

综述

细胞周期蛋白依赖性激酶2的功能及其抑制剂的研究

郑楠^{1,2,3} 徐扬^{1,2,3*}¹辽宁师范大学, 生命科学学院, 大连 116081; ²辽宁师范大学, 七鳃鳗研究中心, 大连 116081;³大连工业大学, 海洋食品精深加工关键技术省部共建协同创新中心, 大连 116034)

摘要 细胞周期蛋白依赖性激酶2(cyclin-dependent kinase 2, CDK2)是CDK家族中的重要成员之一。CDK2的表达或功能异常与多种疾病(如肿瘤、病毒复制与感染、免疫缺陷性疾病和雄性不育等)发生机制密切相关。CDK2抑制剂已成为抗肿瘤药物研发中的一个重要靶点。该文对CDK2在细胞周期调控、细胞增殖、细胞分化、细胞凋亡中的作用机制以及CDK2抑制剂的研发进行综述。

关键词 细胞周期蛋白依赖性激酶2; 细胞周期; CDK2抑制剂

Studies on Protein Function of Cyclin-Dependent Kinase 2 and Its Inhibitors

ZHENG Nan^{1,2,3}, XU Yang^{1,2,3*}¹College of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian 116081, China;²Lamprey Research Center, Liaoning Normal University, Dalian 116081, China;³Collaborative Innovation Center of Seafood Deep Processing, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China)

Abstract CDK2 (cyclin-dependent kinase 2) is one of the most important members of the CDK family. The abnormal expression or function of CDK is closely related to the pathogenesis of various diseases, such as tumors, viral replication and infection, immunodeficiency diseases, and male sterility. CDK2 inhibitors have been become a very attractive target in the research of anti-tumor drugs. Here, this article reviewed the mechanisms of CDK2 in cell cycle regulation, cell proliferation, cell differentiation and cell apoptosis, as well as the development of CDK2 inhibitors.

Keywords CDK2 (cyclin-dependent kinase 2); cell cycle; CDK2 inhibitors

自上世纪70年代, 哺乳动物的细胞周期调控机制已逐渐被明晰。细胞周期的完成, 主要依赖于细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)的激活与表达。CDK属于丝/苏氨酸蛋白激酶家族,

是一类相对较小的蛋白质, 分子量仅有30~45 kDa, 包括200~350个氨基酸。目前, 已发现有13个CDK家族成员(CDK1~13), 根据每种CDK发挥的特定生物学作用, 大体分为两类: 一类主要参与细胞周期调

收稿日期: 2020-11-23 接受日期: 2021-01-18

2020年大连市青年科技之星(批准号:72)、辽宁省教育厅自然科学类青年育苗项目(批准号: LQ2019026)、辽宁师范大学教师指导本科生科研训练项目(批准号: CX202002045)、辽宁师范大学校级大学生创新创业训练计划项目(批准号: 118)、中国博士后科学基金(批准号: 2017M611257)和国家自然科学基金(批准号: 31501911)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0411-85827065, E-mail: yangxu2017@163.com

Received: November 23, 2020 Accepted: January 18, 2021

This work was supported by Young Star of Science and Technology of Dalian in 2020 (Grant No.72), the Seedling Raising Project of Young Scientific and Technological Talents of Liaoning Provincial Department of Education (Grant No.LQ2019026), the Project of Teachers Guiding Undergraduate Scientific Research training of Liaoning Normal University (Grant No.CX202002045), the Training Program of Innovation and Entrepreneurship for College Students of Liaoning Normal University (Grant No.118), the Chinese Postdoctoral Science Foundation (Grant No.2017M611257), and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31501911)

*Corresponding author. Tel: +86-411-85827065, E-mail: yangxu2017@163.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5513>

控,包括CDK1、CDK2、CDK4、CDK6等。CDK2和CDK4主要作用于细胞周期的G₁期和S期,启动DNA复制,诱发有丝分裂;另一类主要参与转录调节,包括CDK3、CDK7、CDK8、CDK9、CDK10。CDK7、CDK8、CDK9与不同的周期蛋白结合,通过调节RNA聚合酶II的磷酸化修饰调控细胞周期相关基因的转录过程。CDK11结合相应的周期蛋白,在RNA剪切中发挥作用^[1]。

CDK2是CDK中的一个高度保守的亚型,在真核细胞中,CDK2主要分布在细胞质、中心体、细胞核、高尔基体、细胞质膜以及核内体中。CDK2定位于12号染色体(12q13),由298个氨基酸组成,其cDNA全长约为897个碱基,相对分子量为33 kDa。CDK2由氨基酸残基互相交替折叠成的2个叶片组成,小叶为体积较小的N末端,由1~82位氨基酸组成5个反向平行 β 折叠和1个 α 螺旋;大叶为体积较大的C末端,主要由83~297位氨基酸组成6个 α 螺旋和1个小 β 折叠。两叶通过一段有弹性的铰链区相连^[2],两叶之间有1个裂口,包含由Lys33和Asp145调节的ATP结合位点、催化中心和镁离子螯合位点。CDK2还含有一小段序列相当保守,称为PSTAIRE序列。该基序富含甘氨酸,包含Thr14和Tyr15,非常接近ATP的 γ -磷酸,促进磷酸化并与周期蛋白结合^[2]。基于CDK2的特定结构及其专属的蛋白功能,本文从以下几方面进行综述。

1 CDK2在细胞周期中的作用

1.1 细胞周期中的关键因子

细胞周期调控依赖的调控因子主要有三大类:CDK、细胞周期蛋白(cyclin)、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂(cyclin-dependent kinase inhibitor, CDKI)^[3]。

细胞周期的正常运转主要依赖于各种CDK的时相性激活和其对相应底物的磷酸化修饰。而这些蛋白激酶的激活,取决于一类呈细胞周期特异性累积表达与分解的蛋白质——cyclin。即细胞周期的调控主要依赖于cyclin与CDK组成的蛋白激酶复合物来完成。CDK-cyclin复合物是活性激酶^[4-5]。1983年发现第一个cyclin,之后在真核生物细胞中又陆续发现了cyclin A~H。不同的cyclin在细胞周期不同时段中出现。其中,cyclin D在G₁/S期表达;cyclin A在S期表达;cyclin B在G₂/M期表达;cyclin C、cyclin E在

G₁期各有不同的表达;cyclin E在静止期表达。由于在cyclin E缺失时,即使其他cyclin和相关CDK处于正常水平,静止期细胞也不能从G₀进入S期^[6],因此保持cyclin E含量的正常水平,不仅是细胞周期有序进行的关键,而且也是细胞周期G₁/S期过渡的关键限制因素。

CDKI属于细胞周期的负调控因子,主要归为Cip/Kip家族和INK4家族。Cip/Kip家族成员主要有p21^{WAF1/cip1}、p27^{cip1}、p57^{kip2}等抑制因子。这些抑制因子一方面通过与cyclin的竞争,单独与CDK结合,抑制cyclin的作用,阻滞细胞周期;另一方面也可与cyclin-CDK复合物结合,对CDK起到抑制作用,干扰细胞周期^[3]。

1.2 细胞周期调控机制核心——CDK2

在有丝分裂信号刺激下,G₁早期CDK4/6与cyclin D结合形成的复合物,初步磷酸化成为视网膜母细胞瘤蛋白(retinoblastoma protein, pRb),促使细胞释放出少量的转录因子E2F。G₁晚期E2F进入细胞核内激活cyclin E和cyclin A转录,CDK2在整个细胞周期中稳定持续表达。而单独的CDK2通常是没有活性的。CDK2的激活主要有两种机制:(1)与细胞周期各时相对应的cyclin结合形成异源二聚体,这是激活CDK2的首要条件;(2)形成二聚体复合物后,wee1激酶和CDK活化激酶(CDK-activating kinase, CAK)会磷酸化CDK2第14位的苏氨酸(Thr14)、第15位的酪氨酸(Tyr15)和第161位的苏氨酸(Thr161),但此时CDK2仍不具有激酶活性,尚需蛋白磷酸水解酶cdc25A去磷酸化Thr14和Tyr15,彻底激活CDK2。活化的cyclin E-CDK2复合物协同磷酸化的底物因子(如Rb、cdc6、NPAT和P107等),促使细胞通过G₁/S检验点,驱动细胞正常分裂,顺利进入S期。若此时细胞周期检验点出现DNA受损或复制异常,CDKI则被激活,使cyclin E-CDK2复合物失去活性,相应底物不能磷酸化,细胞周期暂时停滞,等待相关因子修复受损细胞后,再重新进入细胞周期。在S期,cyclin E含量达到最高峰值,随后cyclin E-CDK2复合物通过S期激酶相关蛋白2(S-phase kinase-associated protein 2, Skp2)和SCF复合体(一种F-box蛋白)形成Skp2-SCF,介导泛素化降解,cyclin E开始减少,最终消失。同时由cyclin A取代cyclin E与CDK2结合,启动DNA复制。DNA复制结束后,细胞通过S期检验点进入G₂期,cyclin B与CDK1结合,形成分裂促进

