

·综述·

脓毒症时糖原合酶激酶 3 相关作用的研究进展

庄明峰 刘大东 孙炳伟

脓毒症是由感染引起的全身炎症反应综合征(SIRS),是严重创伤、休克及感染后常见的并发症,进一步发展可导致脓毒性休克、多器官功能障碍综合征(MODS),即便在基础与临床研究及重症监护手段高度发展的现代,其临床治疗仍然收效甚微,病死率居高不下^[1]。脓毒症的病理生理过程极其复杂,近年研究表明机体的炎症反应和凝血系统功能紊乱在脓毒症的发生发展过程中具有重要作用^[1-3]。大量研究揭示,糖原合酶激酶 3(GSK-3)在脓毒症炎症反应、凝血异常中发挥重要作用^[4-5]。GSK-3 是一种多功能的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是参与糖代谢的主要限速酶之一。研究显示,GSK-3 在细胞的生理过程中扮演着重要角色,已成为潜在的临床治疗靶点^[6]。现就 GSK-3 的结构与调节以及脓毒症时炎症反应、凝血异常中 GSK-3 相关作用的研究进展进行综述。

1 GSK-3 的结构及其调节

GSK-3 是参与糖原代谢的关键酶,能使糖原合成酶磷酸化,降低糖原合成,升高血糖^[7-8]。研究显示,GSK-3 存在 α 、 β 两种不同亚型,分别由两个位于不同染色体 19q13.1-2 和 3q13.3-Q21 的基因编码,且二者在催化结构域有 98% 的同源性^[9]。GSK-3 的两种亚型均含有丝氨酸的氨基末端结构域和酪氨酸的催化结构域。GSK-3 α 和 GSK-3 β 相对分子质量分别是 51 000 和 47 000,主要因两者的氨基末端结构域不同,GSK-3 α 氨基末端富含丰富的甘氨酸^[10]。在哺乳动物中,GSK-3 的两个亚型在 RNA 和蛋白水平广泛表达,但不同组织中含有的亚型比例不同,例如在血小板中 GSK-3 β 远多于 GSK-3 α ^[11]。人类多种疾病的发生发展都与 GSK-3 活性调节高度相关。

在体内 GSK-3 的活性调节机制极其复杂,主要的调节方式包括磷酸化调节、蛋白复合物形成、细胞内分布和一些抑制剂调节^[12-13]。磷酸化是研究最多的调节方式之一,静息时,细胞内的 GSK-3 具有活性,能够使糖原合成酶磷酸化,降低糖原的合成;而在受到刺激时,细胞内的 GSK-3 被磷酸化而失活^[14]。GSK-3 的两个亚型氨基末端结构域均能被磷酸化,GSK-3 α 的磷酸化位点位于该结构域的第 21 位丝氨酸,GSK-3 β 的磷酸化位点位于该结构域的第 9 位丝氨酸,磷酸化后 GSK-3 的活性被抑制^[4]。此外,GSK-3 催化结构域的 T-环含有丰富的酪氨酸,GSK-3 α 和 GSK-3 β 磷酸化位点分别位于该结构域第 279 位和第 216 位酪氨酸,这些位点的磷

酸化并非激酶活性所必需,但能增加整体的催化效率^[15]。已经发现多种蛋白激酶参与了 GSK-3 的磷酸化调节,如蛋白激酶 B(PKB/AKT)、蛋白激酶 A(PKA)、蛋白激酶 C(PKC)、核糖体 S6 激酶(p70S6K、p90RSK)等^[14,16-17]。

GSK-3 β 可使多种底物磷酸化,包括参与代谢和信号调节的蛋白、结构蛋白及各种转录因子,例如糖原合成酶、微管相关蛋白和 β -连环蛋白等^[10,18]。此外,GSK-3 β 还可影响多种转录因子,如 β -连环蛋白、反应元件结合蛋白(CREB)、癌基因(Myc)和核转录因子 κ B(NF- κ B)等基因的表达^[19-20]。

