

• 综述 •

糖尿病治疗新靶点糖原合成酶激酶-3抑制剂的进展

刘率男, 申竹芳*

(中国医学科学院、中国协和医科大学 药物研究所, 北京 100050)

摘要: 糖原合成酶激酶-3 (glycogen synthase kinase-3, GSK-3) 属丝氨酸/苏氨酸类激酶, 最早是作为一种能磷酸化并抑制糖原合成酶活性的蛋白激酶而被发现的。已发现在某些人类疾病中 GSK-3 的活性异常升高, 如糖尿病、阿尔茨海默病及其他一些神经退行性疾病。现已找到了一些小分子 GSK-3 抑制剂主要是通过使 GSK-3 的丝氨酸位点磷酸化, 从而抑制其活性。GSK-3 活性被抑制后, 能影响胰岛素信号传导、葡萄糖代谢及糖原的合成。因此开发 GSK-3 抑制剂已成为研究抗糖尿病药物的一个新思路。本文主要介绍 GSK-3 与糖尿病的联系及近年来 GSK-3 抑制剂在抗糖尿病作用方面的研究进展。

关键词: 糖原合成酶激酶-3; 糖原合成; 胰岛素信号通路; 胰岛素抵抗; 糖尿病

中图分类号: R963 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2007)12-1227-05

A new target for diabetes therapy: advances in the research of glycogen synthase kinase-3 inhibitors

LIU Shuai-nan, SHEN Zhu-fang*

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) is a serine / threonine kinase, originally identified as a protein kinase by its ability to phosphorylate and inactivate glycogen synthase. It was found that the overexpression of GSK-3 is associated with some diseases, such as diabetes, Alzheimer disease and other neurodegenerative diseases. Some pharmacological inhibitors of GSK-3 have been demonstrated to mimic insulin signaling, adjust glycogen synthesis and glucose metabolism, and improve insulin resistance. So GSK-3 inhibitors are realized as a new approach of treating diabetes. This review summarizes current advances in research of GSK-3 inhibitors as a new therapeutic approach for diabetes.

Key words: glycogen synthase kinase-3; glycogen synthase; insulin signaling pathway; insulin resistance; diabetes

糖原合成酶激酶-3 (GSK-3) 是一种多功能的丝氨酸/苏氨酸类激酶^[1], 在真核生物中普遍存在。它能使多种内源性底物磷酸化, 包括代谢及信号传导途径中的蛋白、细胞结构蛋白和转录因子等, 因而在细胞的生长和发育、肿瘤的发生等过程中发挥着重要的调节作用。GSK-3 通过参与多条细胞通路来

调节细胞的功能, 主要包括调节糖原的合成与代谢、参与细胞的分化与增殖、维持细胞的存活等。在某些疾病如 2 型糖尿病、阿尔茨海默病和其他神经退行性疾病的发生发展中 GSK-3 的活性异常升高。研究发现 GSK-3 是胰岛素信号通路中的一个重要的调节因子^[2], 因此在新型抗糖尿病药物的研发中, 以 GSK-3 为靶点寻找其抑制剂已经成为研究抗糖尿病药物的新途径。本文主要介绍 GSK-3 与糖尿病及其抑制剂的抗糖尿病作用研究进展。

收稿日期: 2007-06-04.

* 通讯作者 Tel / Fax: 86 - 10 - 83172669,

E-mail: shenzhf@imm.ac.cn

1 GSK-3简介

1.1 GSK-3的亚型 GSK-3发现于20多年前,因为最早发现它可以使糖原合成酶磷酸化并且失活而被命名为糖原合成酶激酶,它普遍存在于哺乳动物中^[3,4]。其后 Woodgett等^[4]从骨骼肌中分离纯化得到单一的蛋白质组分,并通过分子克隆得到两种亚型,分别是 GSK-3 α 和 GSK-3 β ,这两种亚型的氨基酸序列在催化区有97%的同源性,差别在催化结构域之外的部分,即 GSK-3 α 的N端有一个富含甘氨酸的序列。它们在细胞和组织中广泛存在,具有相似的生物学特性。近年研究表明 GSK-3 β 能磷酸化多种内源性底物,包括代谢与信号传导通路中的多种蛋白、细胞结构蛋白和转录因子等,因而它在细胞的生长、发育、肿瘤发生等过程中发挥重要的调节作用。