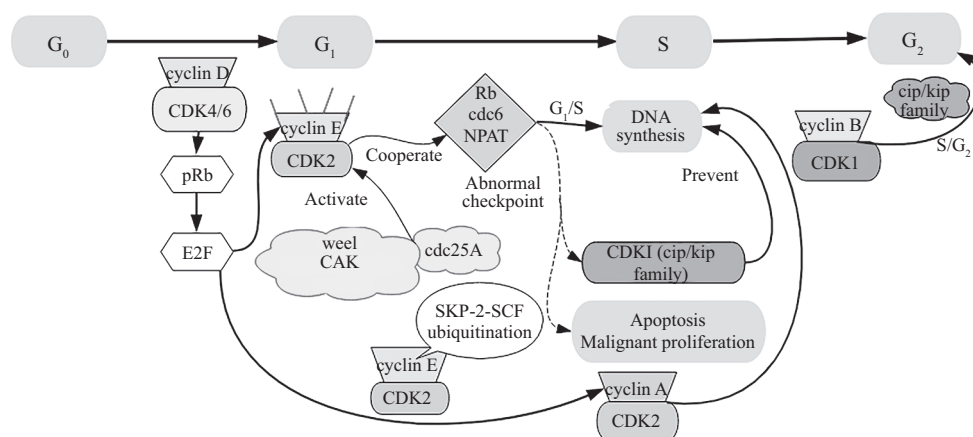


图1 CDK2调节有丝分裂过程(根据参考文献[93]修改)

Fig.1 Regulation of CDK2 in process of mitosis (modified from reference [93])

因子(mitosis-promoting factor, MPF), MPF被活化后, 细胞进入M期, 完成细胞有丝分裂的所有过程(图1)。

2 CDK2在细胞增殖中的作用

细胞增殖是高度受控的细胞生命活动过程。CDK2在细胞内通常保持无活性状态, 但在与 cyclin E(E1、E2)、cyclin A(A1、A2)以及CDK抑制剂p21、p27和p57等相互作用时, 会呈现波动变化。Foxo 环状RNA(circ-Foxo3)通过与p21(CDK2抑制剂)和CDK2形成三元复合物, 可延缓细胞增殖, 主要是因为circ-Foxo3与p21和CDK2的相互作用, 增强了p21与细胞核中cyclin E/A和CDK2结合, 形成的cyclin E/A-CDK2复合物具有催化活性^[7]。PRR14基因沉默后, 通过增加p21和p27的表达, 降低CDK2的mRNA和蛋白质水平, 引起细胞周期G₁期阻滞^[8]。此外, CDK2与特定癌症类型的增殖有着直接联系。单核细胞趋化蛋白1-诱导蛋白1在人神经母细胞瘤细胞中过表达, 通过降低cyclin A、cyclin B、cyclin D、cyclin E表达, CDK2和CDK4以及pRb的磷酸化水平阻断细胞G₁/S周期检查点, 可引起癌细胞在G₁期停滞^[9]。WTAP(wilms' tumor 1-associating protein)对肾癌细胞有促进增殖作用, 其中CDK2的表达与WTAP的表达呈显著正相关性。WTAP与CDK2转录本的3'-UTR结合, 增强了CDK2的表达和mRNA的稳定性, 从而显示出协同的致癌作用^[10]。神经性戊聚糖1(neuronal pentraxin 1, NPTX1)过度表达会抑制结肠癌细胞中cyclin A-CDK2的活性, 下游细胞周期磷酸化过程受阻, 进而抑制增殖^[11]。另外, 高三尖杉酯通过抑制

胰岛素受体底物4(insulin receptor substrate 4, IRS4)蛋白质水平的表达, 抑制PI3K/AKT通路的激活, 进而抑制cyclin E-CDK2的激活, 使细胞周期阻滞在G₀/G₁期, 从而有效地抑制了黑色素瘤耐药细胞A375R的增殖^[12]。可见, CDK2通常具有促进细胞增殖的作用。

然而, CDK2并非对于所有细胞的增殖都是必需的, 如CDK2的缺失并没有改变多囊肾病引起的肾囊肿的形成和生长^[13], CDK2、CDK4、CDK6三重敲除的小鼠胚胎仍能正常地生长发育^[14]。已证实, CDK1在CDK2不存在时, 可补偿其正常活性。CDK1对CDK2、CDK4、CDK6功能的补偿是CDK2缺陷型细胞可以继续增殖的原因^[15], CDK1可结合cyclin E并重塑CDK2的功能。敲除CDK2也会导致CDK1的早期转录激活^[16]。因此, 推测CDK1可能对体细胞增殖有独特作用, 而CDK2除具有促进细胞增殖的功能外, 还应探究其他生物学功能。

3 CDK2在细胞分化中的作用

在人体各种状态和不同类型的细胞中, 细胞分化具有维持终末分化的不可逆性、阻断细胞永生化和肿瘤发生的作用。细胞增殖和分化在正常发育过程中呈负相关, 因此细胞退出细胞周期是进行终末分化的必要步骤。如肠上皮细胞进行分化时, 必须在抑制肠上皮细胞G₁期增殖的基础上才能完成其终末分化, 而过表达CDK2对上皮细胞的分化起到抑制信号通路的作用^[17]。PI3K(磷脂酰肌醇-3激酶)/AKT(蛋白激酶B)/FOXO1(forkheadO1)/p27(CDK2内源性抑制剂)信号通路具有促进细胞生长增殖, 诱

导分化等作用。从机理上讲, cyclin E1、CDK2是PI3K/AKT信号通路的下游蛋白质, 因此抑制cyclin E1/CDK2的激活可将细胞周期阻滞在G₁期, 诱导分化^[18]。一种全反式维甲酸衍生物ATPR(4-amino-2-trifluoromethyl-phenyl retinate)通过抑制AKT磷酸化, 在蛋白质和mRNA水平上调FOXO1A和p27的表达, 并下调cyclin E和CDK2的蛋白质表达, 诱导人胃癌细胞SGC-7901的细胞阻滞和分化^[19]。可见, CDK2的缺失可能会导致分化途径的重新激活, 这可在治疗急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)良好预后效果中得到验证。AML的一个显著特征是白血病或髓细胞在发育不成熟阶段停止生长。YING等^[20]发现, CDK2通过激活PRDX₂抑制髓细胞的分化, 而当泛素连接酶KLHL6使其发生蛋白酶体降解时, 可有效地诱导5个主要患者来源的AML样品的粒细胞分化。只有CDK2发生泛素依赖的蛋白酶体降解, 才伴有AML细胞分化, 因此抑制CDK2是克服分化阻滞的关键策略, 且该方法已成功应用于临床治疗AML。这说明, CDK2具有抑制细胞分化的作用。

AML细胞中CDK2抑制分化的研究, 可指导CDK2抑制剂在白血病靶向新疗法中的未来应用。对CDK2功能的研究, 可与对cyclin的研究平行进行, 但在AML的治疗研究中, CDK2的泛素依赖性蛋白酶体降解方式与cyclin是不相关的。只是, 目前CDK2在这些过程中降低的机制仍然成谜, 还需要更广泛的调查研究。

4 CDK2在细胞凋亡中的作用

细胞周期调控系统通过检验点的方式调控细胞周期, 其间若有细胞损伤, DNA损伤反应(DNA damage response, DDR)将细胞停在G₁/S边界, 以修复受损的DNA, 保持细胞基因组的完整^[21]。研究表明, cyclin和CDK参与了DDR^[22-23]; 在DDR中, CDK2具有独特的作用, 不能被其他CDK所补偿, 因CDK2的敲除会直接导致DNA的损伤^[24]。DDR在G₁/S检验点通过CDK2抑制增殖, 主要有两种机制: (1) p53的积累导致p21转录上调, 随后通过抑制cyclin D1/CDK4和CDK6以及cyclin E-CDK2复合体的活性, 阻滞细胞周期^[25]; (2) 以cdc25A为降解靶点, 导致wee1在Thr14和Tyr15持续抑制CDK2磷酸化, 阻断细胞进入S期^[27]。若损伤严重无法修复细胞, 则发生DDR诱导凋亡。

细胞凋亡受多种细胞信号所调控, 属高度协调的细胞自杀方式。按凋亡信号来源来分, 细胞凋亡途径主要分为两类: (1) 由细胞因子和死亡受体之间相互作用触发而激活caspase-8的外源凋亡途径; (2) 通过线粒体膜通透性改变, 向细胞质中释放细胞色素C(cytochrome C)和多种凋亡因子(如促凋亡蛋白Bax和抗凋亡蛋白Bcl-2)的内源途径^[26]。尽管细胞凋亡的具体机制尚不明晰, 但已证实, 蛋白激酶家族与凋亡过程是密切相关的。这其中比较有代表性的激酶包括但不限于PI3K/AKT信号通路中的激酶(以下游CDK2为主)、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)超家族成员和PKC家族成员以及c-Abl等^[27]。

