

环磷酸腺苷激活的交换蛋白介导的信号通路在视网膜中的作用

胡单萍 综述 沈吟 审校

【摘要】 环磷酸腺苷激活的交换蛋白(Epac)是鸟嘌呤核苷酸交换蛋白因子,与环磷酸腺苷(cAMP)高亲和力和力地结合后能激活下游的多种信号分子,如 Rap 和 Ras 等,这些信号分子可参与多种细胞的生理和病理过程。Ras 和 Rap 能靶向诱导光感受器的生长、分化及增生,Ras 可通过酪氨酸蛋白激酶信号传递(Ras/Raf/MEK/ERK)参与年龄相关性黄斑变性(AMD)和增生性玻璃体视网膜病变(PVR)等疾病的发生。就近年来 Epac 的研究进展及其下游信号分子在视网膜内的功能进行综述。

【关键词】 视网膜; 环磷酸腺苷激活的交换蛋白; 环磷酸腺苷; 信号转导

Exchange proteins activated directly by cyclic adenosinemonophosphate-mediated signal pathway and its role in the retina Hu Danping, Shen Yin. Eye Center of Wuhan University Renmin Hospital, Wuhan 430060, China

Corresponding author: Shen Yin, Email: yinshen@whu.edu.cn

[Abstract] Exchange proteins activated directly by cyclic adenosinemonophosphate (Epac) is one of cyclic adenosinemonophosphate (cAMP)-regulated guanine nucleotide exchange factors. When Epac closely binds with cAMP, it can activate many downstream signal molecules, such as Rap and Ras, etc. By activating several effectors, Epac regulates a multitude of important physiological and pathological processes. Ras and Rap play important effects on the differentiation and proliferation of photoreceptors. Ras may participate in the pathogenesis and development of age-related macular degeneration (AMD) and proliferative vitreo-retinopathy (PVR) through Ras/Raf-1/MEK/ERK cascade. Therefore, further studies about the role of Epac and its downstream signals in the retina may provide numerous directions both in research and treatment of retinal diseases. The researching progress in Epac and the functions of the downstream signaling molecules of Epac in the retina were reviewed.

[Key words] Retina; Exchange proteins activated directly by cyclic AMP; cyclic adenosinemonophosphate; Signal transduction

环磷酸腺苷激活的交换蛋白(exchange proteins activated directly by cyclic adenosinemonophosphate, Epac)是鸟嘌呤核苷酸交换蛋白因子,与环磷酸腺苷(cyclic adenosinemonophosphate, cAMP)高亲和力结合后能激活下游多种信号分子,如 Rap、Rho、Rac、Ras、Rit、Rims 等,参与下游的细胞功能,包括细胞内 Ca²⁺ 浓度调节、细胞黏附、细胞间缝隙连接、细胞分泌、细胞分化、细胞增生、基因表达、细胞凋亡和吞噬作用^[1-4]。在哺乳动物中,可直接被 cAMP 激活的 Epac 蛋白有两个亚型,即 Epac1 和 Epac2。这两个亚型有广泛的序列同源性,均包含 1 个 N-末端调节域和 C-末端催化区域。Epac 的 N-末端调节域内含有 1 个 DEP 结构域和 1 个 cAMP 高亲和力结合位点(cAMP-B)。DEP 结构域的缺失突变会使 Epac1 完全丧失膜定位功能。Epac2 比 Epac1 多 1 个环核苷酸结合位点(cAMP-A),该位点与 cAMP 的亲合力较低,在 cAMP 对 Epac 调控中的作用尚不清楚^[5]。

1 Epac 介导的信号通路机制及其在生理和病理过程中的作用

Epac1 和 Epac2 在组织中的分布不完全相同,Epac1 mRNA 在所有组织中均有表达,而 Epac2 mRNA 主要在大脑和内分泌组织中表达^[6-7]。Epac1 能在单核细胞、巨噬细胞、B 细胞、T 细胞^[8-9]、嗜酸性粒细胞、血小板和 CD34⁺ 的造血细胞中表达,而所有造血细胞类型中还未发现 Epac2 的表达^[10]。Epac 蛋白主要位于细胞膜、线粒体和细胞核附近^[11]。当 Epac 与 cAMP 结合后,可激活 Ras 家族的三磷酸鸟苷(guanosine triphosphate, GTP)酶 Rap1 和 Rap2。Rap 主要位于细胞内囊泡中,小部分位于细胞膜,Rap1 可被第二信使,如 cAMP、Ca²⁺ 和 1-二酰甘油及 2-二酰甘油激活^[12],从而对下游因子发挥作用。

