

# cAMP/Epac 信号通路在 ARDS 中的作用研究进展

陈洪流 李超乾

**摘要** 急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 是一种常见且凶险的临床综合征。炎症反应介导的肺泡上皮细胞和肺血管内皮细胞损伤在 ARDS 的发病机制中处于核心地位。环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 是作用最广泛的第二信使, 调控着一系列不同的病理生理过程。近年来研究发现环磷酸腺苷活化交换蛋白 (exchange protein directly activated by cAMP, Epac) 作为一种新兴的 cAMP 下游分子, 参与多种效应因子和关键信号转导过程, cAMP/Epac 信号通路参与炎症反应、血管内皮和肺上皮屏障功能、凝血功能、肺成纤维细胞分化等调控过程, 这些作用可能与 ARDS 的防治有所关联。本文针对 cAMP/Epac 信号通路在 ARDS 中的作用做一综述。

**关键词** 急性呼吸窘迫综合征 环磷酸腺苷 环磷酸腺苷活化交换蛋白

**中图分类号** R563

**文献标识码** A

**DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2023.05.038

急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 是指各种肺内和肺外致病因素所导致的急性弥漫性肺损伤和进而发展的急性呼吸衰竭。虽然 ARDS 的发病机制尚未完全阐明, 但主流的观点认为炎症反应介导的肺泡上皮细胞和肺血管内皮细胞损伤是促进 ARDS 发生、发展的重要因素。尽管经过了几十年的研究, ARDS 的病死率依旧高达 40% 左右<sup>[1]</sup>。而目前 ARDS 的治疗仍以病因控制和支持治疗为主, 尚缺乏有效的治疗药物。近年来研究发现, cAMP/Epac 信号通路参与炎症反应、血管内皮和肺上皮屏障功能、凝血功能、肺成纤维细胞分化等调控过程, 这些作用可能与 ARDS 的发生、发展有所关联。因此本文就 cAMP/Epac 信号通路在 ARDS 中的作用做一综述, 以寻找 ARDS 防治的新靶点。

## 一、cAMP/Epac 信号通路概述

环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 是作用最广泛的第二信使, 参与调控一系列不同的生理过程, 包括钙转运、门控离子通道、骨骼肌和平滑肌收缩、学习和记忆、细胞生长、分化、凋亡和炎症等<sup>[2]</sup>。多种细胞外配体与 G 蛋白偶联受体结合, 可激活膜结合型腺苷酸环化酶, 从而催化三磷酸腺苷生成 cAMP。G 蛋白偶联受体通过腺苷酰基环化酶和 cAMP 磷酸二酯酶密切调控细胞内 cAMP 含量。早期

的研究认为 cAMP 主要通过激活下游信号分子蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 实现其生物学效应, 而 de Rooij 等<sup>[3]</sup>在 1998 年发现了一种新的 cAMP 下游信号分子, 即环磷酸腺苷活化交换蛋白 (exchange protein directly activated by cAMP, Epac), 从此针对 cAMP/Epac 信号通路的研究拉开序幕。

Epac 包含两个亚型, 即 Epac1 和 Epac2。Epac1 在生物体内广泛表达, Epac2 主要在大脑和肾上腺表达, 在心脏、血管系统、肾脏和肺部的也有表达。Epac 主要由 N 端的调节区和 C 端的催化区组成, cAMP 核苷酸结合位点位于调节区, Epac1 存在 1 个结合位点, 而 Epac2 存在两个结合位点; 催化区存在两个重要的结构域, 分别被称为 REM 和 RA, 前者为 Ras 交换基序, 后者为 Ras 结合基序。Epac 在质膜、核周区域、核膜和线粒体均有表达, 细胞内 Epac 空间区隔化表达在细胞周期中似乎受到严格的调控, 这一特征与 Epac 在多种信号转导中能发挥广泛的差异性作用密切相关。近年的研究证实 Epac 参与调控一系列不同的效应因子和关键信号转导过程, 包括钙离子转运和离子运输、细胞增殖和分化、细胞生存和凋亡、基因转录和染色体完整性、囊泡的运输和分泌、屏障功能和神经元反应等<sup>[4]</sup>。

