

DOI: 10.13376/j.cbls/2021020

文章编号: 1004-0374(2021)02-0176-08

B淋巴酪氨酸激酶的研究进展

倪佳俐¹, 侯亚义², 窦环^{2*}

(1 南京大学生命科学学院, 南京 210023; 2 南京大学医学院, 南京 210023)

摘要: B淋巴酪氨酸激酶(BLK)是SRC激酶家族成员之一, 具有酪氨酸蛋白激酶活性。BLK作为“中间分子”参与免疫细胞发育、迁移和增殖等生理过程中的信号转导; 在疾病进程中, BLK通常表现为表达量降低或激酶活性下降。因此, 对BLK的研究将有助于探索发病机制, 这对指导临床诊断和治疗具有重要意义。现对BLK的分子特点、功能及其在疾病中的作用进行综述。

关键词: B淋巴酪氨酸激酶; 酪氨酸激酶; B细胞发育; 系统性红斑狼疮

中图分类号: Q556.9; R593.24 **文献标志码:** A

Research progress on the B lymphoid tyrosine kinase

NI Jia-Li¹, HOU Ya-Yi², DOU Huan^{2*}

(1 School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210023, China;

2 Medical School of Nanjing University, Nanjing 210023, China)

Abstract: B lymphoid tyrosine kinase (BLK) is one of the SRC kinase family members, which exhibits tyrosine protein kinase activity. As an “intermediate molecule”, BLK is involved in signaling transduction of physiological processes such as cell development, cell migration and proliferation. BLK generally manifests as decreased expression or diminished activity in the course of disease progression. Research on BLK has significant implications for the study of molecular mechanisms of disease and clinical treatment. Our review highlighted the molecular characteristics, functions and its roles in diseases.

Key words: B lymphoid tyrosine kinase; tyrosine kinase; B cell development; systemic lupus erythematosus

B淋巴酪氨酸激酶(B lymphoid tyrosine kinase, BLK)是一种非受体型胞质内酪氨酸蛋白激酶, 与SRC、LYN、FYN、LCK、HCK、FGR、YES和YRK等同属于原癌基因编码的SRC激酶家族。人类BLK基因主要在B淋巴细胞系中表达, 但在T细胞系、胸腺细胞、浆细胞样树突状细胞、胰腺β细胞和巨噬细胞等中也有少量表达^[1-4]。目前研究表明, BLK作为激酶参与了免疫细胞发育、激活和效应等, 从而在自身免疫病、肿瘤等疾病中发挥了重要作用。

1 BLK的分子特征

1.1 BLK的结构

人类BLK基因位于8号染色体(8p23-p22), DNA延伸长度超过30 kb, 共编码505个氨基酸, 相

对分子量约为57.7 kDa, 包含15个外显子。BLK结构域的组成包括N端特有序列、SRC同源结构域SH3域、SH2域和激酶结构域, 它们之间通过共价键进行连接^[5]。这些结构域缺一不可, 如BLK需要以完整结构才能参与Bruton's酪氨酸激酶BTK的自磷酸化和激活^[6]。N端豆蔻酰化序列是SRC家族成员的共有独特序列, 在BLK的细胞膜定位中发挥作用, BLK前3个外显子编码的5'非翻译区和N端序列

收稿日期: 2020-07-02; 修回日期: 2020-09-22

基金项目: 江苏省六大人才高峰高层次人才项目(YY-021); 南京大学“十三五”实验教学改革研究重点课题(SY201918)

*通信作者: E-mail: douhuan@nju.edu.cn; Tel: 025-89681086

是区别于其他家族成员而特有的, 致使激酶底物特异性, 如BLK的N端特殊基序负责BCR受体复合物I α 嵌合体的识别和胞质区的磷酸化^[7]; 并且与其他家族成员N端的肉豆蔻酰-甘氨酸-半胱氨酸序列不同的是, BLK缺少棕榈酰化必需的保守半胱氨酸残基^[8]。SH3结构域位于第58~118位氨基酸, 是激酶非催化部分的保守序列, 通过识别富含脯氨酸及疏水氨基酸残基结合特定蛋白复合物。SH2结构域位于第124~220位氨基酸, 是细胞内信号级联的调控模块, 特异性识别含磷酸化酪氨酸残基的靶肽, 并与其相互作用进行信号传递, 触发相应基因表达和细胞反应, 例如BLK通过SH2-磷酸酪氨酸相互作用与I α (CD79A)、I β (CD79B)胞质域进行特异性结合^[7], 分别磷酸化Tyr188、Tyr199和Tyr196、Tyr207; BLK的SH2结构域结合PLC γ 2、MAPK和GAP等, 实现效应蛋白的磷酸化, 激活体内不同的效应分子, 作用于细胞信号转导、分化和发育等过程^[9]。激酶结构域位于第241~494位氨基酸, 是酶活性中心, 包括了第358~405位特异性底物作用域、第248~269位ATP结合域^[11]以及自身磷酸化位点(图1)。

