

lower respiratory tract infections in "real life" an international, multicenter poststudy survey (ProREAL)[J]. Arch Intern Med, 2012, 172(9): 715-722.

[24] Christ-Crain M, Müller B. Procalcitonin in bacterial infections - hype, hope, more or less[J]. Swiss Med Wkly, 2005, 135(31/32): 451-460.

[25] Lacoma A, Prat C, Andreo F, et al. Value of procalcitonin, C-reactive protein, and neopterin in exacerbations of

chronic obstructive pulmonary disease[J]. Inter J COPD, 2011, 6(1): 157-169.

[26] Tang H, Huang T, Jing JH, et al. Effect of procalcitonin-guided treatment in patients with infections: a systematic review and meta-analysis[J]. Infection, 2009, 37(6): 497-507.

(收稿日期: 2013-03-10 修回日期: 2013-05-22)

· 综述 ·

黏附因子 CD44 的活化状态及其在肿瘤靶向治疗中的研究进展*

侯利丹 综述, 高 锋 审核

(上海交通大学附属第六人民医院中心实验室 200233)

关键词: 肿瘤; CD44; 透明质酸

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2013.27.044

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)27-3313-03

CD44(cluster of differentiation 44)指白细胞分化抗原簇第 44 号,是一类重要的黏附分子,广泛分布于细胞表面,如淋巴细胞、单核细胞、成纤维细胞、内皮细胞等^[1]。不同细胞表面 CD44 与透明质酸(HA)结合活性不同,活化状态存在很大差异。许多正常细胞表面 CD44 处于相对静止状态,而许多肿瘤细胞表面 CD44 处于高度活化状态,能与其主要配体 HA 结合,参与肿瘤的发生、发展及转移等^[2-6]。目前,有关 CD44 活化的调控机制仍未完全阐明,但随着对 CD44 研究的不断深入,其与肿瘤的关系越来越受关注,特别是以 CD44 为靶点进行肿瘤靶向治疗已经成为肿瘤研究的焦点^[7-9]。本文对 CD44 分子活化状态及其在肿瘤靶向治疗中的作用综述如下。

1 CD44 的结构与生物学功能

CD44 基因由一组高度保守的外显子组成,约有 50~60 kb,位于人的第 11 号和小鼠的第 2 号染色体上^[10]。根据其外显子的表达方式不同可分为两型:CD44 标准型(CD44s)和 CD44 变异型(CD44v)。CD44 蛋白结构可分为 3 部分:N-端结构域、跨膜结构域和 C-端结构域。N-端结构域含有与 HA 结合的必须序列,是 CD44 发挥生物学功能的重要区域,C-端结构域可作为蛋白激酶 C 的底物被磷酸化,参与信号转导过程,并且通过锚蛋白与细胞骨架相连。CD44 蛋白的主要功能可归纳为:(1)作为归巢受体介导淋巴细胞与毛细血管后小静脉中的高柱状内皮细胞结合,促使淋巴细胞穿过血管壁回到淋巴组织;(2)参与淋巴细胞,尤其是 T 淋巴细胞及自然杀伤细胞等的激活,在激活过程中,CD44 与其主要配体 HA 或相应抗体结合,作为共刺激分子,能够增强淋巴细胞的功能;(3)参与细胞间的黏附,促进成纤维细胞和淋巴细胞与 HA、硫酸软骨素及层粘连蛋白等细胞外基质结合;(4)能与细胞骨架蛋白结合,参与细胞伪足形成,并与细胞的迁移运动有关^[11-12]。

2 细胞表面 CD44 的活化状态

CD44 是 HA 在细胞表面最主要的受体。HA 是一种由 D-N-乙酰氨基葡萄糖和 D-葡萄糖醛酸为结构单元的高分子黏多糖,为细胞外基质的主要组成部分,能够与肿瘤细胞表面 CD44 结合,参与肿瘤的侵袭和转移。但是 CD44 与 HA 的结

