

PI-3K/Akt 通路的下游因子磷酸二酯酶 3B 及其临床研究

曹文 石放雄*

(南京农业大学动物科学技术学院, 南京 210095)

摘要 在胰岛素诱导的PI-3K/Akt通路中, 磷酸二酯酶3B (phosphodiesterase type 3B, PDE3B) 作为 Akt 的下游因子, 通过调控胞内 cAMP 浓度, 来调节抗糖原水解、抗脂解以及葡萄糖转运等一系列生理过程。最近研究表明 PDE3B 的活性及表达的变化是产生胰岛素抵抗的关键因素之一。因此, PDE3B 及影响 PDE3B 活性的一些物质将可能成为治疗 2 型糖尿病、肥胖症等以胰岛素抵抗为病理基础疾病的重要靶因子。

关键词 磷酸二酯酶 3B; PI-3K/Akt; 胰岛素抵抗; 2 型糖尿病

磷酸二酯酶(phosphodiesterase, PDE)是 cAMP 和 cGMP 介导的信号通路中重要的调控因子。根据与底物的亲和力、自身的生理生化特性, 以及对抑制剂敏感程度的不同, PDE 共分为 11 个家族^[1,2]。其中磷酸二酯酶 3(phosphodiesterase type 3, PDE3)家族包括磷酸二酯酶 3A(phosphodiesterase type 3A, PDE3A)和磷酸二酯酶 3B(phosphodiesterase type 3B, PDE3B)两个亚型, 二者对 cAMP 和 cGMP 都具有高度的亲和性, 并以一种相互竞争的方式水解 cAMP 和 cGMP 成为 5'-AMP 和 5'-GMP^[2]。近些年的研究表明 PDE3B 在调节胰岛素诱导的抗脂解、抗糖原水解、葡萄糖转运以及胰岛素分泌等生理过程中起着举足轻重的作用。本文就 PDE3B 在 PI-3K/Akt 通路中的作用及其在治疗由胰岛素抵抗而引起的 2 型糖尿病上的应用作一综述。

1 PDE3B 的结构、功能及分布

1.1 结构

PDE 家族成员含有高度保守且对催化活性起重要作用的 C 端保守序列 (conserved C-terminal region, CCR)。PDE3B 的 CCR 中有一段 44 个氨基酸的插入序列——INS, 对 PDE3 家族至关重要。PDE3B 的 N 端包含两个疏水区, NHR1(约 200 个氨基酸)和 NHR2(约 50 个氨基酸), 负责 PDE3B 胞内定位。NHR1 和 NHR2 之间是调控催化活性的 PKA 和 PKB 磷酸化位点^[3] (图 1)。

PDE3B 的催化区位于 C 端(包括 CCR), 由 3 个含

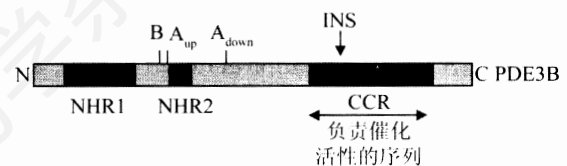


图 1 PDE3B 开放阅读框功能图^[3]

有 17 个 α 螺旋的亚结构域构成。在所有 11 个 PDE 成员中, 活性位点均位于这 3 个亚结构域之间的连接处^[4]。胞内 PDE3B 的定位主要与 N 端结构域 NHR1 和 NHR2 有关。NHR1 包含 6 个跨膜螺旋, 最后两个螺旋足以使仅含有 NHR1 和 NHR2 的重组蛋白质定位在转染细胞的细胞膜上。缺少 NHR1 而含有 NHR2 的重组蛋白质在转染细胞的微粒体和胞质内都有分布; 而缺少 NHR1 和 NHR2 的重组蛋白质则主要分布在细胞质中^[5,6]。尽管目前还没有关于 PDE3B 锚定蛋白的报道, 但它们与胞内膜的联系很可能涉及到蛋白质与蛋白质的相互作用^[3]。

1.2 功能和分布

PDE3A 主要在心肌、平滑肌、血小板中表达, 而 PDE3B 主要在脂肪细胞和胰腺细胞中表达^[7]。在脂肪细胞中, PDE3B 参与调控葡萄糖转运、抗脂解和胰岛素分泌等生理过程^[8,9]; 在胰腺 β 细胞中, PDE3B 抑制剂可通过增加 cAMP 浓度刺激胰岛素分泌^[10,11]; 在原骨髓细胞(promyeloid cell)中, PKB 引起