1.2 BLK的基因多态性

BLK基因的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)与多种疾病的遗传变异相关联, 目前多发现于自身免疫性疾病。BLK风险等位基因产生的功能性变体会导致体内BLK水平下降, 影响免疫细胞耐受机制, 潜在改变了免疫应答, 增加系统性自身免疫疾病的患病风险。BLK基因共表达7个转录本, 目前已鉴定出2个由不同反式作用调控的启动子, 分别是近端启动子(P1)和B淋巴细胞特异性启动子(P2)^[10]。P1为主要启动子, 非B细胞系中P2会被随机抑制或过早终止。启动子区域SNP分布的序列中富含核转录因子NF- κ B和IRF4的结合位点, 风险等位基因也会影响启动子的核因子募集和RNA聚合酶起始转录的效率^[11], 通过改变启动子活性参与BLK转录水平的调节; 同时, 剪接变异体易失活、降解, 进一步下调BLK的表达。

1.3 BLK的激酶活性

作为SRC家族成员之一, BLK的激活方式与其他酪氨酸激酶类似, 并且受到严格调控。在正常细胞中, BLK未接受激活信号时几乎没有活性。通常, BLK是通过磷酸化和去磷酸化的方式来对其自身活性进行调节, 活性高低与酪氨酸总体的磷酸化水平呈正相关, 如第389位酪氨酸能够发生自磷酸

化激活BLK, 而位于C端的第501位酪氨酸则相反, 会通过突变和去磷酸化激活BLK^[1]。同时, 还存在一些内在促激活途径, 如非同义突变A71T将丙氨酸替换为苏氨酸, 导致形成新的磷酸化位点, 该亚型被过度磷酸化并促进激酶激活, 致使蛋白酶体降解增强, BLK的半衰期缩短^[12]; 转基因小鼠BLK(Y495F)中组成性活性BLK的表达量大幅增加, 暗示这一突变对BLK活化的促进作用^[13]。一些SRC家族多靶点抑制剂能抑制BLK磷酸化, 如马赛替尼(masitinib)选择性靶向BLK的Asp89, 并在ATP结合位点经咪唑环进行高亲和力相互作用, 通过竞争进入疏水口袋, 有效抑制BLK活性^[14]。

2 BLK的生物学功能

2.1 BLK与B细胞发育

BLK作为SRC家族激酶成员参与B细胞发育。B细胞发育过程如图2所示, 在祖B细胞(pro B cell)发育时期, BLK已经开始表达, 此时表达量较低。随着发育过程的进行, BLK在前B细胞(pre B cell)和成熟B细胞中的表达量不断上升, 并保持较高水平, 而在B细胞分化为浆细胞时停止表达^[15]。BLK表达量的变化在B细胞发育的不同阶段中产生了不同的效应。

B细胞抗原受体(BCR)的抗原结合部分是细胞膜免疫球蛋白(mIg), 与由二硫键连接的I α /I β 异二聚体非共价结合传递信号。在静息状态下, 包括BLK在内的SRC家族激酶是通过其独特的N末端区域与受体复合物相关联。mIg亚单位结合抗原被激活后, BCR发生聚合并且结构发生变化, 依次激活SRC激酶BLK、LYN、FYN、HCK和其他酪氨酸激酶SYK、BTK等, 使得I α /I β 上的ITAM基序酪氨酸磷酸化, 招募并激活各种下游信号分子, 其中SRC激酶响应速度快, 活性在数秒内迅速增加。Tretter等^[16]研究发现, 在缺乏功能性前BCR的小鼠中, 激活BLK可促进祖B细胞阶段外的成熟, 抑制V $_H$ -DJ $_H$ 重排, 并刺激了 κ 基因重排, 促进B细胞增殖和分化, 同时伴随着I β 酪氨酸磷酸化和与发育成熟相关基因的表达变化。因此, 激活的BLK可参与前BCR相关正常反应^[16], 但在持续性表达活化BLK的转基因小鼠中前B细胞增强对IL-7刺激的反应, 更易发生恶性转化并增殖^[13]。