合并不完全是自发的。CD44 处于 3 种不同状态:(1)静止状态,不能与 HA 结合;(2)可诱导激活状态,CD44 需要在特异抗 CD44 单抗或者激活剂(如佛波酯)的诱导下,才能够被激活,与 HA 结合;(3)组成性激活状态,不需要任何激活剂,CD44 即可以与 HA 结合^[13]。CD44 的活化状态主要体现在与其主要配体 HA 的结合活性上,受到多种因素的影响。研究发现,大部分造血系统细胞表面 CD44 处于诱导激活状态,不能自发结合 HA^[14],如 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞,经佛波酯或 CD44 抗体刺激可使其表面 CD44 受体活化,与 HA 结合。Levesque 等^[4]观察到新鲜分离的人外周血单核细胞和淋巴细胞均不能与 HA 结合,在体外培养 8~16 h 后,部分单核细胞即可与 HA 结合,植物血凝素和抗体 OKT3 刺激可显著提高单核细胞与 HA 结合活性,而大部分淋巴细胞仍不能与 HA 结合,提示外周血单核细胞表面 CD44 处于可诱导激活状态,经诱导可与 HA 结合,许多淋巴细胞表面 CD44 处于静止状态,不能与 HA 结合。许多肿瘤细胞如乳腺癌细胞、肺癌细胞,其表面 CD44 能自发结合 HA,处于组成性激活状态^[15-16]。

3 CD44 不同活化状态的调控机制

CD44 的不同活化状态究竟受何调控,目前仍未完全阐明。研究发现,体外培养后多数单核细胞表达高相对分子质量 CD44v,具有活性,而大部分淋巴细胞不表达,处于静止状态,仅少数表达 CD44v6 的淋巴细胞处于活化状态^[17],表明 CD44 与 HA 的结合可能与 CD44 异构体相关。Perschl 等^[18]发现 CD44 细胞质段缺失可使 T 淋巴瘤细胞丧失与 HA 结合的活性,但是将细胞质段缺失的 CD44 通过二硫键结合形成 CD44 二聚体后,CD44 能够与 HA 结合,表明 CD44 细胞质段可能参与 CD44 在细胞膜上的分布,促使 CD44 在细胞膜上的聚集,诱导其与 HA 结合,该研究提示 CD44 在细胞表面的分布变化,可调节其与 HA 的结合。Kato 等^[3]发现中国仓鼠卵巢细胞 CD44 糖基化缺失株可以结合 HA。用糖基化抑制剂处理 CD44 失活的细胞株,可以使 CD44 相对分子质量降低并促使其与 HA 结合,提示 CD44 过度糖基化可能占据其与 HA 的结合区域,导致 CD44 不能与 HA 结合。Peck 等^[19]将 CD44 阴

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81071814,81172027,81272479)。 作者简介:侯利丹(1988~),硕士在读,主要从事肿瘤靶向治疗的研究。

性的人黑色素瘤细胞和鼠 T 淋巴瘤细胞转染 CD44, 转染可以引起其与 HA 结合。但是, Swiss 小鼠胚细胞 NIH3T3 转染 CD44 后, 仍不能结合 HA, 提示 CD44 与 HA 结合同时受细胞类型的影响^[5]。HA 与 CD44 的结合也受到 HA 状态的影响, 有学者认为交联状态的 HA 可能提高 HA 与 CD44 的亲合力^[20]。综上所述, CD44 与 HA 结合主要与 CD44 构型^[21]、受体分布^[18]、糖基化^[3, 22]等相关, 同时也受细胞类型^[5]、HA 自身存在状态^[20]等调控。

4 肿瘤细胞活化的 CD44 作为靶点在肿瘤靶向治疗中的应用

许多正常细胞与肿瘤细胞均表达 CD44, 但其活化状态不尽相同。Tzircotis 等^[5]检测乳腺癌细胞 MDA-MB-231、MDA-MB-468 及 Swiss 小鼠胚细胞 NIH3T3 表面 CD44 的表达水平和活性, 发现上述细胞均高表达 CD44, 正常小鼠胚细胞 NIH3T3 与 HA 结合活性极低, 乳腺肿瘤细胞 MDA-MB-231、MDA-MB-468 与 HA 结合活性很高; Bachar 等^[23]也证实头颈癌患者肿瘤细胞表面 CD44 能结合 HA, 瘤旁正常组织不能与 HA 结合; 本实验室研究发现, 正常细胞外周血单个核细胞 PBMCs、Swiss 小鼠胚细胞 NIH3T3、人皮肤原代细胞、小鼠肺成纤维细胞 L929、小鼠成骨细胞 MC 3T3-E1 等正常细胞高表达 CD44, 但是 CD44 与 HA 结合活性极低, 处于相对静止状态; 人乳腺癌细胞 MDA-MB-231、MDA-MB-468、Hs578T、BT-549 细胞表面也高表达 CD44, 且 CD44 与 HA 结合活性很强, 处于高度活化状态, 与前人研究结果相符。以上研究提示, CD44 在正常细胞上多处于静止状态, 不具有与 HA 结合的活性, 在肿瘤细胞上则处于高度活化状态, 能够结合 HA。

