

周期蛋白和周期蛋白依赖性激酶及相关激酶抑制剂在细胞周期进程中的调控机制研究进展

潘剑锋¹, 尚方正¹, 马荣¹, 戎友俊¹, 张燕军^{1,2,3,4*}

1 内蒙古农业大学动物科学学院, 内蒙古 呼和浩特 010018

2 农业农村部肉羊遗传育种重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010018

3 内蒙古自治区动物遗传育种与繁殖重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010018

4 内蒙古自治区山羊遗传育种工程技术研究中心, 内蒙古 呼和浩特 010018

潘剑锋, 尚方正, 马荣, 戎友俊, 张燕军. 周期蛋白和周期蛋白依赖性激酶及相关激酶抑制剂在细胞周期进程中的调控机制研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(4): 1525-1547.

PAN Jianfeng, SHANG Fangzheng, MA Rong, RONG Youjun, ZHANG Yanjun. Advances of the regulatory mechanism of cyclin, cyclin-dependent kinases and related kinase inhibitors in cell cycle progression[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(4): 1525-1547.

摘 要: 在细胞发育过程中, 细胞周期起着至关重要的作用。细胞周期进程主要受细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin dependent kinase, CDK)、周期蛋白和内源性 CDK 抑制剂(cyclin-dependent kinase inhibitors, CKI)调控。其中, CDK 是主要的细胞周期调节因子, 可与周期蛋白结合形成周期蛋白-CDK 复合物, 从而使数百种底物磷酸化, 调控分裂间期和有丝分裂进程。各类细胞周期蛋白的活性异常, 可引起不受控制的癌细胞增殖, 导致癌症的发生与发展。因此, 了解 CDK 的活性变化情况、周期蛋白-CDK 的组装以及 CKI 的作用, 将有助于了解细胞周期进程中潜在的调控过程, 为癌症与疾病的治疗和 CKI 治疗药物的研发提供基础。本文关注了 CDK 激活和灭活的关键事件, 并总结了周期蛋白-CDK 在特定期及位置的调控过程, 以及相关 CKI 治疗药物在癌症及疾病中的研究进展, 最后简单阐述了细胞周期进程研究面临的问题和存在的挑战, 以期为后续细胞周期进程的深入研究提供参考和思路。

关键词: 周期蛋白依赖性激酶; 周期蛋白; 周期蛋白依赖性激酶抑制剂; 癌症; 细胞周期

资助项目: 国家自然科学基金(31860627)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31860627).

*Corresponding author. E-mail: imauzyj@163.com

Received: 2022-06-16; Accepted: 2022-11-14; Published online: 2022-12-08

Advances of the regulatory mechanism of cyclin, cyclin-dependent kinases and related kinase inhibitors in cell cycle progression

PAN Jianfeng¹, SHANG Fangzheng¹, MA Rong¹, RONG Youjun¹, ZHANG Yanjun^{1,2,3,4*}

1 College of Animal Science, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, Inner Mongolia, China

2 Key Laboratory of Meat Sheep Genetics and Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China, Hohhot 010018, Inner Mongolia, China

3 Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction in Inner Mongolia Autonomous Region, Hohhot 010018, Inner Mongolia, China

4 Goat Genetics and Breeding in Inner Mongolia Autonomous Region Engineering Technology Research Center, Hohhot 010018, Inner Mongolia, China

Abstract: Cell cycle plays a crucial role in cell development. Cell cycle progression is mainly regulated by cyclin dependent kinase (CDK), cyclin and endogenous CDK inhibitor (CKI). Among these, CDK is the main cell cycle regulator, binding to cyclin to form the cyclin-CDK complex, which phosphorylates hundreds of substrates and regulates interphase and mitotic progression. Abnormal activity of various cell cycle proteins can cause uncontrolled proliferation of cancer cells, which leads to cancer development. Therefore, understanding the changes in CDK activity, cyclin-CDK assembly and the role of CDK inhibitors will help to understand the underlying regulatory processes in cell cycle progression, as well as provide a basis for the treatment of cancer and disease and the development of CDK inhibitor-based therapeutic agents. This review focuses on the key events of CDK activation or inactivation, and summarizes the regulatory processes of cyclin-CDK at specific times and locations, as well as the progress of research on relevant CDK inhibitor therapeutics in cancer and disease. The review concludes with a brief description of the current challenges of the cell cycle process, with the aim to provide scientific references and new ideas for further research on cell cycle process.

Keywords: cyclin dependent kinase (CDK); cyclin; cyclin dependent kinase inhibitor (CKI); cancer; cell cycle

细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin dependent kinase, CDK)是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族成员,通过介导不同底物磷酸化,参与细胞周期调控和转录调节^[1]。大多数 CDK 具有 CDK 激酶结构域、周期蛋白结合位点、磷酸化修饰位点和 T-loop (称为激活环)基序等^[2-3]。当 CDK 与其特定的周期蛋白非共价结合时 CDK 的 T-loop 被置换,从而暴露底物 ATP 结合位点并重新排列活性位点的关键残基,激活

CDK 活性^[4-5]。迄今为止,已有数十种 CDK (CDK1/2/4/6/7/9 等)和周期蛋白(cyclinA/B/D/E/F/G/H 等)被确认,并在细胞周期调控中发挥重要作用,例如 cyclinD-CDK4/6 启动细胞周期进程, cyclinE-CDK2 调控 S 期进入, cyclinA-CDK2 调控 S 期 DNA 复制, cyclinA/B-CDK1 触发有丝分裂等^[6-7]。

由于大多数 CDK 异常表达与癌症进展有关,因此研发 CDK 抑制剂作为抗癌靶向药物引

起了学界极大关注^[8]。近 20 年来,至少有数十种靶向 CDK 的药物在临床试验中进行了研究,然而却仅有极少数被批准用于临床治疗^[9-10]。在研究早期,发现的 CDK 抑制剂多为泛 CDK 抑制剂与多 CDK 抑制剂,其虽可有效抑制多种 CDK 或其他激酶,但表现出来的明显副作用,阻碍了这两类抑制剂进入市场与开展临床治疗。因此,为获得更安全、有效、副作用小的 CDK 抑制剂用于临床治疗,研究者对选择性 CDK 抑制剂展开了研究。2015 年第一种选择性 CDK4/6 抑制剂帕博西尼(palbociclib)被美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准用于治疗乳腺癌^[11]。之后,3 种选择性 CDK4/6 抑制剂瑞博西尼(ribociclib)、阿贝西利(abemaciclib)、曲拉西利(trilaciclib)也相继上市并用于临床治疗^[12]。此外,当前被鉴定的选择性 CDK 抑制剂,主要靶向 CDK1、CDK2、CDK4/6、CDK7 等^[13-14]。在临床研究中 CDK 抑制剂不仅可以被用于治疗各类癌症,还可以被用于治疗各类非癌症疾病,例如炎症性疾病、中枢神经系统疾病和感染性疾病等^[15]。这表明 CDK 在许多癌症与非癌症疾病的病理过程中发挥着重要作用。

本文介绍了 CDK 激活或灭活过程的关键事件、特定时期及位置的周期蛋白-CDK 的研究进展、相关 CDK 抑制剂在癌症和非癌症疾病中的应用情况及研发进展。最后,简单阐述了细胞周期研究领域面临的问题和存在的挑战,旨在为细胞周期研究领域的发展提供研究思路。

1 CDK 活性激活的关键事件

CDK 是驱动真核细胞周期的丝氨酸/苏氨酸特异性蛋白激酶,在其特定时期激活或灭活

可使细胞周期进程有序进行^[16-17]。CDK 激活需要满足如下条件:(1) 需要与周期蛋白结合;(2) CDK 激活位点的磷酸化和抑制位点的去磷酸化;(3) 不与 CDK 抑制剂(cyclin-dependent kinase inhibitors, CKI)结合等。有趣的是只有当周期蛋白与 CDK 结合形成周期蛋白-CDK 复合物时,CDK 上的激活位点磷酸化和抑制位点去磷酸化,才会激活 CDK 的活性,而活化的 CDK 则会在 CKI 的作用下被抑制,因此 CDK 的激活需要满足这 3 个关键事件。

1.1 与周期蛋白结合形成复合物

周期蛋白(cyclin)是一类在细胞周期调控过程中表达量呈周期性变化的蛋白质,周期蛋白最初是由 Tom Evans 在 1983 年研究海胆细胞周期时发现,主要通过激活 CDK 活性和其他细胞周期相关的酶,进而控制细胞周期进程的蛋白质家族^[18-19]。在脊椎动物中,周期蛋白包括 A、B、D、E、F、G 和 H 等类型,可在特定时期与特定 CDK 结合构成周期蛋白-CDK 复合物,例如 cyclinD-CDK4/6、cyclinE-CDK2、cyclinA-CDK2、cyclinH-CDK7、cyclinA-CDK1 和 cyclinB-CDK1 等^[3,20]。每一组周期蛋白-CDK 可通过触发下一组周期蛋白-CDK 以及其他相关细胞周期蛋白的表达,调控各个阶段细胞周期的有序进行^[7]。另外,周期蛋白拥有如下基本结构与特征,包括氨基酸结构域(又称为细胞周期蛋白盒)、破坏框、脯氨酸/谷氨酸/丝氨酸/苏氨酸(pro-glu-ser-thr, PEST)序列等^[3]。这些结构与特征调控周期蛋白与 CDK 结合、周期蛋白的泛素化降解、G1 期周期蛋白更新等过程^[3]。此外,不同种类的周期蛋白只在细胞周期特定时期表达和调节特定 CDK。随着细胞周期的进展,周期蛋白产生效应后立即降解^[21]。但有趣的是 CDK 的浓度不会随着周期进程变化而波

动。因此,在细胞周期进程中其活性的激活则是细胞周期各阶段进程能顺利进行的关键。此外,周期蛋白的降解是由后期促进复合物(anaphase-promoting complex/cyclosome, APC/C)在M期后期至G1期后期的活动,以及SCF(Skp1-Cull1-F-box)-Skp2(S-phase kinase-associated protein 2)复合物在G1期后期至M期早期的活动所致^[22-23]。另外,在胚胎干细胞中周期蛋白的表达模式明显与体细胞不同^[24]。例如小鼠胚胎干细胞具有更高且持续的cyclinA/E蛋白质表达水平,且在整个细胞周期中cyclinA/E的相关激酶CDK2被持续性激活^[25]。表明周期蛋白在细胞周期进程中的表达模式不是一成不变,且在不同细胞类型中表达存在差异。因此,在探究不同细胞类型周期进程中,应注意对细胞周期蛋白表达模式的确认及验证,见图1A。

1.2 CDK 特定位点的磷酸化修饰

CDK与周期蛋白结合是其具有活性的必备条件,但仅有周期蛋白结合还不足以激活CDK,必须在CDK特定位点的磷酸化或去磷酸化才能使其活性得以激活。人类和小鼠体细胞周期研究中发现,WEE激酶家族是驱动CDK抑制位点磷酸化主要的蛋白质激酶家族,该家族主要由这3类蛋白质WEE1、膜相关酪氨酸/苏氨酸蛋白激酶1(protein kinase membrane associated tyrosine/threonine 1, PKMYT1)和WEE1B构成,主要通过介导Tyr15和Thr14位点的磷酸化,降低CDK的活性^[26-28]。WEE激酶家族所造成的CDK活性降低,致使大量周期蛋白-CDK无活性,从而导致该复合物在细胞周期下一阶段开始前大量积累^[27]。而一种在进化上保守的磷酸酶细胞分裂周期25(cell division cycle 25, Cdc25),可通过移除CDK上由WEE激酶介导的抑制性磷酸基团,重新激活周期蛋白-CDK^[29-30]。有趣的是,重新活化的周期蛋

白-CDK还可抑制WEE激酶的活性,并防止WEE激酶再一次灭活CDK^[31]。同时,在人类体细胞中发现活化的周期蛋白-CDK还可磷酸化激活Cdc25的活性,使得周期蛋白-CDK可在短期内急剧增加,这表明了一种周期蛋白-CDK活性激活的反馈调控机制^[32]。在CDK的激活中,除抑制位点磷酸化外,激活位点的磷酸化也是决定CDK活性激活的关键。在人类和小鼠体细胞中发现,CDK激活激酶(CDK-activating kinase, CAK)可通过磷酸化CDK的Thr161位点,激活CDK活性,从而确保细胞周期有序且精确地进行^[33-34]。综上所述,CDK激活需要如下两种模式:通过Cdc25将WEE激酶介导的抑制性磷酸基团去除,称为抑制位点去磷酸化;通过CAK将CDK的激活位点磷酸化,称为激活位点磷酸化。而只有这两种磷酸化模式同时在CDK上进行,才可激活CDK的活性。因此,在细胞周期进程中对CDK特定位点磷酸化状态的探究就显得尤为关键,见图1B。

1.3 CDK 活性抑制剂

在细胞周期中存在多种CKI,激酶4抑制因子(inhibitors of kinase 4, INK4)家族(p16^{INK4A}、p15^{INK4B}、p18^{INK4C}和p19^{INK4D}等)、抑制蛋白(CDK interaction protein/kinase inhibitor protein, CIP/KIP)家族(p21^{Cip1}、p27^{Kip1}和p57^{Kip2}等)以及核糖体蛋白抑制CDK(ribosomal protein-inhibiting CDKs, RPICs)^[7]。这些CKI主要通过抑制周期蛋白-CDK相互作用,阻止周期蛋白与对应的CDK结合,从而抑制CDK活性,造成细胞周期进程停滞^[35]。其中,INK4家族仅抑制cyclinD-CDK4/CDK6,而CIP/KIP家族则具有更广泛的特异性,可抑制cyclinD-CDK4/CDK6、cyclinE-CDK2、cyclinA-CDK2和cyclinB-CDK1等^[35-36]。因此,为了保证在特定时期细胞周期正常有序进行,则需对这些抑制剂进行降解或