Epac 除了可激活 Rap1 和 Rap2 外,同时也激活许多下游效应器,如 Ras 和 Rho GTP 酶、磷脂酶 C (phospholipase C, PLC)、PLD、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、离子通道、分泌颗粒相关蛋白和调控肌动蛋白微管网的蛋白。Epac 可直接发挥生物学作用,也可通过蛋白激酶 A

DOI:10.3760/ema.j.issn.2095-0160.2015.01.017

基金项目:国家自然科学基金项目(81470628、81270998)

作者单位:430060 武汉大学人民医院眼科中心

通信作者:沈吟,Email:yinshen@whu.edu.cn

(protein kinase A, PKA)、激酶锚定蛋白 (A-kinase anchoring proteins, AKAPs) 等间接发挥作用^[13]。研究表明, Epac 的下游信号分子 Rit 对神经信号传导起到了重要的作用; Rim 能增强神经元突触的递质分泌, 增强神经信号的传导; Ras 和 Rap 之间的相互作用能够靶向诱导光感受器细胞的生长及分化; Ras 还可通过酪氨酸蛋白激酶信号传递 (Ras/Raf/MEK/ERK) 途径参与 AMD 的发展。Epac 及其下游的信号分子如图 1、图 2 所示。

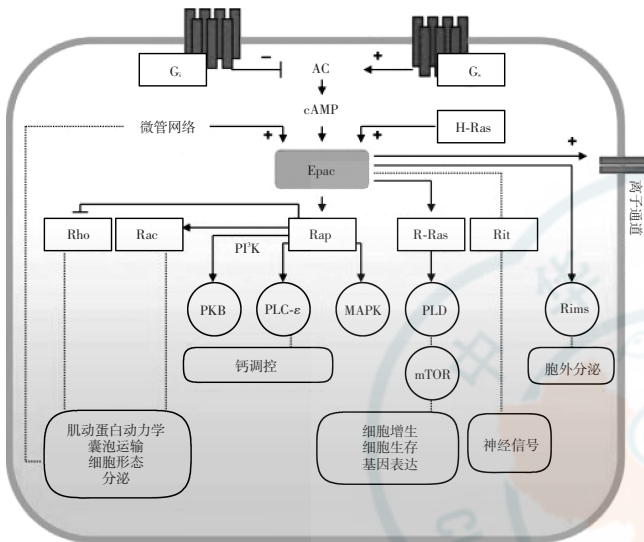


图 1 Epac 信号通路示意图 GTPases 用方框表示, 效应器用圆框表示, 下游细胞产生的反应用椭圆框表示^[1] AC: 腺苷酸环化酶; Epac: 环磷酸腺苷激活的交换蛋白; cAMP: 环磷酸腺苷; PI3K: 磷脂酰肌醇 3 激酶; PKB: 蛋白激酶 B; mTOR: 哺乳动物的雷帕霉素靶蛋白; MAPK: 丝裂原活化蛋白激酶; GTP: 三磷酸鸟苷; PLD: 磷脂酶 D

Epac: Rap-GDP→Epac-cAMP→Rap-GTP



图 2 Epac 信号通路、Epac 的下游信号及其作用示意图 Epac: 环磷酸腺苷激活的交换蛋白; GDP: 二磷酸鸟苷; cAMP: 环磷酸腺苷; GTP: 三磷酸鸟苷; GPCR: G 蛋白偶联受体; ERK1/2: 细胞外信号调节激酶 1/2; MAPK: 丝裂原活化蛋白激酶; DAG: 二酰甘油; IP3: 三磷酸肌醇

2 Epac 在视网膜中的分布与表达

在大鼠视网膜的水平细胞、视锥型双极细胞和视杆型双极细胞、胆碱能无长突细胞、视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 和 Müller 细胞上均能观察到 Epac1 和 Epac2 的表达, 同时, Epac1 能特异地表达在谷氨酸转运体 1 和 C 端结合蛋白 2 染色阳性的光感受器突触上, 而 Epac2 则表达在锥体细胞的内节和外节、细胞体和突触上^[14]。Epac1 和 Epac2 在视网膜内的差异表达为进一步研究视网膜内 cAMP 信号通路奠定

