

# 蛋白激酶 B 的特性及其生物学功能\*

张兵\*\*,\*\*\* 吴乔\*\*,\*\*\*\* 陈睦传\*\*\*

(\*\* 厦门大学生命科学学院细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室 361005 厦门

\*\*\* 厦门大学医学院 361005 厦门)

蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB) 属于丝氨酸苏氨酸蛋白激酶家族成员, 分子量为 57KD, 其结构与蛋白激酶 A 有 68% 的同源性, 与蛋白激酶 C 有 73% 的同源性, 因此又称为 RAC-PK (related to the A and C protein kinase)。由于这种激酶是逆转录病毒 Akt8 癌基因 v-akt 编码的蛋白产物, 故也称为 PKB/Akt<sup>[1,2]</sup>。

许多细胞因子、生长因子受体和抗原受体均可以诱导 PKB/Akt 活性, 活化后的 PKB/Akt 在糖代谢、蛋白合成以及基因表达等过程中起着重要的调节作用<sup>[3]</sup>。人 PKB/Akt 基因位点接近免疫球蛋白重链基因位点<sup>[4]</sup>, 后者区域频繁出现的易位和倒置通常和白白血病、淋巴瘤的诱发相关, 由此提示 PKB/Akt 的激活和调控对肿瘤发生具有潜在的影响<sup>[1]</sup>。另外, PKB/Akt 在细胞凋亡中也有特殊的作用<sup>[5]</sup>。目前, 对 PKB/Akt 的研究已经成为细胞信号转导研究领域的一个新热点, 本文综述近年来这方面的研究进展, 从而增强人们对 PKB/Akt 作用的进一步认识。

## 一、PKB /Akt 的结构

已发现 PKB/Akt 有三种亚型, 即 PKB $\alpha$  (C-Akt1)、PKB $\beta$  (C-Akt2) 和 PKB $\gamma$  (C-Akt3), 它们之间的同源性高达 82%, 在人体组织中广泛表达。与 PKB $\alpha$  和 PKB $\beta$  相比, PKB $\gamma$  在 C 端缺少 23 个氨基酸, 具有组织特异性。在这三种亚型中, 对 PKB $\alpha$  的研究较多, 编码人 PKB $\alpha$  基因位于染色体 14q32 上<sup>[4]</sup>。

PKB/Akt 家族蛋白分子为单链结构, 由 3 个结构域组成: 第 1 - 147 氨基酸构成 N 端调节区 (AH domain), 其中 1 - 106 氨基酸组成 PH 区 (pleckstrin homologous domain), 主要功能是将 PKB/Akt 定位在细胞膜; 第 148 - 411 氨基酸构成中间的激酶区, 其内包含一个保守的苏氨酸位点 (Thr308/Thr309/Thr305), 该位点的磷酸化是 PKB/Akt 活化所必需的; 第 412 - 480 氨基酸构成 C 末端调节区, 富含疏水氨基酸和脯氨酸, 可以和 SH3 (src 同源序列 3) 区结合, 除 PKB $\gamma$  外, PKB $\alpha$  和 PKB $\beta$  在这个区域均有

一个丝氨酸位点 (Ser473/Ser474)<sup>[1,2]</sup>。

除 C 末端外, PKB/Akt 结构在进化过程中高度保守。当 PH 区具有 7 个反向  $\beta$  折叠和一个  $\alpha$  螺旋的结构掩盖住位于 T-Loop 区的 Thr308 位点时, PKB/Akt 活性受到抑制; 而当 PH 区和 PIP3/PIP2 (PtdIns-3, 4, 5-P3, 磷脂酰肌醇 3 磷酸; PtdIns-3, 4-P2 磷酸酰肌醇 2 磷酸) 等结合时, 这种抑制作用则丧失<sup>[6]</sup>。

## 二、PKB /Akt 的活化

PKB/Akt 可以被许多生长因子如 PDGF、EGF、IGF-1 和 bFGF 等和细胞因子如 TNF、IL-1 等激活, 主要是通过 PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase, 磷脂酰肌醇三磷酸激酶) 途径。PKB/Akt 是 PI3K 下游的一个靶位点, 经 PI3K 磷酸化后具有活性, PKB/Akt 的活化过程可以被 PI3K 抑制剂如 wortmannin 和 LY294002 特异性地抑制<sup>[7,8]</sup>。

