘤等。PKC是Ras的上游调控子，是ERK MAPK级联反应的激活剂[34]。PKC抑制剂能诱导细胞凋亡，提高了肿瘤化疗的有效性。尽管上述许多化合物具有特异性，但是几乎没有化合物能在各种激酶中表现出对PKC好的选择性或是在PKC各亚

表 3 2-MOE 寡核苷酸

名称	结构和序列	熔点	2'-取代基
ISIS 3521	GsTsTsCsTsCsGsTsGsTsGsAsGsTsTsTsCsA	52.1	(deoxy)
ISIS 11485	GoToToCoToCoGoCoToGoGoToGoAoGoToToCoA	ND	
ISIS 5357	GsTsTsCsTsCsGsTsGsTsGsAsGsTsTsTsCsA	61.9	(methoxy)
ISIS 8329	GoToToCoToCoGsCsTsGsTsGsAsGoToToToCoA	62.6	
ISIS 9606	GsTsTsCsTsCsGsTsGsTsGsAsGsTsTsTsCsA	64.8	(methoxyethyl)
ISIS 9605	GoToToCoToCoGsCsTsGsTsGsAsGoToToToCoA	69.6	

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/972004-328>

型中有好的选择性。因此迫切需要找到化合物兼具特异性和好的选择性。PKC抑制剂现有Bristol, Myers Squibb公司Bryostatin- 进入临床 - 期实验, Novartis公司PKC412 进入临床 / A期实验, NCI公司UCN-01 进入临床 期实验, ISIS公司PKCa抑制剂ISIS 3521进入临床 - 期实验^[11]。PKC有12个亚型, 针对每个亚型寻找到生物利用性高、溶解性好、低毒特异抑制剂还是很艰巨的任务。