了基础。

3 Epac 介导的信号通路在视网膜中的作用

3.1 Epac 的上游信号分子 cAMP 在视网膜细胞中的作用

视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞的完整性对于维护视网膜功能以及抑制 RPE 细胞增生有重要的作用。RPE 细胞增生的激活与增生性玻璃体视网膜病变 (proliferative vitreoretinopathy, PVR) 及脉络膜恶性黑色素瘤有密切联系。Epac 是 cAMP 控制的鸟苷酸交换因子家族的一员, 介导 cAMP 中不依赖 PKA 的信号转导, cAMP 可以通过 Epac 抑制细胞外信号调节激酶 1/2 (extracellular signal regulation kinase 1/2, ERK1/2), 从而达到抑制 RPE 细胞增生的效果^[15]。可溶性腺苷酸环化酶 (soluble adenylyl cyclase, sAC) 在 RGCs 中有表达, sAC 的激活可提高 cAMP 含量, 促进 RGCs 存活和轴突生长^[16]。

3.2 下游信号分子 Ras 在 RPE 细胞中的作用

研究表明, Ras 在 RPE 细胞增生中发挥了关键作用。激活的小 G 蛋白 Ras 及少量的 Raf-1 (Ras 下游的激酶) 在胎牛血清诱导的 RPE 细胞增生中有重要作用。氧化应激减少了细胞表面的补体抑制和随之引起的补体激活, 并通过一系列的病理改变, 导致各种疾病。H₂O₂ 和 NHS 引起跨膜电阻抗 (transmembrane electrical resistance, TER) 的屏障功能破坏, 继而增加了 Ras 的表达和 Src 磷酸化, 促进了膜攻击复合物 (membrane attack complex, MAC) 的激活, 降低血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 转录的负调节器 zfp36, 从而导致 VEGF 转录的增加。补体旁途径的激活与 VEGF 的释放在年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD) 中扮演至关重要的角色^[17]。

MRN 是 DNA 损伤关键蛋白 Mre11-DNA 修复蛋白 Rad50-NBS1、Mre11-Rad50-NBS1 的复合物, Nijmegen 断裂综合征蛋白 1 (Nijmegen break syndrom 1, NBS1) 是 MRN 复合物中的一员, 它在细胞应对 DNA 损伤和维护基因组稳定性中扮演了重要的角色。NBS1 的下调使细胞周期素 cyclin E 和 cyclin A 出现失调, 延迟细胞周期, 抑制 G₁ 期细胞向 S 期的过渡^[18]。Hematulin 等^[19]证实 NBS1 是通过 cAMP 下游的 Ras/Raf/MEK/ERK 信号级联参与胰岛素生长因子 1 信号流的, 从而促进细胞的增生。RPE 细胞损伤可产生形态的改变及 RPE 细胞的增生和迁移, 引起视网膜脱离和视力丧失。研究证明, 谷氨酸可激活 cAMP 下游 Ras/Raf/MEK/ERK 级联反应, 为进一步探究谷氨酸对 RPE 细胞的兴奋性损伤以及谷氨酸是否促进 RPE 细胞增生和迁移, 导致玻璃体视网膜病变的发生和发展提供了依据。

3.3 下游 Rap 在视网膜细胞调节中的作用

Rap 是 Ras 家族中的 GTP 酶, Ras/Raf-1/MEK/ERK 途径是参与 RPE 细胞增生的信号通路, 与不依赖 PKA 的 cAMP 信号通路, 即 Epac 途径紧密联系, 小 G 蛋白 Rap1 能抑制 cAMP 的激活, 部分逆转 cAMP 对细胞增生的影响和 MEK/ERK 的激活^[15]。通过 Epac 途径激活 Rap, cAMP 还能影响众多细胞的活动, 包括细胞黏附、血管内皮细胞屏障的形成和细胞缝隙连接的形成。