抑制以及相应的激活。在多种人类恶性肿瘤(多发性骨髓瘤等)细胞中发现 SCF-Skp2 复合物可通过泛素化降解 CKI, 消除 CKI 对周期蛋白-CDK 的抑制效果, 促进细胞周期进程^[37]。TGF- β (transforming growth factor-beta)信号通路被证明可通过促进 SMAD2/3 和 SMAD4 结合, 抑制 c-Myc 促进 p15^{INK4B} 表达^[38]。并且 SMAD2/3-SMAD4 复合物还可直接与 p15^{INK4B} 和 p21^{Cip1} 相互作用促进其表达, 从而抑制细胞周期进程^[39]。另外, p107 和 E2F 转录因子 4/5 (adenovirus E2 promoter binding factor transcription factor 4/5, E2F4/5)也可作为 SMAD 的辅助因子, 抑制 c-Myc 促进 p15^{INK4B} 表达^[40]。可见在

细胞周期进程调控中 SMAD 家族起着重要作用。此外, DNA 损伤可通过激活 p53 促进 p21^{Cip1/WAF1} 的表达, 抑制相关 CDK 的激活, 阻碍细胞周期进程^[41]。另外, CDK 不仅可被 CKI 抑制, 同时周期蛋白-CDK 还可通过隔离 CKI, 促进相关 CDK 激活, 例如在乳腺癌和人类 B 细胞淋巴瘤细胞周期研究中发现 cyclinD-CDK4/6 可通过与 p27^{kip1} 特异性结合, 隔离 p27^{kip1} 对 cyclinE-CDK2 的抑制作用, 促进 CDK2 的激活^[42]。表明 CDK 与 CKI 可能存在一种反馈调节机制。综上所述, CDK 活性激活需要将这些由泛素化介导的 CKI 在细胞周期特定时期内降解, 才可保证细胞周期有序进行, 见图 1C。

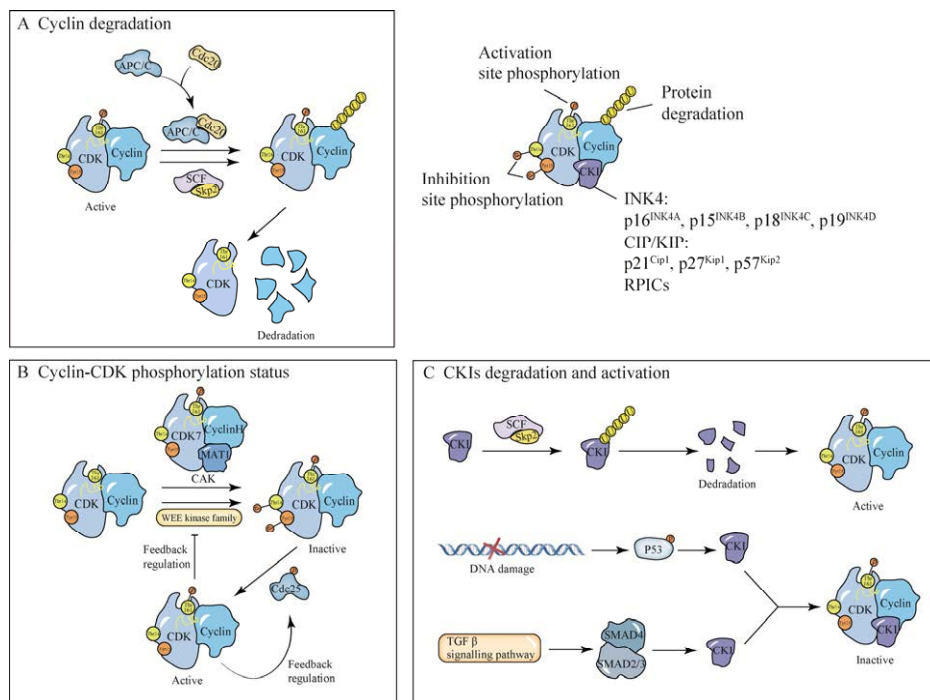


图 1 Cyclin-CDK 活性调控过程

Figure 1 The regulation process of cyclin-CDK activity. A: Cyclin ubiquitination and degradation. Cyclin is ubiquitinated and degraded by APC/C-Cdc20 or SCF-Skp2^[22-23]. B: Cyclin-CDK phosphorylation modification, CAK mediates Thr161 phosphorylation, WEE kinase family mediates Thr14 and Tyr15 site phosphorylation, phosphorylated Cdc25 activates cyclin-CDK by removing Thr14 and Tyr15 phosphate groups, and feedback regulates Cdc25 and WEE kinase family activities^[27,30,33]. C: CKIs ubiquitination degradation and activation, CKIs are degraded by SCF-Skp2 ubiquitination and degradation, DNA damage activates P53 to promote the expression of CKIs, and the TGF- β signalling pathway mediates SMAD4-SMAD2/3 binding to promote the expression of CKIs^[7,38].

2 G1期 cyclinD-CDK4/6 复合物

D 型细胞周期蛋白(cyclin D1/D2/D3)与 CDK4/6 是驱动整个细胞周期启动的核心分子。胞外生长因子信号通过 MAPK (mitogen-activated protein kinases)信号通路刺激 cyclinD-CDK4/6 启动细胞周期^[43]。在细胞分裂过程中,激活的 cyclinD-CDK4/6 可通过使底物视网膜母细胞瘤蛋白(retinoblastoma protein, RB)磷酸化,促使 RB 与 E2F1/2/3 解离,激活 E2F1/2/3 的转录活性,从而协同 DP1/2 促进 cyclinE 及进入 S 期所需的酶和蛋白质翻译,进而保证 G1-S 期转换^[19,44]。此外,非磷酸化的 RB 可与转录因子 E2F1/2/3 紧密结合抑制转录因子的活性,从而诱导 G1 期停滞^[45]。表明在 G1-S 期转换过程中磷酸化 RB 是关键事件。此外,有学者发现 cyclinD-CDK4/6 通过与 RB C 末端的一个 α -螺旋配对,从而磷酸化 RB,并且该螺旋不可被 cyclinE、cyclinA 和 cyclinB 识别,而且 RB C 末端螺旋的突变能阻止其被 cyclinD-CDK4/6 磷酸化,从而造成 G1 期停滞,表明 cyclinD-CDK4/6 磷酸化 RB 与其 C 端螺旋密切相关^[46]。

磷酸酶 Cdc25A 已在体细胞中被证明可通过去除特定位点磷酸化激活 cyclinD-CDK4/CDK6,促进 G1-S 期转换^[47]。而 G1 期至有丝分裂期 Cdc25A 是一种不稳定的蛋白质,并且过于稳定的 Cdc25A 会造成 G1-S 期和 G2-M 期转换加速,致使基因组不稳定导致癌症及疾病发生^[32]。而 cyclinD-CDK4/CDK6 可通过以 ssTrCP 依赖的方式降低 Cdc25A 的稳定性,保证 G1-S 期正常转换^[32]。表明 cyclinD-CDK4/CDK6 与 G1 期 Cdc25A 间可能存在一种调控负反馈回路,控制着 G1-S 期转换。此外,异常表达的 cyclinD 会导致 DNA 损伤、复制应激和

检查点激酶 1 (checkpoint kinase 1, CHK1)激活,致使细胞出现异常生长^[48]。因此,关于 cyclinD-CDK4/6 降解机制的研究就显得尤为关键。研究发现, cyclinD 羧基末端磷酸化可触发泛素化蛋白酶体降解途径,并且该途径受到泛素连接酶(E3)家族成员 CRL4^{AMBRA1} (the cullin-4-based RING-type)调控^[49]。AMBRA1 (activating molecule in beclin-1-regulated autophagy)主要负责 cyclinD 与 CRL4 的靶向连接,随后 E3 则将泛素蛋白链(ubiquitin, Ub)附着在 cyclinD 上,从而使 cyclinD 被泛素化降解^[48-49]。另外,当 AMBRA1 耗竭或下调时 cyclinD 及 Myc (n-Myc、c-Myc)家族蛋白水平升高,并且 Myc 家族蛋白质水平升高的同时还可上调 cyclinD 和 cyclinE 的表达,促进细胞周期的进展^[48]。此外,AMBRA1 水平的降低可能是对 CDK4/6 抑制剂脱敏的机制之一,其可通过增加 cyclinD-CDK4/6 和 cyclinD-CDK2 的形成,从而抵抗 CDK4/6 抑制剂的敏感性^[50]。表明 AMBRA1 是 G1-S 期转换的关键调节因子,可控制 G1-S 期的转换,并有助于在 DNA 复制期间保持基因组的完整性减缓发育异常和肿瘤生长。cyclinD-CDK4/6 机制调控过程如图 2A 所示。

3 G1期 cyclinE-CDK2 复合物

在正常细胞周期中,CDK2 通过与 E 型细胞周期蛋白(cyclinE1/E2)结合促进 G1-S 期转换^[51]。并且 E 型细胞周期蛋白与 CDK2 构成的复合物主要通过使特定底物磷酸化控制细胞周期进程和 DNA 复制^[51]。其中, cyclinE-CDK2 通过催化 RB 磷酸化,致使 RB 失去对 E2F 的抑制作用,促进 DNA 复制相关基因转录和 G1-S 期转换^[51-52]。此外,由 cyclinD-CDK4/6 激活介导的 RB 磷酸化失活,可通过促进 E2F 释放使

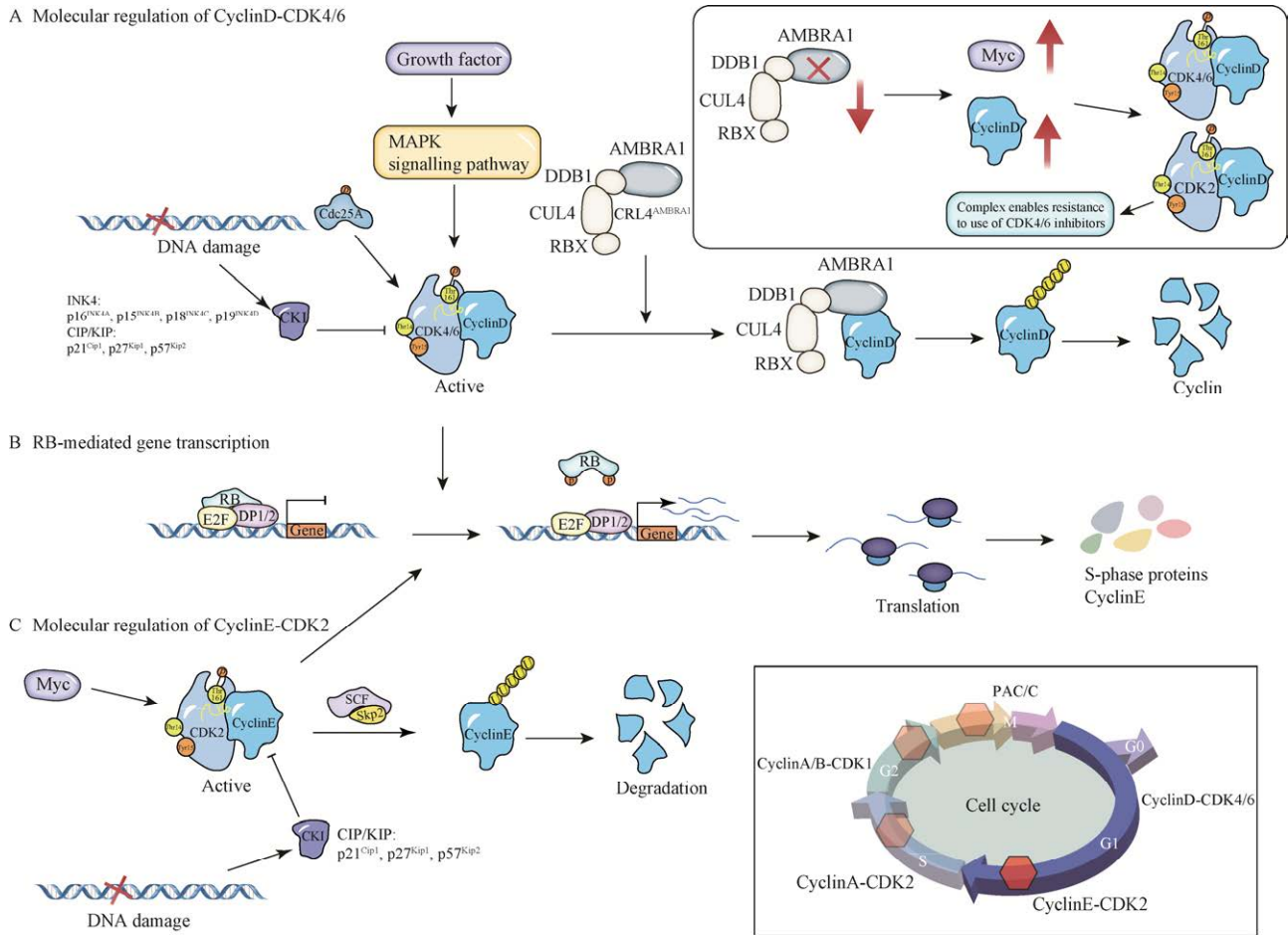


图2 G1期 cyclin-CDK 机制调控过程

Figure 2 The regulation process of cyclin-CDK mechanism in G1-phase. A: Mechanistic regulation of cyclinD-CDK4/6. Growth factor signaling-mediated MAPK signaling and phosphorylated Cdc25A can activate cyclinD-CDK4/6 activity; DNA damage inhibits cyclinD-CDK4/6 activity by activating CKI; cyclinD is inhibited by CRL4^{AMBRA1} ubiquitination degradation, and lack of CRL4^{AMBRA1} increases the expression of Myc and cyclinD, promotes cyclinD binding to CDK4/6 and CDK2, and reduces sensitivity to CDK4/6 inhibitors^[19,43,47-50]. B: RB-mediated gene transcriptional regulation. CyclinD-CDK4/6 and cyclinE-CDK2 phosphorylate RB bound to E2F, thereby promoting S-phase related genes and cyclinE translation^[45,46]. C: Mechanistic regulation of cyclinE-CDK2. CyclinE-CDK2 activity is activated by Myc, inhibited by DNA damage-activated CKI, and degraded by ubiquitination by SCF-Skp2^[53,55].