4.1 CDK2的抗凋亡作用

CDK2在细胞凋亡中的作用(促凋亡或抗凋亡), 已引发广泛的讨论。在很多情况下, CDK2与细胞周期阻滞和抗凋亡密不可分。临床研究已表明, 蒽环类药物化疗, 可导致癌症患者心脏细胞数量减少或者细胞大小减少而萎缩。蒽环类药物阿霉素(Doxorubicin, DOX)可诱导转录因子FOXO1在Ser249发生CDK2活性依赖的磷酸化, 进而导致细胞死亡介体(Bim)转录, Bim与促凋亡靶基因Bcl-2相互作用诱导心肌细胞凋亡和萎缩^[28]。高良姜素(Galangin)对MCF-7人乳腺癌细胞增殖的抑制, 与cyclin D3、cyclin B1、CDK1、CDK2和CDK4蛋白表达下调阻滞细胞周期有关^[29]。泛素连接酶1(constitutive photomorphogenic 1, COP1)介导细胞存活、生长和发育, 与肿瘤抑制因子p53相互作用, 诱导泛素化和降解。用针对COP1短发夹RNA(shRNA)的慢病毒下调COP1表达或沉默COP1, 导致p53活化, 诱导p21表达, 降低CDK2水平, 发生p53依赖的细胞周期阻滞和凋亡^[30]。这表明, CDK2具有抗凋亡作用。扑草净(prometryn)是一种三嗪类轻中度除草剂, 对人体具有致癌性。检测用扑草净处理过的细胞, p53蛋白质表达水平升高, cyclin A和CDK2的表达水平降低, 抗凋亡蛋白Bcl-2的表达明显降低, 促凋亡蛋白Bax的表达明显增加。这证实, 扑草净可能通过影响参与细胞周期调节的关键分子——CDK2和改变Bax/Bcl、caspase 9、caspase 3和PARP等相关蛋白的调控而导致细胞凋亡^[31]。此外, WANG等^[32]发现, 敲除在乳腺癌细胞中高表达的组织蛋白酶L(cathepsin L, CTSL)基因可以阻滞细胞周期和促进凋亡, 进而

减缓乳腺癌的发展。在细胞 G₁/S 期, CTSL 可能是 CDK2-AP1 的上游负调节剂, 它通过蛋白水解作用使 CDK2-AP1 失活, 减弱或逆转其对 CDK2 的抑制作用, 从而导致乳腺癌的发展。这些结果皆清晰地显示, CDK2 在应答细胞凋亡刺激时起负调控作用。

4.2 CDK2 的促凋亡作用

尽管已有研究表明 CDK2 具有抗凋亡作用, 但也有研究显示 CDK2 也具有促凋亡作用。在 DNA 不进行复制时, cyclin A-CDK2 活性在早期凋亡中显著增强, 抑制 CDK2 活性可降低凋亡细胞的数量。例如, 人参二醇通过线粒体膜电位的去极化诱导人肝癌 SK-HEP-1 细胞凋亡, CDK2 活性的快速增强上调与线粒体膜电位去极化密切相关, 导致线粒体中细胞色素 C 从线粒体中释放出来, 激活下游 caspase 级联反应^[33]。另有研究表明, CDK2 在紫杉醇诱导的细胞凋亡过程中, 作用于线粒体中负责调控其通透性的上游蛋白, 致使细胞线粒体膜电位丧失, 同时, cyclin A 的过表达也会协同促进凋亡^[34]。在细胞凋亡过程中, CDK2 活性上调和激活, 主要是通过蛋白水解作用从 cyclin A-CDK2 复合物中消除了 CDK2 抑制剂 p21 的蛋白水解引起的^[34]。CDK2 的激活是耳蜗、肾脏、胸腺和肝脏等受到各种损伤而破坏细胞线粒体通透性所必需的条件之一^[35-37]。例如, 顺铂是一种广泛用于治疗恶性肿瘤的化疗药物, 被列入世界卫生组织的基本药物清单, 但其主要副作用之一就是不可逆转的感觉神经性听力丧失^[38]。TEITZ 等^[39]发现, CDK2 是 kenpaullone (CDK2 和其他激酶抑制剂) 对顺铂诱导的耳蜗细胞损失和噪声诱导的听力损失起保护作用的一个主要的、直接的分子靶点。顺铂诱导后, 通过辅助因子 cyclin A 上调激活 CDK2 活性, 但若 CDK2 的活性被 kenpaullone 抑制或敲除 CDK2 基因, 则会减少顺铂诱导的线粒体活性氧的产生, 减少 caspase-3/7 介导的凋亡激活, 降低细胞凋亡的程度, 减少听力的损伤, 进而表现出更强的抵抗力。同时, 第二代 CDK 抑制剂 AT7519 和 AZD-5438, 均表现出对顺铂诱导的小鼠耳毒性有显著的保护作用^[40], 证明了 CDK2 的促凋亡作用。另外, RYBAK^[41]发现, 抑制 CDK2 对多种耳毒性损伤引起的听力损失均有保护作用, 也证实 CDK2 可能在有丝分裂后的多种细胞类型中具有促凋亡作用。顺铂诱导肾细胞死亡, 主要依赖于 CDK2 的激活, 抑制 CDK2 可免受减少顺铂诱导的细胞凋亡; Bcl-xL (Bcl-2 家族成员) 的 Ser73 被

CDK2 磷酸化, 则是凋亡途径的重要组成部分^[35]。顺铂暴露会引起 Bcl-xL 的 Ser73 被 CDK2 磷酸化, 导致抗凋亡蛋白 Bcl-xL 转变为类似于 Bax/Bak 功能的促凋亡蛋白^[35-36]。在该途径中, 即使没有额外的压力 (如顺铂暴露) 也会导致细胞凋亡。此外, SENG 等^[36]证明, 该途径的上游事件 (即 Bcl-xL 的 Ser73 被 CDK2 磷酸化) 是诱导细胞死亡的必要和充分条件, 而不是 Bcl-xL 随后的裂解产物。

以上这些研究皆表明, 在应答细胞凋亡的外界刺激时, CDK2 可能作为一种新的开关, 具有抗凋亡和促凋亡的双重作用, 可能是由于不同的凋亡信号和外界条件的刺激, 使激活的 CDK2 参与到不同的信号通路中, 磷酸化不同的下游底物, 出现截然相反的作用。CDK2 在某些凋亡途径中的上游作用, 导致线粒体通透性转变促进凋亡, 但是负责连接 CDK2 与下游凋亡途径的信号传导机制尚不清楚。在 DDR 中, CDK2 的活性降低终止了细胞周期, 从而容许 DNA 修复, 但这一过程受到严格控制, 确保剩余的 CDK2 活性足以修复 DNA 损伤; 损伤范围广并超出 CDK2 活性的细胞则会凋亡或衰老^[42]。在修复损伤、衰老和凋亡分叉路中, CDK2 的命运如何? CDK2 调节自身活性低于修复水平, 支持衰老或凋亡的阈值多大? 其机制如何? 尚需进一步探究。

5 CDK2 在疾病中的作用

5.1 CDK2 在肿瘤发生中的作用

癌症是一种细胞生长不受控制的状况, 一般来说, 各种类型癌症的发生是由于细胞周期中起作用的蛋白质过度表达所致。在大量癌症中, 均存在 CDK2 的过度表达^[43-46]。辛伐他汀 (simvastatin, SIM) 通过抑制 CDK4-cyclin D1 和 CDK2-cyclin E1 复合物的表达, 抑制细胞生长, 诱导细胞 G₁ 期停滞, 在结肠癌中具有抗肿瘤活性^[47]。CUI 等^[48]确定了一种长非编码 RNA 712 (long non-coding RNA NON-HSAT028712, Lnc712), 通过与热休克蛋白 90 (heat shock protein 90, HSP90) 形成 RNA-蛋白质复合物来调控乳腺癌的增殖。在乳腺癌细胞中, Lnc712 上调通过 HSP90/cdc37/CDK2 途径引发乳腺癌细胞的增殖。药物抑制 CDK2 或者 Zeste 同源物增强子 2 (enhancer of zeste homolog 2, EZH2) 可以使雌激素受体 α (estrogen receptor α , ER α) 重新表达, 并将三阴性乳腺癌 (triple-negative breast cancer, TNBC) 转化为 ER α 阳

性,使TNBC细胞成为他莫昔芬(taximofen, TAM)激素治疗的靶点^[49]。此外,EZH2在高级别浆液性卵巢癌(high-grade serous ovarian cancer, HGSOC)中也普遍表达,并在卵巢癌标本中存在cyclin E1的过表达,或存在相关激酶CDK2基因的扩增^[50]。Cyclin E的升高通常与CDK2的高表达有关,而与cyclin E相关的大多数肿瘤促进作用都需要CDK2的参与^[51]。可见,CDK2是治疗CDK2高表达HGSOC患者的一个可靠靶点。这说明靶向CDK2可为治愈肿瘤提供更多的可能性。

CDK2在肿瘤中的作用和机制已有较深入的研究,但还存在一些问题亟待解决。如无法使用大量人源肿瘤异种移植模型(Patient-Derived tumor Xenograft, PDX)进行体内实验,对研究成果验证存在可推翻性。CDK2在所有癌症治疗靶点中不能一概而论,在选择靶点标记物时应谨慎,如cyclin E1对晚期肝癌发展才是必需的,而不依赖于CDK2的活性^[52];在某些情况下直接靶向cyclin E1可能更合适些^[53]。由于细胞周期中CDK家族成员间的代偿功能,某些癌症会有耐药性或需要持久抑制反应,因此需要开发针对不同癌症类型的双重抑制剂^[54-56],或探索CDK抑制剂与不同治疗(放疗、化疗等)方式的联合疗法。

