

细胞骨架和cAMP/PKA信号通路的互动效应调控 细胞行为的研究进展

黄帅帅 王宇多 王 萍*

(宁波大学医学院, 宁波大学转化医学中心; 浙江省病理生理学技术研究重点实验室, 宁波 315211)

摘要 细胞骨架的运动变化是一个多蛋白和多步骤参与的复杂过程。研究表明, 环状腺苷酸(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)作为第二信使, 参与调控多种细胞信号转导, 从而调控细胞骨架重排过程及其介导的细胞分裂、迁移、分化和黏附等。然而, 另有文献报道, 细胞骨架纤维排列首先通过影响信号通路中蛋白激酶的活性, 进而影响细胞行为。该文结合课题组的实验结果就细胞骨架和cAMP信号通路互动效应调控细胞行为的研究进展作一综述。

关键词 cAMP; 细胞骨架; 细胞行为; 信号通路

Interactive Effects Between Cytoskeleton and cAMP/PKA Signaling Pathway in Regulation of Cell Behavior

Huang Shuaishuai, Wang Yuduo, Wang Ping*

(Center for Translational Medicine, Ningbo University School of Medicine; Zhejiang Provincial Key Laboratory of Pathophysiology, Ningbo 315211, China)

Abstract Cytoskeleton arrangements are complex processes, which involved many proteins and multi-steps. Cytoskeleton rearrangement-mediated cell behaviors are regulated by the protein kinases in cAMP signaling pathway, whereas, the contrast results are showed in some reports. Combined with our research, this review summarized the interactive effects between cytoskeleton and cAMP signaling pathway in regulation of cell behavior.

Key words cAMP; cytoskeleton; cell behavior; signaling pathway

细胞骨架作为真核细胞中的动态蛋白纤维网状结构, 由微丝(microfilaments, MF)、微管(microtubules, MT)和中间纤维(intermediate filaments, IF)构成。MF是由肌动蛋白聚合而成的多聚体, 广泛存在于真核细胞应力纤维、黏着斑、伪足和收缩环中, 其结构组成单元球状肌动蛋白(globular actin, G-actin)在ATP和多种微丝相关蛋白的作用下, 通过与丝状肌动蛋白(filamentous actin, F-actin)不断组装和解聚的转换,

参与调控细胞形态改变、黏附、迁移和胞质分裂等行为。MT由 α -tubulin和 β -tubulin聚合组成, 在微管相关蛋白的作用下组装形成中空管状结构, 在细胞内物质运输与胞质分裂中扮演重要角色。早期研究认为, MF和MT在细胞中发挥的功能相对独立。然而近年来大量文献表明, MF和MT细胞骨架相互联系、相互依赖, 共同参与调控细胞行为。MT的重排影响黏着斑和应力纤维结构的装配^[1], MT受解聚

收稿日期: 2014-02-19 接受日期: 2014-03-24

国家自然科学基金(批准号: 81071653、81372209)和浙江省自然科学基金(批准号: LY13H160038)资助项目

*通讯作者。Tel: 0574-87609595, E-mail: pinoav@hotmail.com

Received: February 19, 2014 Accepted: March 24, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81071653, 81372209) and the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (Grant No.LY13H160038)

*Corresponding author. Tel: +86-574-87609595, E-mail: pinoav@hotmail.com

网络出版时间: 2014-07-01 16:44

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.07.0047.html>

剂诺考达唑(nocodazole)的强力解聚导致巨噬细胞中伪足结构的破坏^[2]。Shirasaka等^[3]为了研究MF和MT在破骨细胞中的作用,观察到MF大量聚集于破骨细胞的褶皱边缘,而正常情况下MT有两种分布形态:一种是从微管组织中心(microtubule organizing center, MOTC)向细胞四周发射的丝状网络结构,另一种则是与肌动蛋白丝形成环状分布于细胞外围,包绕着整个细胞;然而有趣的是, MF破坏剂cytochalasin D处理细胞后,分布于细胞基质的MT丝状网络结构聚集形成环状结构,而环绕于细胞外围的MT结构发生破坏;使用MT解聚剂作用于破骨细胞后, MF和MT结构均发生明显破坏。由此可见, MF和MT结构网络在维持细胞行为中密不可分。

MF和MT不仅在稳定细胞形态、承受外力刺激、维持细胞内部结构有序性中起重要作用,而且还参与调控细胞迁移、黏附、分裂以及细胞内信号传递。其中, cAMP介导的信号通路 with 细胞骨架之间存在的互动效应与细胞增殖、凋亡、黏附、迁移等细胞行为密切相关, cAMP依赖的蛋白激酶A(cAMP-dependent protein kinase, PKA)作为cAMP依赖的主要靶向蛋白,参与了这些过程。研究发现, cAMP/PKA信号与肿瘤发生发展密切相关,并且参与介导缺氧环境诱导的肿瘤细胞上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程^[4]。然而, Huynh等^[5]发现, PKA参与介导肿瘤抑制因子TGF β 抑制的早期肿瘤转移和浸润过程。Mckenzie等^[6]在研究中发现, 迁移的卵巢癌SKOV-3 EOC细胞伪足前缘部位有大量的活性PKA聚集;然而, PKA活性抑制剂H89作用后, 细胞迁移显著性下调;进一步通过三维细胞外基质培养模型(three-dimensional extracellular matrix)证明, PKA锚定于伪足前缘并且呈活化状态是维持细胞迁移运动所必需的。Tkachenko等^[7]的研究进一步阐述了PKA介导的伪足收缩运动机制,他们认为, PKA通过磷酸化作用激活RhoA, RhoA激活后除了进一步激活下游通路外,还增强与Rho二磷酸鸟苷解离抑制因子(Rho guanosine diphosphate dissociation inhibitor, RhoGDI)的结合能力,从而反向抑制RhoA活性。因此,这种调控RhoA活性的平衡机制为调控迁移细胞行为奠定基础。此外,小RNA技术抑制PKA基因表达,细胞减数分裂期纺锤丝遭破坏,细胞周期受阻,诱导细胞走向凋亡^[8-9]。

我们的前期研究发现,抗肿瘤药物通过诱导

凋亡细胞内Ca²⁺内流,调控细胞骨架MF的解聚和质膜下“环状”MT结构的形成^[10],抑制cAMP/PKC/MARK/CREB信号通路,从而抑制其下游蛋白cyclin A、cyclin D1和Bcl-2基因的表达^[11-12],抑制细胞增殖和侵袭能力^[13],最终诱导细胞凋亡;同时,细胞骨架actin和tubulin亚型基因的表达也被显著抑制^[14](图1)。由此可见, cAMP和细胞骨架纤维排列之间存在紧密的联系。本文就cAMP信号通路 with 细胞骨架纤维排列之间的互动效应作一综述。

