

# Tyrphostin AG34 对重组人蛋白激酶 CK2 全酶的影响

刘新光 梁念慈(湛江 524023 广东医学院生物化学与分子生物学研究所 xgliu@gdmc.edu.cn)

**摘要** 目的:观察 Tyrphostin AG34 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 $\alpha$  和  $\beta$  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[ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP 或[ $\gamma$ - $^{32}$ P]GTP 的[ $^{32}$ P]放射活度来检测。结果:重组人 CK2 是一种  $\text{Ca}^{2+}$ 、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。AG34 对重组人 CK2 全酶具有很强的抑制作用,IC<sub>50</sub> 为  $1.0\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,抑制作用远大于 CK2 已知抑制剂 5,6-二氯-1- $\beta$ -呋喃糖苯并咪唑(DRB)和 *N*-(2-氨基乙基)-5-氯萘-1-磺胺(A3)。AG34 对重组人 CK2 的动力学研究表明:它与 GTP 呈现以竞争性为主的混合型抑制作用,与酪蛋白呈非竞争性抑制作用。结论:AG34 不仅是酪氨酸蛋白激酶的抑制剂,而且是一种十分有效的蛋白激酶 CK2 的抑制剂。重组人蛋白激酶 CK2 可作为一种较为简便筛选和开发有效的 CK2 抑制剂的分子靶点。

**关键词** 重组蛋白激酶 CK2; Tyrphostins; AG34; IC<sub>50</sub>; 酶动力学

## Effect of Tyrphostin AG34 on recombinant human protein kinase CK2 holoenzyme

Liu Xinguang( Liu XG), Liang Nianci( Liang NC) (*Institute of Biochemistry & Molecular Biology, Guangdong Medical College, Zhanjiang, 524023, xgliu@gdmc.edu.cn*)

**ABSTRACT OBJECTIVE:** To study the direct effect of tyrphostin AG34 on recombinant human protein kinase CK2 holoenzyme and its kinetics. **METHOD:** Recombinant human protein kinase CK2  $\alpha$  and  $\beta$  subunits were cloned and expressed by gene engineering, and purified to homogeneous. The two subunits were mixed at the same molar ratio to reconstitute CK2 holoenzyme which had the maximum biological activity. The CK2 activity was assayed by detecting incorporation of  $^{32}\text{P}$  of [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP or [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]GTP into the substrate in the various conditions. **RESULTS:** The recombinant human CK2 was a second messenger ( $\text{Ca}^{2+}$ , cAMP and cGMP) independent protein kinase, the characterization and function of the reconstituted holoenzyme were consistent with those of native CK2. AG34 strongly inhibited the holoenzyme activity of recombinant human protein kinase CK2 with an IC<sub>50</sub> of  $1.0\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , which was more effective than 5,6-dichloro-1- $\beta$ -D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB) and *N*-(2-aminoethyl)-5-chloronaphthalene-1-sulfonamide (A3), the known CK2 special inhibitors. Kinetic studies of AG34 on recombinant human CK2 showed that the inhibition was mixed (competitive is dominant) with GTP and noncompetitive with casein. **CONCLUSION:** AG34 is not only an effective inhibitor of protein tyrosine kinases, but also a novel potent inhibitor of protein kinase CK2. The recombinant human protein kinase CK2 may be used as a molecular target for simpler screening and development of more effective inhibitors of CK2.

广东省自然科学基金(011766) 广东省卫生厅科研基金(A2000487)和湛江市科委科技计划项目资助。

蛋白激酶 CK2 曾被称为酪蛋白激酶 2 或 II (casein kinase 2 or II, CK2 or CKII), 是一种真核细胞普遍存在的信使非依赖性丝/苏氨酸蛋白激酶。它是由两个催化亚基(α 或 α') 和两个调节亚基(β) 组成的不均一四聚体(α<sub>2</sub>β<sub>2</sub>·α'<sub>2</sub>β<sub>2</sub> 或 αα'β<sub>2</sub>)<sup>[1-4]</sup>。蛋白激酶 CK2 有两个重要特点<sup>[1-4]</sup>: 一是它可磷酸化的底物有 200 余种, 这些底物在 DNA 复制与转录、RNA 加工与翻译、细胞代谢与运动、信号的传导与加工、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, 但真正作用至今仍不清楚; 二是 CK2 属于少数具有双辅底物特异性的蛋白激酶之一, 既可以 ATP 也可以 GTP 作为磷酸供体。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<sup>[1-4]</sup>。有研究表明<sup>[5,6]</sup>: CK2 的 α 或 α' 基因可能是原癌基因。最近有学者指出<sup>[1-4,7]</sup>: 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。