RTK (receptor tyrosine kinase) 自体磷酸化后, PI3K 通过 P85 亚单位的 SH2 (src 同源序列 2) 和磷酸化的酪氨酸残基相互作用, 引起自身 P110 亚单位活性的变构调节而被激活<sup>[9,10]</sup>, 此时 P110 可以催化膜上的磷脂酰肌醇 4, 5-双磷酸 D3 位点磷酸化, 产生 PIP3<sup>[11]</sup>, 再通过 5-磷酸化酶水解将部分 PIP3 脱磷酸化为 PIP2。PIP3 和 PIP2 均为细胞内的第二信使, 正常情况下在细胞内含量较少, 但在生长因子刺激下含量剧增, 并为具有 PH 区的脂类结合蛋白激酶结合到膜上提供必要的位点。PKB/Akt 通过 PIP3 和 PIP2 的介导转移到膜上, 并改变结构以暴露 T-Loop 区内的 Thr308 位点<sup>[6,12]</sup>。

PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase, 也称 PDK 或 PKBK) 为脂类结合蛋白激酶, 具有 PH 区, 也由 PIP3 和 PIP2 介导而结合到细胞膜上<sup>[13]</sup>。当 PKB/Akt 的 Thr308 位点被 PDK1 磷酸化和 C 末端调节区的 Ser473 位点被 PDK2 磷酸化后, PKB/Akt 则具有活性。最近发现 PDK1 和

\*教育部访问学者专项基金(2001 年度)资助。

\*\*\*\* 联系人。

PDK2 两种酶之间是相互关联的。PDK1 通过和来源于 PRK2 (protein kinase C-related kinase-2) C 末端的 PIF (PDK1-internacting fragment) 相互作用, 激活其特异性底物, 继而转化为能在 PKB/Akt 的 Ser473 位点上磷酸化 PKB/Akt 的 PDK2, 因此 PDK2 实质上是 PDK1 和 PIF 的复合物, PRK2 则可能是 PDK1 的底物<sup>[14]</sup>。

IP3 (inositol trisphosphate) 在细胞膜上将含有 PH 区的蛋白卸载, 使 PKB/Akt 活化并从细胞膜上脱离, 后者再磷酸化其下游靶位点。活化的 PKB/Akt 在蛋白磷酸酶 2A (PP2A) 的去磷酸化作用下则失活<sup>[3]</sup>。另外, 已活化的 R-Ras 和 Ras 突变体也可以通过 PI3K 途径激活 PKB/Akt, 例如, Ha-Ras 介导的小肠上皮细胞转化就是通过 PI3K 途径激活 PKB/Akt<sup>[15]</sup>。

### 三、PKB/Akt 的生物学功能

#### 1. 参与糖原和蛋白合成等代谢过程

众所周知, 胰岛素能够引发一系列生物学反应, 现已证实许多反应均是通过 PI3K 调节的, 其中包括葡萄糖运输, 糖原合成和蛋白质合成, 而 PKB/Akt 则作为关键激酶起着重要作用。PKB/Akt 磷酸化的作用底物是糖原合成激酶 3 (glycogen synthetase kinase 3, GSK3), 该酶可以磷酸化糖原合成酶使其失活, 从而抑制糖原合成。而当 GSK3 的 Ser 位点被 PKB/Akt 磷酸化后, GSK3 失活, 由此不能磷酸化糖原合成酶, 使得糖原合成酶依旧保持活性而刺激糖原的合成, 这也是胰岛素作用机制之一<sup>[16]</sup>。另外, PKB/Akt 引起的 GSK3 失活也参与了蛋白合成, 并具有加强作用。Tor (rapamycin 靶位点) 可能是 PKB/Akt 下游作用位点, 它可以磷酸化转录起始因子 4E (eIF-4E)-结合蛋白 (4E-BP1), 使其从 eIF4E 上分离下来, 从而增强 mRNA 转录, 促进蛋白合成<sup>[17,18]</sup>。