5.2 CDK2在病毒复制与感染中的作用

早期研究认为,一些DNA病毒能独自编码DNA聚合酶等DNA复制相关蛋白,且能在静止细胞甚至终末分化的神经细胞中复制,其复制与细胞周期无关,不需要CDK的参与。而近期有些研究表明,在病毒感染中,CDK2起重要作用,可参与病毒基因组的转录和复制。1998年,最早证明CDK抑制剂——Rocovotine和Olomoucine在体外可减少病毒感染^[57]。2002年,发现Rocovotine也能阻止体外神经元中单纯疱疹病毒-1(Herpes simplex virus type-1, HSV-1)的重新激活,且抑制程度与对CDK的抑制程度正相关^[58]。最近,证实CDK2是一种HSV-1有效复制所需的细胞酶,并确定为具有抗HSV-1活性的潜在化合物^[59]。此外,GARY^[60]和HIDETAKA^[61]等发现,抑制CDK2及其他CDK的活性,可抑制人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)和人乳头状病毒(human papilloma virus, HPV)的复制。这在EB病毒(epstein-barr virus, EB virus)的复制中亦有所体现^[62-63]。基于以上对CDK2和病毒复制的研究,不仅颠覆了病毒复制与CDK2不相关的猜想,而且为CDK2在病毒复制

中的促进/抑制作用提供了有力证据。至此,病毒复制与CDK2间的关联性重新进入了人们的视野,有更多奥妙被发掘出来。

哺乳动物细胞周期中cyclin和CDK对细胞周期具有重要的调控作用,这些蛋白不仅对细胞自身功能不可或缺,对病毒的增殖也具有抑制或促进作用。例如,cyclin A过表达能抑制猪细小病毒(porcine parvovirus, PPV)的复制,低表达则促进PPV的复制;CDK2过表达能抑制PPV的复制,低表达则对PPV复制无显著影响^[64]。SAMHD1(sterile alpha motif and HD domain-containing protein 1)的磷酸化是参与乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染系统中病毒复制的重要途径,SAMHD1磷酸化受cyclin E2-CDK2复合物的控制。在HBV感染过程中,降低CDK2的表达或抑制其激酶活性,可降低细胞核中SAMHD1磷酸化水平,从而阻断HBV复制^[65]。cyclin A的过表达能降低重组腺相关病毒的转导效率,与cyclin A过表达将宿主细胞大量底物蛋白招募给CDK2从而削弱腺病毒E4orf6蛋白质在转导中的关键作用有关^[66]。病毒共价闭合环(covalently closed circular, CCC) DNA是HBV持续存在的基础,其源于形成蛋白质(病毒衣壳)内松弛的环状(relaxed circular, RC) DNA,驱动着所有病毒基因的表达,以维持病毒的复制。LUO等^[67]和LAURIE等^[68]的研究表明,CDK2可作为病毒衣壳内一种主要内源性激酶,通过调节RC DNA的释放,以控制CCC DNA的形成。这说明,CDK2在病毒复制中具有不可替代的作用,且是病毒与宿主细胞抗衡的焦点,值此,CDK抑制剂作为抗病毒药物正在开发中。

5.3 CDK2在免疫性疾病中的作用

免疫系统保护人体免受感染、疾病和癌症的侵袭。T和B淋巴细胞是细胞免疫和体液反应的主要成分。在免疫性疾病T和/或B细胞中,CDK2一般高表达。间充质干细胞来源的外泌体(mesenchymal stem cells-derived exosomes, MSC-exo)通过上调p27蛋白质和下调CDK2蛋白质诱导细胞周期停滞,表现出对T细胞的活化和增殖有抑制作用^[69]。类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种慢性炎症免疫疾病,其特征是滑膜成纤维细胞增生。果胶毒素-2(pectenotoxin-2, PTX-2)处理滑膜成纤维细胞后,p21与CDK2、CDK6的结合增加,pRb磷酸化和E2F转录因子蛋白水平显著降低,中断G₁期抑制细胞增

殖。PTX-2可有助于寻找新药物以对抗RA介导的滑膜成纤维细胞的增生^[70]。系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种以自身反应性T细胞和B细胞活化与增殖为特征的慢性自身免疫性疾病。在SLE淋巴细胞中, CDK2表达上调, CDK抑制剂(p27和p21)表达降低^[71]; 而与CDK2相关的信号通路PI3K/AKT/GSK3 β 则上调^[72]。羟氯喹(hydroxychloroquine, HCQ)的抗SLE作用, 主要与调节PI3K/AKT/GSK3 β 途径和干扰素(interferon, IFN)信号通路中的CDK2、雌激素受体 α (estrogen receptor α , ESR1)和CDK1靶点有关^[73], 证实了免疫性疾病中CDK2的促进作用。寻常型天疱疮(pemphigus vulgaris, PV)是一类自发性影响皮肤和黏膜的水疱性免疫疾病。其体内抗原主要是加强细胞与细胞间黏附作用的桥粒, 因其与自身钙黏蛋白的抗体有cDNA序列同源性, 两者可在表皮细胞上错误地结合而引起松弛性水疱。这主要是因为PV血清诱导了CDK2表达积累, 过表达的CDK2在细胞周期中的磷酸化作用, 干扰了抗原与抗体之间的活性、定位以及稳定性。因此, 利用Roscovetin对CDK2的抑制作用可以达到预防PV的新生小鼠模型中的水疱效果^[74]。

上述结果, 尽管均可作为CDK2参与免疫性疾病提供有效证据, 但因CDK2在免疫系统中的作用极其复杂, 仍存在很多未知问题。在不同的免疫机制中, 与CDK2作用的底物蛋白属何者? CDK2如何精确调节如此庞大的免疫系统网络? 以CDK2为靶点开发无细胞疗法治疗免疫性疾病是否可行? 欲解决上述问题, 尚需进一步广泛探究。

5.4 CDK2在不育疾病中的作用

因减数分裂II期中没有S期, 所以曾一度认为, CDK2在减数分裂中不如在有丝分裂中的作用显得那么重要。甚至有研究指出, CDK2基因敲除(knock out, KO)小鼠可通过CDK1和CDK4的代偿性活动而表现出接近正常的有丝细胞增殖。然而, CDK2-KO小鼠配子缺陷无法进行减数分裂而导致不育^[23-24]。至此, 减数分裂与CDK2的关系研究才得以关注。

由于子宫内的卵子在减数分裂I期开始停滞有诸多争议, 加之在雌性生殖细胞中是否存在CDK2的作用? 致使CDK2作用下雄性不育的研究成为当前的热点。生殖细胞减数分裂则是通过周期性激活CDK2活性而进行的; 没有激酶活性, 单倍体细胞的生成就会被破坏, 从而导致不育。CDK2通过磷酸化修饰转变

成P-CDK2, 调节减数分裂粗线期染色体活动进程^[75]。CDK2活性的丧失, 则会导致精子细胞停滞在减数分裂前期的粗线期, 之后, DNA双链断裂不能修复, 染色体联会或重组异常, 没有配对的二价体不能交叉, 就不能定向移动到赤道板, 进而使染色单体不能正确分离到子细胞中, 导致生精异常^[75-77]。CDK的活性往往与cyclin调节亚基联系在一起, 然而, CDK2在减数分裂中的活化并非总是需要与cyclin结合。CDK2介导的精子减数分裂可能是通过不依赖于cyclin的机制调控的。蛋白SPY1(Speedy 1), 也被称为Ringo A, 可通过与cyclin相同的位点结合来激活CDK2^[78-79], 且与cyclin的激活不同, CDK2的SPY1激活不需要磷酸化来启动其功能。SPY1在所有组织中都有表达, 但其表达仅在睾丸中显著增加^[80]。另外, 缺乏Ringo A(Ringo家族成员, 一种不典型的CDK1/2激活剂)的小鼠是不育的^[78], 且表现出与CDK2-KO小鼠几乎相同的减数分裂缺陷, 包括非同源染色体配对、未配对的双链断裂、性体和粗线期阻滞^[81]。重要的是, 端粒附着在核膜上是减数分裂前期I同源染色体配对和重组的先决条件, 依赖于CDK2与Ringo A的结合^[82]。因此, Ringo A可能是CDK2在细胞减数分裂中的关键激活因子, 靶向SPY1-CDK2可能会给设计与开发治疗不育疾病的药物提供重要思路。

目前, 多通过基因敲除来模拟不育的发生机制, 尽管在老鼠等动物模型中得以证实, CDK2缺失可引起不育, 但对生殖系统中CDK2作用机制的研究和理解仍处于初级阶段。如人类睾丸活检病理结果与动物模型相对照等。遗憾的是, 目前尚无CDK2基因在男性无精子症人群中的研究, 期待未来有更深入的研究。

6 CDK2抑制剂研究与开发

鉴于CDK2在癌症中起到的关键作用, CDK2抑制剂的设计与开发被视为抗癌药物研发的重要途径。CDK2通过将ATP中的磷酸基团转移到目标蛋白质的特定氨基酸上来催化底物的磷酸化, 从而改变底物蛋白的结构和空间构象^[1]。多数CDK抑制剂是通过与ATP竞争性结合CDK2的ATP结合区域而发挥抑制作用的(表1)。

