

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 21620071151992

UDC

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

**RAR $\gamma$ 在 PI3K/AKT 和 NF- $\kappa$ B 信号交互通路中的作用**

**The Critical Role of RAR $\gamma$  in Cross-talk Between PI3K/AKT  
and NF- $\kappa$ B Signal Pathways**

吴 华

指导教师姓名: 张晓坤 教授

曾锦章 教授

专 业 名 称: 细胞生物学

论文提交日期: 2009 年 4 月

论文答辩时间: 2009 年 5 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2009 年 5 月

# 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于     年    月    日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年    月    日

# 目 录

摘 要.....	1
Abstract.....	2
<b>第一章 前言</b>	
1、核受体简介.....	3
2、视黄酸受体 RAR.....	4
3、PI3K/AKT 信号通路.....	8
4、NF- $\kappa$ B 信号通路 .....	11
5、本文研究的目的是科学意义.....	13
<b>第二章 材料与方法</b>	
1、材料.....	15
2、实验方法.....	17
<b>第三章 结果与分析</b>	
<b>1、P85<math>\alpha</math>的克隆及载体的构建</b>	
(1) PCR 产物鉴定.....	30
(2) 酶切鉴定.....	30
(3) 测序结果.....	31
<b>2、RAR<math>\gamma</math>调控 PI3K/AKT 以及 NF-<math>\kappa</math>B 信号通路</b>	
(1) RAR $\gamma$ 在肝癌细胞以及肝癌组织中高表达.....	32
(2) ATRA 在 RAR $\gamma$ 表达量不同细胞中的生长抑制作用.....	33

(3) RAR $\gamma$ 诱导 I $\kappa$ B $\alpha$ 的降解 .....	33
(4) RAR $\gamma$ 影响 p65 的核转运以及 NF- $\kappa$ B 的转录活性 .....	34
(5) ATRA 诱导 I $\kappa$ B $\alpha$ 的降解依赖于 RAR $\gamma$ 的表达 .....	36
(6) ATRA 诱导 AKT 的磷酸化依赖于 RAR $\gamma$ .....	37
(7) RAR $\gamma$ 与 p85 $\alpha$ 相互作用 .....	38
(8) RAR $\gamma$ 所诱导的 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活依赖于 AKT 的磷酸化.....	39
(9) ATRA 诱导甲胎蛋白基因 (AFP) 的表达依赖于 PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B 信号转 导通路的调控 .....	42
(10) LY294002 以及 BSM-345541 与 ATRA 的协同作用 .....	43
(11) 刺槐素对 HepG2 细胞的作用 .....	44
<b>第四章 讨论</b> .....	46
<b>全文小结</b> .....	50
<b>参考文献</b> .....	51
<b>硕士期间参与发表的文章</b> .....	58
<b>致谢</b> .....	59

# Table of Contents

<b>Abstract in Chinese</b> .....	1
<b>Abstract</b> .....	2
<b>Chapter I Introduction</b>	
<b>1、 Nuclear receptor</b> .....	3
<b>2、 Retinoic acid receptor (RAR)</b> .....	4
<b>3、 PI3K/AKT signal pathway</b> .....	8
<b>4、 NF-<math>\kappa</math>B signal pathway</b> .....	11
<b>5、 Aims and significance</b> .....	13
<b>Chapter II Materials and Methods</b>	
<b>1、 Materials</b> .....	15
<b>2、 Methods</b> .....	17
<b>Chapter III Results and Analysis</b>	
<b>1、 Cloning the p85<math>\alpha</math> and constructing the Flag-p85<math>\alpha</math></b>	
(1) Identification of the PCR product.....	30
(2) Restriction enzyme analysis.....	30
(3) Sequencing results.....	31
<b>2、 RAR<math>\gamma</math> is involved in the PI3K/AKT and NF-<math>\kappa</math>B signaling</b>	
(1) RAR $\gamma$ is highly expressed in liver cancer cells and liver cancer tissues.....	32
(2) The growth inhibitory effect of ATRA and 9- <i>cis</i> -RA .....	33
(3) RAR $\gamma$ induces the degradation of I $\kappa$ B $\alpha$ .....	33