1 cAMP/PKA信号通路对细胞骨架的调控

1.1 PKA结构

PKA是由两个催化亚基(PKA-cat)和两个调节亚基(PKA-reg)组成的变构酶。细胞未受刺激时, PKA-cat与PKA-reg结合, PKA活性受抑制;细胞受刺激后,第二信使cAMP与PKA-reg结合并通过构型改变释放PKA-cat,从而实现其催化作用^[15]。PKA调节的活性十分广泛,尤其是对MF、MT和细胞骨架相关蛋白的调节^[16]。

1.2 cAMP/PKA/MLC途径

肌球蛋白轻链(myosin light chain, MLC)在细胞形态改变、细胞运动和肌肉收缩中扮演重要的作用。MLC受肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase, MLCK)和Rho相关卷曲螺旋形成蛋白激酶(Rho associated coiledcoil forming protein kinase, ROCK)磷酸化,通过与F-actin相互作用,参与诱导应力纤维形成和黏着斑装配,从而调控细胞内伪足运动^[17-18]。有研究表明, cAMP/PKA信号通过调节MLCK和ROCK活性,参与调控MLC介导的细胞运动。一方面, cAMP/PKA信号通过磷酸化 β -磷脂酶C(β -PLC),抑制三磷酸肌醇(inositol 1,4,5-triphosphate, IP3)受体活性,参与调节细胞内Ca²⁺释放,从而形成Ca²⁺/钙调素,结合并上调MLCK活性,最终诱导MLC磷酸化水平上调^[19];另一方面, cAMP介导的PKA激活也可以通过抑制RhoA活性,下调其下游效应分子ROCK的活性,从而抑制MLC的去磷酸化^[20]。因此, MLCK和ROCK活性受PKA信号调控,通过调节MLC磷酸化水平影响其介导的细胞骨架运动。

Bogatcheva等^[21-22]在研究MLC与内皮细胞通透性之间的关系时发现,脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)通过诱导MLC磷酸化,促进细胞通透性增加,下调诱导内皮屏障功能;然而,小RNA技术沉默

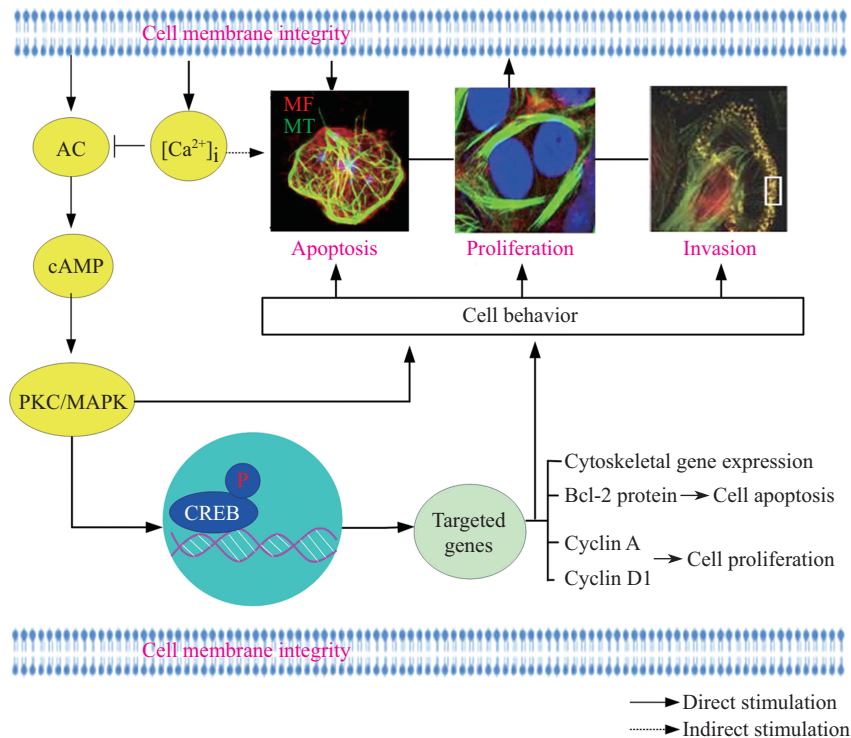


图1 CREB介导的细胞行为
Fig.1 CREB mediated cell behavior

*MLCK*或*ROCK2*基因表达后, *MLC*磷酸化水平下调, 内皮细胞通透性也显著性下调, 因此, 他们初步认为LPS通过*MLCK*和*ROCK2*激活*MLC*调控细胞骨架重排, 下调内皮细胞通透性, 从而增强内皮细胞屏障功能; 进一步研究发现, *AC/PKA*激活剂逆转了LPS诱导的上述过程。由此可见, *cAMP/PKA*信号通过调控*MLCK*或*ROCK*活性, 进而改变*MLC*磷酸化水平, 激发细胞骨架重排, 促进内皮细胞屏障功能。

1.3 *cAMP/PKA/ Rac1*途径

*Rac 1*参与调控生长因子诱导的actin细胞骨架动态平衡, 诱导膜突触与片状伪足的形成^[23]。为了研究*Rac 1*介导的细胞骨架重排机制, Logue等^[24]使用免疫荧光技术标记HEK 293细胞内的F-actin, 发现只有在 Ca^{2+} 升高到一定浓度时, 受A型激酶锚定蛋白(A-kinase anchoring protein, AKAP)锚定的PKA才会参与磷酸化含IQ基元的GTP酶激活蛋白2(IQ motif containing GTPase activating protein 2, IQGAP2), 招募*Rac 1*蛋白参与形成PKA/IQGAP2/*Rac 1*信号复合体, 从而调节actin细胞骨架。

*Rac1*蛋白虽然不受PKA的直接磷酸化, 但PKA可以通过其作用底物蛋白酪氨酸磷酸酶(PTP-PEST)

活性的改变来调节*Rac1*活性^[25-26]。Sastry等^[25]在研究中发现, 成纤维细胞中PTP-PEST过表达后*Rac1*活性下调, 从而抑制血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)诱导的细胞膜突触形成和细胞流动性增加。Espejo等^[26]在此基础上进一步研究发现, *PTP-PEST*基因敲除后, *Rac1*活性显著性增加, 细胞的迁移能力增强, 细胞之间的黏着连接减弱; 相反, *PTP-PEST*过表达则抑制*Rac1*的活性, 从而抑制上皮细胞运动。因此认为, PKA通过调节PTP-PEST, 从而调节*Rac1*介导的细胞骨架改变。