从20世纪90年代起, CDK2的抑制剂已经进入临床研究阶段, 近年来已有更多的CDK2抑制剂问世。CDK2抑制剂大致可分为三类。第一类: CDK2内源肽

表1 ATP竞争性CDK抑制剂(根据参考文献[83-94]修改)

Table 1 Competitive CDK inhibitors of ATP (modified from references [83-94])

名称 Name	类别 Category	CDK靶点 CDK targets	研制阶段 Development phase
Favopiridol	Flavonoids	CDK1,2,4,6,7,9	Clinical II
R-roscovitine	Purine	CDK1,2,5,7,9	Clinical II
AT-7519	Pyrazole	CDK1,2,4,5	Clinical I
AZD-5438	Imidazole pyrimidine	CDK1,2,6,9	Clinical I
BAY-1000394	Amino pyrimidine	CDK1,2	Clinical II
Dinaciclib	Pyrimidine	CDK1,2,5,9	Clinical II
Palbociclib	Pyrazole and Pyrimidine	CDK2,4,6	Listed
R-547	Amino pyrimidine	CDK1,2,4,6,7,9	Clinical I
SNS-032	Amino thiazole	CDK2,7,9	Clinical I
MK-7965 (Merck)	Pyrazole and Pyrimidine	CDK1,2,9	Clinical II

抑制剂; 第二类: I型抑制剂(正构抑制剂)——竞争性地靶向激酶构象中的ATP结合位点; 第三类: II型抑制剂(别构抑制剂)——通过与ATP结合口袋以外的氨基酸残基结合, 改变CDK2构象, 进而影响其与ATP的结合。

6.1 CDK2内源肽抑制剂

Cip/Kip家族成员是高等真核生物细胞周期调控的天然CDKI, 如p27、p21、p57、p107及其衍生肽等^[83]。这类抑制剂通过与cyclin A/E结合, 抑制CDK2活性, 进而阻断细胞周期, 从而有效地抑制细胞增殖。如p27不仅能够与CDK2较浅的凹陷部分结合, 而且也能与较深的裂隙部分结合, 使其构象发生较大改变, 从而抑制其活性^[84]。

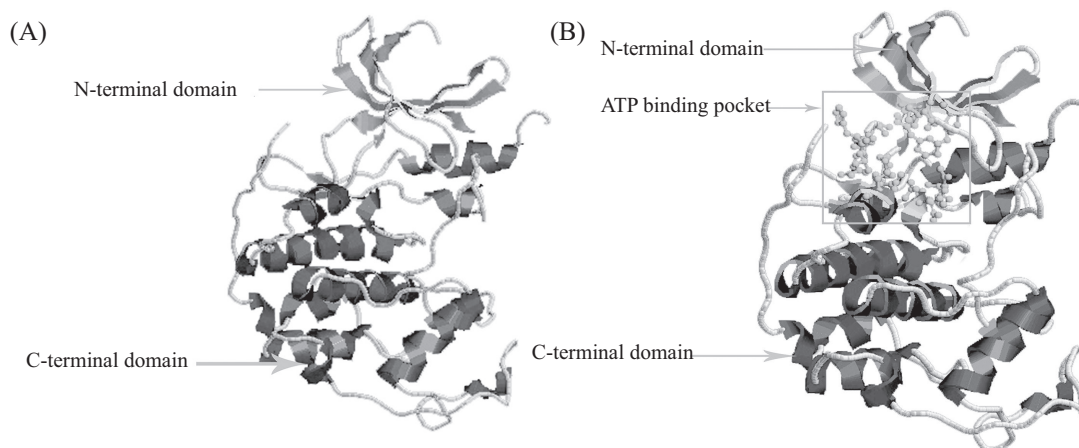
6.2 CDK2 I型抑制剂

目前, 应用最多的是针对CDK2的ATP结合口袋的小分子化合物。CDK2的ATP结合口袋位于N末端和C末端之间的裂缝中, 由21个氨基酸组成(图2)。研究发现, CDK2中的Ile10、Val18、Ala31、Lys33、Phe80、Glu81、Phe8、Leu83、His84、Gln85、Asp86、Lys89、Gln131、Leu134、Ala144和Asp145等位点, 在结合ATP的过程中发挥着至关重要的作用^[85-86]。根据化学结构的不同, CDK2的小分子抑制剂主要分为: 嘧啶类、嘌呤类、黄酮类、十字萜碱类、吡啶类及其衍生物, 咪唑并吡啶类、吡唑并吡啶类、吡唑类、噻唑类、哌酮类、吡嗪类、丁酸内酯类、萜烯类、喹啉类及其衍生物等^[83-86]。其中, 嘌呤类、嘧啶类具有较强的活性和生物多样性, 尤其嘧啶类衍生物更易合成, 其抑制活性更高, 倍受青睐。

6.2.1 嘌呤类抑制剂 嘌呤类抑制剂是最早被发现

和应用最广泛的CDK抑制剂之一。嘌呤类抑制剂主要包括Olomoucine、Roscovitine、Purvalanol及其衍生物等。最早被发现的嘌呤类抑制剂是Olomoucine^[87], 一种具有选择性的抑制剂, 对CDK1、CDK2和CDK5有抑制活性, 对CDK4和CDK6没有抑制活性。Roscovitine^[88]是对Olomoucine进行结构改造形成的, 其抑制活性是Olomoucine的17倍。Roscovitine属于非选择性的抑制剂, 对CDK1、CDK2、CDK5、CDK7和CDK9均有抑制作用。此外, Olomoucine的衍生物Purvalanol A和B^[89], 都显示出很强的抑制活性, 比Olomoucine的抑制活性高1 000倍左右。因此, 嘌呤类抑制剂多是以Olomoucine和Roscovitine为先导, 通过改变其结构来增加嘌呤类抑制剂的活性, 从而达到抑制的目的。

6.2.2 嘧啶类抑制剂 2000年, OTYEPKA等^[90]通过CDK嘌呤类抑制剂设计合成出最简单的嘧啶类抑制剂NU6027。NU6027具有较强的抑制活性, 特别是对CDK1和CDK2。NU6027的合成成为设计出活性更高、结构更简单的新型嘧啶类CDK2抑制剂提供了明确的方向。2003年, SAYLE等^[91]以NU6027为基础, 通过在嘧啶环的2-位氨基加入含有酰胺或磺酰胺的苯基基团设计合成出了新的化合物。其对CDK的抑制活性远远高于NU6027。2006年, CHU等^[92]在NU6027的基础上合成出了R547(5-位芳甲酰基取代的二氨基嘧啶化合物), 具有很强的生物活性, 在体外显示出了广谱的抗肿瘤活性。R547能够将肿瘤细胞的细胞周期抑制在G₁或G₂期并促进细胞凋亡, 达到治疗恶性肿瘤的目的^[93]。近年来, 已把嘧啶分子2,4位中一个氨基替换为嘧啶环、吡啶环、咪唑环、苯环、



A: 人源CDK2的晶体结构(PDB ID:1HCK); B: 人源CDK2的ATP结合口袋, I型抑制剂通过与ATP结合口袋中的氨基酸位点结合, 与ATP竞争激酶活性位点, 改变CDK2构象, 抑制激酶活性。

A: crystal structure of human CDK2 (PDB ID:1HCK); B: human CDK2 ATP-binding pocket. Type I inhibitors competed with ATP for kinase active sites by binding to amino acid sites in ATP binding pockets, altering CDK2 conformation, and inhibiting kinase activity.

图2 CDK2的晶体结构和ATP结合口袋

Fig.2 Crystal structure and ATP binding pocket of CDK2

噻唑环等基团^[94], 都具有很强的生物活性和广谱的抗癌活性。

6.3 CDK2 II型抑制剂

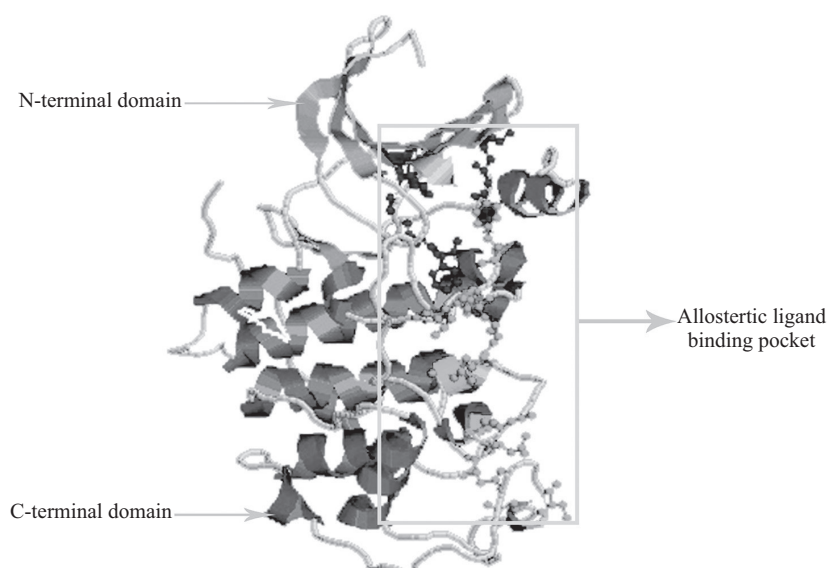
由于ATP结合口袋在CDK蛋白家族中的高度保守, 使得针对ATP结合口袋开发选择性CDK2抑制剂变得困难重重。因此, 科学家将目光转向了发展非ATP结合的CDK2抑制剂。CDK2 II型抑制是通过别构调节抑制CDK2活性的。别构调节是指某种不直接涉及蛋白质活性的物质, 通过与蛋白质活性位点以外的其他位点(别构位点)相结合, 从而引起蛋白质分子的构象变化并引起蛋白质活性改变的现象。目前, 已发现2个抑制剂新结合口袋^[96]: (1) 由Leu55、Lys56、Phe80、Asp145、Phe146和Lys33组成, 位于ATP结合位点和C-端螺旋的中间; (2) 由Leu124、Phe152、Val154-156、Glu172、Gly176、Thr182、Val184、Val227-230、Ser232-234和Asp270-Asn272组成, 被5肽LAALS和TAALS占据(图3)。此外, 现已有CDK2的别构小分子抑制剂^[97-98]和别构多肽抑制剂^[99]成功上市, 如Imatinib、Sorafenib、BIRb-796、ANS(8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid)^[100]和AAL-933等^[95]。