(4) RAR $\gamma$ induces p65 nuclear translocation and NF- $\kappa$ B activation.....	34
(5) Role of RAR $\gamma$ in ATRA-induced I $\kappa$ B $\alpha$ degradation.....	36
(6) Role of RAR $\gamma$ in ATRA-induced phosphorylation of AKT .....	37
(7) Interaction of RAR $\gamma$ and p85 $\alpha$ .....	38
(8) Role of PI3K/AKT signaling in RAR $\gamma$ -induced activation of NF- $\kappa$ B signal pathway .....	39
(9) Role of PI3K/AKT and NF- $\kappa$ B signalings in ATRA-induced expression of AFP gene.....	42
( 10 ) Synergistic growth inhibitory effect of LY294002, BSM-345541 and ATRA.....	43
(11) Effect of acacetin in HepG2 cell.....	44
<b>Chapter IV Discussion</b> .....	46
<b>Conclusion</b> .....	50
<b>References</b> .....	51
<b>Publications</b> .....	58
<b>Acknowledgments</b> .....	59

## 摘要

视黄醇 (retinoids) 是天然的或人工合成的维生素 A 衍生物, 在细胞的生长、分化以及凋亡中发挥着重要的作用。许多视黄醇类似物已经被开发成新的抗癌药物, 并在临床上广泛应用于癌症的治疗。

视黄醇的生物学作用由视黄酸受体 (Retinoic acid receptor, RAR) 和视黄醇 X 受体 (Retinoid X receptor, RXR) 两类核受体所介导, 这两类受体分别由  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$  三种不同的基因所编码, 这些基因在进化上高度保守, 但它们在胚胎发育调控过程中以及成年组织中的表达分布却不尽相同, 说明不同受体具有各自独特的功能。

在本研究中, 我们发现 RAR $\gamma$  在不同的细胞和不同组织的表达水平有较大的差异, 在肝癌组织中, 我们发现该基因普遍高表达, 在肝癌细胞 HepG2 的体外实验中, 我们发现 RAR $\gamma$  可以与 p85 $\alpha$  相互作用, 从而激活 PI3K/AKT 信号通路, 诱导 I $\kappa$ B $\alpha$  磷酸化和 p65 向核内转位, 激活 NF- $\kappa$ B 转录功能, 并最终诱导 AFP 蛋白的表达。结果表明, RAR $\gamma$  在肝癌中的表达有可能介导炎症发生和促进癌细胞增殖, 提示了 RAR $\gamma$  有可能成为开发抗肝癌药物的一个有效的分子靶点。针对这样的分子机制, 我们从天然产物中筛选到了一种黄酮类化合物——刺槐黄素, 发现它能够通过诱导 RAR $\gamma$  的降解来抑制 AKT 的磷酸化及肝癌细胞的生长。

**关键词:** 视黄酸; RAR $\gamma$ ; PI3K; NF- $\kappa$ B; 非基因组效应; 肝癌; 甲胎蛋白; 刺槐黄素

## Abstract

Retinoids, a group of natural or synthetic vitamin A derivatives, play an important role in the regulation of cell proliferation, differentiation and apoptosis. Some of these compounds have been developed as effective anticancer drugs.

The biological actions of retinoids are primarily mediated through two classes of nuclear receptors, retinoic acid receptors (RARs) and retinoid X receptors (RXRs). Both RAR and RXR are encoded by three distinct genes,  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ , which are highly conserved amongst species and spatiotemporally expressed in developing embryos and adult tissues. Their distinct distributions suggest that individual isotypes may have unique and specific function.

