

DOI: 10.13376/j.cblls/2015041

文章编号: 1004-0374(2015)03-0306-10



王韵, 北京大学基础医学院副院长, 神经科学研究所副所长, 神经生物学系副主任、教授、博士生导师, 北京大学麦戈文脑科学研究所课题组长, 国家杰出青年基金获得者, 教育部长江特聘教授。兼任中国生理学会副理事长及秘书长, 国际神经肽协会中国分会秘书长, 中国神经科学学会理事, 教育部基础医学指导委员会及中华医学会基础医学分会秘书长, 北京神经科学学会副理事长。系列文章发表在神经科学国际专业杂志上, 获国家发明专利3项。曾获教育部高校优秀青年教师称号及奖励基金、全国优秀科学技术工作者、张香桐神经科学青年科学家奖、北京市“教育先锋”先进个人及北京市高等教育教学名师等荣誉称号。课题组研究方向是神经系统细胞信号转导通路的研究, 重点集中两个方面。一是痛与痛觉调制的细胞信号转导通路: 旨在病理性疼痛模型上, 研究外周和中枢神经元发生的可塑性变化及其与痛感受与痛情绪的关系, 并围绕细胞信号转导的核心分子——蛋白激酶, 深入探讨慢性痛产生相关的信号通路, 以期发现新的镇痛靶点或镇痛药物, 为解决临床镇痛问题提供新思路。另一个是神经发育和损伤修复机制: 旨在探讨参与神经元极性建立、迁移、树突发育、突触形成和修剪等神经发育过程, 以及外周神经损伤后修复(与发育过程享有一些共同的分子机制)和神经元缺血损伤/抗损伤过程的关键分子, 旨在阐明先天性神经发育疾病和后天性神经损伤如机械、缺血损伤等过程的病理机制, 找到其中的关键分子, 设计可能的干预策略, 从而为一些临床常见神经精神疾病的治疗提出新方法。

蛋白激酶与神经系统功能调控

曹 帅¹, 王 韵^{1,2*}

(1 北京大学基础医学院神经生物学系, 北京大学神经科学研究所, 教育部/卫生计生委重点实验室, 北京 100191; 2 北京大学麦戈文脑研究所, 北京 100871)

摘 要: 翻译后的磷酸化修饰是蛋白质结构和功能的重要调节方式。催化蛋白质磷酸化过程的蛋白激酶广泛参与神经发育、感觉、学习记忆、情绪与认知等生理过程及神经退行性疾病、慢性疼痛及精神疾病等病理生理过程, 是生命科学领域的研究热点。现将举例说明蛋白激酶在神经系统内的重要作用, 并介绍以蛋白激酶为靶点的药物开发现况。

关键词: 神经系统; 蛋白激酶; Cdk5; PKD1; LIMK

中图分类号: Q42; Q555 **文献标志码:** A

Protein kinases and the functional regulation in the nervous system: a review of illustration with examples

CAO Shuai¹, WANG Yun^{1,2*}

收稿日期: 2015-01-17

基金项目: 国家自然科学基金杰出青年基金项目(30925015); 国家自然科学基金重点项目(30830044); 国家自然科学基金中加合作基金项目(91332119); 国家重点基础研究发展计划(“973”项目)(2014CB542204)

*通信作者: E-mail: wangy66@bjmu.edu.cn

(1 Key Laboratory for Neuroscience of Ministry of Education and Health, Neuroscience Research Institute and Department of Neurobiology, Peking University, Beijing 100191, China; 2 PKU-IDG/McGovern Institute for Brain Research, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract: Post-translational phosphorylation modification plays vital roles in modulating protein structure and function. Protein kinases, which catalyze the phosphorylation reaction of substrate protein, take part in most physiological neural processes such as sensory perception, learning and memory, emotion and cognition. Dysfunction of protein kinases leads to pathophysiological events, such as neurodegenerative disorders, chronic pain and psychiatric disorders. Examples would be taken to interpret how the kinases work in the nervous system, based on which kinase-targeted drugs are to be developed or under clinical trials for their clinical effects.

Key words: nervous system; protein kinases; Cdk5; PKD1; LIMK

1 蛋白质的磷酸化修饰与蛋白激酶

1.1 磷酸化修饰及其生物学意义

蛋白质的翻译后修饰 (post-translational modification) 是前体蛋白质在翻译后, 经过剪切、折叠或化学修饰而成为具有完整结构和特定功能的成熟蛋白质的过程。其中, 蛋白质的磷酸化 (phosphorylation) 与去磷酸化 (dephosphorylation) 修饰使生物体在细胞与分子水平实现对蛋白质构象及功能的调控, 在生物体生理与病理过程中普遍存在, 尤其在细胞信号转导中发挥重要作用。在细胞内, 蛋白质磷酸化与去磷酸化过程分别由蛋白激酶 (protein kinases) 和蛋白磷酸酶 (protein phosphatase) 催化。因此, 蛋白激酶和蛋白磷酸酶的底物类型、含量、分布、功能活性、调控方式与效应方式等作为细胞与分子水平稳态 (homeostasis) 的重要内容, 一直是生命科学研究的热点。

1.2 蛋白激酶的分类及功能

蛋白激酶, 即蛋白质磷酸转移酶 (protein phosphotransferase), 或称蛋白质磷酸化酶 (protein phosphokinase), 可以催化 ATP 或 GTP γ 位磷酸基转移至底物蛋白质特定氨基酸残基的化学过程。根据国际生物化学与分子生物学联盟命名委员会 (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, NC-IUBMB) 提出的酶类命名法 (Enzyme Nomenclature, <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>), 蛋白激酶包含于 EC 2.7 (Enzyme Commission, 酶学委员会)。按照底物氨基酸残基的不同, 蛋白激酶可分类为酪氨酸激酶 EC 2.7.10 (其中包括受体型酪氨酸激酶 EC 2.7.10.1 和非特异型酪氨酸激酶 EC 2.7.10.2)、丝苏氨酸激酶 EC 2.7.11、双重底物激酶 EC 2.7.12、