4 Epac 信号通路在眼科生理和病理研究中的前景

VEGF 是参与新生血管形成的重要信号蛋白。在正常情况下, RPE 细胞、RGCs 和星形胶质细胞等都能合成少量的 VEGF, 从而参与血管形成, 维持血管内皮细胞的活性^[20]。研究表明, 湿性 AMD 患者的脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)中有 VEGF 及其受体的存在。相关动物实验也表明, 在 CNV 的进展中, 起源于 RPE 细胞的 VEGF 含量明显升高。由于基础水平的 VEGF 可保持脉络膜血管的正常分布, 如果长期接受抑制 VEGF 的治疗很可能会影响血管的正常生理活动。因此, 在 AMD 治疗中应更注意那些可能降低 VEGF 的基础分泌的病理过程。cAMP 通过 Epac 抑制 ERK1/2 而抑制 RPE 细胞的增生, 从而抑制病理性 VEGF 的升高, 因此在视网膜玻璃体疾病中有重要的研究价值。在老化、氧化应激、外伤等多种病理因素的作用下, RPE 细胞表面补体的抑制作用减弱, 提高 Ras 表达和下游 Src 磷酸化而激活 MAC, 最后导致 VEGF 转录水平提高, 引起 VEGF 水平的病理性升高, 促使病理性新生血管的形成。如能靶向抑制 Ras 的表达, 则可减缓 RPE 细胞中 MAC 的激活, 维持 zfp36 的负向调节作用, 通过控制病理性 VEGF 转录, 从而控制 AMD 发展^[15]。

PVR 中 VEGF 分泌也是增高的, 进一步研究表明, VEGF 主要在 PVR 的早期发挥作用。PVR 是孔源性视网膜脱离复位手术失败的主要原因, 其发病机制为视网膜表面和玻璃体后大面积的纤维增生膜收缩、牵拉, 最后导致视网膜脱离。纤维增生膜主要由 RPE 细胞、胶质细胞、纤维细胞、成纤维细胞和巨噬细胞构成, RPE 细胞在 PVR 发生和发展中起重要作用, 它不仅是增生膜形成和收缩的主要细胞, 且可产生趋化因子, 吸引纤维胶质细胞和成纤维细胞参与增生膜的形成, 而 cAMP 激活 Epac 后可通过 Ras/Raf-1/MEK/ERK 联合途径来控制 ERK 1/2, 起到抑制 RPE 细胞增生的作用, 但目前仅限于离体实验, 在人 RPE 细胞中是否也会有同样的效果还需进一步研究。

VEGF 在伴玻璃体出血的增生型糖尿病视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy, PDR)患者纤维血管膜中的表达升高, 可能与 PDR 纤维血管膜的形成有关。VEGF 含量增高促进微血管的内皮细胞增生, 同时又使细胞膜的通透性增强, 大分子物质, 如纤维蛋白原等进入细胞外基质中形成纤维蛋白凝胶, 新生血管和基质细胞的内向生长, 最终导致新生血管形成。

对 Epac 及其下游信号分子对 VEGF 转录的研究不仅可增进我们对 PVR 和 PDR 的形成过程、致病机制等方面的认识, 也为疾病的治疗提供参考。另外, Epac 的其他下游信号分子, 如 Rap、Rit、Rim、Rho 等对神经信号的传导也起到重要作用, 但目前视网膜和视神经中的研究尚未见文献报道。进一步研究视网膜和视神经中 Epac 介导的酶激信号网络以及下游蛋白和调节环路, 就有可能在不久的将来找到靶向治疗 AMD、PVR 和其他视网膜疾病的方法, 为临床眼科疾病的治疗提供更多的选择。