In this study, we show that the expression level of RAR $\gamma$  varies among different tissues and that it is frequently overexpressed in liver tumors. Using *in vitro* cell culture system, we find that RAR $\gamma$  upon binding to its ligand all-trans-retinoic acid (ATRA) interacts with the p85 $\alpha$  regulatory subunit of the phosphoinositide 3-kinase (PI3K), leading to activation of PI3K and its downstream target AKT. The activation of PI3K/AKT signaling is accompanied with phosphorylation and degradation of inhibitor of  $\kappa$ B $\alpha$  (I $\kappa$ B $\alpha$ ), which then stimulates nuclear translocation of p65/RelA and NF- $\kappa$ B transcriptional activity. Based on our mechanistic studies, we have also screened a natural products library for antagonizing the RAR $\gamma$ -mediated NF- $\kappa$ B pathway and successfully identified a flavonoid derivative Acacetin that can induce RAR $\gamma$  degradation and inhibition of RAR $\gamma$ -mediated activation of PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B signaling. Together, our results demonstrate that RAR $\gamma$  functions to induce inflammation of liver cancer cells and their growth by nongenomically activating the PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B pathway, suggesting that it may represent an attractive molecular target for developing anti-liver cancer agents. Our results also suggest that Acacetin is a promising lead for developing new agents for treating liver cancer.

**Key words:** retinoic acid; RAR $\gamma$ ; PI3K; NF- $\kappa$ B; non-genomic action; hepatocellular carcinoma;  $\alpha$ -fetoprotein; acacetin

## 第一章 前言

### 1、核受体简介

脂溶性激素须经过细胞核受体的介导才能发挥作用，人们把所有的细胞核激素受体统称为激素核受体超家族，这是一类配体依赖的转录因子，成员众多，包括糖皮质激素受体 (GR $\alpha$ ,  $\beta$ )、盐皮质激素受体 (MR)、雄激素受体 (AR)、雌激素受体 (ER $\alpha$ ,  $\beta$ )、孕激素受体 (PR)、甲状腺激素受体 (TR $\alpha$ ,  $\beta$ )、维甲酸受体 (RAR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ )、视黄醇 X 受体 (RXR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ )、维生素 D<sub>3</sub> (VDR)、过氧化物酶体增生物受体 (PPAR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) 和数目众多的孤儿受体(orphan receptor) 等，共分 29 个亚家族 200 余个成员。

在进化上，核受体来源于同一前体，在植物、昆虫、两栖动物、棘皮动物都有代表存在，是一类古老的受体家族。目前的研究表明，孤儿受体为进化的始祖，类固醇、甲状腺和维生素 A/D 受体为该家族中高度进化的成员。

人们发现核受体是由许多调节区组成，采用调换核受体某些调节区形成嵌合受体去确认孤儿受体的配体以及研究受体的功能，导致了核受体科学的迅速发展。核受体的典型结构分为六个部分，从 N 端到 C 端依次分为 A、B、C、D、E 和 F 区，其中 A/B 区在长度、序列和结构上高度多变，该区含有一转录活化区，称为 AF1，可通过和基础转录因子、辅活化子或其他转录因子的相互作用活化目标基因。最近的发现说明 A/B 区有可能与其它信号转导通路有关系<sup>[116]</sup>，但具体的作用机理还不清楚。C 区为 DNA 结合区(DNA-binding domain, DBD)，该区域高度保守，在结构上有两个锌指(zinc finger)，分别称为 P 盒(P Box)和 B(B Box)盒。D 区为一多变的绞链区，允许核受体蛋白曲折或者改变构型，通常含有一核定位信号。E 区相对较大(约 250 个氨基酸)，功能较复杂，核受体的激素结合区(Hormone-binding domain, HBD)位于 E 区，此外，E 区还具有和热休克蛋白结合、聚合、核定位、转录活化、分子内沉寂、分子间阻遏的作用。核受体的 E 区为转录活化区，称为 AF2。一些核受体在 C 端还含有一段多变的 F 区，目前还没有发现 F 区的特定功能。核受体活化受激素水平的调节，二聚体化是其活化的重要基础<sup>[110-111]</sup>。