组氨酸激酶 EC 2.7.13、精氨酸激酶 EC 2.7.14 以及其他蛋白激酶 EC 2.7.99 (表 1)。

2 蛋白激酶在神经系统中的作用研究

已有大量研究证实了不同蛋白激酶在神经系统多种重要生理功能中的关键地位。在神经系统正常生理过程中, 蛋白激酶常与其上游信号和下游底物形成对细胞内物质和细胞活动的复杂调节网络, 而其本身则是网络的关键节点, 如在学习与记忆中, 钙信号引起的多种蛋白激酶协同作用, 共同引发了即时和长期的突触功能增强^[1]。由 NMDA 受体 (*N*-methyl-*D*-aspartic acid receptor, NMDAR) 介导而通过突触后膜的钙离子至少引起了 4 种关键的后续蛋白激酶反应, 按照时间顺序划分如下。(1) 位于树突的钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase, CaMK II) 发生自磷酸化并磷酸化 AMPA 受体 (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid receptor, AMPAR), 促进 AMPA 受体转运至细胞膜发挥功能, 并促进膜上的 AMPA 受体更易于通道开放, 形成了即时的突触功能增强。(2) PKM ζ 是一种脑内表达的持续激活的非典型蛋白激酶 C (cAMP-dependent protein kinase C, PKC)。在钙离子内流后, 包括 CaMK II 在内的多种激酶激活使 PKM ζ 翻译合成增加, 通过其激酶活性提高细胞膜上的 AMPA 受体数量, 维持了即时的突触功能增强, 但这一过程是否是长时程增强 (long-time potentiation, LTP) 的必要条件存在争议^[2-4]。(3) 钙离子内流通过激活钙离子依赖的腺苷酸环化酶 (adenylyl cyclase, AC) 提高了细胞内 cAMP 水平, 激活蛋白激酶 A (cAMP-dependent protein kinase A, PKA) 与细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK),

表1 蛋白激酶的酶学命名法

命名与分类	子分类系统
EC 2.7.10 酪氨酸激酶	EC 2.7.10.1 receptor protein-tyrosine kinase
	EC 2.7.10.2 non-specific protein-tyrosine kinase
EC 2.7.11 丝苏氨酸激酶	EC 2.7.11.1 non-specific serine/threonine protein kinase
	EC 2.7.11.2 [pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)] kinase
	EC 2.7.11.3 dephospho-[reductase kinase] kinase
	EC 2.7.11.4 [3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase (acetyl-transferring)] kinase
	EC 2.7.11.5 [isocitrate dehydrogenase (NADP ⁺)] kinase
	EC 2.7.11.6 [tyrosine 3-monooxygenase] kinase
	EC 2.7.11.7 myosin-heavy-chain kinase
	EC 2.7.11.8 Fas-activated serine/threonine kinase
	EC 2.7.11.9 Goodpasture-antigen-binding protein kinase
	EC 2.7.11.10 IκB kinase
	EC 2.7.11.11 cAMP-dependent protein kinase
	EC 2.7.11.12 cGMP-dependent protein kinase
	EC 2.7.11.13 protein kinase C
	EC 2.7.11.14 rhodopsin kinase
	EC 2.7.11.15 β-adrenergic-receptor kinase
	EC 2.7.11.16 G-protein-coupled receptor kinase
	EC 2.7.11.17 Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase
	EC 2.7.11.18 myosin-light-chain kinase
	EC 2.7.11.19 phosphorylase kinase
	EC 2.7.11.20 elongation factor 2 kinase
	EC 2.7.11.21 polo kinase
	EC 2.7.11.22 cyclin-dependent kinase
	EC 2.7.11.23 [RNA-polymerase]-subunit kinase
EC 2.7.11.24 mitogen-activated protein kinase	
EC 2.7.11.25 mitogen-activated protein kinase kinase kinase	
EC 2.7.11.26 tau-protein kinase	
EC 2.7.11.27 [acetyl-CoA carboxylase] kinase	
EC 2.7.11.28 tropomyosin kinase	
EC 2.7.11.29 low-density-lipoprotein receptor kinase	
EC 2.7.11.30 receptor protein serine/threonine kinase	
EC 2.7.11.31 [hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (NADPH)] kinase	
EC 2.7.11.32 [pyruvate, phosphate dikinase] kinase	
EC 2.7.11.33 [pyruvate, water dikinase] kinase	
EC 2.7.12 双重激酶	EC 2.7.12.1 dual-specificity kinase
	EC 2.7.12.2 mitogen-activated protein kinase kinase
EC 2.7.13 组氨酸激酶	EC 2.7.13.1 protein-histidine pros-kinase
	EC 2.7.13.2 protein-histidine tele-kinase
	EC 2.7.13.3 histidine kinase
EC 2.7.14 精氨酸激酶	EC 2.7.14.1 protein arginine kinase
EC 2.7.99 其他蛋白激酶	EC 2.7.99.1 triphosphate—protein phosphotransferase

注：酶学分类及命名信息来自<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>

通过磷酸化环磷腺苷效应元件结合蛋白 (cAMP-response element binding protein, CREB) 实现对细胞核内基因转录的调控，最终形成 LTP，并产生相

应的长期记忆行为表现。

神经系统迥异于生物体其他系统。某些蛋白激酶在神经系统内特异性表达或显示独特功能。本课

题组长期关注的细胞周期依赖性蛋白激酶 5 (cyclin-dependent kinase 5, Cdk5)、蛋白激酶 D1 (protein kinase D1, PKD1) 和 LIM 序列蛋白激酶 (LIM motif-containing protein kinases, LIMK) 均为在神经系统中发挥重要作用的蛋白激酶。接下来以它们为例, 分别从外周与中枢神经系统、生理状态与病理生理状态、不同的神经功能与行为表现、不同的底物类型与不同的作用方式等维度, 阐述蛋白激酶在神经系统中发挥的作用。