致谢 本工作为国家自然科学基金资助项目(批准号: 20472043)。

参 考 文 献

- 1 Xu W C, Zhou Q, Ashendel C L, et al. Novel protein kinase C inhibitors: synthesis and PKC inhibition of α -substituted polythiophene derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1999, 9: 2279~2282[DOI]
- 2 Scapin G. Structural biology in drug design: selective protein kinase inhibitors. *DDT*, 2002, 7(11): 601~611
- 3 Liu J P. Protein kinase C and its substrates. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1996, 116: 1~29[DOI]
- 4 Way K J, Chou E, King G L. Identification of PKC-isoform-specific biological actions using pharmacological approaches. *Tips*, 2000, 21: 181~187
- 5 裴 刚. 蛋白激酶和蛋白磷酸酯酶的抑制剂. *生命科学*, 1995, 7(3): 33~39
- 6 杨桂芝. 植物中蛋白激酶 C 抑制剂的研. *生命的化学*, 1998, 18(3): 19~21
- 7 季少平, 药立波. 蛋白激酶 C 与细胞周期. *生命科学*, 2001, 13(1): 37~40
- 8 Fabbro D, Ruetz S, Buchdunger E, et al. Protein kinases as targets for anticancer agents: from inhibitors to useful drugs. *Pharmacology & Therapeutics*, 2002, 93: 79~98[DOI]
- 9 Wang Z, Canagarajah B J, Boehm J C, et al. Structural basis of inhibitor selectivity in MAP kinases. *Structure*, 1998, 6: 1117~1128 [DOI]
- 10 Schinaler T, Sicheri F, Pico A, et al. Crystal structure of Hck in complex with a Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. *Mol Cell*, 1999, 3: 639~648[DOI]
- 11 Hu H. Recent discovery and development of selective protein kinase C inhibitors. *DDT*, 1996, 1: 438~447
- 12 Lee J C, Adams J L. Inhibition of serine/threonine kinases. *Current Opinion in Biotechnology*, 1995, 6: 657~661[DOI]
- 13 Yoshikawa N, Nakamura K, Yamaguchi Y, et al. Effect of PKC412, a selective inhibitor of protein kinase C, on lung metastasis in mice injected with B16 melanoma cells. *Life Science*, 2003, 72: 1377~1387[DOI]
- 14 Martiny-Baron G, Kazanietz M G, Mischak H, et al. Selective inhibition of protein kinase C by the indolocarbazole Gö6976. *The Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268(13): 9194~9197
- 15 Marmy-Conus N, Hannan K M, Pearson R B. Ro 31-6045, the inactive analogue of the protein kinase C inhibitor Ro 31-8220, blocks in vivo activation of p70^{S6K}/p85^{S6K}: implications for the analysis of S6K signaling. *FEBS Letters*, 2002, 519: 135~140[DOI]
- 16 Teicher B A, Alvarez E, Mendelsohn L G, et al. Enzymatic rational and preclinical support for a potent protein kinase C β inhibitor in cancer therapy. *Advan Enzyme Regul*, 1999, 39: 313~327[DOI]
- 17 Clerk A. Death by protein kinase C inhibitor: a stressful event. *J Mol Cell Cardiol*, 2001, 33: 1773~1776[DOI]
- 18 蔡 阳, 欧阳荔. 格列维克的构效关系研究. *中国药物化学杂志*, 2002, 12(5): 276~278
- 19 Liu G S, Cohen M V, Mochly-Rosen D, et al. Protein kinase C- ϵ is responsible for the protection of preconditioning in rabbit cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 1999, 31: 1937~1948[DOI]
- 20 Ono-Saito N, Niki I, Hidaka H. H-Series protein kinase inhibitors and potential clinical applications. *Pharmacol Ther*, 1999, 82(2-3): 123~131[DOI]
- 21 Parang K, Cole P A. Designing bisubstrate analog inhibitors for protein kinases. *Pharmacology & Therapeutics*, 2002, 93: 145~157 [DOI]
- 22 Loog M, Uri A, Raidaru G. Adenosine-5'-carboxylic acid peptidyl derivatives as inhibitors of protein kinase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1999, 9: 1447~1452[DOI]
- 23 Yedovitzky M, Mochly-Rosen D, Johnson J A. Translocation inhibitors define specificity of protein kinase C isoenzymes in pancreatic β -Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(3): 1417~1420[DOI]
- 24 Johnson J A, Gray M O, Chen C H, et al. A protein kinase C translocation inhibitor as an isozyme-selective antagonist of cardiac function. *The Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(40): 24962~24966[DOI]
- 25 Ron D, Luo J H, Mochly-Rosen D. C2 region-derived peptides inhibit translocation and function of β protein kinase C in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(41): 24180~24187[DOI]
- 26 Harris T E, Persaud S J, Jones P M. Pseudosubstrate peptide inhibitors of β -cell protein kinases: altered selectivity after myristoylation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1999, 155: 61~68[DOI]
- 27 Slater S J, Seiz J L, Cook A C, et al. Inhibition of protein kinase C by resveratrol. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2003, 1637: 59~69
- 28 Cohen P. The development and therapeutics potential of protein kinase inhibitors. *Current Opinion in Chemical Biology*, 1999, 3: 459~465[DOI]
- 29 Dean N M, McKay R, Condon T P, et al. Inhibition of protein kinase C- α expression in human A549 cells by antisense oligonucleotides inhibits induction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) mRNA by phorbol esters. *The Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(23): 16416~16424
- 30 刘俊达, 张靖莲. 细胞凋亡研究促进新药开发的展望. *中国新药杂志*, 1999, 3(5): 298~302
- 31 McKay R J, Miraglia L J, Cummins L L, et al. Characterization of a potent and specific class of antisense oligonucleotide inhibitor of human protein kinase C- α expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(3): 1715~1722[DOI]
- 32 Bonham M A, Brown S, Boyd A L. An assessment of the antisense properties of RNase H-competent and steric-blocking oligomers. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23(7): 1197~1203
- 33 Parker P J. Inhibition of protein kinase C—Do We, Can We, and Should We? *Pharmacol Ther*, 1999, 82(2-3): 263~267[DOI]
- 34 Buolamwini J K. Novel anticancer drug discovery. *Current Opinion in Chemical Biology*, 1993, 3: 500~509[DOI]

(2004-09-15 收稿, 2004-12-14 收修改稿)