

生长因子、细胞因子和肽激素与特定受体结合后，通过一系列蛋白磷酸化事件启动信号转导，从而引起细胞水平的反应和变化，如基因表达、细胞生长和增殖。蛋白磷酸化是将外界刺激转换为胞内信号的一个主要机制。因此，抑制或逆转磷酸化过程，有可能从细胞水平上达到一定的治疗效果。蛋白磷酸化反应由某些酶介导，这些酶就是所谓的“蛋白激酶”。蛋白激酶是一个庞大的家族，是细胞各种过程（特别是在细胞受到外部刺激后启动的各种信号转导反应）的重要参与者。人类基因组编码了大约500种蛋白激酶，这些激酶主要包括两大类：酪氨酸激酶（在人的基因组中有大约90个成员）和丝氨酸激酶（在人的基因组中有388个成员）。酪氨酸激酶又被进一步分为受体酪氨酸激酶和非受体酪氨酸激酶，它们都是潜在的疾病治疗靶标。目前至少有8种以激酶为靶点的抗肿瘤药物得到批准，超过100种抑制各种蛋白激酶的化合物正用于临床试验<sup>[5, 6]</sup>。

大多数激酶抑制剂被用于癌症治疗方面的药物开发。在癌变过程中，异常的蛋白激酶活性是遗传变异或机体变异所导致的，而在心血管疾病中，这种情况则起因于被激活的神经激素系统的过度刺激。激酶抑制剂在治疗癌症方面取得的成功也极大的支持了它在治疗心血管疾病方面的应用。

现在正处于研发阶段的两类激酶抑制剂分别是抗体和小分子激酶抑制剂。抗体类抑制剂以受体酪氨酸激酶为目标，与受体阻断剂的作用原理相似，在受体水平切断信号的传导。小分子激酶抑制剂以其它激酶为靶标，参与信号传导过程。目前，蛋白激酶抑制剂被作为治疗药物还面临几个问题。例如，有人怀疑它作为药物的实用性，因为有些激酶的蛋白序列之间存在高度保守的区域。然而晶体学数据也表明，不同的激酶之间仍然存在一定的特异性区域，足以满足开发特异性抑制剂的要求。此外，抑制疾病过程中出现的激酶功能异常有可能也会抑制激酶在其它情况下对机体有益的功能。这些需要通过改进给药系统实现局部给药来克服<sup>[6]</sup>。

## 三、与心血管疾病密切相关的蛋白激酶

### 1. Rho激酶

GTP酶Rho能够调节细胞多方面的功能，这主要通过它的下游效应因子Rho激酶来实现。Rho/Rho激酶广泛分布于哺乳类动物的组织细胞中，它是具有信息传导和分子开关功能的信号蛋白。在过去十年间，已有大量证据显示这两种蛋白在几类心血管疾病的病理过程中发挥了重要作用，特别是Rho激酶现在已经作为重要的靶点用于许多心血管疾病的治疗<sup>[7]</sup>。研究表明，Rho激酶通过与Ang II、ET-1、PDGF等多种血管活性物质的相互调控来影响平滑肌细胞（SMC）的功能和结构，从而直接参与心血管疾病的病理过程。Rho激酶与动脉粥样硬化（arteriosclerosis, AS）、高血压、冠脉痉挛、心肌缺血等主要心血管疾病的发生发展关系密切。目前，用Rho激酶抑制剂防治心血管疾病的研究已经进入临床试验阶段，其结果令人瞩目，有望成为防治心血管疾病的新方法。

#### 1.1 Rho激酶与高血压

Y27632是一种选择性的Rho激酶抑制剂，它能够显著降低多种系统性高血压大鼠模型的全身血压，这表明Rho激酶与高血压之间关系密切。相比而言，同等剂量的Y27632对原来血压正常的动物并没有显著影响，这说明Rho/Rho激酶信号通路很大程度上参与了高血压的发病过程。Ang II最近被证实通过Rho激酶途径收缩脑动脉，这一效应在慢性高血压患者体内有可能加强，然而在Ang II诱导的高血压模型中，没有发现Rho/Rho激酶对于改变了的颈动脉收缩性能造成影响，这显示在不同的血管床中存在信号传导系统的差异。尽管如此，人们已经证实了Rho激酶在多种高血压模型大鼠中的活性都被大大提高，这些模型包括自发性高血压脑卒中大鼠（SHR）和醋酸脱氧皮质酮盐大鼠。Rho激酶不仅存在于外周血管，也存在于中枢神经系统。中枢神经系统内的Rho激酶主要分布于延髓的孤束核，抑制孤束核内Rho激酶的活性导致SHR心率和血压的持

续下降，但对血压正常的Wistar-Kyoto大鼠却没有影响，说明Rho激酶可能参与了高血压的交感神经系统的调节机制<sup>[8]</sup>。

## 1.2 Rho激酶与冠状动脉痉挛

在猪冠状动脉痉挛模型中，动脉痉挛症状和MBS磷酸化都对Y27632十分敏感，而且在动脉痉挛的部位发现Rho激酶mRNA水平局部性地升高。显性失活Rho激酶能够消除冠状动脉痉挛，降低Rho激酶下游靶标ERM蛋白水平。有趣的是，直接的PKC激活能够诱导冠状动脉痉挛，间接地引起膜结合RhoA的水平，这一现象能够被Rho激酶抑制剂Fasudil减弱，这就表明冠状动脉痉挛发生时PKC与RhoA-Rho激酶系统存在相互作用，并且RhoA-Rho激酶系统位于PKC通路的下游。因此，Rho激酶有可能是治疗冠状动脉痉挛更具特异性的靶点之一。

## 1.3 Rho激酶与动脉粥样硬化

动脉粥样硬化以血管异常为特征，包括内皮功能损伤，对内皮组织产生的血管舒张因子NO生物利用度降低以及炎症反应。最初，通过观察，发现RhoA能够在体外负向调节内皮NOS（eNOS）的mRNA水平，从而认为Rho-Rho激酶系统可能参与内皮组织NO的生成。近期研究显示，Rho激酶有可能参与调节纤溶酶原激活剂抑制物1（plasminogen activator inhibitor type-1, PAI-1）的表达。PAI-1不仅参与纤维蛋白的溶解，也能促进AS的形成。Rho激酶还能够降低内皮细胞的屏障功能，Rho激酶参与内皮细胞的收缩，增加了内皮细胞的通透性，从而促进了AS的发展。此外，Rho激酶促进SMC的增殖，血管中膜SMC的迁移和增生是导致AS基本病理改变的因素之一<sup>[9]</sup>。

## 1.4 Rho激酶与心肌梗塞和心力衰竭

心肌梗塞通常会导致进行性心肌重塑和功能障碍。在心肌梗塞小鼠模型中，Rho激酶活性升高，左心室出现ERM磷酸化程度升高、纤维化、肥大以及炎症反应，Fasudil能够减轻所有的病理损伤，表明Rho激酶对于心肌梗塞后左心室具有重塑作用，说明Rho激酶可作为治疗或抑制左心室重塑的靶标。

在心肌梗塞后期出现充血性心力衰竭时，对于5-HT的正性收缩性反应可以通过增加心室5-HT受体的数目来实现，这一现象能够被Y27632抑制，从而表明该过程有Rho激酶的参与。有趣的是，衰竭心脏的基础收缩力也能够被Y27632降低，说明Rho激酶可能对保持衰竭心脏的收缩功能有重要作用。

此外，Rho激酶还涉及心衰动物过度血管收缩现象的发生。慢性心衰伴随的循环系统异常包括外周血管阻力升高和血管舒张功能损坏。动脉输注Fasudil能够减轻心衰患者前臂血管阻力，增加前臂血流量。

## 1.5 Rho激酶与其它心血管疾病

动物实验或临床资料还提示：心律失常、心脏同种移植物的血管增厚、静脉桥疾病、动脉粥样硬化性血管闭塞症及雷诺氏病的发病也与Rho激酶的异常表达有关<sup>[8]</sup>。