2.1 Cdk5在神经系统中的作用研究

Cdk5 是细胞周期依赖性蛋白激酶家族 (cyclin-dependent kinases, Cdk5; EC 2.7.11.22) 的成员, 其分子结构与其他家族成员类似, 但并不直接参与细胞周期的调控^[5]。Cdk5 在单体状态下无激酶活性, 与激活因子 p35/p25 或 p39/p29 结合而激活, 其激活因子分布于神经系统细胞不同的亚细胞结构, 故 Cdk5 主要于神经系统中发挥作用^[6-8], 其激酶活性异常造成严重的中枢和外周神经系统病变。Cdk5 激活子由 p35/p39 病理剪切为半衰期更长的 p25/p29, 进而持续激活 Cdk5, 这是其激酶活性异常的主要原因之一, 而 p35 的 N 端剪切物 p10 可能保护 Cdk5 免于病理性激活^[9]。

在中枢神经系统中, 大量研究显示, Cdk5 参与调控神经发育、突触发育, 维持突触稳定性与神经元兴奋性, 其功能的实现主要通过对突触前囊泡转运、突触后膜受体分布、细胞骨架蛋白、神经递质合成过程中的酶活性及细胞周期关键蛋白活性等细胞事件的调控实现^[10-11]。Cdk5 的激酶活性异常见于阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD)、肌萎缩性脊髓侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS)、帕金森氏病 (Parkinson's disease, PD) 和朊病毒相关脑病 (prion-related encephalopathies, PRE) 等多种神经系统退行性疾病^[12]。2011 年, Su 和 Tsai^[11] 虽然总结了 Cdk5 在神经系统中已知的底物、磷酸化位点与相应的功能, 然而近几年关于 Cdk5 对神经系统功能的研究方兴未艾。一方面, 在原有的学习记忆^[13-14]、神经发育与突触功能^[15-22] 等方面的研究显示, Cdk5 通过对不同底物的磷酸化修饰几乎参与了神经元从开始发育到成熟以及突触从形成到功能调控的方方面面; 另一方面, Cdk5 在神经系统其他功能中发挥的作用也受到关注。Bai 等^[23] 报道 Cdk5 通过磷酸化内耳细胞 BK 通道 Slo 亚基调控听觉; Kwak 等^[24] 报道 Cdk5 通过磷酸化 CLOCK

蛋白参与生物节律的调节; Cdk5 也通过磷酸化 HDAC 复合物、MEF2D、p19INK4d、RKIP 等蛋白调控生理与病理状态下细胞凋亡、自噬或细胞保护, 决定细胞命运^[25-28]。近来研究提示 Cdk5 也参与成瘾 (addiction)、精神分裂症 (schizophrenia) 及重度抑郁症 (major depressive disorder, MDD) 等精神疾病的发病^[29-33]。

另有研究关注外周神经系统 Cdk5 在伤害性信息感受过程中的作用。Pareek 等^[34] 提出 Cdk5 通过直接磷酸化瞬时感受器电位 V1 通道 (transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1) 调控痛觉感受信号的传入。本课题组则探讨了 Cdk5 在痛觉敏化中是否发挥关键作用: 在炎症痛动物模型上, 证明外周背根神经节 (DRG) 和中枢脊髓背角 Cdk5 激活通过不同机制参与热痛觉敏化^[35]。进一步的研究发现, Cdk5 通过磷酸化驱动蛋白家族成员 13B (kinesin-3 family member 13B, KIF13B) 上的 Thr506 促进 TRPV1 受体的高尔基体后运输, 增加受体在膜上的表达, 进而参与痛觉敏化。干扰 Cdk5 对 KIF13B 的磷酸化则减少 TRPV1 受体在细胞膜的表达, 降低受体功能, 动物的痛行为显著缓解^[36]。Prochazkova 等^[37] 在面部机械痛敏的动物模型也证明了 Cdk5 激酶活性的重要作用。

针对 Cdk5 的研究也具有积极的转化医学意义。例如, 吗啡与 μ 受体 (mu opioid receptor, MOR) 结合激活内源性阿片系统, 是其发挥镇痛作用的主要方式, 而临床上面临吗啡耐受 (morphine tolerance) 困境。 δ 受体 (delta opioid receptor, DOR) 基因敲除的小鼠吗啡耐受消失^[38], 提示耐受形成可能与 MOR-DOR 二聚体的形成有关^[39]。Pareek 和 Kulkarni^[40] 提出了 Cdk5 与 p35 参与吗啡耐受形成的可能性。本课题组则通过体外实验和在体实验证明 Cdk5 可以与 DOR 结合并磷酸化 DOR 第二胞内环 161 位苏氨酸, 抑制 Cdk5 活性可以降低 DOR 的膜表达并干扰其功能。进一步研究表明, Cdk5 的酶活性与 DOR 161 位苏氨酸的磷酸化为细胞膜表达 DOR, 形成 MOR-DOR 异源二聚体所必需, 也是形成吗啡耐受的必要条件。根据以上研究结果, 通过设计构建含有穿膜肽段和 DOR 第二胞内环的融合多肽 Tat-DOR-2L, 以尝试该磷酸化位点是否具有潜在的药理学应用。融合多肽可以与 DOR 胞内第二环竞争性结合 Cdk5, 从而抑制 DOR 161 位苏氨酸的磷酸化。蛛网膜下腔注射 Tat-DOR-2L 可以

干扰 DRG 神经元的 DOR 的膜表达和 MOR-DOR 异源二聚体的形成, 延迟急性和慢性吗啡耐受的形成^[41]。后续的研究显示, 在炎症痛模型大鼠 DRG 神经元, 161 位点磷酸化 DOR 表达升高, 蛛网膜下腔给予 Tat-DOR-2L 可以增强痛觉敏化并延迟吗啡耐受的形成^[42], 提示镇痛药物吗啡与干扰耐受的多肽联合用药的潜在可能性。

2.2 PKD1在神经系统中的作用研究

蛋白激酶 PKD 家族属于丝苏氨酸激酶中的 CaMK 激酶 (EC 2.7.11.17), 已知有 PKD1、PKD2 及 PKD3 三种亚型。PKD1 也称 PKC μ , 其分子由多个结构域构成, 其中丝 / 苏氨酸激酶催化结构域是其功能结构域, 而两个锌指结构域 (zinc-finger domain) C1A 与 C1B, 以及 PH 结构域是可以抑制 PKD1 催化功能的调节结构域^[43]。PKD1 可以由多种方式激活, 包括活化环被直接磷酸化^[44-46]、由 G $\beta\gamma$ 亚基直接激活^[47-48] 以及由细胞凋亡蛋白酶 caspase 切割抑制性调节结构域^[49] 等。