收稿日期: 2007-07-03 接受日期: 2007-08-31

国家自然科学基金资助项目(No.30571335)

* 通讯作者。Tel/Fax: 025-84395701, E-mail: fxshi@njau.edu.cn

的 PDE3B 磷酸化能刺激 DNA 合成^[12]。因为 PDE3B 是脂肪细胞中可被胰岛素激活的主要亚型, 所以 PDE3B 又被称作脂肪细胞 PDE3。

2 PI-3K/PKB 信号通路

2.1 PI-3K 概述

磷脂酰肌醇-3激酶 (phosphoinositide-3-kinase, PI-3K) 是 Whitman 等^[13]发现的一种与细胞内信号转导有关的脂类第二信使, 负责催化磷脂酰肌醇(PI) 肌醇环上 3' 羟基的磷酸化, 根据底物结构不同可分为 3 种类型, 即 I 型 PI-3K、II 型 PI-3K、III 型 PI-3K。体内发挥重要作用的是 I 型 PI-3K。I 型 PI-3K 又可分为两个亚型: IA 和 IB, 均由 p85 α / β / γ (调节亚基) 和 P110 α / β / γ (催化亚基) 组成。静息状态下, 调节亚基使催化亚基保持在很低的活力状态; 当胰岛素与其受体(IR) 结合后, 激活受体的内源性酪氨酸激酶活性, 导致自身磷酸化和胰岛素受体底物(insulin-receptor substrate, IRS) 的酪氨酸磷酸化, 酪氨酸磷酸化的 IRS 通过自身 SH2 结构域招募到 PI-3K 的 P85, 从而解除对 P110 的抑制作用, 使 PI-3K 活化即 PI-3K 信号通路被激活。IB 亚型的调节亚基与已知任何蛋白质在结构上没有同源性, 其在酶活性调节中的作用仍不清楚^[14]。

2.2 PKB 概述

蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB) 是一种分子量为 60 kDa 的蛋白激酶, 因与蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 和蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 有很高的同源性(PKC 为 73%, PKA 为 68%) 而得名。由于该激酶被证明为反转录病毒 Akt-8 癌基因 V-akt 编码的蛋白质产物, 故又称 Akt^[15]。目前发现哺乳动物中 PKB 有三种亚型: PKB α 、PKB β 、PKB γ 。PKB α 与 PKB β 和 PKB γ 分别有近 81% 和 83% 的同源性。PKB α 和 PKB β 在人体组织中普遍表达; 而 PKB γ 的表达则具有组织特异性, 主要在脑、肾、睾丸、骨骼肌等组织中表达^[16]。

2.3 PI-3K/PKB 信号通路

PI-3K/Akt 信号通路具有调节细胞增殖、分化、存活和迁移等诸多功能^[17-20]。胰岛素或生长因子与细胞膜上的受体结合后激活 PI-3K, 活化的 PI-3K 催化 PI(4,5)P₂ 产生 PI(3,4,5)P₃, PIP₃ 位于质膜, 是磷酸酶作用的靶分子, 同时也是细胞内重要的第二信使, 通过与 PH 结构域(pleckstrin homology, 系一种存在于多种信号蛋白和细胞骨架相关蛋白中的功能微区), 直接或间接激活多种激酶, 如 PKB。PKB 的活

化不仅需要完整的 PH 结构域, 还需要 PKB Thr308 和 Ser473 两个位点的磷酸化。磷脂酰肌醇依赖性蛋白激酶 1/2 (phosphoinositide-dependent kinase 1/2, PDK1/PDK2), 能使 T308 和 S473 位点磷酸化, 而 PDK 的激活又依赖于 PIP₃ 的调节^[14,16]。参与 PI-3K/PKB 途径负调节的分子主要包括丝氨酸/苏氨酸磷酸酶 PP2A (protein phosphatase 2A)、磷酸酯酶 (phatase and tensin homology deleted on chromosome ten, PTEN), SHIP (SH2 domain-containing PI5-phosphatase)。PI(4,5)P₂ 产生的 IP₃ 可促进 PKB 与膜分离, 进一步被 PP2A 水解失活。另外, SHIP1 和 SHIP2 可使 PIP₃ 去磷酸化, 生成 PI(3,4)P₂, PTEN 使 PI-3K 的磷脂产物 PIP₃ 去磷酸化, 生成 PI(4,5)P₂, 从而减少 PKB 的活化^[21-23]。

