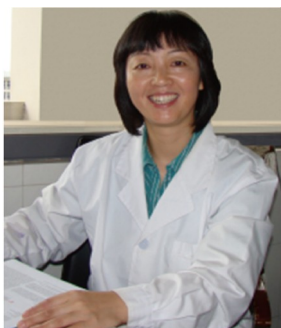


综述



张志珍, 博士, 教授; 研究方向: 脂质代谢异常与动脉粥样硬化性心血管疾病。主持国家自然科学基金、广东省自然科学基金、广东省科技计划项目、广东省高层次人才项目等20项, 发表科研论文70余篇。科研成果获湛江市科学技术一等奖。广东省第七批“千百十工程”省级培养对象, 广东省生物化学与分子生物学学会常务理事。

Epac结构与功能及其在心血管疾病中的作用

陈耿基^{1,2}, 肖佳海^{1,2}, 梁浩林^{1,2}, 张志珍^{1*}

(¹广东医科大学基础医学院, 东莞 523808; ²广东医科大学医学技术学院, 东莞 523808)

摘要: cAMP是细胞内重要的第二信使, 对细胞的分化、生长、代谢等过程产生影响。cAMP直接激活交换蛋白(Epac)是小相对分子质量GTP酶Ras超家族的鸟嘌呤核苷酸交换因子, 参与cAMP调控的多种生物学过程。Epac是多结构域蛋白, 包含羧基端的催化结构域和氨基端的调节结构域, 有Epac1、Epac2A、Epac2B和Epac2C四种不同亚型。Epac通过不同的信号转导过程参与炎症反应、抗氧化、抗凋亡、细胞增殖与分化以及钙离子的调节等。近年来的研究显示, Epac与心力衰竭、心律失常、动脉粥样硬化以及缺血-再灌注损伤有着密切联系, 可作为心血管疾病新的治疗靶点。本文介绍了Epac的结构特点、激活过程与生理功能, 并概述了Epac在心血管疾病发生发展中的作用。

关键词: Epac; cAMP; 信号转导; 心血管疾病

Structure and function of Epac and its role in cardiovascular diseases

CHEN Gengji^{1,2}, XIAO Jiahai^{1,2}, LIANG Haolin^{1,2}, ZHANG Zhizhen^{1*}

(¹School of Basic Medicine, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China;

²School of Medical Technology, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China)

Abstract: cAMP is an important second messenger within cells, which affecting the processes such as cellular differentiation, growth and metabolism. Exchange protein directly activated by cAMP (Epac), a guanine nucleotide exchange factors of small molecular weight GTPase Ras family, is involved in diverse biological processes regulated by cAMP. Epac is a multidomain protein that contains a catalytic domain at the carboxyl terminal and a regulatory domain at the amino terminal. There are four different subtypes of Epac:

收稿日期: 2024-05-16

第一作者: E-mail: 774585079@qq.com

*通信作者: E-mail: zzzhang@gdmu.edu.cn

Epac1 and Epac2A, Epac2B, Epac2C. Epac signaling participates in inflammatory response, antioxidant and antiapoptosis, cell proliferation and differentiation, and calcium ion regulation. Recent studies have shown that Epac is closely related to heart failure, arrhythmia, atherosclerosis and ischemia-reperfusion injury, which can be used as a new therapeutic target for cardiovascular diseases. This paper introduces the structural characteristics, activation process, and physiological function of Epac, and summarizes its role in the occurrence and development of cardiovascular diseases.

Key Words: Epac; cAMP; signal transduction; cardiovascular disease

环腺苷酸(cyclic AMP, cAMP)是一种最常见且最普遍的第二信使,参与调控多种生命活动,包括肌肉收缩、物质代谢、分泌、钙稳态以及基因转录等^[1]。最初,cAMP被认为只作用于cAMP依赖性蛋白激酶A(protein kinase A, PKA),但在1998年,de Rooij等^[2]通过体外克隆编码cAMP直接激活交换蛋白(exchange protein directly activated by cAMP, Epac)的基因,在大鼠成纤维细胞中观察到Epac能激活Ras相关蛋白1(Ras related protein 1, Rap1),同时在大鼠成纤维母细胞系中也发现cAMP能诱导Epac对Rap1的鸟嘌呤核苷酸交换因子(guanine nucleotide exchange factor, GEF)活性,进而确定了Epac是cAMP作用的新靶蛋白。研究证实,Epac在人体大部分组织中表达,且参与cAMP调控的多种生物学过程,介导诸多疾病的病理生理过程,如癌症、心血管疾病、糖尿病、肺纤维化、神经系统疾病等^[3,4]。近年来的研究表明,Epac是心血管疾病发生发展中的重要信号分子,参与心力衰竭、心律失常、动脉粥样硬化以及缺血-再灌注损伤等的调控^[5-8]。本文拟对Epac的结构特点、激活与生理功能以及Epac在心律失常、心力衰竭、动脉粥样硬化、缺血再灌注损伤中的作用进行综述。

1 Epac结构特点

Epac基因在人体组织特异性表达并进行选择性剪接。Epac蛋白家族有着高度同源的结构域,不同亚型的差异性表达可影响它们在细胞内的位置,从而产生不同的生物学效应。

1.1 Epac特点及分布

Epac是小相对分子质量GTP酶Ras超家族的GEF。Ras是细胞内的一种小相对分子质量G蛋白,

其活性与结合GTP或GDP直接相关,当结合GTP形成Ras-GTP时为活性状态,而结合GDP时则失去活性。GEF可促进G蛋白释放GDP代之以GTP而将其激活^[9]。Epac有Epac1和Epac2两种亚型,分别由基因鸟嘌呤核苷酸交换因子3(Rap guanine nucleotide exchange factor 3, *RAPGEF3*)和*RAPGEF4*编码。*RAPGEF3*位于染色体12q13.11,基因全长为36 677个核苷酸,编码区共有30个外显子,开放阅读框架长度为2 772,编码含有923个氨基酸残基的Epac1。*RAPGEF4*位于染色体2q31.1,基因全长为317 049个核苷酸,编码区共有37个外显子,通过选择性剪接产生3个Epac2突变体,包括含有1 011个氨基酸残基的Epac2A、867个氨基酸残基的Epac2B和696个氨基酸残基的Epac2C^[10]。