已有文献报道 PKD1 参与神经元发育、联合性学习、痛觉敏化、药物成瘾及氧化应激后的神经保护等神经系统生理及病理生理功能^[50-54], 提示 PKD1 功能多样。在细胞内的定位提示相应的功能可能性, 不同信号转导通路及自身调节亚基的调控转运并定位至细胞核内、细胞膜附近或高尔基体上, 也有文献报道其分布于胞浆和线粒体膜上^[43]。

PKD1 定位于高尔基体往往发挥其对于细胞内的蛋白转运、细胞骨架的调控作用^[55-59]。在神经发育过程中, 定向的蛋白转运可能与神经元极性的形成关系密切。2008 年, 本课题组首次报道在神经元极性的确立和维持中, PKD1 不可或缺, 其功能并非通过调控细胞骨架实现, 而是通过定位于高尔基体实现的^[60]。

PKD1 定位于细胞膜附近对于膜蛋白, 尤其是对于膜通道和膜受体的调控, 体现在神经系统多种功能中。在伤害性感受方面, 本课题组发现 DRG 神经元中的 PKD1 可以定位于细胞膜, 通过结合伤害性信息整合器 TRPV1 并磷酸化其 116 位丝氨酸, 调控 TRPV1 对于其激动剂 capsaicin 的响应, 参与热痛觉敏化的形成^[61-62]。在精神药理学方面, 中脑多巴胺受体 D1 (dopamine receptor D1, D1R) 是奖赏系统以及药物成瘾、抑郁症等神经精神领域的关注热点^[63], D1R 的激活是可卡因 (cocaine) 产生多种细胞和行为水平的效应的必要条件^[64-66]。本课题

组研究发现, 急性可卡因暴露可引起大鼠纹状体蛋白激酶 PKD1 活性升高; 如果敲减 PKD1 表达, 则可以降低可卡因诱导的高运动活性, 其机制与 PKD1 直接磷酸化 D1 受体 421 位氨基酸, 并且促进 D1 受体的膜定位, 增强下游 ERK 通路的激活有关^[67]。根据上述研究结果, 进一步构建了 Tat-S421 干扰肽, 对大鼠背侧纹状体注射该干扰肽, 可显著抑制可卡因诱导的高运动活性; 如果将其注射到大鼠海马或伏隔核壳部, 还可以抑制可卡因诱导的条件性位置偏爱的形成, 而不影响大鼠的学习记忆能力; 并且, 在伏隔核壳部注射 Tat-S421 肽自身并不能形成条件性位置偏爱, 提示 Tat-S421 减轻可卡因成瘾的作用并非依赖于其毒品“替代”作用。这些研究提示, 靶向 D1 受体的 421 位氨基酸可能是治疗药物成瘾或其他与多巴胺失衡相关疾病的一种新策略。

另有在多巴胺能神经元进行的研究发现, 在氧化应激状态下, 氧化剂引发 PKD1 活化环磷酸化, 使 PKD1 迅速进入细胞核, 通过底物作用调控基因表达, 产生神经保护作用^[51,53]。这些研究也提示 PKD1 功能缺失可能在 PD 的发病中出现。类似地, 在缺血性脑损伤中, Stetler 等^[52] 也报道了 PKD1 可以通过磷酸化热休克蛋白 27 (heat shock protein 27, HSP27) 发挥神经保护作用。

2.3 LIMK在神经系统中的作用研究

LIMK 蛋白激酶家族属于双重激酶 EC 2.7.12, 目前包括 LIMK1 和 LIMK2 两个成员。两者广泛表达于各种组织细胞, 但在组织中的分布和细胞内的定位并不相同, 提示功能存在差异^[68-69]。除了 C 端的激酶结构域及与其连接的 PZD 结构域, LIMK 还含有 2 个 LIM 结构域, 并因此得名。LIMK 与很多大分子存在结合或相互作用, 如 Rho/ROCK1-2、PKA、PKC 及 SSH 等, 但其已知底物仅有肌动蛋白解聚因子 (actin depolymerizing factor, ADF)/cofilin 系统, 通过磷酸化 cofilin 抑制其对 actin 的剪切, 故其功能研究主要围绕 LIMK 对细胞骨架的调控展开^[70-71]。

在神经系统中, LIMK 对神经元细胞骨架的调控对于神经元的分化、极性、突起形成、运动、迁移及凋亡具有重要作用; 对突触而言, 维持突触的正常形态和功能以及形成 LTP 也离不开骨架蛋白的支持^[72-73]。LIMK1 基因敲除小鼠表现出空间学习记忆能力差、LTP 改变、海马树突结构异常等功能和

形态表型^[72], 其对于突触的影响与 Rho 家族小分子 GTP 酶有关^[73]。

突触可塑性变化被认为参与痛觉敏化形成, 而痛觉敏化形成过程中的关键蛋白 PKA、PKC ϵ 及 ERK1/2 等均能够与细胞骨架元件存在相互作用^[74-79], 所以 LIMK 对于痛觉敏化及其相应的突触可塑性增强可能存在潜在影响。Li 等^[80] 研究表明, 在炎症痛模型中, DRG 神经元中 LIMK1 和 LIMK2 蛋白含量迅速上升, 而死酶活性的 LIMK 和 LIMK shRNA 可以减弱炎症引起的痛觉敏化, 提示 LIMK 参与形成了炎症痛敏。进一步研究显示, LIMK 通过对 cofilin 3 位丝氨酸的磷酸化, 改变了细胞内的肌动蛋白动态, 可能通过改变多种相关蛋白激酶的空间分布而促进了痛觉敏化的形成。其中一个可能的机制是, 伤害性刺激敏感的 TRPV1 是 LIMK-cofilin 信号的一个潜在下游效应器。TRPV1 的丝氨酸磷酸化水平在炎症痛后上升, 促进痛觉敏化的形成, 而 LIMK 对 cofilin 的磷酸化可以抑制细胞骨架蛋白剪切, 为 TRPV1 提供支撑。