3 PDE3B 途经 PI-3K/Akt 信号通路作用于脂肪细胞

3.1 PDE3B 在脂肪细胞中的作用

最近研究发现 PDE3B 在脂肪细胞中不但可诱导葡萄糖含量的上升, 葡萄糖转运蛋白 4 (glucose transporter 4, GLUT-4) 的跨膜转运, 还涉及抗脂解作用, 与脂肪含量的上升密切相关^[24]。脂肪细胞中加入 OPC3911 (一种 PDE3 的特异性抑制剂) 后, 抑制胰岛素诱导的葡萄糖含量上升、脂肪生成及 GLUT-4 跨膜转运能力, 尤其是在异丙基肾上腺素(一种 β 肾上腺素受体拮抗物) 存在的情况下, OPC3911 的抑制作用进一步加强。此外, 脂肪细胞中 PDE3B 的过表达能加强脂肪生成作用^[24]。Elks 等^[25]研究发现, cilostamide (一种 PDE3 的特异性抑制剂) 能够诱导培养的鼠类 3T3-L1 脂肪细胞中脂解反应的发生。

研究证明, 脂肪细胞中调控 cAMP 的因子参与胰岛素诱导的葡萄糖浓度上升, 以及 GLUT-4 的跨膜转运^[26]。因此, 调控 cAMP 池的 PDE3B 很可能负责胞内囊泡中 GLUT-4 的转运及融合过程中重要蛋白的调控, 从而对胰岛素诱导的葡萄糖转运进行调控。GLUT-4 的跨膜转运是胰岛素敏感组织摄取葡萄糖的主要机制。静息状态下, 多数 GLUT-4 被隔离在胞内囊泡中, 在胰岛素刺激下, PI-3K/Akt 通路被激活, 活化的 Akt 能够直接磷酸化 GLUT-4, 而 GLUT-4 的磷酸化与它的转运能力有关^[27]。这样, 经过一系列复杂的反应, GLUT-4 从胞内跨膜转运至胞膜, 通过构象变化将胞外葡萄糖转运至胞内, 促使脂肪细胞中葡萄糖含量升高。但对此问题的研究仍然存在分

歧。例如有研究表明,促使cAMP含量上升的 β 肾上腺素激动剂(β -adrenergic agonist)能够促进、抑制或者对脂肪细胞中胰岛素诱导的葡萄糖上升无影响^[28-30]。而PDE3抑制剂(如OPC3911)对脂肪细胞中胰岛素诱导的葡萄糖上升不起作用等^[31]。

胰岛素能使PDE3B磷酸化,从而激活PDE3B,这就增加了对于cAMP的水解程度,从而降低了PKA的活性。脂酶活性受PKA调控,PKA活性的降低意味着脂酶磷酸化程度下降,脂酶活性受到抑制,最终导致脂解反应受到抑制,脂肪含量上升。此外,PDE3B的过表达与重要脂酶——乙酰辅酶A羧化酶(ACC)磷酸化的下降有关。例如,Zmuda-Trzebiatowska等^[32]的研究证明OPC3911对于ACC的磷酸化有显著的促进作用。

3.2 PDE3B在脂肪细胞中可能的信号通路

Wortmannin (PI-3K抑制剂)能够抑制胰岛素诱导的葡萄糖跨膜转运、抗脂解及PDE3B的活性。ML9(一种强效的PKB抑制因子)也能抑制胰岛素诱导的葡萄糖转运^[33]。PKB的过表达,以PDE3B依赖的方式诱导3T3-L1细胞葡萄糖转运、GLUT-4跨膜运输以及脂肪生成的发生^[34]。但也有证据表明PKB不参与抗脂解反应^[35]。

PI-3K抑制剂能够抑制生长因子或细胞激素激活的Akt活性,这表明PI-3K是位于Akt上游的调控因子^[35]。尽管MAPK和p70 S6激酶也位于PI-3K的下游,但这些蛋白质似乎并不参与对PDE3B的调控^[36]。