综上, 随着对CDK2晶体结构认识的深化以及对CDK2抑制剂研究重大成果的取得, 将CDK2抑制剂分成了三类。其中, 多种I型抑制剂已进入临床研究阶段, 但因CDK激酶在其活性催化部位(ATP结合口袋)有高度的序列相似性, 这些抑制剂往往并非特

异性抑制CDK2的激酶活性, 其选择性较差。例如, CDK4在CDK家族中分布最为广泛。CDK2和CDK4的折叠形式的相似度达到了45%, 其中, 在ATP结合位点, 仅仅有4个氨基酸残基的差别^[101-102]。与传统型I型抑制剂相比, 别构抑制剂有3个明显的优势: (1) 通过与新发现的别构结合口袋结合而发挥抑制作用, 而CDK家族成员在此区域存在序列差异, 可实现对靶标更高的选择性^[95]; (2) 较少的不良反应; (3) 低毒性。但目前, 别构抑制剂使用范围小、临床经验少, 尚需进一步参考癌症预后情况。相信以别构抑制剂为研究方向进行定向筛选和结构改造, 将会获得更具开发前景的治疗药物。

7 问题与展望

CDK2是细胞周期蛋白依赖性激酶高度保守家族中的1个亚型, CDK2不但是细胞周期中的关键因子, 而且在细胞增殖、细胞凋亡、细胞分化和各类典型疾病中都有不可替代的作用。虽然对CDK2的作用机制已有很多研究, 但其与CDK家族成员间关系的研究仍需探究。此外, CDK2抑制剂的研发对于肿瘤等疾病的治疗具有重要意义。总之, 随着对CDK2的深入研究, 新的CDK2底物蛋白、调控因子和抑制因子等必将被逐渐研究明晰, 这不仅有助于更加深刻地认识细胞周期调控机制, 而且对开发抗癌新药、治疗肿瘤以及CDK2相关的疾病, 皆具有重大意义。



II型抑制剂通过与别构口袋中的氨基酸残基作用, 间接改变CDK2构象, 抑制激酶活性。

Conformation and kinase activity of CDK2 altered for type II inhibitors by interacting with amino acid residues in the allosteric pocket, indirectly.

图3 CDK2的别构口袋

Fig.3 Allosteric pockets of CDK2

参考文献 (References)

- [1] TALAPATI S R, NATARAJ V, POTHUGANT M, et al. Structure of cyclin-dependent kinase 2 (CDK2) in complex with the specific and potent inhibitor CVT-313 [J]. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*, 2020, 76(8): 350-6.
- [2] MOHAMMAD T, BATRA S, DAHIYA R, et al. Identification of high-affinity inhibitors of cyclin-dependent kinase 2 towards anticancer therapy [J]. *Molecules*, 2019, 24(24): 4589.
- [3] HE S, YANG S, NIU M, et al. HMG-box transcription factor 1: a positive regulator of the G₁/S transition through the Cyclin-CDK-CDKI molecular network in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Cell Death Discov*, 2018, 9(2): 100.
- [4] CHENG W, YANG Z, WANG S, et al. Recent development of CDK inhibitors: an overview of CDK/inhibitor co-crystal structures [J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 164: 615-39.
- [5] INGHAM M, SCHWARTZ G K. Cell-cycle therapeutics come of age [J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35: 2949-59.
- [6] GENG Y, YU Q, SICINSKA E, et al. Cyclin E ablation in the mouse [J]. *Cell*, 2003, 114(4): 431-43.
- [7] DU W W, YANG W, LIU E, et al. Foxo3 circular RNA retards cell cycle progression via forming ternary complexes with p21 and CDK2 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016(6): 2846-58.
- [8] 李方方, 刘鑫. 沉默PRR14基因抑制结肠癌HCT116细胞增殖[J]. *中国生物化学与分子生物学报*(LI F F, LIU X. PRR14 silencing inhibits proliferation of colon cancer HCT116 cells [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*), 2019, 35(11): 99-105.
- [9] BORATYN E, NOWAK I, KARNAS E, et al. MCP1 overexpression in human neuroblastoma cell lines causes cell-cycle arrest by G₁/S checkpoint block [J]. *J Cell Biochem*, 2020, 121(5/6): 3406-25.
- [10] TANG J, WANG F, CHENG G, et al. Wilms' tumor 1-associating protein promotes renal cell carcinoma proliferation by regulating CDK2 mRNA stability [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 40.
- [11] PENG X F, PAN K M, ZHAO W L, et al. NPTX1 inhibits colon cancer cell proliferation through down-regulating cyclin A2 and CDK2 expression [J]. *Cell Biol Int*, 2018, 42(5): 589-97.
- [12] 黄世莹, 曾娣, 张滔, 等. 高三尖杉酯碱通过下调IRS4蛋白质的表达抑制黑色素瘤维罗非尼耐药细胞周期和增殖[J]. *中国生物化学与分子生物学报*(HUANG S Y, ZENG D, ZHANG T. Homoharringtonine inhibits the cell cycle and proliferation of vemurafenib-resistant melanoma cells by downregulating the expression of IRS4 [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*), 2020, 36(8): 970-6.
- [13] ZHANG J Q J, BURGESS J, STEPANOVA D, et al. Role of cyclin-dependent kinase 2 in the progression of mouse juvenile cystic kidney disease [J]. *Lab Invest*, 2020, 100(5): 696-711.
- [14] SANTAMARIA D, BARRIERE C, CERQUEIRA A, et al. Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle [J]. *Nature*, 2007, 448: 811-5.
- [15] YING M, SHAO X, JING H, et al. Ubiquitin-dependent degradation of CDK2 drives the therapeutic differentiation of AML by targeting PRDX2 [J]. *Blood*, 2018, 131(24): 2698-711.
- [16] FABER E B, WANG N, GEORG G I. Review of rationale and progress towards targeting cyclin-dependent kinase 2 (CDK2) for male contraception [J]. *Biol Reprod*, 2020, 103(2): 357-67.
- [17] HAUSSMANN I U, BODI Z, SANCHEZ-MORAN E, et al. M6 A potentiates Sxl alternative pre-mRNA splicing for robust drosophila sex determination [J]. *Nature*, 2016, 540: 301-4.
- [18] SONG C C, YANG Z X, DONG D, et al. MiR-483 inhibits bovine myoblast cell proliferation and differentiation via IGF1/PI3K/AKT signal pathway [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(6): 9839-48.
- [19] XIA Q, ZHAO Y, WANG J, et al. Proteomic analysis of cell cycle arrest and differentiation induction caused by ATPR, a derivative of all-trans retinoic acid, in human gastric cancer SGC-7901 cells