另一方面, 更多的研究发现BLK也是BCR信号转导的一种负调节剂。Bewarder等^[17]证明, BLK通过SH2结构域可与B细胞中激活后的激酶SYK直接

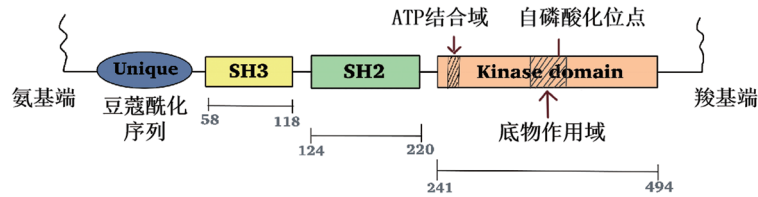


图1 BLK的结构示意图

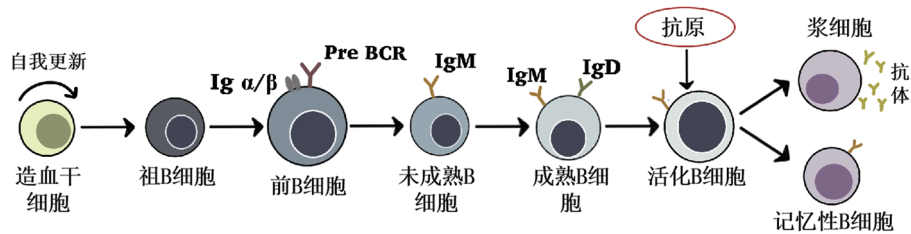


图2 B细胞的发育过程示意图

结合，并磷酸化B细胞上的抑制性Fc受体，抑制BCR诱导的增殖和分化。根据以上结果，我们认为BLK作为一种酪氨酸激酶能介导关于B细胞的正、负两种调控作用。

BLK在成熟B细胞亚群中的表达量各异，边缘区(marginal zone, MZ) B细胞的BLK表达量最高，B1细胞次之，滤泡(foicicular, FO) B细胞最低。Samuelson等^[18]研究发现，BLK^{+/-}和BLK^{-/-}小鼠在抗IgM抗体刺激后与BLK^{+/+}小鼠相比，BCR信号功能响应增强，导致B1细胞数量增加，MZ B细胞数量减少，血清抗核抗体水平有所升高，前两种小鼠随着年龄增长会加重自身免疫，并且B细胞活化阈值与其细胞的BLK水平成正比。当BLK表达减少，甚至不存在时，B细胞耐受性受到破坏。但Texido等^[19]研究发现，缺少BLK的小鼠B细胞中抗IgM抗体诱导的蛋白酪氨酸磷酸化却并未发生明显改变，他们认为BLK在BCR参与的B细胞激活中具有功能冗余的特点，因为抗原与BCR的交联能激活FYN、LYN等除BLK外的多种SRC家族激酶，它们都发挥了一定的作用，例如缺少LYN同样与患自身免疫病小鼠血液中高滴度抗DNA和抗核抗体有关^[20]，缺少FYN引起B细胞对IL-5的应答减少^[21]，这些激酶可能进行功能补偿。功能冗余性使BLK在淋巴细胞发育和激活中的个体作用难以界定。

值得注意的是，区别于Samuelson等^[18]使用的C57BL/6小鼠，当Texido等^[19]使用敲除BLK基因的129/Sv小鼠时，并未观察到B细胞发育或活化的明显缺陷，这两种矛盾的结果可能是由于小鼠遗传背

景不同导致BLK缺少，引发不同症状的出现，该结论仍需进一步详细论证。

2.2 BLK与T细胞功能

随着研究的深入，人们发现BLK不仅在B细胞中大量表达，在T细胞中也有表达，并发挥一定的作用。在胸腺微环境下，T细胞发育经历淋巴样祖细胞、祖T细胞、前T细胞、未成熟T细胞、成熟T细胞等阶段。胸腺中T细胞可依据CD4、CD8的表达分为双阴性(double negative, DN)细胞、双阳性(double positive, DP)细胞和单阳性(single positive, SP)细胞。根据构成表面TCR的肽链的不同，T细胞又被分为数量约占95%的 $\alpha\beta$ T细胞和5%的 $\gamma\delta$ T细胞。Laird等^[22]研究显示，小鼠的骨髓和胸腺祖细胞、未成熟DN T细胞和 $\gamma\delta$ T细胞、小部分成熟的 $\gamma\delta$ T细胞中均有BLK表达，而在 $\alpha\beta$ T细胞中不表达BLK；通过与T细胞特异性的LCK和FYN这两种激酶表达量的比较表明，BLK是在 $\gamma\delta$ T细胞中表达的主要SRC家族激酶。

BLK通过控制胸腺早期祖细胞的数量和个体发育过程中未成熟胸腺细胞的增殖参与T细胞发育，BLK减少使所有DN T细胞的增殖均减少。其中，在T细胞发育尚未达到平衡时，BLK^{-/-}小鼠的T细胞总数相比于BLK^{+/+}小鼠会减少，但随着发育成熟，差异会逐渐消失^[22]，这些现象提示了BLK不仅可以诱导增殖，而且可以调节细胞对增殖刺激的适应性。

IL-17是T细胞引发炎症反应的驱动因子。 $\gamma\delta$ T细胞是IL-17的重要来源，BLK是产生IL-17的 $\gamma\delta$ T细胞发育所必需的分子。在BLK^{-/-}小鼠中，TCR激活

后产生IL-17的 $\gamma\delta$ T细胞所占百分比大大降低, 并且4周龄的BLK^{-/-}小鼠的IL-23R⁺ $\gamma\delta$ T细胞的百分比和数量均显著降低^[22]。原癌基因编码的c-Maf转录因子是产生IL-17的 $\gamma\delta$ T细胞分化的必要调节剂, 它能直接激活BLK基因, 间接说明BLK参与了该分化进程^[23]。虽然目前尚不清楚BLK在这些效应细胞生成中的作用机理, 但已能证明BLK在IL-17⁺ $\gamma\delta$ T细胞的发育中具有重要作用。

2.3 BLK参与肿瘤细胞的迁移、增殖

BLK通过作用于不同底物, 参与多种肿瘤细胞迁移、生长等相关的信号通路。胶质母细胞瘤是最常见的中枢神经系统恶性肿瘤, 其中胶质瘤干细胞(glioma stem cells, GSCs)的存在与肿瘤的发生、发展、复发有关。Krüppel样因子4 (Krüppel-like factors 4, KLF4)是锌指蛋白KLF因子家族成员之一, 是一种含有DNA结合域的重要转录因子, 直接与下游基因相结合从而调控转录, 目前认为KLF4是GSCs的主要标志物之一, 能促进细胞的自我更新和肿瘤复发。Oyinlade等^[24]研究发现, KLF4直接结合BLK和LIM结构域7 (LMO7)增强子区域的mCpGs, 并通过形成3D染色质环激活它们的启动子, 而敲除BLK基因则会增强细胞黏附能力, 减少KLF4介导的细胞迁移, 表明BLK依赖甲基化增强子进行基因调控, 并参与脑肿瘤细胞的黏附和迁移的重要信号转导。