已证实脂肪细胞中胰岛素激活PDE3B需要Akt的参与。例如,Kitamura等^[37]发现,重组体Akt可以直接磷酸化重组体PDE3B,Akt的磷酸化与重组体PDE3B活性的升高直接相关。此外,当PDE3B上的Akt磷酸化位点由丝氨酸转变成丙氨酸后,胰岛素不能再激活3T3-L1脂肪细胞中PDE3B突变体的活性。进一步研究发现:在三种Akt异构体中,Akt2与GLUT-4的转运紧密相连。剔除Akt2将导致骨骼肌中葡萄糖含量上升受抑以及肝中胰岛素抵抗。借助RNAi剔除Akt2,将导致3T3L1脂肪细胞降低对胰岛素的敏感性。此外,人类家族中出现的Akt2突变体也与人类胰岛素抵抗和糖尿病有关^[38-40]。

在对胰岛素的应答中,PDE3B主要分布在细胞膜上,而Akt会从胞内转运至质膜,以激活PDE3B^[41]。PDE3B被激活后,随即水解cAMP,cAMP又通过依赖PKA/不依赖PKA两条通路发挥作用,最终参与对葡萄糖转运和脂肪代谢的调控。但目前关于PDE3B

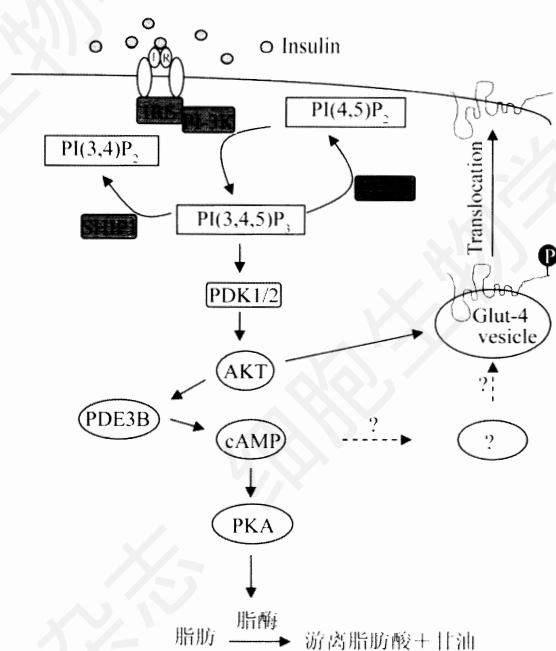


图2 脂肪细胞中胰岛素诱导的PI-3K/Akt信号通路图^[42]

Insulin: 胰岛素; IR: 胰岛素受体; IRS: 胰岛素受体底物。

如何调节胞内囊泡中GLUT-4的转运及融合过程中重要蛋白的活化尚不清楚。

通过以上一系列事实,可推断PDE3B在脂肪细胞中可能的信号通路:胰岛素(insulin)-胰岛素受体(IR)-胰岛素受体底物(IRS)-PI3K-PIP3-PDK1/2-Akt/PKB-PDE3B-cAMP-PKA途径/非PKA途径-GLUT-4跨膜转运/葡萄糖浓度升高/脂肪生成(图2)。

4 临床研究现状

4.1 PDE3B与肥胖、2型糖尿病

目前已经明确,胰岛素抵抗是2型糖尿病发病的重要原因之一,贯穿于2型糖尿病发生、发展的整个过程^[43]。胰岛素抵抗是指胰岛素作用的靶器官、组织(主要为肝脏、肌肉、脂肪组织)对胰岛素生物学效应的反应性降低或丧失,因而产生一系列病理和临床表现。脂肪细胞对于胰岛素敏感性的减弱是骨骼肌和肝脏中胰岛素抵抗发生的先兆,而PDE3B对脂肪细胞中胰岛素诱导的一系列生理过程发挥着重要的作用。因此,PDE3B活性的下降意味着胰岛素诱导的PI-3K/Akt通路受阻,这使脂肪细胞对胰岛素敏感性减弱,从而诱发胰岛素抵抗,最终就可能导致2型糖尿病的发生。

研究发现,酶活性降低的PDE3B基因突变体能

够刺激胰腺β细胞产生胰岛素,并促进内脏脂肪累积和门静脉中游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)浓度升高,最终导致肝脏和脂肪组织出现胰岛素抵抗^[44]。内脏脂肪累积被认为是导致胰岛素抵抗的原因之一,它通过增加 FFA 浓度和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)表达来发挥作用。