3 以神经系统蛋白激酶为靶点的药物设计

前面述及蛋白激酶含量及功能异常在许多病理及病理生理过程中扮演重要角色。随着单克隆抗体制备技术、小分子抑制剂或激动剂筛选技术日益成熟以及核酸药物及多肽药物蓬勃发展, 以特定蛋白

激酶或特定其上下游分子为靶点的治疗药物成为药物研发的主要内容之一。蛋白激酶靶向药物设计符合个性化临床医疗的要求, 配合易感基因筛查手段可以获得良好疗效。目前, 蛋白激酶靶向的药物已成为临床上治疗肿瘤的重要手段, 这激励着其他领域研发蛋白激酶靶向药物^[81]。

有效治疗中枢神经系统疾病的药物一直有着庞大的市场需求。已有大量研究揭示了多个神经病理过程中异常的蛋白激酶作用机制及相应的潜在药物作用位点。Rask-Andersen 等^[82] 总结了目前已经经过 FDA 批准以及尚在临床试验中的蛋白激酶药物, 其中针对神经系统疾病的药物数目较少(表 2), 因为中枢神经系统的药物研发面临血脑屏障 (brain blood barrier, BBB)、肝细胞色素系统 P450, 以及小分子药物本身对靶点的亲和性和选择性等诸多挑战^[83]。近些年来, 系统生物学与蛋白质组学方兴未艾, 建立健全数据库, 充分利用组学技术将为药物研发提供便利。而基础医学进一步了解疾病规律、揭示疾病微观本质, 是开发有效药物的根本动力。

作为中枢神经系统疾病中的热点, AD 和 PD 受到广泛关注, 对其病理本质的揭示已经为研发临床药物提供雄厚基础。例如, Hooper 等^[84] 研究表明, 在 AD 患者前额叶皮层 (prefrontal cortex, PFC) 以及海马 (hippocampus, HP) 中, 糖原合成酶激酶 3 (glycogen synthase kinase 3, GSK3) 的表达量升高,

表2 神经系统蛋白激酶靶向药物

药物名称	药物类型	靶点蛋白激酶	适应症	研究阶段
Bevacizumab(Avastin®)	单克隆抗体	VEGF	GM	FDA批准上市(2004)
Masitinib	抑制剂	CSF-1/PDGF受体家族, Src家族	AD	III期临床研究
Talmapimod Losmapimod(BIRB796)	抑制剂	MAPK家族	NP	III期临床研究
PH-797804	抑制剂	MAPK家族	NP	II期临床研究
Artemin(BG00010)	重组GDNF	RET	神经病变	II期临床研究
Fasudil、INS117548、AR-12286	抑制剂	AGC家族	ALS、CV	临床试验
Tideglusib、DM-99	抑制剂	GSK3家族	AD	临床试验
MK-1775(AZD1775)	抑制剂	Wee1家族	GM	临床试验
CEP-1347	抑制剂	MAPK家族	PD	临床试验

注: AD(Alzheimer's disease), 阿尔茨海默病; AGC(PKA/ PKG/ PKC), 蛋白激酶A/G/C; ALS(amyotrophic lateral sclerosis), 脊髓侧索硬化症; CSF-1/PDGF (colony-stimulating factor/ platelet-derived growth factor), 集落刺激因子-1/血小板衍生活因子; CV(cerebral vasospasm), 脑血管痉挛; FDA(Food and Drug Administration), 美国食品药品监督管理局; GDNF(glioblastoma multiforme), 胶质细胞源性神经营养因子; GM(glioblastoma multiforme), 多形性成胶质细胞瘤; GSK3(glycogen synthase kinase 3), 糖原合成酶激酶3; MAPK(mitogen-activated protein kinase), 丝裂原活化蛋白激酶; NP(neuropathic pain), 神经病理痛; PD(Parkinson's disease), 帕金森氏病; RET(proto-oncogene tyrosine-protein kinase receptor Ret), 原癌基因酪氨酸蛋白激酶受体Ret; VEGF(vascular endothelial growth factor), 血管内皮生长因子

而且 GSK3 可以通过磷酸化 AD 关键蛋白 Tau 引发神经纤维缠结, 影响学习记忆功能。针对 GSK3 的阻断剂 Tideglusib 已经进入 II 期临床研究^[85]。在 PD 患者中, 已有全基因组相关性研究显示 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 可能是疾病进程中产生病理变化的潜在节点^[86]。针对其上激活因子混合连接激酶 1~3 (mixed lineage kinases 1~3, MLK1~3) 的抑制剂 CEP-1347 已进入 II 期临床研究^[87]。遗憾的是, 上述药物尚未报告优于安慰剂的效果^[85,87]。

在外周神经系统中, 镇痛药物是主要的药物研发方向之一。然而, 针对 PKC 的多肽 KAI-1678 的效果并未优于对照组^[88-89], 针对 NGF 的单克隆抗体安全性受到质疑^[90]。现有进入临床研究的药物除了 MAPK 家族抑制剂以外, 还有 RET 受体激酶内源配体 artemin, 后者作用于仅在外周神经元中表达的 GFRA3-RET 复合物, 改善了胶质细胞源性神经营养因子 (glial cell derived neurotrophic factor, GDNF) 作为镇痛药物的副作用^[82]。

4 总结与展望

虽然蛋白激酶一直是生命科学的研究热点, 但是神经系统内蛋白激酶的作用研究远远不够。通过已知的蛋白激酶研究实例发现, 蛋白激酶在神经系统的中枢和外周均有广泛作用, 其磷酸化位点涵盖蛋白激酶的已知分类, 作用方式既有与其他领域蛋白激酶共有的调控信号转导、调控配体-受体作用等, 也包含在神经系统内尤为重要的调控细胞骨架与离子通道等。充分结合原有技术路线与蛋白质组学等新型技术, 深入挖掘蛋白激酶在神经系统内的广泛作用, 为神经系统药物研发打好基础是生命科学领域的当务之急。神经领域将成为个性化医疗、转化医学等医学概念发挥作用的新舞台, 而神经领域的蛋白激酶研究将书写分子医学的新篇章。