## 二、cAMP/Epac 信号通路在 ARDS 中的作用

1. cAMP/Epac 在炎症反应中的作用: 人们对炎症反应在 ARDS 中的作用进行了大量的研究, 各种肺内或肺外因素引起的损伤可导致炎症细胞的激活, 这是 ARDS 的启动因素。过度炎症反应可引起肺泡上皮细胞和肺毛细血管内皮细胞受损, 从而导致以弥漫

基金项目: 广西壮族自治区自然科学基金资助项目 (2020GXNSFDA238003)

作者单位: 530021 南宁, 广西医科大学第一附属医院急诊科

通信作者: 李超乾, 教授, 博士生导师, 电子邮箱: lichaoqianguod@

163.com

性肺间质和肺泡水肿为主要特征的 ARDS 的发生。因此,控制失衡的炎症反应对于 ARDS 的防治是至关重要的。

cAMP/Epac 信号通路与炎症调节密切相关。Wang 等<sup>[5]</sup>研究发现,槲皮素通过增加肺组织的 cAMP 和 Epac 含量,抑制脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的肺内炎性细胞因子的释放,阻断中性粒细胞的募集,并以剂量依赖的方式减少肺内白蛋白的渗漏。此外,槲皮素通过激活 cAMP/Epac 信号通路,抑制 LPS 诱导的小鼠肺上皮细胞分泌角质形成细胞衍生的趋化因子。Wang 等<sup>[6]</sup>研究发现,Epac 激动剂 8CPT 可减少 LPS 诱导的小鼠肺泡灌洗液白细胞数量,减少肺组织肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 (interleukin, IL)-6 和 IL-1 $\beta$  等炎性细胞因子的表达。Xing 等<sup>[7]</sup>研究认为心钠素可通过激活 Epac/Ras 相关蛋白 1 (ras-related protein 1, Rap1)/T 淋巴瘤侵袭诱导基因 1 (T lymphoma invasion and metastasis gene 1, TIAM1)/Rac 信号通路减轻 LPS 和 TNF- $\alpha$  诱导的肺微血管内皮细胞炎症反应。近年来研究认为,Epac 激动剂可通过激活 cAMP/Epac/Rap1 信号通路,减轻 LPS 诱导的人肺动脉内皮细胞的炎症反应,减少中性粒细胞的黏附和迁移<sup>[8]</sup>。

Jiang 等<sup>[9]</sup>研究发现,Epac1 基因敲除的小鼠视网膜高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group box 1, HMGB1)、核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 (cysteiny aspartate specific proteinase, caspase)-1 及 IL-1 $\beta$  表达增加,而 Epac1 激动剂可减少高糖处理的视网膜内皮细胞上述炎性细胞因子的表达。Barker 等<sup>[10]</sup>研究表明,Epac1 激动剂 I942 可上调炎性细胞因子信号转导抑制分子 3 (suppressor of cytokine signaling 3, SOCS3) 表达,进而抑制 Janus 激酶 (janus kinase, JAK)/信号转导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)/IL-6 信号通路,减轻血管内皮细胞炎症。由此可见,cAMP/Epac 信号通路可通过多种途径抑制炎症反应,对 ARDS 防治可能有所帮助。

2. cAMP/Epac 对血管内皮细胞的作用:各种致病因素导致机体的损伤可诱导炎症反应的产生,过度炎症反应可引起肺血管内皮细胞受损。受损的内皮细胞不仅是诱发 ARDS 的主要靶细胞,而且是活跃的