Epac基因在各种组织中差异性表达。Epac1在子宫、卵巢、中枢神经系统、脂肪组织、肾脏和血管平滑肌细胞中高表达^[11]。Epac2的不同亚型具有组织特异性表达的特点:Epac2A在中枢神经系统、垂体、胰岛以及胰腺中高表达,Epac2B在肾上腺、睾丸的类固醇生成细胞系中表达,而Epac2C仅在肝脏中表达^[12]。在心肌细胞中,Epac1主要分布在核膜上,而Epac2则集中在横小管中^[13]。Epac各亚型在不同组织细胞的定位有助于信号复合物的形成及信号转导的特异性,提示Epac可作为一种具有组织特异性的治疗靶点。

1.2 Epac蛋白结构

Epac是一种多结构域蛋白,包括羧基端(-COOH)的催化结构域和氨基端(-NH₂)的调节结构域^[10]。催化结构域由REM(Ras exchange motif)、RA(Ras association)和CDC25-HD(CDC25-homology domain)组成。CDC25-HD结构域由两段反向平行的 α -螺旋组成螺旋发夹(helical hairpin, HP)状结构,

发夹的N-末端螺旋与Rap蛋白相互结合。RA结构域具有泛素折叠($\beta\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$)的特征。Epac1的RA结构域能够与小相对分子质量G蛋白Ran相互作用, Ran通过与Ran结合蛋白2(Ran-binding protein 2, RanBP2)相互结合促进Epac1从胞质向核膜移动, 并将Epac1锚定在核孔上以激活核膜上的Rap1。另外, Epac1可以经历翻译后修饰, 当G蛋白受体激酶2(G protein kinase 2, GRK2)依赖性磷酸化Epac1时则会抑制其向质膜易位^[14]。Epac2的RA结构域通过与GTP结合的Ras相互作用, 促进Epac2从胞质易位到胞膜^[15,16]。

调节结构域由DEP(Disheveled/Egl-10/pleckstrin)和CNBD-B(cyclic nucleotide binding domain B)组成。Epac的调节结构域在细胞内处于自身抑制构象时, 可阻断Rap蛋白的GEF活性。CNBD-B结构域能够与cAMP高亲和力结合, 当被cAMP激活后, DEP结构域通过与磷脂酸相互作用将Epac靶向细胞膜^[17]。调节结构域CNBD-B的C-端和催化结构域REM的N-端之间存在一个铰链区, 该区域有助于保持Epac蛋白在其自身抑制状态下的稳定性。同时, CDC25-HD结构域的Arg886和Asp883氨基酸残基与cNBD-B结构域的Gln303、

Asp307和Glu332氨基酸残基之间能形成离子键, 该离子作用力与铰链区域协同作用, 稳定并维持Epac处于自身抑制构象^[18]。不同Epac亚型在调节结构域有差异。Epac1的N-末端含有一段由49个氨基酸残基组成的序列, 该序列能与细胞膜定位相关蛋白ERM(ezrin-radixin-moesin)相互作用, 通过与DEP结构域协同将Epac易位到质膜, 并介导与细胞外基质的黏附^[19]。Epac2A额外含有一个较低亲和力的cAMP结合域(CNBD-A), 参与Epac2A自身抑制与激活状态的循环, 并有助于胰腺细胞中Epac2A的细胞膜定位^[20,21]。Epac2C缺乏DEP结构域, 这会影响其亚细胞定位^[17]。Epac不同亚型的结构特点及其功能见图1。

2 Epac的活化与生理功能

Epac作为一种新兴的cAMP下游信号分子, 其激活与cAMP具有紧密联系。同时, cAMP/Epac信号通路参与多种效应分子和关键信号转导过程, 调控着一系列不同的病理生理过程。

