

# 淋巴瘤和cAMP信号通路

钟 瑶, 朱 琦

上海交通大学附属第九人民医院血液内科, 上海 200011

[摘要] 淋巴瘤细胞克隆性增殖和疾病进展涉及细胞内多个信号通路。环腺苷酸(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)信号通路作为一种重要的细胞内信息传递系统参与细胞增殖、分泌、代谢和凋亡等多种生理过程的调控。靶向调变cAMP信号通路可以诱导多种恶性淋巴瘤细胞增殖阻滞和凋亡, 其机制涉及线粒体介导细胞凋亡、cAMP调控蛋白激酶和多种细胞内调控因子。对cAMP介导淋巴瘤细胞凋亡深入研究分析, 将为临床治疗淋巴瘤提供可能途径和潜在靶点。

[关键词] 淋巴瘤; 环腺苷酸信号通路; 细胞凋亡

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2016.06.013

中图分类号: R733.4 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2016)06-0556-05

**Lymphoma and cAMP signaling pathway** ZHONG Yao, ZHU Qi (Department of Hematology, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China)

Correspondence to: ZHU Qi E-mail: zhuqi70@hotmail.com

[Abstract] Several signaling pathways are involved in clonal proliferation of lymphoma cells and disease progression. It has been shown that cyclic adenosine monophosphate (cAMP) signaling pathway, as an important intracellular messenger delivery system, is related to modulation of multiple physiological processes including cell proliferation, secretion, metabolism and apoptosis. Manipulating the cAMP signaling pathway can induce cell cycle arrest and apoptosis of various malignant lymphoid cells, which involves mitochondria-dependent apoptosis and cAMP-modulated protein kinases as well as changes of intracellular mediators. In-depth research and analysis of cAMP-induced apoptosis in lymphoma cells would provide potential targets and possible therapeutic means for the treatment of lymphoma.

[Key words] Lymphoma; Cyclic adenosine monophosphate signaling pathway; Apoptosis

淋巴瘤是起源于淋巴结和淋巴组织的淋巴细胞克隆增殖性疾病, 其发生与免疫应答过程中淋巴细胞异常增殖、分化和凋亡密切相关。作为最常见的血液肿瘤, 淋巴瘤具有高度异质性, 其生物学特征、临床进程及预后各不相同<sup>[1]</sup>。目前淋巴瘤临床治疗药物包括糖皮质激素和烷化剂等细胞毒药物及基于特定分子靶标的靶向药物(如利妥昔单抗等), 其中基于靶向药物的联合化疗显著提高部分淋巴瘤患者临床缓解率和治愈率<sup>[2]</sup>。此外, 一些新型治疗手段(如造血干细胞移植和细胞免疫治疗等)使部分复发或难治性淋巴瘤患者获得缓解并延长其生存期<sup>[3-5]</sup>。但目前仍有相当一部分淋巴瘤患者对现有治疗方案不敏感或疗效欠佳而成为“真正”

难治性患者<sup>[4]</sup>。因此, 深入探究淋巴瘤细胞异常生长的细胞和分子机制并发现潜在治疗靶标或途径有其必要性和重要临床意义<sup>[6]</sup>。近年来大量研究显示, 通过调变细胞内环腺苷酸(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)信号通路不仅可以诱导多种恶性淋巴细胞增殖阻滞和凋亡, 而且能够增强恶性淋巴细胞对糖皮质激素等化疗药物的敏感性, cAMP信号通路成为淋巴瘤治疗的潜在靶标<sup>[7]</sup>。现对cAMP信号通路在不同恶性淋巴瘤细胞凋亡中的作用及靶向调变该通路诱导淋巴瘤细胞凋亡可能机制和临床应用前景进行综述。