cyclinE 表达量升高,从而使 cyclinE 在 G1 期积累^[44]。在 G1 期积累的 cyclinE 则通过激活 CDK2 促进细胞 G1-S 期转换,并且此时 cyclinE 的表达量达到峰值^[44]。到 S 期结束时, cyclinE 被 SCF-Skp2 复合物降解, cyclinE-CDK2 活性被消除,直至下一个 G1 期开始^[53]。cyclinE 的 C 端

截断和 C 端附近的错义突变可赋予其在体内的高稳定性^[54]。cyclinE-CDK2 的 Thr380 自磷酸化抑制 cyclinE 表达,破坏 cyclinE 的稳定性,而当 Thr380 突变为 Ala 后, cyclinE 稳定性增加^[54]。并且 T380A 突变可消除 cyclinE 的破坏性磷酸化,并阻止 cyclinE 被泛素化降解^[54]。表

明 cyclinE-CDK2 的激活与 cyclinE 的特异性位点自磷酸化和泛素依赖性降解间的机制联系。此外, *Myc* 基因家族可通过刺激和抑制关键细胞周期调节因子的表达, 在生长控制和细胞周期进程中发挥作用^[55]。并且过表达的 *Myc* 可通过激活 cyclinE-CDK2, 促进 G1-S 期转换^[55]。cyclinE-CDK2 机制调控过程见图 2B。

4 S 期 cyclinA-CDK2 复合物

CyclinA-CDK2 是 S 期的标志复合物。cyclinA 表达的阻断及 cyclinA-CDK2 活性的抑制是对正常细胞中细胞周期阶段控制具有特异性的事件, 是癌细胞凋亡网络的一部分^[56]。研究发现, 在 S 期 cyclinA-CDK2 可通过磷酸化细胞分裂周期 6 (cell division cycle 6, Cdc6), 使其从 G1 期的核定位移位到细胞质中, 从而调控 Cdc6 在启动 DNA 复制过程的作用, 阻止 S 期和 G2 期的 DNA 再复制^[57]。另外, DNA 复制的启动涉及细胞周期依赖性组装和蛋白质复合物的拆卸, 包括起源识别复合物(origin recognition complex, ORC)和 Cdc6 AAA(+)-ATPases^[58]。其中, ORC 可与 Cdc6 结合形成包含 6 个 AAA+亚基的环状复合物, 并通过 Cdc6 将启动目标定位到染色体中的特定 DNA 序列^[59]。并且 Cdc6 和 Cdt1 (Cdc10-dependent transcript 1)可将微小染色体维持家族(minichromosome maintenance family, MCMs)招募到复制起点, 并与 ORC 和 Cdc45 结合形成复制前复合物(pre-replication complex), 共同驱动 DNA 生物合成^[60]。另外, 在缺乏起源活性的 DNA 上, Cdc6 ATPase 促进 Cdc6 的解离, 而具有起源活性的 DNA 则可下调 Cdc6 ATPase 稳定 ORC-Cdc6-DNA 复合物, 促进 MCM 加载启动 DNA 复制^[58]。表明特定的 DNA 序列可通过控制 Cdc6 ATPases 的速率, 调控 Cdc6 从 ORC-Cdc6-DNA 复合物中

解离的速率。此外, cyclinA-CDK2 的磷酸化可导致染色质许可和 DNA 复制因子 1 (chromatin licensing and DNA replication factor 1, Cdt1)降解, 并且 Cdt1 的降解、Cdc6 的移位以及联会蛋白(geminin)能防止 MCM 与染色质在 S 期结合, 从而通过控制复制起点严格限制染色体在每个细胞周期中只复制一次^[61]。综上所述, 维持基因组稳定性需要每个细胞周期精确复制一次 DNA, 而这一过程可能是通过限制复制起点许可实现, 使每个复制起点的触发限制为每个细胞周期一次。

此外, 正常的 DNA 复制过程中, cyclinA-CDK2 激活受到 Cdc25 的调控, 从而保证 DNA 的复制受到严格调控^[62]。但随着 DNA 损伤信号 ATM/ATR-Chk1/Chk2 激酶的传导, 使 Cdc25 暴露出一段降解基序, 导致 Cdc25 被泛素化降解^[62]。而 Cdc25 的降解则导致 cyclinA-CDK2 中的 CDK2 无法去除抑制性磷酸基团, 致使其激活被抑制, 细胞周期进程被阻止^[63]。另外, cyclinA-CDK2 可通过磷酸化抑制 RB, 促进 E2F1/2/3 和 DP1/2 复合物合成 S 期蛋白, 从而促进 S 期 DNA 合成^[64]。并且有序的 S 期进展还需要 E2F 及时失活, cyclinA-CDK2 可通过与 E2F 稳定结合, 从而指导 E2F-DP1/2 异构体的磷酸化, 中和其 DNA 结合能力, 致使其活性降低, 保证有序的 S 期进展^[65]。在 S-G2 期转换过程中, cyclinA2 的定位从只在细胞核到既在细胞核又在细胞质的变化, 并且只有在细胞质的 cyclinA2-CDK2 可通过 Bora 的磷酸化激活有丝分裂激酶 PLK1 (polo-like kinase 1)^[66]。表明细胞质中的 cyclinA2 可能通过触发 PLK1 的激活调控 S-G2 期转换, 且细胞质存在的 cyclinA2 受到 DNA 损伤信号调控。而 DNA 损伤信号主要通过 DNA 依赖性蛋白激酶(DNA dependent protein kinase, DNA-PK)和 ATM/ATR-Chk1/Chk2 两条激酶途径

磷酸化激活 p53, 促进 CKIs (p21^{Cip}、p27^{Kip1/2} 和 p57^{Kip1/2}) 的表达, 抑制 cyclinA-CDK2 活性造成 S-G2 期转换停滞^[67]。因此, cyclinA2 核质定位以及 p53 活性的变化, 是细胞周期进程中至关重要的事件, 是 S-G2 期转换的关键。核糖核酸还原酶 (ribonucleotide reductase, RNR) 催化用于 DNA 合成的脱氧核糖核苷酸三磷酸 (deoxyribonucleotide triphosphates, dNTP) 构建块的从头合成, 且 RNR 是由两个大的 RRM1 亚基和两个小的 RRM2 亚基组成的异源四聚体^[68]。在 S-G2 期, RRM1 的 Ser559 可被 cyclinA-CDK2 磷酸化, 并且 RRM1 的这种 S559 磷酸化可增强 RNR 活性, 维持正常 DNA 复制过程中所需的 dNTPs, 确保基因组稳定^[68]。此外, RRM1 S559 磷酸化和 ATR 的联合靶向可触发致命的复制应激和深刻的抗肿瘤作用^[68]。因此, RRM1 的翻译后磷酸化可为精细调节 RNR 和癌症的治疗提供新策略。CyclinA-CDK2 机制调控过程见图 3。

5 S 期 cyclinH-CDK7 复合物

CyclinH-CDK7 是调控细胞周期进程的关键复合物, 其遗传失活可导致细胞周期停滞, 诱发成人干细胞衰竭导致的过早衰老等疾病的发生^[69]。研究发现, cyclinH-CDK7-MAT1 (mating-type locus) 组成的三聚体复合物 CDK 激活激酶 (CDK-activating kinase, CAK), 是激活周期蛋白-CDK 活性的基础^[34]。CAK 通过使周期蛋白-CDK 的 T-loop 发生磷酸化, 从而激活特定的周期蛋白-CDK 活性, 调控细胞周期进程^[70]。在后生动物中, cyclinH-CDK7-MAT1 是当前被发现的 CDK2 和 CDK1 唯一已知的 CAK, 并且通过使 CDK1 和 CDK2 激活位点磷酸化调控细胞周期进程^[71]。CDK2 所结合的复合物 cyclinA-CDK2 的激活是促进

S 期进展的关键过程, 抑制 CDK7 则阻止了 cyclinA-CDK2 的激活, 延迟了 S 期的进展^[72]。CDK1 所结合的复合物 cyclinA-CDK1 和 cyclinB-CDK1 的激活是触发有丝分裂的关键过程, 抑制 CDK7 则会阻止有丝分裂的进入并破坏 cyclinB-CDK1 的组装^[72]。此外, CDK7 除可以建立 CDK1 和 CDK2 的活性, 还可通过维持 CDK4 和 CDK6 的活性, 启动细胞周期起始^[73]。当细胞退出静止状态时, CDK7 与 CDK4 的激活磷酸化同时上升, 并加速 CDK4 的激活^[73]。表明 CDK7 及其结合的 cyclinH-CDK7-MAT1 三聚体是细胞周期进程的关键调控因素, 主要通过激活相关周期蛋白-CDK 的活性驱动细胞周期进程。

此外, CAK 还与转录因子 IIH (transcription factor IIH, TFIIH) 介导的转录起始以及 DNA 修复有关, 通过磷酸化 RNA 聚合酶 II (RNA polymerase II, Pol II) 和相关转录因子 (例如雌激素受体- α), 调节基因表达^[74]。当 CAK 与 TFIIH 结合时, CAK 通过其 C 末端结构域 (C-terminal domain, CTD) 的高磷酸化激活 Pol II 介导转录起始; 而在没有 TFIIH 的情况下, CAK 则通过控制 CDK T-loop 的磷酸化调控 CDK 活性^[70]。另外, CDK7 激活还可以独立于 T-loop 磷酸化发生, 而这依赖于 MAT1 使 CDK7 的 T-loop 定位在其活性构象中^[70]。这些结果表明 CAK 在细胞周期进程和基因转录调控中起着重要的作用。另外, M 期促进因子 (M phase-promoting factor, MPF) 也被证明可通过诱导 CDK7 磷酸化, 致使 TFIIH 相关的激酶和转录活动受到抑制, 导致有丝分裂受到抑制^[75]。综上所述, cyclinH-CDK7-MAT1 组成的 CAK 是激活相关周期蛋白-CDK 活性的基础, 是细胞周期进程中关键的调控因子。