- [J]. *Proteomics Clin Appl*, 2017, 11(7/8): 201600099.
- [20] YING M, SHAO X, JING H, et al. Ubiquitin-dependent degradation of CDK2 drives the therapeutic differentiation of AML by targeting PRDX2 [J]. *Blood*, 2018, 131(24): 2698-711.
- [21] TADESSE S, ANSHABO A T, PORTMAN N, et al. Targeting CDK2 in cancer: challenges and opportunities for therapy [J]. *Drug Discov Today*, 2020, 25(2): 406-13.
- [22] YIN X, YU J, ZHOU Y, et al. Identification of CDK2 as a novel target in treatment of prostate cancer [J]. *Future Oncol*, 2018, 14(8): 709-18.
- [23] LE J, PEREZ E, NEMZOW L, et al. Role of deubiquitinases in DNA damage response [J]. *DNA Repair*, 2019, 76: 89-98.
- [24] PEFANI D E, LATUSEK R, PIRES I, et al. RASSF1A-LATS1 signalling stabilizes replication forks by restricting CDK2-mediated phosphorylation of BRCA2 [J]. *Nat Cell Biol*, 2014, 16(10): 962-71.
- [25] SHIEH S Y, AHN J, TANAI K, et al. The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1(Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites [J]. *Genes Dev*, 2000, 14(3): 289-300.
- [26] 战卓. Cyclin A-Cdk2介导的Rad9磷酸化调控细胞凋亡的功能研究[D]. 长春: 吉林大学, 2013.
- [27] MAILAND N, FALCK J, LUKAS C, et al. Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage [J]. *Science*, 2000, 288(5470): 1425-9.
- [28] XIA P, CHEN J, LIU Y, et al. Doxorubicin induces cardiomyocyte apoptosis and atrophy through cyclin-dependent kinase 2-mediated activation of forkhead box O1 [J]. *J Biol Chem*, 2020, doi: 10.1074/jbc.RA119.011571.
- [29] LIU D, YOU P, LUO Y, et al. Galangin induces apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells through mitochondrial pathway and phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt inhibition [J]. *Pharmacology*, 2018, 102(1/2): 58-66.
- [30] KA W H, CHO S K, CHUN B N, et al. The ubiquitin ligase COP1 regulates cell cycle and apoptosis by affecting p53 function in human breast cancer cell lines [J]. *Breast Cancer Res*, 2018, 25(5): 529-38.
- [31] LIU Q Y, WANG L S, CHEN H W, et al. Prometryn induces apoptotic cell death through cell cycle arrest and oxidative DNA damage [J]. *Toxicol Res*, 2019, 8(6): 833-41.
- [32] WANG Z, XIANG Z, ZHU T, et al. Cathepsin L interacts with CDK2-AP1 as a potential predictor of prognosis in patients with breast cancer [J]. *Oncol Lett*, 2020, 19(1): 167-76.
- [33] JIN Y H, YIM H, PARK J H, et al. Cdk2 activity is associated with depolarization of mitochondrial membrane potential during apoptosis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 305(4): 974-80.
- [34] GUO X X, KIM H, LI Y, et al. Cdk2 acts upstream of mitochondrial permeability transition during paclitaxel-induced apoptosis [J]. *Protein Cell*, 2011, 2(7): 543-53.
- [35] MEGYESI J, TARCSAFALVI A, SENG N, et al. Cdk2 phosphorylation of Bcl-xL after stress converts it to a pro-apoptotic protein mimicking Bax/Bak [J]. *Cell Death Discov*, 2016, doi: 10.1038/cddiscovery.2015.66.
- [36] SENG N, MEGYESI J, TARCSAFALVI A, et al. Mimicking Cdk2 phosphorylation of Bcl-xL at Ser73 results in caspase activation and Bcl-xL cleavage [J]. *Cell Death Discov*, 2016, doi: 10.1038/cddiscovery.2016.1.
- [37] TUTTIS K, GOMES DA COSTA D L M, SERPELONI J M, et al. Phytochemical profile, and antiproliferative and proapoptotic effects of pouteria ramiflora(Mart.) radlk. Leaf extract, and its synergism with cisplatin in HepG2 cells [J]. *J Med Food*, 2020, doi: 10.1089/jmf.2020.0045.
- [38] KNIGHT K R, CHEN L, FREYER D, et al. Group-wide, prospective study of ototoxicity assessment in children receiving cisplatin chemotherapy(ACCL05C1): a report from the children's oncology group [J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35(4): 440-5.
- [39] TEITZ T, FANG J, GOKTUG A N, et al. CDK2 inhibitors as candidate therapeutics for cisplatin- and noise-induced hearing loss [J]. *J Exp Med*, 2018, 215(4): 1187-203.
- [40] HAZLITT R A, TEITZ T, BONGA J D, et al. Development of second-generation CDK2 inhibitors for the prevention of cisplatin-induced hearing Loss [J]. *J Med Chem*, 2018, 61(17): 7700-9.
- [41] RYBAK L P, MUKHERJEA D, RAMKUMAR V. Mechanisms of cisplatin-induced ototoxicity and prevention [J]. *Semin Hear*, 2019, 40(2): 197-204.
- [42] LIU Q, GAO J, ZHAO C, et al. To control or to be controlled? Dual roles of CDK2 in DNA damage and DNA damage response [J]. *DNA Repair*, 2020, doi: 10.1016/j.dnarep.2019.102702.
- [43] SARKAR B, ULLAH M A, ISLAM S S, et al. Analysis of plant-derived phytochemicals as anti-cancer agents targeting cyclin dependent kinase-2, human topoisomerase IIa and vascular endothelial growth factor receptor-2 [J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2020, 13: 1-17.
- [44] WANG Y, XIE B H, LIN W H, et al. Amplification of SMYD3 promotes tumorigenicity and intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma via upregulation of CDK2 and MMP2 [J]. *Oncogene*, 2019, 38(25): 4948-61.
- [45] YIN X, YU J, ZHOU Y, et al. Identification of CDK2 as a novel target in treatment of prostate cancer [J]. *Future Oncol*, 2018, 14(8): 709-18.
- [46] HUR S, KIM J H, YUN J, et al. Protein phosphatase 1H, cyclin-dependent kinase inhibitor p27, and cyclin-dependent kinase 2 in paclitaxel resistance for triple negative breast cancers [J]. *J Breast Cancer*, 2020, 23(2): 162-70.
- [47] CHEN M J, CHENG A C, LEE M F, et al. Simvastatin induces G1 arrest by up-regulating GSK3 β and down-regulating CDK4/cyclin D1 and CDK2/cyclin E1 in human primary colorectal cancer cells [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(6): 4618-25.
- [48] CUI Y, LU C, ZHANG Z, et al. A long non-coding RNA Lnc712 regulates breast cancer cell proliferation [J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(1): 162-71.
- [49] NIE L, WEI Y, ZHANG F, et al. CDK2-mediated site-specific phosphorylation of EZH2 drives and maintains triple-negative breast cancer [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 5114.
- [50] AU-YEUNG G, LANG F, AZAR W J, et al. Selective targeting of cyclin E1-amplified high-grade serous ovarian cancer by cyclin-dependent kinase 2 and AKT inhibition [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(7): 1862-74.
- [51] FANG D, HUANG S, SU S B. Cyclin E1-CDK2, a potential anticancer target [J]. *Aging*, 2016, 8(4): 571-2.
- [52] SONNTAG R, GIEBELER N, NEVZOROVA Y A, et al. Cyclin E1 and cyclin-dependent kinase 2 are critical for initiation, but