Gα13属于异源三聚体G蛋白家族; RhoA是Ras家族成员中的一类GTP结合蛋白, 通过作用于下游分子调控细胞迁移与运动; G蛋白偶联受体激活的Gα12/Gα13激活Rho鸟嘌呤核苷酸交换因子, 催化RhoA与GTP结合, 引起细胞形态改变, 诱导细胞收缩和迁移。p190RhoGAP是GTPase活化蛋白, 主要作用于小G蛋白Rho家族, 可通过水解RhoA-GTP来调节肌动蛋白应力纤维的形成。在人黑色素瘤细胞系中, BLK能直接结合并激活Gα13, 使p190RhoGAP酪氨酸磷酸化, 抑制RhoA活化, 最终导致细胞侵袭力不足, 其中p190RhoGAP依赖酪氨酸激酶的磷酸化对细胞侵袭的作用是必需的^[25]。

部分酪氨酸激酶抑制剂已在肿瘤治疗中得到应用, 例如达沙替尼(dasatinib)能有效抑制小鼠中组成型活性BLK诱导的肿瘤生长^[26]; 依鲁替尼(ibrutinib)是BTK的靶向抑制剂, 但同样能有效抑制BLK等家族激酶, 阻断BCR信号转导, 使来自弥漫性大B细胞淋巴瘤DLBCL患者的异种移植物中的肿瘤生长受到抑制^[27]。Fallacara等^[28]通过分子建模及酶活测

定发现了吡唑并[3,4-d]嘧啶衍生物新家族可同时抑制BLK、FYN、LYN, 有抗淋巴瘤细胞增殖的作用。

3 BLK与疾病

3.1 BLK与系统性红斑狼疮

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种由环境和遗传因素诱导的全身自身免疫疾病, 其特征是多种自身抗体产生、补体激活以及自身抗体-自身免疫原复合物的形成和沉积, 目前SLE的病因和致病机制尚未阐明。2008年, 高加索人的全基因组关联研究(genome wide association study, GWAS)首次证实BLK是SLE的易感基因, 基因座中的遗传变异使BLK表达降低, 致使个体易患SLE^[29]。GWAS结合高通量单核苷酸分型、精细定位, 确定了BLK与SLE相关的多种遗传变异, 证明携带SLE风险等位基因的人BLK含量明显低于非携带者^[30], 并且风险等位基因的效应大小和基因频率在不同人群之间有所不同。

首先是最常见的一种基因多态性rs13277113 (简称为“A”) ^[29], 它位于5'上游启动子区域。SNP A使BLK mRNA水平下降, SLE患者出现单个或多个器官新发或加重的临床表现^[31], BLK表达的减少又与FAM167A (C8orf13)的高水平表达相关^[32], 这些效应同样与SLE的发展紧密相关^[33]。特别地, SNP A在不同人种中均与SLE密切相关^[34-35], 其中亚洲人和高加索人中SNP A基因型和等位基因分布存在巨大的差异, 亚洲人的主要等位基因在高加索人中成为次要等位基因^[36]; 位于BLK基因第一个内含子的SNP rs2248932在SNP A下游43 kb处, 在高加索人和中国汉族人中与SLE有显著的相关性, 该变体中亚洲人的风险等位基因频率同样高于高加索人^[37-39]; 综合来看, 这或许可以解释为什么亚洲人口对SLE易感性更高。除SLE外, SNP A还与严重缺血性并发症、类风湿关节炎、喉鳞状细胞癌等密切相关^[35, 40-42]。

除SNP A外, 还存在其他BLK与SLE相关的遗传变异。位于BLK第一内含子的SNP rs2618476与rs922483处于连锁不平衡状态, 且与STAT4-rs3821236、XKR6-rs685109有显著相关性^[43-44]。Guthridge等^[45]成功鉴定出两种BLK-SNP, 它们以细胞型和发育阶段特异性的方式调节启动子活性。rs922483位于PI启动子内与RNA聚合酶II结合的区域中, 降低启动子的转录活性, 导致人外周血T细胞和脐带血B细胞中BLK mRNA表达总体下降; 位于P2启动子的

rs1382568是三等位基因变体,能导致祖B细胞系BLK启动子活性下降。同时,研究发现在成熟B细胞中P1位点影响更大,而在未成熟B细胞中是P2位点影响最显著。Mo等^[46]的研究发现共有24个BLK-SNPs与SLE显著相关,其中包括rs2736345、rs2618443在内的17个SNPs影响血浆组织蛋白酶B表达水平,而血浆组织蛋白酶B与SLE呈因果关系,这可能成为BLK参与SLE的一种新机制。此外,Di等^[47]发现在中国人群中rs2618479和rs7812879与SLE患者肾功能不全及蛋白尿等临床症状显著相关,这也是首次将BLK-SNP与SLE的临床特征联系起来。

