

Akt 信号通路与细胞存活的研究进展

陈毅刚, 尹波 综述 罗本燕 审校

浙江大学附属第一医院神经内科, 浙江省杭州市 310003

摘要: Akt/PKB 是一种丝/苏氨酸蛋白激酶, 由三个高度同源的 Akt1、Akt2 和 Akt3 组成。在对 Akt/PKB 的上游机制中不断了解的同时, 我们也认识到 Akt 的下游途径与协调信号的特异性有关, 通过影响下游多种效应分子的活化状态, 发挥着调节细胞存活、代谢、增殖的作用。Akt/PKB 信号通路在与肿瘤、心血管疾病、神经系统疾病的发生发展密切相关而受到重视。本文主要对 Akt/PKB 信号通路的组成与功能, 调节及抗凋亡方面的研究进展作一综述, 期待为以 Akt/PKB 为作用靶点的治疗研究提供参考。

关键词: Akt/PKB; 细胞存活; 凋亡; PI3K-AKT; 信号转导

丝/苏氨酸蛋白激酶 (serine-threonine kinase, Akt) 也被称为蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB), 分子量约为 57 kD, 处于多条信号通路的重要交叉点, 通过影响下游多种因子的活化状态, 发挥着抑制凋亡、促进增殖的关键作用^[1-2]。Akt/PKB 参与细胞存活主要通过直接调控凋亡蛋白、调节转录因子、控制代谢方式三种方式来实现。近年来, 不断的研究使人们对 Akt 生物学作用的了解更加深入, 其分子特性及作用靶点逐步被阐明, 而且它在细胞凋亡、增殖、血管再生、新陈代谢、细胞迁移中也起的作用也有了重大突破^[3]。

1 Akt/PKB 的结构特点

Akt/PKB 蛋白由约 480 个氨基酸组成, 包括氨基端的 PH 结构、中间的激酶区和羧基尾端三部分^[4]。目前在哺乳动物中发现至少 3 种 Akt 亚型: Akt1 (PKB α)、Akt2 (PKB β) 和 Akt3 (PKB γ), 分别由位于染色体 14q32、19q13 和 1q43 上的三个不同基因编码。Akt1 具有广泛的组织分布性, 而 Akt2 在肌肉和脂肪细胞中表达, Akt3 严格存在于睾丸与大脑中^[5]。目前发现 PKB α 可能在胚胎发育、生长方面起着决定性作用, 而 PKB β 和 PKB γ 对机体糖稳态和大脑方面并没有明显作用^[6]。

N 末端调节区, 即 PH 域, 大约由 100 个氨基酸组成, 它可以介导脂质与蛋白质、蛋白质与蛋白质之间相互作用, 近年来发现这个结构域可能与 3-磷脂酰肌醇中的 PH 域有高度相似性^[7], 故 PH 域调节 Akt/PKB 与 3-磷脂酰肌醇的结合, 促进 Akt/

PKB 分子向质膜移位而被活化。中间酶活性区具有催化丝/苏氨酸残基磷酸化活性的作用, 与 PKA 和 PKC 的活性区高度相似。其中的 Thr308 位点磷酸化是 Akt 活化所必需的; C 末端有一个富含脯氨酸的疏水结构域 (HM), 其中含有 Akt 完全活化所必需的第 2 个磷酸化位点 Ser473。目前 Akt/PKB 的 PH 域晶体结构已清晰, 其他结构正逐渐被解析, 对磷酸化关键位点、底物蛋白结合位点也将会有更深刻的认识。

2 Akt/PKB 的活性调节

所有 Akt/PKB 异构体除 PKB γ /Akt3 外, 都具有两个活性调节位点: Akt1 (PKB α)、Akt2 (PKB β) 和 Akt3 (PKB γ) 分别对应 Thr308 与 Ser473、Thr309 与 Ser474 和 Thr305 与 Ser472^[8]。Akt 能被细胞内多种物质如激素、生长因子、细胞因子、细胞间基质等刺激活化, 其活化途径可分为 PI3K 依赖、PI3K 非依赖和蛋白因子调控三种。