Suzuki 等^[45]发现:胰岛素抵抗会使糖尿病 KK 小鼠、天然肥胖大鼠以及氟美松(dexamethasone)处理过的大鼠附睾脂肪细胞中基础 PDE3 的活性(主要是 PDE3B)以及胰岛素诱导的膜结合 PDE3B 活性降低。Tang 等^[46]发现,在肥胖、糖尿病 KKAY 小鼠中 PDE3B 及其 mRNA 以及膜结合 PDE 活性较对照组均明显下降。Eriksson 等^[47]也曾报道 PDE3B 抑制剂有减缓大鼠脂肪细胞糖代谢的作用,这表明酶活性降低的 PDE3B 突变体可能诱发糖尿病。

临床研究发现在 2 型糖尿病患者脂肪细胞中 PDE3B 的 mRNA 表达下降,激素敏感脂酶(hormone-sensitive lipase, HSL)活性增高,脂解增加,FFA 释放增多^[44]。血清 FFA 的升高可引起骨骼肌、肝脏的胰岛素抵抗,是胰岛素抵抗和糖尿病发生的一个重要因素,这已得到公认。血清 FFA 升高可降低 PI-3K 活性,阻碍胞内胰岛素信号转导,从而进一步加重胰岛素抵抗^[44]。现已证实,PDE3B 水解 cAMP,使 PKA 活性降低,会引起 HSL 的去磷酸化和失活,最终导致甘油三酯(TG)水解减少及 FFA 从脂肪细胞中释放减少,从而减轻胰岛素抵抗^[48,49]。但目前 PDE3B 基因突变是否涉及 2 型糖尿病的发病机制还未得到验证,PDE3B 基因表达的调控机制以及 PDE3B 是否作为 2 型糖尿病发生的首发因素尚待研究。

4.2 药物研究

Tang 等^[46,50]发现盐酸吡格列酮片(pioglitazone)以及 JTT501[一种过氧化物酶体增殖物激活受体γ(PPARγ)配体],可使患有肥胖、胰岛素抵抗的糖尿病 KKAY 小鼠脂肪组织中,PDE3B 基因表达得到恢复,从而降低 KKAY 小鼠血清中胰岛素、葡萄糖和 FFA 含量,以及减少甘油三酯水解,最终减轻患病程度。吡格列酮作为一类新型的胰岛素增敏剂,有明显降低血糖的功效,目前已用于治疗人类 2 型糖尿病,并取得了良好的效果。另一抗糖尿病药物 cilostazol 可选择性增加高密度脂蛋白(HDL)亚型 LpA-1 的含量,并能改善 2 型糖尿病患者的餐后高脂血症^[51]。

钒酸盐(vanadate)和钒过氧酸pV(peroxovanadate)能够加强机体对胰岛素的敏感性,降低胰岛素抵抗,因

此被广泛用于治疗由胰岛素抵抗引发的疾病。其作用机理与酪氨酸磷酸酶的抑制有关,其中涉及 PDE3B 介导的 PI-3K 通路^[52]。

5 小结

PDE3 作为胞内第二信使 cAMP 和 cGMP 联系的纽带,在细胞信号转导、生长、新陈代谢以及细胞增殖中都起着重要的调控作用。PDE3B 作为 PDE3 家族的一员,在调节胰岛素诱导的抗糖原水解、抗脂解、葡萄糖转运等过程中发挥着重要作用。PDE3B 功能缺陷可能导致由胰岛素抵抗引起的 2 型糖尿病、肥胖症等疾病。临床上影响 PDE3B 活性的药物已经用于治疗这些疾病,但目前有关这些药物影响 PDE3B 活性的具体机制仍不清楚,进一步研究会对治疗 2 型糖尿病和肥胖症有重大意义。

参考文献(References)