\*本课题得到了国家 863 项目(2007AA09Z404)、福建省重点项目(2007I0023 和 2008Y0062)的资助。



图 1. 核受体的结构示意图

**Fig 1. The structure of nuclear receptor**

核受体选择性地与某些化学物质（配体）相结合，引发细胞的生理效应，参与代谢、生长、发育、分化、死亡和免疫等几乎所有的生理过程的调节，其作用归因于核受体经相应配体或小分子化合物诱导后可激活调控特定核基因的转录活性，产生生物学效应；但很多证据也证明核受体可以通过非基因转录（Nongenomic）调控的方式来起作用。例如有些核受体在某些化合物的作用下可从细胞核迁移到细胞质，引发不同的生物学效应。非基因转录作用是核受体控制癌细胞生长，分化，及凋亡的一个重要模式，但与基因转录机制相比，非基因转录的作用机制还相当不清楚。核受体表达或调控异常与人体的许多疾病如心血管疾病、糖尿病、痴呆症和癌症密切相关，针对核受体开发的药物也因而广泛应用于这些疾病的治疗<sup>[112-113]</sup>。

## 2、视黄酸受体 RAR

视黄酸受体（retinoic acid receptors, RARs）是核受体超家族成员中的重要一员，它与视黄醇 X 受体（retinoid X receptors, RXRs）共同介导视黄醇（retinoids）的生物学作用。视黄醇是一类天然的或人工合成的维生素 A 衍生物，能够调节许多关键的生命活动过程，例如细胞的分化、增殖、凋亡、胚胎发育、视觉形成、繁殖、骨骼形成、新陈代谢、造血等<sup>[1-8]</sup>。许多维生素 A 衍生物已经被应用在治疗癌症及其它疾病。例如 all-trans-RA 已被用于治疗早幼粒白血病，Targretin 已被应用于皮肤癌的治疗，近年，Targretin 在临床上被证明对肺癌（III 期临床）和乳腺癌（II 期临床）也有很好的治疗效果。

RAR 有三个不同的亚型，即 RAR $\alpha$ 、RAR $\beta$  和 RAR $\gamma$ ，分别由不同的基因所编码，这些不同亚型之间具有某些相似的核内转录调控机制，在功能上具有一定程度的冗余性（redundancy），但由于结构以及分布上的差异，这些不同的基因承担着不同独特的功能。这些功能还有待进一步的认识。

RAR 在蛋白合成后通过位于其内部的核定位序列 (nuclear localization sequence, NLS) 的引导进入细胞核, 所以在通常情况下, 这类核受体位于核内, 以执行其转录激活的功能。另一方面, 其 C-端还有一个出核序列 (nuclear export sequence, NES), 在受到某种小分子作用或信号转导调控下, NES 可被激活, 从而引导这类核受体出核。我们最近的实验也证明 N-端的序列对核受体在细胞质的分布及功能也有很大的作用<sup>[116]</sup>。