2.1 PI3K 依赖型活化

磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphoinositide 3-kinases, PI3K) 是一种胞内磷脂酰肌醇激酶, 它由一个催化亚基 p110 和一个调节亚基 p85 构成。PI3K 的 p110 本身既具有 Ser/Thr 激酶的活性, 也具有磷脂酰肌醇激酶的活性^[9]。Akt/PKB 是 PI3K 信号途径中重要的下游靶激酶。首先, 活化的 PI3K 催化 PIP2 生成 3, 4, 5-三磷酸磷脂酰肌醇 (PIP3), PIP3 通过与 Akt/PKB 的 PH 域结合, 使之从胞质转位至细胞膜, 引起 PKB/Akt 构象的改变, 暴露两个

收稿日期: 2012-03-12; 修回日期: 2012-06-18

作者简介: 陈毅刚 (1988-), 男, 硕士研究生, 主要从事脑缺血机制研究。

通讯作者: 罗本燕 (1962-), 女, 教授, 博士生导师, 主要从事神经内科工作。E-mail: luobenyan@zju.edu.cn。

磷酸化位点。同时,胞质中 PIP3 依赖性蛋白激酶 (PDK) 也借助自身的 PH 域与 PIP3 结合,导致构象改变的 Akt/PKB 与 PDK 相互接近;然后 PDK1 使 T308 发生磷酸化,部分激活 Akt/PKB;PDK2 或整合素连接型激酶 (ILK) 作用下使 S473 也发生磷酸化,完全活化 PKB/Akt^[10]。Akt/PKB 的激活有时需要激酶活性区的两个酪氨酸残基(在 PKB α /Akt1 为 Tyr315 和 Tyr326 位点)磷酸化,且此过程依赖 src 家族的酪氨酸激酶。也有报道称酪氨酸激酶受体 (RTK)/乙酸激酶 1 (Ack1) 通过磷酸化 Tyr170 位点来激活 Akt^[11]。活化的 Akt,进一步激活其下游的因子,如 bcl-2 家族、E2F、糖原合成酶 3 (GSK3)、叉头转录因子 (FKHR) 等,对细胞凋亡产生调节作用。

而在此过程中,PIP3 受到人第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因 (PTEN) 的调节。PTEN 是继 p53 后又一个抑癌基因,对能促进细胞增殖生长的 PI3K/Akt/PKB 信号转导途径起到负调控作用。从而引起其下游的一系列信号分子的变化,促进细胞凋亡,使细胞周期停滞于 G1 期,抑制肿瘤细胞生长。同样,PTEN 表达的缺失能增加 PI3K 的活性,从而通过影响血管内皮生长因子 (VEGF),促进血管内皮细胞增殖和微血管的形成^[12]。

2.2 PI3K 非依赖型活化

尽管许多研究表明 PI3-K 在调节 Akt/PKB 活性中起重要作用,但尚存在其他途径参与调节 Akt/PKB。一些物质如前列腺素 E、毛喉素能升高 cAMP,通过 PKA 激活 Akt^[13],此时仅仅需要激活 Thr308,并且发现这个过程不被 PI3K 抑制剂 wortmannin 阻断,而 PKA 激活 PKB 的机制目前仍不清楚。P38/HOG1 可以直接激活 MAPKAP 激酶-2,后者能在体外磷酸化 Akt 的 Ser473 位点,可能与细胞应激引起的 Akt/PKB 的活化有关;同时也发现胰岛素等刺激因子可通过激活依赖于钙-钙调蛋白激酶,直接磷酸化 Akt 的 Thr308 位点导致其活化^[14]。

天然抗癌基因 PHLPP (PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase) 可以不通过 PI3K,直接负性调节 Akt。PHLPP 家族有三种磷酸酶亚型: PHLPP1- α 、PHLPP1- β 和 PHLPP2;它们的作用也不尽相同,PHLPP1 主要使 AktII 和 AktIII 去磷酸化,而 PHLPP2 则影响 Akt I 和 AktIII 的磷酸化。

PHLPP1 和 PHLPP2 通过使磷酸化的 Akt 去磷酸化,补充 PTEN 功能的不足,降低细胞内活化的 Akt 水平,从而抑制 PI3K/Akt 信号通路的调控细胞周期、抑制细胞凋亡的作用^[15]。

2.3 蛋白调控因子

蛋白调控因子主要分为负性调控因子与正性调控因子。C 末端调节蛋白 (CTMP) 是针对 Akt 的 C 端的一种负性调节因子;Trb3 是近年来发现的一个具有脚手架样蛋白质,它抑制 Akt/PKB 中的 Thr308 和 Ser473 位点的磷酸化。正性调节因子如热休克蛋白 Hsp27 和 Hsp90、Tcl1 通过与 Akt/PKB 不同结构域结合来活化其活性。目前研究发现, Hsp27 蛋白通过正性调节 Akt 从而抑制 JNK2 信号通路,在脑卒中方面具有保护作用^[16]。