AG34 是一系列人工合成的低分子量化合物 Tyrphostins 中的一种化合物(结构式见图 1), 是酪氨酸蛋白激酶(TPK) 抑制剂<sup>[8]</sup>。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 AG34 对 CK2 的作用机制, 本文在已克隆表达人 CK2α 和 β 亚基的基础上<sup>[9-12]</sup>, 首次研究了 AG34 对纯化的重组人 CK2 全酶活性的直接作用及其动力学。

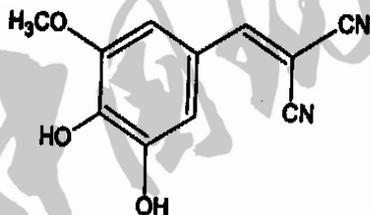


图 1 AG34 的化学结构式

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

AG34 由以色列 Gazit 教授实验室合成惠赠, 其合成方法见文献<sup>[8]</sup>。5,6-二氯-1-β 咪唑糖苯并咪唑(DRB) 和 N-(2-氨基乙基)-5-氯萘-1-磺胺(A3) 为 Calbiochem 公司产品, 酪蛋白为 ICN 产品。肝素, 精胺, 组蛋白 III S, poly(Glu: Tyr) 4:1, ATP, GTP 为 Sigma 公司产品, P81 磷酸纤维素滤纸为 Whatman 产品。[γ-<sup>32</sup>P]ATP 或 [γ-<sup>32</sup>P]GTP 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 CK2α 和 β 亚基 cDNA 重组质粒 pTCKA 和 pTCKB 的克隆与测序 方法见作者以前的报道<sup>[9,10]</sup>。

1.2.2 重组人 CK2α 和 β 亚基的原核表达、纯化与鉴定 方法见作者以前的报道<sup>[11,12]</sup>。

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<sup>[11,12]</sup>。酶反应总体积为 35 μl, 反应混合液中含 50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 7.2, 150 mmol·L<sup>-1</sup> KCl, 10 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 50 μmol·L<sup>-1</sup> ATP, [γ-<sup>32</sup>P]ATP 或 GTP 1.85 × 10<sup>4</sup> Bq (比活 1.85 × 10<sup>17</sup> Bq·mol<sup>-1</sup>), 去磷酸化酪蛋白 2g·L<sup>-1</sup>。反应温度为 30℃。加 15 μl 重组 CK2 全酶启动酶反应, 反应 10 min 后取 30 μl 点至直径 2cm 的 P81 磷酸纤维素滤纸上终止反应, 阴干, 用 85 mmol·L<sup>-1</sup> 磷酸洗涤数次, 最后用丙酮洗涤一次, 80℃ 烘干后, 加闪烁液于液闪仪计数, 每组同时做 3 个平行管。每 min 催化 1 pmol [γ-<sup>32</sup>P]ATP 或 [γ-<sup>32</sup>P]GTP 上的 <sup>32</sup>P 转移到酪蛋白上所需的酶量为 1 个酶单位。

1.2.5 AG34 对重组人 CK2 全酶的直接作用与 IC<sub>50</sub> 的计算 IC<sub>50</sub> 的计算根据半数数量概率单位法<sup>[13]</sup> 进行。以浓度的对数为横座标, 相应浓度抑制率的概率单位 (probit) 为纵座标, 求出直线回归方程, 并根据方程计算 IC<sub>50</sub> 值 (50% 抑制时的概率单位为 5)。