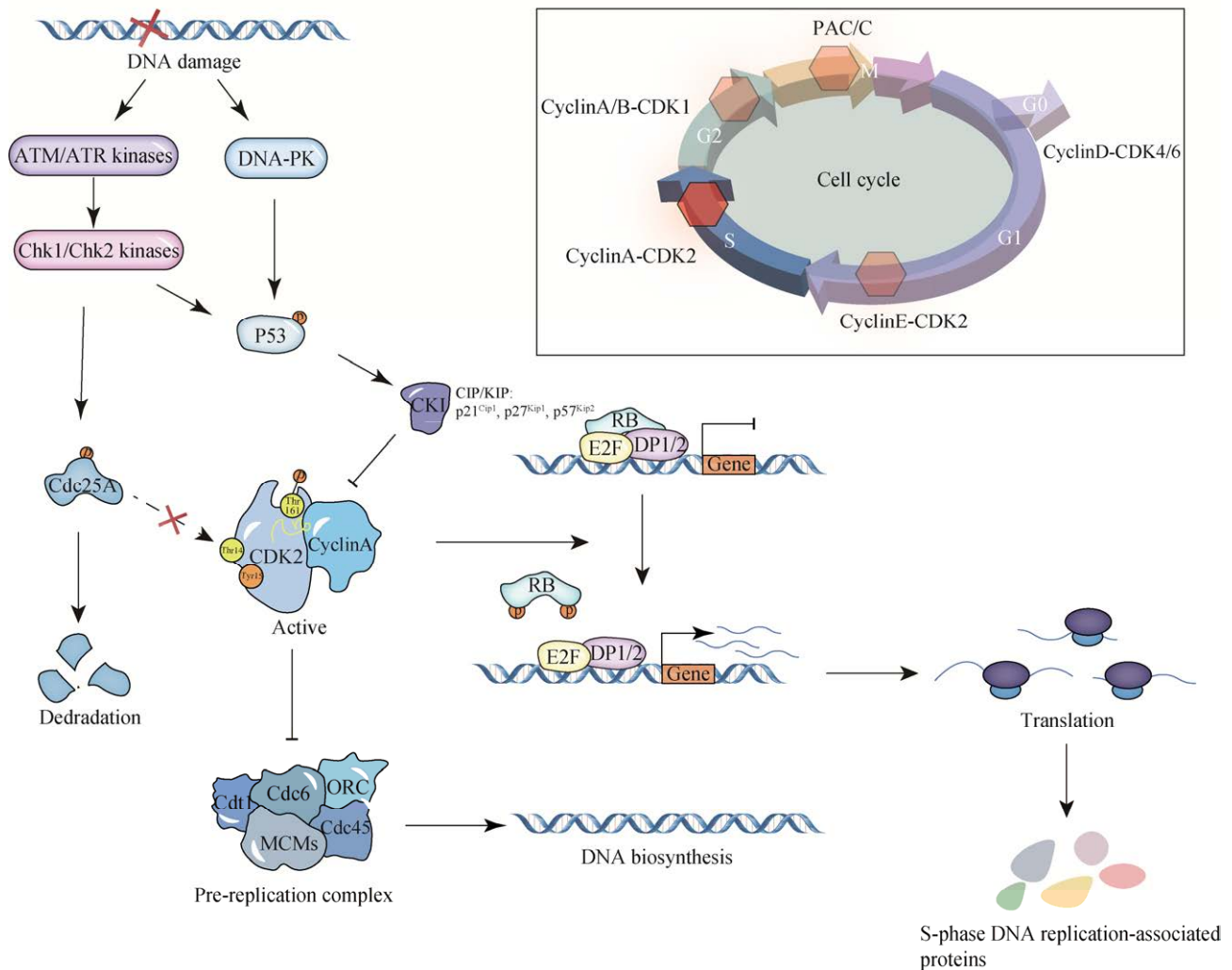


图3 S期 cyclinA-CDK2 机制调控过程

Figure 3 The regulatory process of cyclinA-CDK2 mechanism in S-phase. DNA damage activates P53 expression by activating DNA-PK and ATM/ATR-Chk1/Chk2 kinase pathways and promotes CKI expression; ATM/ATR-Chk1/Chk2 kinase pathway inhibits cyclinA-CDK2 activation by ubiquitinating and degrading Cdc25A; Activated cyclinA-CDK2 inhibits DNA biosynthesis by inhibiting the pre-replication complex; activated cyclinA-CDK2 phosphorylates RB and promotes the translation of DNA replication-related proteins in S-phase^[60-62,64,67].

6 G2期与M期中的 cyclinB-CDK1复合物

正常细胞周期进程中，B型细胞周期蛋白(cyclinB1/B2/B3)通常通过与CDK1结合触发有丝分裂^[76]。在G2期，只有cyclinB积累到一定阈值才会触发G2-M期转换，但cyclinB被破坏

则会造成G2-M期转换停滞，细胞周期进程紊乱^[77]。在M期，cyclinB的表达则会导致有丝分裂中期向后期转换停滞，造成细胞周期进程停滞。机制调控过程见图4。

6.1 cyclinB-CDK1的核质定位

在细胞周期进程调控过程中，cyclinB穿梭于细胞核与细胞质之间，并在不同结构中聚集。

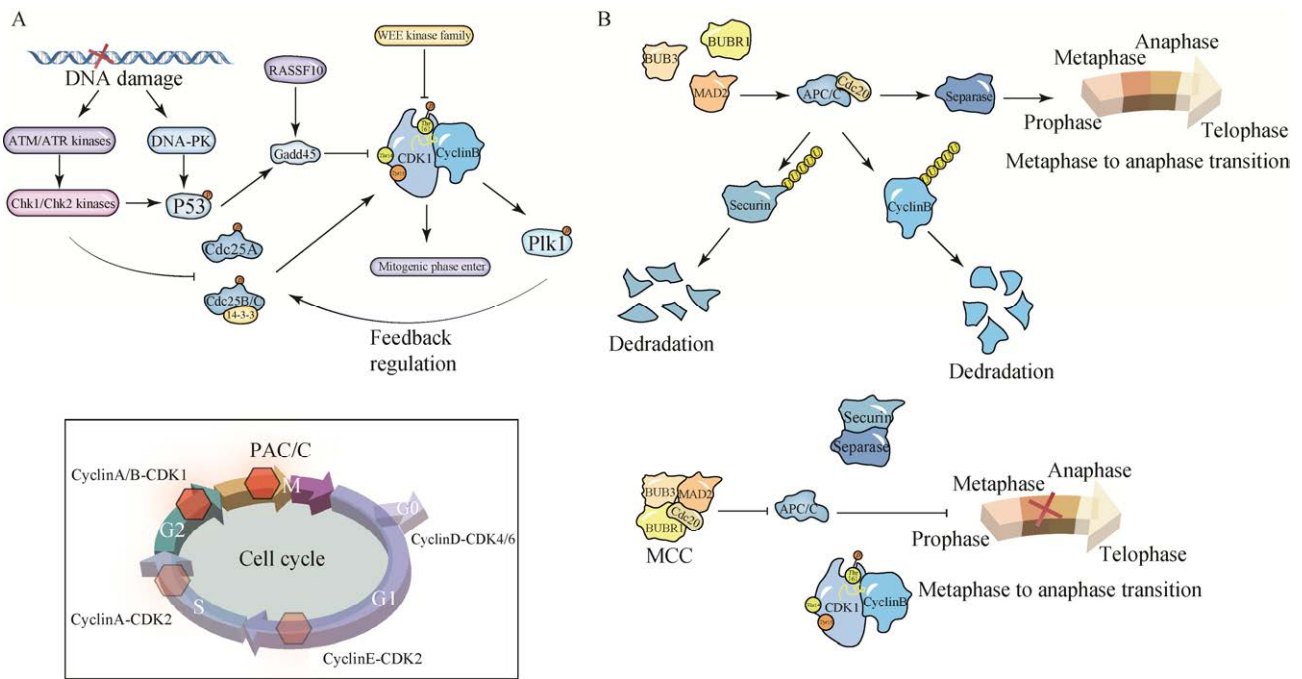


图 4 G2 期与 M 期 cyclinB-CDK1 机制调控过程

Figure 4 The regulatory process of cyclinB-CDK1 and PAC/C mechanism in G2 and M phases. A: Mechanistic regulation of cyclinB-CDK1 in G2-phase. DNA damage mediates p53 expression by activating DNA-PK and ATM/ATR-Chk1/Chk2 kinase pathways, promoting Gadd45 to inhibit cyclinB-CDK1 activation; RASSF10 inhibits cyclinB-CDK1 activation by promoting Gadd45; WEE kinase family inhibits the activation of cyclinB-CDK1; Cdc25B/C binds to 14-3-3 to activate cyclinB-CDK1, and the activated cyclinB-CDK1 can feedback-regulate the activity of Cdc25B/C and 14-3-3 complex by activating PIK1, promote M-phase entry^[87-89,91]. B: CyclinB-CDK1 mechanism regulation in M-phase. When Cdc20 is released from MCC and binds to APC/C, it promotes the ubiquitination and degradation of securin and cyclinB, thereby promoting the transition from metaphase to anaphase; When MCC factors are tightly bound, APC/C activity is inhibited, resulting in arrest of metaphase to anaphase transition^[92-94].

在间期, cyclinB-CDK1 穿梭于细胞核和细胞质并聚集在中心体, 促进核层的分解和核膜破裂 (nuclear envelope breakdown, NEBD); 在前期, cyclinB-CDK1 聚集在细胞核及有丝分裂纺锤体; 在中期, cyclinB-CDK1 聚集在纺锤体中间重叠的微管, 调控姐妹染色单体分离^[78-79]。在中期结束时 cyclinB-CDK1 从纺锤体消失, 进入后期后细胞质中的 cyclinB-CDK1 也逐渐消失^[80]。表明 cyclinB-CDK1 的时空变化调节可能调控着有丝分裂进程。此外, CDK1 激活磷酸化需

要 cyclinB-CDK1 转移到细胞核中才能进行, 阐明在有丝分裂开始时控制 cyclinB1-CDK1 空间易位的介质的作用对于细胞周期进程调控至关重要^[77]。另外, cyclinB 核输入的增加是由核输入机制的变化驱动, 既不需要 PIK1 调控也不需要抑制核输出^[78]。因此, cyclinB-CDK1 的激活和其快速的核输入之间的内在联系协调着有丝分裂进入时细胞核和细胞质的重组。

6.2 G2-M 期转换中的 cyclinB-CDK1

CyclinB-CDK1 与 Greatwall (Gwl)是 M 期

促进因子(M-phase promoting factor, MPF)的关键组分,可促进 M 期启动^[81]。研究发现,虽然过量的 cyclinB-CDK1 可诱导核膜破裂,但抑制纺锤体组装,Greatwall 则可逆转这种现象发生并减少核膜破坏所需的 cyclinB-CDK1 数量,形成具有对齐染色体的纺锤体^[81]。表明 Greatwall 与 cyclinB-CDK1 存在反馈调控作用。在没有 Greatwall 的情况下,即使 cyclinB-CDK1 完全活跃,MPF 在细胞质中也检测不到,而当 Greatwall 被添加时,MPF 的活性也随之恢复,从而触发有丝分裂^[81]。表明 MPF 活性激活需要 cyclinB-CDK1 与 Greatwall 共同调节。此外,Greatwall 在有丝分裂开始时可使抑制 CDK 活性的蛋白磷酸酶 PP2A/B55 失活,从而使 CDK 的活性在分裂期达到最大^[82]。而在 G2-M 期 Greatwall 可被 CDK1 磷酸化激活,产生一个双稳态分子开关,使 cyclinB-CDK1 完全激活^[82]。并且 Greatwall 对 PP2A:B55 的抑制,可使缺乏 cyclinB-CDK1 的细胞进入有丝分裂并对大多数与有丝分裂相关的蛋白质进行磷酸化^[83]。表明 Greatwall 与 cyclinB-CDK1 存在反馈调控作用,并且两者相互协同在细胞周期进程调控中发挥着关键作用。

此外, cyclinB-CDK1 活性受到一类 p53 调节的 DNA 损伤诱导蛋白家族 Gadd45 (growth arrest and DNA damage 45)调控,包括 Gadd45a、Gadd45b 和 Gadd45g 等^[84]。在 DNA 损伤时, Gadd45a、Gadd45b 和 Gadd45g 通过抑制 cyclinB1-CDK1 活性造成 G2-M 期停滞、生长抑制和细胞凋亡^[85]。此外,这 3 种 Gadd45 蛋白质在细胞暴露于紫外线照射后可协作激活 S 期和 G2-M 期检查点,其中 Gadd45b 和 Gadd45a 对 cyclinB-CDK1 活性的抑制涉及复合物的破坏,而 Gadd45g 没有破坏复合物^[85]。Ras 相关

域蛋白家族(Ras association domain family, RASSF)是由许多肿瘤抑制基因编码,并被证明可抑制肿瘤细胞增殖^[86]。其中, RASSF10 可通过促进 GADD45a 的核积累,抑制 cyclinB-CDK1 形成,诱导有丝分裂停滞^[87]。并且敲除 NPM 或 GADD45a,可导致 RASSF10 介导的 G2-M 期停滞受损^[87]。另外,在 G2-M 期选择性抑制 NFkappaB 可使 G2-M 期特异性基因 cyclinB1/B2、Plk1 和 Cdc25B 的转录被抑制,延迟有丝分裂进入^[88]。

在 G2-M 期转换中, Cdc25 家族(Cdc25A/B/C)起着重要作用。Cdc25 家族可通过消除由 WEE 激酶家族介导的 CDK1 Thr14 和 Tyr15 位点抑制性磷酸化以及与 14-3-3 结合的方式,激活 cyclinB-CDK1 活性,调控 G2-M 期转换^[89-90]。同时, Cdc25A/B/C 的活性也都受到 DNA 损伤信号诱导的 ATM/ATR-Chk1/2 激酶信号传导途径调控^[91]。虽然 cyclinB 的积累可触发 G2-M 转换,但过早的 cyclinB 破坏则可触发有丝分裂退出。cyclinB 的破坏主要受到异常激活的 E3 泛素连接酶 APC/C 和其共激活剂 Cdc20 调控^[92]。因此,可通过降低 Cdc20 对 APC/C 的亲和力,以及催化有丝分裂检查点复合物(mitotic checkpoint complex, MCC) MAD2-BUBR1-BUB3-Cdc20 的组装等方式阻止 APC/C 的异常激活,防止这种有丝分裂提前退出事件发生,从而使细胞周期有序进行^[93-94]。

6.3 有丝分裂中期向后期转换中的 cyclinB-CDK1

在有丝分裂中期向后期转换过程中, APC/C 被 Cdc20 激活,并且激活的 APC/C 促进分离酶抑制蛋白(securin)和 cyclinB 的泛素化降解启动后期^[95]。在有丝分裂早期,姐妹染色单体被黏连蛋白复合物固定^[96]。姐妹染色单体的分离由有丝分裂后期分离酶(Separin)触发,分

离酶则通过其抑制剂 securin 和 cyclinB 的降解被激活, 从而促进中后期的转换^[96]。表明 securin 与 cyclinB 是抑制分离酶活性的关键因子, 在中后期转换中起着关键作用。综上所述, cyclinB 在 G2 期表达水平的维持可促进 G2-M 期转换, 但进入有丝分裂期后, 高水平的 cyclinB 则会通过抑制分离酶活性, 造成中期向后期转换停滞。因此 cyclinB 需要在特定时期表达和降解, 从而推进细胞周期进程的有序进行。

