



CD73 在骨代谢中作用的研究进展

刘显华^{1,2} 综述 梅海波² 审核

先天性胫骨假关节(CPT)是由于骨发育异常所致的胫骨畸形和特殊类型的骨折不愈合^[1]。而实现胫骨假关节的骨性愈合和维持骨性连接则是治疗 CPT 的关键。虽然目前有很多该病治疗方法的报道,使该病的治愈率得到很大改观,但其治愈率仍存在很大差异^[2]。手术方法的改进虽提高了 CPT 的治愈率,但仍存在治疗失败,如假关节不愈合,骨性连接不稳定,甚至导致截肢的可能。该病的骨延迟愈合或不愈合是否与成骨因素缺陷有关仍是未知。骨愈合是一个复杂而精细的多级再生过程,成骨细胞是骨形成的主要功能细胞,在骨重塑中起着重要的作用。最近有研究证明,胞外-5'-核苷酸酶(CD73)是一种影响间充质干细胞(MSCs)向成骨细胞和软骨细胞分化的调节因子,可以引导骨再生^[3]。近 20 年来的研究表明,CD73 是一个主要的间充质干细胞的细胞表面标志物,然而 CD73 在细胞中的功能知之甚少。有研究表明 CD73 参与间充质干细胞(MSC)分化后的循环压缩载荷^[3],在细胞外腺苷的生成中也起着重要的作用。它可以通过调节核苷酸的代谢和腺苷的浓度影响成骨细胞功能^[4]。本文就 CD73 在骨代谢中的作用的研究进展作一综述。

一、CD73 的表达及其影响因素

胞外-5'-核苷酸酶(CD73)是通过糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚定于细胞膜外表面的一种糖蛋白。不仅参与嘌呤核苷酸的补救合成途径,生成腺苷与腺苷受体相互作用,还是一种重要的免疫信号分子,参与跨膜信号转导及细胞黏附。它催化 5'-核糖和脱氧核糖核苷酸的磷酸酯键的水解得到相应的核糖和脱氧核糖核苷和磷酸^[5]。

CD73 是一种根据国际社会为细胞疗法(ISCT)定义的间充质干细胞的主要细胞表面标志物^[6]。它广泛表达于人体组织细胞表面,包括肝细胞、成纤

维细胞、内皮细胞、淋巴细胞和神经胶质细胞、近端肾小管上皮细胞等^[7]。它的表达是由 Wnt-bcatenin 的信号调节,Wnt-bcatenin 信号也是已知骨代谢的重要途径^[8,9]。另一个转录因子——缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)对于骨再生和骨骼发育是重要的,它也参与调节 CD73 的表达^[10]。CD73 的表达也受 Wnt- β -连环蛋白的信号影响,是骨稳态的主要途径之一。在骨愈合早期阶段的缺氧血肿中发现,CD73 也受细胞因子和生长因子调控,如 TGF- β 、IL-1 β 和 TNF- α ^[5]。

另外,最近研究提供的证据表明,体外细胞受机械应力导致细胞膜外表面标志物 CD73 的表达降低^[11,12]。在研究中,骨髓间充质干细胞进行循环压缩载荷后 3 d,CD73 蛋白和 mRNA 表达显著降低^[13]。值得注意的是,移除载荷刺激后这种影响 CD73 表达的效果仍可持续 1 周。在另一项研究中,来源于脐带的间充质干细胞进行持续单向延伸 10 d,CD73 的表达也随着应变的增加显著下降^[14]。

二、CD73 在骨代谢中的作用

1. CD73 参与成骨细胞分化:骨愈合是一个复杂而精细的多级再生过程,而骨折愈合的基础是骨膜成骨细胞再生。在骨折发生时,骨折处除骨骼损伤外,还伴有神经、血管的破坏,并在骨断裂区引起活化凝血反应以及形成局部血肿。大量炎性细胞、成纤维细胞和间充质干细胞(MSCs)聚集在骨折断裂区在局部会形成一个炎性细胞因子聚集和低氧分压(缺氧)环境。一旦干细胞已经达到了骨折的位置,它们都面临着炎性细胞因子聚集和低氧分压(缺氧)环境影响,且伴随受机械应力的影响^[12]。这种情况可能会影响到间充质干细胞^[15],从而影响破骨细胞骨吸收和成骨细胞骨形成之间的平衡关系,进而影响骨骼形态及骨骼重塑的过程。

