

PKB/Akt 在糖尿病及其血管并发症中的调节作用

肖国华 王宗保

目前,糖尿病(DM)已成为继心脑血管疾病、肿瘤之后严重危害人类健康的第三大慢性病。研究表明糖尿病血管病变发生的主要原因是血管内皮细胞功能异常,这是动脉粥样硬化(AS)的早期指标,亦是AS发生和加重的重要基础或起始事件^[1]。PKB(protein kinase B)/Akt 通过对葡萄糖转运、糖原合成、糖酵解和糖异生的调节及其基因的突变、沉默、敲除和PKB酶活性改变影响着葡萄糖的代谢及糖尿病的发生和发展,在血管内皮细胞凋亡、增生及血管发生的生理和病理过程中也起关键作用,多年来一直受到有关专家、学者的高度重视,并取得了较大进展。

一、PKB/Akt 的结构特征和组织分布

PKB 是属于丝氨酸/苏氨酸激酶家族,相对分子质量为 57kDa,在研究一种反转录病毒 Akt8 时被发现,因与 PKA、PKC 家族有同源性而得名 PKB,亦因是 v-akt 病毒癌基因而被称为 Akt。

PKB/Akt 约由 480 个氨基酸组成,N 端到 C 端依次为 PH 结构域、激酶/催化结构域和调节结构域。PH 结构域可介导脂类之间及蛋白质-蛋白质之间的相互作用,PH 结构域突变或缺失可导致 Akt 的活性降低或丧失;激酶结构域类似于 PKA、PKC 的激酶结构域,早期被称作 A 和 C 相关的蛋白激酶(RAC-PK),含有调节激酶活性的 ATP 结合位点,PKB α 、PKB β 、PKB γ 分别为 Thr308、Thr309、Thr305,该位点的磷酸化是 PKB 活化所必需的;调节结构域功能尚不明确,但有研究表明调节区富含脯氨酸,并含有 Akt 活化所必需的第 2 个磷酸化位点(Ser473),该位点的磷酸化使 Akt 的活性达到最大。

目前共发现 PKB/Akt 的 3 种主要形式:PKB α /Akt1、PKB β /Akt2 和 PKB γ /Akt3,3 种亚型有高度序列同源性,在不同的组织中各亚型分布不同。在多数组织中 Akt1 占主导地位,内皮细胞中以 Akt1 表达为

主^[2];而 Akt2 主要表达于胰岛素效应组织,如肝、肾、心脏和骨骼肌;Akt3 则在脑组织中高表达。

二、PKB/Akt 的调控

新近研究结果从 3 个方面解释了 PKB 活化和作用的分子机制。在胞外信号刺激下 PKB 与位于胞膜处的磷酸肌醇 3-激酶(PI3K)结合,活化蛋白激酶 1(PDK1),再磷酸化 PKB 的 Thr 308 位点^[3],随后蛋白激酶 2(PDK2)包括哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合体(mTORC2)、共济失调毛细血管扩张症突变基因蛋白产物(ATM)及 DNA 依赖蛋白激酶(DNA-PK)以依赖于 PI3K 的方式磷酸化 PKB 的 Ser 473 位点,从而全面激活 PKB。

其次以不依赖 PI₃K 的方式调控 PKB 活性的激酶包括甲状腺特异原癌基因/酪氨酸激酶 RET/PTC,通过磷酸化 PKB 的 Tyr 315 位点上调其激酶;首次证明 c-junN 端激酶(JNK)通过磷酸化 PKB 的 Thr 450 位点活化 PKB,进而保护受损心肌细胞;酪蛋白激酶 2(CK2)抗凋亡功能可能与其磷酸化 PKB 的 Ser 129 位点而活化 PKB 有关。

另外,乳腺肿瘤激酶(Brk)通过磷酸化 PKB 的 Tyr 474 位点进而抑制 PKB 活性;G 蛋白偶联受体激酶 2(GRK2)通过抑制 PKB 活性影响 eNOS 活化和 NO 的释放,其分子机制尚在研究中,提示了 GRK2 在血管疾病发生中可能具有重要意义。