[参 考 文 献]

- [1] Mayford M. Protein kinase signaling in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol*, 2007, 17: 313-7
- [2] Ling DS, Benardo LS, Serrano PA, et al. Protein kinase mzeptin is necessary and sufficient for Ltp maintenance. *Nat Neurosci*, 2002, 5: 295-6
- [3] Shema R, Haramati S, Ron S, et al. Enhancement of consolidated long-term memory by overexpression of protein kinase mzeptin in the neocortex. *Science*, 2011, 331: 1207-10
- [4] Volk LJ, Bachman JL, Johnson R, et al. Pkm-Zeta is not required for hippocampal synaptic plasticity, learning and memory. *Nature*, 2013, 493: 420-3
- [5] Dhariwala FA, Rajadhyaksha MS. An unusual member of the Cdk family: Cdk5. *Cell Mol Neurobiol*, 2008, 28: 351-69
- [6] Lew J, Huang QQ, Qi Z, et al. A brain-specific activator of cyclin dependent kinase 5. *Nature*, 1994, 371: 423-6
- [7] Tsai LH, Delalle I, Caviness VS, et al. P35 is a neural-specific regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5. *Nature*, 1994, 371: 419-23
- [8] Hagmann H, Taniguchi Y, Pippin JW, et al. Cyclin I and P35 determine the subcellular distribution of Cdk5. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2015, 308(4): C339-47
- [9] Zhang L, Liu W, Szumlanski KK, et al. P10, the N-terminal domain of P35, protects against Cdk5/P25-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 20041-6
- [10] Kawauchi T. Cdk5 regulates multiple cellular events in neural development, function and disease. *Dev Growth Differ*, 2014, 56: 335-48
- [11] Su SC, Tsai LH. Cyclin-dependent kinases in brain development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2011, 27: 465-91
- [12] Lopes JP, Agostinho P. Cdk5: multitasking between physiological and pathological conditions. *Prog Neurobiol*, 2011, 94: 49-63
- [13] Lai KO, Wong AS, Cheung MC, et al. Trkb phosphorylation by Cdk5 is required for activity-dependent structural plasticity and spatial memory. *Nat Neurosci*, 2012, 15:1506-15
- [14] Plattner F, Hernandez A, Kistler TM, et al. Memory enhancement by targeting Cdk5 regulation of Nr2b. *Neuron*, 2014, 81: 1070-83
- [15] Kim SH, Ryan TA. Balance of calcineurin A α and Cdk5 activities sets release probability at nerve terminals. *J Neurosci*, 2013, 33: 8937-50
- [16] Rakic S, Kanatani S, Hunt D, et al. Cdk5 phosphorylation of ErbB4 is required for tangential migration of cortical interneurons. *Cereb Cortex*, 2015, 25(4): 991-1003
- [17] Worth DC, Daly CN, Geraldo S, et al. Drebrin contains a cryptic F-actin-bundling activity regulated by Cdk5 phosphorylation. *J Cell Biol*, 2013, 202: 793-806
- [18] Cho B, Cho HM, Kim HJ, et al. Cdk5-dependent inhibitory phosphorylation of Drp1 during neuronal maturation. *Exp Mol Med*, 2014, 46: e105
- [19] Duhr F, Deleris P, Raynaud F, et al. Cdk5 induces constitutive activation of 5-Ht₆ receptors to promote neurite growth. *Nat Chem Biol*, 2014, 10: 590-7
- [20] Nishimura YV, Shikanai M, Hoshino M, et al. Cdk5 and its substrates, Dcx and P27kip1, regulate cytoplasmic dilation formation and nuclear elongation in migrating neurons. *Development*, 2014, 141: 3540-50
- [21] Tang J, Ip JP, Ye T, et al. Cdk5-dependent Mst3 phosphorylation and activity regulate neuronal migration through rhoA inhibition. *J Neurosci*, 2014, 34: 7425-36
- [22] Ye T, Ip JP, Fu AK, et al. Cdk5-mediated phosphorylation of rapgef2 controls neuronal migration in the developing