## 1 cAMP信号通路和淋巴瘤细胞凋亡

cAMP作为一种普遍细胞内第二信使通过其下游效应分子调控细胞多种生理过程, 这些效应分子包括cAMP依赖蛋白激酶A(cyclic-AMP

基金项目: 上海市自然科学基金(13ZR1423800)。

通信作者: 朱 琦 E-mail: zhuqi70@hotmail.com

dependent protein kinase A, PKA)和cAMP活化转换蛋白(exchange protein directly activated by cAMP, EPAC)等。cAMP信号通路调变的细胞生物学效应取决于细胞类型和细胞内特定环境<sup>[8]</sup>。有研究显示,淋巴瘤细胞内cAMP信号通路激活通常导致其增殖阻滞和凋亡,提高细胞内cAMP水平能够诱导多种淋巴瘤细胞凋亡<sup>[7,9]</sup>。

弥漫大B细胞淋巴瘤(diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL)是临床最常见高度异质性B细胞淋巴瘤。腺苷酸环化酶(adenylyl cyclase, AC)激动剂佛司可林(forskolin)通过提高DLBCL细胞内cAMP水平而诱导其细胞增殖阻滞和凋亡。但部分难治性DLBCL细胞内因高表达磷酸二酯酶(phosphodiesterase, PDE)4B使其细胞内cAMP迅速降解而削弱forskolin介导细胞活力下降。Forskolin联合PDE4B特异性抑制剂哈利普兰(rolipram)或PLX513能够使难治性DLBCL细胞内cAMP水平升高进而诱导其细胞增殖和活力下降<sup>[10]</sup>。此外, DLBCL细胞内PDE4B高表达可降低细胞内cAMP水平而削弱cAMP对磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B/the mammalian target of rapamycin, PI3K/AKT/mTOR)信号通路的抑制作用,导致DLBCL细胞内AKT通路激活而使其对糖皮质激素药物(如地塞米松等)耐药<sup>[11]</sup>。有研究显示,提高DLBCL细胞内cAMP水平(如forskolin或PDE4B特异性抑制剂处理DLBCL细胞)不仅可以抑制细胞内AKT通路活化,而且能够提高细胞内糖皮质激素受体表达,从而增强DLBCL细胞对糖皮质激素的敏感性<sup>[12]</sup>。因此,提高DLBCL细胞内cAMP水平不仅可以直接介导其细胞生长阻滞和凋亡,而且能够增强糖皮质激素的凋亡诱导效应或逆转激素耐药。

相对于DLBCL,慢性淋巴细胞白血病/小淋巴细胞淋巴瘤(chronic lymphocytic leukemia/small lymphocyte lymphoma, CLL/SLL)临床呈惰性进程,现有细胞毒化疗药物联合免疫治疗虽然可以诱导CLL临床缓解,但仍无法治愈该疾

病<sup>[13]</sup>。因此,有必要寻找针对复发或难治性CLL有效治疗途径。Mentz研究小组最先报道,PDE抑制剂茶碱能够诱导CLL细胞凋亡,而且该效应能被cAMP拮抗剂部分逆转,提示茶碱介导CLL凋亡与其提高CLL细胞内cAMP水平密切相关<sup>[14]</sup>。但同样浓度的茶碱对正常B淋巴细胞活力无显著影响。随后多个体外研究结果也证实,茶碱可以诱导CLL细胞凋亡,而且其他提高细胞内cAMP水平的药物(如AC激动剂forskolin等)能增强茶碱的凋亡诱导效应<sup>[15]</sup>。为了更有效并且特异性提高CLL细胞内cAMP水平而介导其凋亡,筛选CLL细胞内PDE亚型特异性抑制剂成为研究重点。随后酶学和分子生物学研究提示,PDE4特异性抑制剂rolipram能够有效而稳定诱导原代CLL细胞凋亡,而且该效应与其提高CLL细胞内cAMP水平密切相关<sup>[16]</sup>。此外,rolipram对外周正常T和B淋巴细胞活力影响较小,推测与PDE4细胞内亚定位相关(正常T和B淋巴细胞与CLL细胞内PDE4定位不同导致cAMP调控分子分布和最终细胞生物学效应的差异)。