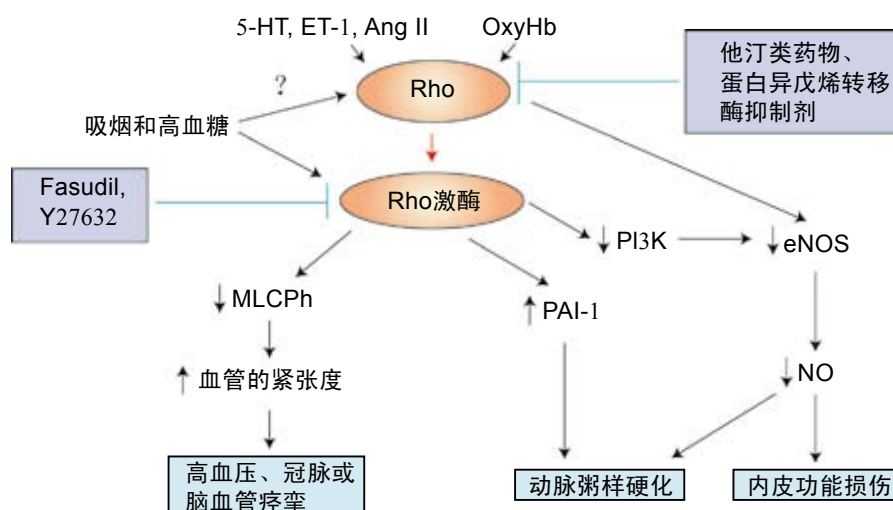


图2 Rho/Rho激酶与心血管疾病。在心血管系统的各种细胞（血管平滑肌细胞、内皮细胞和心肌细胞）中，Rho/Rho激酶能够被多种病理因子激活，包括5-HT、ET-1、Ang II以及氧合血红蛋白（OxyHb）。Rho/Rho激酶的激活能导致肌球蛋白轻链磷酸酶（MLCPh）被抑制，继而增加血管的紧张度，从而可能导致高血压以及冠脉或脑血管痉挛。此外，Rho/Rho激酶还可能通过负调节内皮组织中的一氧化氮合酶（eNOS）的mRNA水平或者磷脂酰肌醇3激酶（PI3K）的活性（从而降低内皮中NO的活性），或者通过增加纤溶酶原激活物抑制剂（PAI-1）的表达，从而参与动脉粥样硬化和内皮功能损伤的形成。另外，高血糖和吸烟都有可能过度激活Rho激酶，导致血管功能损伤。因此，以Rho或者Rho激酶为靶标的药物制剂，如他汀类药物、蛋白异戊烯转移酶抑制剂（PPI）及Rho激酶抑制剂（Fasudil和Y27632）等等已经被认为是一种颇有前景的治疗手段，能够用于心血管疾病的治疗。

图片来源: *Trends in Pharmacological Sciences*

## 2. 蛋白激酶C (PKC)

PKC是丝-苏氨酸激酶家族的一员，它对激素和细胞因子细胞内的信号传递起着非常重要的作用。PKC广泛分布于人体的各种组织细胞中。PKC家族在心血管系统主要参与血管收缩、缺血预适应和心肌肥大。其中，缺血预适应又称缺血预处理，指的是心肌在多次短暂缺血后，不但不会造成累积的心肌损害，反而产生一定的“自我”保护作用，使其对随后较长时间的缺血耐受性明显增强这样一种现象。

PKC存在多种亚型，目前发现至少有12种PKC亚型，根据其基本结构和激活方式可分为三大类（表1）。

表1 PKC亚型

类别	亚型	特点
经典型PKC (cPKC)	$\alpha$ 、 $\beta$ 1、 $\beta$ 2、 $\gamma$ 亚型	可被磷脂酰丝氨酸 (PS)、 $\text{Ca}^{2+}$ 和 二脂酰甘油 (DAG) 或豆蔻酰佛波醇乙酯 (PMA) 激活;
新型PKC (nPKC)	$\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\eta$ /L、 $\theta$ 和 $\mu$ 亚型	不被 $\text{Ca}^{2+}$ 激活，但可被DAG和PMA 激活;
非典型PKC (aPKC)	$\zeta$ 、 $\iota$ 、 $\lambda$ 亚型	不被 $\text{Ca}^{2+}$ 、PMA或DAG激活。

在心血管系统中，PKC各亚型的作用尚未完全阐明，仅PKC- $\alpha$ 、PKC- $\beta$ 、PKC- $\delta$ 及PKC- $\epsilon$ 研究得较为深入。一般认为，PKC- $\alpha$ 和PKC- $\beta$ 在心肌收缩功能方面发挥重要作用，能够引发心衰<sup>[10-12]</sup>，而PKC- $\delta$ 和PKC- $\epsilon$ 主要影响缺血预适应<sup>[13, 14]</sup>和心肌肥大<sup>[15]</sup>，因而这些亚型常被作为相应的治疗靶点而被广泛研究。

### 2.1 PKC与心肌肥大<sup>[15]</sup>

乳鼠心肌细胞经常被用于研究心肌肥大信号通路。许多刺激物，例如卟啉醇肉豆蔻酸乙酸酯（PMA）、Ang II、苯肾上腺素（PE）以及ET-1等常常被用来诱导心肌细胞的肥大。PMA能够激活cPKC和nPKC的各种亚型，转染或显性负向PKC- $\alpha$ 突变体实验都能表明PKC- $\alpha$ 是引起心肌细胞肥大的必要充分因素，表现为蛋白合成增加、蛋白/DNA比例升高及细胞表面积增加等。并且，PKC- $\alpha$ 反义处理能够降低PE诱导的 $\alpha$ -actin和心房利钠肽（ANP）的mRNA水平增加。另一方面，过表达PKC- $\alpha$ 能够增加细胞表面积和<sup>3</sup>H-亮氨酸掺入，升高ANP的mRNA水平，表明PKC- $\alpha$ 的激活能够诱导心肌细胞的肥大。人们还发现，PKC- $\beta$  1和PKC- $\beta$  2是PMA诱导心肌细胞肥大所必须的。此外，PKC- $\epsilon$ 在心肌细胞肥大中的作用也有报道，反义处理PKC- $\epsilon$ 能降低myotrophin诱导乳鼠心肌细胞蛋白合成的增加。因此，至少四种PKC亚型参与了乳鼠心肌细胞肥大的过程，它们是PKC- $\alpha$ 、PKC- $\beta$  1、PKC- $\beta$  2和PKC- $\epsilon$ ，而PKC- $\delta$ 和PKC- $\zeta$ 没有参与这一过程。

在动物模型中，早期的研究观测了多种慢性压力超负荷致肥厚心肌中PKC表达与磷酸化水平的改变，涉及的压力超负荷模型有升主动脉缩窄、腹主动脉缩窄、肺动脉缩窄及盐敏感性高血压等大鼠模型。人心衰期

心肌可检测出PKC- $\alpha$ 、PKC- $\beta$  1与PKC- $\beta$  2表达明显增加，PKC- $\epsilon$  表达未改变。当对PKC- $\alpha$ 、PKC- $\beta$  和PKC- $\epsilon$  基因敲除鼠行主动脉缩窄后，心脏仍发生肥厚。这可能是由于PKC各异构体之间具有相互代偿作用，单独敲除一个异构体不会产生影响，如对PKC- $\epsilon$  敲除鼠行主动脉缩窄，肥厚心肌中PKC- $\delta$  的表达与磷酸化水平明显上调。

此外，也有科学家采用改变两种基因的复合转基因鼠，观测到PKC- $\epsilon$  在心肌肥厚过程中高表达，具有防止心衰的作用；相反，若在心肌肥厚过程中抑制PKC- $\epsilon$  的表达，心肌则出现更为明显的肥厚，并很快发生心衰。这些结果表明，PKC- $\epsilon$  在心肌肥厚过程起代偿作用。另外，PKC- $\epsilon$  高表达在心肌缺血再灌注过程中对心肌损伤具有明显的保护作用。所以，PKC- $\epsilon$  可能是一种具有心肌保护功能的PKC异构体。

总之，在慢型压力超负荷引起的心肌肥厚过程中，由于引起心肌肥厚的诱因主要是心肌细胞自分泌或旁分泌的促心肌细胞肥大因子，如ET-1、儿茶酚胺和Ang II等。这些因子均为G蛋白偶联受体（GPCR）的激动剂，而GPCR激活均由PKC介导而引起心肌细胞肥大，所以，PKC是介导心肌肥大的关键性环节<sup>[16]</sup>。

## 2.2 PKC与心力衰竭<sup>[17]</sup>

心肌肥大是细胞对刺激的慢适应性反应，随着肥大的进展，这种适应会变为不适应，也就是从肥大到心衰的转变。有学者研究发现，在肥大细胞中，PKC激活转录基因，引起蛋白质合成增加，收缩蛋白累积，并表达更有效的收缩蛋白；而在心衰肌细胞中，虽然蛋白合成增加，但结构蛋白增加较多，收缩蛋白相对减少，从而引起心衰。目前已经清楚的是心肌细胞肥大的机制，但从肥大到心衰转变的机制仍不清楚。但可以肯定的是，增强PKC活性可通过多种机制降低心肌收缩力。与正常心肌细胞相比较，衰竭心肌细胞中PKC的活性明显增加。在充血性心力衰竭中（主动脉缩窄动物模型），PKC- $\epsilon$ 、PKC- $\beta$  1和PKC- $\beta$  2的活性均显著增加，PKC其它亚型则无明显变化。在扩张性心肌病和缺血性心肌病引起的心衰中， $\alpha$ 、 $\beta$  1和 $\beta$  2亚型活性显著增加，这提示在衰竭心肌细胞中，PKC各亚型都受到选择性调节<sup>[10]</sup>。