PKB/Akt 调控严密精确,其调控紊乱可引起多种疾病如糖尿病和癌症等。目前虽然对于 PKB 两个关键位点(Ser473 和 Thr308)磷酸化的研究已经取得明显进展,但其他位点磷酸化对 PKB 活性的影响及其机制和 PKB 活化方式与生物效应间的关联目前还远未阐明。

三、PKB/Akt 的功能

1. PKB/Akt 在代谢中的功能:(1) PKB/Akt 在糖代谢中的作用:PKB 的磷酸化通过胰岛素依赖方式进行,可在以下 3 个水平上调控葡萄糖代谢:①PKB/Akt 通过诱导葡萄糖转运蛋白 GLUT1 和 GLUT3 的表达及 GLUT4 向质膜的移位促进葡萄糖摄取,此外,

基金项目:湖南省科技厅科研项目(湘材教指 2008SKJ17)

作者单位:421001 衡阳,南华大学生物化学与分子生物学教研室

通讯作者:王宗保,电子信箱:wangzb65@hotmail.com

PKB/Akt 通过增加内吞影响葡萄糖转运,从而维持血糖稳定^[4];②通过糖原合成酶激酶 3 (GSK3) 促进糖原合成。GSK3 是第一个被发现的 PKB/Akt 的生理底物,PI₃K、PDK、PKB/Akt 和 GSK3 形成了胰岛素调节糖原合成的信号级联系统中的一个重要支路。两种形式的 GSK3 的异构体 GSK3 α 和 GSK3 β 的氨基端都含有 PKB/Akt 的磷酸化位点,胰岛素通过磷酸化和失活 GSK3 促进糖原合成;③通过磷酸果糖激酶 2 (6-PF2-K) 诱导糖酵解。PKB/Akt 可以使心脏特异的 6-PF2-KSer 466 发生磷酸化,使其活化促进糖酵解。PKB 的磷酸化还可不通过胰岛素依赖方式进行。增加肝脏二磷酸果糖 (FDP) 可增加 PKB 蛋白含量及其磷酸化水平,上调肝葡萄糖激酶的基因表达,降低葡萄糖-6-磷酸酶的基因表达,从而影响糖酵解和糖原异生。PKB/Akt 基因的突变、沉默、敲除和 PKB 酶活性改变都影响着葡萄糖的代谢及糖尿病的发生。人 PKB β Arg274 突变抑制了 PKB 异构体的表达或者干预了 PDK1 的功能,表现为重度高胰岛素血症及胰岛素抵抗 (IR),还可导致糖尿病;PKB β 基因沉默抑制葡萄糖的摄取,PKB α 与 PKB β 基因沉默对糖原合成有抑制作用;PKB β 基因敲除使己糖摄取与利用均明显下降, GLUT4 易位减少,从而引起胰岛素抵抗和严重的糖尿病,且重新表达 PKB β 后上述作用完全恢复^[5];结构性激活 PKB 能使 GLUT4 持久易位,还可增加 GLUT1 的表达,从而增加糖转运。(2) PKB/Akt 在蛋白质与脂代谢中的作用:PKB/Akt 在两个水平上调控蛋白质代谢:①PKB/Akt 通过真核起始因子 (eIF2B) 启动蛋白质合成。eIF2B 是蛋白质合成的关键调控点之一, GSK-3 被 PKB 去活化后,解除对 eIF2B 磷酸化位点的作用,使该抑制位点发生去磷酸化,从而启动蛋白质合成途径;②通过 mTOR 终止蛋白质合成。PKB/Akt 能使 mTOR Ser 2448 发生磷酸化而活化 mTOR,从而对结节性脑硬化蛋白酶错构蛋白 (TSC2) 磷酸化导致其失活,最后终止蛋白质合成。PKB/Akt 在脂代谢中的作用是通过 ATP 柠檬酸裂解酶来实现的。GSK-3 磷酸化 ATP 柠檬酸裂解酶,从而使胞质内柠檬酸转化为乙酰乙酸,减弱脂肪合成效应。最近研究报道 PKB 与脂解作用和脂肪形成有关。