2 GSK-3 与炎症反应

脓毒症时机体释放大量的炎症介质和细胞因子,引起全身过度的炎症反应,最终导致机体组织器官损伤^[21-23]。近年来研究发现,GSK-3 能促进炎症反应的发生发展。关于 GSK-3 在炎症反应领域的研究,主要表现在 GSK-3 通过对转录因子的调控作用来调节炎症因子的产生^[24-25]。Martin 等^[26]在研究 Toll 样受体(TLR)活化与单核细胞炎症反应时发现,抑制 GSK-3 的活性能促进抗炎因子白细胞介素-10(IL-10)的产生,并抑制前炎症因子白细胞介素-6 和-1 β (IL-6、IL-1 β)以及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的产生;进一步的研究发现,GSK-3 对炎症反应的这种调节作用是由于 GSK-3 能够影响 NF- κ B 的 p65 亚单位和 CREB 二者与 CREB 绑定蛋白(CBP)的相互作用^[9,27]。使用脂多糖(LPS)在体外刺激单核细胞时发现,哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 1(mTORC1)能够导致 GSK-3 β 磷酸化,从而抑制 GSK-3 β 的活性,增加抗炎因子 IL-10 的产生、减少前炎症因子白细胞介素-12(IL-12)的产生、并促进 β -干扰素(IFN- β)的产生^[16]。另外,IFN- γ 能够增强 LPS 诱导的单核/巨噬细胞炎症因子产生,其作用机制涉及胞质中的 GSK-3 对抗炎因子 IL-10 产生抑制作用和 GSK-3 对信号转导及转录激活因子 3(STAT3)的激活作用^[28]。体内研究发现,抑制 GSK-3 β 的活性可以导致抗炎因子 IL-10 产生增加,从而减轻肝脏缺血/再灌注(I/R)损伤^[29]。GSK-3 除了能调节单核细胞的炎症反应外,还参与了自然杀伤细胞(NKs)、巨噬细胞衍生的 RAW264.7 细胞、树突细胞(DCs)等炎症反应的调控^[30-31]。

此外,有研究显示,使用 GSK-3 阻滞剂抑制 GSK-3 活性后能够促进 IL-17 诱导的 IL-6 产生^[32]。同样,抑制 GSK-3 活性还能诱导心肌细胞中 TNF- α 和内皮细胞中 IL-6 的产生增加^[33-34]。这些发现与上述 GSK-3 的促炎作用相矛盾,可能归因于 GSK-3 调节的多种转录因子间的复杂联系,还依赖于不同的细胞类型和刺激因素。很显然,GSK-3 的阻滞可以改变炎症反应的平衡,故 GSK-3 可能成为临床炎症疾病治疗的潜在靶点。

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.07.016

基金项目:国家自然科学基金(81071546,81272148,30772256);江苏省自然科学基金(BK2012703)

作者单位:212001 镇江,江苏大学附属医院烧伤整形科

通信作者:孙炳伟,Email:sunbinwe@hotmail.com

3 GSK-3 与凝血异常

在脓毒症复杂的发病机制中,凝血系统功能紊乱是病死率增加的重要原因^[35-36]。血小板活化是凝血系统激活过程中的重要事件,在脓毒症早期即可发生血小板激活和聚集^[37-38]。血小板的活化反应与相关信号通路[如磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/AKT 通路、丝裂素活化蛋白激酶(MAPK)通路、酪氨酸蛋白激酶(PTK)通路以及 G 蛋白耦联受体通路等]的激活密切相关^[39-40]。研究显示,这些信号通路的激活将会影响 GSK-3 的活性^[14,41-42]。

在血小板中主要表达 GSK-3 的 β 亚型^[11]。有研究证实, GSK-3 β 是血小板功能的负性调节因子。体外研究发现,抑制 GSK-3 β 的活性可有效增强蛋白酶活化受体 1(PAR1)调节的血小板聚集能力;同样,体内研究发现,小鼠敲除 GSK-3 β 基因后, PAR4 调节的血小板聚集力明显增强,血栓形成也明显增加^[43]。进一步研究显示, PKC- α 和 AKT 能够将 GSK-3 β 磷酸化,但这两种激酶作用方式有差异, PKC- α 能早期快速磷酸化 GSK-3 β , 而 AKT 主要介导 GSK-3 β 的后期磷酸化^[5,44]。GSK-3 β 磷酸化后,抑制了 GSK-3 β 活性,促进了凝血酶介导的血小板整合素 α II b β 3 表达和颗粒释放,导致了血小板的过度活化^[45]。此外,另一些研究发现,抑制 GSK-3 的活性可减少胶原蛋白诱导的血小板颗粒释放^[46-47]。

大量研究显示, GSK-3 在许多信号分子的激活、磷酸化等方面发挥重要的作用,已发现 GSK-3 的底物有将近 100 多种^[20,48]。最新研究发现, GSK-3 β 对血小板功能的调控可能涉及经典的 Wnt/ β -连环蛋白信号通路^[49-50]。当缺乏 Wnt 信号时, β -连环蛋白被 GSK-3 β 磷酸化而引起泛素化,最终被蛋白酶降解;当存在 Wnt 信号时, GSK-3 β 磷酸化而失活,导致 β -连环蛋白磷酸化减少,而在胞质内稳定聚集,随后核转位而调控细胞功能^[51-52]。但是血小板无核,磷酸化稳定的 β -连环蛋白不能进入细胞核发挥核转录作用,故血小板中 β -连环蛋白调节血小板功能的机制有待进一步研究阐明。