基于 CD44 在正常细胞和肿瘤细胞表面活化状态差异, 提示肿瘤细胞表面高度活化的 CD44 能够作为理想的靶点分子, 用于肿瘤靶向治疗。

目前, 已有许多学者以 CD44 为靶点分子, 通过阻断 CD44 与 HA 结合从而降低肿瘤转移^[24-26], 进行肿瘤靶向治疗。Zawadzki 等^[27]运用 CD44s 受体蛋白、CD44v10 受体蛋白和 CD44 单克隆抗体阻断小鼠 B16F10 黑色素瘤 CD44 与其配体 HA 结合, 发现在不进行任何其他处理的情况下, CD44s 受体蛋白和 CD44v10 受体蛋白可使肿瘤在肺部的转移量分别降低 70% 和 60%, CD44 单克隆抗体也取得了基本相同的效果。

近年来, 随着纳米载药系统研究的兴起, 纳米颗粒连接靶向分子 HA, 针对肿瘤表面 CD44 进行肿瘤靶向治疗取得很大进展。Choi 等^[28]将 HA 经过疏水性修饰制作成球形 HA 纳米颗粒(HA-NPs), HA-NPs 中间为疏水核心, 可以运载疏水性抗肿瘤药物, 用荧光标记 HA-NPs, 分别作用于高表达 CD44 的鳞状癌细胞 SCC7 和正常非洲绿猴肾纤维细胞 CV-1, 结果显示 SCC7 可以有效摄取 HA-NPs, 而 CV-1 没有明显摄取。将 SCC7 细胞悬液种入裸鼠背部皮下, 构建裸鼠鳞癌模型, 尾静脉注射荧光标记的 HA-NPs 检测其在裸鼠体内的靶向性, 结果表明 HA-NPs 靶向结合癌细胞表面 CD44, 有效提高其肿瘤部位的浓度。Auzenne 等^[29]发现 HA-PTX 对 CD44 阳性人卵巢癌细胞 SKOV-3ip 和 NMP-1 的杀伤活性明显大于单纯 PTX, 加入过量游离的 HA 能够阻断这种增强的杀伤活性, 提示 HA-PTX 通过靶向细胞表面 CD44, 达到增强杀伤靶向细胞的效果。Rivkin 等^[30]在 PTX 脂质体上连接 HA 制得带靶向性的 PTX 脂质体(PTX-GAGs), 为了明确 PTX-GAGs 是否与肠癌细胞 CT-26 高表达的 CD44 结合, 将细胞与 PTX-GAGs 共孵育 0.5、6、12 h 后, 加入 CD44 单克隆抗体检测 CD44 表达, 结果发现 0.5 h 时完全不能检测到细胞 CD44 表达, 6 h 时约半数细胞可检测到 CD44 表达, 12 h 时所有细胞均能检测到

CD44 表达, 说明 0.5 h 时 PTX-GAGs 与 CD44 结合, 占据了 CD44 全部位点, 12 h 后完全进入细胞, 释放了 CD44 结合位点, 证实 PTX-GAGs 主要依赖与 CD44 结合, 靶向进入细胞。小鼠体内实验也显示, PTX-GAGs 主要集中于肿瘤部位, 在同样的处理条件下, PTX-GAGs 抑瘤效果达市售药泰素的 4 倍。这种现象不仅局限于肠癌细胞, 游离多西环素作用于小鼠肺腺癌细胞 D122 1 h, 药物几乎未进入细胞, 不对细胞造成杀伤, 而 DOX-GAGs 处理 1 h 后, 细胞内明显呈现药物聚集, 说明药物可以通过 CD44 与 HA 靶向结合主动进入细胞内, 显著提高细胞内药物浓度。Bachar 等^[23]研究了以 HA 为靶向分子的丝裂霉素脂质体(MMC-GAGs)对 5 例头颈癌患者的作用, 结果显示肿瘤组织 CD44 与 HA 有很高的结合活性, 而瘤旁正常细胞 CD44 基本不结合 HA, 体外细胞杀伤实验结果也证实 MMC-GAGs 选择性靶向杀伤头颈癌细胞, 与 PTX 相比明显提高杀伤活性, 而未杀伤瘤旁正常细胞, 证明 MMC-GAGs 在体内应用时, HA 仅与肿瘤细胞表面 CD44 结合, 将药物运输至肿瘤部位, 不会杀伤表达 CD44 的正常细胞, 在提高药物疗效的同时也保证了体内用药的安全性。Coradini 等^[31]将透明质酸丁酸钠颗粒(HA-But)分别作用于高表达 CD44 的肝癌细胞 HepB3 和低表达 CD44 的肝癌细胞 HepG2 上, 发现 HA-But 对细胞的抑制率较单纯丁酸提高了 10 倍左右, 在相同条件下 HA-But 对 HepB3 的杀伤明显高于 HepG2, 但是充分延长作用时间 HA-But 对低表达 CD44 的 HepG2 也有明显杀伤作用, 提示 HA-But 与 CD44 结合后很快进入细胞, CD44 可重新结合 HA, 保证药物在细胞内的浓度, 抑制肿瘤生长。