## 2.1 RAR 的结构

RARs 由三个亚型组成,  $\alpha$ ,  $\beta$ , 和  $\gamma$ <sup>[9-10]</sup>, 与其他核受体相似, 在结构上, 这类基因可以分为 A/B、C、D、E、F 等五个区<sup>[11-13]</sup> (图 1)。位于氨基端 A/B 区, 含有一个不依赖于配体的转录激活结构域 AF-1, 三种不同的 RAR 亚型, 氨基端氨基酸序列的差异较大, 提示它们可能具有不同的生物学功能。事实上, 我们一系列的实验证明 A/B 区也许发挥着独特的生物学功能, 例如 RAR $\gamma$ 的 A/B 区调节其核质定位, 并且这样一种调节能够被 p38 MAPK 信号通路调控<sup>[116]</sup>。C 区为 DNA 结合区 (DNA-binding domain, DBD), 由两个锌指结构构成, 这个区域主要介导特异性 DNA 序列的识别。在第一个锌指结构上, 受体识别特异性 DNA 序列就是直接经过 P-box 上的三个氨基酸进行的。另外, DR-box 能够与第二锌指结构上的 D-box 相互作用, 允许非对称性复合体形成异源二聚体。第二个锌指直接用于不同的 DNA 结合, 允许受体形成对称性或不对称性的二聚体, 其上 D-box 中的 6 个氨基酸对于 DNA 的相互作用十分重要<sup>[14]</sup>。E 区较大, 为配体结合区 (ligand-binding domain, LBD), 含有 12 个  $\alpha$ 螺旋和一个  $\beta$ 折叠,  $\alpha$ 螺旋 3、7 和 11 之间可形成一个配体结合口袋, 能够与特定的配体相结合, 从而调节它的生物学功能。另外, E 区和 A/B 区之间可能通过某种分子内的相互作用, 从而对该基因的功能和调控产生重要影响<sup>[15-16]</sup>。D 区是疏水区, 连接 DBD 和 LBD, 能够保证 DBD 可以自由旋转, 产生多种构像改变而不发生原子排列所形成的空间位阻, 同时 D 区还含有一段入核序列, 影响核受体的核定位<sup>[17]</sup>。F 区是 RARs 的羧基末端, 与受体自身稳定性及抗原性有关, 该区域含有一个配体依赖的转录激活功能域 AF-2<sup>[18-19]</sup>。

在 RAR 的各亚型间, 各区氨基酸的组成是不相同, 其中 C 区的同源性最高, 达到 97%, D 区的同源性为 74%, 而 A/B 区和 F 区同源性较小, 仅为 31-37% ;

F 区的组成及长度差别更为明显, 在 RAR 结构中这是一个较为特殊的区域<sup>[20]</sup>(图 2)

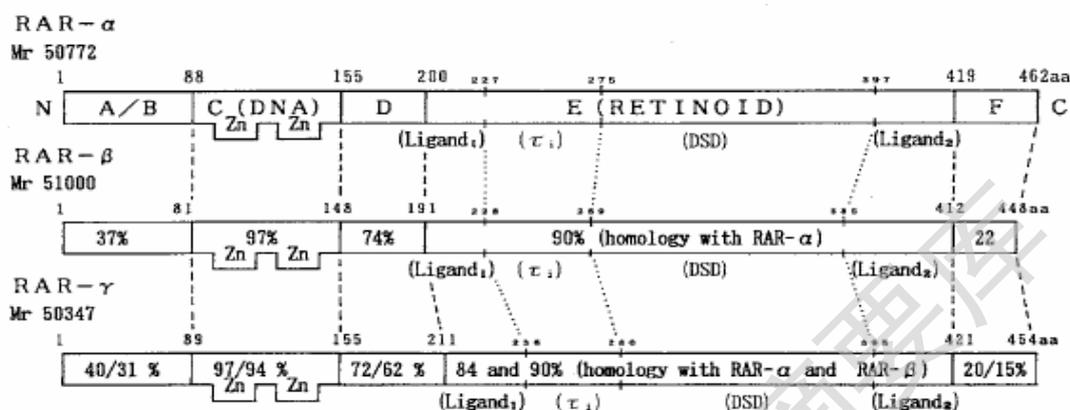


图 2. 人类 RAR $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ 的结构图(引自文献 20)

Fig 2. Gross structures of human RAR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$

## 2.2 RAR 的功能及其信号传导途径

Petkovich 和 Giguere 等研究团队在 1987 年几乎同时发现了 RARs<sup>[21-22,117]</sup>, 后来人们认识到 RAR 的不同亚型在胚胎发育过程及不同成熟组织中具有不同的表达谱, 这提示这些不同受体可能具有不同的功能。1990 年 Mangelsdorf 等人在人肝和肾细胞的 cDNA 文库中发现了一种在结构上与 RAR 有很大区别, 能够编码 462 个氨基酸的 cDNA, 它翻译的产物能够被视黄酸 (retinoic acid, RA) 激活, 并能够诱导其转录活性, 人们将它称为视黄醇 X 受体 $\alpha$  (human retinoid X receptor  $\alpha$ , hRXR $\alpha$ )<sup>[23]</sup>。后来, 人们陆续在不同动物、不同组织中发现了 RXR 的存在<sup>[24-25]</sup>。