- cerebral cortex. *Nat Commun*, 2014, 5: 4826
- [23] Bai JP, Surguchev A, Joshi P, et al. Cdk5 interacts with slo and affects its surface expression and kinetics through direct phosphorylation. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2012, 302: C766-80
- [24] Kwak Y, Jeong J, Lee S, et al. Cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) regulates the function of clock protein by direct phosphorylation. *J Biol Chem*, 2013, 288: 36878-89
- [25] Fu AK, Hung KW, Wong HH, et al. Cdk5 phosphorylates a component of the hdac complex and regulates histone acetylation during neuronal cell death. *Neurosignals*, 2013, 21: 55-60
- [26] Ke K, Shen J, Song Y, et al. Cdk5 contributes to neuronal apoptosis via promoting Mef2d phosphorylation in rat model of intracerebral hemorrhage. *J Mol Neurosci*, 2014 [Epub ahead of print]
- [27] Ogara MF, Belluscio LM, de la Fuente V, et al. Cdk5-mediated phosphorylation of P19ink4d avoids DNA damage-induced neurodegeneration in mouse hippocampus and prevents loss of cognitive functions. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1843: 1309-24
- [28] Wen Z, Shu Y, Gao C, et al. Cdk5-mediated phosphorylation and autophagy of rkip regulate neuronal death in Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, 2014, 35: 2870-80
- [29] Ferrer-Alcon M, La Harpe R, Guimon J, et al. Downregulation of neuronal Cdk5/P35 in opioid addicts and opiate-treated rats: Relation to neurofilament phosphorylation. *Neuropsychopharmacology*, 2003, 28: 947-55
- [30] Camp MC, Mayfield RD, McCracken M, et al. Neuroadaptations of Cdk5 in cholinergic interneurons of the nucleus accumbens and prefrontal cortex of inbred alcohol-preferring rats following voluntary alcohol drinking. *Alcohol Clin Exp Res*, 2006, 30: 1322-35
- [31] Drerup JM, Hayashi K, Cui H, et al. Attention-deficit/hyperactivity phenotype in mice lacking the cyclin-dependent kinase 5 cofactor P35. *Biol Psychiatry*, 2010, 68: 1163-71
- [32] Ramos-Miguel A, Meana JJ, Garcia-Sevilla JA. Cyclin-dependent kinase-5 and P35/P25 activators in schizophrenia and major depression prefrontal cortex: Basal contents and effects of psychotropic medications. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2013, 16: 683-9
- [33] Zhu WL, Shi HS, Wang SJ, et al. Increased Cdk5/P35 activity in the dentate gyrus mediates depressive-like behaviour in rats. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2012, 15: 795-809
- [34] Pareek TK, Keller J, Kesavapany S, et al. Cyclin-dependent kinase 5 modulates nociceptive signaling through direct phosphorylation of transient receptor potential vanilloid 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 660-5
- [35] Yang YR, He Y, Zhang Y, et al. Activation of cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) in primary sensory and dorsal horn neurons by peripheral inflammation contributes to heat hyperalgesia. *Pain*, 2007, 127: 109-20
- [36] Xing BM, Yang YR, Du JX, et al. cyclin-dependent kinase 5 controls trpv1 membrane trafficking and the heat sensitivity of nociceptors through Kif13b. *J Neurosci*, 2012, 32: 14709-21
- [37] Prochazkova M, Terse A, Amin ND, et al. Activation of cyclin-dependent kinase 5 mediates orofacial mechanical hyperalgesia. *Mol Pain*, 2013, 9: 66
- [38] Zhu Y, King MA, Schuller AG, et al. Retention of supraspinal δ -like analgesia and loss of morphine tolerance in δ opioid receptor knockout mice. *Neuron*, 1999, 24: 243-52
- [39] He SQ, Zhang ZN, Guan JS, et al. Facilitation of μ -opioid receptor activity by preventing δ pioid receptor-mediated codegradation. *Neuron*, 2011, 69: 120-31
- [40] Pareek TK, Kulkarni AB. Cdk5: a new player in pain signaling. *Cell Cycle*, 2006, 5: 585-8
- [41] Xie WY, He Y, Yang YR, et al. Disruption of Cdk5-associated phosphorylation of residue threonine-161 of the δ -opioid receptor: impaired receptor function and attenuated morphine antinociceptive tolerance. *J Neurosci*, 2009, 29: 3551-64
- [42] Chen HJ, Xie WY, Hu F, et al. Disruption of δ -opioid receptor phosphorylation at threonine 161 attenuates morphine tolerance in rats with Cfa-induced inflammatory hypersensitivity. *Neurosci Bull*, 2012, 28: 182-92
- [43] Li G, Wang Y. Protein kinase D: a new player among the signaling proteins that regulate functions in the nervous system. *Neurosci Bull*, 2014, 30: 497-504
- [44] Iglesias T, Waldron RT, Rozengurt E. Identification of *in vivo* phosphorylation sites required for protein kinase D activation. *J Biol Chem*, 1998, 273: 27662-7
- [45] Matthews SA, Rozengurt E, Cantrell D. Characterization of serine 916 as an *in vivo* autophosphorylation site for protein kinase D/protein kinase C μ . *J Biol Chem*, 1999, 274: 26543-9
- [46] Vertommen D, Rider M, Ni Y, et al. Regulation of protein kinase D by multisite phosphorylation. Identification of phosphorylation sites by mass spectrometry and characterization by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*, 2000, 275: 19567-76
- [47] Jamora C, Yamanouye N, Van Lint J, et al. G β y-mediated regulation of Golgi organization is through the direct activation of protein kinase D. *Cell*, 1999, 98: 59-68
- [48] Rey O, Sinnott-Smith J, Zhukova E, et al. Regulated nucleocytoplasmic transport of protein kinase D in response to G protein-coupled receptor activation. *J Biol Chem*, 2001, 276: 49228-35
- [49] Endo K, Oki E, Biedermann V, et al. Proteolytic cleavage and activation of protein kinase C μ by caspase-3 in the apoptotic response of cells to 1- β -D-arabinofuranosylcytosine and other genotoxic agents. *J Biol Chem*, 2000, 275: 18476-81
- [50] Doppler H, Storz P, Li J, et al. A phosphorylation state-specific antibody recognizes Hsp27, a novel substrate of protein kinase D. *J Biol Chem*, 2005, 280: 15013-9
- [51] Asaithambi A, Kanthasamy A, Saminathan H, et al. Protein kinase D1 (PKD1) activation mediates a compensatory protective response during early stages of