研究人员进一步探索BLK在SLE中的作用,认为BLK参与适应性免疫应答,BLK表达水平的下降可能改变B细胞特异性信号转导途径,导致普遍的B细胞机能亢进,使机体易患自身免疫病。在狼疮小鼠模型中,降低BLK表达水平会促进蛋白尿和肾病的发作,BLK^{+/-}和BLK^{-/-}小鼠会产生更高水平的促炎因子、抗dsDNA、IgG自身抗体,IFN- γ 、IL-17和IL-21的表达量显著增加,B细胞分泌IL-6和作为抗原提呈细胞的能力增强,加速淋巴细胞的增殖,诱导了免疫复合物介导的肾小球肾炎,同时B1a细胞向有炎症的肾脏中聚集,并且它们分化为分泌IgG细胞的能力增强,这些可能是引发自身抗体产生的合理机制,随后会转化为SLE一系列临床症状^[48-49]。有趣的是,敲除BLK基因的正常小鼠却不会表现出过度免疫表型^[50],因此,BLK并不是SLE发病的必要因素。

在不同人群中,BLK-SNP与BANK1-SNP之间的遗传相互作用与SLE易感性紧密相关^[51],其中BANK1是具有锚蛋白重复序列的B细胞胞质支架蛋白1(B-cell scaffold protein with ankyrin repeats 1)。Castillejo等^[52]首次证明BLK与BANK1能直接结合,在单独表达BLK时,BLK优先定位于质膜上,而两者共表达时,BLK大部分表达于胞质中,这可能是由于BANK1可以将分子引向特定的细胞区室,激活BCR使BANK1酪氨酸磷酸化,并增强BANK1和BLK的结合。SLE患者中BLK罕见变体降低BLK活性,显著减少BANK1的磷酸化^[53]。

综上,结合BLK的减少对自身免疫调节网络的影响和BLK SNP的风险等位基因分析,证明了BLK与狼疮疾病的相关性,为研究SLE致病机理和新诊断、治疗方法打开不同思路。

3.2 BLK与白血病

白血病是由多能造血干细胞异常引起的一种克

隆性疾病,是血液系统中的恶性肿瘤。近年来,人们不断发现BLK与多种白血病的联系。95%的慢性髓样白血病(chronic myeloid leukemia, CML)患者造血干细胞中9号染色体长臂末端Abl原癌基因在5'端发生断裂,并与22号染色体长臂末端的c-BCR基因3'端发生融合。BLK可作为白血病干细胞(leukemia stem cell, LSC)的肿瘤抑制因子,但不影响正常的造血干细胞或造血作用,致癌的BCR/ABL融合基因在CML模型小鼠的LSC中下调Pax5, Pax5是可结合BLK启动子的上游调节因子,具有抑癌功能, c-MYC与Pax5直接结合下调BLK表达。在白血病细胞中, S期激酶相关蛋白Skp2能够识别细胞周期抑制因子p27,两者的表达量呈负相关,低表达p27促进白血病细胞增生并抑制细胞分化和凋亡。BLK可通过下调Skp2来上调下游效应子p27,以抑制LSC的增殖,BLK还可调节花生四烯酸5-脂氧合酶Alox5,它是维持LSC分化、生存的关键基因^[54]。SRC激酶抑制剂,如达沙替尼在CML治疗中并不会抑制BLK的肿瘤抑制活性,因此这种肿瘤抑制功能与BLK的激酶活性无关。

急性淋巴白血病(acute lymphocytic leukemia, ALL)起源于淋巴细胞在骨髓内异常增生,多与遗传和DNA甲基化、组蛋白修饰、非编码RNA调控等表观遗传修饰有关。BLK在ALL中过度表达,并且甲基化不足^[55],BLK失调可能通过调节B细胞受体信号转导推进了疾病的发展。B细胞急性淋巴白血病(B-ALL)是ALL中最常见的一种,在疾病进程中,磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)特异性地催化磷脂酰肌醇,顺次激活激酶Akt等,促进肿瘤细胞增殖、抑制凋亡。Kim等^[56]在B-ALL临床前模型中发现,依鲁替尼以BLK、BTK为靶标,干扰前BCR信号转导,使下游PI3K/Akt信号失活,调节前BCR相关因子CD72和蛋白激酶PKC- β 的表达,降低原癌基因BCL-6、CD44表达水平,抑制肿瘤细胞向骨髓基质方向迁移;因此在异种移植模型小鼠中,此药能显著延长小鼠生存期,有希望成为B-ALL的靶向药物。

在慢性淋巴白血病(chronic lymphocytic leukemia, CLL)中,依鲁替尼可靶向BLK等激酶,有效阻止热休克蛋白90(HSP90)抑制剂诱导的BLK降解,从而发挥抗CLL活性^[57];阿法替尼(afatinib)是一种表皮生长因子受体(EGFR)酪氨酸激酶抑制剂,是常见的肿瘤靶向药物,Lukas等^[58]进行离体药物研究时发现,该药在CLL中以BLK、SRC、YES、SYK为直接下游靶标干扰BCR信号转导,在CLL治疗中可与