4 GSK-3 与其他病变

脓毒症进一步发展将会累及心血管、中枢系统,导致其功能失调,最终形成多器官功能障碍综合征(MODS)。研究显示, GSK-3 在心脏 I/R 以及中枢神经系统组织损伤和修复过程中发挥重要作用。对心肌细胞的研究发现,抑制 GSK-3 β 的活性能够减轻心肌细胞的 I/R 损伤,促进心肌重构^[53]。而西地那非通过 PKG 信号使心肌细胞 GSK-3 β 失活,推测环磷酸鸟苷(cGMP)很可能通过 GSK-3 β 的失活抑制线粒体膜通透性转移孔的开放而保护心肌细胞^[54]。另外研究发现, GSK-3 促进了中枢神经系统中星形胶质细胞和小胶质细胞的活化与迁移,且这些细胞中前炎症因子(IL-6 和 TNF)、趋化因子[IL-8、受激活调节正常 T 细胞表达和分泌因子(RANTES)、趋化因子配体(CXCL10)]以及一氧化氮(NO)产生增加,而抗炎因子(IL-10)的产生减少^[55-56]。在缺氧/缺糖的情况下,抑制 GSK-3 的活性能维持小胶质细胞的生存,并诱导促红细胞生成素(HSP)合成增加^[57],还能减轻炎症诱导的神经细胞毒性反应^[55]。

5 展望

脓毒症时凝血活化和炎症反应之间存在明显交叉,机体内大量凝血因子被激活,凝血系统活化,使其功能紊乱,并促进炎症反应的进一步发展,后者亦可引起前者的活化,两者相互影响,共同促进脓毒症的发生发展。作为一种多功能的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, GSK-3 在脓毒症炎症反应和凝血异常中发挥关键作用。但 GSK-3 与脓毒症时血小板异常活化以及过度炎症反应的具体机制至今仍不清楚,仍需大量研究来阐述说明。

参考文献

- [1] Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock [J]. *N Engl J Med*, 2013, 369(9):840-851.
- [2] Tynl K. Critical role for oxidative stress, platelets, and coagulation in capillary blood flow impairment in sepsis [J]. *Microcirculation*, 2011, 18(2):152-162.
- [3] 孙振朕,朱科明,邓小明. 血小板和中性粒细胞在脓毒症中作用机制的研究进展 [J]. *中国危重病急救医学*, 2011, 23(8):502-504.
- [4] Wang H, Brown J, Martin M. Glycogen synthase kinase 3: a point of convergence for the host inflammatory response [J]. *Cytokine*, 2011, 53(2):130-140.
- [5] Moore SF, van den Bosch MT, Hunter RW, et al. Dual regulation of glycogen synthase kinase 3 (GSK3) α/β by protein kinase C (PKC) α and Akt promotes thrombin-mediated integrin α II b β 3 activation and granule secretion in platelets [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(6):3918-3928.
- [6] Mines MA. Hyperactivity: glycogen synthase kinase-3 as a therapeutic target [J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 708(1-3):56-59.
- [7] Cross DA, Alessi DR, Cohen P, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B [J]. *Nature*, 1995, 378(6559):785-789.
- [8] Gao C, Hölscher C, Liu Y, et al. GSK3: a key target for the development of novel treatments for type 2 diabetes mellitus and Alzheimer disease [J]. *Rev Neurosci*, 2011, 23(1):1-11.
- [9] Cortés-Vieyra R, Bravo-Patiño A, Valdez-Alarcón JJ, et al. Role of glycogen synthase kinase-3 beta in the inflammatory response caused by bacterial pathogens [J]. *J Inflamm (Lond)*, 2012, 9(1):23.
- [10] Ciaraldi TP, Carter L, Mudaliar S, et al. GSK-3beta and control of glucose metabolism and insulin action in human skeletal muscle [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2010, 315(1-2):153-158.
- [11] Ono M, Matsubara Y, Shibano T, et al. GSK-3 β negatively regulates megakaryocyte differentiation and platelet production from primary human bone marrow cells in vitro [J]. *Platelets*, 2011, 22(3):196-203.
- [12] Medina M, Wandosell F. Deconstructing GSK-3: The Fine Regulation of Its Activity [J]. *Int J Alzheimers Dis*, 2011, 2011:479249.
- [13] Beurel E, Michalek SM, Jope RS. Innate and adaptive immune responses regulated by glycogen synthase kinase-3 (GSK3) [J]. *Trends Immunol*, 2010, 31(1):24-31.
- [14] Kaidanovich-Beilin O, Woodgett JR. GSK-3: Functional Insights from Cell Biology and Animal Models [J]. *Front Mol Neurosci*, 2011, 4:40.
- [15] Chowdhry S, Zhang Y, McMahon M, et al. Nrf2 is controlled by two distinct β -TrCP recognition motifs in its Neh6 domain, one of which can be modulated by GSK-3 activity [J]. *Oncogene*, 2013, 32(32):3765-3781.
- [16] Wang H, Brown J, Gu Z, et al. Convergence of the mammalian target of rapamycin complex 1- and glycogen synthase kinase 3- β -signaling pathways regulates the innate inflammatory response [J]. *J Immunol*, 2011, 186(9):5217-5226.