T细胞淋巴瘤虽然发病率较低,但其对传统化疗药物敏感性较低而预后较差。设计针对T细胞淋巴瘤特异性新型治疗模式有其重要临床意义。Coffino等<sup>[17]</sup>首先报道,cAMP拟似物或提高细胞内cAMP药物(如PDE抑制剂茶碱或G蛋白偶联受体激动剂等)能够诱导小鼠T淋巴瘤细胞株S49细胞凋亡。随后的研究证实,cAMP拟似物能够介导T淋巴瘤细胞生长G<sub>1</sub>期阻滞和凋亡特征性变化(DNA片段等)<sup>[18]</sup>。此外,通过细胞培养克隆了cAMP耐药S49细胞亚型Kin-S49(PKA缺乏或功能缺陷S49细胞)和D-S49(具备正常PKA活性但缺乏cAMP介导细胞凋亡的S49细胞)。这些耐药S49细胞株联合野生型S49(wild type S49, WT-S49)细胞为深入探究调变cAMP信号通路诱导T细胞淋巴瘤凋亡提供了独特和理想的实验平台。近年来,有研究还发现,提高调节性T淋巴细胞内cAMP水平能够有效抑制其功能,从而解除调节性T淋巴细胞对效应T淋巴细胞负向调控进而增强其对淋巴瘤细胞免疫攻

击<sup>[19]</sup>。因此, 调变cAMP信号通路不仅可以诱导T淋巴瘤细胞凋亡, 还能够调控调节性T淋巴细胞功能而逆转淋巴瘤细胞免疫逃逸。

## 2 调变cAMP信号通路诱导淋巴瘤细胞凋亡可能机制

细胞凋亡是细胞主动的程序性死亡过程, 存在两种基本凋亡途径: ① 内源性线粒体依赖的凋亡途径, 主要涉及线粒体跨膜电位改变和去极化, 细胞色素C和第二线粒体源性半胱天冬酶激活因子(second mitochondria-derived activator of caspase, Smac)释放和下游内源性caspase激活(caspase-9和caspase-3); ② 外源性细胞膜受体介导的凋亡途径, 主要涉及细胞膜表面凋亡受体(如Fas受体等)活化和下游外源性caspase激活(caspase-8等)。其中内源性凋亡途径受B细胞淋巴瘤相关蛋白(B cell lymphoma-related proteins, Bcl-related proteins)调控, 其中包括凋亡抑制蛋白(Bcl-2和BclXL等)和凋亡诱导蛋白(Bax、Bak、BAD、BIM和BclXS等)共同调控线粒体释放细胞色素C等凋亡因子<sup>[20-21]</sup>。提高淋巴瘤细胞内cAMP水平的药物或制剂主要通过内源性线粒体依赖的凋亡途径诱导细胞凋亡。流式细胞仪检测线粒体跨膜电位结果显示, forskolin处理DLBCL细胞后, 细胞内线粒体跨膜电位明显降低, 同时伴随细胞色素C释放和下游caspase-9及caspase-3活性增加<sup>[10]</sup>。小鼠T淋巴瘤细胞株S49实验也显示出相似结果。cAMP拟似物处理S49细胞后, 细胞内线粒体跨膜电位下降, 随后细胞色素C和Smac释放, caspase-3活化, 而外源性细胞凋亡途径相关的caspase-8没有被cAMP拟似物激活<sup>[7]</sup>。这些研究结果提示, cAMP信号通路主要通过线粒体途径诱导淋巴瘤细胞凋亡。

cAMP下游直接效应分子包括PKA和EPAC等。此外, cAMP还可对细胞内其他信号通路产生间接影响。有研究发现, cAMP拟似物无法诱导PKA缺乏或功能缺陷的Kin-S49细胞凋亡, 而EPAC激动剂不能介导S49细胞凋亡<sup>[22]</sup>。这些结果提示, PKA是cAMP拟似物介导S49细胞凋亡的关键效应分子。但DLBCL体外研究结果