其他药物联合使用发挥协同效应。

3.3 BLK与糖尿病

青年成熟期发病型糖尿病(maturity onset diabetes of the young, MODY)是一种胰岛 β 细胞功能遗传缺陷症, 导致胰岛素分泌不足。在MODY患者的基因组序列中检测到包括A71Y在内的5个BLK基因突变, 使BLK含量降低^[59]。Borowiec等^[3]发现, 在高葡萄糖浓度下的胰岛 β 细胞系min6中, 过表达BLK能特异性上调转录因子Pdx1和Nkx6.1, 使胰岛素分泌增加, 抑制BLK表达则相反; 当发生A71Y突变时, 正如1.3节中提到的这一突变使BLK半衰期缩短, 并且启动子活性降低, BLK对胰岛素含量的影响大大减弱。当细胞处于低葡萄糖浓度下时, BLK对胰岛素含量无影响, 证明BLK需在特定条件下才能对胰岛素分泌产生影响。

4 结语

BLK属于SRC酪氨酸激酶家族, 通过作用于不同底物参与了体内多种信号转导途径, 它的异常表达影响了疾病进程和发展。相较于其他SRC酪氨酸激酶家族成员, 现有对BLK的研究相对较少, 最开始人们认为它是在B淋巴细胞系中特异性表达, 相关研究多集中于B淋巴细胞系中BLK参与免疫进程, 如B细胞发育等, 以及SLE的相关性等方面。更多新研究发现其他免疫细胞也会表达BLK, 其参与的信号通路也越来越复杂, 并与CML、淋巴白血病、糖尿病等关联, 甚至还参与肿瘤细胞的迁移和增殖。BLK激酶抑制剂多为SRC家族多靶点抑制剂, 如达沙替尼, 部分药物逐渐被应用于临床, 由于SRC家族激酶中的成员存在功能冗余, 具体的分子作用机制仍未有系统化解释, 但是, SRC家族成员SRC、LYN、FYN等的研究对BLK也具有重要借鉴意义。由于BLK主要在免疫细胞中表达, BLK与自身免疫病的关系应受到格外重视, 其在疾病中作用的分子免疫调控机制和对临床诊疗的指导作用仍值得深入研究。

[参 考 文 献]

- [1] Islam KB, Rabbani H, Larsson C, et al. Molecular cloning, characterization, and chromosomal localization of a human lymphoid tyrosine kinase related to murine Blk. *J Immunol*, 1995, 154: 1265-72
- [2] Cao W, Zhang L, Rosen DB, et al. BDCA2/Fc ϵ RI γ complex signals through a novel BCR-like pathway in human plasmacytoid dendritic cells. *PLoS Biol*, 2007, 5: e248
- [3] Borowiec M, Liew CW, Thompson R, et al. Mutations at the *BLK* locus linked to maturity onset diabetes of the young and β -cell dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 14460-5
- [4] Smolinska MJ, Page TH, Urbaniak AM, et al. Hck tyrosine kinase regulates TLR4-induced TNF and IL-6 production via AP-1. *J Immunol*, 2011, 187: 6043-51
- [5] 王登嵘, 刘显, 肖健. Src蛋白激酶在疾病中的功能及研究现状. *医学与哲学(B)*, 2018, 39: 58-60, 79
- [6] Mahajan S, Fargnoli J, Burkhardt AL, et al. Src family protein tyrosine kinases induce autoactivation of Bruton's tyrosine kinase. *Mol Cell Biol*, 1995, 15: 5304-11
- [7] Saouaf SJ, Kut SA, Fargnoli J, et al. Reconstitution of the B cell antigen receptor signaling components in COS cells. *J Biol Chem*. 1995, 270: 27072-8
- [8] Saouaf SJ, Wolven A, Resh MD, et al. Palmitoylation of Src family tyrosine kinases regulates functional interaction with a B cell substrate. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 234: 325-9
- [9] Pleiman CM, Clark MR, Gauen LK, et al. Mapping of sites on the Src family protein tyrosine kinases p55blk, p59fyn, and p56lyn which interact with the effector molecules phospholipase C- γ 2, microtubule-associated protein kinase, GTPase-activating protein, and phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol*, 1993, 13: 5877-87
- [10] Lin YH, Shin EJ, Campbell MJ, et al. Transcription of the blk gene in human B lymphocytes is controlled by two promoters. *J Biol Chem*, 1995, 270: 25968-75
- [11] Delgado-Vega AM, Dozmorov MG, Quirós MB, et al. Fine mapping and conditional analysis identify a new mutation in the autoimmunity susceptibility gene BLK that leads to reduced half-life of the BLK protein. *Ann Rheum Dis*, 2012, 71: 1219-26
- [12] Díaz-Barreiro A, Bernal-Quirós M, Georg I, Marañón C, et al. The SLE variant Ala71Thr of BLK severely decreases protein abundance and binding to BANK1 through impairment of the SH3 domain function. *Genes Immun*, 2016, 17: 128-38
- [13] Malek SN, Dordai DI, Reim J, et al. Malignant transformation of early lymphoid progenitors in mice expressing an activated Blk tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 7351-6
- [14] Aljoundi AK, Agoni C, Olotu FA, et al. 'Piperazing' the catalytic gatekeepers: unraveling the pan-inhibition of SRC kinases; LYN, FYN and BLK by masitinib. *Future Med Chem*, 2019, 11: 2365-80
- [15] Dymecki SM, Zwollo P, Zeller K, et al. Structure and developmental regulation of the B-lymphoid tyrosine kinase gene blk. *J Biol Chem*, 1992, 267: 4815-23
- [16] Tretter T, Ross AE, Dordai DI, et al. Mimicry of pre-B cell receptor signaling by activation of the tyrosine kinase Blk. *J Exp Med*, 2003, 198: 1863-73
- [17] Bewarder N, Weinrich V, Budde P, et al. *In vivo* and *in vitro* specificity of protein tyrosine kinases for immunoglobulin G receptor (Fc γ RII) phosphorylation.