目前 GSK-3 β 的完整结构已经确定。全酶的结构包括一小段主要由 β 片层组成的N端叶片(N-lobe)和一大段主要由 α 螺旋组成的C端叶片(C-lobe),两个叶片间形成与ATP结合的囊袋,即 GSK-3 β 与初始磷酸化底物结合的位点^[5]。

1.2 GSK-3的调节及其生理作用 GSK-3与其他激酶不同,它在细胞中是组成型表达的。其活性受到细胞外许多信号因子调节,如胰岛素、内皮生长因子(EGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)以及 Wnt 配体等。这些信号因子会使 GSK-3的N末端结构域中的丝氨酸磷酸化(GSK-3 α 的 Ser21和 GSK-3 β 的 Ser9)。体内的多条信号途径都会通过活化不同的蛋白激酶使 GSK-3磷酸化而调节它的活性。

另外, GSK-3属蛋白激酶,可使多种内源性底物磷酸化。如它能使糖原合成酶磷酸化,从而抑制其活性;它能磷酸化多种转录因子如 c-Jun、CAAT 增强子结合蛋白 α (C/EBP α)以及 NF-ATc等,从而降低它们与 DNA 的结合活性,调节许多基因的转录及表达;它还能使胰岛素受体底物-1(IRS-1)磷酸化,从而抑制胰岛素信号传导途径,削弱胰岛素的作用。因此 GSK-3在多种细胞信号通路中都起到一个关键性的负调节作用^[6]。

2 GSK-3与糖尿病

2.1 GSK-3与胰岛素信号通路 胰岛素受体底物(IRS)是胰岛素信号传导的重要介质。其中 IRS-1主要介导胰岛素在外周组织的效应; IRS-2主要介导胰岛素在肝脏的作用,调节 β 细胞分泌功能并对 β 细胞发育有重要影响。

GSK-3是体内第一种被证实的 IRS-1 激酶。它

可以使 IRS-1 中多个丝氨酸残基磷酸化,从而削弱胰岛素信号通路的传导。GSK-3在体内是组成型表达,并在无任何外界刺激下维持 IRS-1 的磷酸化,因此它在胰岛素信号通路中起到一种“gatekeeper”的作用,即无胰岛素信号刺激时, GSK-3 维持着 IRS-1 的磷酸化,抑制胰岛素信号传导;当存在胰岛素信号时, GSK-3 的活性被抑制,此时 IRS-1 通过自身磷酸化介导胰岛素信号通路向下流的传导,促进糖原及蛋白质的合成。因此, GSK-3 对胰岛素信号传导起重要的调节作用,能够影响胰岛素发挥正常作用,参与胰岛素抵抗的发生和发展。

在胰岛素抵抗或2型糖尿病患者的骨骼肌中可观察到 GSK-3 的表达升高,提示过度表达的 GSK-3 可能使 IRS-1 磷酸化,削弱胰岛素信号的传导,最终导致胰岛素抵抗。Dokken等^[7]在研究中发现选择性的 GSK-3 抑制剂可以解除 GSK-3 对 IRS-1 的抑制作用,通过上调 IRS-1 水平调节胰岛素信号的传导,增强胰岛素的作用,从而改善大鼠肌肉组织的胰岛素抵抗状态。

2.2 GSK-3与糖代谢 GSK-3属胰岛素受体后信号蛋白,是胰岛素刺激的糖原、蛋白质合成过程中的重要调节因子。GSK-3能够影响糖原合成、糖异生、葡萄糖转运和摄取等多个糖代谢途径。Pearce等^[8]发现雄性小鼠肌肉组织中的 GSK-3 β 过量表达时表现为糖耐量异常。

GSK-3通过使糖原合成酶磷酸化而抑制其活性,使糖原合成减少。因此通过抑制 GSK-3 的活性,使糖原合成酶活性增加,促进细胞外葡萄糖向糖原的转化,可以降低血糖。