效应细胞。由此可见,维持肺血管内皮细胞的屏障功能、减轻内皮细胞的损伤对于 ARDS 的防治是非常重要的。

肺毛细血管屏障的通透性是由黏附连接、紧密连接、缝隙连接调节的。内皮细胞黏附连接主要由血管内皮钙黏蛋白 (vascular endothelial cadherin, VE-cadherin)、连环蛋白等构成。紧密连接主要由封闭蛋白、闭合蛋白、闭锁小带蛋白以及紧密连接黏附分子等构成<sup>[11]</sup>。 $\beta_2$  受体激动剂、前列腺素和佛司可林均可通过提高细胞内 cAMP 水平,激活下游 Epac/Rap1 信号通路,调控与紧密连接和黏附连接相关的肌动蛋白-微管网络,从而增强内皮屏障功能,减少血管渗漏<sup>[12]</sup>。近年来研究发现,血管内皮细胞 cAMP 水平上升可通过激活 Epac/SOCS3/STAT3 信号通路减轻血管内皮炎症反应、增强内皮屏障功能<sup>[13]</sup>。另一项研究表明,cAMP/Epac 信号通路的活化一方面可通过抑制促分裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)/丝裂原活化的细胞外信号调节激酶 (mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase, MEK)/细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 信号通路保护血管内皮细胞并增强其屏障功能;另一方面可通过同时抑制磷脂肌醇 3 激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI<sub>3</sub>K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB/Akt) 和 MEK/ERK 信号通路减少 caspase-3/7 表达,从而抑制血管内皮细胞凋亡,增加内皮细胞存活<sup>[14]</sup>。此外,研究者在对人脐静脉内皮细胞的实验中发现,Epac 激动剂 8CPT-2Me-cAMP 可促进肌动蛋白结构重组,增加 VE-cadherin 和闭锁小带蛋白 (zonula occludens, ZO)1 表达,从而改善再生肺支架的内皮屏障功能<sup>[15]</sup>。

Wang 等<sup>[16]</sup>研究发现,预防性给予多巴胺或多巴胺 D1 受体激动剂可通过活化 cAMP/Epac 信号通路使组蛋白去乙酰化酶 6 (histone deacetylase 6, HDAC6) 失活,抑制机械性拉伸诱导的  $\alpha$ -微管蛋白脱乙酰基,从而减轻机械性拉伸诱发的肺内皮屏障功能障碍和肺损伤。贝前列环素可通过激活 cAMP/Epac/Rap1 信号通路,减少 LPS 诱导的人肺动脉内 IL-8、细胞间黏附分子 1 以及血管细胞黏附分子 1 的表达,从而减轻内皮渗漏<sup>[8]</sup>。前列腺素 E<sub>2</sub> 和贝前列环素可通过 cAMP 活化 PKA、Epac/Rap1 和 TIAM1/Vav2 依赖的信号通路,增加外周 F-肌动蛋白和连接蛋白表达,从而保护肺动脉内皮细胞屏障功

能<sup>[17]</sup>。综上所述,研究认为 cAMP/Epac 信号通路的活化可保护血管内皮细胞、增强血管屏障功能。

3. cAMP/Epac 对肺上皮细胞的作用:肺泡上皮作为一个紧密的屏障,限制水、电解质以及小分子亲水溶剂的通过,从而维持正常的气体交换功能。各种致病因素可直接或间接损伤肺泡上皮细胞,破坏上皮屏障功能,致使大分子和蛋白丰富的液体进入肺泡间质和肺泡腔,从而导致 ARDS 的发生。因此,保护肺泡上皮细胞、维持肺上皮屏障功能是防治 ARDS 的重要环节之一。

Scheibner 等<sup>[18]</sup>研究认为,内生性的腺苷受体 A<sub>2</sub> 活化可抑制高分子透明质酸降解产物诱导的气道上皮细胞炎症,这与激活 cAMP/Epac 信号通路,进而抑制核因子  $\kappa$ B (nuclear factor - kappa B, NF -  $\kappa$ B) 表达有关。Cao 等<sup>[19]</sup>研究发现 Epac 抑制剂 ESI - 09 可诱导小鼠肺泡上皮细胞应力性纤维形成增多,而连接蛋白降解增加,因此 Epac 可能有助于增强肺上皮细胞的屏障功能。维持肺泡上皮屏障功能的稳态主要是由黏附连接和紧密连接实现的。