- [17] Maurer U, Preiss F, Brauns-Schubert P, et al. GSK-3 - at the crossroads of cell death and survival [J]. *J Cell Sci*, 2014, 127 (Pt 7):1369-1378.
- [18] Buttrick GJ, Wakefield JG. PI3-K and GSK-3: Akt-ing together with microtubules[J]. *Cell Cycle*, 2008, 7(17):2621-2625.
- [19] Xia Y, Rao J, Yao A, et al. Lithium exacerbates hepatic ischemia/reperfusion injury by inhibiting GSK-3 β /NF- κ B-mediated protective signaling in mice[J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 697(1-3): 117-125.
- [20] Kim WY, Wang X, Wu Y, et al. GSK-3 is a master regulator of neural progenitor homeostasis [J]. *Nat Neurosci*, 2009, 12(11): 1390-1397.
- [21] Fry DE. Sepsis, systemic inflammatory response, and multiple organ dysfunction: the mystery continues [J]. *Am Surg*, 2012, 78(1): 1-8.
- [22] Cinel I, Opal SM. Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer[J]. *Crit Care Med*, 2009, 37(1):291-304.
- [23] 郑贵军, 孙茜, 李银平. 炎症、内皮、凝血与脓毒症[J]. *中国危重病急救医学*, 2009, 21(9):573-576.
- [24] Chan MM, Cheung BK, Li JC, et al. A role for glycogen synthase kinase-3 in antagonizing mycobacterial immune evasion by negatively regulating IL-10 induction [J]. *J Leukoc Biol*, 2009, 86(2):283-291.
- [25] Rehani K, Wang H, Garcia CA, et al. Toll-like receptor-mediated production of IL-1Ra is negatively regulated by GSK3 via the MAPK ERK1/2[J]. *J Immunol*, 2009, 182(1):547-553.
- [26] Martin M, Rehani K, Jope RS, et al. Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3[J]. *Nat Immunol*, 2005, 6(8):777-784.
- [27] Kim HJ, Joe Y, Kong JS, et al. Carbon monoxide protects against hepatic ischemia/reperfusion injury via ROS-dependent Akt signaling and inhibition of glycogen synthase kinase 3 β [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2013, 2013:306421.
- [28] Beurel E, Jope RS. Glycogen synthase kinase-3 promotes the synergistic action of interferon- γ on lipopolysaccharide-induced IL-6 production in RAW264. 7 cells [J]. *Cell Signal*, 2009, 21(6):978-985.
- [29] Ren F, Duan Z, Cheng Q, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase 3 beta ameliorates liver ischemia reperfusion injury by way of an interleukin-10-mediated immune regulatory mechanism [J]. *Hepatology*, 2011, 54(2):687-696.
- [30] Fionda C, Malgarini G, Soriani A, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 increases NKG2D ligand MICA expression and sensitivity to NK cell-mediated cytotoxicity in multiple myeloma cells: role of STAT3[J]. *J Immunol*, 2013, 190(12):6662-6672.
- [31] Larabee JL, Maldonado-Arocho FJ, Pacheco S, et al. Glycogen synthase kinase 3 activation is important for anthrax edema toxin-induced dendritic cell maturation and anthrax toxin receptor 2 expression in macrophages [J]. *Infect Immun*, 2011, 79(8):3302-3308.
- [32] Shen F, Li N, Gade P, et al. IL-17 receptor signaling inhibits C/EBP β by sequential phosphorylation of the regulatory 2 domain [J]. *Sci Signal*, 2009, 2(59):ra8.
- [33] Shen E, Fan J, Peng T. Glycogen synthase kinase-3 β suppresses tumor necrosis factor- α expression in cardiomyocytes during lipopolysaccharide stimulation [J]. *J Cell Biochem*, 2008, 104(1): 329-338.
- [34] Ramirez SH, Fan S, Zhang M, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) decreases inflammatory responses in brain endothelial cells[J]. *Am J Pathol*, 2010, 176(2):881-892.
- [35] Levi M. The coagulant response in sepsis and inflammation [J]. *Haemostaseologie*, 2010, 30(1):10-12, 14-16.
- [36] 李旭, 马晓春. 脓毒症内皮细胞损伤和凝血功能障碍相关的生物标志物[J]. *中国危重病急救医学*, 2011, 23(2): 117-121.