- Mol Cell Biol, 1996, 16: 4735-43
- [18] Samuelson EM, Laird RM, Maue AC, et al. Blk haploinsufficiency impairs the development, but enhances the functional responses, of MZ B cells. *Immunol Cell Biol*, 2012, 90: 620-9
- [19] Texido G, Su IH, Mecklenbräuker I, et al. The B-cell-specific Src-family kinase Blk is dispensable for B-cell development and activation. *Mol Cell Biol*, 2000, 20: 1227-33
- [20] Chan VW, Meng F, Soriano P, et al. Characterization of the B lymphocyte populations in Lyn-deficient mice and the role of Lyn in signal initiation and down-regulation. *Immunity*, 1997, 7: 69-81
- [21] Yasue T, Nishizumi H, Aizawa S, et al. A critical role of Lyn and Fyn for B cell responses to CD38 ligation and interleukin 5. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 10307-12
- [22] Laird RM, Laky K, Hayes SM. Unexpected role for the B cell-specific Src family kinase B lymphoid kinase in the development of IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells. *J Immunol*, 2010, 185: 6518-27
- [23] Zuberbuehler MK, Parker ME, Wheaton JD, et al. The transcription factor c-Maf is essential for the commitment of IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells. *Nat Immunol*, 2019, 20: 73-85
- [24] Oyinlade O, Wei S, Kammers K, et al. Analysis of KLF4 regulated genes in cancer cells reveals a role of DNA methylation in promoter- enhancer interactions. *Epigenetics*, 2018, 13: 751-68
- [25] Bartolomé RA, Díaz-Martínez M, Coló GP, et al. A Blk-p190RhoGAP signaling module downstream of activated G α 13 functionally opposes CXCL12-stimulated RhoA activation and cell invasion. *Cell Signal*, 2014, 26: 2551-61
- [26] Petersen DL, Berthelsen J, Willerslev-Olsen A, et al. A novel BLK-induced tumor model. *Tumour Biol*, 2017, 39: 1010428317714196
- [27] Battistello E, Katanayeva N, Dheilly E, et al. Pan-SRC kinase inhibition blocks B-cell receptor oncogenic signaling in non-Hodgkin lymphoma. *Blood*, 2018, 131: 2345-56
- [28] Fallacara AL, Passannanti R, Mori M, et al. Identification of a new family of pyrazolo[3,4-d]pyrimidine derivatives as multitarget Fyn-Blk-Lyn inhibitors active on B- and T-lymphoma cell lines. *Eur J Med Chem*, 2019, 181: 111545
- [29] Hom G, Graham RR, Modrek B, et al. Association of systemic lupus erythematosus with C8orf13-BLK and ITGAM-ITGAX. *N Engl J Med*, 2008, 358: 900-9
- [30] Simpfendorfer KR, Olsson LM, Manjarrez Orduño N, et al. The autoimmunity-associated BLK haplotype exhibits *cis*-regulatory effects on mRNA and protein expression that are prominently observed in B cells early in development. *Hum Mol Genet*, 2012, 21: 3918-25
- [31] Chen Y, Wu Q, Shao Y, et al. Identify the association between polymorphisms of BLK and systemic lupus erythematosus through unlabelled probe-based high-resolution melting analysis. *Int J Immunogenet*, 2012, 39: 321-7
- [32] Pamuk ON, Gurkan H, Pamuk GE, et al. BLK pathway-associated rs13277113 GA genotype is more frequent in SLE patients and associated with low gene expression and increased flares. *Clin Rheumatol*, 2017, 36: 103-9
- [33] Demirci FY, Wang X, Morris DL, et al. Multiple signals at the extended 8p23 locus are associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *J Med Genet*, 2017, 54: 381-9
- [34] Yang W, Ng P, Zhao M, et al. Population differences in SLE susceptibility genes: STAT4 and BLK, but not PXX, are associated with systemic lupus erythematosus in Hong Kong Chinese. *Genes Immun*, 2009, 10: 219-26
- [35] Ito I, Kawasaki A, Ito S, et al. Replication of the association between the C8orf13-BLK region and systemic lupus erythematosus in a Japanese population. *Arthritis Rheum*, 2009, 60: 553-8
- [36] Tsuchiya N, Ito I, Kawasaki A. Association of IRF5, STAT4 and BLK with systemic lupus erythematosus and other rheumatic diseases. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*, 2010, 33: 57-65
- [37] Fan Y, Tao JH, Zhang LP, et al. Association of BLK (rs13277113, rs2248932) polymorphism with systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*, 2011, 38: 4445-53
- [38] Song GG, Lee YH. Association between BLK polymorphisms and susceptibility to SLE : a meta-analysis. *Z Rheumatol*, 2017, 76: 176-82
- [39] Zhang Z, Zhu KJ, Xu Q, et al. The association of the BLK gene with SLE was replicated in Chinese Han. *Arch Dermatol Res*, 2010, 302: 619-24
- [40] Torres O, Palomino-Morales R, Vazquez-Rodriguez TR, et al. Role of the C8orf13-BLK region in biopsy-proven giant cell arteritis. *Hum Immunol*, 2010, 71: 525-9
- [41] Huang H, Huang SC, Hua DJ, et al. Interaction analysis between BLK rs13277113 polymorphism and BANK1 rs3733197 polymorphism, MMEL1/TNFRSF14 rs3890745 polymorphism in determining susceptibility to rheumatoid arthritis. *Autoimmunity*, 2017, 50: 403-8
- [42] Pasvenskaite A, Vilkeviciute A, Liutkeviciene R, et al. Associations of IL6 rs1800795, BLK rs13277113, TIMP3 rs9621532, IL1RL1 rs1041973 and IL1RAP rs4624606 single gene polymorphisms with laryngeal squamous cell carcinoma. *Gene*, 2020, 747: 144700
- [43] Graham RR, Cotsapas C, Davies L, et al. Genetic variants near TNFAIP3 on 6q23 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet*, 2008, 40: 1059-61
- [44] Steri M, Orrù V, Idda ML, et al. Overexpression of the cytokine BAFF and autoimmunity risk. *N Engl J Med*, 2017, 376: 1615-26
- [45] Guthridge JM, Lu R, Sun H, et al. Two functional lupus-associated BLK promoter variants control cell-type- and developmental-stage-specific transcription. *Am J Hum Genet*, 2014, 94: 586-98
- [46] Mo X, Guo Y, Qian Q, et al. Mendelian randomization analysis revealed potential causal factors for systemic