此外, 最新研究表明, 除了PTP-PEST, PKA还可以通过刺激P21活化激酶(p21-activated kinase, PAK)来调节*Rac1*活性^[27-28]。PAK作为一种丝氨酸/苏氨酸激酶, 在肿瘤组织中呈高表达状态, 其N-端的CRIB结构域受Cdc42/*Rac1*活化, 诱导肿瘤细胞骨架纤维重组, 并促进细胞浸润和转移^[29]。蔡松旺等^[30]为了研究PAK在肺癌A549细胞侵袭及迁移中的作用, 使用小RNA干扰技术抑制细胞内PAK基因表达, 发现细胞骨架应力纤维丝明显减少, actin皱缩, 癌细胞的扩散和侵袭能力下调。此外, Baumer等^[31]和Del等^[32]发现, $\beta 1$ -PAK交换因子($\beta 1$ -PAK-interacting exchange

factor, $\beta 1$ -Pix)通过与PAK结合后形成复合体, 激活下游分子Cdc-42和Rac1, 诱导丝状伪足形成, 从而介导肿瘤细胞的扩散和侵袭。Chahdi等^[27]使用定点突变载体W43K(丧失与PAK结合能力的 $\beta 1$ -Pix SH3m)和L238R/L239S(丧失GEF活性的 $\beta 1$ -Pix DHm)处理人肾小球系膜HMC细胞, 发现Cdc-42和Rac1蛋白均不能被激活, 进一步通过PKA定点突变位点研究发现, PKA通过磷酸化 $\beta 1$ -Pix Ser-516与Thr-526位点, 从而结合PAK发挥功能。这些结果表明, PAK受PKA活化并通过调控其下游分子Rac1, 在肿瘤细胞的浸润和转移中发挥重要作用。

1.4 cAMP/PKA/RhoA途径

Ras同源基因家族成员A(Ras homolog gene family member A, RhoA)作为一个小GTP酶蛋白, 通过激活其下游激酶ROCK信号, 参与调控细胞伪足运动, 从而诱导细胞迁移^[33]。

RhoA诱导的细胞迁移与MF重排密切相关。早期研究报道, RhoA在细胞迁移中参与调控细胞应力纤维的形成, 其Ser-188位点可以直接受PKA磷酸化。新近文献表明, PKA抑制细胞内应力纤维的聚合和组装, 从而诱导细胞形态和运动的改变, 然而, 这种作用被G14V RhoA组成型激活突变体所逆转^[34-35]。Jones等^[36]在研究中发现, 前列腺癌上皮细胞中, PKA介导的RhoA Ser-188磷酸化诱发神经内分泌样表型(neuroendocrine-like phenotype)快速分化; 然而, 这种变化受ROCK抑制剂Y-27632所逆转。他们因此认为, PKA通过磷酸化RhoA Ser-188位点抑制RhoA活性, 从而进一步抑制ROCK活性, 最终诱导前列腺肿瘤上皮细胞分化成神经内分泌样表型。Jia等^[37]在研究植物雌激素染料木黄酮改善血管内皮细胞发生功能的分子机制中发现, 该药物显著性抑制了thrombin诱导的cAMP水平下调、MLC磷酸化水平增加和应力纤维形成, 从而下调单层内皮细胞通透性, 维护内皮细胞屏障功能; 然而, 这些作用被RhoA或ROCK抑制剂所逆转。他们因此认为, 木黄酮通过刺激cAMP/PKA信号, 从而抑制RhoA/ROCK活性, 最终逆转thrombin诱导的内皮细胞紊乱功能。这些报道表明, RhoA/ROCK信号在PKA调控细胞行为改变过程中扮演了重要角色。

深入研究发现, 在迁移细胞中RhoA活化并向细胞膜褶皱样运动部位聚集, 活化的RhoA通过调节下游底物ROCK的活性, 从而激活单丝氨酸蛋白激

酶(LIM kinase, LIMK), 最终激活丝切蛋白(cofilin), 介导应力纤维聚合和组装^[38-39]。Aslam等^[20]发现, cAMP/PKA通过抑制CPI-17和RhoA/ROCK信号分子, 激活MLCK, 调节MLC去磷酸化, 进而抑制内皮细胞收缩, 增强内皮细胞屏障功能。深入研究发现, 血浆中介素(intermedin)通过下调人脐静脉内皮细胞HUVECs的RhoA/ROCK通路的活性, 进而诱导MLC磷酸化和应力纤维丝的减少, 导致内皮细胞屏障功能的失活。由此可见, cAMP/PKA通过RhoA/ROCK信号通路介导了细胞的收缩抑制。

1.5 cAMP/PKA/VASP途径

血管扩张刺激磷蛋白(vasodilator-stimulated phosphoprotein, VASP)是Ena/VASP蛋白家族的主要成员, 作为一种肌动蛋白结合蛋白, 通过参与肌动蛋白丝的解聚和聚合, 介导细胞迁移和黏着等过程。王婷婷等^[40]报道, VASP主要位于细胞间连接处、黏着连接处以及细胞膜上动态性较高的区域, 参与调节细胞骨架相关的各种细胞行为, 如成纤维细胞的迁移、血小板的聚集和神经细胞轴突的形成等。

VASP作为PKA的一个重要底物, 在actin细胞骨架重塑和细胞迁移中扮演重要角色。Zhang等^[41]在研究PKA调控的VASP在细胞迁移中的作用机制中发现, 趋化因子PDGF通过磷酸化VASP Ser157位点激活VASP, 并且伴随着PKA的激活和内皮细胞迁移率的显著性上调; 然而, 转染VASP-S157A后逆转了上述现象, 因此, 他们初步认为, PDGF通过激活PKA, 进而增加VASP磷酸化水平, 促进细胞迁移。通过免疫荧光技术进一步发现, 片状伪足数量显著增加, VASP大量聚集于迁移细胞片状伪足前缘, 若破坏PKA和AKAP的结合, PDGF诱导的这些现象被逆转。因此, 他们认为, PKA与AKAP结合并活化, 促进VASP磷酸化和定位于伪足前缘, 参与介导PDGF诱导的内皮细胞迁移。由此可见, VASP在PKA介导的细胞行为调控中发挥重要作用。

Lee等^[42]为了研究VASP在二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)诱导胶质细胞膜褶皱样运动和趋化性中的作用, 首先使用ADP作用于胶质细胞, 发现ADP能够快速上调细胞内的cAMP水平, 并且诱导VASP的Ser-153位点磷酸化, 同时伴随着胶质细胞膜褶皱样运动的形成和趋化性增强。其次, 他们分别使用PKA抑制剂H89和PKA信号通路激动剂forskolin作用于BV2胶质细胞, 发现H89可显著抑制VASP