原来认为 p70<sup>S6k</sup> (p70 ribosomal protein S6 kinases) 也是 PKB/Akt 下游的作用位点之一, 可以磷酸化线粒体蛋白 S6, PKB/Akt 通过加强 p70<sup>S6k</sup> 表达水平促进蛋白合成<sup>[19]</sup>。然而, 最新研究否认了这一观点, 而是将 p70<sup>S6k</sup> 和 PKB/Akt 并列为 PI3K 的作用底物, 但其磷酸化机制比 PKB/Akt 更为复杂, 涉及到许多磷酸化位点<sup>[20]</sup>。

#### 2. 促进细胞存活、抑制细胞凋亡

(1) 促进细胞存活, 尤其是神经元 一些生长因子通过 PI3K/Akt 途径阻止神经元进入死亡进

程, 从而促进神经元的存活<sup>[17,20]</sup>。例如在海马神经元中, PKB/Akt 通过 PI3K 途径被激活后, 抑制转录因子 P53 的活性, 进而抑制海马神经元在缺氧和一氧化氮条件下发生的细胞死亡, 由此促进神经元的存活<sup>[21]</sup>。在小脑神经元发生过程中, 通过 PI3K 途径激活的 PKB/Akt 在介导 IGF-1 作用于小脑神经元存活时也发挥了关键作用<sup>[22]</sup>。因此 PKB/Akt 在介导各种生长因子促进神经元存活、抑制神经元溃变过程中具有重要的媒介作用。

(2) 参与细胞凋亡调控 近年来的研究表明 PI3K-PKB/Akt 参与一些细胞的凋亡调节, 主要是抑制细胞凋亡活动。PKB/Akt 主要通过作用于下列几种底物而抑制细胞凋亡, 这些底物包括 Bad、caspase9、FKHR (transcription factors of the forkhead family) 和 IκK 激酶等。

Bad 是 Bcl-2 家族成员之一, 正常状态下被磷酸化并与 Bcl-XL 结合, 使 Bcl-XL 去磷酸化而失活, 由此导致细胞凋亡。当生长因子作用于细胞后, 导致 Bad 两个位点 (Ser-112 和 Ser-136) 中的任何一个位点磷酸化, 由此促使 Bad 从 Bcl-XL 脱离, 而与细胞质内 14-3-3 蛋白 (一种调节器蛋白, 以磷酸化形式和许多信号分子相互作用) 结合, 结合后的 Bad 去磷酸化作用被抑制或者从线粒体上的靶位点分开, 从而抑制细胞凋亡, 促进细胞生长。PKB/Akt 则主要作用于 Bad 的 Ser-136 位点上<sup>[24,25]</sup>。

胱冬肽酶 (caspase) 是一类细胞内蛋白酶, 作为细胞凋亡的启动者和效应器起作用。许多刺激细胞凋亡的信号可以诱导细胞色素 C 从线粒体释放到细胞质中, 继而激活 Apaf-1 和胱冬肽酶 9 (caspase-9)。活化的胱冬肽酶 (caspase-9) 直接和胱冬肽酶 3 (caspase-3) 结合, 激活后者引发其他一系列的胱冬肽酶 (caspases) 级联反应。PKB/Akt 则磷酸化 caspase-9 而导致其失活, 从而抑制细胞凋亡、促进细胞生长<sup>[26]</sup>。

Forkhead 家族成员 (如 FKHR、FKHRL 和 AFX) 在正常情况下从细胞质进入到细胞核, 并且和细胞内特定的 DNA 元件结合, 启动基因表达。PKB/Akt 磷酸化 Forkhead 家族成员, 使其被阻止在细胞质中, 无法进入细胞核, 不能启动凋亡基因, 从而抑制细胞凋亡、促进细胞生长<sup>[27]</sup>。

NF-κB 转录因子可以诱导细胞核内一些促进生长的基因活化, 这些基因包括 bc1-2 家族中的 Bfl-1/A1、胱冬肽酶 (Caspase) 家族成员等。正常状态下, NF-κB 转录因子被 NF-κB 抑制酶 (IB 家族) 阻断