7 CDK 抑制剂在癌症和疾病中的应用

7.1 CDK4/6 抑制剂

当前已有多类高特异性 CDK4/6 抑制剂被批准用于癌症及疾病的治疗, 包括帕博西尼 (palbociclib)、瑞博西尼 (ribociclib)、阿贝西利 (abemaciclib) 和曲拉西利 (trilaciclib) 等^[97]。但在临床研究发现癌症及疾病对这些抑制剂有耐药性, 并且许多耐药性病例缺乏分子研究基础。因此, 解析这类抑制剂在癌症及疾病中的功能机制, 将有助于提升治疗效果。AbuHammad 等^[98]在黑色素瘤中发现帕博西尼与蛋白精氨酸甲基转移酶 5 (protein arginine methyltransferase 5, PRMT5) 抑制剂 GSK3326595 联合使用可延缓耐药性的出现, 并且提供的临床证据表明 CDK4/6 和 PRMT5 的联合抑制是一种有效且耐受性良好的治疗策略。Peng 等^[99]在结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 中发现, E26 转化特异性变异转录因子 5 (E26 transformation-specific variant transcription factor 5, ETV5) 可通过抑制 p21 促进 G1-S 期转换, 加速 CRC 的生长, 并改变 CRC 对帕博西尼和迪那昔布 (dinaciclib) 的药物敏感性。Zhou 等^[100]发现在前列腺癌和乳腺癌细胞中, 组蛋白去乙酰化酶 5

(histone deacetylase 5, HDAC5) 的缺失会损害 RB 对促癌基因的抑制并赋予癌症对帕博西尼的耐药性, 而且这种影响被溴域和外端 (bromodomain and extra-terminal, BET)-环磷酸腺苷反应元件结合蛋白 (cyclic adenosine monophosphate response element binding protein, CBP)/p300 双重抑制剂 NEO2734 克服。这些结果表明 CDK4/6 抑制剂与其他药物的联合治疗可有效地减轻耐药性的发生。

Zhang 等^[101]在乳腺癌中发现帕博西尼和吡罗替尼 (pyrotinib) 的联合治疗可通过降低 pAKT 和 pHER3 (phosphorylated human epidermal growth factor receptor 3) 活性, 诱导 G0-G1 期停滞, 增加细胞凋亡率。Kumarasamy 等^[102]在胰腺癌中发现帕博西尼与 MEK 抑制剂的联合治疗可使 p27 上调, 增强体内肿瘤对帕博西尼的反应, 提高帕博西尼对胰腺癌的治疗效果。阿贝西利是唯一一种在难治性转移性 ER+乳腺癌中具有单一活性的 CDK4/6 抑制剂, 能够有效穿过血脑屏障, 并具有降低骨髓抑制的独特毒性特征^[103]。与其他 CDK4/6 抑制剂相比, 阿贝西利可能独立于 cyclinD-CDK4/6-RB 通路发挥作用, 可为阿贝西利可能扩大的临床适应症和预测性生物标志物研究产生重要影响^[103]。此外, 除上述的 CDK4/6 抑制剂外, Therapeutics 公司研发的一种小分子、短效的 CDK4/6 抑制剂曲拉西利, 其具有骨髓保护作用, 与癌症化疗联合使用时具有潜在的抗肿瘤功效与安全性^[104]。曲拉西利能诱导骨髓中增殖的造血干细胞和祖细胞出现短暂的、可逆的 G1 期停滞, 从而保护它们在化疗期间免受损害^[104]。

综上所述, 虽然当前 CDK4/6 抑制剂类药物已被证明可有效改善临床治疗效果, 但内在或获得性耐药性的发展会限制这些治疗的功效。并且联合治疗比单独使用一类药物的表现

更好,对机体的毒性更小,抗性更低。因此,在临床和转化研究中应重点关注 CDK4/6 抑制剂的敏感性/抗性机制和 CDK4/6 抑制剂的相关联合治疗策略,从而为癌症和疾病相关临床治疗药物、新的反应生物标志物的研发奠定基础^[105]。

7.2 CDK7 相关抑制剂

7.2.1 CDK7 特异性共价抑制剂 THZ1

细胞周期和转录控制的失调是肿瘤细胞的一般特征,这突出了使用 CDK7 抑制剂作为新型癌症治疗剂的潜力。当前已有多种 CDK7 特异性共价抑制剂被用于临床研究。其中,CDK7 特异性共价抑制剂 THZ1,是当前研究最多的 CDK7 特异性抑制剂。其通过抑制 CDK7 的表达,影响相关致病基因的转录活性以及癌细胞的周期进程,以达到治疗癌症及疾病的目的^[106]。三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)是一种乳腺癌的特殊亚型, TNBC 患者在治疗后通常表现出较差的预后和高复发率。Li 等^[107]在 TNBC 中发现高特异性的 CDK7 抑制剂 BS-181 和 THZ1,均可下调 CDK7 介导的 Pol II 磷酸化,其中 THZ1 的效力比 BS-181 高 500 倍。机制研究表明, TNBC 细胞存活很大程度依赖于细胞中的 B 细胞淋巴瘤 2 (B-cell lymphoma-2, BCL-2)/BCL-XL 信号^[107]。因此,研究人员将 BCL-2/BCL-XL 抑制剂 ABT-263/ABT199 与 THZ1 联合治疗,发现 TNBC 细胞出现生长抑制和凋亡^[107]。表明 CDK7 可作为 TNBC 预后的候选生物标志物,并且 CDK7 和 BCL-2/BCL-XL 抑制剂的联合治疗可为改善 TNBC 治疗提供有价值的参考。胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC)是一种具有高死亡率的致死性恶性肿瘤。Lu 等^[108]在多个 PDAC 临床模型中发现 THZ1 抑制 CDK7 可导致有丝分裂和核因子- κ B (nuclear factor-kappaB, NF- κ B)信号传导相关转

录物的转录被抑制,从而调控癌细胞周期进程以达到治疗的目的。表明 PDAC 中抑制依赖 CDK7 的转录激活,可为针对高侵袭性 PDAC 的治疗提供积极的策略。此外,THZ1 还可用于这些癌症治疗:结直肠癌^[109]、上皮性卵巢癌^[110]、胆囊癌^[111]等。

7.2.2 其他 CDK7 特异性共价抑制剂

除 THZ1 外,这些 CDK7 抑制剂也在疾病及癌症治疗和临床研究中得到应用,例如 BS-181、ICEC0942、SY-1365、YKL-5-124、SY-5609 和 AT7519 等^[112-113]。类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种慢性炎症性疾病,可导致严重残疾。Hong 等^[114]在胶原蛋白诱导的关节炎(collagen-induced arthritis, CIA)小鼠模型中,发现 BS-181 可通过抑制 CDK7 抑制 RA 的炎症反应,表明 CDK7 具有显著的抗炎作用。Patel 等^[115]发现一种用于治疗癌症的口服生物 CDK7 抑制剂 ICEC0942,其在 BC 和 CRC 的异种移植物中,具有显著的抗肿瘤作用。并且与他莫昔芬(tamoxifen)的联合治疗可使雌激素受体阳性肿瘤异种移植物生长被完全停滞^[115]。表明 ICEC0942 可作为单一药物或其他药物联合使用治疗癌症。Hu 等^[116]在对卵巢癌(ovarian cancer)和乳腺癌患者群体进行的临床试验中发现,SY-1365 治疗降低了抗凋亡 BCL2 家族成员 MCL1 和 BCL-XL 的蛋白质水平,并且 BCL-XL 表达低的癌细胞对 SY-1365 更敏感。此外,SY-1365 作为单一药剂在多种急性髓性白血病(acute myeloid leukemia, AML)和卵巢癌异种移植模型中也表现出显著的抗肿瘤作用,并且与 BCL2 抑制剂维奈托克(venetoclax)联合使用时,SY-1365 诱导的生长抑制作用被增强^[116]。表明在血液肿瘤和实体肿瘤的临床治疗中 SY-1365 拥有巨大潜力。Olson 等^[117]发现一种治疗以 E2F 失调为标志

的癌症的 CDK7 抑制剂 YKL-5-124, 其与 THZ1 不同, 不会导致 Pol II C 末端结构域磷酸化发生变化, 主要通过抑制 E2F 驱动的基因表达, 从而导致 G1-S 期转换停滞, 进而达到治疗的目的。Zhang 等^[118]在小细胞肺癌 (small-cell lung cancer, SCLC) 中发现 YKL-5-124 通过抑制 CDK7 表达, 增强基因组不稳定性, 破坏细胞周期进程, 触发 SCLC 的抗肿瘤免疫力。表明 CDK7 抑制剂与抗肿瘤免疫存在内在联系, 这可为由 CDK7 抑制剂和免疫疗法组成的联合治疗方案提供理论依据。

7.3 其他 CDK 抑制剂

除了相对成熟的 CDK4/6 和 CDK7 抑制剂外, 还有许多 CDK 抑制剂也被应用于癌症及非癌症疾病治疗上, 但大多数仍处于临床前与早期临床阶段。例如, CDK2/7/9 抑制剂 seliciclib (CYC202)、CDK9 抑制剂 NVP-2、CDK2/9 抑制剂 fadraciclib (CYC065) 等^[119-120]。Seliciclib 是一种 CDK 抑制剂, 可竞争 CDK2/7/9 上的 ATP 结合位点, 抑制 CDK2/7/9 活性^[121]。在临床试验上 seliciclib 被发现可通过抑制 CDK2/7/9 活性, 诱导肿瘤细胞凋亡, 减少模型小鼠肿瘤生长^[121]。昼夜节律系统和细胞周期在癌症中经常失调。Iurisci 等^[122]在格拉斯哥骨肉瘤 (Glasgow osteosarcoma) 中发现塞利西利 (seliciclib) 可通过抑制 CDK1/2/7/9 调控生物钟改善肿瘤的恶性状况。P276-00 是一种 CDK4 抑制剂, 可抑制 CDK4 表达^[123]。Rathos 等^[123]在胰腺癌细胞中发现 P276-00 与吉西他滨 (gemcitabine) 联合治疗可抑制 CDK4 和 Bcl-2 表达, 增强细胞凋亡, 从而抑制肿瘤恶性增长。AT7519 是 CDK2 靶向抑制剂^[124]。Dolman 等^[124]在神经母细胞瘤中发现 AT7519 可通过抑制 CDK2 表达, 改善小鼠的生存率与肿瘤的恶性增长状况, 表明 AT7519 是一种极具前景的靶

向药物, 可用于治疗高危神经母细胞瘤患者。在过去 50 年中, AML 的治疗效果一直在稳步改善^[125]。CDK2 和 CDK9 失活被证明可克服 AML 细胞分化停滞, 表明靶向 CDK2 和 CDK9 可能是一种极具前途的 AML 治疗方法^[125]。维奈托克 (Venetoclax) 是 FDA 批准的 Bcl-2 选择性抑制剂, Luedtke 等^[126]在慢性淋巴细胞白血病和 AML 中发现 CDK9 抑制剂 voruciclib 与维奈托克联合靶向 CDK9 可产生针对 AML 细胞和原发性患者样本的协同抗白血病活性。Fadraciclib (CYC065) 是一种 CDK2/9 抑制剂, 在 AML 中具有临床前疗效。Chantkran 等^[119]在 AML 中发现当 fadraciclib 与维奈托克或常规化疗药物阿糖胞苷或阿扎胞苷联合使用时显示出协同活性, fadraciclib 和阿扎胞苷的联合使用具有最有利的治疗效果。Mandal 等^[127]发现 CDK9 抑制剂 BAY1251152 针对不同实体瘤的 I 期临床试验显示出良好的抗肿瘤、靶向活性和可控的安全性。同时, 为了提高有效性和靶点多样性并降低潜在的耐药性, 将 CDK9 抑制剂与针对 MYC、MCL-1 和 HSP90 的抑制剂相结合, 联合治疗将是研究者后续可关注的方向^[127]。Richters 等^[128]在前列腺癌 (Castration-resistant prostate cancer, CRPC) 中发现口服 KB-0742 可通过抑制 CDK9 降低 CRPC 恶性生长, 表明 KB-0742 可作为靶向 CRPC 具有前景的治疗药物。细胞因子干扰素 γ (cytokine interferon gamma, IFNG) 介导的适应性免疫抗性仍是癌症免疫治疗的主要问题^[129]。Huang 等^[129]在胰腺癌中发现 CDK 抑制剂迪那昔布 (dinaciclib) 可通过抑制 CDK1/2/5 克服 IFNG 介导的胰腺癌适应性免疫抗性, 表明 CDK1/2/5 活性对于 IFNG 介导的癌症免疫逃逸至关重要, 可为克服 IFNG 引发的胰腺肿瘤免疫获得性耐药提供一种新策略。

8 问题与展望

细胞周期进程是一种复杂的机制调控过程, 涉及各类细胞周期有关的蛋白激酶和蛋白磷酸酶催化的磷酸化和去磷酸化过程。在这一过程中有许多细胞周期调控因子发挥着重要作用, 包括周期蛋白、CDK、CKIs、WEE 激酶家族、CDC 家族和 APC/C 等, 且这些调控因子在时间与空间上受到转录、翻译后修饰以及蛋白质降解等多种方式调节。其中, 细胞周期进程运行机制的核心是由 CDK 和其对应的周期蛋白“轮动式”表达介导, 并且涉及的上下游调节网络复杂且精细, 只要任一环节出现问题, 就会导致细胞分裂出现异常。而细胞分裂异常是所有恶性肿瘤细胞的特征, 所以几乎所有关于癌症的研究都会涉及细胞周期^[6]。因此, 近十几年以来关于抗癌药物的研发多围绕 CDK 的药理学靶点进行, 例如 CDK4/6 抑制剂 (palbociclib、ribociclib、abemaciclib 等)、CDK7 抑制剂 (THZ1、SY-1365 等) 等。并且 CDK 抑制剂类治疗药物在临床研究中可通过作为单一药物或与其他治疗药物及方法联合使用治疗癌症及疾病。而癌症的高耐药性、药物的靶向特异性以及潜在的副作用风险, 一直以来是癌症治疗中 CDK 靶向与非靶向药物研发的重要挑战。因此, 在设计治疗方案及药物研发时应充分考虑药物的耐药性、靶向特异性、潜在的副作用风险以及 CDK 在细胞周期进程调控的特殊性, 从而开发减少或克服耐药性、低副作用的新型 CDK 靶向及非靶向药物。