- [1] Soderling SH *et al. Curr Opin Cell Biol*, 2000, **12**: 174
- [2] Francis SH *et al. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 2001, **65**: 1
- [3] Movsesian MA. *Basic Res Cardiol*, 2002, **97**: 83
- [4] Xu RX *et al. Science*, 2000, **288**: 1822
- [5] Kenan Y *et al. J Biol Chem*, 2000, **275**: 12331
- [6] Shakur Y *et al. J Biol Chem*, 2000, **275**: 38749
- [7] Reinhardt RR *et al. J Clin Invest*, 1995, **95**: 1528
- [8] Nilsson R *et al. Cell Signal*, 2006, **18**: 1713
- [9] Cong L *et al. Biochem J*, 2007, **403**: 519
- [10] Härndahl L *et al. J Biol Chem*, 2004, **279**: 15214
- [11] Härndahl L *et al. J Biol Chem*, 2002, **277**: 37446
- [12] Ahmad F *et al. J Immunol*, 2000, **164**: 4678
- [13] Whitman M *et al. Nature*, 1988, **332**: 644
- [14] Vanhaesebroeck B *et al. Exp Cell Res*, 1999, **253**: 239
- [15] Jones PF *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**: 4171
- [16] Laine J *et al. J Biol Chem*, 2002, **277**: 3743
- [17] Gao A *et al. Toxicol Lett*, 2007, **170**: 30
- [18] Xie Jin *et al. Exp Hematol*, 2005, **33**: 564
- [19] Díaz-Montero CM *et al. Eur J Cancer*, 2006, **42**: 1491
- [20] Zheng ZZ *et al. Int J Biochem Cell Biol*, 2007, **39**: 340
- [21] Hemmings BA. *Science*, 1997, **275**: 628
- [22] Baran CP *et al. J Biol Chem*, 2003, **278**: 38628
- [23] Cantley LC *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 4240
- [24] Zmuda-Trzebiatowska E *et al. Cell Signal*, 2006, **18**: 382
- [25] Elks ML *et al. Endocrinology*, 1984, **115**: 1262
- [26] Kotani K *et al. Mol Cell Biol*, 1998, **18**: 6971
- [27] Kupriyanova TA *et al. J Biol Chem*, 1999, **274**: 1458
- [28] Omatsu-Kanbe M *et al. FEBS Lett*, 1992, **314**: 246
- [29] Ferrara CM *et al. Biochem J*, 1999, **343**: 571
- [30] Lee AD *et al. Am J Physiol*, 1997, **273**: c1082
- [31] Eriksson H *et al. Biochim Biophys Acta*, 1995, **1266**: 101
- [32] Zmuda-Trzebiatowska E *et al. Cell Signal*, 2007, **19**: 81
- [33] Smith U *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **268**: 315
- [34] Kohn AD *et al. J Biol Chem*, 1996, **271**: 31372

- [35] Burgering BM *et al. Nature*, 1995, **376**: 599
[36] Wijkander J *et al. Endocrinology*, 1998, **139**: 219
[37] Kitamura T *et al. Mol Cell Biol*, 1999, **19**: 6286
[38] Cho H *et al. Science*, 2001, **292**: 1728
[39] Jiang ZY *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**: 7569
[40] George S *et al. Science*, 2004, **304**: 1325
[41] Andjelković M *et al. J Biol Chem*, 1997, **272**: 31515
[42] Watson RT *et al. Trends Biochem Sci*, 2006, **31**: 215
[43] 许樟荣等. *中国糖尿病杂志*, 2006, **14**: 250
[44] Sano R *et al. Diabetes Res Clin Pract*, 2001, **54**: 79
[45] Suzuki T *et al. Diabetologia*, 1985, **28**: 286
[46] Tang Y *et al. Diabetes*, 1999, **48**: 1830
[47] Eriksson JW *et al. Biochim Biophys Acta*, 1994, **1189**: 163
[48] Boden G *et al. Eur J Clin Invest*, 2002, **32**: 14
[49] Itani SI *et al. Diabetes*, 2002, **51**: 2005
[50] Tang Y *et al. Eur J Endocrinol*, 2001, **145**: 93
[51] Resjö S *et al. Cell Signal*, 2002, **14**: 231
[52] Castan I *et al. Biochem J*, 1999, **339**: 281

Phosphodiesterase Type 3B: Downstream Factor of PI-3K/PKB Pathway as well as Its Clinical Research

Wen Cao, Fang-Xiong Shi*

(College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract In the insulin-induced PI-3K/Akt pathway, phosphodiesterase type 3B(PDE3B), as downstream factor of Akt, plays an important role in the physiological responses such as antiglycogenolysis, antilipolysis, glucose transport by mediating intracellular cAMP level. Recent evidence suggests that variety of PDE3B's activity and expression is one of key factors which lead to insulin resistance. Therefore, PDE3B and some substances affecting activity of PDE3B could be the target to cure Type 2 diabetes and adiposity which pathophysiology are based on insulin resistance.

Key words PDE3B; PI-3K/Akt; insulin resistance; type 2 diabetes

Received: July 3, 2007 Accepted: August 31, 2007

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30571335)

* Corresponding author. Tel/Fax: 86-25-84395701, E-mail: fxshi@njau.edu.cn