的磷酸化和细胞趋化性;相反, forskolin活化PKA后, VASP的磷酸化水平升高, 细胞膜褶皱样运动和趋化性显著下调。最后, 他们通过小RNA技术沉默*VASP*基因表达, 发现ADP诱导的细胞膜褶皱样运动被显著抑制, 表明VASP受PKA磷酸化调控, 在ADP诱导的细胞膜褶皱样运动的形成和趋化性中起重要作用。

Lebrand等^[43]为了研究Ena/VASP蛋白在片状伪足和丝状伪足形成中所发挥的作用, 首先根据Ena/VASP蛋白的EVH1结构域, 构建与其特异性结合的FP4配体基元载体, 并在此基础上分别构建FP4-Mito(将胞内Ena/VASP移位至线粒体)、FP4-CAAX(将胞内Ena/VASP移位至细胞膜)和AP4-Mito突变载体(FP4的苯丙氨酸位点突变成丙氨酸, 丧失功能), 转染至海马神经元细胞并通过免疫荧光定位观察。结果发现, FP4-Mito转染后, 细胞丝状伪足和actin肌动蛋白丝数量与野生型相比均显著下调, 而在FP4-CAAX转染后效果相反; 进一步研究发现, AP4-Mito转染后促进forskolin诱导的丝状伪足生长, 相反, FP4-Mito处理后呈现抑制作用。由此可见, Ena/VASP参与PKA介导的actin细胞骨架网络调控。

1.6 cAMP/PKA/LASP1途径

LIM与SH3结构域蛋白1(LIM and SH3 protein 1, LASP1)作为一个肌动蛋白结合蛋白, 其Ser-146位点受cAMP/PKA信号磷酸化, 参与调控细胞骨架纤维排列^[44]。Zhang等^[45]在研究中发现, 通过基因敲除技术构建*LASP1*^{-/-}基因敲除小鼠模型, 该模型小鼠与对照组*LASP1*(+/+)相比, 损伤修复能力与肿瘤形成能力较强, 并且来源于*LASP1*^{-/-}小鼠的成纤维细胞(embryonic fibroblasts, MEFs)在体外培养时迁移能力与贴壁能力显著增强, 黏着蛋白表达水平显著升高。因此, 他们认为, *LASP1*在MF介导的细胞黏着和迁移过程中, 存在负性调节作用。Butt等^[46]为了研究*LASP1*和细胞转移之间的关系, 通过构建*LASP1* S146D模拟磷酸化突变体, 转染至乳腺癌PTK-2细胞系后, 再通过细胞迁移实验发现, *LASP1* S146D模拟磷酸化突变体导入的细胞迁移率与对照组相比下调了25%。进一步研究发现, *LASP1* S146D模拟磷酸化突变体转染的细胞株, *LASP1*蛋白从伪足前缘和黏着连接处迁移至胞质溶胶。Keicher等^[47]在研究*LASP1*和PKA的关系时也发现了类似的现象, 他们使用PKA激活剂处理PTK-2细胞后发现, *LASP1*

蛋白从黏着连接处移位至胞质溶胶, 而肌动蛋白丝排列结构并未发生任何改变; 此外, 他们通过构建*LASP1* T156E模拟磷酸化突变体, 转染至细胞后发现, *LASP1*与F-actin的结合能力显著下降。综上所述, *LASP1*受PKA磷酸化, 从而通过改变其细胞内定位, 发挥细胞骨架重组和细胞迁移的功能。

*LASP1*还可以与黏着斑蛋白Krp或细胞骨架结合蛋白palladin结合, 从而介导伪足生长和细胞迁移运动。Spence等^[48]在研究中发现, 缺失SH3结构域的*LASP1*突变体细胞, 其伪足长度与对照相比显著缩短, 并且不能参与延伸运动, 细胞的迁移能力显著性下降; 有趣的是, 通过小RNA干扰技术沉默*Krp1*或者*LASP1*基因表达后也发生了上述现象; 通过免疫荧光技术进一步研究发现, *Krp1*和*LASP1*结合并聚集于富含F-actin的区域。因此, 他们推测, *LASP1*通过其SH3结构域与Krp结合, 参与调控细胞的伪足延伸运动。Rachlin等^[49]在研究中发现, *LASP1*通过和actin相关蛋白palladin相互作用, 介导细胞形态变化和细胞运动。他们使用小RNA技术沉默*palladin*基因表达, 发现*LASP1*聚集于黏着斑, 而不能与肌动蛋白丝相结合, 伪足的延伸运动也受抑制。由此可见, *LASP1*通过与palladin结合, 介导伪足生长和细胞迁移运动。

1.7 cAMP/PKA/adducin途径

内收蛋白(adducin)作为一种细胞膜骨架蛋白, 与血影蛋白spectrin-actin复合体具有较强的结合活性, 并且被认为是spectrin-actin介导的细胞膜骨架组装的调控蛋白^[50]。研究表明, 内收蛋白受PKA磷酸化后能够阻断肌动蛋白的聚合, 扮演着类似封端蛋白的功能。Matsuoka等^[51]为了研究内收蛋白介导的蛋白激酶调控actin细胞骨架的机制, 通过体外实验证明PKA和PKC均能磷酸化内收蛋白; 进一步研究发现, PKA磷酸化内收蛋白后可显著下调内收蛋白与胞衬蛋白fodrin/actin复合体的结合活性, 并促进胞衬蛋白与actin的相互作用, 而PKC磷酸化内收蛋白后却无此功能。因此, PKA通过磷酸化内收蛋白抑制其与胞衬蛋白形成复合体, 从而增强了spectrin与F-actin的结合作用。

1.8 cAMP/PKA/ $\alpha 4$ integrin 途径

$\alpha 4$ 整合素($\alpha 4$ integrin)作为一种介导细胞核与细胞外基质连接的跨膜受体, 通过与细胞骨架桩蛋白(paxillin)等配体作用, 介导细胞迁移运动。Liu等^[52]