显示, PKA特异性抑制剂H89或PKI虽然能够有效抑制forskolin介导DLBCL细胞内PKA活化, 但对forskolin诱导细胞增殖阻滞和凋亡无显著影响。此外, EPAC特异性激动剂对DLBCL细胞生长和活力无显著影响, 而forskolin能够诱导缺乏EPAC的DLBCL细胞株DHL6细胞凋亡<sup>[10]</sup>。这些研究结果提示, cAMP介导的DLBCL细胞凋亡不依赖于PKA和EPAC。因此, cAMP下游直接效应分子在不同淋巴瘤细胞凋亡中的作用大相径庭。

Wilderman等<sup>[23]</sup>采用基因芯片技术比较WT-S49、Kin-S49和D-S49细胞在cAMP拟似物处理后基因表达谱的变化以明确cAMP信号通路介导淋巴瘤细胞凋亡中的关键分子, 结果发现, 凋亡诱导因子*Bim*在cAMP拟似物8-(4-Chlorophenylthio)adenosine 3': 5'-cyclic monophosphate(8-CPT-cAMP)处理后的WT-S49细胞内表达明显升高, 敲除*Bim*基因显著钝化8-CPT-cAMP介导的WT-S49细胞凋亡, 过表达*BimL*(*Bim*的一种亚型)明显提高8-CPT-cAMP介导的WT-S49、Kin-S49和D-S49细胞凋亡。这些结果提示, *Bim*是cAMP信号通路介导S49淋巴瘤细胞凋亡的关键分子。此外, 细胞毒T淋巴细胞抗原-2(cytotoxic T lymphocyte antigen-2, CTLA-2)及生存素在cAMP介导S49细胞凋亡中也发挥关键作用<sup>[24]</sup>。但cAMP信号通路促发S49细胞凋亡的启动关键分子及cAMP调控*Bim*和CTLA-2等因子的具体机制仍有待进一步明确。同时, DLBCL体外研究结果显示, cAMP信号通路通过调变凋亡诱导因子BAD介导DLBCL细胞凋亡, cAMP信号通路通过抑制DLBCL细胞内PI3K/AKT通路激活, 继而阻止AKT对其下游底物(包括BAD等)磷酸化, 从而提高BAD活性介导细胞凋亡<sup>[12]</sup>。但cAMP信号通路调变PI3K活性的具体机制仍不明确, 可能与cAMP直接或间接调控PI3K上游酪氨酸激酶(如RAS等)活性有关。

综上所述, cAMP信号通路可能通过以下机制诱导淋巴瘤细胞凋亡: ① 诱导淋巴瘤细胞内线粒体跨膜电位下降和凋亡诱导因子释放; ② 通过cAMP下游直接效应分子PKA调变凋亡调控

因子(如*Bim*和CTLA-2等)介导细胞凋亡;③直接或间接影响细胞内其他信号通路(如PI3K/AKT通路等)进而调变凋亡相关因子(如BAD等)诱导细胞凋亡。

### 3 调变cAMP信号通路治疗淋巴瘤的临床应用前景

调变淋巴瘤细胞内cAMP信号通路的可能方式包括活化淋巴瘤细胞内AC、抑制细胞内cAMP降解和直接针对cAMP通路的效应分子。

首先,应用受体激动剂增强淋巴瘤细胞内AC活性可能产生非靶器官组织细胞因AC亢进而导致不良反应,因此,如何瞬时提高淋巴瘤细胞内AC活性而达到治疗目的的同时不显著影响其正常组织器官成为治疗关键。G蛋白偶联受体激动剂前列腺素E2能够通过提高CLL细胞内cAMP水平而诱导其凋亡,使其具备临床应用前景<sup>[15]</sup>。