Lochhead等^[9]证实 GSK-3 能够调节肝脏糖异生途径中的限速酶——磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PEPCK)和葡萄糖-6磷酸酶(G6P)的基因表达,从而影响糖异生途径。其中 G6P是控制机体葡萄糖稳态的一个关键酶,也是糖异生和糖原分解中最后一步反应的限速酶,其活性变化直接影响内源性糖的输出。

许多研究显示 GSK-3 抑制剂可以促进大鼠骨骼肌细胞膜上葡萄糖转运体-4(GLUT4)的转位,如化合物 CT-98014、CT-118637 可以通过增加肌细胞表面的 GLUT4 蛋白的转位,从而提高 ZDF 大鼠骨骼肌中胰岛素刺激的葡萄糖转运。这可能与 GSK-3 抑制剂解除 GSK-3 对 IRS-1 的抑制作用有关,激活其下游的 PI3-K,从而增加了 GLUT4 的转位^[10]。

因此, GSK-3可以从糖原合成、葡萄糖转运及糖异生等方面影响机体糖代谢过程。其抑制剂可以通过对 GSK-3活性的抑制,从而调节糖代谢,改善糖尿病动物模型的糖耐量异常^[11]。

2.3 GSK-3与胰岛素抵抗 胰岛素抵抗指胰岛素的靶组织对胰岛素的反应性降低,它是 2型糖尿病的病理基础和显著特征。经典的胰岛素抵抗主要表现在胰岛素的外周抵抗,尤其是肌肉和脂肪组织对葡萄糖摄取的减少。

2型糖尿病动物模型中,肌肉组织糖原合成酶活性明显被抑制且糖原的合成减少,这些结论说明在胰岛素抵抗状态下可能存在着 GSK-3的调节异常^[12]。另外, GSK-3在调节脂肪生成方面也有一定的作用。它可以使 C/EBP α 磷酸化,而这个转录因子可以调节与前脂肪细胞分化相关基因的表达。胰岛素能够调节 GSK-3的磷酸化,诱导 C/EBP α 的去磷酸化,调节前脂肪细胞的分化。体外研究发现 GSK-3抑制剂锂离子也可以抑制 3T3-L1 前脂肪细胞的分化^[13]。说明 GSK-3可能是胰岛素抵抗诱导的脂肪堆积的重要介导因子之一。

2型糖尿病中与 GSK-3活性异常相关的组织主要是脂肪和肌肉,糖尿病肥胖小鼠模型的脂肪组织中 GSK-3的活性是对照组的两倍^[14];另外 2型糖尿病患者的肌肉组织中, GSK-3的活性和表达水平也显著升高。GSK-3活性的显著升高能够导致胰岛素作用的减弱,因此 GSK-3可能参与 2型糖尿病外周组织胰岛素抵抗的发生发展过程。

胰岛素抵抗大鼠在给予饮食控制和运动锻炼后,其骨骼肌中 GSK-3含量明显下降,提示了抑制 GSK-3活性可能是饮食控制和运动疗法改善胰岛素抵抗的机制之一。骨骼肌中 GSK-3表达下降从而降低其对胰岛素信号传导的抑制,促进糖原合成,增加葡萄糖向组织中的转运而使血糖下降。

2.4 GSK-3与胰岛 β 细胞 在糖尿病的治疗中,为了降低糖尿病并发症的发病率及致死率,除了严格控制血糖升高及改善体内糖脂代谢的紊乱,还可通过改善胰岛 β 细胞功能来缓解由于自身免疫引起胰岛损伤的 1型糖尿病患者的病情,也有利于 2型糖尿病患者的治疗及恢复。

Marcus等^[15]发现,小分子的 GSK-3抑制剂可以增加正常胰岛 β 细胞及胰岛瘤细胞 INS-E的复制,并能提高胰岛 β 细胞的存活率,增加胰岛素分泌量。适当浓度的 CHIR99021、6-bromoinhibin-3'-oxime (BIO)、1-azakenpauillone等小分子 GSK-3抑制