1.2.6 酶的动力学测定 根据 IC<sub>50</sub> 结果, 选择 3 种不同浓度 AG34 (0, 1, 25, 10 μmol·L<sup>-1</sup>) 进行实验分组。在固定酪蛋白浓度为 2g·L<sup>-1</sup>, GTP 浓度从 6.25 ~ 50 μmol·L<sup>-1</sup> 情况下, 测定 CK2 的活性 (相当于反应速度); 或在固定 GTP 的浓度为 12.5 μmol·L<sup>-1</sup>, 改变酪蛋白浓度 (1 ~ 8 g·L<sup>-1</sup>) 条件下, 测定 CK2 活性, 每个样品同时做 3 个平行管, 采用 Line weaver-Burk 作图法求出表观 K<sub>m</sub> 和表观 V<sub>max</sub> 酶动力学参数, 以此判断 AG34 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 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 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<sup>2+</sup> 则对 CK2 的活性基本没有影响。

### 2.2 AG34 对重组人 CK2 全酶的直接作用

向反应体系中加入不同浓度 AG34, 实验结果表明 (表 2): AG34 对重组人 CK2 全酶有较强的抑制作用, 且随着 AG34 浓度的不断增加, 对 CK2 全酶的活性抑制率逐渐升高, 呈现浓度依赖性关系。以浓度的对数为横座标, 相应浓度抑制率的概率单位为纵座标, 求出的直线回归方程为:  $y = 0.8440x + 2.4612$ ,  $r = 0.9817$ , 其 IC<sub>50</sub> 为 1018.7 nmol·L<sup>-1</sup> 即

1.0 μmol·L<sup>-1</sup> (表 2)。

表 1 重组人蛋白激酶 CK2 全酶性质

组别	CK2 活性 (mU, $\bar{x} \pm s$ )	%对照组
对照组	1264.9 ± 95.7	100
+ 组蛋白(0.5 g·L <sup>-1</sup> ) - 酪蛋白	52.4 ± 9.5	4.1 <sup>**</sup>
+ poly(Glu-Tyr)41 (0.4 g·L <sup>-1</sup> ) - 酪蛋白	124.7 ± 24.2	9.9 <sup>**</sup>
+ 肝素(8 mg·L <sup>-1</sup> )	507.0 ± 44.7	40.1 <sup>**</sup>
+ DRB (40 μmol·L <sup>-1</sup> )	325.5 ± 71.3	25.7 <sup>**</sup>
+ 精胺(2.5 mmol·L <sup>-1</sup> )	1840.4 ± 107.1	145.5 <sup>**</sup>
+ Ca <sup>2+</sup> (5 mmol·L <sup>-1</sup> )	1248.5 ± 63.4	98.7
+ cAMP(10 μmol·L <sup>-1</sup> )	1365.7 ± 112.0	108.0
+ cGMP(10 μmol·L <sup>-1</sup> )	1267.8 ± 108.3	100.2

使用等摩尔数(14 pmol)的 CK2α 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。<sup>\*\*</sup> P < 0.01 (与对照组相比)

表 2 AG34 对重组人蛋白激酶 CK2 全酶的影响

浓度 (nmol·L <sup>-1</sup> )	log value	CK2 活性 (cpm, $\bar{x} \pm s$ )	抑制率 (%)	概率单位
0		78346 ± 8806		
625	2.7959	46091 ± 2687	41.2 <sup>**</sup>	4.7725
1250	3.0969	37708 ± 573	51.9 <sup>**</sup>	5.0502
2500	3.3979	24397 ± 148	68.9 <sup>**</sup>	5.4959
5000	3.6990	22806 ± 1814	70.9 <sup>**</sup>	5.5534
10000	4.0000	17648 ± 930	77.5 <sup>**</sup>	5.7388
20000	4.3010	8249 ± 2133	86.8 <sup>**</sup>	6.1264

注: <sup>\*\*</sup> P < 0.01 (与 0 nmol·L<sup>-1</sup> 组比较)

### 2.3 AG34 抑制重组人 CK2 全酶的动力学研究

#### 2.3.1 在不同 GTP 浓度情况下 AG34 对 CK2 活性的影响

在固定酪蛋白浓度,改变 GTP 的浓度条件下,以 [S]<sup>-1</sup> 和 V<sup>-1</sup> 作图显示的酶动力学结果(图 2)表明:随着抑制剂 AG34 浓度的增加,表观 V<sub>max</sub> 逐渐减小,而表观 K<sub>m</sub> 则逐渐增大,双倒数作图交点相交于第二象限内的一点,说明 AG34 与 GTP 呈现以竞争性抑制为主的混合型抑制重组人 CK2 活性。