- [37] Semple JW, Italiano JE Jr, Freedman J. Platelets and the immune continuum[J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(4):264-274.
- [38] 孙艳, 孙炳伟. 膜糖蛋白活化、造血系细胞特异蛋白-1 磷酸化与脓毒症时血小板功能异常的关系研究进展 [J]. *江苏大学学报(医学版)*, 2011, 21(6):544-548.
- [39] Li Z, Delaney MK, O'Brien KA, et al. Signaling during platelet adhesion and activation [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(12):2341-2349.
- [40] Tohyama Y, Yamamura H. Protein tyrosine kinase, syk: a key player in phagocytic cells[J]. *J Biochem*, 2009, 145(3):267-273.
- [41] Son YO, Wang L, Poyil P, et al. Cadmium induces carcinogenesis in BEAS-2B cells through ROS-dependent activation of PI3K/AKT/GSK-3 β /catenin signaling [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012, 264(2):153-160.
- [42] Gosens R, Meurs H, Schmidt M. The GSK-3/ β -catenin-signalling axis in smooth muscle and its relationship with remodelling [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2008, 378(2):185-191.
- [43] Li D, August S, Woulfe DS. GSK3 β is a negative regulator of platelet function and thrombosis [J]. *Blood*, 2008, 111(7):3522-3530.
- [44] O'Brien KA, Gartner TK, Hay N, et al. ADP-stimulated activation of Akt during integrin outside-in signaling promotes platelet spreading by inhibiting glycogen synthase kinase-3 β [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(9):2232-2240.
- [45] Joo SJ. Mechanisms of Platelet Activation and Integrin α II β 3 [J]. *Korean Circ J*, 2012, 42(5):295-301.
- [46] O'Brien KA, Stojanovic-Terpo A, Hay N, et al. An important role for Akt3 in platelet activation and thrombosis [J]. *Blood*, 2011, 118(15):4215-4223.
- [47] Gambaryan S, Kobsar A, Rukoyatkina N, et al. Thrombin and collagen induce a feedback inhibitory signaling pathway in platelets involving dissociation of the catalytic subunit of protein kinase A from an NF κ B-I κ B complex [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(24):18352-18363.
- [48] Medina M, Avila J. Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease [J]. *Curr Pharm Des*, 2010, 16(25):2790-2798.
- [49] Steele BM, Harper MT, Macaulay IC, et al. Canonical Wnt signaling negatively regulates platelet function[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(47):19836-19841.
- [50] Kumari S, Dash D. Regulation of β -catenin stabilization in human platelets[J]. *Biochimie*, 2013, 95(6):1252-1257.
- [51] MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases[J]. *Dev Cell*, 2009, 17(1): 9-26.
- [52] Clevers H, Nusse R. Wnt/ β -catenin signaling and disease [J]. *Cell*, 2012, 149(6):1192-1205.
- [53] Zhai P, Sciarretta S, Galeotti J, et al. Differential roles of GSK-3 β during myocardial ischemia and ischemia/reperfusion[J]. *Circ Res*, 2011, 109(5):502-511.
- [54] Juhaszova M, Zorov DB, Yaniv Y, et al. Role of glycogen synthase kinase-3 β in cardioprotection [J]. *Circ Res*, 2009, 104(11): 1240-1252.
- [55] Yuskaitis CJ, Jope RS. Glycogen synthase kinase-3 regulates microglial migration, inflammation, and inflammation-induced neurotoxicity[J]. *Cell Signal*, 2009, 21(2):264-273.
- [56] Huang WC, Lin YS, Wang CY, et al. Glycogen synthase kinase-3 negatively regulates anti-inflammatory interleukin-10 for lipopolysaccharide-induced iNOS/NO biosynthesis and RANTES production in microglial cells[J]. *Immunology*, 2009, 128(1 Suppl): e275-286.
- [57] Shang YC, Chong ZZ, Wang S, et al. Erythropoietin and Wnt1 govern pathways of mTOR, Apaf-1, and XIAP in inflammatory microglia[J]. *Curr Neurovasc Res*, 2011, 8(4):270-285.