其次,抑制淋巴瘤细胞内cAMP降解药物包括非特异性和亚型特异性PDE抑制剂,目前针对淋巴瘤细胞的PDE亚型抑制剂包括PDE1、PDE3、PDE4和PDE7抑制剂。基于体外研究结果,Willis等<sup>[25]</sup>应用茶碱联合苯丁酸氮芥治疗复发或难治性CLL,10例患者中9例临床应答,其中5例获得临床缓解。而PDE4特异性抑制剂rolipram已成功应用于支气管哮喘和自身免疫性脑脊髓膜炎等疾病治疗,具备良好临床应用安全性。针对14例CLL患者原代细胞敏感性检测显示,rolipram诱导CLL细胞凋亡率为34%~89%,并且与CLL患者临床分期及既往化疗反应无关,显示出良好临床应用潜力<sup>[16]</sup>。

最后,直接针对cAMP通路调控的效应分子介导淋巴瘤细胞凋亡也是有效的治疗策略。cAMP下游效应分子PKA在cAMP介导的T淋巴瘤细胞凋亡发挥关键作用。因此,PKA特异性cAMP拟似物存在应用于T淋巴瘤治疗的可能性。此外,在cAMP介导DLBCL细胞凋亡中关键分子PI3K/AKT也是重要治疗靶标。PI3K特异性抑制剂idelalisib已成功应用于惰性淋巴瘤治疗。随机和前瞻性研究显示,idelalisib联合利妥昔单抗治疗复发CLL总有效率达81%,中位无疾病进

展生存时间未达到,提示大部分患者仍存活。此外,PI3K特异性抑制剂对难治性CLL患者(尤其是*P53*基因缺失患者)显示出良好疗效<sup>[26]</sup>。

总之,调变cAMP信号通路可以诱导淋巴瘤细胞增殖阻滞和凋亡,其机制涉及淋巴瘤细胞内线粒体跨膜电位下降、cAMP调控蛋白激酶PKA和多种细胞内调控因子。随着对cAMP介导淋巴瘤细胞凋亡深入研究分析,找到参与cAMP信号通路诱导淋巴瘤细胞凋亡的关键分子或途径,将为临床治疗淋巴瘤提供潜在靶标和新型治疗途径。

### [参 考 文 献]

- [1] ANSELL S M. Non-Hodgkin lymphoma: diagnosis and treatment [J]. *Mayo Clin Proc*, 2015, 90(8): 1152-1163.
- [2] FISHER R I, KHAN N. Is observation dead in follicular lymphoma? No, but the apoptosis pathway has been activated [J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2015, 13(3): 363-366.
- [3] VOSE J M. Mantle cell lymphoma: 2015 update on diagnosis, risk-stratification, and clinical management [J]. *Am J Hematol*, 2015, 90(8): 739-745.
- [4] BACHY E, SALLES G. Treatment approach to newly diagnosed diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Semin Hematol*, 2015, 52(2): 107-118.
- [5] HE G, WANG C, TAN H, et al. Rituximab after autologous stem cell transplantation enhances survival of B-cell lymphoma patients: a meta-analysis and systematic review [J]. *Transplant Proc*, 2015, 47(2): 517-522.
- [6] HAPGOOD G, SAVAGE K J. The biology and management of systemic anaplastic large cell lymphoma [J]. *Blood*, 2015, 126(1): 17-25.
- [7] INSEL P A, WILDERMAN A, ZHANG L, et al. Cyclic AMP/PKA-promoted apoptosis: insights from studies of S49 lymphoma cells [J]. *Horm Metab Res*, 2014, 46(12): 854-862.
- [8] INSEL P A, ZHANG L, MURRAY F, et al. Cyclic AMP is both a pro-apoptotic and anti-apoptotic second messenger [J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2012, 204(2): 277-287.
- [9] ZAMBON A C, WILDERMAN A, HO A, et al. Increased expression of the pro-apoptotic protein BIM, a mechanism for cAMP/protein kinase A (PKA)-induced apoptosis of immature T cells [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(38): 33260-33267.
- [10] SMITH P G, WANG F, WILKINSON K N, et al. The phosphodiesterase PDE4B limits cAMP-associated PI3K/AKT-dependent apoptosis in diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Blood*, 2005, 105(1): 308-316.
- [11] KIM J, JEONG D, NAM J, et al. MicroRNA-124 regulates glucocorticoid sensitivity by targeting phosphodiesterase 4B