3 Akt/PKB 对细胞活动的调节

目前已发现 100 多种 AKT/PKB 的作用底物,值得注意的是,许多 Akt/PKB 底物是在细胞核内发挥作用的蛋白。活化的 Akt 通过多种信号途径影响下游一系列效应分子的活化状态,在细胞内发挥着抑制凋亡的生物学效应。

3.1 细胞存活直接调节

有大量的研究数据表明, Akt/PKB 的主要功能之一就是生长因子介导调节细胞存活、抑制凋亡。细胞凋亡的发生为高度精密调节过程,涉及信号转导、基因调控和凋亡效应的执行三个阶段。信号转导过程的激活、存活和死亡调控基因之间的启动和平衡,决定细胞的存亡。信号转导过程的激活是启动细胞凋亡的必要前提。

3.1.1 调节 Bcl-2 家族 bcl-2 家族成员分为凋亡抑制蛋白和促凋亡蛋白。bcl-2、bcl-xL 等属于抑制凋亡蛋白, Bax、Bad 等属于促凋亡蛋白。Bad 转位到线粒体和抑制凋亡蛋白 Bcl-xL 结合形成促凋亡复合体,而释放与 Bcl-xL 结合的促凋亡蛋白 bax。持续活化的 Akt/PKB 可使 Bad 的 Ser136 发生磷酸化。磷酸化的 Bad 与线粒体膜上的 Bcl-2 或 Bcl-XL 发生解离^[17],而与胞液中的 14-3-3 蛋白结合,不能发挥抗凋亡作用。有研究进一步表明, BAD 磷酸化可能与提高线粒体阈值、减少细胞色素 C 的释放有关。

3.1.2 Caspase-9 促凋亡相关因子半胱天冬蛋白酶 9 (Caspase-9) 是细胞凋亡的启动者和效应者。活化的 Akt 可使其 Ser196 位点磷酸化而失去活性。但是此位点在低等哺乳动物中是不保守的,而

在高等物种中尚缺乏实验证据,因此 Akt/PKB 通过 caspase-9 调节细胞凋亡可能并不是主要的途径。

3.1.3 SAPK 应激活化蛋白激酶(SAPK)包含 JNK 和 p38 MAP 信号通路。有报道称 Akt/PKB 能磷酸化 SAPK 上游的几种激酶。凋亡信号调节激酶 1 (ASK1) 是一种 MAP 激酶激酶类(MKKK),Akt/PKB 通过磷酸化其 Ser83 位点从而抑制其凋亡作用。混合谱系酶 3 (MLK3) 是 SAPK 上游的另一种激酶,Akt/PKB 能磷酸化 MLK 的 Ser673 位点从而抑制其活性,促进细胞的存活。

3.2 转录因子调控

3.2.1 FoxO Forkhead 有研究表明,FoxO 亚家族中的某些成员是 Akt/PKB 信号通路的下游作用靶点,主要参与调节代谢和生长过程中相关靶基因的转录。Akt/PKB 激活可导致 FoxO 蛋白磷酸化,引起 FoxO 介导的基因转录受抑制,使得细胞增殖和凋亡之间的平衡被打破,促进细胞生长,导致肿瘤发生^[18]。

3.2.2 NF- κ B 核因子 KB (NF- κ B) 是一种存在于真核细胞内的转录因子,存在于体内多种细胞中,活化后能与许多基因启动子区域的固定核苷酸序列结合而启动基因转录,参与多种疾病的发病过程。IKK 是激活 NF- κ B 经典路径,有研究表明,Akt/PKB 可以直接或间接地调控 IKK 的活性从而调节 NF- κ B 的活性。活化的 Akt 直接磷酸化 NF- κ B 抑制性辅助因子激酶 II (IKK α) 或磷酸化 p65 的 ser-529 或 Ser-536 位点而激活 NF- κ B,使 NF- κ B 转位至胞核内,引起靶基因的转录。也有少部分研究发现 Akt 可作为 NF- κ B 下游因子,两者其相互调节作用。