2.1 Epac的激活

在静息细胞内, Epac的调节结构域CNBD-B不与cAMP结合, CNBD-B通过Arg886和Asp883氨基

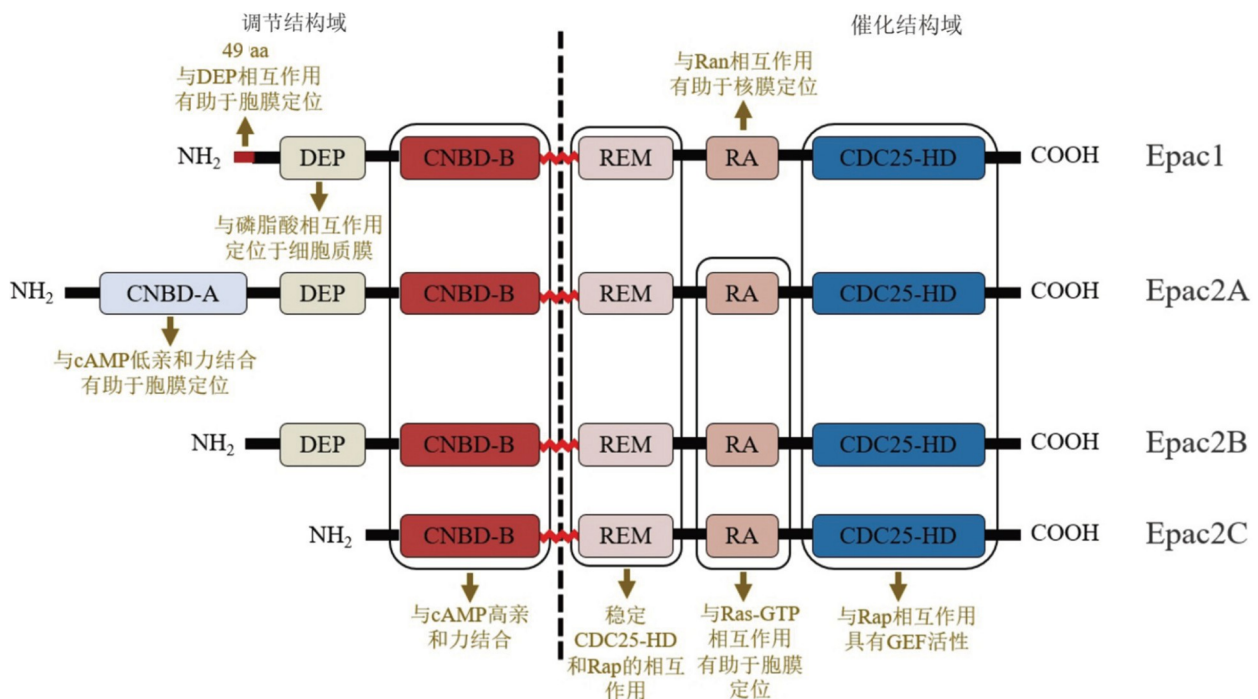


图1 Epac亚型的结构及不同结构域功能示意图

酸残基与CDC25HD结构域的Gln303、Asp307和Glu332氨基酸残基发生离子相互作用,阻碍了Rap与CDC25HD的结合。调节结构域就在空间上阻碍了催化结构域,自动抑制了其催化活性,使Epac处于自身抑制的空间闭合状态而失去活性^[18]。同时,CNBD-B结构域与铰链区也存在离子相互作用,有助于Epac蛋白非活性状态的稳定^[22]。Epac级联反应始于膜结合型腺苷酸环化酶(membrane-bound adenylylate cyclase, mAC)或可溶性腺苷酸环化酶(soluble adenylylate cyclase, sAC)的激活^[23]。当细胞膜上的G蛋白偶联受体激活G蛋白时,活化的Gs-GTP进一步使mAC活化,催化ATP转化为cAMP。细胞内产生的cAMP与Epac的CNBD-B结构域结合后,铰链区内的离子作用力减弱,铰链区域构象发生变化,诱导Epac构象改变,Epac的自我抑制形式被解除,催化区域暴露而呈现出激活状态。在其活性状态下,催化结构域的CDC25-HD作为小相对分子质量GTP酶Ras超家族的GEFs,促进其效应蛋白Rap1释放GDP并结合GTP,进而活化为Rap1-GTP^[2]。cAMP可通过磷酸二酯酶(phosphodiesterases, PDEs)的作用水解为5'-AMP,从而终止级联反应^[24]。当Rap相关蛋白激活后,可以催化下游一系列丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶的磷酸化,并依次激活底物蛋白的磷酸化级联反应,进而发挥生物学效应^[25]。有研究表明,阴离子膜是

Epac1激活的主要组成部分,与cAMP协同作用以产生最大的GEF活性,当cAMP浓度较低时,Epac1必须由阴离子膜引发才能结合cAMP^[26]。Epac的活化过程见图2。

2.2 Epac的生理功能

Epac能与细胞内多种受体蛋白结合介导信号转导,参与炎症、内皮屏障、抗氧化、凋亡、细胞增殖与分化以及细胞内外钙离子的调节等过程。Epac能够在cAMP激活的情况下催化Rap上的GDP转变为GTP, cAMP-Epac-Rap信号可以控制细胞间相互接触以及调控细胞分化和炎症等过程^[10]。

Epac参与细胞的抗氧化和抗凋亡。当细胞受到刺激引起胞内cAMP水平升高后,机体可以通过cAMP-Epac-磷脂酰肌醇-3激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)-蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)信号通路减少细胞中活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生、减少细胞凋亡,预防线粒体功能障碍^[27]。

Epac也可通过激活Rap,进而激活细胞内MAPK激酶激活因子(MAPK kinase activator, Raf),促进下游MAPK/细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)活化,参与细胞增殖和细胞周期调控以及离子通道的调节和基因表达调控^[25,27,28]。