细胞周期是由蛋白质的时间与空间上的精确调节驱动, 且当前对细胞周期研究通常以细胞群体为目标, 极少对单个分裂细胞进行探究, 而对单个分裂细胞进行深入的探索则可能会获得许多意想不到的结果。随着诸如转录组、翻

译组、蛋白质组以及单细胞分析技术等组学和测序手段的发展, 使得细胞周期领域研究取得了长足的进展。其中, 单细胞分析技术的出现给细胞周期研究带来了新的策略, 利用单细胞 RNA 测序 (scRNA-seq) 可发现更多细胞周期依赖性基因, 但这一测序手段主要在基因组和转录组水平对 mRNA 的丰度进行探究, 无法对蛋白质的翻译后修饰、蛋白质动力学等相关表型特征进行直接且深入的表征。单细胞蛋白质组学 (single-cell proteomics) 的出现, 则使从蛋白质水平进行直接表征变为可能, 使单个细胞的蛋白质表达水平从基于 mRNA 丰度的推导转变为真实意义的测量^[130]。而将单细胞蛋白质组与转录组的联合分析, 则可系统性地 mRNA 和蛋白质水平鉴定细胞周期相关蛋白质, 从而为细胞周期时空蛋白质图谱的建立, 提供更为精确的蛋白质及基因时空表达谱信息。此外, 也可利用单细胞蛋白质基因组构建重要经济动物 (例如羊、牛和猪等) 的细胞周期蛋白质图谱, 完善物种信息库, 为动物经济性状的提升和种质资源的筛选提供积极的策略。同时, 单细胞蛋白质组学也可应用于构建不同类型癌细胞的细胞周期蛋白质图谱, 并根据不同类型癌细胞的特异性周期调控机制, 筛选相关致癌与抑癌特异性细胞周期基因或蛋白质, 从而为癌症治疗相关靶向药物的研发添砖加瓦。

REFERENCES

- [1] MALUMBRES M. Cyclin-dependent kinases[J]. *Genome Biology*, 2014, 15(6):122.
- [2] ÖRD M, MÖLL K, AGEROVA A, KIVI R, FAUSTOVA I, VENTA R, VALK E, LOOG M. Multisite phosphorylation code of CDK[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2019, 26(7): 649-658.
- [3] WOOD DJ, ENDICOTT JA. Structural insights into the functional diversity of the CDK-cyclin family[J]. *Open Biology*, 2018, 8(9): 180112.

- [4] RUSSO AA, JEFFREY PD, PAVLETICH NP. Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 1996, 3(8): 696-700.
- [5] XIE ZL, HOU SZ, YANG XX, DUAN YJ, HAN JH, WANG Q, LIAO CZ. Lessons learned from past cyclin-dependent kinase drug discovery efforts[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2022, 65(9): 6356-6389.
- [6] LIU J. Cell cycle on the crossroad of tumorigenesis and cancer therapy[J]. *Trends in Cell Biology*, 2022, 32(1): 30-44.
- [7] BURY M. New insights into CDK regulators: novel opportunities for cancer therapy[J]. *Trends in Cell Biology*, 2021, 31(5): 331-344.
- [8] MARTIN MP, ENDICOTT JA, NOBLE MEM. Structure-based discovery of cyclin-dependent protein kinase inhibitors[J]. *Essays in Biochemistry*, 2017, 61(5): 439-452.
- [9] SHI ZF, TIAN L, QIANG TT, LI JY, XING Y, REN XD, LIU C, LIANG CY. From structure modification to drug launch: a systematic review of the ongoing development of cyclin-dependent kinase inhibitors for multiple cancer therapy[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2022, 65(9): 6390-6418.
- [10] FASSL A, GENG Y, SICINSKI P. CDK4 and CDK6 kinases: from basic science to cancer therapy[J]. *Science*, 2022, 375(6577): eabc1495.
- [11] WEDAM S, FASHOYIN-AJE L, BLOOMQUIST E, TANG SH, SRIDHARA R, GOLDBERG KB, THEORET MR, AMIRI-KORDESTANI L, PAZDUR R, BEAVER JA. FDA approval summary: palbociclib for male patients with metastatic breast cancer[J]. *Clinical Cancer Research*, 2020, 26(6): 1208-1212.
- [12] KWAPISZ D. Cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors in breast cancer: palbociclib, ribociclib, and abemaciclib[J]. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2017, 166(1): 41-54.
- [13] ABDELDAYEM A, RAOUF YS, CONSTANTINESCU SN, MORIGGL R, GUNNING PT. Advances in covalent kinase inhibitors[J]. *Chemical Society Reviews*, 2020, 49(9): 2617-2687.
- [14] TADESSE S, ANSHABO AT, PORTMAN N, LIM E, TILLEY W, CALDON CE, WANG S. Targeting CDK2 in cancer: challenges and opportunities for therapy[J]. *Drug Discovery Today*, 2020, 25(2): 406-413.
- [15] NING SB, WANG HW, ZENG C, ZHAO YJ. Prediction of allosteric druggable pockets of cyclin-dependent kinases[J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2022, 23(4): bbac290.
- [16] THIEL JT, DAIGELER A, KOLBENSCHLAG J, RACHUNEK K, HOFFMANN S. The role of CDK pathway dysregulation and its therapeutic potential in soft tissue sarcoma[J]. *Cancers*, 2022, 14(14): 3380.
- [17] CHOU J, QUIGLEY DA, ROBINSON TM, FENG FY, ASHWORTH A. Transcription-associated cyclin-dependent kinases as targets and biomarkers for cancer therapy[J]. *Cancer Discovery*, 2020, 10(3): 351-370.
- [18] EVANS T, ROSENTHAL ET, YOUNGBLOM J, DISTEL D, HUNT T. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division[J]. *Cell*, 1983, 33(2): 389-396.
- [19] ENGELAND K. Cell cycle regulation: P53-p21-RB signaling[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2022, 29(5): 946-960.
- [20] SUSANTI NMP, TIAHJONO DH. Cyclin-dependent kinase 4 and 6 inhibitors in cell cycle dysregulation for breast cancer treatment[J]. *Molecules*, 2021, 26(15): 4462.
- [21] SWAFFER MP, JONES AW, FLYNN HR, SNIJDERS AP, NURSE P. CDK substrate phosphorylation and ordering the cell cycle[J]. *Cell*, 2016, 167(7): 1750-1761.e16.
- [22] KIMATA Y. APC/C ubiquitin ligase: coupling cellular differentiation to G1/G0 phase in multicellular systems[J]. *Trends in Cell Biology*, 2019, 29(7): 591-603.
- [23] WEI WY, AYAD NG, WAN Y, ZHANG GJ, KIRSCHNER MW, KAELIN WG Jr. Degradation of the SCF component Skp2 in cell-cycle phase G1 by the anaphase-promoting complex[J]. *Nature*, 2004, 428(6979): 194-198.
- [24] LIU LJ, MICHOWSKI W, KOLODZIEJCZYK A, SICINSKI P. The cell cycle in stem cell proliferation, pluripotency and differentiation[J]. *Nature Cell Biology*, 2019, 21(9): 1060-1067.
- [25] STEAD E, WHITE J, FAAST R, CONN S, GOLDSTONE S, RATHJEN J, DHINGRA U, RATHJEN P, WALKER D, DALTON S. Pluripotent cell division cycles are driven by ectopic Cdk2, cyclin A/E and E2F activities[J]. *Oncogene*, 2002, 21(54): 8320-8333.
- [26] ZHU JY, CUELLAR RA, BERNDT N, LEE HE, OLESEN SH, MARTIN MP, JENSEN JT, GEORG GI, SCHÖNBRUNN E. Structural basis of wee kinases functionality and inactivation by diverse small

- molecule inhibitors[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2017, 60(18): 7863-7875.
- [27] GHELLI LUSERNA DI RORÀ A, CERCHIONE C, MARTINELLI G, SIMONETTI G. A WEE1 family business: regulation of mitosis, cancer progression, and therapeutic target[J]. *Journal of Hematology & Oncology*, 2020, 13(1): 1-17.
- [28] SCHMIDT M, ROHE A, PLATZER C, NAJJAR A, ERDMANN F, SIPPL W. Regulation of G2/M transition by inhibition of WEE1 and PKMYT1 kinases[J]. *Molecules*, 2017, 22(12): 2045.
- [29] RUDOLPH J. Inhibiting transient protein-protein interactions: lessons from the Cdc25 protein tyrosine phosphatases[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2007, 7(3): 202-211.
- [30] LUCENA R, ALCAIDE-GAVILÁN M, ANASTASIA SD, KELLOGG DR. Wee1 and Cdc25 are controlled by conserved PP2A-dependent mechanisms in fission yeast[J]. *Cell Cycle*, 2017, 16(5): 428-435.
- [31] ENDERS GH. Gauchos and ochos: a Wee1-Cdk tango regulating mitotic entry[J]. *Cell Division*, 2010, 5(1): 1-7.
- [32] DOZIER C, MAZZOLINI L, CÉNAC C, FROMENT C, BURLET-SCHILTZ O, BESSON A, MANENTI S. CyclinD-CDK4/6 complexes phosphorylate CDC25A and regulate its stability[J]. *Oncogene*, 2017, 36(26): 3781-3788.
- [33] CLARKE PR. Cyclin-dependent kinases: CAK-handed kinase activation[J]. *Current Biology*, 1995, 5(1): 40-42.
- [34] GREBER BJ, PEREZ-BERTOLDI JM, LIM K, IAVARONE AT, TOSO DB, NOGALES E. The cryoelectron microscopy structure of the human CDK-activating kinase[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(37): 22849-22857.
- [35] LI Q, JIANG BS, GUO JY, SHAO H, DEL PRIORE IS, CHANG Q, KUDO R, LI ZQ, RAZAVI P, LIU B, BOGHOSSIAN AS, REES MG, RONAN MM, ROTH JA, DONOVAN KA, PALAFOX M, REIS-FILHO JS, de STANCHINA E, FISCHER ES, ROSEN N, et al. INK₄ tumor suppressor proteins mediate resistance to CDK4/6 kinase inhibitors[J]. *Cancer Discovery*, 2022, 12(2): 356-371.
- [36] STAROSTINA NG. Multiple degradation pathways regulate versatile CIP/KIP CDK inhibitors[J]. *Trends in Cell Biology*, 2012, 22(1): 33-41.
- [37] CHEN Q, XIE WL, KUHN DJ, VOORHEES PM, LOPEZ-GIRONA A, MENDY D, CORRAL LG, KRENITSKY VP, XU WM, MOUTOUH-DE PARSEVAL L, WEBB DR, MERCURIO F, NAKAYAMA KI, NAKAYAMA K, ORLOWSKI RZ. Targeting the p27 E3 ligase SCFSkp2 results in p27- and Skp2-mediated cell-cycle arrest and activation of autophagy[J]. *Blood*, 2008, 111(9): 4690-4699.
- [38] FENG XH, LIANG YY, LIANG M, ZHAI WG, LIN X. Direct interaction of c-myc with Smad2 and Smad3 to inhibit TGF- β -mediated induction of the CDK inhibitor p15 Ink4B[J]. *Molecular Cell*, 2016, 63(6): 1089.
- [39] GOMIS RR, ALARCÓN C, HE W, WANG QQ, SEOANE J, LASH A, MASSAGUÉ J. A FoxO-Smad synexpression group in human keratinocytes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(34): 12747-12752.
- [40] CHEN CR, KANG YB, SIEGEL PM, MASSAGUÉ J. E2F4/5 and p107 as smad cofactors linking the TGF β receptor to c-myc repression[J]. *Cell*, 2002, 110(1): 19-32.
- [41] SCHADE AE, FISCHER M, DECAPRIO JA. RB, p130 and p107 differentially repress G1/S and G2/M genes after p53 activation[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(21): 11197-11208.
- [42] ZHANG WQ, BERGAMASCHI D, JIN BQ, LU X. Posttranslational modifications of p27kip1 determine its binding specificity to different cyclins and cyclin-dependent kinases *in vivo*[J]. *Blood*, 2005, 105(9): 3691-3698.
- [43] MIN MW, RONG Y, TIAN CZ, SPENCER SL. Temporal integration of mitogen history in mother cells controls proliferation of daughter cells[J]. *Science*, 2020, 368(6496): 1261-1265.
- [44] RUBIN SM, SAGE J, SKOTHEIM JM. Integrating old and new paradigms of G1/S control[J]. *Molecular Cell*, 2020, 80(2): 183-192.
- [45] KENT LN, LEONE G. The broken cycle: E2F dysfunction in cancer[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2019, 19(6): 326-338.
- [46] TOPACIO BR, ZATULOVSKIY E, CRISTEA S, XIE S, TAMBO CS, RUBIN SM, SAGE J, KOIVOMAGI M, SKOTHEIM JM. Cyclin D-Cdk4, 6 drives cell-cycle progression via the retinoblastoma protein's C-terminal helix[J]. *Molecular Cell*, 2019, 74(4): 758-770.e4.
- [47] NAGAHARA H, EZHEVSKY SA, VOCERO-AKBANI AM, KALDIS P, SOLOMON MJ, DOWDY SF. Transforming growth factor β targeted inactivation