Young 等<sup>[20]</sup>研究发现脱细胞细胞外基质 (decellularized extracellular matrix, dECM) 添加层粘连蛋白后,可明显增强肺泡上皮屏障功能。这些作用与其活化 Epac/Rap1 通路,从而上调紧密连接蛋白 (claudin) - 18、连接黏附分子 (junctional adhesive molecule, JAM) - A 表达密切相关。另有研究表明 A 型激酶锚定蛋白 9 (A - kinase anchoring protein9, AKAP9) 是内皮屏障和上皮屏障的关键调节因子。COPD 诱导剂香烟烟雾可通过下调气道上皮细胞 AKAP9 的表达,进而减少上皮 E - 钙粘蛋白的表达,从而导致上皮屏障功能受损<sup>[21,22]</sup>。而近年来研究证实 Epac1 抑制剂 ESI - 09 可使 AKAP9 在上皮细胞的定位错误和功能降低<sup>[23]</sup>。由此笔者推测 cAMP/Epac1 信号通路参与 AKAP9 对上皮屏障功能的调控。因此,笔者认为 cAMP/Epac1 信号通路活化具有保护肺泡上皮细胞、维持肺上皮屏障功能的作用。

4. cAMP/Epac 对凝血功能的影响:凝血激活和过度炎症反应是 ARDS 病理生理的基本特征之一。过度炎症反应可引起血管内皮细胞损伤,促进血小板活化并聚集到损伤的内皮,同时中性粒细胞以及其他吞噬细胞被招募到微血管中,与血小板相互作用,放大促凝和炎症反应,导致微血管血栓 (免疫血栓) 形成。免疫血栓形成有助于病原体的清除和血管内皮的修复,然而,失控的免疫血栓形成会引起附带的组

织损伤,从而导致器官功能障碍。目前已证实 ARDS 的发生与肺泡和肺间质中凝血活动增强及纤维蛋白溶解活动减弱有关<sup>[1]</sup>。因此抗凝和抑制血小板活化可能有助于 ARDS 的防治。

He 等<sup>[24]</sup>通过人类心脏活检发现 Epac1 表达降低与心房附壁血栓形成具有一定的相关性。随后的动物实验证实,Epac1 基因缺失的小鼠对化学诱导的颈动脉闭塞更敏感。而 Epac1 抑制剂可减少血管内皮细胞促纤维蛋白溶解复合物 (ANXA2 - S100A10) 2 的形成。Chu 等<sup>[25]</sup>在大脑中动脉闭塞的小鼠实验中发现,安非博肽 (一种特异性的血小板膜糖蛋白 I b 受体拮抗剂) 可通过激活 cAMP/Epac 信号通路减少脑梗死面积、减轻脑缺血再灌注损伤。血管性血友病因子 (von willebrand factor, VWF) 是凝血途径激活的主要成分之一,也是血管炎症的重要介质,在血栓炎症中发挥重要作用。Xiao 等<sup>[26]</sup>研究发现,Epac1 基因缺失的 LPS 诱导小鼠血浆 VWF 水平较野生型小鼠增高,且肺组织内出现微血栓。此外,体外实验发现 Epac1 通过 PI<sub>3</sub>K/内皮一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 依赖的方式抑制 TNF -  $\alpha$  诱导的人脐静脉内皮细胞 VWF 的分泌。以上的研究表明,cAMP/Epac 通路的活化可促进纤维蛋白溶解、抑制血栓形成,可能有助于 ARDS 防治。

5. cAMP/Epac 对肺成纤维细胞的作用:ARDS 的病理生理过程一般包括 3 个阶段。早期为渗出期,以弥漫性肺间质和肺泡水肿为主要特征,这一阶段与肺血管内皮细胞和肺泡上皮细胞损伤以及肺泡内炎症细胞的激活密切相关。约 1 周后进入第 2 阶段即增殖期,此时肺水肿减轻,出现 II 型肺泡上皮增生、胶原纤维沉积,炎性细胞及成纤维细胞浸润等改变。急性损伤后存活的患者有一部分进入第 3 阶段即慢性纤维化期。因此,阻止肺纤维的进展可改善 ARDS 患者预后。