一般认为， $\beta$  亚型是与心力衰竭关系最为密切的PKC亚型。在高血压致心衰的模型大鼠中，PKC- $\beta$  的水平被明显升高，Ang受体阻断剂能改善心脏功能并降低PKC- $\beta$  的激活和表达水平。选择性抑制PKC- $\beta$  能够改善MI诱导心衰的心脏功能和钙调控，增强高血压诱导的心衰大鼠的心脏功能，延长其存活时间。在转基因鼠中，PKC- $\beta$  过表达会导致明显的左室衰竭，并减弱了钙离子处理信号，这可能是由于心肌细胞钙离子反应性降低造成的。在PKC- $\beta$  过表达心肌细胞中，肌钙蛋白磷酸化程度显著加强，降低了肌丝对钙离子的反应性，引起心肌细胞功能障碍，降低了心肌细胞的收缩性。此外，PKC- $\alpha$  的表达和活性在早期心衰中没有变化，但在两种心衰大鼠模型的终末期均被上调。磷酸化研究表明，PKC- $\alpha$  通过磷酸化cTnI/cTnT降低肌原纤维收缩性，敲除PKC- $\alpha$  基因能增加心肌收缩力；过表达PKC- $\epsilon$  也会造成心室功能显著损害以及钙离子内稳态的变化。

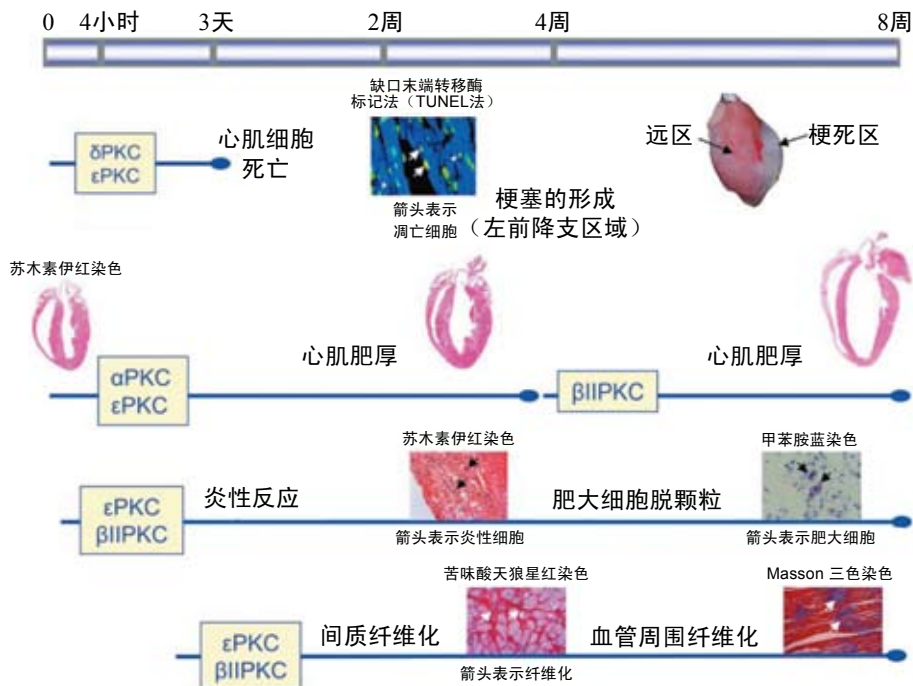


图3 PKC的各种亚型都密切参与了心肌梗塞和心衰中的各种重构过程。心衰的进程以心肌重构作为重要标志，而PKC的某些特定亚型在这一进程的不同阶段中发挥了重要作用。心肌细胞死亡、炎症反应、心肌肥厚以及纤维化都受PKC的某些特定亚型直接调控，例如PKC- $\alpha$ 、PKC- $\beta$  II、PKC- $\delta$  及PKC- $\epsilon$  等等。

图片来源: *Cardiovascular Research*

### 3. 糖原合成酶激酶3 $\beta$ (GSK-3 $\beta$ )

糖原合成酶激酶3 (GSK-3) 属于保守丝氨酸/苏氨酸激酶家族, 这一酶家族存在于所有的真核生物中。人类中, GSK-3包括两种亚型: GSK-3 $\alpha$  与GSK-3 $\beta$ 。它们由不同的基因编码, 在激酶区域有97%的序列同源。在心脏中, GSK-3 $\alpha$  与GSK-3 $\beta$  均有表达, 但是它们的表达模式、底物选择与细胞功能均不同。迄今为止, 大部分研究都是探讨GSK-3 $\beta$  的作用, 对GSK-3 $\alpha$  亚型功能的特异性了解得很少。

GSK-3 $\beta$  起初被认为通过磷酸化糖原合成酶而抑制糖原的合成, 但是现已发现GSK-3 $\beta$  广泛参与各种细胞功能的调节, 包括代谢、基因表达的调节和细胞骨架完整性的维持。由于GSK-3 $\beta$  倾向磷酸化位于N末端比邻脯氨酸的丝氨酸/苏氨酸残基, 所以它被称为脯氨酸定向激酶。GSK-3 $\beta$  主要定位于细胞浆, 但也可以在细胞核中发现。在受到刺激时, GSK-3 $\beta$  的亚细胞定位会发生改变。在心肌细胞中, 内皮素刺激促进GSK-3 $\beta$  核转位, 而异丙肾上腺素则致其出核。在心脏组织中, GSK-3 $\beta$  是重要的心肌肥厚负性调节信号分子, 同时对心肌细胞凋亡有重要的调节作用, 而且在血管组织中能促进血管增生<sup>[18]</sup>。GSK-3 $\beta$  的抗肥厚效应令人期待<sup>[19-21]</sup>, 同时由于它具有一定的促凋亡能力, 因而也可以作为提高缺血后心肌存活率的治疗靶点<sup>[22]</sup>。

#### 3.1 GSK-3 $\beta$ 与心肌肥大<sup>[23]</sup>

近来有证据显示, GSK-3 $\beta$  是重要的内源性心肌肥大负性调控分子。通过过表达来增强细胞GSK-3 $\beta$  活性可以抑制心肌肥大的多种表现, 包括蛋白合成率的增加和肥大相关基因的表达。兴奋 $\beta$  肾上腺素能受体、Gq偶联受体以及Fas受体可以激活肥大相关程序, 通过PI3K/Akt途径使GSK-3 $\beta$  的Ser9磷酸化而致GSK-3 $\beta$  活性钝化, 这就阻止了GSK-3 $\beta$  发挥抗心肌肥大效应, 而最终导致心肌肥大。在转基因小鼠心脏特异性地过表达固有活性的GSK-3 $\beta$  或GSK-3 $\beta$  的突变体GSK-3 $\beta$  S9A (其Ser9不能被磷酸化), 能够抑制主动脉狭窄或异丙肾上腺素刺激所致的心肌肥大, 也能够部分阻止钙调神经磷酸酶激活所致的心肌肥大。新近研究显示, 过表达非磷酸化的GSK-3 $\beta$  可以抑制胰岛素样生长因子1所致的心肌肥大。在缺乏功能性Fas受体的Ipr小鼠压力负荷实验中, Fas受体所诱导的GSK-3 $\beta$  抑制作用消失, 同时缺少代偿性心肌肥大过程, 并伴有快速发生的左室扩张、心力衰竭。患有糖尿病时, 胰岛素诱导GSK-3 $\beta$  磷酸化以及活性钝化的功能受损。胰岛素对GSK-3 $\beta$  的磷酸化作用受阻不仅损害糖原合成功能, 也减少蛋白的合成, 最终导致糖尿病性心肌病的发生。这些体内实验的研究结果都显示, GSK-3 $\beta$  在心肌肥大的负性调控中发挥了重要的作用。