2. PKB/Akt 对细胞的作用:(1) PKB/Akt 抗细胞凋亡:PKB/Akt 是体内重要的凋亡抑制蛋白,PKB/Akt 通过磷酸化底物调节细胞凋亡和细胞代谢。PKB 抑制细胞凋亡主要表现在以下几个方面:使凋亡抑制

剂存活蛋白 (survivin) 的表达增加^[6];使 NF- κ B 活化并转位入核,启动抗凋亡基因的转录;使胱天蛋白酶-8 (caspase-8) 抑制剂 FLIP 的表达增加;磷酸化鼠双小蛋白-2 (MDM2) 使其转位入核进而抑制 p53 的促凋亡作用;使糖原合成酶激酶 3 失活;磷酸化 Bad 使其与 Bcl-2 或 Bcl-XL 解离而抗细胞凋亡;直接磷酸化胱天蛋白酶-9 使其激活下游胱天蛋白酶的能力降低;磷酸化凋亡信号调节激酶 (SAPK) 通路上游的激酶凋亡信号调节激酶,使 SAPK 通路受到抑制而促进细胞存活。(2) PKB/Akt 对细胞周期和转录的调控:PKB/Akt 可以通过磷酸化 GSK3 而增加周期蛋白 D (cyclin D) 的积累,负调控周期蛋白激酶 (CDK) 的抑制剂 P27/kip1 和野生型 p53 激活中断 1 (p21/cip1/waf1),通过增加 MDM2 活性导致 p53 降解,调控细胞周期。PKB/Akt 在活化后可以移位到核内,磷酸化一系列核因子发挥转录调控作用,主要表现在:①磷酸化转录因子 FoxO 降低其与凋亡有关的转录活性;②磷酸化 I κ B α 激酶 (IKK),后者磷酸化 I κ B,导致其降解,转录因子 κ 基因结合核因子 (NF κ B) 得以释放,发挥功能。

四、PKB/Akt 在糖尿病血管并发症中的作用

1. PKB/Akt 与糖尿病:PKB 通过活化诱导 GLUT4 向质膜移位,促进葡萄糖摄取,抑制糖原的合成,抑制糖酵解,促进糖异生,抑制蛋白质的合成及基因表达改变促进血糖升高、重度高胰岛素血症及胰岛素抵抗 (IR) 的发生,进而导致糖尿病。PKB/Akt 介导 β 细胞生长、生存在 2 型糖尿病中起关键作用。PKB/Akt 促进 β 细胞生长和增生:Akt 磷酸化 mTOR 后可激活真核起始因子 4E 结合蛋白 21 (eIF24E2BP1) 和核糖体 S6 蛋白激酶 (p70^{S6K}), eIF24E2BP1 和 p70^{S6K} 磷酸化导致 β 细胞蛋白合成总体增加,促进细胞增生和细胞周期进程,mTOR 激酶也可以作为“ATP 感受器”激活 p70^{S6K},从而控制蛋白的合成、加强基因的转录,促使胰岛 β 细胞肥大;磷酸化 GSK3 β 从而阻止细胞周期蛋白 D (cyclinD) 磷酸化和降解,促进细胞周期进程和有丝分裂,是 β 细胞正常生长扩增所必需的;胰十二指肠同源盒因子 (Pdx)-1 是一个诱发 β 细胞分化和胰岛素基因表达的关键转录因子,在 β 细胞 Foxo-1 负性调节 Pdx-1, Akt 介导 Foxo-1 磷酸化失活,从而促进细胞增生。PKB/Akt 抑制 β 细胞凋亡:Akt 可以直接磷酸化半胱氨酸蛋白酶前体蛋白 (procaspase)-9,防止其活化而阻断 β 细胞凋亡进程、促进细胞生存;Akt 通过磷酸