有学者在对小鼠实验研究中得出:CD73 缺乏会导致雄性小鼠的骨小梁骨矿物质含量降低,伴有血清骨钙素水平降低,同时颅盖骨和股骨的骨成骨细胞 mRNA 标志物的表达降低。CD73 缺陷小鼠本身的颅骨成骨细胞产生碱性磷酸酶(ALP)和钙化骨结节,致使骨小梁体积、厚度及骨密度显著降低。在不

一样的皮质骨,骨小梁体积厚度显著降低。与此相反,CD73 表达的 MC3T3 - E1 细胞则表达更多的骨钙素(Bglap)和骨唾液酸(IBSP),并产生更多的碱性磷酸酶(ALP)和钙化骨结节^[16]。这项体外的系列研究显示,CD73 调节体外成骨细胞增殖和分化。

我们除了了解 CD73 在成骨细胞上的分化作用以外,对 CD73 对骨髓间充质干细胞的分化知之甚少^[17]。杜晶春^[18]等通过体外诱导分化实验发现:在成骨诱导条件下,骨髓间充质干细胞(hMSCs)能够被诱导为成骨细胞,形成典型、致密的岛状细胞结构和钙化结节。流式分析结果显示 hMSCs 高表达 CD73、CD105 和 CD166 分子。另外,有学者提出,CD73 介导 MSC 成骨分化的影响可能是通过腺苷受体信号传递。

2. CD73 通过调节核苷酸的代谢和腺苷浓度影响骨细胞功能:腺苷在调节细胞的功能中有重要生物作用,负责骨重塑的细胞也不例外。体外和体内的研究证明了负责骨吸收的破骨细胞其形成和功能需要 A_1 AR 信号^[19]。体外研究表明,负责骨形成的成骨细胞的增殖和分化,可能是由 AR 信号调制^[15]。激活 AR 产生的外腺苷,至少在一部分,由外生 -5'-核苷酸:CD73 这种分子的表达,通过经典 Wnt 和 HIF - 1 α 的途径,在成骨细胞中诱使细胞内信息传导。因此,CD73 可能通过调节核苷酸的代谢和腺苷浓度,影响成骨细胞功能,发挥 CD73 在骨代谢中的作用。

研究表明在成骨钙化培养过程中,MC3T3 - E1 细胞中腺苷 A_{2A} 受体(A_{2A} AR)和 A_{2B} 受体(A_{2B} AR)的表达增加。与此相反, A_{2A} AR 拮抗剂治疗的原胶原 α_2 I 型阳性的小鼠骨髓充质干细胞在培养中的数量减少^[20]。此外,CD73 在表达 MC3T3 - E1 细胞的骨钙素和骨唾液酸的表达增强被抑制于 A_{2B} AR 的拮抗剂^[16]。MC3T3 - E1 细胞表达腺苷 A_{2A} 受体(A_{2A} AR)和 A_{2B} 受体(A_{2B} AR)和这些受体的表达增加了成骨细胞分化。在过度表达 CD73 的 MC3T3 - E1 细胞中观察到,骨钙素(OC)和骨唾液蛋白(BSP)的表达增强,可通过用 A_{2B} AR 拮抗剂所抑制。总的来说,CD73 通过 A_{2B} AR 信号产生腺苷积极调节成骨细胞分化。这些研究结果表明,CD73、腺苷及腺苷受体在促进 MSCs 分化中可能也发挥了关键作用。因此,研究者推测 CD73 在 MSC - 介导的骨折愈合中起着根本性的作用,并可能提供了一种未知因素引导这一再生过程。