在核外而不能作用于核内的相关基因位点。PKB/Akt就是通过和I $\kappa$ K(一种磷酸化NF- $\kappa$ B抑制酶的激酶)的直接作用而磷酸化NF- $\kappa$ B抑制酶,使其降解失去活性,从而有利NF- $\kappa$ B转录因子的释放并进入核内作用于相关的生长基因,促进细胞生长。现已发现PKB/Akt磷酸化I $\kappa$ K的位点是Thr23<sup>[17]</sup>。

PKB/Akt是细胞存活信号通路中的关键调节者,通过调节FKHR家族和NF- $\kappa$ B阻断细胞凋亡,通过磷酸化Bad和caspase-9使其失活而阻断细胞凋亡。另外,还存在其他PKB/Akt的靶位点,例如NOS(NO合成酶)、端粒酶telomerase等。目前已知在一定条件下活化PKB/Akt是细胞存活所必需的,而且通过调节PKB/Akt,许多在其上游的原癌基因和肿瘤抑制基因也都会直接影响肿瘤发展进程。

### 3. 在免疫细胞中的作用

PI3K的活化和PIP3的产生是BCR(B细胞受体)介导信号途径的关键,而PKB/Akt位于PI3K的下游,因此反馈调节PI3K途径可认为是下调B细胞反应的一种机制<sup>[29]</sup>。另一方面免疫细胞也部分调节PKB/Akt活性,如SHIP(SH2 domain-containing inositol phosphatase)可以裂解PIP3产生PIP2,从而激活PKB/Akt途径,引发免疫反应;但如果SHIP和FcRIIB1-Fc受体结合,就会导致PKB/Akt活性被抑制<sup>[28]</sup>。同时由于PKB/Akt基因位点与免疫球蛋白重链位点相接近,推测可能与白血病和淋巴瘤等的发生机制相关<sup>[1,4]</sup>。最近研究表明,Nur77是T细胞抗原受体介导细胞凋亡所必需的,PKB/Akt通过磷酸化Nur77的Ser350位点使其失活,从而抑制细胞凋亡。所以PKB/Akt和PI3K在免疫系统中起着负调节作用<sup>[29]</sup>。

## 四、PKB/Akt研究的主要方向

### 1. PKB/Akt在正常细胞糖代谢中的作用机制

尽管已经证实PKB/Akt能够促进葡萄糖吸收和蛋白合成,但并不是在所有细胞中PKB/Akt均能够诱导糖原合成。现已发现在3T3L-1脂肪细胞中PKB/Akt不能诱导糖原合成<sup>[30]</sup>,因此有必要对PKB/Akt诱导细胞内糖代谢改变的机制进行深入研究。

### 2. PKB/Akt抗凋亡的作用机制

尽管已经发现PKB/Akt抑制凋亡过程中的几种底物,但并不仅仅局限于此,还存在其他的PKB/Akt抗凋亡作用位点<sup>[31]</sup>。另一方面,由于PKB/Akt具有促进生长因子诱导细胞存活和抑制细胞凋亡的

作用,许多学者开始关注其在肿瘤治疗中所起的作用。例如已发现在卵巢癌细胞中,PKB/Akt2表达水平较高<sup>[32]</sup>,并且当PKB/Akt1基因过度表达或者PKB/Akt2基因表达增强时,其抑制化疗药物诱导的细胞凋亡能力比低水平表达PKB/Akt1或PKB/Akt2的肿瘤细胞更强<sup>[33]</sup>。PTEN通过抑制PI3K/Akt而抑制肿瘤形成<sup>[34]</sup>,有趣的是在PTEN<sup>+</sup>/杂合小鼠中又观察到上皮发育不良和直肠癌发生的比例较高,推测PKB/Akt活性在结肠直肠癌发生中可能起重要作用<sup>[35,36]</sup>。