化鼠双小蛋白-2 (Mdm2) Ser 166 和 Ser 186, 保护其免受蛋白小体依赖降解, 而引起 Mdm2 自身泛素化抑制和稳定, 从而引起 p53 下调, p53 在 β 细胞过表达可促其凋亡, 显性负相 p53 突变体 (p53 + / -) 可保护 β 细胞免于凋亡^[7]; 性连锁凋亡蛋白抑制物 (XIAP) 是保守的凋亡蛋白抑制分子 (IAP) 家族成员, Akt 通过磷酸化 XIAP Ser⁸⁷ 残基抑制其自动泛素化和诱发泛素化、增强其稳定性和细胞内水平, 从而抑制 caspase-3 活性和细胞凋亡, 改善细胞生存; Akt 磷酸化 Bcl-2/Bcl-XL 相关死亡促进因子 (BAD) 导致其在胞质内失活, 阻止其与 Bcl-2 和 Bcl-XL 结合引起的 β 细胞凋亡, 从而增加 β 细胞生存; Akt 可引起 JNK 去磷酸化进而抑制 β 细胞凋亡。

2. PKB/Akt 与糖尿病血管并发症: 血管内皮细胞 (vascular endothelial cells, VECs) 是人体血管壁的第 1 道屏障, 也是最早受到高血糖影响的部位。PKB/Akt 在糖尿病血管内皮细胞凋亡、增生的调控中起关键作用。研究证明高糖条件下产生的活性氧簇 (ROS) 可使 Akt 去磷酸化, 导致 HUVECs 增生功能障碍, 促进内皮细胞凋亡, PI3K/Akt 的特异性抑制剂 LY294002 以剂量依赖性方式削弱内皮细胞的生殖, 而在高糖条件下转染构建性激活的 Akt 突变体能增加内皮细胞的增生; 高糖能上调 HUVECs 中 COX-2 蛋白的表达, 促进 PGE₂ 合成, 激活 caspase-3 进而促使 HUVEC 的凋亡; 高糖还能抑制 PKB 激活或加速 PKB 灭活, 进而抑制其下游 eNOS 的产生而加速内皮细胞凋亡^[8]; 内皮细胞 JNK 途径对 PKB 存在调节作用, 高糖通过激活 JNK 途径, 导致 PKB 磷酸化水平的降低, 促进内皮细胞凋亡; 去活化 PKB 导致存活蛋白的 mRNA 和蛋白质水平降低而促进微血管内皮细胞凋亡。研究表明 PI3K/Akt 途径参与抑制炎症反应^[9], 激活 Akt 可发挥部分抗炎作用, 保护受损的内皮细胞, 减少 AS 的发生; Akt 去活化诱导血管黏附分子-1 (vascular adhesion molecule 1, VCAM-1) 的表达, 诱导炎症效应, 促进血管内皮细胞的损伤。PKB/Akt 在血管发生的生理和病理过程中也有着重要作用: (1) 高糖能激活 Akt1/PKB, 进而促进 HUVECs 纤维连接蛋白 (fibronectin, FN) mRNA 和蛋白水平的表达, 而纤维连接蛋白的过度表达是糖尿病血管病变的一个显著特征。 (2) PKB 是血管发生的关键, VEGF 激活 PKB, 通过磷酸化 PKB Ser 1177 激活 eNOS 释放 NO, 从而促进血管舒张、血管重塑及血管发生^[10], 而 GRK2 通过抑制 PKB 活性影响 eNOS 激活 NO 释放而影响

血管发生。 (3) PKB 也可导致 hypoxiainducible factor α (HIF1 α and HIF2 α) 转录因子增加, 部分通过 mTORC1 翻译, HIF α 的激活促进 VEGF 及其他血管生存因子表达, 通过自分泌和旁分泌促进血管生存。