Epac1信号可激活磷脂酶C(phospholipase C,

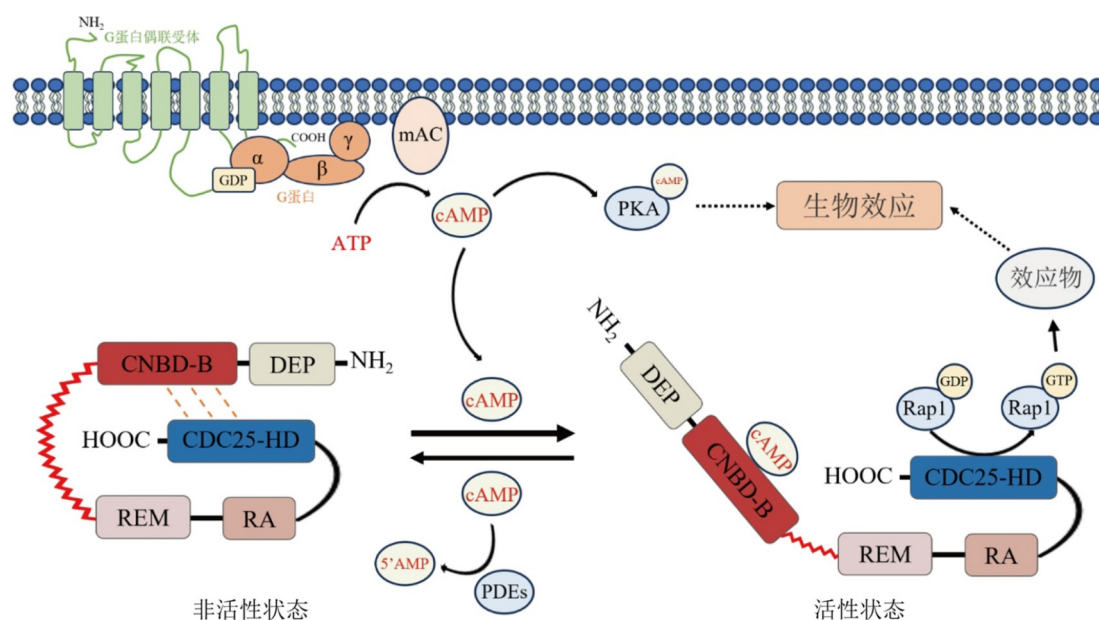


图2 Epac的活化过程

PLC)。活化的PLC可将细胞膜内层脂质中的磷脂酰肌醇4,5-二磷酸(phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, PIP_2)水解为肌醇-1,4,5-三磷酸(inositol-1,4,5-triphosphate, IP_3)和磷脂酰甘油(diacylglycerol, DAG)。 IP_3 与内质网膜上的特异性受体(IP_3 -R)结合释放 Ca^{2+} , Ca^{2+} 与钙调蛋白(calmodulin, CaM)结合形成复合物, 使 Ca^{2+} /CaM依赖的蛋白激酶 II (Ca^{2+} /calmodulin dependent protein kinase II, CaMK II)磷酸化激活^[29]。Epac2-PI3K-Akt信号通路促进一氧化氮合酶(nitric oxide synthases 1, NOS1)合成NO, 使得CaMK II依赖性兰尼碱受体2(ryanodine receptor 2, RyR2)磷酸化, 从而促进心脏肌浆网 Ca^{2+} 泄漏, 进而参与心血管疾病的发生发展^[30-32]。Epac参与的细胞内信号转导途径见图3。

3 Epac与心血管疾病

心血管疾病(cardiovascular disease, CVD)是导致全球居民死亡的首要原因。心血管疾病的预防及治疗是临床和基础研究的热点。心力衰竭(heart failure, HF)、心律失常(arrhythmias)是心血管疾病中常见的临床表现。心力衰竭并发心律失常是较常见和多发的一种疾病。动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是诱发心血管疾病的主要病理基础。动脉壁增厚、血管腔狭窄造成心肌缺血, 导致心脏更易受到缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, I/R)。cAMP信号转导通路与心脏功能密切相关^[33]。Epac是cAMP的重要效应蛋白, 同样是心血管疾病发生发展的关键参与者。