参考文献

[1] Roscioni SS, Elzinga CR, Schmidt M. Epac: effectors and biological

- functions [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2008, 377 (4-6): 345-357. doi:10.1007/s00210-007-0246-7.
- [2] Hibino H, Pironkova R, Onwumere O, et al. RIM binding proteins (RBPs) couple Rab3-interacting molecules (RIMs) to voltage-gated Ca²⁺ channels [J]. *Neuron*, 2002, 34 (3): 411-423.
- [3] Wang Y, Okamoto M, Schmitz F, et al. Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion [J]. *Nature*, 1997, 388 (6642): 593-598. doi:10.1038/41580.
- [4] Lee CH, Della NG, Chew CE, et al. Rin, a neuron-specific and calmodulin-binding small G-protein, and Rit define a novel subfamily of ras proteins [J]. *J Neurosci*, 1996, 16 (21): 6784-6794.
- [5] Cheng X, Ji Z, Tsalkova T, et al. Epac and PKA: a tale of two intracellular cAMP receptors [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2008, 40 (7): 651-662. doi:10.1111/j.1745-7270.2008.00438.x.
- [6] Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, et al. A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1 [J]. *Science*, 1998, 282 (5397): 2275-2279. doi:10.1126/science.282.5397.2275.
- [7] de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, et al. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP [J]. *Nature*, 1998, 396 (6710): 474-477. doi:10.1038/24884.
- [8] Tiwari S, Fellekiss K, Moon EY, et al. Among circulating hematopoietic cells, B-CLL uniquely expresses functional EPAC1, but EPAC1-mediated Rap1 activation does not account for PDE4 inhibitor-induced apoptosis [J]. *Blood*, 2004, 103 (7): 2661-2667. doi: http://dx.doi.org/10.1182/blood-2003-06-2154.
- [9] Bryn T, Mahic M, Enserink JM, et al. The cyclic AMP-Epac1-Rap1 pathway is dissociated from regulation of effector functions in monocytes but acquires immunoregulatory function in mature macrophages [J]. *J Immunol*, 2006, 176 (12): 7361-7370. doi:10.4049/jimmunol.176.12.7361.
- [10] Lorenowicz MJ, van Gils J, de Boer M, et al. Epac1-Rap1 signaling regulates monocyte adhesion and chemotaxis [J]. *J Leukoc Biol*, 2006, 80 (6): 1542-1552. doi:10.1189/jlb.0506357.
- [11] Qiao J, Mei FC, Popov VL, et al. Cell cycle-dependent subcellular localization of exchange factor directly activated by cAMP [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277 (29): 26581-26586. doi:10.1074/jbc.M203571200.
- [12] Jeyaraj SC, Unger NT, Chotani MA. Rap1 GTPases: an emerging role in the cardiovascular system [J]. *Life Sci*, 2011, 88 (15-16): 645-652. doi:10.1016/j.lfs.2011.01.023.
- [13] Roscioni SS, Elzinga CR, Schmidt M. Epac: effectors and biological functions [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2008, 377 (4-6): 345-357. doi:10.1007/s00210-007-0246-7.
- [14] Whitaker CM, Cooper NG. Differential distribution of exchange proteins directly activated by cyclic AMP within the adult rat retina [J]. *Neuroscience*, 2010, 165 (3): 955-967. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.10.054.
- [15] Hecquet C, Lefevre G, Valtink M, et al. cAMP inhibits the proliferation of retinal pigmented epithelial cells through the inhibition of ERK1/2 in a PKA-independent manner [J]. *Oncogene*, 2002, 21 (39): 6101-6112. doi:10.1038/sj.onc.1205765.
- [16] Corredor RG, Trakhtenberg EF, Pita-Thomas W, et al. Soluble adenylyl cyclase activity is necessary for retinal ganglion cell survival and axon growth [J]. *J Neurosci*, 2012, 32 (22): 7734-7744. doi:10.1523/JNEUROSCI.5288-11.2012.
- [17] Kunchithapautham K, Rohrer B. Sublytic membrane-attack-complex (MAC) activation alters regulated rather than constitutive vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion in retinal pigment epithelium monolayers [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286 (27): 23717-23724. doi:10.1074/jbc.M110.214593.
- [18] Bornfeldt KE, Krebs EG. Crosstalk between protein kinase A and growth factor receptor signaling pathways in arterial smooth muscle [J]. *Cell Signal*, 1999, 11 (7): 465-477. doi:10.1016/S0898-6568(99)00020-0.
- [19] Hematulin A, Sagan D, Eckardt-Schupp F, et al. NBS1 is required for IGF-1 induced cellular proliferation through the Ras/Raf/MEK/ERK cascade [J]. *Cell Signal*, 2008, 20 (12): 2276-2285. doi:10.1016/j.cellsig.2008.08.017.
- [20] García S, López E, López-Colomé AM. Glutamate accelerates RPE cell proliferation through ERK1/2 activation via distinct receptor-specific mechanisms [J]. *J Cell Biochem*, 2008, 104 (2): 377-390. doi:10.1002/jcb.21633.
- [21] Mcleod DS, Taomoto M, Cao J, et al. Localization of VEGF receptor-2 (KDR/Flk-1) and effects of blocking it in oxygen-induced retinopathy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002, 43 (2): 474-482.

(收稿日期:2014-07-12)

(本文编辑:尹卫靖 杜娟)