### 2.2.1 RAR 的转录激活调控机制

全反式视黄酸 (ATRA) 和 9-顺式视黄酸 (9-*cis*-RA) 是最常见的视黄酸衍生物<sup>[1]</sup>(如图 3)。ATRA 能够激活 RARs, 而 9-*cis*-RA 不仅能够激活 RARs 而且能够激活 RXRs。RARs 结合视黄酸应答元件 (RA responsive element, RARE) 需要 RXRs 的协助, 二者形成异源二聚体后才能结合到 RAREs 上, 发挥转录因子的作用。在无配体存在的条件下, RAR/RXR 异源二聚体与阻遏子结合, 抑制靶基因的转录。当配体作用时, RAR/RXR 异源二聚体上阻遏子被激活辅助因子取代, 视黄酸应答的靶基因因而被激活转录<sup>[26-29]</sup>。RXR 的配体 DHA、脂肪酸具有抗炎的作用, 脂肪酸能够通过诱导 RXR 与 PPAR 形成异源二聚体来调控脂质代谢<sup>[118]</sup>。另外,

RXR 自身还可以形成异源二聚体调控靶基因的转录 [119-120]。

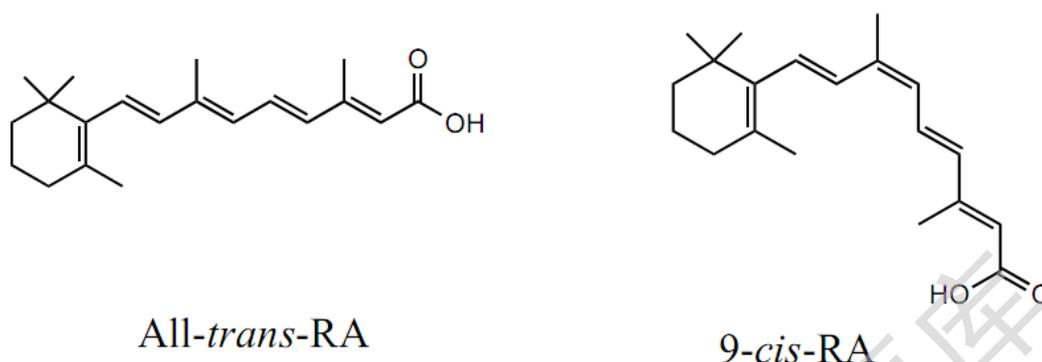


图 3. ATRA 以及 9-cis-RA 的结构

Fig 3. The structure of ATRA and 9-cis-RA

RARE 是存在于靶基因启动子及调控序列中的一段特殊 DNA 序列。从 1990 年发现 $\beta$ RARE 至今已有 30 多种的 RARE 被发现。自然状态下, 各个靶基因的 RARE 不完全相同, 它们通常含有被不等的碱基对间隔的两段保守的 AGGTCA 或类似的基元序列(motif), 该基元序列也被称为半位点(half-site)或核心识别序列 CRM, 一个完整的 RARE 一般都有两个 CRM, 每个 CRM 的间隔和方向可以不同。经过比较发现, 不同核受体的 CRM 之间可以间隔 1、2、3、4 或者 5 个碱基, 称为“1-to-5”规则<sup>[30]</sup>。例如, RXRs 可以结合间隔仅一个碱基的 RARE, RARs 可以结合间隔 1、2、5 个碱基的 RARE。受体通过三条途径识别特定的 RARE: CRM 的精确序列、CRM 的方向和 CRM 的间隔距离。每个特定的受体对三者的要求不同, 由此形成不同的识别谱。如 RARs 和 RXRs 优先识别的是间隔两个碱基的 CRM, 称为 DR2, 与之相差越远, 亲和力越小, 这样可以造成不同的靶基因对不同配体的不同反应强度<sup>[31]</sup>。