研究发现, $\alpha 4$ 整合素细胞质内结构域与信号受体蛋白整合素结合, 诱导细胞骨架MF纤维排列发生改变, 显著上调细胞迁移率。然而, 破坏 $\alpha 4$ 整合素和桩蛋白复合体后, 细胞迁移能力显著下调。Han等^[53]在研究 $\alpha 4$ 整合素和细胞迁移的关系时发现, $\alpha 4$ 整合素Ser-988位点参与调控其与桩蛋白的结合。他们通过构建 $\alpha 4$ 整合素模拟磷酸化突变体 $\alpha 4$ 整合素S988D, 转染细胞后发现, $\alpha 4$ 整合素和桩蛋白的结合能力下调, 迁移能力受抑制。因此, $\alpha 4$ 整合素受磷酸化调节后与桩蛋白的结合活性下调, 最终抑制细胞迁移。

Goldfinger等^[54]在此基础上经过深入研究发现, $\alpha 4$ 整合素受PKA磷酸化后, 聚集于迁移细胞前缘伪足, 并且与桩蛋白的结合活性显著下调, 细胞迁移能力增强。他们首先使用特异性的磷酸化 $\alpha 4$ 整合素抗体, 发现荧光主要聚集于迁移细胞前缘伪足中, 而非磷酸化的 $\alpha 4$ 整合素蛋白则随机分布于整个细胞体和伪足中。其次, 他们通过构建负显性突变体 $\alpha 4$ 整合素(S988A)抑制其磷酸化水平, 发现伪足延伸至划痕处的细胞数显著下降, 细胞迁移率显著下调; 同时, 使用PKA活性抑制剂Rp-cAMP或者H89处理正常细胞株, 磷酸化的 $\alpha 4$ 整合素蛋白表达量显著下调, 然而, 在Rp-cAMP或者H89处理表达负显性突变体 $\alpha 4$ 整合素(S988A)的细胞株中却未发现此现象。最后, 他们通过 $\alpha 4$ 整合素和桩蛋白共染色进一步发现, 桩蛋白与 $\alpha 4$ 整合素共同定位于侧向边缘区(lateral edge)和尾部边缘区(trailing edge); 有趣的是, 桩蛋白并未定位于磷酸化 $\alpha 4$ 整合素聚集的伪足前缘(leading edge); 最后, 他们通过构建融合蛋白技术证明, $\alpha 4$ 整合素受磷酸化后抑制其与桩蛋白的结合活性, 从而促进细胞迁移。因此, PKA通过磷酸化作用使 $\alpha 4$ 整合素从 $\alpha 4$ 整合素/桩蛋白复合体中释放, 转移至伪足前缘, 在细胞迁移中扮演着十分重要的角色。

1.9 cAMP/PKA/MAP4途径

有研究表明, 微管相关蛋白4(microtubule-associated protein 4, MAP4)促进MT组装, 在细胞分裂间期抑制MT解聚。MAP4作为微管相关蛋白, 具有促进MT组装和聚合的功能^[55]。MAP4受PKA磷酸化后与MT的结合能力下降, 导致MT稳定性的破坏。Ou等^[56]的最新研究表明, 膀胱癌的恶性程度与MAP4的表达水平呈正相关。为了进一步研究MAP4与膀胱癌转移之间的关系, 使用cAMP激活剂dbcAMP作用于人膀胱癌细胞T24和UM-UC-3细胞, 通过划痕实验发

现, 细胞转移和侵袭能力显著下调, MT骨架网路破坏, 同时发现MAP4磷酸化水平升高; 然而上述现象被PKA或者MAP4的小RNA干扰作用所逆转。因此, cAMP/PKA信号通过磷酸化MAP4, 从而导致MT细胞骨架网络破坏, 抑制膀胱癌细胞转移和侵袭能力。

1.10 cAMP/PKA/DCX途径

双皮质素(doublecortin, DCX)作为微管相关蛋白, 在体内和体外实验中已被发现具有稳定MT、导致MT聚合的作用^[57]。Toriyama等^[58]在研究中发现, PKA促进神经迁移, 在此过程中受DCX所介导。进一步研究发现, PKA激活剂处理后, DCX Ser-47位点磷酸化, 伴随着与MT的结合能力下降, 细胞迁移能力增加。因此认为, PKA通过促进DCX磷酸化, 降低DCX与MT的结合能力, 从而促进细胞迁移。

然而, 我们的研究发现, PKA并不参与凋亡细胞内特殊MT结构的形成。凋亡细胞内 β -tubulin聚集于细胞质膜下方, 形成环状MT结构并且包绕着凋亡小体和片段化的细胞核^[14]; 其次, Ca^{2+} 内流参与调节凋亡细胞内特殊环状MT结构的形成; 最后, Ca^{2+} 内流抑制了AC活性和cAMP水平, 然而, 这种抑制现象被PKC激活剂而非PKA激活剂所逆转^[10]。由此可见, 细胞内cAMP/PKC, 而非cAMP/PKA信号在细胞凋亡和增殖中起重要作用。

2 细胞骨架纤维排列对cAMP/PKA信号通路的影响

传统观点认为, 细胞内信号分子通过调控细胞骨架及其蛋白基因, 从而改变细胞骨架的组成成分和装配方式, 最终诱导细胞骨架网络发生改变。然而, 与传统观点不同的是, 细胞骨架MF纤维排列和相关蛋白的改变能影响细胞内cAMP/PKA信号通路。细胞骨架结构受解聚剂破坏后, 伴随着cAMP/PKA下游效应分子的变化, 然而, 这种变化通常只受MF纤维排列的影响, MT完整性的破坏并不起作用。COOK等^[59]为了研究MF和MT对表皮角化细胞(normal human epidermal keratinocytes, NHEK)中层黏连蛋白B2(laminin B2)的影响, 分别使用MF解聚剂(cytochalasin D)和MT解聚剂(nocodazole)作用于NHEK细胞, 发现只有cytochalasin D作用后, laminin B2合成显著增加, 而MT解聚剂加入无影响。因此, MF细胞骨架纤维排列的破坏影响laminin B2的合成和分泌, 而MT细胞骨架并无影响。