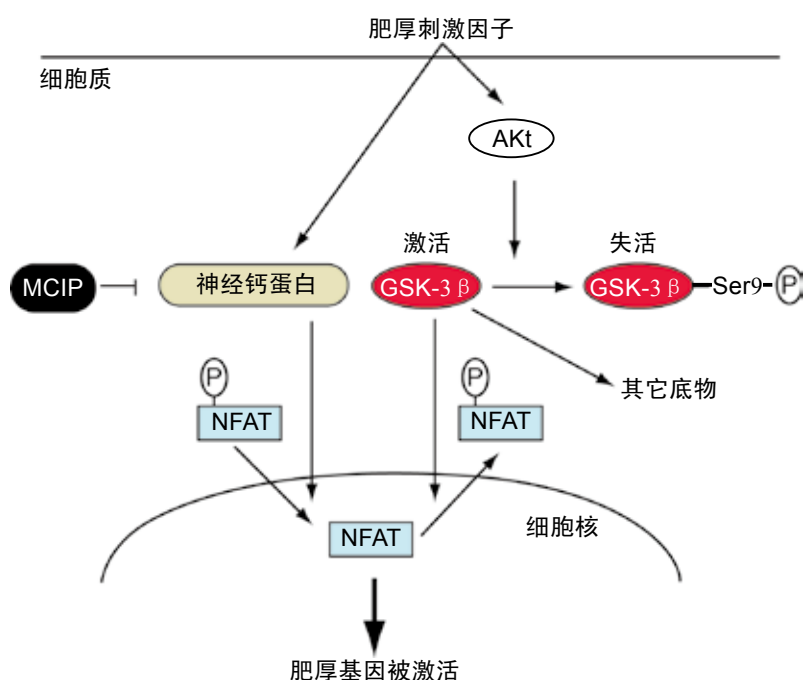


图4 神经钙蛋白和GSK-3 $\beta$  对心肌肥大的反协同效应。大量的肥厚刺激因子激活神经钙蛋白和Akt。神经钙蛋白能够使NFAT蛋白去磷酸化, 导致它转位入核, 激活肥厚基因。GSK-3 $\beta$  通过磷酸化NFAT蛋白拮抗神经钙蛋白的信号通路。GSK-3 $\beta$  被Akt或其它激酶在丝氨酸-9残基磷酸化后失活。GSK-3 $\beta$  还具有其它底物, 能够影响肥厚性信号传导通路。神经钙蛋白的活性同样受到MCIP蛋白的抑制。图片来源: *Proceedings of the National Academy of Sciences*

GSK-3 $\beta$ 通过调节核转录、蛋白翻译合成、细胞骨架形成等多种机制影响心肌肥大的发生发展。GSK-3 $\beta$ 可以磷酸化激活T细胞核因子(nuclear factor-activated T cell, NFAT)、GATA4、 $\beta$ 连环蛋白( $\beta$ -catenin)、转录因子和真核起始因子B $\epsilon$ (一种蛋白翻译调节因子)等一系列不同的转录因子,使这些因子出核或者失活,与DNA结合降低,导致核转录降低,从而发挥抑制肥大的作用。当用内皮素或异丙肾上腺素抑制GSK-3 $\beta$ 作用时,NFAT和GATA4的磷酸化降低,这些转录因子在胞核中定位增强,刺激心肌肥大的发生。

真核翻译起始因子2(eukaryotic translation initiationfactor 2, eIF2)结合到活化的启动子tRNA(蛋氨酸-信使核糖核酸, met-tRNA<sup>met</sup>)上是控制蛋白合成(心肌肥大的显著特征)的一个关键步骤,结合后形成三元络合物再结合到核糖体亚单位40S上。eIF2B $\epsilon$ 是eIF2B的关键亚单位,它控制eIF2的二磷酸鸟苷/三磷酸鸟苷(GDP/GTP)交换反应,其活性可因Ser540的磷酸化而降低。Hardt等人研究表明,通过磷酸化eIF2B $\epsilon$ 而抑制蛋白合成的启动是GSK-3 $\beta$ 发挥抗心肌肥大作用的重要机制。GSK-3 $\beta$ 也可以通过增强蛋白酶体的降解或亚细胞位置的改变来负性调节 $\beta$ 连环蛋白和细胞周期蛋白D1的表达,影响心肌肥大的发生与发展。

### 3.2 GSK-3 $\beta$ 与心肌细胞凋亡

GSK-3 $\beta$ 在细胞凋亡与生存调节中发挥重要的作用。GSK-3 $\beta$ 可以促使神经细胞、血管平滑肌细胞发生凋亡。环腺苷酸的水平升高可以通过蛋白激酶A依赖途径使GSK-3 $\beta$ 失活而促进神经细胞的存活。锂可以抑制GSK-3 $\beta$ 的活性,在缺血性中风时提供神经保护作用。有研究显示,缺血预适应可以促进GSK-3 $\beta$ 磷酸化而介导心肌保护作用,这一作用能被PI3K抑制剂Wortmannin阻断,而GSK-3 $\beta$ 抑制剂氯化锂可以模拟缺血预适应的心肌保护作用,表明抑制GSK-3 $\beta$ 的活性具有心肌保护作用。大鼠心肌转染肾上腺髓质素基因能够促进Akt与GSK-3 $\beta$ 的磷酸化,降低心肌中GSK-3 $\beta$ 与Caspase-3的活性,减少缺血再灌注诱导的心肌细胞凋亡。而且,在离体培养的心肌细胞中,肾上腺髓质素也可以减少缺氧复氧所诱导的心肌细胞凋亡,同时伴有GSK-3 $\beta$ 磷酸化增强、GSK-3 $\beta$ 与Caspase-3活性降低。阿片样物质具有心脏保护作用,可以减轻心肌缺血再灌注损伤。Gross等人研究证明,阿片样物质通过磷酸化GSK-3 $\beta$ 的Ser9而减轻心肌缺血再灌注损伤。上述研究表明,PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$ 信号途径在缺氧缺血预适应、缺氧复氧和缺血再灌注损伤中发挥重要作用,多种心肌保护分子都通过此信号途径的激活抑制心肌细胞凋亡,从而发挥保护作用,而GSK-3 $\beta$ 作为这一信号途径的下游分子其作用可能更为突出。因此调节GSK-3 $\beta$ 活性可能会成为冠心病和心力衰竭等新的治疗策略<sup>[24]</sup>。

## 4. G蛋白偶联受体激酶(GRK)

GRK家族属于丝氨酸/酪氨酸蛋白激酶家族,主要由7个成员组成,按发现时间顺序分别命名为GRK1~GRK7。每个成员都含有共同的功能结构,包括1个中心催化区、1个底物识别和含有G蛋白信号调节蛋白(regulators of G protein signaling, RGS)样结构的氨基末端区以及1个作用于胞膜的羧基末端区。GRK1和GRK7主要分布于视网膜,介导光感传导。GRK2、GRK3、GRK5和GRK6分布广泛,在心、脑、肺、肾等组织均有表达。GRK4主要存在于睾丸。其中GRK2,也被称为 $\beta$ 肾上腺素受体激酶(ARK1)能够调节心脏 $\beta$ 肾上腺素受体。 $\beta$ 肾上腺素受体是交感神经系统通过变时变力作用来调控心功能的枢纽分子,在慢性心衰中,心室功能的衰竭同心脏中 $\beta$ 肾上腺素受体介导的信号转导过程密切相关。GRK2作为 $\beta$ 肾上腺素受体初始的调节分子,其活性与心衰反应的发生过程密切相关。GRK2是位于胞膜上的细胞溶质酶,主要与活化了的异源性三聚体G蛋白的 $\beta$ 、 $\gamma$ 亚单位相结合。它在心脏中的主要功能为催化已经激活的 $\beta$ 肾上腺素受体磷酸化,促进arrestin蛋白与磷酸化了的 $\beta$ 肾上腺素受体结合,促使其与G蛋白解偶联,由此导致受体脱敏或降解。慢性心衰的一个重要反应就是 $\beta$ 肾上腺素受体的脱敏,GRK2水平和活性的升高同病变心肌中 $\beta$ 肾上腺素受体脱敏的加剧恰恰有着特异的相关性。

在心衰病人中，不论是缺血还是扩张型心肌病，GRK2的活性及其在心肌细胞内的表达均有明显的增高<sup>[26]</sup>。近年来，众多动物模型实验资料均提示病变心肌中GRK2水平的增加同心衰的发病有着密切的联系。对GRK2被抑制表达的转基因大鼠和GRK2基因敲除大鼠的研究发现，它们均表现出基础心脏功能的增强和对β肾上腺素受体引起心肌收缩的异常敏感，表明心脏GRK2水平或活性的改变均会严重影响心脏功能<sup>[27]</sup>。