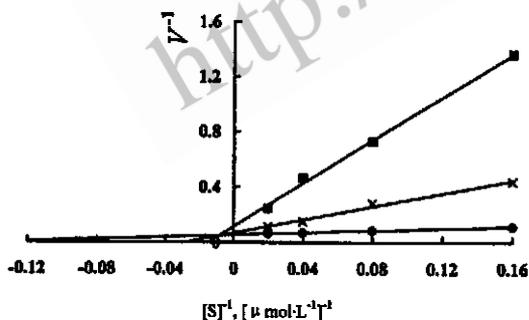


图 2 Line weaver-Burk 作图法分析 AG34 对重组人 CK2 全酶的抑制作用的动力学

固定酪蛋白浓度为 2 g·L<sup>-1</sup>,按图中所示改变 GTP 浓度条件下测定不同浓度 AG34 对重组人 CK2 全酶的影响,每个值代表 3 次实验的平均值。

AG34: 0 nmol·L<sup>-1</sup> (●); 1.25 μmol·L<sup>-1</sup> (×); 10 μmol·L<sup>-1</sup> (■)

#### 2.3.2 在不同酪蛋白浓度情况下 AG34 对 CK2 活性的影响

中国现代应用药学杂志 2002 年 6 月第 19 卷第 3 期

在固定 GTP 的浓度,改变酪蛋白浓度情况下,以 [S]<sup>-1</sup> 和 V<sup>-1</sup> 作图显示的 AG34 酶动力学结果(图 3)表明:随着抑制剂 AG34 浓度的增加,表观 V<sub>max</sub> 逐渐减小,而表观 K<sub>m</sub> 则基本不变,双倒数作图交点交于横轴负端一点,说明 AG34 与酪蛋白呈非竞争性抑制重组人 CK2。

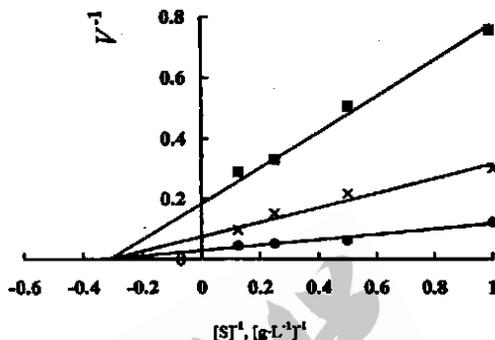


图 3 Line weaver-Burk 作图法分析 AG34 对重组人 CK2 全酶的抑制作用的动力学

固定 GTP 浓度为 12.5 μmol·L<sup>-1</sup>,按图中所示改变酪蛋白浓度条件下不同浓度 AG34 对重组人 CK2 全酶的影响,每个值代表 3 次实验的平均值。

AG34: 0 nmol·L<sup>-1</sup> (●); 0.25 μmol·L<sup>-1</sup> (×); 10 μmol·L<sup>-1</sup> (■)

### 2.4 DRB 与 A3 对重组人 CK2 全酶的抑制作用

5,6-二氯-1-β-呋喃糖苯并咪唑(DRB)和 N-(2-氨基)-5-氯萘-1-磺胺(A3)是已知对 CK2 有抑制作用的两种化合物<sup>[1-3]</sup>,结果(表 3 和表 4)表明:它们对重组人 CK2 都有较强的抑制作用,其 IC<sub>50</sub> 分别为 10.4 μmol·L<sup>-1</sup> 和 25.5 μmol·L<sup>-1</sup>,说明 AG34 对重组人 CK2 全酶的抑制作用明显强于 DRB 和 A3。

表 3 DRB 对重组人蛋白激酶 CK2 全酶的影响

浓度 (μmol·L <sup>-1</sup> )	log value	CK2 活性 (cpm, $\bar{x} \pm s$ )	抑制率 (%)	概率单位
0		20542 ± 1272		
5	0.6990	13109 ± 550	36.2 <sup>**</sup>	4.6415
10	1.0000	9971 ± 94	51.5 <sup>**</sup>	5.0251
20	1.3010	7631 ± 741	62.9 <sup>**</sup>	5.3319
40	1.6021	6104 ± 126	70.3 <sup>**</sup>	5.5244
80	1.9031	3357 ± 614	83.7 <sup>**</sup>	5.9945