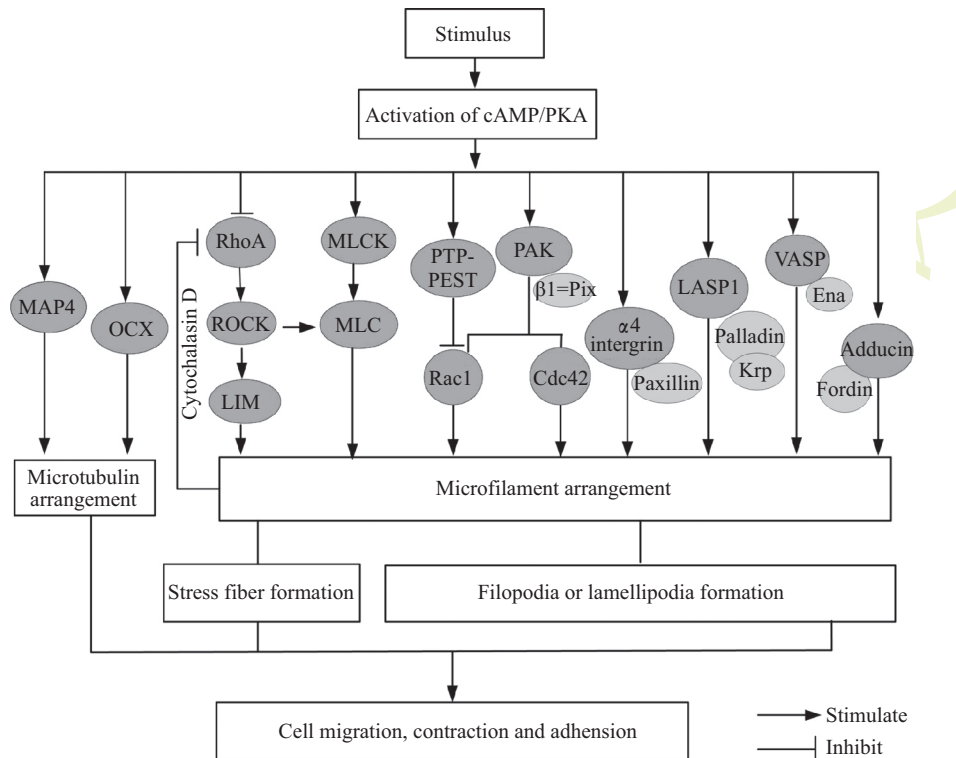


图2 cAMP信号通路调控的细胞骨架相关蛋白在细胞迁移、收缩和黏附中的作用

Fig.2 Effects of cAMP-mediated cytoskeleton related protein on cell migration, contraction and adhesion

不同的细胞骨架状态对cAMP/PKA/RhoA/ROCK信号具有反馈调节作用。Bhadriraju等^[60]在研究中发现,细胞骨架张力状态的改变通过刺激cAMP/PKA/RhoA/ROCK信号通路,介导MLC磷酸化水平改变。他们使用蛋白印章技术在聚二甲基硅氧烷材质(polydimethylsiloxane, PDMS)的小皿中,加入微量纤连蛋白,制作一些供悬浮细胞黏附、但不足以使细胞完全铺展的“微型小岛”,用以限制细胞骨架张力。结果发现,细胞骨架张力受限制时,ROCK活性和MLC磷酸化水平均呈较低状态,然而,若使细胞充分铺展,ROCK与肌球蛋白活性恢复至正常水平。深入研究发现,细胞骨架张力破坏剂(cytochalasin D或blebbistatin)处理后,ROCK活性受抑制,然而这个过程并没有被组成型突变载体RhoA-V14的转染所逆转。由此可见,细胞骨架张力和RhoA/ROCK信号之间存在反馈调节机制,在细胞外力与细胞内化学信号的转化中起重要作用。我们的前期研究表明,使用cytochalasin D破坏MF细胞骨架后,RhoA活性显著性下调;相反,我们使用RhoA负显性抑制剂RhoAT19N降低活化的RhoA水平,发现细胞骨架排列无明显改变。因此,细胞骨架纤维排列的改变对RhoA信号通路具有直接调控作用。

综上所述,细胞骨架MF纤维排列改变对cAMP/PKA信号通路具有负性调控作用。

3 小结与展望

cAMP/PKA作为一条既保守又经典的信号通路,通过调控多种下游通路介导细胞迁移、收缩和黏附等细胞行为(图2)。不同通路之间相互交联,构成缤纷复杂的调控体系,然而,这些交联的调控作用最终指向了以MF和MT为基础的骨架网络,参与调控肿瘤细胞的发生、发展过程;同时,细胞骨架排列改变对细胞骨架调控蛋白及其信号通路也具有反馈调节作用。因此,深入研究肿瘤发生、发展过程中AMP和细胞骨架之间的互动效应,并分析其对癌症靶向研究的分子机制,将为探索疾病的分子机制奠定基础,同时也为人类寻找克服相关疾病的靶向药物提供新思路。

参考文献 (References)

- 1 Kaverina I, Krylyshkina O, Small JV. Microtubule targeting of substrate contacts promotes their relaxation and dissociation. *J Cell Biol* 1999; 146(5): 1033-44.
- 2 Linder S, Hufner K, Wintergerst U, Aepfelbacher M. Microtubule-dependent formation of podosomal adhesion structures in