3.1 Epac与心力衰竭

心力衰竭是由各种原因引起的心肌损伤而造成

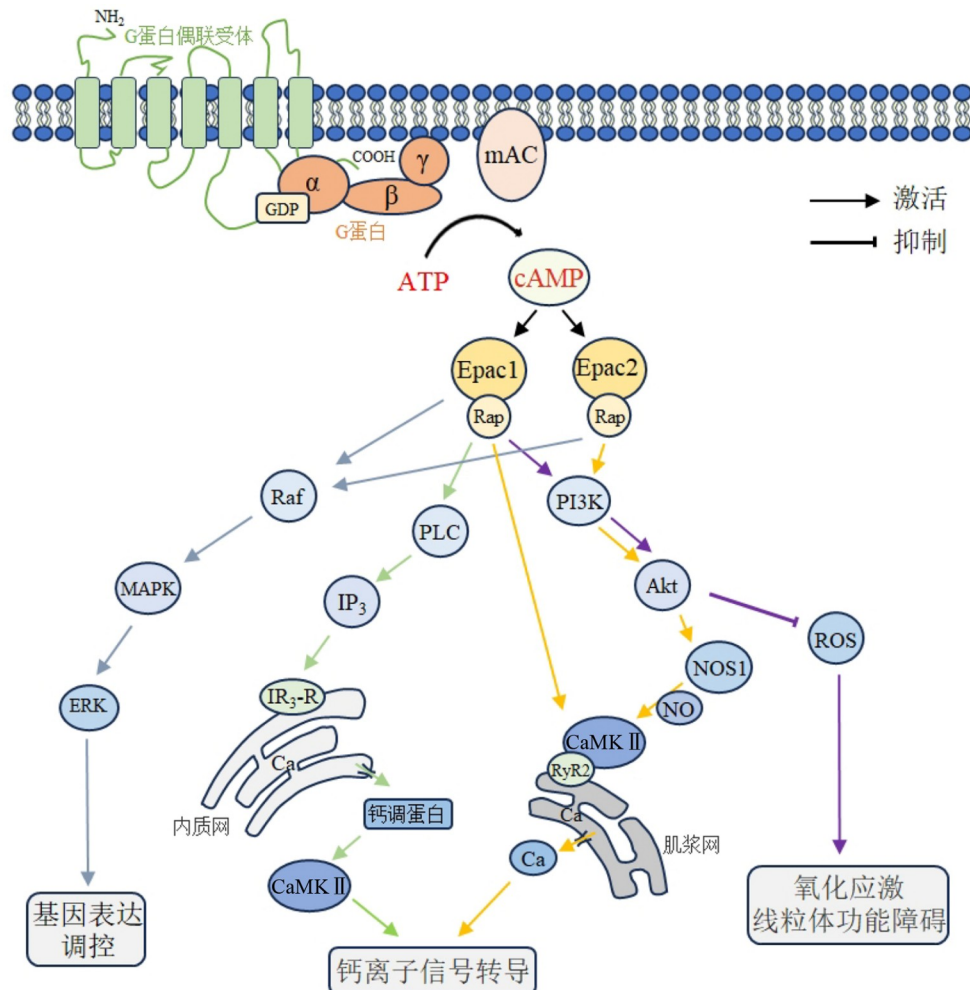


图3 Epac参与的细胞内信号转导途径

心肌结构和功能的变化。在心衰早期,交感神经兴奋,肾上腺激素等儿茶酚胺分泌增多,使得心率加快,心肌收缩力增强,导致血容量重新分布以保证心、脑等重要组织器官的血液供应。异丙肾上腺素(isoprenaline, ISO)是一种非选择性 β -肾上腺素能受体(β -adrenergic receptor, β -AR)的激动剂,被广泛应用于诱导小鼠心衰^[34]。研究表明,ISO能够升高细胞内cAMP水平,激活依赖于Epac1和磷脂酶C的信号通路,促进 Ca^{2+} 释放,进而诱导心肌细胞凋亡^[35]。随着心脏代偿的失效,心脏会逐渐扩大,心脏的交感神经过度兴奋会使心肌细胞发生凋亡坏死、纤维化^[36]。Okumura等^[37]在*Epac1*基因敲除小鼠中发现,Epac1缺失导致依赖于磷脂酶C的 Ca^{2+} 释放减少,心脏收缩性降低。Epac1的缺乏使得心肌细胞凋亡和纤维化减少,且对ISO和衰老诱导的心肌病表现出耐药性,导致心律失常,活性减弱。Epac1缺失也能保护心脏免受儿茶酚胺等应激的影响,提示抑制Epac1可能是治疗心衰的有效方法。心衰的发病机制还包括ROS产生、细胞凋亡和线粒体功能障碍。有研究显示,抑制Epac1的表达能保护细胞免受上述发病机制的影响^[38]。有研究证实,Epac1通过Jak/STAT通路抑制诱导型一氧化氮合酶的表达,保护心脏免受 β -AR诱导的急性应激引发的心功能障碍^[39]。Laudette等^[40]使用Epac1的非竞争性抑制剂AM-001抑制Epac1下游效应蛋白Rap1的激活,减轻了ISO诱导心衰小鼠的心脏损伤和纤维化,并改善了心脏功能。有研究表明,心肌细胞自噬减少可能导致心肌重塑并诱发心力衰竭^[41]。Li等^[42]研究发现,Epac1参与 β 1-肾上腺素受体自身抗体(β 1-AA)介导的心肌细胞自噬降低。有研究显示,Epac1破坏了线粒体脂肪酸摄取和氧化之间的平衡,导致脂质积累和线粒体功能障碍,最终导致心肌细胞凋亡^[43]。Pereira等^[31]研究表明, β -AR通过cAMP-Epac2-PI3K-Akt-NOS1-CaMK II通路,介导兔和小鼠心室肌细胞的肌浆网 Ca^{2+} 渗漏诱导心衰,说明Epac2也参与了心衰的发生发展。

3.2 Epac与心律失常

心脏活动的起源和(或)传导障碍能导致心脏搏

动的频率和(或)节律异常,即心律失常。Boileve等^[44]的研究表明,Epac与心律失常信号通路有关,Epac1和Epac2通过PLC/PKC和NOS/PKG通路抑制大鼠心室心肌细胞中的 K^{+} 电流,参与心室心肌细胞动作电位持续时间增加。Epac1参与了心房和室性心律失常的发展,且使用Epac1的选择性抑制剂CE3F4能显著抑制小鼠心房和心室肌细胞的肌浆网 Ca^{2+} 渗漏,预防小鼠心房和室性心律失常^[45]。磷酸二酯酶2是一种水解细胞内cAMP和cGMP的水解酶,可以调节心脏收缩和舒张功能。Wagner等^[46]研究发现,磷酸二酯酶2能抵抗 β -AR介导的cAMP依赖性Epac/CaMK II信号通路所诱发的室性心律失常,因此抑制Epac1可能是治疗心律失常的有效途径。也有研究报道,Epac1通过CaMK II介导的L型钙通道(L-type calcium channel, LTCC)增加对心房颤动的易感性,且LTCC开放可以延长诱导心房颤动的动作电位,说明激活Epac1可以促进心房颤动^[47]。而使用Epac1的非竞争性抑制剂AM-001能选择性阻断心房颤动的发生^[5]。研究证实,CD44能调节 β -AR和Epac1介导 Ca^{2+} 异常导致的室性心律失常,这可能是预防心脏疾病患者心律失常和心源性猝死的新治疗靶点^[36]。Yang等^[48]研究证实,Rap1是心脏线粒体ROS产生的负性调控因子,Epac2-Rap1信号能够减弱线粒体ROS的产生,降低心肌心律失常的易感性。RyR2是位于肌浆网/内质网膜上的一种细胞内钙释放通道,CaMK II-RyR2信号通路介导 Ca^{2+} 释放和 Na^{+} - Ca^{2+} 交换,RyR2异常激活可能引发室性早搏^[30,31,49]。小鼠实验表明,Epac参与介导的RyR2激活,能显著改变 Ca^{2+} 的体内平衡,使得心肌动作电位传导减慢,促进心律失常的发展^[50]。总之,Epac在心律失常中发挥着多种作用,抑制Epac可能是治疗心律失常的有效方法。

3.3 Epac与动脉粥样硬化

动脉粥样硬化是心血管系统中最常见的疾病,与炎症、血管内皮功能障碍、氧化应激和低密度脂蛋白胆固醇水平升高有关。正常的血管内皮是抵御心血管疾病的基础防线,血管平滑肌细胞表型转化导致的细胞迁移对动脉粥样硬化的进程具