Laccarino等人研究阐明了通过免疫组化方法监测外周血淋巴细胞中的GRK2水平和活性可用于监测心肌中此激酶的水平，血液中GRK2水平镜像反映心脏中该激酶的水平。还有研究发现，高血压患者淋巴细胞内GRK2水平也增高，这进一步支持使用血液中的GRK2水平来监测伴有心血管疾病患者心功能状态的可行性。Laccarino等人的实验还表明，淋巴细胞内的GRK2水平同左室射血分数和美国纽约心脏病协会（NYHA）心功能分级相关，提示GRK2上升的水平可能同心衰患者病情和临床症状体征的严重性相关。而长期使用β肾上腺素受体拮抗剂的动物模型，如服用卡维地洛和阿替洛尔的大鼠和服用比索洛尔的猪，心脏均存在GRK2水平的降低和β肾上腺素受体介导的信号转导增强。故而在服用β肾上腺素受体拮抗剂的心衰患者中监测其外周血GRK2水平可作为评价这些药物疗效的一个有意义的指标<sup>[28]</sup>。

综上所述，GRK2可以成为有较大价值的生化指标以协助诊断心衰、判断病情严重性，从而掌握临床干预的时机及力度。

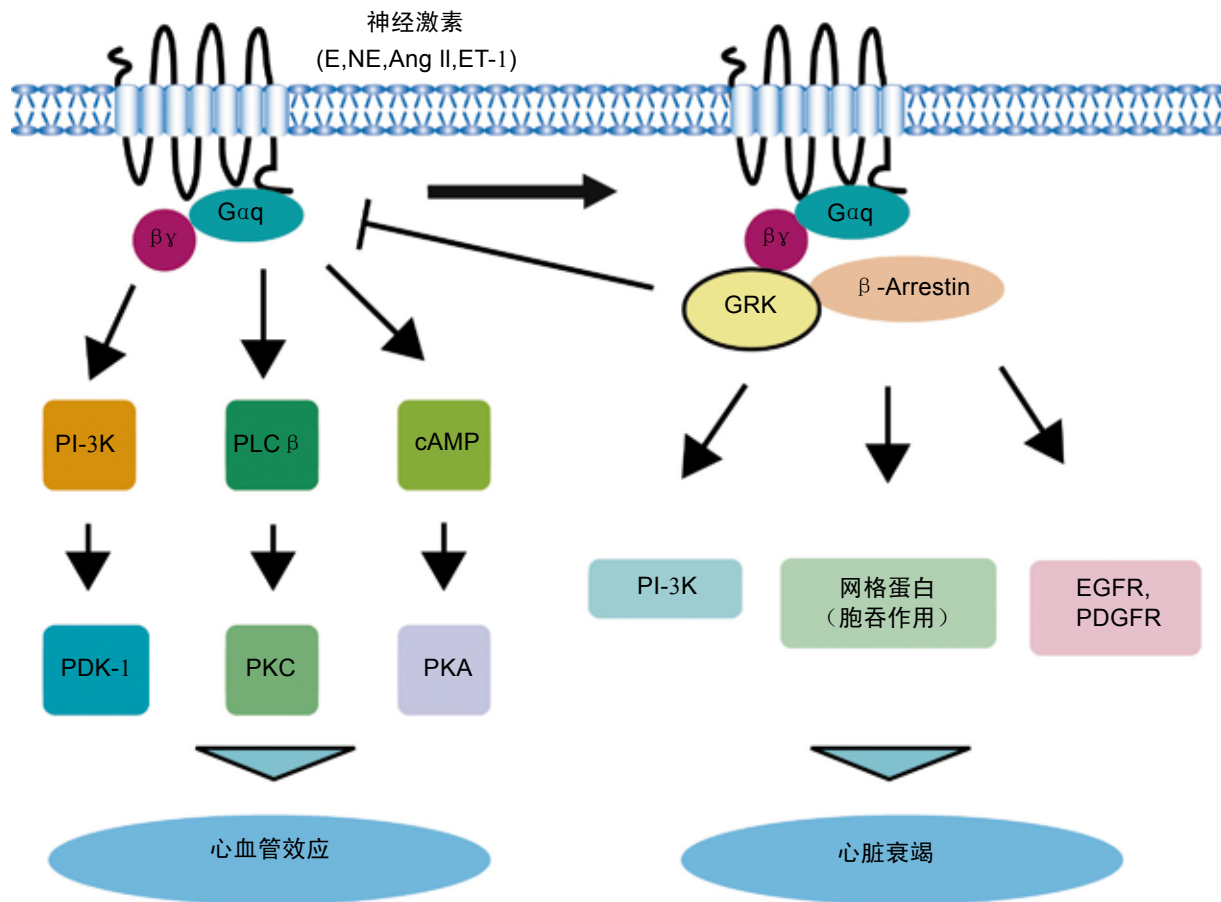


图5 GRK调节下的与心血管功能和心衰相关的信号转导。与G蛋白偶联受体（GPCR）结合的配体能够通过G蛋白异源三聚体中的Gβ和Gγ亚基，将GRK招募至细胞膜。GRK将GPCR磷酸化之后，终止了其来自Gα亚基的信号传递，并促进视紫红质抑制蛋白（arrestin）的结合。后者会导致受体失敏化和内吞。同时，一系列信号传递又被GRK和arrestin通过与多个信号蛋白的相互作用而启动。这些信号机制都参与了心衰和心功能失调的发生。

图片来源：Journal of Molecular and Cellular Cardiology

# 人类激酶组ORF表达克隆和shRNA克隆



## 基因功能研究的阴阳配对

- 人类蛋白编码基因的shRNA表达克隆——功能抑制 (Lost function)
- 人类全长蛋白编码ORF克隆——功能获得 (Gain function)

**GeneCopoeia™**  
Expressway to Discovery

GeneCopoeia, Inc.  
19520 Amaranth Drive  
Germantown, Maryland 20874  
USA  
Tel: 301-515-6982  
Fax: 301-515-6983  
Web: <http://www.genecopoeia.com>

**复能基因**  
FulenGen

广州复能基因有限公司  
地址: 广州科学城国际企业孵化器D座8楼 510663  
电话: (020)32052376、32052410、32290874  
传真: (020)32052877  
网址: <http://www.fulengen.com>  
服务热线: 020-32068595 020-32052376-666  
电子信箱: [sales@fulengen.com](mailto:sales@fulengen.com)



## 5. 磷脂酰肌醇3激酶 (PI3K)

磷脂酰肌醇3激酶 (PI3K) 家族参与多种信号通路, 调节细胞的主要功能。正常情况下, 由其活化而产生的类脂产物3, 4-二磷酸磷脂酰肌醇[PI(3,4)P<sub>2</sub>]和3, 4, 5-三磷酸磷脂酰肌醇[PI(3,4,5)P<sub>3</sub>]作为第二信使结合并激活多种细胞内的靶蛋白, 形成一个信号级联复合物, 最终调节细胞的增殖、分化、存活和迁移等。PI3K 激酶家族的亚型依其结构和底物的特异性不同可分为I、II、III类型。其中III型PI3K以PI为底物, II型以PI及PIP为底物, I型以PI、PIP及PIP<sub>2</sub>为底物, 使底物的肌醇环第3位发生磷酸化。在心血管系统中被广泛研究的是I型。I型PI3K依p110所结合亚基的不同又分为IA型和IB两个亚型, 它们分别从酪氨酸激酶连接受体和G蛋白连接受体传递信号。IA型PI3K催化亚基p110包括p110 $\alpha$ 、p110 $\beta$ 和p110 $\delta$ , IB型催化亚基主要为p110 $\gamma$ , 因而这些亚型也分别被命名为PI3K $\alpha$ 、PI3K $\beta$ 和PI3K $\gamma$ 等等。PI3K有多种生物功能影响心血管系统、癌症、自身免疫及炎症。在心血管系统, 它对心肌肥大过程的影响已经引起了人们的重视<sup>[29, 30]</sup>。