剂,作用于高糖浓度下的 INS-E细胞时,均可降低 DNA的裂解及 caspase的活性,减少细胞凋亡。另外 GSK-3活性被抑制后胰岛素信号传导增强,通过激活 PI3-K/Akt信号途径,可以使 INS-E细胞的增殖率增加 2~3倍,并且提高细胞的净生长量。这可能与 PI3-K/Akt激活其下游的 GIP、GLP-1、IGF-1等蛋白的表达有关,表明 GSK-3抑制剂还有类似于生长因子的作用,刺激胰岛细胞的增殖。

3 GSK-3抑制剂

以往研究发现,糖尿病及肥胖模型小鼠的 GSK-3表达水平及活性均有增加,同时也发现了一些具有抑制 GSK-3活性作用的化合物,它们在体内均具有一定的胰岛素样作用。这提示研究 GSK-3抑制剂可能成为开发抗糖尿病药物的一条新途径。

最先发现的 GSK-3抑制剂是锂离子, Klein和 Melton于 1996年首次报道了锂可选择性抑制 GSK-3。细胞水平研究表明,锂离子能够调节 3T3-L1 前脂肪细胞及大鼠脂肪细胞中的糖摄取,增加 GLUT4的转位,并且能够增加大剂量胰岛素刺激下的糖摄取。但锂离子刺激葡萄糖摄取的机制尚未清楚。目前锂已作为一种非常有效的工具药,用于研究 GSK-3被抑制后细胞功能的改变及其广泛的生物学功能。

近年来,随着对 GSK-3抑制剂的深入研究,已发现 30多种小分子化合物均具有一定的 GSK-3抑制作用。多数 GSK-3抑制剂具有以下几种特征,(1)相对分子质量较小(<600);(2)多数是平面疏水性杂环结构;(3)除锂离子外,大部分化合物为 ATP竞争型,主要是通过 ATP竞争结合于酶的 ATP结合位点而抑制 GSK-3的活性;锂离子是直接和镁离子竞争结合,使酶的活性被抑制;(4)与大多数激酶的抑制剂相似, GSK-3的抑制剂主要通过疏水端与激酶中的数个氢键结合,从而起到抑制作用。已发现的化合物中,部分小分子 GSK-3抑制剂在细胞或动物水平上都有一定的胰岛素样作用。

Gary等^[16]对氨基嘧啶类化合物如 CHIR98014、CHIR98023的研究时发现,氨基嘧啶类 GSK-3抑制剂能降低糖异生相关的 PEPCK和 G6P的表达,从而抑制肝糖输出。另外这两种化合物都能促进骨骼肌细胞上的 GLUT4转位,并且增加肝糖原的合成,从而显著降低 Zucker糖尿病肥胖大鼠的空腹血糖并改善其口服糖耐量异常。众所周知,在糖尿病的

发生发展过程中,肝糖原合成和肝糖输出显著异常,而氨基嘧啶类 GSK-3 抑制剂可以从这两个环节加以调节,发挥其抗糖尿病作用。

GSK-3 两种亚型 GSK-3 α 和 GSK-3 β 的 ATP 结合袋的结构域同源性较大,针对此结构域的多数 ATP 竞争型 GSK-3 抑制剂,无法区分这两种亚型。Coghlan 等^[17]找到的两种马来酰胺类的抑制剂 SB-216763 和 SB-41528629,在分子水平比较特异地抑制 GSK-3 β 的活性。体外实验中发现,它们能使大鼠 L6 骨骼肌细胞中糖原合成增加 6.8 倍。也能增加 3T3-L1 前脂肪细胞中糖原的合成。说明此类 GSK-3 抑制剂在细胞水平上具有类似胰岛素样作用。

ATP 竞争型的 GSK-3 抑制剂可能对其他激酶也有不同程度的抑制作用,从而产生一些不期望的作用。Batyra 等^[18]研究的特异性底物竞争型多肽类抑制剂 L803-m ts,通过特殊肽段结合序列特异性地与 GSK-3 的催化结构域结合,而特异抑制 GSK-3 活性,但对其他激酶如蛋白激酶 B 和蛋白激酶 C 等无抑制作用。实验研究中观察 L803-m ts 可以产生胰岛素样作用,增加 HEK293 细胞中糖原的合成,并且能促进小鼠脂肪细胞的糖摄取。动物实验中发现 L803-m ts 能够提高高脂饲料喂养的 C57 糖尿病小鼠的胰岛素敏感性,从而改善胰岛素抵抗状态^[19]。所以研究多肽类 GSK-3 抑制剂是开发特异性抑制剂的新方向。