- primary human macrophages. *J Cell Sci* 2000; 113(23): 4165-76.
- 3 Shirasaka Y, Kawasaki M, Sakane T, Omatsu H, Moriya Y, Nakamura T, *et al.* Induction of human P-glycoprotein in Caco-2 cells: Development of a highly sensitive assay system for P-glycoprotein-mediated drug transport. *Drug Metab Pharmacokinet* 2006; 21(5): 414-23.
- 4 Shaikh D, Zhou Q, Chen T, Ibe JC, Raj JU, Zhou G. cAMP-dependent protein kinase is essential for hypoxia-mediated epithelial-mesenchymal transition, migration, and invasion in lung cancer cells. *Cell Signal* 2012; 24(12): 2396-406.
- 5 Huynh QK, Wise SJ, Koch KA, Castonguay LA, Reid BG, Pagratis EE, *et al.* Screening and identification of a novel class of TGF-beta type 1 receptor kinase inhibitor. *J Biomol Screen* 2011; 16(7): 724-33.
- 6 McKenzie AJ, Campbell SL, Howe AK. Protein kinase A activity and anchoring are required for ovarian cancer cell migration and invasion. *PLoS One* 2011; 6(10): e26552.
- 7 Tkachenko E, Sabouri-Ghomi M, Pertz O, Kim C, Gutierrez E, Machacek M, *et al.* Protein kinase A governs a RhoA-RhoGDI protrusion-retraction pacemaker in migrating cells. *Nat Cell Biol* 2011; 13(6): 660-7.
- 8 Hensley HH, Hannoun-Levi JM, Hachem P, Mu Z, Stoyanova R, Khor LY, *et al.* PKA knockdown enhances cell killing in response to radiation and androgen deprivation. *Int J Cancer* 2011; 128(4): 962-73.
- 9 Duncan FE, Moss SB, Williams CJ. Knockdown of the cAMP-dependent protein kinase (PKA) type Ialpha regulatory subunit in mouse oocytes disrupts meiotic arrest and results in meiotic spindle defects. *Dev Dyn* 2006; 235(11): 2961-8.
- 10 Wang P, Xu S, Zhao K, Xiao B, Guo J. Increase in cytosolic calcium maintains plasma membrane integrity through the formation of microtubule ring structure in apoptotic cervical cancer cells induced by trichosanthin. *Cell Biol Int* 2009; 33(11): 1149-54.
- 11 Wang P, Xu J, Zhang C. CREB, a possible upstream regulator of Bcl-2 in trichosanthin-induced HeLa cell apoptosis. *Mol Biol Rep* 2010; 37(4): 1891-6.
- 12 Wang P, Yan H, Li JC. CREB-mediated Bcl-2 expression in trichosanthin-induced Hela cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 363(1): 101-5.
- 13 Jiang Q, Bai T, Shen S, Li L, Ding H, Wang P. Increase of cytosolic calcium induced by trichosanthin suppresses cAMP/PKC levels through the inhibition of adenylyl cyclase activity in HeLa cells. *Mol Biol Rep* 2011; 38(4): 2863-8.
- 14 Wang P, Li JC. Trichosanthin-induced specific changes of cytoskeleton configuration were associated with the decreased expression level of actin and tubulin genes in apoptotic Hela cells. *Life Sci* 2007; 81(14): 1130-40.
- 15 Caretta A, Mucignat-Caretta C. Protein kinase A in cancer. *Cancers (Basel)* 2011; 3(1): 913-26.
- 16 Howe AK. Regulation of actin-based cell migration by cAMP/PKA. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1692(2/3): 159-74.
- 17 Wilson CA, Tsuchida MA, Allen GM, Barnhart EL, Applegate KT, Yam PT, *et al.* Myosin II contributes to cell-scale actin network treadmilling through network disassembly. *Nature* 2010; 465(7296): 373-7.
- 18 Butt T, Mufti T, Humayun A, Rosenthal PB, Khan S, Molloy JE. Myosin motors drive long range alignment of actin filaments. *J Biol Chem* 2010; 285(7): 4964-74.
- 19 Sriwai W, Zhou H, Murthy KS. G(q)-dependent signalling by the lysophosphatidic acid receptor LPA(3) in gastric smooth muscle: Reciprocal regulation of MYPT1 phosphorylation by Rho kinase and cAMP-independent PKA. *Biochem J* 2008; 411(3): 543-51.
- 20 Aslam M, Hartel FV, Arshad M, Gunduz D, Abdallah Y, Sauer H, *et al.* cAMP/PKA antagonizes thrombin-induced inactivation of endothelial myosin light chain phosphatase: Role of CPI-17. *Cardiovasc Res* 2010; 87(2): 375-84.
- 21 Bogatcheva NV, Zemskova MA, Kovalenkov Y, Poirier C, Verin AD. Molecular mechanisms mediating protective effect of cAMP on lipopolysaccharide (LPS)-induced human lung microvascular endothelial cells (HLMVEC) hyperpermeability. *J Cell Physiol* 2009; 221(3): 750-9.
- 22 Bogatcheva NV, Zemskova MA, Poirier C, Mirzapoiazova T, Kolosova I, Bresnick AR, *et al.* The suppression of myosin light chain (MLC) phosphorylation during the response to lipopolysaccharide (LPS): Beneficial or detrimental to endothelial barrier? *J Cell Physiol* 2011; 226(12): 3132-46.
- 23 Tsang SM, Brown L, Gadmor H, Gammon L, Fortune F, Wheeler A, *et al.* Desmoglein 3 acting as an upstream regulator of Rho GTPases, Rac-1/Cdc42 in the regulation of actin organisation and dynamics. *Exp Cell Res* 2012; 318(18): 2269-83.
- 24 Logue JS, Whiting JL, Scott JD. Sequestering Rac with PKA confers cAMP control of cytoskeletal remodeling. *Small GTPases* 2011; 2(3): 173-6.
- 25 Sastry SK, Lyons PD, Schaller MD, Burridge K. PTP-PEST controls motility through regulation of Rac1. *J Cell Sci* 2002; 115(Pt 22): 4305-16.
- 26 Espejo R, Rengifo-Cam W, Schaller MD, Evers BM, Sastry SK. PTP-PEST controls motility, adherens junction assembly, and Rho GTPase activity in colon cancer cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; 299(2): C454-63.
- 27 Chahdi A, Miller B, Sorokin A. Endothelin 1 induces beta 1Pix translocation and Cdc42 activation via protein kinase A-dependent pathway. *J Biol Chem* 2005; 280(1): 578-84.
- 28 Manchanda PK, Jones GN, Lee AA, Pringle DR, Zhang M, Yu L, *et al.* Rac1 is required for Prkar1a-mediated NF2 suppression in Schwann cell tumors. *Oncogene* 2013; 32(30): 3491-9.
- 29 贺丽芳, 张国君. p21活化激酶4与肿瘤的研究进展. 国际肿瘤学杂志(He Lifang, Zhang Guojun. p21 activated kinase 4 and tumor. *Int J Oncol* 2012; 39(1): 15-8.
- 30 蔡松旺, 谢迭来, 翁毅敏, 温星桥, 张军航. p21活化激酶6对人非小细胞肺癌A549细胞侵袭及迁移能力的影响. 中国病理生理杂志(Cai Songwang, Xie Dielai, Weng Yimin, Wen xingqiao, Zhang Junhang. Effects of p21-activated kinase 6 on invasion and migration of human non-small-cell lung cancer A549 cells. *Chinese Journal of Pathophysiology* 2013; 29(9): 1637-40.
- 31 Baumer Y, Drenckhahn D, Waschke J. cAMP induced Rac 1-mediated cytoskeletal reorganization in microvascular endothelium. *Histochem Cell Biol* 2008; 129(6): 765-78.
- 32 Del Valle-Perez B, Martinez VG, Lacasa-Salavert C, Figueras A, Shapiro SS, Takafuta T, *et al.* Filamin B plays a key role in vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell motility through its interaction with Rac-1 and Vav-2. *J Biol Chem* 2010; 285(14): 10748-60.