研究表明,Epac 作为一种新兴的 cAMP 下游分子,对成纤维细胞增殖、应力性纤维形成以及上皮细胞黏附均有抑制作用,在遏制肺纤维化 (pulmonary fibrosis, PF) 发展的过程中扮演着重要角色,因此它有可能成为 PF 药物开发和治疗的新靶点。肺成纤维细胞负责胶原蛋白的生成和细胞外基质的沉积,与纤维化过程直接相关。转化生长因子 -  $\beta$  (transforming growth factor -  $\beta$ , TGF -  $\beta$ ) 是目前诱导成纤维细胞活化的最重要因子之一,在 TGF -  $\beta$  的刺激下,成纤维细胞表达  $\alpha$  - 平滑肌肌动蛋白和胶原蛋白,分化成更

具收缩力、增生性和分泌性的肌成纤维细胞。所有这些过程均涉及 Epac 和 PKA 的中介作用。

### 三、展望

炎症反应是 ARDS 的启动因素,炎症细胞可通过分泌细胞因子、氧自由基、蛋白水解酶等损伤肺泡上皮细胞和肺血管内皮细胞,而受损的上皮和内皮细胞通过分泌细胞因子和黏附分子,促进血小板、中性粒细胞以及巨噬细胞等在微血管聚集形成免疫血栓,失控的免疫血栓进一步加重炎症反应和凝血功能失衡,它们相互作用的恶性循环,最终导致 ARDS 的发生、发展。cAMP/Epac 信号通路的激活,具有抑制炎症反应,增强肺血管内皮屏障功能,保护肺上皮细胞,促进纤维蛋白溶解、抑制血栓形成以及抑制肺纤维化等作用。由此推测,在 ARDS 防治进程中,cAMP/Epac 信号通路有可能成为新的干预靶点。

### 参考文献

- 1 孙红双,吕菁君,魏捷.急性肺损伤发病机制及治疗的未来研究趋势[J].医学研究杂志,2016,45(1):181-183
- 2 Zaccolo M, Zerio A, Lobo MJ, *et al.* Subcellular organization of the cAMP signaling pathway [J]. *Pharmacol Rev*, 2020, 73(1): 278-309
- 3 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
- 4 Lee K. Epac: new emerging cAMP - binding protein [J]. *BMB Reports*, 2021, 54(3): 149-156
- 5 Wang XF, Song SD, Li YJ, *et al.* Protective effect of quercetin in LPS - induced murine acute lung injury mediated by cAMP - Epac pathway [J]. *Inflammation*, 2018, 41(3): 1093-1103
- 6 Wang X, Song S, Hu Z, *et al.* Activation of Epac alleviates inflammation and vascular leakage in LPS - induced acute murine lung injury [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 96: 1127-1136
- 7 Xing J, Birukova AA. ANP attenuates inflammatory signaling and Rho pathway of lung endothelial permeability induced by LPS and TNF- $\alpha$  [J]. *Microvasc Res*, 2010, 79(1): 56-62
- 8 Birukova AA, Meng F, Tian Y, *et al.* Prostacyclin post - treatment improves LPS - induced acute lung injury and endothelial barrier recovery via Rap1 [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852(5): 778-791
- 9 Jiang Y, Liu L, Curtiss E, *et al.* Epac1 blocks NLRP3 inflammasome to reduce IL - 1 $\beta$  in retinal endothelial cells and mouse retinal vasculature [J]. *Mediators Inflamm*, 2017, 2017: 2860956
- 10 Barker G, Parnell E, van Basten B, *et al.* The potential of a novel class of EPAC - selective agonists to combat cardiovascular inflammation [J]. *J Cardiovasc Dev Dis*, 2017, 4(4): 22
- 11 Wetschureck N, Strlic B, Offermanns S. Passing the vascular barrier: endothelial signaling processes controlling extravasation [J]. *Physiol Rev*, 2019, 99(3): 1467-1525