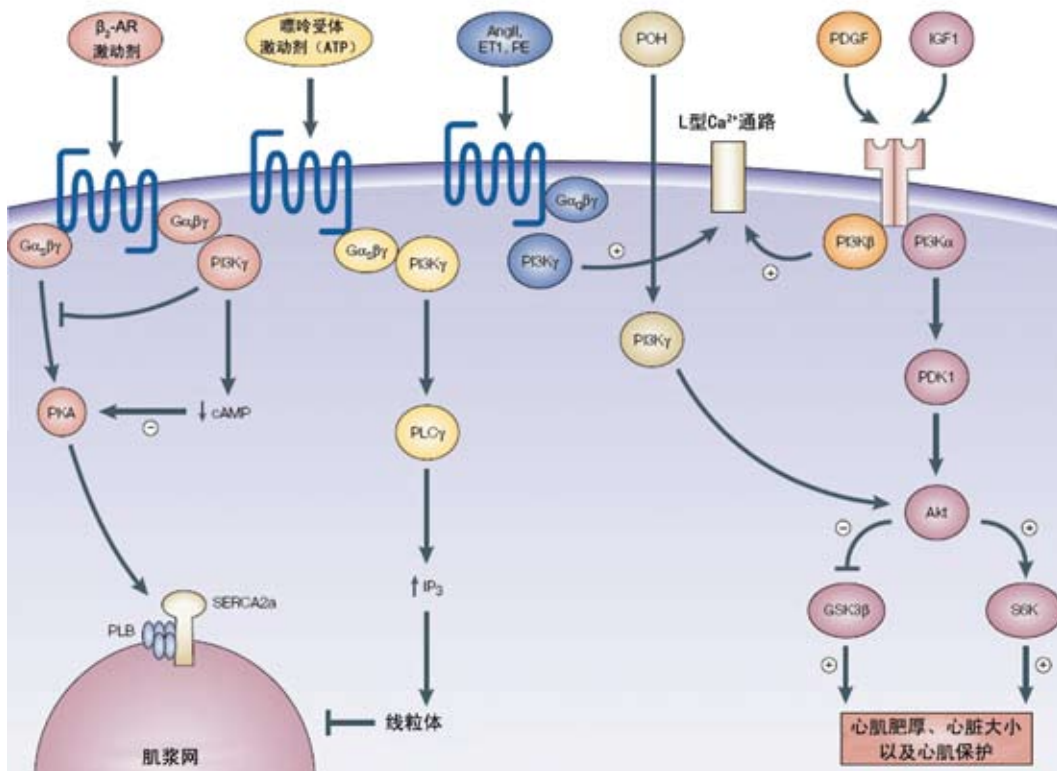


图6 PI3K对心肌肥厚和收缩的影响。PI3K的各亚型在钙调节和收缩功能、肥厚以及心肌保护过程中都发挥关键作用。过度刺激PI3K $\gamma$ 可能会限制 $\beta_2$ -AR对于心肌收缩的影响, PI3K $\gamma$ 通过G $\alpha_1$ 偶联受体与 $\beta_2$ -AR信号通路相关联, 导致cAMP水平降低, 因而减弱PKA的活性以及它对PLB的磷酸化程度。相比之下, 抑制PI3K能够提高心肌的收缩性。PI3K的活性还能够使 $\beta_2$ -AR与G $\alpha_s$ 解偶联, 从而使之无法激活PKA。 $\beta_2$ -AR介导的肥厚是通过激活Akt和PI3K引起的GSK3 $\beta$ 磷酸化来调节的。G $\alpha_s$ 偶联受体激动剂(通过PI3K $\gamma$ 途径)也通过IP<sub>3</sub>受体降低了SR钙离子的摄取。PI3K $\beta$ 还能够影响L型钙通道的功能。压力超负荷型心肌肥厚主要由PI3K $\gamma$ 介导。PI3K $\alpha$ 以及其下游因子主要调节心肌肥厚、器官的体积以及发挥心脏保护作用。

图片来源: *Nature Reviews*

各种动物实验都表明PI3K在心肌肥大过程中的作用, 并且不同亚型具有不同作用。过表达PI3K $\alpha$ 能导致代偿性肥大但不会伴随心肌功能障碍, PI3K $\gamma$ 活化引发肥厚之后则会发生失代偿心衰。在新生的心肌细胞当中, PI3K抑制剂使得细胞中的蛋白质合成成功率降低, 并且能在胰岛素诱导的细胞中抑制蛋白质的生成。进一步研究发现, 用大鼠进行实验, 组织活性PI3K $\alpha$ 在心脏中特异过表达能使心肌细胞变大而造成心脏变大; 相反, 显性缺失PI3K $\alpha$ 的大鼠, 其心肌细胞变小, 心脏也变小, 但不发生心肌细胞数目的变化。心脏大

小的改变与Akt/PKB的磷酸化的相应变化有关。组织活性PI3K $\alpha$ 和显性缺失PI3K在心脏中的过表达都不会造成心肌细胞功能紊乱和寿命减少，这意味着PI3K所调节的是心脏生理性的增生和肥大。与此相一致的是，在应答各种不同的生理性刺激（比如通过增加含磷Akt/PKB的水平和活性来增强IGF-1作用）时，PI3K $\alpha$ 对于所造成的生理性增生都是必须的。与向心性肥大和离心性肥大不同，通过增强PI3K $\alpha$ （以及Akt/PKB）活性造成的心肌肥大，是一种生理性肥大，其心肌细胞的相对尺寸不会改变，其具体机制可能与某一独特的基因表达特性有关。

PTEN是位于心肌细胞和内皮细胞上PI3K $\alpha$ 和PI3K $\gamma$ 的负性调控子。在心脏中，PTEN缺失会增加GSK-3 $\beta$ 的磷酸化水平，导致生理性高血压、缺血预适应和L型Ca<sup>2+</sup>离子通道的激活。此外，PTEN还在心血管形成和出生后血管发生过程中起重要作用，在小鼠模拟人类心肌肥大模型中，PTEN的表达受到抑制，导致PI3K信号增强，从而增加细胞大小，过表达PTEN则使细胞变小。最近，有体内实验证实PTEN在调控哺乳动物细胞（包括心肌细胞）大小上起着重要的作用。例如，在新生儿心肌细胞中，显性缺失PTEN的表达能激活Akt/PKB从而增加蛋白质合成和细胞大小，相反野生型PTEN的过表达则使之减少，这些数据从另一角度支持了PI3K在心肌肥大过程中的重要地位。

PI3K信号通路在缺血和压力超负荷时也会被激活<sup>[31]</sup>。生长因子通过PI3K $\alpha$ 激活酪氨酸激酶而引发代偿性肥厚，而神经激素因子通过GPCR和PI3K $\gamma$ 导致失代偿性心肌肥厚。由于PI3K $\alpha$ 和PI3K $\gamma$ 的不同作用，针对于 $\gamma$ 亚型特异性抑制剂的研究有助于减轻在钙转运、 $\beta$ 肾上腺素能信号通路、心肌收缩及肥厚过程中的有害反应。但是，目前这一类抑制剂在心血管疾病治疗方面的应用前景还有待进一步研究。