- of cyclin E: cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2) complexes by inhibition of Cdk2 activating kinase activity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(26): 14961-14966.
- [48] MAIANI E, MILLETTI G, NAZIO F, HOLDGAARD SG, BARTKOVA J, RIZZA S, CIANFANELLI V, LORENTE M, SIMONESCHI D, DI MARCO M, D'ACUNZO P, DI LEO L, RASMUSSEN R, MONTAGNA C, RACITI M, DE STEFANIS C, GABICAGOGEASCOA E, RONA G, SALVADOR N, PUPO E, et al. AMBRA1 regulates cyclin D to guard S-phase entry and genomic integrity[J]. *Nature*, 2021, 592(7856): 799-803.
- [49] CHAIKOVSKY AC, LI C, JENG EE, LOEBELL S, LEE MC, MURRAY CW, CHENG R, DEMETER J, SWANEY DL, CHEN SH, NEWTON BW, JOHNSON JR, DRAINAS AP, SHUE YAN TING, SEOANE JA, SRINIVASAN P, HE A, YOSHIDA A, HIPKINS SQ, MCCREA E, et al. The AMBRA1 E3 ligase adaptor regulates the stability of cyclin D[J]. *Nature*, 2021, 592(7856): 794-798.
- [50] SIMONESCHI D, RONA G, ZHOU N, JEONG YT, JIANG SW, MILLETTI G, ARBINI AA, O'SULLIVAN A, WANG AA, NITHIKASEM S, KEEGAN S, SIU Y, CIANFANELLI V, MAIANI E, NAZIO F, CECCONI F, BOCCALATTE F, FENYÖ D, JONES DR, BUSINO L, et al. CRL4AMBRA1 is a master regulator of D-type cyclins[J]. *Nature*, 2021, 592(7856): 789-793.
- [51] CHU C. Cyclin E in normal physiology and disease states[J]. *Trends in Cell Biology*, 2021, 31(9): 732-746.
- [52] CHUNG M. Transient hysteresis in CDK4/6 activity underlies passage of the restriction point in G1[J]. *Molecular Cell*, 2019, 76(4): 562-573.e4.
- [53] NAKAYAMA K. Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27Kip1, polyploidy and centrosome overduplication[J]. *The EMBO Journal*, 2000, 19(9): 2069-2081.
- [54] WON KA, REED SI. Activation of cyclin E/CDK2 is coupled to site-specific autophosphorylation and ubiquitin-dependent degradation of cyclin E[J]. *The EMBO Journal*, 1996, 15(16): 4182-4193.
- [55] ZAJAC-KAYE M. Myc oncogene: a key component in cell cycle regulation and its implication for lung cancer[J]. *Lung Cancer*, 2001, 34: S43-S46.
- [56] LIVIO M, VALERIE W. Intrinsic S phase checkpoint enforced by an antiproliferative oncosuppressor cytokine[J]. *Cancer Gene Therapy*, 2021, 29(7): 897-900.
- [57] PETERSEN BO. Phosphorylation of mammalian CDC6 by cyclin A/CDK2 regulates its subcellular localization[J]. *The EMBO Journal*, 1999, 18(2): 396-410.
- [58] SPECK C, STILLMAN B. Cdc6 ATPase activity regulates ORC·Cdc6 stability and the selection of specific DNA sequences as origins of DNA replication[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(16): 11705-11714.
- [59] HOSSAIN M. Multiple, short protein binding motifs in ORC1 and CDC6 control the initiation of DNA replication[J]. *Molecular Cell*, 2021, 81(9): 1951-1969.e6.
- [60] LIU ZK, LI J, CHEN J, SHAN QN, DAI HJ, XIE HY, ZHOU L, XU X, ZHENG SS. MCM family in HCC: MCM6 indicates adverse tumor features and poor outcomes and promotes S/G2 cell cycle progression[J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 1-10.
- [61] SUGIMOTO N. Cdt1 phosphorylation by cyclin A-dependent kinases negatively regulates its function without affecting geminin binding[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(19): 19691-19697.
- [62] GOTO H, NATSUME T, KANEMAKI MT, KAITO A, WANG SJ, GABAZZA EC, INAGAKI M, MIZOGUCHI A. Chk1-mediated Cdc25A degradation as a critical mechanism for normal cell-cycle progression[J]. *Journal of Cell Science*, 2019, 132(2): jcs223123.
- [63] KATICH SC, ZERFASS-THOME K, HOFFMANN I. Regulation of the *Cdc25A* gene by the human papillomavirus type 16 E7 oncogene[J]. *Oncogene*, 2001, 20(5): 543-550.
- [64] HALABAN R. Melanoma cell autonomous growth: the Rb/E2F pathway[J]. *Cancer Metastasis Reviews*, 1999, 18(3): 333-343.
- [65] XU M, SHEPPARD KA, PENG CY, YEE AS, PIWNICA-WORMS H. Cyclin A/CDK2 binds directly to E2F-1 and inhibits the DNA-binding activity of E2F-1/DP-1 by phosphorylation[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1994, 14(12): 8420-8431.
- [66] SILVA CASCALES H, BURDOVA K, MIDDLETON A, KUZIN V, MÜLLERS E, STOY H, BARANELLO L, MACUREK L, LINDQVIST A. Cyclin A2 localises in the cytoplasm at the S/G2 transition to activate PLK1[J]. *Life Science Alliance*, 2021, 4(3): e202000980.
- [67] HUANG RX, ZHOU PK. DNA damage response

- signaling pathways and targets for radiotherapy sensitization in cancer[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2020, 5: 60.
- [68] SHU Z, LI Z, HUANG HH, CHEN Y, FAN J, YU L, WU ZH, TIAN L, QI Q, PENG S, WEI CY, XIE ZQ, LI XB, FENG Q, SHENG H, LI GQ, WEI DP, SHAN CL, CHEN G. Cell-cycle-dependent phosphorylation of RRM1 ensures efficient DNA replication and regulates cancer vulnerability to ATR inhibition[J]. *Oncogene*, 2020, 39(35): 5721-5733.
- [69] GANUZA M, SÁIZ-LADERA C, CAÑAMERO M, GÓMEZ G, SCHNEIDER R, BLASCO MA, PISANO D, PARAMIO JM, SANTAMARÍA D, BARBACID M. Genetic inactivation of Cdk7 leads to cell cycle arrest and induces premature aging due to adult stem cell exhaustion[J]. *The EMBO Journal*, 2012, 31(11): 2498-2510.
- [70] PEISSERT S, SCHLOSSER A, KENDEL R, KUPER J, KISKER C. Structural basis for CDK7 activation by MAT1 and cyclin H[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(43): 26739-26748.
- [71] BISTEAU X, PATERNOT S, COLLEONI B, ECKER K, COULONVAL K, de GROOTE P, DECLERCQ W, HENGST L, ROGER PP. CDK4 T172 phosphorylation is central in a CDK7-dependent bidirectional CDK4/CDK2 interplay mediated by p21 phosphorylation at the restriction point[J]. *PLoS Genetics*, 2013, 9(5): e1003546.
- [72] LAROCHELLE S. Requirements for Cdk7 in the assembly of Cdk1/cyclin B and activation of Cdk2 revealed by chemical genetics in human cells[J]. *Molecular Cell*, 2007, 25(6): 839-850.
- [73] SCHACHTER MM, MERRICK KA, LAROCHELLE S, HIRSCHI A, ZHANG C, SHOKAT KM, RUBIN SM, FISHER RP. A Cdk7-Cdk4 T-loop phosphorylation cascade promotes G1 progression[J]. *Molecular Cell*, 2013, 50(2): 250-260.
- [74] PATEL H, ABDULJABBAR R, LAI CF, PERIYASAMY M, HARROD A, GEMMA C, STEEL JH, PATEL N, BUSONERO C, JERJEES D, REMENYI J, SMITH S, GOMM JJ, MAGNANI L, GYÓRFFY B, JONES LJ, FULLER-PACE F, SHOUSA SM, BULUWELA L, RAKHA EA, et al. Expression of CDK7, cyclin H, and MAT1 is elevated in breast cancer and is prognostic in estrogen receptor-positive breast cancer[J]. *Clinical Cancer Research*, 2016, 22(23): 5929-5938.
- [75] AKOULITCHEV S, REINBERG D. The molecular mechanism of mitotic inhibition of TFIID is mediated by phosphorylation of CDK7[J]. *Genes & Development*, 1998, 12(22): 3541-3550.
- [76] KRAUSE K, WASNER M, REINHARD W, HAUGWITZ U, LANGE-ZU DOHNA C, MÖSSNER J, ENGELAND K. The tumour suppressor protein p53 can repress transcription of cyclin B[J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(22): 4410-4418.
- [77] PORTER LISA A, DONOGHUE DANIEL J. Cyclin B1 and CDK1: nuclear localization and upstream regulators[J]. *Progress in Cell Cycle Research*, 2003, 5: 335-47.
- [78] GAVET O, PINES J. Activation of cyclin B1-Cdk1 synchronizes events in the nucleus and the cytoplasm at mitosis[J]. *Journal of Cell Biology*, 2010, 189(2): 247-259.
- [79] PAPINI D. The Aurora B gradient sustains kinetochore stability in anaphase[J]. *Cell Reports*, 2021, 37(6): 109818.
- [80] HUANG JY. The disappearance of cyclin B at the end of mitosis is regulated spatially in *Drosophila* cells[J]. *The EMBO Journal*, 1999, 18(8): 2184-2195.
- [81] HARA M, ABE Y, TANAKA T, YAMAMOTO T, OKUMURA E, KISHIMOTO T. Greatwall kinase and cyclin B-Cdk1 are both critical constituents of M-phase-promoting factor[J]. *Nature Communications*, 2012, 3: 1059.
- [82] GARCÍA-BLANCO N, VÁZQUEZ-BOLADO A, MORENO S. Greatwall-endosulfine: a molecular switch that regulates PP2A/B55 protein phosphatase activity in dividing and quiescent cells[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(24): 6228.
- [83] HÉGARAT N, CRNCEC A, SUAREZ PEREDO RODRIGUEZ MF, ECHEGARAY ITURRA F, GU Y, BUSBY O, LANG PF, BARR AR, BAKAL C, KANEMAKI MT, LAMOND AI, NOVAK B, LY T, HOCHEGGER H. Cyclin A triggers mitosis either via the greatwall kinase pathway or cyclin B[J]. *The EMBO Journal*, 2020, 39(11): e104419.
- [84] JIN SQ, TONG T, FAN WH, FAN FY, ANTINORE MJ, ZHU XC, MAZZACURATI L, LI XX, PETRIK KL, RAJASEKARAN B, WU M, ZHAN QM. GADD45-induced cell cycle G2-M arrest associates with altered subcellular distribution of cyclin B1 and is independent of p38 kinase activity[J]. *Oncogene*, 2002, 21(57): 8696-8704.
- [85] VAIRAPANDI M, BALLIET AG, HOFFMAN B,