- in diffuse large B cell lymphoma [J]. *Gene*, 2015, 558(1): 173–180.
- [ 12 ] KIM S W, RAI D, AGUIAR R C. Gene set enrichment analysis unveils the mechanism for the phosphodiesterase 4B control of glucocorticoid response in B-cell lymphoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(21): 6723–6732.
- [ 13 ] ROZOVSKI U, HAZAN-HALEVY I, KEATING M J, et al. Personalized medicine in CLL: current status and future perspectives [J]. *Cancer Lett*, 2014, 352(1): 4–14.
- [ 14 ] MENTZ F, MERLE-BERAL H, OUAZ F, et al. Theophylline, a new inducer of apoptosis in B-CLL: role of cyclic nucleotides [J]. *Br J Haematol*, 1995, 90(4): 957–959.
- [ 15 ] MENTZ F, MERLE-BERAL H, DALLOUL A H. Theophylline-induced B-CLL apoptosis is partly dependent on cyclic AMP production but independent of CD38 expression and endogenous IL-10 production [J]. *Leukemia*, 1999, 13(1): 78–84.
- [ 16 ] TIWARI S, DONG H, KIM E J, et al. Type 4 cAMP phosphodiesterase (PDE4) inhibitors augment glucocorticoid-mediated apoptosis in B cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) in the absence of exogenous adenylyl cyclase stimulation [J]. *Biochem Pharmacol*, 2005, 69(3): 473–483.
- [ 17 ] COFFINO P, BOURNE H R, TOMKINS G M. Mechanism of lymphoma cell death induced by cyclic AMP [J]. *Am J Pathol*, 1975, 81(1): 199–204.
- [ 18 ] COFFINO P, GRAY J W, TOMKINS G M. Cyclic AMP, a nonessential regulator of the cell cycle [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1975, 72(3): 878–882.
- [ 19 ] DOU A X, FENG L L, LIU X Q, et al. Cyclic adenosine monophosphate involvement in low-dose cyclophosphamide-reversed immune evasion in a mouse lymphoma model [J]. *Cell Mol Immunol*, 2012, 9(6): 482–488.
- [ 20 ] FERREIRA CDA S, MAGANHIN C C, SIMÕES RDOS S, et al. Melatonin: cell death modulator [J]. *Rev Assoc Med Bras*, 2010, 56(6): 715–718.
- [ 21 ] HABIBOVIC S, HRGOVIC Z, BUKVIC I, et al. Molecular mechanisms in apoptosis [J]. *Med Arh*, 2000, 54(1): 33–40.
- [ 22 ] KESHWANI M M, KANTER J R, MA Y, et al. Mechanisms of cyclic AMP/protein kinase A- and glucocorticoid-mediated apoptosis using S49 lymphoma cells as a model system [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(41): 12681–12686.
- [ 23 ] WILDERMAN A, GUO Y, DIVAKARUNI A S, et al. Proteomic and metabolic analyses of S49 lymphoma cells reveal novel regulation of mitochondria by cAMP and protein kinase A [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(36): 22274–22286.
- [ 24 ] ZHANG L, YUN H, MURRAY F, et al. Cytotoxic T lymphocyte antigen-2 alpha induces apoptosis of murine T-lymphoma cells and cardiac fibroblasts and is regulated by cAMP/PKA [J]. *Cell Signal*, 2011, 23(10): 1611–1616.
- [ 25 ] WILLIS C R, GOODRICH A, PARK K, et al. A phase I/II study examining pentostatin, chlorambucil, and theophylline in patients with relapsed chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin's lymphoma [J]. *Ann Hematol*, 2006, 85(5): 301–307.
- [ 26 ] BLUNT M D, STEELE A J. Pharmacological targeting of PI3K isoforms as a therapeutic strategy in chronic lymphocytic leukaemia [J]. *Leuk Res Rep*, 2015, 4(2): 60–63.

(收稿日期: 2016-01-05 修回日期: 2016-03-15)