## 6. 腺苷酸活化蛋白激酶（AMPK）

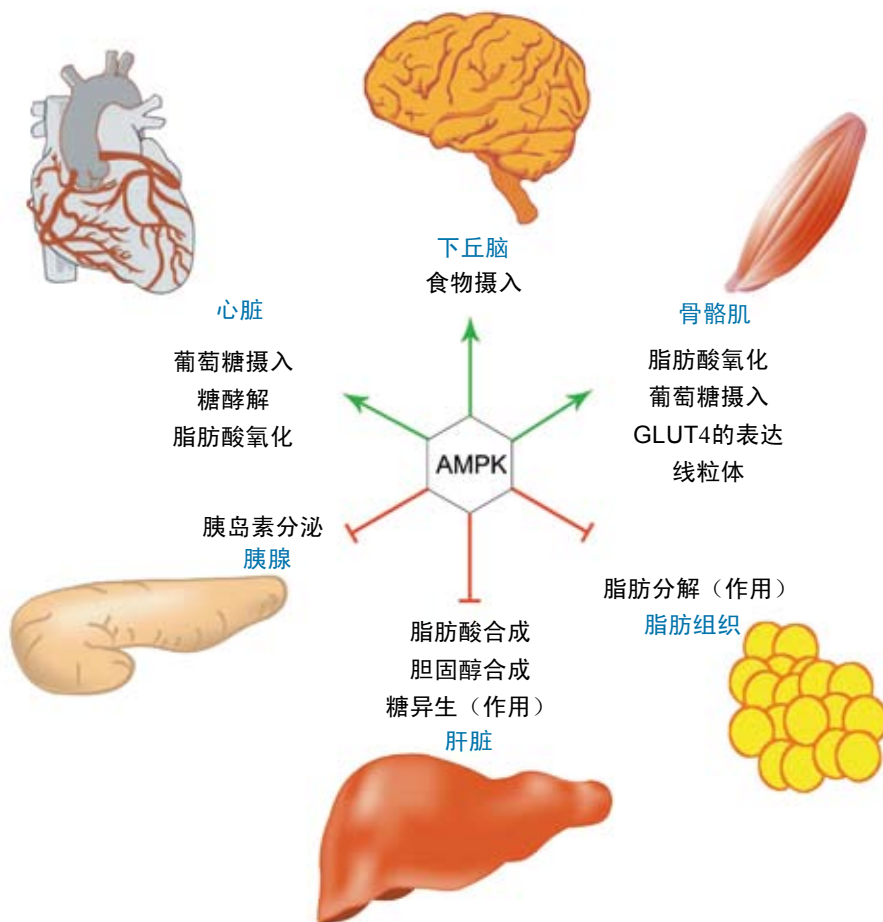


图7 AMPK在整个机体内参与调节能量平衡。图中绿色箭头表示正向调节，红色箭头表示负向调节。AMPK在心肌缺血时可增加葡萄糖的摄入和糖酵解，并减少缺血和再灌时心肌细胞的损伤和凋亡。低血糖会刺激下丘脑部位的AMPK的激活，从而增加食物的摄取。运动时，AMPK被激活会促进骨骼肌中脂肪酸氧化的进行，产生大量的ATP以维持能量的需要，AMPK的激活还可伴有葡萄糖转运的增加以及GLUT4表达的增加，其机制可能是AMPK促进转录因子肌细胞增强子2（MEF2）和GLUT4增强子（GEF）结合，以及钙调蛋白依赖性蛋白激酶（CAMK）表达增加，从而增加GLUT4的转录。对于脂肪组织，AMPK激活后不仅能抑制脂肪的合成，而且还有抑制脂肪分解的作用。在肝脏组织，AMPK一旦被激活，可使 $\beta$ -羟甲基- $\beta$ -甲基戊二酸单酰辅酶A还原酶（HMGCR）、乙酰辅酶A羧化酶（ACC）等磷酸化而失去活性，从而抑制胆固醇、脂肪酸和糖原的合成。AMPK还与胰岛素信号通路间存在通信联系，当胰岛素信号通路受阻时，AMPK信号通路可作为备用途径参与葡萄糖代谢，可增加胰岛素的敏感性，并抑制胰岛素的分泌。

图片来源：The Journal of Clinical Investigation

磷酸腺苷（AMP）激活的蛋白激酶（AMP activated protein kinase, AMPK）是一种在细胞内行使能量代谢调节的蛋白激酶，同时也是细胞的能量变化感受器。机体受到生理应激或病理刺激时，AMPK影响糖原、脂肪酸及蛋白质代谢，对心血管系统功能起重要调节作用。在心肌及血管平滑肌受缺血/缺氧或心血管活性物质刺激时，AMPK激活还能通过影响细胞周期及物质代谢抑制细胞增殖，从而在高血压及动脉粥样硬化的防治中起重要作用。因此，AMPK有望成为代谢性疾病及心血管疾病重要的治疗新靶点<sup>[33, 34]</sup>。

AMPK保护缺血所致心肌损伤<sup>[35, 36]</sup>。心肌缺血时会很快激活AMPK，活化的AMPK可在心肌缺血的情况下发挥诸多适应性调节功能，如调节能量代谢、控制细胞蛋白合成、表达相关基因、调节离子通道的活性甚至部分特定细胞器的功能。细胞内葡萄糖代谢水平升高是心肌缺血的重要生理反应，此时细胞外大量葡萄糖转运到细胞内，以作为葡萄糖代谢所需的原料，而葡萄糖转运子4（GLUT4）在此过程中至关重要。激活的AMPK促使长链脂酰CoA入线粒体进行β氧化以维持能量平衡，同时促进心肌膜葡萄糖载体GLUT4快速转位到质膜，增加糖的摄取。AMPK增加心肌葡萄糖的摄入以及GLUT4转运，部分经过NO2鸟苷酸环化酶通路介导。AMPK功能缺失的转基因鼠的心脏，在轻度缺血再灌时不能增加葡萄糖的摄入和糖酵解，同时左心室收缩功能的恢复明显减弱、心脏的损伤增加及心肌细胞的凋亡增加。在胰岛素抵抗心肌AMPK激活后还可通过激活PI3K/PKB通路，使糖摄取功能接近正常。在心肌缺氧时，AMPK激活还能抑制蛋白质的合成，可在能量缺乏时节能以保护心脏。由此可见，AMPK在心肌缺血时可增加葡萄糖的摄入和糖酵解并减少在缺血和再灌时心肌的损伤和凋亡，这为临床治疗缺血性心脏病提供了必要的指导。

此外，AMPK激活还可抑制高血糖引起的血管内皮细胞中caspase-3的活性，减少细胞凋亡，并且对血管新生起重要作用。在人脐静脉内皮细胞腺病毒表达dnAMPK可抑制细胞向血管内皮细胞生长因子迁移并且抑制血管发生。AMPK还能够促进内皮细胞对游离脂肪酸（free fatty acid, FFA）的氧化，拮抗FFA造成的内皮细胞脂毒性，降低胆固醇水平，对心血管功能起到保护作用。

除了上述在治疗心血管疾病方面有希望作为治疗靶点的激酶之外，还有以下几种蛋白激酶，但目前的研究结果对于它们是否能够被作为治疗靶点尚存在争议。

## 7. 丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）

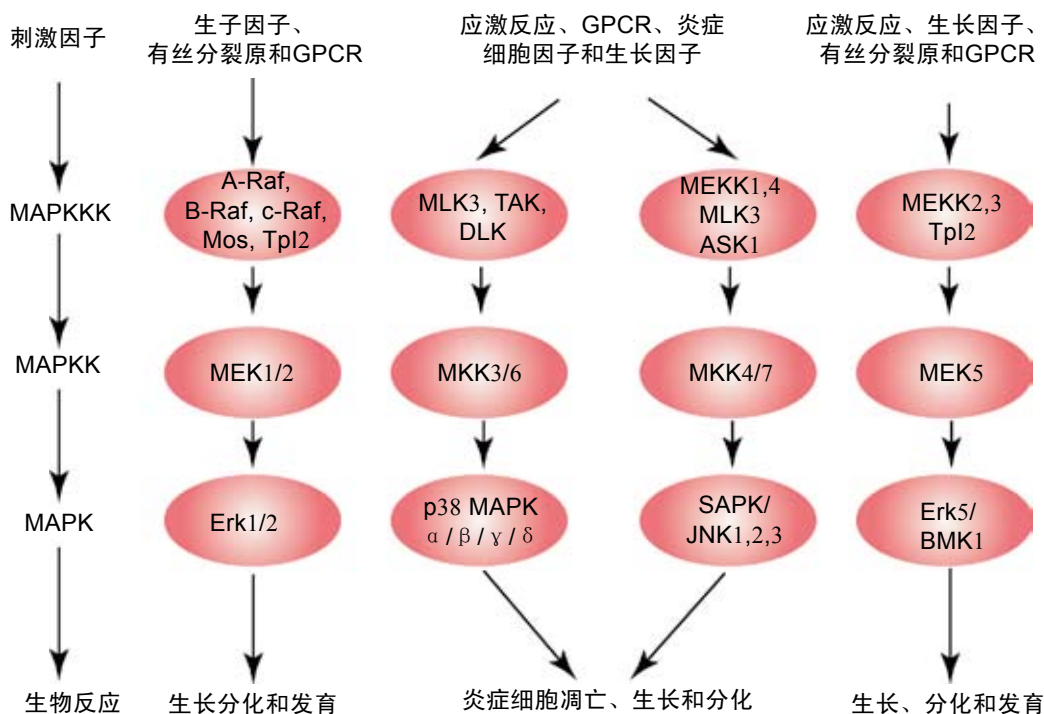


图8 庞大的MAPK级联系统。MAPK属于丝/苏氨酸蛋白激酶家族，在真核生物中高度保守，参与细胞内许多过程，如细胞增殖、分化、运动以及凋亡。MAPK级联信号系统主要分为三个层次。MAPK被MAPK激酶（MAPKK）磷酸化后激活，MAPKK又被MAPKK激酶（MAPKKK）磷酸化并激活，MAPKKK又通过与小GTP酶和/或其它蛋白激酶的相互作用而被激活，从而将MAPK信号通路与细胞表面受体及外部的刺激因子相联系。  
图片来源：[http://www.cellsignal.com/reference/pathway/MAPK\\_Cascades.html](http://www.cellsignal.com/reference/pathway/MAPK_Cascades.html)