- 12 Cerutti C, Ridley AJ. Endothelial cell - cell adhesion and signaling [J]. *Exp Cell Res*, 2017, 358(1): 31-38
- 13 Luchowska - Stanska U, Morgan D, Yarwood SJ, *et al.* Selective small - molecule EPAC activators [J]. *Biochem Soc Trans*, 2019, 47(5): 1415-1427
- 14 Gunduz D, Troidl C, Tanislav C, *et al.* Role of PI<sub>3</sub>K/Akt and MEK/ERK signalling in cAMP/Epac - Mediated endothelial barrier stabilisation [J]. *Front Physiol*, 2019, 10: 1387
- 15 Yuan Y, Engler AJ, Raredon MS, *et al.* Epac agonist improves barrier function in iPSC - derived endothelial colony forming cells for whole organ tissue engineering [J]. *Biomaterials*, 2019, 200: 25-34
- 16 Wang Y, Liu YJ, Xu DF, *et al.* DRD1 downregulation contributes to mechanical stretch - induced lung endothelial barrier dysfunction [J]. *Theranostics*, 2021, 11(6): 2505-2521
- 17 Birukova AA, Zagranichnaya T, Fu P, *et al.* Prostaglandins PGE(2) and PGI(2) promote endothelial barrier enhancement via PKA - and Epac1/Rap1 - dependent Rac activation [J]. *Exp Cell Res*, 2007, 313(11): 2504-2520
- 18 Scheibner KA, Boodoo S, Collins S, *et al.* The adenosine a<sub>2a</sub> receptor inhibits matrix - induced inflammation in a novel fashion [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2009, 40(3): 251-259
- 19 Cao X, Li Y, Shi J, *et al.* The potentially therapeutic role of EPAC in curbing the process of idiopathic pulmonary fibrosis via differential cellular pathways [J]. *J Inflamm Res*, 2021, 14: 611-619
- 20 Young BM, Shankar K, Tho CK, *et al.* Laminin - driven Epac/Rap1 regulation of epithelial barriers on decellularized matrix [J]. *Acta Biomater*, 2019, 100: 223-234
- 21 Zuo H, Trombetta - Lima M, Heijink IH, *et al.* A - kinase anchoring proteins diminish TGF -  $\beta$ 1/cigarette smoke - induced epithelial - to - mesenchymal transition [J]. *Cells*, 2020, 9(2): 356
- 22 Oldenburger A, Poppinga WJ, Kos F, *et al.* A - kinase anchoring proteins contribute to loss of E - cadherin and bronchial epithelial barrier by cigarette smoke [J]. *Am J Physiol - Cell Ph*, 2014, 306(6): C585-C597
- 23 Kumar N, Gupta S, Dabral S, *et al.* Role of exchange protein directly activated by cAMP (EPAC1) in breast cancer cell migration and apoptosis [J]. *Mol Cell Biochem*, 2017, 430(1-2): 115-125
- 24 He X, Drelich A, Yu S, *et al.* Exchange protein directly activated by cAMP plays a critical role in regulation of vascular fibrinolysis [J]. *Life Sciences*, 2019, 221: 1-12
- 25 Chu W, Sun X, Zhu X, *et al.* Blockade of platelet glycoprotein receptor 1b ameliorates blood - brain barrier disruption following ischemic stroke via Epac pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 140: 111698
- 26 Xiao J, Zhang B, Su Z, *et al.* Intracellular receptor EPAC regulates von Willebrand factor secretion from endothelial cells in a PI<sub>3</sub>K - /eNOS - dependent manner during inflammation [J]. *J Biol Chem*, 2021, 297(5): 101315

(收稿日期: 2022-05-11)

(修回日期: 2022-06-08)