- 33 O' Connor K, Chen M. Dynamic functions of RhoA in tumor cell migration and invasion. *Small GTPases* 2013; 4(3): 141-7.
- 34 Oishi A, Makita N, Sato J, Iiri T. Regulation of RhoA signaling by the cAMP-dependent phosphorylation of RhoGDIalpha. *J Biol Chem* 2012; 287(46): 38705-15.
- 35 Newell-Litwa KA, Horwitz AR. Cell migration: PKA and RhoA set the pace. *Curr Biol* 2011; 21(15): R596-8.
- 36 Jones SE, Palmer TM. Protein kinase A-mediated phosphorylation of RhoA on serine 188 triggers the rapid induction of a neuroendocrine-like phenotype in prostate cancer epithelial cells. *Cell Signal* 2012; 24(8): 1504-14.
- 37 Jia Z, Zhen W, Velayutham Anandh Babu P, Liu D. Phytoestrogen genistein protects against endothelial barrier dysfunction in vascular endothelial cells through PKA-mediated suppression of RhoA signaling. *Endocrinology* 2013; 154(2): 727-37.
- 38 O' Connor KL, Nguyen BK, Mercurio AM. RhoA function in lamellae formation and migration is regulated by the alpha6beta4 integrin and cAMP metabolism. *J Cell Biol* 2000; 148(2): 253-8.
- 39 Kreisberg JJ, Ghosh-Choudhury N, Radnik RA, Schwartz MA. Role of Rho and myosin phosphorylation in actin stress fiber assembly in mesangial cells. *Am J Physiol* 1997; 273(Pt 2): F283-8.
- 40 王婷婷, 李 柯, 魏 蕾. 血管扩张刺激磷蛋白在细胞骨架调节中的作用. *生理科学进展*(Wang tingting, Li Ke, Wei Lei. Roles of vasodilator-stimulated phosphoprotein in the regulation of cytoskeleton. *Process in Physiological Sciences*) 2006; 37(1): 27-30.
- 41 Zhang D, Ouyang J, Wang N, Zhang Y, Bie J. Promotion of PDGF-induced endothelial cell migration by phosphorylated VASP depends on PKA anchoring via AKAP. *Mol Cell Biochem* 2010; 335(1/2): 1-11.
- 42 Lee S, Chung CY. Role of VASP phosphorylation for the regulation of microglia chemotaxis via the regulation of focal adhesion formation/maturation. *Mol Cell Neurosci* 2009; 42(4): 382-90.
- 43 Lebrand C, Dent EW, Strasser GA, Lanier LM, Krause M, Svitkina TM, *et al.* Critical role of Ena/VASP proteins for filopodia formation in neurons and in function downstream of netrin-1. *Neuron* 2004; 42(1): 37-49.
- 44 Mihlan S, Reiss C, Thalheimer P, Herterich S, Gaetzner S, Kremerskothen J, *et al.* Nuclear import of LASP-1 is regulated by phosphorylation and dynamic protein-protein interactions. *Oncogene* 2013; 32(16): 2107-13.
- 45 Zhang H, Chen X, Bollag WB, Bollag RJ, Sheehan DJ, Chew CS. Lasp1 gene disruption is linked to enhanced cell migration and tumor formation. *Physiol Genomics* 2009; 38(3): 372-85.
- 46 Butt E, Gambaryan S, Gottfert N, Galler A, Marcus K, Meyer HE. Actin binding of human LIM and SH3 protein is regulated by cGMP- and cAMP-dependent protein kinase phosphorylation on serine 146. *J Biol Chem* 2003; 278(18): 15601-7.
- 47 Keicher C, Gambaryan S, Schulze E, Marcus K, Meyer HE, Butt E. Phosphorylation of mouse LASP-1 on threonine 156 by cAMP- and cGMP-dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324(1): 308-16.
- 48 Spence HJ, McGarry L, Chew CS, Carragher NO, Scott-Carragher LA, Yuan Z, *et al.* AP-1 differentially expressed proteins Krp1 and fibronectin cooperatively enhance Rho-ROCK-independent mesenchymal invasion by altering the function, localization, and activity of nondifferentially expressed proteins. *Mol Cell Biol* 2006; 26(4): 1480-95.
- 49 Rachlin AS, Otey CA. Identification of palladin isoforms and characterization of an isoform-specific interaction between Lasp-1 and palladin. *J Cell Sci* 2006; 119(Pt 6): 995-1004.
- 50 Zhao KN, Masci PP, Lavin MF. Disruption of spectrin-like cytoskeleton in differentiating keratinocytes by PKCdelta activation is associated with phosphorylated adducin. *PLoS One* 2011; 6(12): e28267.
- 51 Matsuoka Y, Hughes CA, Bennett V. Adducin regulation. Definition of the calmodulin-binding domain and sites of phosphorylation by protein kinases A and C. *J Biol Chem* 1996; 271(41): 25157-66.
- 52 Liu S, Kiosses WB, Rose DM, Slepak M, Salgia R, Griffin JD, *et al.* A fragment of paxillin binds the alpha 4 integrin cytoplasmic domain (tail) and selectively inhibits alpha 4-mediated cell migration. *J Biol Chem* 2002; 277(23): 20887-94.
- 53 Han J, Rose DM, Woodside DG, Goldfinger LE, Ginsberg MH. Integrin alpha 4 beta 1-dependent T cell migration requires both phosphorylation and dephosphorylation of the alpha 4 cytoplasmic domain to regulate the reversible binding of paxillin. *J Biol Chem* 2003; 278(37): 34845-53.
- 54 Goldfinger LE, Han J, Kiosses WB, Howe AK, Ginsberg MH. Spatial restriction of alpha4 integrin phosphorylation regulates lamellipodial stability and alpha4beta1-dependent cell migration. *J Cell Biol* 2003; 162(4): 731-41.
- 55 Maccioni RB, Cambiazo V. Role of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly. *Physiol Rev* 1995; 75(4): 835-64.
- 56 Ou Y, Zheng X, Gao Y, Shu M, Leng T, Li Y, *et al.* Activation of cyclic AMP/PKA pathway inhibits bladder cancer cell invasion by targeting MAP4-dependent microtubule dynamics. *Urol Oncol* 2014; 32(1): 47.e21-48.
- 57 Horesh D, Sapir T, Francis F, Wolf SG, Caspi M, Elbaum M, *et al.* Doublecortin, a stabilizer of microtubules. *Hum Mol Genet* 1999; 8(9): 1599-610.
- 58 Toriyama M, Mizuno N, Fukami T, Iguchi T, Tago K, Itoh H. Phosphorylation of doublecortin by protein kinase A orchestrates microtubule and actin dynamics to promote neuronal progenitor cell migration. *J Biol Chem* 2012; 287(16): 12691-702.
- 59 Cook JR, van Buskirk RG. Disruption of microfilaments alters laminin synthesis but not laminin trafficking in NHEK *in vitro*. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1996; 32(5): 300-6.
- 60 Bhadriraju K, Elliott JT, Nguyen M, Plant AL. Quantifying myosin light chain phosphorylation in single adherent cells with automated fluorescence microscopy. *BMC Cell Biol* 2007; 8: 43.