MAPK、ERK1/2、JNK以及p38 MAPK共同组成一个庞大的级联反应系统，除了维持内环境稳态的短息变化和急性荷尔蒙反应，还参与调节各种复杂的功能，如胚胎形成、分化、增殖和细胞死亡等<sup>[37]</sup>。虽然它们普遍存在于机体内，但激活的机制、底物以及功能各有特点，并且具有细胞特异性。ERK1/2是MAPK类最早被确认的激酶，它被心肌细胞中的生长刺激剂（包括ET-1、PE和Ang II）激活，具有促生长和细胞保护功能。ERK1/2一般被认为能够促进代偿性肥大的发生。另外，JNK和p38 MAPK细胞压力（例如缺血、促炎因子和肥厚性刺激等）激活。这种激活与心肌肥厚和凋亡都有关联。由于其作用的复杂性，对于它的激活究竟是心血管疾病的诱因还是结果，在已知的文献报道中存在多种有争议的观点，这有可能是由于这类激酶存在多种亚型以及目前尚没有发现选择性高的抑制剂所导致的。雌激素能够抑制ROS的形成和p38 $\alpha$ 的激活，并且伴随增加p38 $\beta$ 的活性。p38 $\beta$ 不同于p38 $\alpha$ ，它几乎不受缺氧/再复氧的影响。上述表明，雌激素以不同的方式调节p38的两种主要亚型的活性，并且研究结果表明是p38 $\alpha$ 引起了细胞的死亡，而p38 $\beta$ 则没有参与此过程。此外，一项研究表明在小型动物（如小鼠）中，p38的激活可以导致急性细胞损伤和死亡，而在猪上则没有观察到这一现象，说明如果要将这一激酶作为治疗靶点，可能需要考虑种属的特异性<sup>[38]</sup>。

## 8. Ca<sup>2+</sup>/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (CaMK II)

CaMK II是一种多功能且广泛存在的丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶，它参与心律失常和结构性心脏病的发生<sup>[39]</sup>。如前文所述，调节钙信号通路的蛋白激酶，如Rho激酶和PKC代表了治疗心血管疾病的新靶点。ROCK和PKC位于体内钙平衡调节的上游，而CaMK II代表的是下游靶点，能够反过来使大量底物磷酸化。它在交感神经过度兴奋时由 $\beta$ 肾上腺素激活。在正常的交感神经反应不被阻断时，抑制CaMK II的活性是有益的。在心肌细胞中，通过表达一种CaMK II小肽抑制剂AC3-I来抑制CaMK II或者使用了CaMK II抑制剂KN-93的小鼠，都能够减轻MI和长期 $\beta$ 肾上腺素刺激引起的心肌肥厚和收缩功能损害的症状。然而，AC3-I转基因小鼠保留了正常的基础功能和急性 $\beta$ 肾上腺素受体反应。CaMK II活性和表达在心脏心率不齐时都有增加。并且，心脏中过表达CaMK II会导致心肌肥厚和功能损伤，而抑制其表达可以减少心律不齐的发生。最近，有报道称CaMK II能够调节AV结节传导。在CaMK II被抑制的基因模型中发现，CaMK II的活性是保持正常的AV结节传导所必须的，抑制它会使通过AV结节的传导减慢。CaMK II作为治疗靶点在心肌功能障碍和心率不齐方面的作用研究近年来多有报道<sup>[39-41]</sup>。

## 9. 哺乳动物雷帕霉素靶 (mTOR)

mTOR也是一种丝氨酸-苏氨酸激酶，它被生长因子、ATP、低氧感受器及调节细胞生长和分裂的因子激活。几种心肌肥大的信号通路，如PI3K和ERK1/2都位于mTOR的上游。在动物模型中，雷帕霉素抑制mTOR能够减轻压力过负荷所致的心肌肥大甚至可以使已经肥大的心脏复原。这一靶标主要被用于治疗冠脉再狭窄<sup>[43]</sup>，通过采用支架灌输雷帕霉素，来抑制mTOR对血管平滑肌的增殖效应。雷帕霉素还可以增加组织因子(TF)的表达，TF对于血栓症的发生具有重要影响。然而，在另一项研究中发现，虽然在人的平滑肌细胞中抑制mTOR之后增加了TF蛋白的表达，但TF的活性没有提高，说明采用雷帕霉素洗脱支架具有一定的安全性。新的研究又发现了雷帕霉素抑制mTOR能够减轻缺血再灌注造成的心脏损伤<sup>[44]</sup>。雷帕霉素预处理过的小鼠心脏经过缺血再灌注后，梗塞面积减少、心肌细胞存活率提高，说明雷帕霉素对心肌具有一定的保护作用。

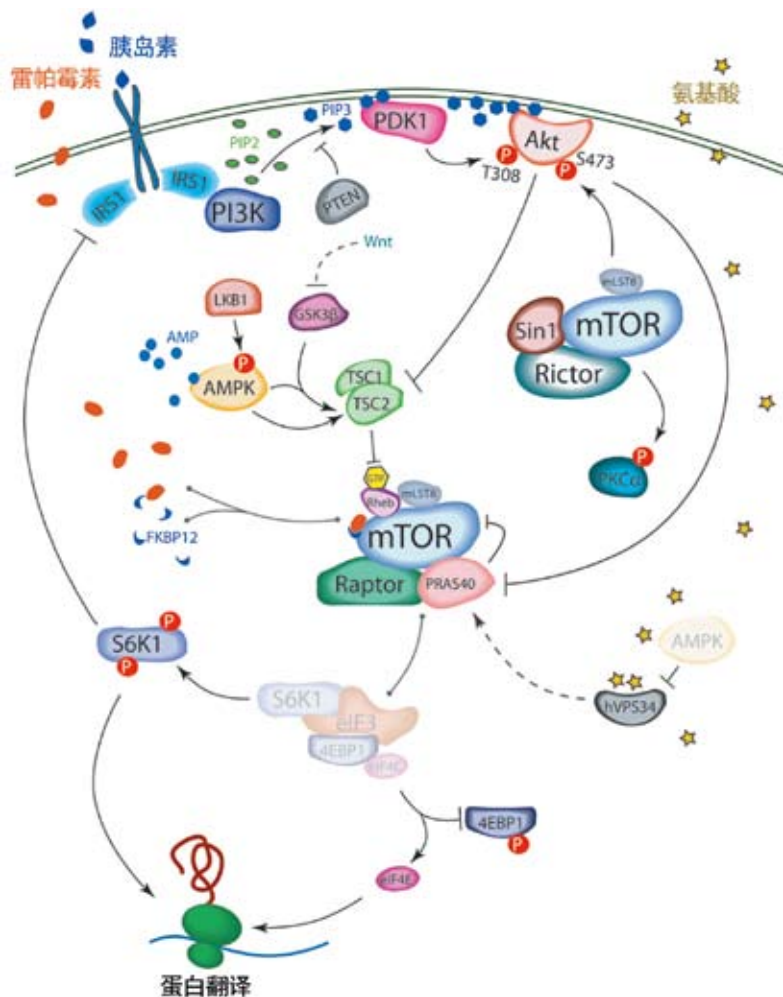


图9 哺乳动物细胞中的mTOR信号网络系统。mTORC1（即雷帕霉素敏感复合物），由mTOR、Raptor、mLST8和PRAS40组成。TSC1/2-Rheb是mTORC1主要的上游调节因子。经由TSC1/2-Rheb信号轴，mTORC1整合了细胞能级，生长因子和Wnt信号，通过磷酸化S6K1和4EBP1，来调节蛋白质翻译过程。磷酸化了的S6K1抑制IRS1功能，继而减弱胰岛素/PI3K信号传导。hVPS34已被报道能够感应mTORC1的有效性。mTORC2亚基包括mTOR、Rictor、Sin1和mLST8。mTORC2通过调节PKC和Akt控制细胞的结构和生存。mTORC2的上游调节尚未研究清楚。图中箭头表示“激活”，短横线表示“抑制”，虚线表示“结合”。  
图片来源：Cell Research

## 四、几种蛋白激酶抑制剂在治疗心血管疾病方面的开发与应用

### 1. 调控Rho激酶的药物

Rho激酶参与多种心血管疾病的发病过程，抑制Rho激酶能够逆转相应的病理过程，因此，Rho激酶抑制剂的研制和开发对于诸多心血管病的防治具有重要的战略意义。其中研究较多的是Fasudil和Y27632。前者已经作为“世界首创的蛋白激酶抑制剂”于1999年在日本上市，用于治疗脑出血后的血管痉挛。Fasudil给药后迅速分配到各组织内，半衰期大鼠为1h，猴约114h。给药后24h内，67%的药物以原形药或异喹啉的氢

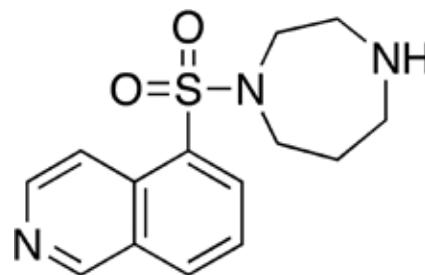


图10 Rho激酶抑制剂Fasudil的化学结构式。  
图片来源：<http://en.wikipedia.org/wiki/Fasudil>