### 3. 与其他信号通路的交联(cross-talk)

PKB/Akt位于许多信号通路的交界处,通过生长因子受体激活的PI3K起作用<sup>[37]</sup>。现已发现PKB/Akt激活途径不仅与细胞因子、生长因子等刺激有关,还受Ras受体、cAMP等调节。例如cAMP对PKB/Akt的调节作用主要是通过阻断PKB/Akt与其上游PDK(phosphoinositide-dependent kinase)连接而抑制PKB/Akt作用<sup>[37]</sup>。另外,cAMP有效地抑制PKB/Akt的Thr和Ser位点磷酸化而抑制PKB/Akt作用,通过抑制PDK转运到细胞膜上而负调控PDK活性,还可以抑制PI3K活性,降低体内PI3P活性等等,由此形成复杂的交联。另一方面,PKB/Akt位于Ras下游,其通过直接磷酸化Ras途径中Raf的Ser259位点,为14-3-3蛋白提供结合位点,抑制Raf作用,从而在Raf-MEK-ERK和PI3K-PKB/Akt途径之间形成交联,而且已证明PI3K-PKB/Akt的活化在哺乳类细胞RAS介导的转化、黏附、细胞存活以及由RAS诱导的细胞骨架重新形成中起到至关重要的作用<sup>[38]</sup>。

## 摘 要

PKB/Akt是一种作用特殊的蛋白激酶,在细胞因子、生长因子的作用下,通过PI3K途径被激活,在细胞代谢、生长调节和抑制细胞凋亡等生物活动过程中起着重要的调节作用,有效地将胞外存活因子与胞内生长、代谢和凋亡机制的相关性有机地联系起来,并且和Ras、G蛋白、PKA以及PKC等也有复杂的交联(cross-talk)。因此,通过对PKB/Akt的深入研究,尤其在抑制细胞凋亡、促进细胞存活意义的阐明,对于应用PKB/Akt作用靶点治疗疾病将会有着长远的、广泛的前景。

## 参 考 文 献

[1] Coffey PJ. et al., 1998, *Biochem. J.*, 335:1-13.

- [ 2 ] Bellacosa A. et al. ,1991, *Science*, **254**:274 - 277.
- [ 3 ] Hemmings BA. 1997, *Science*, **275**:628 - 630.
- [ 4 ] Staal SP. et al. ,1988, *Genomics*, **2**:96 - 98.
- [ 5 ] Kulik G, et al. ,1997, *Mol Cell Biol.* ,**17**:1595 - 1606.
- [ 6 ] Bellacosa A. et al. ,1998, *Oncogene*, **17**:313 - 325.
- [ 7 ] Burgering S. et al. ,1995, *Nature*, **376**:599 - 602.
- [ 8 ] Datta K. et al. , 1996, *J. Biol. Chem.* , **271**: 30865 - 30839.
- [ 9 ] Fruman DA. et al. , 1998, *Annu. Rev. Biochem.* , **67**: 481 - 507.
- [10] Klippel A. et al. , 1992, *Mol. Cell. Biol.* , **12**: 1451 - 1459.
- [11] Carpenter CL. et al. ,1996, *Curr. Opin. Cell Biol.* , **8**:153 - 158.
- [12] Franke TF. et al. ,1997, *Science*, **275**:665 - 668.
- [13] Alessi DR. et al. ,1997, *Curr. Biol.* , **7**:261 - 269.
- [14] Balendran A. et al. ,1999, *Curr. Biol.* , **9**:393 - 404.
- [15] Hongmiao S. et al. , 2001, *J. Biol. Chem.* , **276**: 14498 - 14504.
- [16] Cross DA. et al. ,1995, *Nature*, **378**:785 - 788.
- [17] Datta SR. et al. ,1999, *Gene Dev.* , **13**:2905 - 2927.
- [18] Scott PH. et al. ,1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 7772 - 7777.
- [19] Kon H. et al. ,1999, *Oncogene*, **18**:5115 - 5119.
- [20] Rameh LE. et al. , 1999, *J. Biol. Chem.* , **274**: 8347 - 8350.
- [21] Yamaguchi A. et al. , 2001, *J. Biol. Chem.* , **276**:5256 - 5264.
- [22] Dudek H. et al. ,1997, *Science*, **275**:661 - 665.
- [23] Downward J. 1998, *Science*, **279**:673 - 674.
- [24] Del PL. et al. ,1997, *Science*, **278**:687 - 689.
- [25] Datta SR. et al. ,1997, *Cell*, **91**:231 - 241.
- [26] Cardone MH. et al. ,1998, *Science*, **283**:1318 - 1321.
- [27] Brunet A. et al. ,1999, *Cell*, **96**:857 - 868.
- [28] Javad AM. et al. , 1998, *J. Biol. Chem.* , **273**: 33922 - 33928.
- [29] Pekarsky Y. et al. ,2001, *Proc. Natl. Aca. Sci. USA*, **98**: 365 - 369.
- [30] Ueki K. et al. ,1998, *J. Biol. Chem.* , **273**:5315 - 5322.
- [31] Madge LA. et al. , 2000, *J. Biol. Chem.* , **275**: 15458 - 15465.
- [32] Yuan ZQ. et al. ,2000, *Oncogene*, **19**:2324 - 2330.
- [33] Page C. et al. , 2000, *Anticancer Res.* , **20**:407 - 416.
- [34] Cantley LC. et al. ,1999, *Proc. Natl. Aca. Sci. USA*, **96**: 4240 - 4245.
- [35] Di Cristofano A. et al. ,1998, *Nat. Genet.* , **19**:348 - 355.
- [36] Podsypanina K. et al. ,1999, *Proc. Natl. Aca. Sci. USA*, **96**,1563 - 1568.
- [37] Sunhong K. et al. , 2001, *J. Biol. Chem.* , **276**: 12864 - 12870.
- [38] Osada M. et al. , 1999, *Mol. Cell. Biol.* , **19**: 6333 - 63440.