3.2.3 CREB cAMP 反应元件结合蛋白(CREB) 转录因子能被 Akt/PKB 在 Ser133 位点磷酸化,促进 CREB 与其相关的 CRB 连接增强,致转录的能力增强,可能与 Akt 诱导的一些抗凋亡基因表达有关。

3.2.4 Yes 相关蛋白(YAP) Hippo-YAP 是一个新发现的信号转导通路,YAP 是其下游的一个转录激活子,许多肿瘤细胞都高表达 YAP-mRNA。Akt/PKB 能通过 PI3-K 依赖途径磷酸化 Yap 的 Ser127 位点,负性调节 p73 的转录,从而减弱了 Bax 的表达,抑制凋亡。

3.3 影响细胞周期

3.3.1 GSK3 糖原合酶激酶 3 (glycogen synthase

kinase 3, GSK-3) 是一种高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,研究发现,GSK-3 除参与糖代谢外,还参与细胞生长、增殖和凋亡等重要生理过程。GSK-3 β 可以使髓样细胞白血病-1 (Mcl-1) 磷酸化,增加 Mcl-1 的泛素化和降解诱导凋亡;AKT 通过负性调节 GSK-3 影响 Mcl-1 的稳定性,抑制凋亡^[19]。

3.3.2 mTOR 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR) 是一种非典型丝/苏氨酸蛋白激酶,分为 mTORC1 和 mTORC2。mTORC2 能磷酸化 Akt 的 ser473 位点,活化 Akt 可直接激活 mTOR,也可通过抑制 TSC1/TSC2 形成复合物,来激活 mTOR 信号。mTOR 下游主要作用因子是核糖体激酶 p70S6K 和真核细胞启动因子 eIF4E 结合蛋白(4E-BP1)。两者的激活均能促进蛋白质合成。因此,在原发性肝癌的治疗中,Akt/mTOR 是重要的治疗靶点之一^[20]。虽然这条信号通路的激活能导致肿瘤,但在脑缺血疾病中,它的激活具有抗凋亡和神经细胞保护功能^[21]。

3.3.3 PRAS40 40 kD 的 14-3-3 结合蛋白(Proline-rich-Akt Substrate, PRAS40) 是近几年新发现的 Akt 作用底物,同时 Haar 等证实 PRAS40 为 mTOR 结合蛋白^[22]。有学者发现 Akt 能磷酸化 PRAS40 的 Ser246 位点,从而解除了对 mTORC1 的抑制作用,进而激发下一步 4E-BP1 的反应,参与蛋白合成、核转运,促进细胞存活^[23]。

4 结语

Akt 通路与许多信号途径相互交叉,形成复杂的信号网络。在过去的十年里,Akt/PKB 信号通路的机制已被清晰的阐明,且在细胞存活与增殖方面研究进展很快。有小鼠研究表明,Akt1 缺乏组表现为胚胎生长迟滞,Akt2 缺乏组表现为高血糖和高胰岛素血症,Akt3 缺乏组表现为大脑体积缩小。因此不同的 Akt 亚型会产生不同的表型,具体的作用仍有待明确。Akt/PKB 的底物蛋白也相继被发现,如 GSK3、Forkhead 蛋白,但它们的重要程度也尚未明确。Akt 的抗凋亡作用是当前研究的热点,但同时也可能是一把双刃剑,猜测与提前衰老有关^[24]。因此,Wu 等^[25] 学者认为 Akt/PKB 在细胞、组织老化等方面给了我们巨大的思索余地和平衡空间。而且 Akt/PKB 还参与了脑缺血的病理过程,与脑缺血损伤程度有关,而且这些都需要内外源性神经营养因子激活,但是由于血脑屏障的作

用,营养因子很难起作用^[26]。因此近些年来,Akt/PKB 作为疾病治疗靶点的研究越来越热门。目前 Akt/PKB 作为一个热门的信号通路,尚在进一步研究中,有望把 Akt 及其下游靶点作为分子靶点开发并筛选药物,为基因治疗疾病开辟一个新的领域。