另外一些研究也表明腺苷支持破骨细胞的形成

和骨吸收^[19]。在体外破骨细胞缺乏所需的 A_{1A} AR 的 A_1 AR 信号,可导致小鼠骨量增加^[21]。AR 受体激活抑制骨保护素的表达,但不影响在人类成骨细胞中 NF - κ B 配体表达的受体激活剂。在成骨细胞分化过程中观察到 A_{2A} AR 和 A_{2B} AR 的高程表达式。这些 AR 亚型加上 GS 蛋白质,可以启动信号,刺激骨形成^[22]。有趣的是在体外介导不只是 A_{2A} AR, A_{2B} AR 参与。

另一方面,一些体外研究表明腺苷在成骨细胞的作用。AR 参与诱导小鼠成骨细胞的有丝分裂和防止细胞死亡^[23]。内源性腺苷是由 CD73 促进成骨细胞分化通过 A_{2B} AR 信号所产生的。 A_{2B} AR 作为第二信使,耦合到 Gs 和使用 cAMP(环磷酸腺苷)的一个七跨膜的 G 蛋白偶联受体。而据研究报告,通过骨形态发生蛋白信号增强,cAMP 促进成骨细胞功能和骨形成的合成代谢作用^[24]。

综上所述,CD73 是一种间充质干细胞的主要细胞表面标志物。它的表达是由 Wnt - bcatenin 的信号调节,同时受到缺氧诱导因子 - 1 α (HIF - 1 α)、Wnt - β - 连环蛋白的信号以及细胞因子和生长因子调控,在骨再生和骨骼发育中是一重要因素,也是骨稳态的主要途径之一。除了机械微环境的影响,在骨愈合过程中生物微环境的改变也可能是 CD73 介导的 MSC 的因素。CD73 是另一种 MSCs 向成骨细胞和软骨细胞分化的调节因子,引导骨再生的要素。也可能通过调节核苷酸的代谢和腺苷浓度,影响成骨细胞功能、发挥 CD73 在骨代谢中的作用。

参考文献

- 1 Feldman DS, Jordan C, Fonseca L. Orthopaedic manifestations of neurofi bromatosis type 1 [J]. J Am Acad Orthop Surg, 2010, 18(6): 346-57.
- 2 梅海波,赫荣国,刘昆,等. 联合手术技术治疗儿童先天性胫骨假关节[J]. 中华小儿外科杂志, 2012, 33(6): 421-425.
- 3 Ode A, Schoon J, Kurtz A, et al. CD73/5'-ecto-nucleotidase acts as a regulatory factor in osteo-/chondrogenic differentiation of mechanically stimulated mesenchymal stromal cells [J]. Eur Cell Mater, 2013, 25: 37-47.
- 4 Takedachi M, Oohara H, Smith BJ, et al. CD73-generated adenosine promotes osteoblast differentiation [J]. J Cell Physiol, 2012, 227(6): 2622-2631.
- 5 Hunsucker SA, Mitchell BS, Spsychala J. The 5'-nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism [J]. Pharmacol Ther, 2005, 107(1): 1-30.