- LIEBERMANN DA. GADD45b and GADD45g are cdc2/cyclinB1 kinase inhibitors with a role in S and G2/M cell cycle checkpoints induced by genotoxic stress[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2002, 192(3): 327-338.
- [86] IWASA H, HOSSAIN S, HATA Y. Tumor suppressor C-RASSF proteins[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2018, 75(10): 1773-1787.
- [87] LAKSHMI CH NP. Molecular basis for RASSF10/NPM/RNF₂ feedback cascade-mediated regulation of gastric cancer cell proliferation[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2021, 297(2): 100935.
- [88] CUDE K, WANG YP, CHOI HJ, HSUAN SL, ZHANG HL, WANG CY, XIA ZG. Regulation of the G2-M cell cycle progression by the ERK5-NFκB signaling pathway[J]. *Journal of Cell Biology*, 2007, 177(2): 253-264.
- [89] KOHAMA Y. Regulation of the stability and activity of CDC25A and CDC25B by protein phosphatase PP2A and 14-3-3 binding[J]. *Cellular Signalling*, 2019, 54: 10-16.
- [90] FERENCOVA I, VASKOVICOVA M, DRUTOVIC D, KNOBLOCHOVA L, MACUREK L, SCHULTZ RM, SOLC P. CDC25B is required for the metaphase I-metaphase II transition in mouse oocytes[J]. *Journal of Cell Science*, 2022, 135(6): jcs252924.
- [91] SANCAR A, LINDSEY-BOLTZ LA, ÜNSAL-KAÇMAZ K, LINN S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2004, 73: 39-85.
- [92] LARA-GONZALEZ P. The G2-to-M transition is ensured by a dual mechanism that protects cyclin B from degradation by Cdc20-activated APC/C[J]. *Developmental Cell*, 2019, 51(3): 313-325.e10.
- [93] KAISARI S, MINIOWITZ-SHEMTOV S, SITRY-SHEVAH D, SHOMER P, KOZLOV G, GEHRING K, HERSHKO A. Role of ubiquitin-protein ligase UBR5 in the disassembly of mitotic checkpoint complexes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(9): e2121478119.
- [94] LARA-GONZALEZ P, KIM T, OEGEMA K, CORBETT K, DESAI A. A tripartite mechanism catalyzes Mad2-Cdc20 assembly at unattached kinetochores[J]. *Science*, 2021, 371(6524): 64-67.
- [95] SHEVAH-SITRY D, MINIOWITZ-SHEMTOV S, TEICHNER A, KAISARI S, HERSHKO A. Role of phosphorylation of Cdc20 in the regulation of the action of APC/C in mitosis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(35): e2210367119.
- [96] YU J, RAIA P, GHENT CM, RAISCH T, SADIAN Y, CAVADINI S, SABALE PM, BARFORD D, RAUNSER S, MORGAN DO, BOLAND A. Structural basis of human separase regulation by securin and CDK1-cyclin B1[J]. *Nature*, 2021, 596(7870): 138-142.
- [97] WANG RT. Clinical considerations of CDK4/6 inhibitors in triple-negative breast cancer[J]. *Biochimica et Biophysica Acta: BBA-Reviews on Cancer*, 2021, 1876(2): 188590.
- [98] ABUHAMMAD S, CULLINANE C, MARTIN C, BACOLAS Z, WARD T, CHEN H, SLATER A, ARDLEY K, KIRBY L, CHAN KT, BRAJANOVSKI N, SMITH LK, RAO AD, LELLIOTT EJ, KLEINSCHMIDT M, VERGARA IA, PAPENFUSS AT, LAU P, GHOSH P, HAUPT S, et al. Regulation of PRMT5-MDM4 axis is critical in the response to CDK4/6 inhibitors in melanoma[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(36): 17990-18000.
- [99] PENG Y, FENG HR, WANG CG, SONG ZJ, ZHANG YQ, LIU K, CHENG X, ZHAO R. The role of E26 transformation-specific variant transcription factor 5 in colorectal cancer cell proliferation and cell cycle progression[J]. *Cell Death & Disease*, 2021, 12(5): 427.
- [100] ZHOU YK, JIN X, MA J, DING DL, HUANG ZL, SHENG HY, YAN YQ, PAN YQ, WEI T, WANG LG, WU HS, HUANG HJ. HDAC5 loss impairs RB repression of pro-oncogenic genes and confers CDK4/6 inhibitor resistance in cancer[J]. *Cancer Research*, 2021, 81(6): 1486-1499.
- [101] ZHANG K. CDK4/6 inhibitor palbociclib enhances the effect of pyrotinib in HER2-positive breast cancer[J]. *Cancer Letters*, 2019, 447: 130-140.
- [102] KUMARASAMY V, VAIL P, NAMBIAR R, WITKIEWICZ AK, KNUDSEN ES. Functional determinants of cell cycle plasticity and sensitivity to CDK4/6 inhibition[J]. *Cancer Research*, 2021, 81(5): 1347-1360.
- [103] CHONG QY. A unique CDK4/6 inhibitor: current and future therapeutic strategies of abemaciclib[J]. *Pharmacological Research*, 2020, 156: 104686.
- [104] DHILLON S. Trilaciclib: first approval[J]. *Drugs*, 2021, 81(7): 867-874.

- [105] PIEZZO M, COCCO S, CAPUTO R, CIANNIELLO D, GIOIA GD, LAURO VD, FUSCO G, MARTINELLI C, NUZZO F, PENSABENE M, de LAURENTIIS M. Targeting cell cycle in breast cancer: CDK4/6 inhibitors[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(18): 6479.
- [106] WANG J, ZHANG RG, LIN ZY, ZHANG S, CHEN YB, TANG J, HONG JX, ZHOU XS, ZONG Y, XU YZ, MENG R, XU SB, LIU L, ZHANG T, YANG KY, DONG XR, WU G. CDK7 inhibitor THZ1 enhances antiPD-1 therapy efficacy via the p38 α /MYC/PD-L1 signaling in non-small cell lung cancer[J]. *Journal of Hematology & Oncology*, 2020, 13(1): 1-16.
- [107] LI B, NI CHONGHAILE T, FAN Y, MADDEN SF, KLINGER R, O'CONNOR AE, WALSH L, O'HURLEY G, MALLYA UDUPI G, JOSEPH J, TARRANT F, CONROY E, GABER A, CHIN SF, BARDWELL HA, PROVENZANO E, CROWN J, DUBOIS T, LINN S, JIRSTROM K, et al. Therapeutic rationale to target highly expressed CDK7 conferring poor outcomes in triple-negative breast cancer[J]. *Cancer Research*, 2017, 77(14): 3834-3845.
- [108] LU P, GENG J, ZHANG L, WANG Y, NIU NN, FANG Y, LIU F, SHI JJ, ZHANG ZG, SUN YW, WANG LW, TANG YJ, XUE J. THZ1 reveals CDK7-dependent transcriptional addictions in pancreatic cancer[J]. *Oncogene*, 2019, 38(20): 3932-3945.
- [109] ZHOU Y, LU LL, JIANG GM, CHEN ZJ, LI JX, AN PP, CHEN LK, DU J, WANG HS. Targeting CDK7 increases the stability of snail to promote the dissemination of colorectal cancer[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2019, 26(8): 1442-1452.
- [110] KIM J. CDK7 is a reliable prognostic factor and novel therapeutic target in epithelial ovarian cancer[J]. *Gynecologic Oncology*, 2020, 156(1): 211-221.
- [111] HUANG CS, XU QC, DAI CL, WANG LY, TIEN YC, LI FX, SU Q, HUANG XT, WU J, ZHAO W, YIN XY. Nanomaterial-facilitated cyclin-dependent kinase 7 inhibition suppresses gallbladder cancer progression via targeting transcriptional addiction[J]. *ACS Nano*, 2021, 15(9): 14744-14755.
- [112] KAZI A, CHEN LW, XIANG SY, VANGIPURAPU R, YANG H, BEATO F, FANG B, WILLIAMS TM, HUSAIN K, UNDERWOOD P, FLEMING JB, MALAFA M, WELSH EA, KOOMEN J, TREVINO J, SEBTI SM. Global phosphoproteomics reveal CDK suppression as a vulnerability to KRas addiction in pancreatic cancer[J]. *Clinical Cancer Research*, 2021, 27(14): 4012-4024.
- [113] MARINEAU JJ, HAMMAN KB, HU SH, ALNEMY S, MIHALICH J, KABRO A, WHITMORE KM, WINTER DK, ROY S, CIBLAT S, KE N, SAVINAINEN A, WILSILY A, MALOJCIC G, ZAHLER R, SCHMIDT D, BRADLEY MJ, WATERS NJ, CHUAQUI C. Discovery of SY-5609: a selective, noncovalent inhibitor of CDK7[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2022, 65(2): 1458-1480.
- [114] HONG HH, ZENG YM, JIAN WX, LI L, LIN LY, MO YS, LIU ML, FANG SH, XIA Y. CDK7 inhibition suppresses rheumatoid arthritis inflammation *via* blockage of NF- κ B activation and IL-1 β /IL-6 secretion[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2018, 22(2):1292-1301.
- [115] PATEL H, PERIYASAMY M, SAVA GP, BONDKE A, SLAFER BW, KROLL SHB, BARBAZANGES M, STARKEY R, OTTAVIANI S, HARROD A, ABOAGYE EO, BULUWELA L, FUCHTER MJ, BARRETT AGM, COOMBES RC, ALI S. ICEC0942, an orally bioavailable selective inhibitor of CDK7 for cancer treatment[J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2018, 17(6): 1156-1166.
- [116] HU SH, MARINEAU JJ, RAJAGOPAL N, HAMMAN KB, CHOI YJ, SCHMIDT DR, KE N, JOHANNESSEN L, BRADLEY MJ, ORLANDO DA, ALNEMY SR, REN YX, CIBLAT S, WINTER DK, KABRO A, SPROTT KT, HODGSON JG, FRITZ CC, CARULLI JP, DI TOMASO E, et al. Discovery and characterization of SY-1365, a selective, covalent inhibitor of CDK7[J]. *Cancer Research*, 2019, 79(13): 3479-3491.
- [117] OLSON CM. Development of a selective CDK7 covalent inhibitor reveals predominant cell-cycle phenotype[J]. *Cell Chemical Biology*, 2019, 26(6): 792-803.e10.
- [118] ZHANG H, CHRISTENSEN CL, DRIES R, OSER MG, DENG J, DISKIN B, LI F, PAN Y, ZHANG X, YIN Y, PAPADOPOULOS E, PYON V, THAKURDIN C, KWIATKOWSKI N, JANI K, RABIN AR, CASTRO DM, CHEN T, SILVER H, HUANG Q, et al. CDK7 inhibition potentiates genome instability triggering anti-tumor immunity in small cell lung cancer[J]. *Cancer Cell*, 2020, 37(1): 37-54.e9.
- [119] CHANTKARAN W, HSIEH YC, ZHELEVA D, FRAME S, WHEADON H, COPLAND M. Interrogation of novel CDK2/9 inhibitor fadraciclib (CYC065) as a potential therapeutic approach for AML[J]. *Cell Death Discovery*, 2021, 7: 137.

- [120] OLSON CM, JIANG BS, ERB MA, LIANG YK, DOCTOR ZM, ZHANG ZN, ZHANG TH, KWIATKOWSKI N, BOUKHALI M, GREEN JL, HAAS W, NOMANBHOY T, FISCHER ES, YOUNG RA, BRADNER JE, WINTER GE, GRAY NS. Pharmacological perturbation of CDK9 using selective CDK9 inhibition or degradation[J]. *Nature Chemical Biology*, 2018, 14(2): 163-170.
- [121] MACCALLUM DE, MELVILLE J, FRAME S, WATT K, ANDERSON S, GIANELLA-BORRADORI A, LANE DP, GREEN SR. Seliciclib (CYC₂02, R-roscovitine) induces cell death in multiple myeloma cells by inhibition of RNA polymerase II-dependent transcription and down-regulation of mcl-1[J]. *Cancer Research*, 2005, 65(12): 5399-5407.
- [122] IURISCI I, FILIPSKI E, REINHARDT J, BACH S, GIANELLA-BORRADORI A, IACOBELLI S, MEIJER L, LÉVI F. Improved tumor control through circadian clock induction by seliciclib, a cyclin-dependent kinase inhibitor[J]. *Cancer Research*, 2006, 66(22): 10720-10728.
- [123] RATHOS MJ, JOSHI K, KHANWALKAR H, MANOHAR SM, JOSHI KS. Molecular evidence for increased antitumor activity of gemcitabine in combination with a cyclin-dependent kinase inhibitor, P276-00 in pancreatic cancers[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2012, 10(1): 1-11.
- [124] DOLMAN MEM, POON E, EBUS ME, DEN HARTOG IJM, van NOESEL CJM, JAMIN Y, HALLSWORTH A, ROBINSON SP, PETRIE K, SPARIDANS RW, KOK RJ, VERSTEEG R, CARON HN, CHESLER L, MOLENAAR JJ. Cyclin-dependent kinase inhibitor AT7519 as a potential drug for MYCN-dependent neuroblastoma[J]. *Clinical Cancer Research*, 2015, 21(22): 5100-5109.
- [125] WANG LG, SHAO XJ, ZHONG TB, WU Y, XU AX, SUN XY, GAO HY, LIU YB, LAN TL, TONG Y, TAO X, DU WX, WANG W, CHEN YQ, LI T, MENG XB, DENG HT, YANG B, HE QJ, YING MD, et al. Discovery of a first-in-class CDK2 selective degrader for AML differentiation therapy[J]. *Nature Chemical Biology*, 2021, 17(5): 567-575.
- [126] LUEDTKE DA, SU YW, MA J, LI XY, BUCK SA, EDWARDS H, POLIN LS, KUSHNER J, DZINIC SH, WHITE K, LIN H, TAUB JW, GE YB. Inhibition of CDK9 by voruciclib synergistically enhances cell death induced by the Bcl-2 selective inhibitor venetoclax in preclinical models of acute myeloid leukemia[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2020, 5: 17.
- [127] MANDAL R, BECKER S, STREBHARDT K. Targeting CDK9 for anti-cancer therapeutics[J]. *Cancers*, 2021, 13(9): 2181.
- [128] RICHTERS DOYLE SK, FREEMAN DB, LEE C, LEIFER BS, JAGANNATHAN S, KABINGER F, KOREN JV, STRUNTZ NB, URGILES J, STAGG RA, CURTIN BH, CHATTERJEE D, MATHEA S, MIKOSCHIK PJ, HOPKINS TD, GAO H, BRANCH JR, XIN H, WESTOVER L, et al. Modulating androgen receptor-driven transcription in prostate cancer with selective CDK9 inhibitors[J]. *Cell Chemical Biology*, 2021, 28(2): 134-147.e114.
- [129] HUANG J, CHEN P, LIU K, LIU J, ZHOU BR, WU RL, PENG Q, LIU ZX, LI CF, KROEMER G, LOTZE M, ZEH H, KANG R, TANG DL. CDK1/2/5 inhibition overcomes IFNG-mediated adaptive immune resistance in pancreatic cancer[J]. *Gut*, 2021, 70(5): 890-899.
- [130] MAHDESSIAN D, CESNIK AJ, GNANN C, DANIELSSON F, STENSTRÖM L, ARIF M, ZHANG C, LE T, JOHANSSON F, SCHUTTEN R, BÄCKSTRÖM A, AXELSSON U, THUL P, CHO NH, CARJA O, UHLÉN M, MARDINOGLU A, STADLER C, LINDSKOG C, AYOGLU B, et al. Spatiotemporal dissection of the cell cycle with single-cell proteogenomics[J]. *Nature*, 2021, 590(7847): 649-654.

(本文责编 郝丽芳)