IC<sub>50</sub> = 25.5 μmol·L<sup>-1</sup>, <sup>\*\*</sup> P < 0.01 (与 0 μmol·L<sup>-1</sup> 组比较)

表 4 A3 对重组人蛋白激酶 CK2 全酶的影响

浓度 (μmol·L <sup>-1</sup> )	log value	CK2 活性 (cpm, $\bar{x} \pm s$ )	抑制率 (%)	概率单位
0		33624 ± 2784		
10	1.0000	23996 ± 1716	28.6 <sup>**</sup>	4.4466
20	1.3010	18415 ± 511	45.2 <sup>**</sup>	4.8743
40	1.6021	12358 ± 1062	63.2 <sup>**</sup>	5.3319
80	1.9031	9037 ± 1441	73.1 <sup>**</sup>	5.6128
160	2.2041	5855 ± 172	82.6 <sup>**</sup>	5.9542

IC<sub>50</sub> = 25.5 μmol·L<sup>-1</sup>, <sup>\*\*</sup> P < 0.01 (与 0 μmol·L<sup>-1</sup> 组比较)

### 3 讨论

目前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<sup>[1-4,7]</sup>。Tyrphostins 是人工合成的一系列化合物,因能特异性抑制 TPK 而得名。它们可抑制表皮生长因子受体(EGFR)、血小板衍生的生长因子受体(PDGFR)、HER2/neu 与 HER-2 的 TPK 活性,而且可抑制 EGF- 依赖的 A431 细胞的增殖等,TPK 的抑制剂已作为阻断信号传导靶点的一类新型治疗药物<sup>[8,14,15]</sup>。有研究表明:AG34 抑制 EGFR 的 TPK 的 IC<sub>50</sub> 为 20 μmol·L<sup>-1</sup><sup>[8]</sup>。AG34 不但可以逆转 pp60F527 诱导转化的 NIH/3T3 细胞的形态变化,抑制 pp60F527 蛋白激酶活性,而且在 c-src/ F527 基因转染的 NIH/3T3 细胞中,它可明显抑制包括 pp125FAK 和 pp60F527 癌基因蛋白在内的酪氨酸磷酸化作用,选择性降低 Src 癌基因蛋白 pp60F527 的合成<sup>[16]</sup>。AG34 诱导的人肺癌细胞分化表型与细胞内 TPK 活性降低相关<sup>[17]</sup>。这些研究都只局限在抑制 TPK 活性方面。

由于 CK2 的活性与增殖相关,抑制细胞增殖可能会影响 CK2 的活性。但从组织中提取纯化得到研究所需 CK2 的量较为困难,因此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<sup>[9-12]</sup>,进行了一系列生化药理学研究。本实验首次观察到 AG34 可明显抑制重组人 CK2 全酶的活性,其 IC<sub>50</sub> 仅为 1.0 μmol·L<sup>-1</sup>(表 2)。蛋白激酶 CK2 是少数既能以 ATP 也能以 GTP 作为磷酸供体的蛋白激酶之一<sup>[1-4]</sup>,故以 GTP 作磷酸供体进行 CK2 活性的测定特异性更好。本实验的酶动力学结果揭示了 AG34 对 CK2 的作用机制,它与 GTP 呈现以竞争性抑制为主的混合性抑制(图 2),说明它与 GTP 具有一定的竞争性抑制作用;而与酪蛋白则呈非竞争性抑制 CK2(图 3)。