- oxidative stress-induced neuronal degeneration. *Mol Neurodegener*, 2011, 6: 43
- [52] Stetler RA, Gao Y, Zhang L, et al. Phosphorylation of Hsp27 by protein kinase D is essential for mediating neuroprotection against ischemic neuronal injury. *J Neurosci*, 2012, 32: 2667-82
- [53] Asaithambi A, Ay M, Jin H, et al. Protein kinase D1 (PKD1) phosphorylation promotes dopaminergic neuronal survival during 6-ohda-induced oxidative stress. *PLoS One*, 2014, 9: e96947
- [54] Fu Y, Ren M, Feng H, et al. Neuronal and intestinal protein kinase D isoforms mediate Na⁺ (salt taste)-induced learning. *Sci Signal*, 2009, 2: ra42
- [55] Fu Y, Rubin CS. Protein kinase D: coupling extracellular stimuli to the regulation of cell physiology. *EMBO Rep*, 2011, 12: 785-96
- [56] Malhotra V, Campelo F. PKD regulates membrane fission to generate TGN to cell surface transport carriers. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011, 3(2): pii:a005280
- [57] Ellwanger K, Hausser A. Physiological functions of protein kinase D *in vivo*. *IUBMB Life*, 2013, 65: 98-107
- [58] Olayioye MA, Barisic S, Hausser A. Multi-level control of actin dynamics by protein kinase D. *Cell Signal*, 2013, 25: 1739-47
- [59] Atik N, Kunii M, Avriyanti E, et al. The role of PKD in cell polarity, biosynthetic pathways, and organelle/F-actin distribution. *Cell Struct Funct*, 2014, 39: 61-77
- [60] Yin DM, Huang YH, Zhu YB, et al. Both the establishment and maintenance of neuronal polarity require the activity of protein kinase D in the Golgi apparatus. *J Neurosci*, 2008, 28: 8832-43
- [61] Wang Y, Kedei N, Wang M, et al. Interaction between protein kinase cmu and the vanilloid receptor type 1. *J Biol Chem*, 2004, 279: 53674-82
- [62] Zhu H, Yang Y, Zhang H, et al. Interaction between protein kinase D1 and transient receptor potential V1 in primary sensory neurons is involved in heat hypersensitivity. *Pain*, 2008, 137: 574-88
- [63] Beaulieu JM, Gainetdinov RR. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev*, 2011, 63:182-217
- [64] Bertran-Gonzalez J, Bosch C, Maroteaux M, et al. Opposing patterns of signaling activation indopamine D1 and D2 receptor-expressing striatal neurons in response to cocaine and haloperidol. *J Neurosci*, 2008, 28: 5671-85
- [65] Bateup HS, Santini E, Shen W, et al. Distinct subclasses of medium spiny neurons differentially regulate striatal motor behaviors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 14845-50
- [66] Xu M, Hu XT, Cooper DC, et al. Elimination of cocaine-induced hyperactivity and dopamine-mediated neurophysiological effects in dopamine D1 receptor mutant mice. *Cell*, 1994, 79: 945-55
- [67] Wang N, Su P, Zhang Y, et al. Protein kinase D1-dependent phosphorylation of dopamine D1 receptor regulates cocaine-Induced behavioral responses. *Neuropsychopharmacology*, 2014, 39: 1290-301
- [68] Foletta VC, Moussi N, Sarmiere PD, et al. Lim kinase 1, a key regulator of Actin dynamics, is widely expressed in embryonic and adult tissues. *Exp Cell Res*, 2004, 294: 392-405
- [69] Acevedo K, Moussi N, Li R, et al. Lim kinase 2 is widely expressed in all tissues. *J Histochem Cytochem*, 2006, 54: 487-501
- [70] Bernard O. Lim kinases, regulators of actin dynamics. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39: 1071-6
- [71] Manetti F. Lim kinases are attractive targets with many macromolecular partners and only a few small molecule regulators. *Med Res Rev*, 2012, 32: 968-98
- [72] Sarmiere PD, Bamburg JR. Head, neck, and spines: a role for limk-1 in the hippocampus. *Neuron*, 2002, 35: 3-5
- [73] Meng Y, Zhang Y, Tregoubou V, et al. Regulation of spine morphology and synaptic function by limk and the actin cytoskeleton. *Rev Neurosci*, 2003, 14: 233-40
- [74] Prekeris R, Hernandez RM, Mayhew MW, et al. Molecular analysis of the interactions between protein kinase C-epsilon and filamentous actin. *J Biol Chem*, 1998, 273: 26790-8
- [75] Colledge M, Scott JD. Akaps: from structure to function. *Trends Cell Biol*, 1999, 9: 216-21
- [76] Faux MC, Rollins EN, Edwards AS, et al. Mechanism of a-kinase-anchoring protein 79 (Akap79) and protein kinase C interaction. *Biochem J*, 1999, 343 Pt 2: 443-52
- [77] Fraser ID, Cong M, Kim J, et al. Assembly of an a kinase-anchoring protein-β(2)-adrenergic receptor complex facilitates receptor phosphorylation and signaling. *Curr Biol*, 2000, 10: 409-12
- [78] Gomez LL, Alam S, Smith KE, et al. Regulation of a-kinase anchoring protein 79/150-camp-dependent protein kinase postsynaptic targeting by Nmda receptor activation of calcineurin and remodeling of dendritic actin. *J Neurosci*, 2002, 22: 7027-44
- [79] Rathee PK, Distler C, Obreja O, et al. Pka/Akap/Vr-1 module: a common link of Gs-mediated signaling to thermal hyperalgesia. *J Neurosci*, 2002, 22: 4740-5
- [80] Li Y, Hu F, Chen HJ, et al. Limk-dependent actin polymerization in primary sensory neurons promotes the development of inflammatory heat hyperalgesia in rats. *Sci Signal*, 2014, 7: 1-11
- [81] Zhang J, Yang PL, Gray NS. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9: 28-39
- [82] Rask-Andersen M, Zhang J, Fabbro D, et al. Advances in kinase targeting: current clinical use and clinical trials. *Trends Pharmacol Sci*, 2014, 35: 604-20
- [83] Chico LK, Van Eldik LJ, Watterson DM. Targeting protein kinases in central nervous system disorders. *Nat Rev Drug Discov*, 2009, 8: 892-909
- [84] Hooper C, Killick R, Lovestone S. The Gsk3 hypothesis of Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 2008, 104: 1433-9
- [85] del Ser T, Steinwachs KC, Gertz HJ, et al. Treatment of Alzheimer's disease with the GSK-3 inhibitor tideglusib: A pilot study. *J Alzheimers Dis*, 2013, 33: 205-15
- [86] Wang G, Pan J, Chen SD. Kinases and kinase signaling

- pathways: potential therapeutic targets in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*, 2012, 98: 207-21
- [87] Parkinson Study Group PI. Mixed lineage kinase inhibitor Cep-1347 fails to delay disability in early Parkinson disease. *Neurology*, 2007, 69: 1480-90
- [88] Cousins MJ, Pickthorn K, Huang S, et al. The safety and efficacy of kai-1678- an inhibitor of epsilon protein kinase C (epsilonpkc)-versus lidocaine and placebo for the treatment of postherpetic neuralgia: a crossover study design. *Pain Med*, 2013, 14: 533-40
- [89] Moodie JE, Bisley EJ, Huang S, et al. A single-center, randomized, double-blind, active, and placebo-controlled study of kai-1678, a novel Pkc-epsilon inhibitor, in the treatment of acute postoperative orthopedic pain. *Pain Med*, 2013, 14: 916-24
- [90] Holmes D. Anti-Ngf painkillers back on track? *Nat Rev Drug Discov*, 2012, 11: 337-8