### 2.2.2 RAR 的非基因组效应调控机制

之前我们实验室发现孤儿受体 TR3 发挥着一种独特的非基因组效应调控机制, 我们证实, 在凋亡信号的刺激下, TR3 能够从细胞核转移到细胞质中, 与线粒体上的一种抗凋亡的蛋白 Bcl2 相互作用, 通过改变 Bcl2 的构象, 暴露出其 BH3 区, 使 Bcl2 从抗凋亡转变为促凋亡<sup>[121]</sup>。RAR 除能够与 RXR 形成异源二聚体发挥转录功能外, 最近一系列的文献也报道了, RAR 能够快速激活一系列的反应, 这种效应主要发生在细胞质中或质膜上, 它们的发生相当迅速以至不依赖基

因的转录和蛋白质的合成<sup>[32-35]</sup>。RAR 在 RA 的刺激下,能够通过一系列的激酶,比如: ERK1/2, JNK, PKC, P38, PI3K, ATAT1 等等<sup>[36-37]</sup>,来激活相应的信号通路,调节细胞的生长、分化以及凋亡。例如 Susana Masia 等人<sup>[36]</sup>的实验证实, RAR $\alpha$  能够与 p85 $\alpha$ 发生相互作用,如果在 ATRA 存在的条件下,这种相互作用将进一步增强,这种相互作用将立刻激活 PI3K/AKT 信号通路和 ERK1/2 MAPK 信号通路,最终导致成神经细胞瘤的分化。我们在实验中发现,在肝癌细胞中, RAR 中的一个亚型 RAR $\gamma$ 能够与 p85 相互作用,并且在 ATRA 存在的条件下,这种相互作用被进一步增强, RAR $\gamma$ 能够在 ATRA 存在的条件下迅速的激活 PI3K/AKT 信号通路,进而激活 NF- $\kappa$ B 信号通路,导致甲胎蛋白(AFP)的表达。

### 3. PI3K/AKT 信号通路

磷酸肌醇-3 激酶 (phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)是生长因子超家族信号传导过程中的重要分子,能够被多种细胞因子刺激而激活,它能够调节基因的转录和翻译以及细胞的增殖与凋亡等多种功能, PI3K/AKT 信号通路的紊乱,将会导致各种疾病的发生<sup>[45-48]</sup>,值得注意的是,人类肿瘤的发生经常伴随着 PI3K/AKT 信号通路的异常。PI3K/AKT 信号通路的持续激活,导致肿瘤细胞的无限增殖<sup>[49-56]</sup>。目前在控制肿瘤细胞的增殖上,出现了针对该信号通路的抑制剂作为抗肿瘤药物得到了广泛研究并在临床上取得了预期的进展,如 PTEN 的转基因研究、PI3K 抑制剂 LY294002 和握曼青霉素、PDK-1 抑制剂星抱菌素和塞来昔布 Akt 抑制剂呱立福新、雷帕霉素靶蛋白(mTOR)抑制剂西罗莫司等<sup>[57-59]</sup>。

#### 3.1 PI3K/AKT 的结构特点

PI3K 是一类特异的催化磷脂酰肌醇脂物质的激酶。PI3K 由催化亚基 p110 和调节亚基 p85 构成。哺乳动物的 PI3K 家族主要有三种类型, I 型 PI3K 是由 p85 $\alpha/\beta/\gamma$ (调节亚基)和 p110 $\alpha/\beta/\gamma$ (催化亚基)组成的异源二聚体, p85 的氨基端含有 SH3 结构域和能与 SH3 结构域结合的脯氨酸富集区,其 C 端含有 2 个 SH2 结构域 1 个与 p110 结合的区域。而 p110 则有 6 个结构域: N 端 p85 结合域(但 p110 $\gamma$ 无此结构域)、Ras 结合域(RBD)、富含脯氨酸区(可与含 SH3 的蛋白发生作用)、PI3K 同源区(homology region, HG)、HR3 区(C 端包含碱性亮氨酸链样结构域 bZIP)、HR2 区及 HR1 区(催化结构域)。I 型 PI3K 可被具有酪氨酸蛋白