3. DM 心肌病: 心脏的生长、发育与 PKB 的激活^[18] 直接相关。PKB 通过磷酸化并失活 GSK-3 β 促进糖原合成, 从而导致心肌肥厚; PKB/Akt 激活已经被证实在心肌缺血预处理的早期相和延迟相中均发挥重要作用, 参与了缺血预处理的心脏保护作用。研究证明 Akt1、Akt2 在心脏中高度表达, 核靶向的 PKB 过表达转基因鼠出现心肌肥大, 表现为心肌细胞总数的增多和心肌收缩力增强, PKB 信号只有在胞核内或在生理条件下短暂激活才对心脏有利^[11]。

五、PKB 在药物干预中的应用

近年来, 有关 PKB 药物的研究已有进展。抑制 PKB 活性的药物可引起细胞周期静止、促进凋亡, 可诱发 IR 或糖尿病, 如姜黄素可减少 PKB Ser 473 磷酸化, 天然植物鱼藤酮在不影响 PI3K 活性的浓度下抑制 PKB 的活性。但针对 PKB3 种异构体的特异性抑制剂罕见报道, 激活 PKB 的药物可治疗糖尿病, 但长期用药则易促进肿瘤形成, 鞣酸通过胰岛素受体及 PKB 的磷酸化刺激 GLUT4 易位从而降低血糖, 可望成为无肥胖不良反应的抗糖尿病药物; 罗格列酮增加心肌葡萄糖氧化及胰岛素刺激的 PKB 活性, 从而降低 Zucker 糖尿病肥胖大鼠血糖、三酰甘油及游离脂肪酸水平。

六、展 望

综上所述, PKB 在糖代谢及糖尿病血管并发症的发生与发展中起着重要作用, 但其机制复杂, 仍有许多问题尚未阐明: PKB 的活化和失活的精确调控, 目前仍知之甚少; Akt 在细胞核内的精确定位及其调节机制、相互作用分子和靶分子有待研究; PKB 的直接和间接底物仍有许多有待发现; 药物干预 PKB 的表达或活性是否可以特异性地改善 IR 以及 PKB 移位至胞膜被激活的详细机制都有待阐明; 进一步研究 PKB 活化的磷酸化位点与糖尿病血管并发症发病机制的关系, 将有可能为糖尿病血管并发症的发病机制、病理生理、诊断以及治疗等提供一些崭新的思路和方法。此外, 对 PKB 亚型激活剂、PKB 磷酸化位点激活剂的开发及内源性 PKB 抑制物的阻断, 可为糖代谢障碍、胰岛素抵抗和 2 型糖尿病的防治提供新的