DRB 与 A3 作为已知的蛋白激酶 CK2 的抑制剂<sup>[1-3]</sup>,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 CK1、PKA、PKG、PKC 等蛋白激酶的活性,我们的实验结果表明纯化的重组人 CK2 全酶可受到已知抑制剂的抑制,AG34 抑制 CK2 的作用(IC<sub>50</sub> 为 1.0 μmol·L<sup>-1</sup>)明显强于 DRB(IC<sub>50</sub> 为 10.4 μmol·L<sup>-1</sup>)和 A3(IC<sub>50</sub> 为 25.5 μmol·L<sup>-1</sup>),说明 AG34 不但是 TPK 的抑制剂,而且可能是 CK2 十分有效的抑制剂,从而拓宽了 AG34 的作用范围。TPK、PKC、CK2 等都是与细胞信号传递的有关的蛋白激酶<sup>[1-3]</sup>,目前 CK2 的蛋白底物已发现 200 多种,与信号传递有关的钙调蛋白、p34<sup>cdk2</sup>、雌激素受体 2 等,既受 PKC 调节,又是 CK2 的重要底物<sup>[1-3]</sup>。这些揭示了 CK2 与某些信号转导、细胞代谢调节的激酶之间存在密切的相互关系,不过它们在细胞内的分工和作用的先后顺序和确切的作用机制还有待于进一步研究。由于我们通过基因工程得到大量的纯化重组人 CK2,以它作为药理靶点观察药物对其抑制作用及其机制,方法十分简便快速,因此本文的结果提示重组人蛋白激酶 CK2 可作为一种较为简便筛选和开发有效的 CK2 抑制剂的分子靶点。

## 参考文献

- 1 Pinna LA, Meggio F. Protein kinase CK2 ("casein kinase ~ 2") and its implication in cell division and proliferation. *Prog Cell Cycle Res*, 1997, 3: 77.
- 2 Guerra B, Issinger OG. Protein kinase CK2 and its role in cellular proliferation, development and pathology. *Electrophoresis*, 1999, 20(2): 391.
- 3 Tawfic S, Yu S, Wang H, et al. Protein kinase CK2 signal in neoplasia. *Histol Histopathol*, 2001, 16(2): 573.
- 4 陈小文, 刘新光, 梁念慈. 蛋白激酶 CK2. 国外医学分子生物学分册, 2001, 23(4): 206.
- 5 Seldin DC, Leder P. Casein kinase IIa transgene-induced murine lymphoma: relation to theileriosis in cattle. *Science*, 1995, 267(5199): 894.
- 6 Orlandini M, Semplici F, Ferruzzi R et al. Protein kinase CK2 $\alpha'$  induced by serum as a delayed early gene and cooperates with Haras in fibroblast transformation. *J Biol Chem*, 1998, 273(33): 21291.
- 7 De Clercq E. Current lead natural products for the chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Med Res Rev*, 2000, 20(5): 323.
- 8 Gazit A, Yaish P, Gilon C, et al. Tyrphostins I: synthesis and biological activity of protein tyrosine kinase inhibitors. *J Med Chem*, 1989, 32(10): 2344.
- 9 刘新光, 梁念慈, 马涧泉. 重组人蛋白激酶 CK2 $\alpha$  亚基 cDNA 的克隆与测序. *中山医科大学学报*, 1999, 20(2): 158.
- 10 刘新光, 梁念慈, 马涧泉, 等. 重组人蛋白激酶 CK2 $\beta$  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.
- 11 刘新光, 梁念慈, 马涧泉. 重组人蛋白激酶 CK2 $\alpha$  亚基的原核表达、纯化与鉴定. *中国生物化学与分子生物学报*, 2000, 16(1): 17.
- 12 刘新光, 梁念慈, 马涧泉. 重组人 CK2 $\beta$  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.
- 13 杨树勤 主编. 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: 197~202.
- 14 Levitzki A, Gazit A. Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science*, 1995, 267(5205): 1782.
- 15 Levitzki A. Protein tyrosine kinase inhibitors as novel therapeutic agents. *Pharmacol Ther*, 1999, 82(2~3): 231.
- 16 Agbotounou WK, Levitzki A, Jacquemin-Sablon A, et al. Effects of tyrphostins on the activated c-src protein in NIH/3T3 cells. *Mol Pharmacol*, 1994, 45(5): 922.
- 17 Schwartz B, Lamprecht SA, Polak-Charcon S, et al. Induction of the differentiated phenotype in human colon cancer cell is associated with the attenuation of subcellular tyrosine phosphorylation. *Oncol Res*, 1995, 7(6): 277.

收稿日期: 2001-07-25