有重要作用, 而Epac1能通过调节Rap1等维持内皮屏障功能^[51]。Epac1也能通过促进血小板衍生生长因子BB诱导的细胞内Ca²⁺浓度增加, 促进血管平滑肌细胞迁移以及新生内膜的形成, 进而促进动脉粥样硬化的发展^[52]。利用Epac1敲除小鼠实验发现, Epac1通过PI3K/Akt信号通路抑制血管损伤后的内膜形成, 而且Epac1缺乏减少了血小板衍生生长因子诱导的线粒体分裂和ROS的产生, 说明Epac1在促进血管平滑肌细胞增殖和血管损伤中发挥重要作用, 促进了动脉粥样硬化的发展^[53]。Zou等^[54]发现, 敲除前列腺素D₂受体1会损害Epac1/Rap1的激活, 促使血管重塑和纤维化, 影响血液供应和代谢功能。Robichaux等^[6]研究发现, 在Epac1缺失的动脉粥样硬化斑块的巨噬细胞内, 氧化型低密度脂蛋白(oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL)累积减少, 使用Epac1特异性激动剂则可诱导小鼠动脉粥样硬化斑块中巨噬细胞内氧化型低密度脂蛋白受体-1(ox-LDL receptor-1, LOX-1)的表达上调, 加速ox-LDL的摄入。上述实验结果表明, Epac1参与了泡沫细胞和动脉粥样硬化的形成, 抑制Epac1可能是治疗动脉粥样硬化的一种潜在策略。

3.4 Epac与缺血-再灌注损伤

缺血-再灌注损伤是由于各种原因造成组织血液灌注减少而使细胞发生损伤。当细胞缺血缺氧时, 线粒体损伤, 导致自由基生成增多和细胞内Ca²⁺超载, 这是缺血-再灌注损伤的重要发病机制。临床中使用胰高血糖素样肽-1受体激动剂治疗急性心肌梗死, 此类激动剂可通过激活Epac/Rap通路下调反应性物质的生成进而预防I/R心脏损伤^[55]。Fazal等^[56]的研究证实, Epac1激活有助于缺血-再灌注损伤, Epac1在人类缺血性心衰中表达上升, *Epac1*基因敲除则能显著降低缺血-再灌注损伤时的梗死面积; 在缺血-再灌注损伤的情况下, 位于线粒体相关内质网膜的Epac1被可溶性腺苷酸环化酶激活, 开放线粒体膜通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore, MPTP), 诱导线粒体Ca²⁺超载, 说明Epac1是心脏中重要的应激反应开关^[56,57]。临床研究表明, 抑制Epac1表达可通过Epac1/Rap1信号通路缓解心肌缺血-再灌注导致的心肌细胞损伤^[7,58]。给*Epac1*基因敲除小鼠注射

Epac1的非竞争性抑制剂AM-001后, 发现小鼠心肌缺血-再灌注损伤的梗死面积减少^[40]。有研究发现, Epac通过Epac/PLC通路特异性激活蛋白激酶C, 同时蛋白激酶A也通过增加ROS激活蛋白激酶C, Epac和蛋白激酶A协同激活蛋白激酶C能介导对心脏缺血-再灌注损伤的保护作用^[59]。

4 小结

临床上, 调节细胞内cAMP浓度的药物已被广泛使用。然而, cAMP是一种细胞内普遍存在且作用广泛的信号分子, 对许多组织和系统的信号转导至关重要, 其作为治疗靶标不可避免地产生全身不良反应。自发现以来, 大量的科学研究揭示了Epac在身体各种组织中的重要功能。其中, Epac1在心力衰竭、心律失常、动脉粥样硬化、缺血再灌注损伤中的作用已得到证实。Epac是心血管疾病发生发展过程中的一个重要信号分子, 抑制其活性并没有产生显著的生理异常^[60], 说明可能比cAMP更具有组织特异性, 可作为心血管疾病的潜在治疗靶点。然而, Epac2不同亚型在心血管疾病中的具体作用及其靶向特异性仍有待探索。同时, 对Epac不同亚型的选择性剪切、不同亚型蛋白质的空间结构及其功能以及Epac信号转导下游的效应分子还需进行深入研究。因此, 可以采用组织特异性或条件性*Epac*敲除的动物模型以及应用Epac药理调节剂进行进一步的体内研究, 以阐明发挥作用的分子机制, 使其作为治疗靶点更具特异性, 为心血管疾病的治疗提供一种新的策略。

参考文献

- [1] Ould Amer Y, Hebert-Chatelain E. Mitochondrial cAMP-PKA signaling: what do we really know? *Biochim Biophys Acta*, 2018, 1859(9): 868-877
- [2] de Rooij J, Zwartkruis FJT, Verheijen MHG, et al. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature*, 1998, 396(6710): 474-477
- [3] Zhang H, Liu Y, Liu J, et al. cAMP-PKA/EPAC signaling and cancer: the interplay in tumor microenvironment. *J Hematol Oncol*, 2024, 17(1): 5
- [4] Zummo FP, Krishnanda SI, Georgiou M, et al. Exendin-4 stimulates autophagy in pancreatic β -cells via the