(proteintyrosinekinase,PT K) 活性的膜受体和非受体型如 Src 等蛋白激酶激活。II 型 PI3K 自 N 端到 C 端依次排列着富含脯氨酸区、Ras 结合区、HR3 区、HR2 区、HR1 区、PX 结构域及 C2 结构域。III 型 PI3K 由调节亚基 p150 和豆蔻酰化的催化亚基 p100 组成异二聚体<sup>[60-64]</sup>。

AKT,是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。其是 PI3K/AKT 信号通路中的核心蛋白激酶, AKT 是细胞内病毒原癌蛋白 v-AKT 的同族体, 由于 v-AKT 能引起鼠白血病, 因此也称做为 c-AKT 或 AKT<sup>[65]</sup>研究表明, v-AKT 和 c-AKT 编码一种与蛋白激酶 A 和蛋白激酶 C 有一些类似的蛋白激酶, 它也被称为蛋白激酶 B (protein kinase B,PKB)或 RAC(Related to protein kinase A and C)。目前发现至少存在 3 种 Akt 家族成员: AKT1 / PKB $\alpha$ 、AKT2 / PKB $\beta$ 、AKT3 / PKB $\gamma$ 。AKT 分子约由 480 个氨基酸残基组成, 包括氨基端的调节区、中间的激酶区以及羧基端的尾部三个部分。AKT / PKB 的催化区与 PKA 有 65%同源性, 与 PKC 有 75 %同源性<sup>[66-69]</sup>。不同的是, AKT 氨基端含有 1 个特异性作用于底物中丝氨酸/ 苏氨酸残基并使其磷酸化的血小板-白细胞 C 激酶底物同源结构区域( pleckstrin homology, PH ), 可介导脂质-蛋白质和(或) 蛋白质-蛋白质之间的相互作用, Akt 羧基端是疏水区, 富含脯氨酸。AKT 的 PH 区在进化中是高度保守的,表明其可能具有重要的功能。

### 3.2 PI3K/AKT 信号通路的激活途径

PI3K/AKT 通路广泛存在细胞中, 是参与细胞生长、增殖、分化调节的信号转导通路。PI3K 可被 G 蛋白偶联受体和(或)蛋白酪氨酸激酶受体激活,也可被 Ras 蛋白激活。PI3K 对磷脂酰肌醇环上的 3 位羟基进行磷酸化产生磷酸化的磷脂酰肌醇: 包括 3 - 磷酸磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol 3-phosphate, PI-3P)、3,4 - 二磷酸磷脂酰肌醇( phosphatidyli-nositol 3, 4-bisphosphate, PI-3, 4-P2)、3, 4, 5-三磷酸磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate, PI-3, 4, 5-P3)<sup>[70]</sup>。

多种生长因子都可以通过 PI3K/AKT 信号通路发挥作用 (如图 4), 例如, 当细胞受到表皮生长因子 EGF 刺激后, 细胞膜上酪氨酸蛋白激酶或本身具有酪氨酸激酶活性的跨膜受体被激活, 从而活化由 p85 和 p110 亚单位组成的 PI3K. PI3K 将 PI(4,5)P2 转化成 PI(3,4,5)P3, AKT 转移到细胞膜上, 通过其 PH domain 与 PI(3,4,5)P3 作用, 磷脂酰肌醇-依赖的激酶 (PDK)1、PDK2 和整合素连接激酶

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库