以上研究表明, 肿瘤细胞表面活化状态的 CD44 是肿瘤治疗的一个理想靶点, 运用 HA^[26]、CD44 单克隆抗体^[27]、CD44 受体蛋白^[27, 32]等阻断 CD44 与 HA 的结合, 可以有效减小肿瘤体积, 抑制肿瘤转移; 以 HA 为靶向分子制作药物靶向 CD44 能够有效提高药物在肿瘤部位的聚集, 增加药物的生物利用度, 达到靶向治疗肿瘤的效果。

5 展望

综上所述, CD44 以不同的状态广泛分布于各类正常和肿瘤细胞上, 特别是活化状态的 CD44 在肿瘤发生、发展及转移中发挥着重要作用, 以肿瘤细胞表面 CD44 为靶点进行肿瘤的靶向治疗为肿瘤治疗提供了新的方向。但关于 CD44 与 HA 结合的调控机制尚不完全清楚, 有待进一步深入地研究。

参考文献:

- [1] Sneath RJ, Mangham DC. The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia[J]. *Mol Pathol*, 1998, 51(4):191-200.
- [2] Afify A, Purnell P, Nguyen L. Role of CD44s and CD44v6 on human breast cancer cell adhesion, migration, and invasion[J]. *Exp Mol Pathol*, 2009, 86(2):95-100.
- [3] Katoh S, Zheng Z, Oritani K, et al. Glycosylation of CD44 negatively regulates its recognition of hyaluronan[J]. *J Exp Med*, 1995, 182(2):419-429.
- [4] Levesque MC, Haynes BF. In vitro culture of human peripheral blood monocytes induces hyaluronan binding and up-regulates monocyte variant CD44 isoform expression[J]. *J Immunol*, 1996, 156(4):1557-1565.
- [5] Tzircotis G, Thorne RF, Isacke CM. Chemotaxis towards hyaluronan is dependent on CD44 expression and modulated by cell type variation in CD44-hyaluronan binding[J].