- RAPGEF/EPAC-Ca²⁺-PPP3/calcineurin-TFEB axis. *Autophagy*, 2022, 18(4): 799-815
- [5] Guillot B, Boileve A, Walton R, et al. Inhibition of EPAC1 signaling pathway alters atrial electrophysiology and prevents atrial fibrillation. *Front Physiol*, 2023, 14: 1120336
- [6] Robichaux Iii WG, Mei FC, Yang W, et al. Epac1 (exchange protein directly activated by cAMP 1) upregulates LOX-1 (oxidized low-density lipoprotein receptor 1) to promote foam cell formation and atherosclerosis development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020, 40(12): e322
- [7] Yang H, Xue W, Ding C, et al. Vitexin mitigates myocardial ischemia/reperfusion injury in rats by regulating mitochondrial dysfunction via Epac1-Rap1 signaling. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021(1): 9921982
- [8] Zhu D, Zhu R, Zhou X, et al. Exchange proteins directly activated by cAMP mediate cardiac repolarization and arrhythmogenesis during chronic heart failure. *Can J Physiol Pharmacol*, 2021, 99(7): 729-736
- [9] Joo E, Olson MF. Regulation and functions of the RhoA regulatory guanine nucleotide exchange factor GEF-H1. *Small GTPases*, 2021, 12(5-6): 358-371
- [10] Lee K. Epac: new emerging cAMP-binding protein. *BMB Rep*, 2021, 54(3): 149-156
- [11] Formoso K, Lezoualc'h F, Mialet-Perez J. Role of EPAC1 signalosomes in cell fate: friends or foes? *Cells*, 2020, 9(9): 1954
- [12] Shiozaki-Takagi Y, Ozaki N, Toyoda Y. Epac2 activation mediates glucagon-induced glucogenesis in primary rat hepatocytes. *J Diabetes Invest*, 2024, 15(4): 429-436
- [13] Pereira L, Rehmann H, Lao DH, et al. Novel Epac fluorescent ligand reveals distinct Epac1 vs. Epac2 distribution and function in cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(13): 3991-3996
- [14] Singhmar P, Huo XJ, Eijkelkamp N, et al. Critical role for Epac1 in inflammatory pain controlled by GRK2-mediated phosphorylation of Epac1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(11): 3036-3041
- [15] Banerjee U, Cheng X. Exchange protein directly activated by cAMP encoded by the mammalian Rapgef3 gene: structure, function and therapeutics. *Gene*, 2015, 570(2): 157-167
- [16] Sugawara K, Shibasaki T, Takahashi H, et al. Structure and functional roles of Epac2 (Rapgef4). *Gene*, 2016, 575(2): 577-583
- [17] Falginella FL, Kravec M, Drabinová M, et al. Binding of DEP domain to phospholipid membranes: more than just electrostatics. *Biochim Biophys Acta*, 2022, 1864(10): 183983
- [18] Schmidt M, Dekker FJ, Maarsingh H, et al. Exchange protein directly activated by cAMP (Epac): a multidomain cAMP mediator in the regulation of diverse biological functions. *Pharmacol Rev*, 2013, 65(2): 670-709
- [19] Gloerich M, Ponsioen B, Vliem MJ, et al. Spatial regulation of cyclic AMP-Epac1 signaling in cell adhesion by ERM proteins. *Mol Cell Biol*, 2010, 30(22): 5421-5431
- [20] Stožer A, Paradiž Leitgeb E, Pohorec V, et al. The role of cAMP in beta cell stimulus-secretion and intercellular coupling. *Cells*, 2021, 10(7): 1658
- [21] Takahashi T, Shibasaki T, Takahashi H, et al. Antidiabetic sulfonylureas and cAMP cooperatively activate Epac2A. *Sci Signal*, 2013, 6(298): ra94
- [22] Boulton S, Selvaratnam R, Blondeau JP, et al. Mechanism of selective enzyme inhibition through uncompetitive regulation of an allosteric agonist. *J Am Chem Soc*, 2018, 140(30): 9624-9637
- [23] Li HL, Go S, Chang JC, et al. Soluble adenylyl cyclase, the cell-autonomous member of the family. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2024, 1870(2): 166936
- [24] Tulsian NK, Ghode A, Anand GS. Adenylate control in cAMP signaling: Implications for adaptation in signalosomes. *Biochem J*, 2020, 477(16): 2981-2998
- [25] Hoy JJ, Salinas Parra N, Park J, et al. Protein kinase A inhibitor proteins (PKIs) divert GPCR-G α s-cAMP signaling toward EPAC and ERK activation and are involved in tumor growth. *FASEB J*, 2020, 34(10): 13900-13917
- [26] Sartre C, Peurois F, Ley M, et al. Membranes prime the RapGEF EPAC1 to transduce cAMP signaling. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 4157
- [27] Nuamnaichati N, Mangmool S, Chattipakorn N, et al. Stimulation of GLP-1 receptor inhibits methylglyoxal-induced mitochondrial dysfunctions in H9c2 cardiomyoblasts: potential role of Epac/PI3K/Akt pathway. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 805
- [28] Song X, Wen H, Zuo L, et al. Epac-2 ameliorates spontaneous colitis in *IL-10*^{-/-} mice by protecting the intestinal barrier and suppressing NF- κ B/MAPK signaling. *J Cell Mol Med*, 2022, 26(1): 216-227
- [29] Kosuru R, Chrzanowska M. Integration of rap1 and calcium signaling. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(5): 1616
- [30] Harvey KE, Tang S, LaVigne EK, et al. RyR2 regulates store-operated Ca²⁺ entry, phospholipase C activity, and electrical excitability in the insulinoma cell line INS-1. *PLoS ONE*, 2023, 18(5): e0285316
- [31] Pereira L, Bare DJ, Galice S, et al. β -Adrenergic induced SR Ca²⁺ leak is mediated by an Epac-NOS pathway. *J Mol Cell Cardiol*, 2017, 108: 8-16
- [32] Xiao J, Zhang B, Su Z, et al. Intracellular receptor EPAC regulates von Willebrand factor secretion from endothelial