GSK-3 抑制剂对 GSK-3 α 和 GSK-3 β 两种亚型的选择性也决定了其能否长期应用。已发现的 GSK-3 β 的选择性抑制剂 AR-A014418^[20],长期应用时可激活 NF- κ B,并减弱细胞在炎症状态下的生存能力^[21]。但是对于小分子化合物来说,让其能够选择性抑制结构域如此高同源性的两个蛋白也是很困难的,因此在今后的研究中可以考虑应用反义 RNA 或 RNA 干扰手段进行抑制^[22]。

4 结论和展望

迄今发现的大多数 GSK-3 小分子抑制剂都能增加糖尿病动物模型中糖原合成酶的活性,并且在动物模型上这些 GSK-3 抑制剂可以抑制肝糖输出,促进外周组织对葡萄糖的利用^[23]。中国医学科学院药物研究所合成药物化学研究室也对 GSK-3 抑制剂进行了初步探索和研究,在体外实验中,发现一些化合物具有一定的 GSK-3 抑制活性。

目前 GSK-3 抑制剂均处在临床前研究阶段,其原因可能是 GSK-3 被抑制后不仅影响到糖原合成,

还可能会影响到其他如 Wnt 通路等细胞内的信号通路。作为治疗糖尿病药物时,长期应用 GSK-3 抑制剂可能会产生一定的不良作用,因此将 GSK-3 抑制剂作为一种新型抗糖尿病药物来开发,还需进行更加深入且系统的研究。从积极的一面来看,在一些糖尿病动物模型上,长期应用 GSK-3 抑制剂并没有观察到致癌现象,这可能与 GSK-3 受到长期的、温和的抑制作用有关。一定程度的抑制作用可以提高肝脏或肌肉组织对胰岛素的敏感性,但不会引起细胞的分化与增殖的激活。

GSK-3 作为一个新的靶点是近年生物学及创新药物研究的热点,虽然目前国内外对于该类抑制剂的研究大多仍处于实验室阶段,但现已发现它在糖尿病的发生发展过程中扮演重要角色。随着对 GSK-3 在体内影响细胞内信号通路广泛性的了解,以及对其抑制剂抗糖尿病作用机制的深入阐明,结合特异性抑制剂的研发以及计算机辅助设计在药物研究中的应用,以 GSK-3 为靶点来开发新型的抗糖尿病药物将是未来的研究方向之一,也势必会带来一些新的收获。

References

- [1] Cohen P, Yellowlees D, Aitken A, et al. Separation and characterisation of glycogen synthase kinase 3, glycogen synthase kinase 4, glycogen synthase kinase 5 from rabbit skeletal muscle [J]. *Eur J Biochem*, 1982, 124: 21 - 35.
- [2] Cohen P, Nimmo HG, Proud CG. How does insulin stimulate glycogen synthesis [J]. *Biochem Soc Symp*, 1978, 43: 69 - 95.
- [3] Kockeritz L, Doble B, Patel S, et al. Glycogen synthase kinase-3, an overview of an overachieving protein kinase [J]. *Curr Drug Targets*, 2006, 7: 1377 - 1388.
- [4] Woodgett JR. cDNA cloning and properties of glycogen synthase kinase-3 [J]. *Methods Enzymol*, 1991, 200: 564 - 577.
- [5] Noble ME, Endicott JA, Johnson LN, et al. Protein kinase inhibitors: insights into drug design from structure [J]. *Science*, 2004, 303: 1800 - 1805.
- [6] Frame S, Cohen P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery [J]. *Biochem J*, 2001, 359: 1 - 16.
- [7] Dokken BB, Sloniger JA, Henriksen EJ. Acute selective glycogen synthase kinase-3 inhibition enhances insulin signaling in prediabetic insulin-resistant rat skeletal muscle [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005, 288: 1188 - 1194.