- 6 Dominici M, Blanc KL, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells, The International Society for Cellular Therapy position statement [J]. *Cytherapy*, 2006, 8(4): 315–317.
- 7 Airas L, Niemela J, Jalkanen S. CD73 Engagement Promotes Lymphocyte Binding to Endothelial Cells Via a Lymphocyte Function Associated Antigen-1-Dependent Mechanism [J]. *J Immunol*, 2000, 165(10): 5411–5417.
- 8 Williams B, Insogna K. Where Wnts went; The exploding field of Lrp5 and Lrp6 signaling in bone [J]. *J Bone Miner Res*, 2009, 24(2): 171–178.
- 9 Wang Y, Wan C, Deng L, et al. The hypoxia-inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(6): 1616–1626.
- 10 Wan C, Gilbert S, Wang Y, et al. Activation of the hypoxia-inducible factor-1alpha pathway accelerates bone regeneration [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(2): 686–691.
- 11 Goodship A, Kenwright J. The influence of induced micro-movement upon the healing of experimental tibial fractures [J]. *J Bone Joint Surg Br*, 1985, 67(4): 650–655.
- 12 Komatsu DE, Hadjiargyrou M. Activation of the transcription factor HIF-1 and its target genes, VEGF, HO-1, iNOS, during fracture repair [J]. *Bone*, 2004, 34(4): 680–688.
- 13 Ode A, Kopf J, Kurtz A, et al. CD73 and CD29 concurrently mediate the mechanically induced decrease of migratory capacity of mesenchymal stromal cells [J]. *Eur Cell Mater*, 2011, 22: 26–42.
- 14 Kang MN, Yoon HH, Seo YK, et al. Effect of mechanical stimulation on the differentiation of cord stem cells [J]. *Connect Tissue Res*, 2012, 53(5): 149–159.
- 15 Wang J, Thampatty BP. Mechanobiology of adult and stem cells [J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2008, 271: 301–346.
- 16 Takedachi M, Oohara H, Smith BJ, et al. CD73-generated adenosine promotes osteoblast differentiation [J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227(6): 2622–2631.
- 17 Delorme B, Ringe J, Gallay N, et al. Specific plasma membrane protein phenotype of culture-amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Blood*, 2008, 111(5): 2631–2635.
- 18 杜晶春, 吴玉, 李雪燕. CD73 在人骨髓间充质干细胞免疫调节功能中的作用 [J]. *广东医学*, 2012, 33(24): 3703–3705.
- 19 Kara F, Doty S, Boskey A, et al. Adenosine A(1) receptors regulate bone resorption in mice; Adenosine A(1) receptor blockade or deletion increases bone density and prevents ovariectomy-induced bone loss in adenosine A(1) receptor-knockout mice [J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(2): 534–541.
- 20 Katebi M, Soleimani M, Cronstein BN. Adenosine A2A receptors play an active role in mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cell development [J]. *J Leukoc Biol*, 2009, 85(3): 438–444.
- 21 Kara FM, Chitu V, Sloane J, et al. Adenosine A1 receptors (A1Rs) play a critical role in osteoclast formation and function [J]. *FASEB J*, 2010, 24(7): 2325–2333.
- 22 Costa MA, Barbosa A, Neto E, et al. On the role of subtype selective adenosine receptor agonists during proliferation and osteogenic differentiation of human primary bone marrow stromal cells [J]. *J Cell Physiol*, 2011, 226(5): 1353–1366.
- 23 Fatokun A, Stone T, Smith R. Hydrogen peroxide-induced oxidative stress in MC3T3-E1 cells; The effects of glutamate and protection by purines [J]. *Bone*, 2006, 39(3): 542–551.
- 24 Nakao Y, Koike T, Ohta Y, et al. Parathyroid hormone enhances bone morphogenetic protein activity by increasing intracellular 30, 50-cyclic adenosine monophosphate accumulation in osteoblastic MC3T3-E1 cells [J]. *Bone*, 2009, 44(5): 872–877.

(上接第 144 页)

- 18 Hongchao Y, Jianyi N, Jian W, et al. The Down-Regulation of Neuroligin-2 and the Correlative Clinical Significance of Serum GABA Over-Expression in Hirschsprung's Disease [J]. *Neurochem Res* (2014) 39: 1451–1457.
- 19 Eleanor Dow, Sean Cross, Debra J. Wolgemuth, et al. Second Locus for Hirschsprung Disease/Waardenburg Syndrome in a Large Mennonite Kindred, [J]. *Am J Med Genet*. 1994 Oct 15; 53(1): 75–80.
- 20 Atif saeed, Lenka Barreto, Sudhesna, et al. Identification of novel genes in Hirschsprung disease pathway using whole genome expression study [J]. *Journal of pediatric surgery*, 2012, 47: 303–307.
- 21 Auteri M, Zizzo MG, Mastropalo M, et al. Opposite role played by GABAA and GABAB receptors in the modulation of peristaltic activity in mouse distal colon [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2004, 731: 93–99.