- cells in a PI3K/eNOS-dependent manner during inflammation. *J Biol Chem*, 2021, 297(5): 101315
- [33] Liu T, Klusmann E. Targeting cAMP signaling compartments in iPSC-derived models of cardiovascular disease. *Curr Opin Pharmacol*, 2023, 71: 102392
- [34] Xu B, Li M, Wang Y, et al. GRK5 controls SAP97-dependent cardiotoxic β_1 adrenergic receptor-CaMKII signaling in heart failure. *Circ Res*, 2020, 127(6): 796-810
- [35] Li L, Cai H, Liu H, et al. β -adrenergic stimulation activates protein kinase C ϵ and induces extracellular signal-regulated kinase phosphorylation and cardiomyocyte hypertrophy. *Mol Med Rep*, 2015, 11(6): 4373-4380
- [36] Chan YH, Tsai FC, Chang GJ, et al. CD44 regulates Epac1-mediated β -adrenergic-receptor-induced Ca^{2+} -handling abnormalities: Implication in cardiac arrhythmias. *J Biomed Sci*, 2023, 30(1): 55
- [37] Okumura S, Fujita T, Cai W, et al. Epac1-dependent phospholamban phosphorylation mediates the cardiac response to stresses. *J Clin Invest*, 2014, 124(6): 2785-2801
- [38] Mazevet M, Belhade A, Ribeiro M, et al. EPAC1 inhibition protects the heart from doxorubicin-induced toxicity. *eLife*, 2023, 12: e83831
- [39] Jin H, Fujita T, Jin M, et al. Cardiac overexpression of Epac1 in transgenic mice rescues lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction and inhibits Jak-STAT pathway. *J Mol Cell Cardiol*, 2017, 108: 170-180
- [40] Laudette M, Coluccia A, Sainte-Marie Y, et al. Identification of a pharmacological inhibitor of Epac1 that protects the heart against acute and chronic models of cardiac stress. *Cardiovasc Res*, 2019, 115(12): 1766-1777
- [41] Liao M, Xie Q, Zhao Y, et al. Main active components of Si-Miao-Yong-An decoction (SMYAD) attenuate autophagy and apoptosis via the PDE5A-AKT and TLR4-NOX4 pathways in isoproterenol (ISO)-induced heart failure models. *Pharmacol Res*, 2022, 176: 106077
- [42] Li Y, Tian Y, Shi S, et al. Epac1 participates in β_1 -adrenoreceptor autoantibody-mediated decreased autophagic flux in cardiomyocytes. *Biochim Biophys Acta*, 2023, 1870(7): 119512
- [43] Laudette M, Sainte-Marie Y, Cousin G, et al. Cyclic AMP-binding protein Epac1 acts as a metabolic sensor to promote cardiomyocyte lipotoxicity. *Cell Death Dis*, 2021, 12(9): 824
- [44] Boileve A, Romito O, Hof T, et al. EPAC1 and 2 inhibit K^+ currents via PLC/PKC and NOS/PKG pathways in rat ventricular cardiomyocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2024, 327(3): C557-C570
- [45] Prajapati R, Fujita T, Suita K, et al. Usefulness of exchanged protein directly activated by cAMP (Epac) 1-inhibiting therapy for prevention of atrial and ventricular arrhythmias in mice. *Circ J*, 2019, 83(2): 295-303
- [46] Wagner M, Sadek MS, Dybkova N, et al. Cellular mechanisms of the anti-arrhythmic effect of cardiac PDE2 overexpression. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(9): 4816
- [47] Zhang MX, Zheng JK, Wang WW, et al. Exchange-protein activated by cAMP (EPAC) regulates L-type calcium channel in atrial fibrillation of heart failure model. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(5): 2200-2207
- [48] Yang Z, Kirton HM, Al-Owais M, et al. Epac2-Rap1 signaling regulates reactive oxygen species production and susceptibility to cardiac arrhythmias. *Antioxid Redox Signal*, 2017, 27(3): 117-132
- [49] Yip KP, Ribeiro-Silva L, Cha B, et al. Epac induces ryanodine receptor-dependent intracellular and inter-organellar calcium mobilization in MPKC CD cells. *Front Physiol*, 2023, 14: 1250273
- [50] Valli H, Ahmad S, Sriharan S, et al. Epac-induced ryanodine receptor type 2 activation inhibits sodium currents in atrial and ventricular murine cardiomyocytes. *Clin Exp Pharma Physio*, 2018, 45(3): 278-292
- [51] García-Ponce A, Schuster K, Døskeland SO, et al. Epac1 is crucial for maintenance of endothelial barrier function through a mechanism partly independent of rac1. *Cells*, 2020, 9(10): 2170
- [52] Kato Y, Yokoyama U, Yanai C, et al. Epac1 deficiency attenuated vascular smooth muscle cell migration and neointimal formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35(12): 2617-2625
- [53] Wang H, Robichaux WG, Wang Z, et al. Inhibition of Epac1 suppresses mitochondrial fission and reduces neointima formation induced by vascular injury. *Sci Rep*, 2016, 6(1): 36552
- [54] Zou F, Li Y, Zhang S, et al. DP1 (prostaglandin D_2 receptor 1) activation protects against vascular remodeling and vascular smooth muscle cell transition to myofibroblasts in angiotensin II-induced hypertension in mice. *Hypertension*, 2022, 79(6): 1203-1215
- [55] Boshchenko AA, Maslov LN, Mukhomedzyanov AV, et al. Peptides are cardioprotective drugs of the future: the receptor and signaling mechanisms of the cardioprotective effect of glucagon-like peptide-1 receptor agonists. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(9): 4900
- [56] Fazal L, Laudette M, Paula-Gomes S, et al. Multi-functional mitochondrial epac1 controls myocardial cell death. *Circ Res*, 2017, 120(4): 645-657
- [57] Lewis MJ, Khaliulin I, Hall K, et al. Cardioprotection of immature heart by simultaneous activation of PKA and epac: a role for the mitochondrial permeability transition pore. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(3): 1720

- [58] El-Mokadem BM, El-Abhar HS, Abdallah DM, et al. Epac-1/Rap-1 signaling pathway orchestrates the reno-therapeutic effect of ticagrelor against renal ischemia/reperfusion model. [Biomed Pharmacother](#), 2021, 139: 111488
- [59] Khaliulin I, Bond M, James AF, et al. Functional and cardioprotective effects of simultaneous and individual activation of protein kinase A and Epac. [Br J Pharmacol](#), 2017, 174(6): 438-453
- [60] Robichaux Iii WG, Cheng X. Intracellular cAMP sensor EPAC: physiology, pathophysiology, and therapeutics development. [Physiol Rev](#), 2018, 98(2): 919-1053