- [8] Pearce NJ, Arch JC, Clapham MP, et al. Development of glucose intolerance in male transgenic mice overexpressing human glycogen synthase kinase-3 on a muscle-specific promoter [J]. *Metabolism*, 2004, 53: 1322 - 1330.
- [9] Lochhead PA, Coghlan M, Rice SQ, et al. Inhibition of GSK-3 selectively reduces glucose-6-phosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression [J]. *Diabetes*, 2001, 50: 937 - 946.
- [10] Kim YB, Peroni OD, Aschenbach WG, et al. Muscle-specific deletion of the Glut4 glucose transporter alters multiple regulatory steps in glycogen metabolism [J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 11: 9713 - 9723.
- [11] Henriksen EJ, Dokken BB. Role of glycogen synthase kinase-3 in insulin resistance and type 2 diabetes [J]. *Curr Drug Targets*, 2006, 7: 1435 - 1441.
- [12] Dokken BB, Henriksen EJ. Chronic selective glycogen synthase kinase-3 inhibition enhances glucose disposal and muscle insulin action in pre-diabetic obese Zucker rats [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006, 291: 209 - 213.
- [13] Rao R, Zhang MZ, Zhao M, et al. Lithium treatment inhibits renal GSK-3 activity and promotes cyclooxygenase 2-dependent polyuria [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005, 288: 642 - 649.
- [14] Ozanne SE, Jensen CB, Tingey KJ, et al. Decreased protein levels of key insulin signalling molecules in adipose tissue from young men with a low birthweight-potential link to increased risk of diabetes [J]. *Diabetologia*, 2006, 49: 2993 - 2999.
- [15] Marcus G, Friedrich H. Inhibitor of glycogen synthase kinase (GSK) 3 promotes replication and survival of pancreatic beta cells [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282: 12030 - 12037.
- [16] Gary WC, Kirk J, Wemer R, et al. Effects of a novel glycogen synthase kinase-3 inhibitor on insulin-stimulated glucose metabolism in Zucker diabetic fatty (fa/fa) rats [J]. *Diabetes*, 2002, 51: 2903 - 2910.
- [17] Coghlan MP, Culbert AA, Cross DA. Selective small molecular inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and transcription [J]. *Chem Biol*, 2000, 7: 793 - 803.
- [18] Batya P, Oksana K. Insulin mimetic action of synthetic phosphorylated peptide inhibitors of glycogen synthase kinase-3 [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003, 305: 974 - 980.
- [19] Rao R, Hao CM, Redha R, et al. Glycogen synthase kinase 3 inhibition improves insulin-stimulated glucose metabolism but not hypertension in high-fat-fed C57BL/6J mice [J]. *Diabetologia*, 2007, 50: 452 - 460.
- [20] Murray JT, Campbell DG, Morrice N, et al. Exploitation of KESTREL to identify NDRG family members as physiological substrates for SGK1 and GSK3 [J]. *Biochem J*, 2004, 384: 477 - 488.
- [21] Schwabe RF, Brenner DA. Role of glycogen synthase kinase-3 in TNF-alpha-induced NF-kappaB activation and apoptosis in hepatocytes [J]. *Liver Physiol*, 2002, 283: 204 - 211.
- [22] Yu JY, Taylor J, DeRuiter SL, et al. Enhancement of RNAi activity by improved siRNA duplexes [J]. *Mol Ther*, 2003, 7: 228 - 236.
- [23] Kaidanovich-Beilin O, Eldar-Finkelman H. Long-term treatment with novel glycogen synthase kinase-3 inhibitor improves glucose homeostasis in ob/ob mice: molecular characterization in liver and muscle [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 316: 17 - 24.

《药学报》荣获第六届“百种中国杰出学术期刊”称号

《药学报》于 2002 ~ 2006 年连续荣获“百种中国杰出学术期刊”称号。根据中国科学技术研究所 2007 年 11 月 15 日发布的信息,本刊又获得第六届“百种中国杰出学术期刊”称号。