- lupus erythematosus. *Immunology*, 2020, 159: 279-88
- [47] Di D, Ye Q, Wu X, et al. Polymorphisms of BLK are associated with renal disorder in patients with systemic lupus erythematosus. *J Hum Genet*, 2020, 65: 675-81
- [48] Wu YY, Georg I, Diaz-Barreiro A, et al. Concordance of increased B1 cell subset and lupus phenotypes in mice and humans is dependent on BLK expression levels. *J Immunol*, 2015, 194: 5692-702
- [49] Samuelson EM, Laird RM, Papillion AM, et al. Reduced B lymphoid kinase (Blk) expression enhances proinflammatory cytokine production and induces nephrosis in C57BL/6-lpr/lpr mice. *PLoS One*, 2014, 9: e92054
- [50] Mentlein L, Thorlacius GE, Meneghel L, et al. The rheumatic disease-associated FAM167A-BLK locus encodes DIORA-1, a novel disordered protein expressed highly in bronchial epithelium and alveolar macrophages. *Clin Exp Immunol*, 2018, 193: 167-77
- [51] Ramírez-Bello J, Jiménez-Morales S, Montufar-Robles I, et al. BLK and BANK1 polymorphisms and interactions are associated in Mexican patients with systemic lupus erythematosus. *Inflamm Res*, 2019, 68: 705-13
- [52] Castillejo-López C, Delgado-Vega AM, Wojcik J, et al. Genetic and physical interaction of the B-cell systemic lupus erythematosus-associated genes BANK1 and BLK. *Ann Rheum Dis*, 2012, 71: 136-42
- [53] Jiang SH, Athanasopoulos V, Ellyard JI, et al. Functional rare and low frequency variants in BLK and BANK1 contribute to human lupus. *Nat Commun*, 2019, 10: 2201
- [54] Zhang H, Peng C, Hu Y, et al. The Blk pathway functions as a tumor suppressor in chronic myeloid leukemia stem cells. *Nat Genet*, 2012, 44: 861-71
- [55] Navarrete-Meneses MDP, Pérez-Vera P. Epigenetic alterations in acute lymphoblastic leukemia. *Bol Med Hosp Infant Mex*, 2017, 74: 243-64
- [56] Kim E, Hurtz C, Koehrer S, et al. Ibrutinib inhibits pre-BCR⁺ B-cell acute lymphoblastic leukemia progression by targeting BTK and BLK. *Blood*, 2017, 129: 1155-65
- [57] Liu Z, Liu J, Zhang T, et al. Destabilization of ROR1 enhances activity of Ibrutinib against chronic lymphocytic leukemia *in vivo*. *Pharmacol Res*, 2020, 151: 104512
- [58] Lukas M, Velten B, Sellner L, et al. Survey of *ex vivo* drug combination effects in chronic lymphocytic leukemia reveals synergistic drug effects and genetic dependencies. *Leukemia*, 2020, 34: 2934-50
- [59] Bonnefond A, Yengo L, Philippe J. et al. Reassessment of the putative role of BLK-p.A71T loss-of-function mutation in MODY and type 2 diabetes. *Diabetologia*, 2013, 56: 492-6