- J Cell Sci, 2005, 118(21): 5119-5128.
- [6] Platt VM, Szoka FC Jr. Anticancer therapeutics: targeting macromolecules and nanocarriers to hyaluronan or CD44, a hyaluronan receptor[J]. Mol Pharm, 2008, 5(4): 474-486.
- [7] Li SD, Howell SB. CD44-targeted microparticles for delivery of cisplatin to peritoneal metastases[J]. Mol Pharm, 2009, 7(1): 280-290.
- [8] Marangoni E, Lecomte N, Durand L, et al. CD44 targeting reduces tumour growth and prevents post-chemotherapy relapse of human breast cancers xenografts[J]. Br J Cancer, 2009, 100(6): 918-922.
- [9] Choi KY, Yoon HY, Kim JH, et al. Smart nanocarrier based on PEGylated hyaluronic acid for cancer therapy [J]. ACS Nano, 2011, 5(11): 8591-8599.
- [10] Hertweck MK, Erdfelder F, Kreuzer KA. CD44 in hematological neoplasias[J]. Ann Hematol, 2011, 90(5): 493-508.
- [11] Hanagiri T, Shinohara S, Takenaka M, et al. Effects of hyaluronic acid and CD44 interaction on the proliferation and invasiveness of malignant pleural mesothelioma[J]. Tumour Biol, 2012, 33(6): 2135-2341.
- [12] Hernández D, Miquel-Serra L, Docampo MJ, et al. Role of versican V0/V1 and CD44 in the regulation of human melanoma cell behavior[J]. Int J Mol Med, 2011, 27(2): 269-275.
- [13] Lesley J, English N, Perschl A, et al. Variant cell lines selected for alterations in the function of the hyaluronan receptor CD44 show differences in glycosylation[J]. J Exp Med, 1995, 182(2): 431-437.
- [14] Smadja-Joffe F, Legras S, Girard N, et al. CD44 and hyaluronan binding by human myeloid cells[J]. Leuk Lymphoma, 1996, 21(5/6): 407-420.
- [15] Herrera-Gayol A, Jothy S. Effects of hyaluronan on the invasive properties of human breast cancer cells in vitro [J]. Int J Exp Pathol, 2008, 82(3): 193-200.
- [16] Ohashi R, Takahashi F, Cui R, et al. Interaction between CD44 and hyaluronate induces chemoresistance in non-small cell lung cancer cell[J]. Cancer Lett, 2007, 252(2): 225-234.
- [17] DeGrendele HC, Kosfisz M, Estess P, et al. CD44 activation and associated primary adhesion is inducible via T cell receptor stimulation[J]. J Immunol, 1997, 159(6): 2549-2553.
- [18] Perschl A, Lesley J, English N, et al. Role of CD44 cytoplasmic domain in hyaluronan binding[J]. Eur J Immunol, 2005, 35(2): 495-501.
- [19] Peck D, Isacke CM. CD44 phosphorylation regulates melanoma cell and fibroblast migration on, but not attachment to, a hyaluronan substratum[J]. Curr Biol, 1996, 6(7): 884-890.
- [20] Lesley J, Gál I, Mahoney DJ, et al. TSG-6 modulates the interaction between hyaluronan and cell surface CD44[J]. J Biol Chem, 2004, 279(24): 25745-25754.
- [21] Stamenkovic I, Aruffo A, Amiot M, et al. The hematopoietic and epithelial forms of CD44 are distinct polypeptides with different adhesion potentials for hyaluronate-bearing cells[J]. EMBO J, 1991, 10(2): 343-348.
- [22] English NM, Lesley JF, Hyman R. Site-specific de-N-glycosylation of CD44 can activate hyaluronan binding, and CD44 activation states show distinct threshold densities for hyaluronan binding[J]. Cancer Res, 1998, 58(16): 3736-3742.
- [23] Bachar G, Cohen K, Hod R, et al. Hyaluronan-grafted particle clusters loaded with Mitomycin C as selective nanovectors for primary head and neck cancers[J]. Biomaterials, 2011, 32(21): 4840-4848.
- [24] Bartolazzi A, Peach R, Aruffo A, et al. Interaction between CD44 and hyaluronate is directly implicated in the regulation of tumor development[J]. J Exp Med, 1994, 180(1): 53-66.
- [25] Guo Y, Ma J, Wang J, et al. Inhibition of human melanoma growth and metastasis in vivo by anti-CD44 monoclonal antibody[J]. Cancer Res, 1994, 54(6): 1561-1565.
- [26] Zeng C, Toole BP, Kinney SD, et al. Inhibition of tumor growth in vivo by hyaluronan oligomers[J]. Int J Cancer, 1998, 77(3): 396-401.
- [27] Zawadzki V, Perschl A, Rösel M, et al. Blockade of metastasis formation by CD44-receptor globulin[J]. Int J Cancer, 1998, 75(6): 919-924.
- [28] Choi KY, Chung H, Min KH, et al. Self-assembled hyaluronic acid nanoparticles for active tumor targeting [J]. Biomaterials, 2010, 31(1): 106-114.
- [29] Auzenne E, Ghosh SC, Khodadadian M, et al. Hyaluronic acid-paclitaxel: antitumor efficacy against CD44⁺ human ovarian carcinoma xenografts[J]. Neoplasia, 2007, 9(6): 479-486.
- [30] Rivkin I, Cohen K, Koffler J, et al. Paclitaxel-clusters coated with hyaluronan as selective tumor-targeted nanovectors[J]. Biomaterials, 2010, 31(27): 7106-7114.
- [31] Coradini D, Zorzet S, Rossin R, et al. Inhibition of hepatocellular carcinomas in vitro and hepatic metastases in vivo in mice by the histone deacetylase inhibitor HA-But[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(14): 4822-4830.
- [32] Sy MS, Guo YJ, Stamenkovic I. Inhibition of tumor growth in vivo with a soluble CD44-immunoglobulin fusion protein[J]. J Exp Med, 1992, 176(2): 623-627.

(收稿日期: 2013-03-13 修回日期: 2013-06-22)