## DNA 拓扑异构酶 II 研究进展

阴梅云 郑全辉 郑力芬 韩 硕 周娜静 阎蕴力

(河北医科大学基础所细胞生物室 石家庄 050017)

DNA 拓扑异构酶 II (Topoisomerase II, Topo II) 是生物体内广泛存在的一类核蛋白,通过调节核酸结构动态变化,在 DNA 复制、修复、转录、重组以及染色体分离等生命活动中发挥重要作用。此外, Topo II 与肿瘤发生、发展以及治疗和预后等方面有较密切的联系。Topo II 有  $\alpha$  与  $\beta$  两种同功酶,其中 Topo II  $\alpha$  研究报道颇多,有不少新见解。本文重点概述 Topo II  $\alpha$  表达调控和其影响因素,并对 Topo II  $\alpha$  与 Topo II  $\beta$  同功酶异同方面的研究作一比较。

### 一、蛋白激酶对 Topo II $\alpha$ 生物活性的影响

细胞内许多激酶类蛋白质,如蛋白激酶 C、钙调蛋白依赖蛋白激酶、酪蛋白激酶 CK2、CAMP 依赖蛋白激酶以及细胞周期依赖蛋白激酶 (cyclin-dependent kinases, CDKs) 等均可影响 Topo II  $\alpha$  生物活性。此类蛋白质常通过它们的丝氨酸残基部位磷

酸化 Topo II  $\alpha$ ,使其生物活性增加。而且,这些蛋白质的调节往往与 Topo II  $\alpha$  在细胞周期中特异性分布有关。特别是在  $G_2/M$  期,一系列重大事件:如 DNA 损伤修复、染色质重修饰、染色体凝集、染色体分离和细胞分裂等都与 Topo II  $\alpha$  的作用有关。新近,有资料研究表明:Topo II  $\alpha$  细胞周期特异性,主要决定于其蛋白质 3'-UTR 区域,此区包括 177 核苷酸,富含腺嘌呤/尿嘧啶,多种蛋白质可直接作用于此,以调节 Topo II  $\alpha$  周期性变化<sup>[1]</sup>。其中,有下列几种蛋白激酶与 Topo II  $\alpha$  的活性及其在  $G_2/M$  期中的作用关系密切。

#### 1. CDKs 的作用

一般来说,不同种类的 CDK 均可通过直接或间接方式,影响 Topo II  $\alpha$  的生物活性。其中, p34<sup>CDK2</sup> 作为细胞周期由  $G_2$  期向 M 期过渡的重要的调节成分,能够直接和 Topo II  $\alpha$  形成分子复合物,对染色质进行重修饰、参与染色体形成<sup>[2]</sup>。另外, p34<sup>CDK2</sup> 在