参 考 文 献

- [1] 黄秀兰,崔国辉. PI3K-Akt 信号通路 with 肿瘤细胞凋亡关系的研究进展. 癌症, 2008, 27(3): 331-336.
- [2] 赵学芹,黄宪章. Akt/PKB 信号通路调控机制的研究进展. 广东医学, 2009, 30(12): 1920-1922.
- [3] Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. Cell, 2007, 129(7): 1261-1274.
- [4] Vasudevan KM, Garraway LA. AKT signaling in physiology and disease. Curr Top Microbiol Immunol, 2010, 347: 105-33.
- [5] Hers I, Vincent EE, Tavaré JM. Akt signalling in health and disease. Cell Signal, 2011, 23(10): 1515-1527.
- [6] Dum meler B, Hemmings BA. Physiological roles of PKB/Akt isoforms in development and disease. Biochem Soc Trans, 2007, 35(pt 2): 231-235.
- [7] Huang BX, Akbar M, Kevala K, et al. Phosphatidylserine is a critical modulator for Akt activation. J Cell Biol, 2011, 192(6): 979-992.
- [8] Song G, Ouyang GL, Bao SD. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. J Cell Mol, 2005, 9(1): 59-71.
- [9] 王维,张琍. PI3K/Akt 信号转导通路的研究进展. 现代医药卫生, 2010, 26(7): 1051-1052.
- [10] Fayard E, Xue G, Parcellier A, Bozulic L, etc. Protein kinase B (PKB/Akt), a key mediator of the PI3K signaling pathway. Curr Top Microbiol Immunol, 2010, 346: 31-56.
- [11] Mahajan K, Coppola D, Challa S, et al. Akt1 mediated AKT/PKB tyrosine 176 phosphorylation regulates its activation. PLoS One, 2010, 5(3): e9646.
- [12] 袁紫刚,徐锦芳,金国良,等. PTEN/PI3K/AKT 信号通路 with 脑血管畸形血管生成的研究进展. 国际神经病学神经外科学杂志, 2011, 38(5): 463-467.
- [13] Stuenkel JT, Bolling A, Ingvaldsen A, et al. Beta-adrenoceptor stimulation potentiates insulin-stimulated PKB phosphorylation in rat cardiomyocytes via cAMP and PKA. Br J Pharmacol, 2010, 160(1): 116-129.
- [14] Zheng F, Soellner D, Nunez J, et al. The basal level of intracellular calcium gates the activation of phosphoinositide 3-kinase-Akt signaling by brain-derived neurotrophic factor in cortical neurons. J Neurochem, 2008, 106(3): 1259-1274.
- [15] 胡海峰,殷明,马恒. 蛋白磷酸酶 PHLPP with PI3K/Akt 信号通路的研究进展. 中国医学创新, 2012, 9(2): 153-156.
- [16] Qi D, Liu H, Niu J, et al. Heat shock protein 72 inhibits c-Jun N-terminal kinase 3 signaling pathway via Akt1 during cerebral ischemia. J Neurol Sci, 2012, 317(2): 123-129.
- [17] Matheny RW Jr, Adamo ML. Current perspectives on Akt Akt-ivation and Akt-ions. Exp Biol Med (Maywood), 2009, 234(11): 1264-1270.
- [18] Zhang X, Rielland M, Yalcin S, et al. Regulation and function of FoxO transcription factors in normal and cancer stem cells: what have we learned? Current drug tarhets, 2011, 12(9): 1267-1283.
- [19] Cole AR. GSK3 as a Sensor Determining Cell Fate in the Brain. Front Mol Neurosci, 2012, 5(4): 1-10.
- [20] Zhou Q, Lui VW, Yeo W. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in hepatocellular carcinoma. Future Oncol, 2011, 7(10): 1149-1167.
- [21] Hwang SK, Kim HH. The functions of mTOR in ischemic diseases. BMB Rep, 2011, 44(8): 506-511.
- [22] Vander Haar EV, Lee SI, Brandhakavi S, et al. Insulin signaling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. Nat Cell Biol, 2007, 9(3): 316-323.
- [23] Wang HT, Zhang QS, Wen Q, et al. Proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40): A novel downstream target of PI3k/Akt signaling pathway. Cell Signal, 2012, 24(1): 17-24.
- [24] Meera Swami. Therapeutics: Akt: a double-edged sword. Nat Rev Cancer, 2009, 9(2): 76-77.
- [25] Wu M, Wang B, Fei J, et al. Important roles of Akt/PKB signaling in the aging process. Front Biosci (Schol Ed), 2010, 2: 1169-1188.
- [26] 韩彩萍,胡长林. PI3K/AKT 信号通路 with 脑缺血神经细胞凋亡. 国际神经病学神经外科学杂志, 2006, 33(1): 88-91.