- not for progression of hepatocellular carcinoma [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(37): 9282-7.
- [53] BANGEN J M, HAMMERICH L, SONNTAG R, et al. Targeting CCL4-induced liver fibrosis by RNA interference-mediated inhibition of cyclin E1 in mice [J]. *Hepatology*, 2017, 66(4): 1242-57.
- [54] TADESSE S, ANSHABO A T, PORTMAN N, et al. Targeting CDK2 in cancer: challenges and opportunities for therapy [J]. *Drug Discov Today*, 2020, 25(2): 406-13.
- [55] PATEL P, TSIPERSON V, GOTTESMAN S R S, et al. Dual inhibition of CDK4 and CDK2 via targeting p27 tyrosine phosphorylation induces a potent and durable response in breast cancer cells [J]. *Mol Cancer Res*, 2018, 16(3): 361-77.
- [56] BOLIN S, BORGENVIK A, PERSSON C U, et al. Combined BET bromodomain and CDK2 inhibition in MYC-driven medulloblastoma [J]. *Oncogene*, 2018, 37(21): 2850-62.
- [57] SCHANG L M, PHILLIPS J, SCHAFFER P A. Requirement for cellular cyclin-dependent kinases in herpes simplex virus replication and transcription [J]. *J Virol*, 1998, 72(7): 5626-37.
- [58] SCHANG L M, BANTLY A, SCHAFFER P A. Explant-induced reactivation of herpes simplex virus occurs in neurons expressing nuclear Cdk2 and Cdk4 [J]. *J Virol*, 2002, 76(15): 7724-35.
- [59] VIEGAS D J, EDWARDS T G, BLOOM D, et al. Virtual screening identified compounds that bind to cyclin dependent kinase 2 and prevent herpes simplex virus type 1 replication and reactivation in neurons [J]. *Antiviral Res*, 2019, 172: 104621.
- [60] GARY C, HAJEK M, BIKTASOVA A, et al. Selective antitumor activity of roscovitine in head and neck cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(25): 38598-611.
- [61] SADANARI H, FUJIMOTO K J, SUGIHARA Y, et al. The anti-human cytomegalovirus drug triclin inhibits cyclin-dependent kinase 9 [J]. *FEBS Open Bio*, 2018, 8(4): 646-54.
- [62] SATO Y, WATANABE T, SUZUKI C, et al. S-Like-Phase cyclin-dependent kinases stabilize the Epstein-Barr virus BDLF4 protein to temporally control late gene transcription [J]. *J Virol*, 2019, 93(8): 1707-18.
- [63] WATANABE T, SATO Y, MASUD H M A A, et al. Antitumor activity of cyclin-dependent kinase inhibitor alsterpaullone in Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders [J]. *Cancer Sci*, 2020, 111(1): 279-87.
- [64] 唐青海, 杨海, 彭永刚, 等. 猪Cyclin A和CDK2蛋白对猪细小病毒增殖的调控作用[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版)(TANG Q H, YANG H, PENG Y G, et al. Regulation effect of porcine cyclin A and CDK2 on proliferation of porcine parvovirus [J]. *Journal of northwest A&F university, Nat Sci Ed*), 2020, 48(8): 19-27.
- [65] HU J, QIAO M, CHEN Y, et al. Cyclin E2-CDK2 mediates SAMHD1 phosphorylation to abrogate its restriction of HBV replication in hepatoma cells [J]. *FEBS Lett*, 2018, 592(11): 1893-904.
- [66] GRIFMAN M, CHEN N N, GAO G P, et al. Overexpression of cyclin A inhibits augmentation of recombinant adeno-associated virus transduction by the adenovirus E4orf6 protein [J]. *J Virol*, 1999, 73(12): 10010-9.
- [67] LUO J, XI J, GAO L, et al. Role of Hepatitis B virus capsid phosphorylation in nucleocapsid disassembly and covalently closed circular DNA formation [J]. *PLoS Pathog*, 2020, 16(3): e1008459.
- [68] LUDGATE L, NING X, NGUYEN D H, et al. Cyclin-dependent kinase 2 phosphorylates s/t-p sites in the hepadnavirus core protein C-terminal domain and is incorporated into viral capsids [J]. *J Virol*, 2012, 86(22): 12237-50.
- [69] LEE S, KIM S, CHUNG H, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes suppress proliferation of T cells by inducing cell cycle arrest through p27kip1/Cdk2 signaling [J]. *Immunol Lett*, 2020, 225: 16-22.
- [70] PARK C, KIM G Y, JUNG J H, et al. Pectenotoxin-2 induces G1 arrest of the cell cycle in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis [J]. *Int J Mol Med*, 2011, 27(6): 783-7.
- [71] TANG H, TAN G, GUO Q, et al. Abnormal activation of the akt/GSK3 beta signaling pathway in peripheral blood T cells from patients with systemic lupus erythematosus [J]. *Cell Cycle*, 2009, 8(17): 2789-93.
- [72] BARBER D F, BARTOLOME A, HERNANDEZ C, et al. PI3K gamma inhibition blocks glomerulonephritis and extends lifespan in a mouse model of systemic lupus [J]. *Nat Med*, 2005, 11(9): 933-5.
- [73] XIE B, GENG Q, XU J, et al. The multi-targets mechanism of hydroxychloroquine in the treatment of systemic lupus erythematosus based on network pharmacology [J]. *Lupus*, 2020, 29(13): 1704-11.
- [74] LANZA A, CIRILLO N, ROSSIello R, et al. Evidence of key role of Cdk2 overexpression in pemphigus vulgaris [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(13): 8736-45.
- [75] WANG L, LIU W, ZHAO W, et al. Phosphorylation of CDK2 on threonine 160 influences silencing of sex chromosome during male meiosis [J]. *Biol Reprod*, 2014, 90(6): 138.
- [76] CHAUHAN S, DIRIL M K, LEE J H S, et al. Cdk2 catalytic activity is essential for meiotic cell division *in vivo* [J]. *Biochem J*, 2016, 473(18): 2783-98.
- [77] SHI Q, SPRIGGS E, FIELD L L, et al. Single sperm typing demonstrates that reduced recombination is associated with the production of aneuploid 24,XY human sperm [J]. *Am J Med Genet*, 2001, 99(1): 34-8.
- [78] MIKOLCEVIC P, ISODA M, SHIBUYA H, et al. Essential role of the Cdk2 activator Ringo A in meiotic telomere tethering to the nuclear envelope [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 11084.
- [79] MCGRATH D A, FIFIELD B A, MARCEAU A H, et al. Structural basis of divergent cyclin-dependent kinase activation by Spy1/RINGO proteins [J]. *EMBO J*, 2017, 36(15): 2251-62.
- [80] FAGERBERG L, HALLSTROM B M, OKSVOLD P, et al. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2014, 13(2): 397-406.
- [81] VIERA V, ALSHEIMER M, GOMEZ R, et al. CDK2 regulates nuclear envelope protein dynamics and telomere attachment in mouse meiotic prophase [J]. *J Cell Sci*, 2015, 128(1): 88-99.
- [82] TU Z, BAYAZIT M B, LIU H, et al. Speedy A-Cdk2 binding mediates initial telomere-nuclear envelope attachment during meiotic prophase I independent of Cdk2 activation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(3): 592-7.
- [83] CHOCHAN T A, QIAN H, PAN Y, et al. Cyclin-Dependent Kinase-2 as a target for cancer therapy: progress in the development of CDK2 inhibitors as anti-cancer agents [J]. *Curr Med Chem*, 2015, 22(2): 237-63.

- [84] TSYTLONOK M, HEMMEN K, HAMILTON G, et al. Specific conformational dynamics and expansion underpin a multi-step mechanism for specific binding of p27 with Cdk2/Cyclin A [J]. *J Mol Biol*, 2020, 432(9): 2998-3017.
- [85] KOPRULUOGLU C, DEJMEK M, SALA M, et al. Optimization of norbornyl-based carbocyclic nucleoside analogs as cyclin-dependent kinase 2 inhibitors [J]. *J Mol Recognit*, 2020, doi: 10.1002/jmr.2842.
- [86] KARTHIGA A, TRIPATHI S K, SHANMUGAM R, et al. Targeting the cyclin-binding groove site to inhibit the catalytic activity of CDK2/cyclin A complex using p27KIP1-derived peptidomimetic inhibitors [J]. *J Biol Chem*, 2015, 8(1): 11-24.
- [87] 张京玉, 王清龙, 侯学会, 等. 具有嘌呤结构的细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂研究进展[J]. *有机化学*(ZHANG J Y, WANG Q L, HOU X H, et al. Recent advances in cyclin-dependent kinase inhibitors with purine scaffold [J]. *Chinese Journal of Organic Chemistry*), 2012, 32: 1-11.
- [88] 王坚. 嘌呤类CDK抑制剂嘌呤电子等排体研究进展[J]. *亚太传统医学*(WANG J. Recent advances in the electron xenoplasms of purine CDK inhibitors [J]. *Asia Pacific Traditional Medicine*), 2013, 9(10): 52-5.
- [89] WESIERSKA-GADEK J, SCHIND G. Dual action of the inhibitors of cyclin-dependent kinases: targeting of the cell-cycle progression and activation of wild-type p53 protein [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2006, 15(1): 23-38.
- [90] QTYEPKA M, KRSTOF V, HAVLICEK L, et al. Docking-based development of purine-like inhibitors of cyclin-dependent kinase 2 [J]. *J Med Chem*, 2000, 43(13): 2506-13.
- [91] SAYLE K L, BENTLEY J, BOYLE F T, et al. Structure based design of 2-arylamino-4-cyclohexyl methyl-5-nitroso-6-amino pyrimidine inhibitors of cyclin-dependent kinases 1 and 2 [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2003, 13(18): 3079-82.
- [92] CHU X J, DEPINTO W, BARTKOVITO D, et al. Discovery of [4-amino-2-(1-methane sulfonyl piperidin-4-ylamino) pyrimidin-5-yl](2,3-difluoro-6-methoxyphenyl) methanone(R547), a potent and selective cyclin-dependent kinase inhibitor with significant *in vivo* antitumor activity [J]. *J Med Chem*, 2006, 49(22): 6549-60.
- [93] 刘萍. 基于CDK2的抗肿瘤药物设计与研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨理工大学, 2015.
- [94] TENG M, JIANG J, HE Z, et al. Development of CDK2 and CDK5 dual degrader TMX72 [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2020, 59(33): 13865-70.
- [95] 胡雨彤, 舒晓宏, 张健. 激酶别构调节剂的研究进展[J]. *中国科学:化学*(HU Y T, SHU X H, ZHANG J. Progress in allosteric modulators of protein kinases [J]. *Scientia Sinica Chimica*), 2015, 45(9): 884-91.
- [96] DUCA J S. Recent advances on structure-informed drug discovery of cyclin-dependent kinase-2 inhibitors [J]. *Future Med Chem*, 2009, 1(8): 1453-66.
- [97] BETZI S, ALAM R, MARTIN M, et al. Discovery of a potential allosteric ligand binding site in CDK2 [J]. *ACS Chem Biol*, 2011, 6(5): 492-501.
- [98] MARTIN M P, ALAM R, BETZI S, et al. A novel approach to the discovery of small-molecule ligands of CDK2 [J]. *Chembiochem*, 2012, 13(14): 2128-36.
- [99] CHEN H, ZHAO Y, LI H, et al. Break CDK2/Cyclin E1 interface allosterically with small peptides [J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e109154.
- [100] FABER E B, TIAN D, BURBAN D, et al. Cooperativity between orthosteric inhibitors and allosteric inhibitor 8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid(ANS) in cyclin-dependent kinase 2 [J]. *ACS Chem Biol*, 2020, 15(7): 1759-64.
- [101] VASQUEZ A F, MUNOZ A R, DUITAMA J, et al. Discovery of new potential CDK2/VEGFR2 type II inhibitors by fragmentation and virtual screening of natural products [J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2020, 13: 1-15.
- [102] LIANG J W, WANG M Y, WANG S, et al. Identification of novel CDK2 inhibitors by a multistage virtual screening method based on SVM, pharmacophore and docking model [J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2020, 35(1): 235-44.