药物靶标。

参考文献

- 1 Sudano I, Spieker LE, Hermann F, *et al.* Protection of endothelial function: targets for nutritional and pharmacological interventions. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2006, 47(2): S136 – S150
- 2 Somanath PR, Razorenova OV, Chen J, *et al.* Akt1 in endothelial cell and angiogenesis. *Cell Cycle*, 2006, 5(5): 512 – 518
- 3 Viniegra JG, Martínez N, Modirassari P, *et al.* Full activation of PKB/Akt in response to insulin or ionizing radiation is mediated through ATM. *J Biol Chem*, 2005, 280(6): 4029 – 4036
- 4 Dugani CB, Klip A. Glucose transporter 4: cycling, compartments and controversies. *EMBO Rep*, 2005, 6(12): 1137 – 1142
- 5 Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, *et al.* Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor – mTOR complex. *Science*, 2005, 307(5712): 1098 – 1101
- 6 Ohashi H, Takagi H, Oh H, *et al.* Phosphatidylinositol 3 – kinase/Akt regulates angiotensin II – induced inhibition of apoptosis in microvascular endothelial cells by governing survivin expression and suppression of caspase – 3 activity. *Circ Res*, 2004, 94(6): 785 – 793
- 7 Amaravadi R, Thompson CB. The survival kinases Akt and Pim as potential pharmacological targets. *J Clin Invest*, 2005, 115(10): 2618 – 2624
- 8 Kobayashi T, Taguchi K, Yasuhiro T, *et al.* Impairment of PI3 – K/Akt pathway underlies attenuated endothelial function in aorta of type 2 diabetic mouse model. *Hypertension*, 2004, 44(6): 956 – 962
- 9 Guha M, Mackman N. The phosphatidylinositol 3 – kinase – Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. *J Biol Chem*, 2002, 277(35): 32124 – 32132
- 10 Salt IP, Morrow VA, Brandie FM, *et al.* High glucose inhibits insulin – stimulated nitric oxide production without reducing endothelial nitric – oxide synthase Ser1177 phosphorylation in human aortic endothelial cells. *J Biol Chem*, 2003, 278(21): 18791 – 18797
- 11 Rota M, Boni A, Urbanek K, *et al.* Nuclear targeting of Akt enhances ventricular function and myocyte contractility. *Circ Res*, 2005, 97(12): 1332 – 1341
- (收稿: 2009 – 06 – 22)
- (修回: 2009 – 11 – 29)
- (上接第 12 页)
- 7 Suzuki T, Ito T, Kashima I, *et al.* Continuous perfusion of pulmonary arteries during total cardiopulmonary bypass favorably affects levels of circulating adhesion molecules and lung function. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2001, 122(2): 242 – 248
- 8 Wei B, Liu YL, Wang Q, *et al.* Lung Perfusion With Protective Solution Relieves Lung Injury in Corrections of Tetralogy of Fallot. *Ann Thorac Surg*, 2004, 77(3): 918 – 924
- 9 De Santo LS, Romano G, Amarelli C, *et al.* Surgical repair of acute type a aortic dissection: continuous pulmonary perfusion during retrograde cerebral perfusion prevents lung injury in a pilot study[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2003, 126(3): 826 – 831
- 10 Chen F, Nakamura T, Wada H. Development of new organ preservation solutions in Kyoto University. *Yonsei Med J*, 2004, 45(6): 1107 – 1114
- 11 Kelly RF, Murar J, Hong Z, *et al.* Low potassium dextran lung preservation solution reduces reactive oxygen species production. *Ann Thorac Surg*, 2003, 75(6): 1705 – 1710
- 12 Thabut G, Vinatier I, Brugière O, *et al.* Influence of preservation solution on early graft failure in clinical lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 164(7): 1204 – 1208
- 13 Oto T, Griffiths AP, Rosenfeldt F, *et al.* Early outcomes comparing Perfadex, Euro – Collins, and Papworth solutions in lung transplantation. *Ann Thorac Surg*, 2006, 82(5): 1842 – 1848
- 14 Xiong L, Legagneux J, Wassef M, *et al.* Protective effects of Celsior in lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*, 1999, 18(4): 320 – 327
- 15 Wittwer T, Wahlers T, Cornelius JF, *et al.* Celsior solution for improvement of currently used clinical standards of lung preservation in an ex vivo rat model. *Eur J Cardiothorac Surg*, 1999, 15(5): 667 – 671
- 16 Sommer SP, Warnecke G, Hohlfeld JM, *et al.* Pulmonary preservation with LPD and celsior solution in porcine lung transplantation after 24 h of cold ischemia[J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2004, 26(1): 151 – 157
- 17 Dedeilias P, Koletsis E, Apostolakis E, *et al.* The effectiveness of an extracellular low – potassium solution in 24 – hour lung graft preservation[J]. *Med Sci Monit*, 2006, 12(11): BR355 – 361
- 18 Chen F, Nakamura T, Wada H. Development of new organ preservation solutions in Kyoto University[J]. *Yonsei Med J*, 2004, 45(6): 1107 – 1114
- 19 Omasa M, Hasegawa S, Bando T, *et al.* Application of ET – Kyoto Solution in Clinical Lung Transplantation[J]. *Ann Thorac Surg*, 2004, 77(1): 338 – 339
- 20 Chen F, Fukuse T, Hasegawa S, *et al.* Effective Application of ET – Kyoto Solution for Clinical Lung Transplantation[J]. *Transplantation Proceedings*, 2004(9), 36: 2812 – 2815
- (收稿: 2009 – 06 – 15)

欢迎订阅 2010 年《医学研究杂志》杂志