

CD39-腺苷能轴在纤维化疾病中作用的研究进展

帅 陈 综述 慈雷雷, 贾文茜, 吕雄文 审校

摘要 三磷酸二磷酸水解酶(ENTPD1/CD39)和5'-核苷酸酶(NT5E/CD73)是细胞外2种重要的跨膜水解酶,与腺苷和腺苷受体组成的CD39-腺苷能轴在组织损伤中所出现的细胞裂解、细胞凋亡等过程中起着重要的作用。纤维化是许多疾病发生的主要病理特征,影响日常生活,严重威胁到人类的健康安全。近年来大量的文献研究CD39-腺苷能轴在纤维化疾病中的表达和调控,使得研究人员对其在疾病中的分子机制有更深入的了解。该文就CD39-腺苷能轴的结构以及其在几种常见纤维化疾病中的表达和调控等研究进行综述。

关键词 纤维化疾病; CD39; CD73; 腺苷

中图分类号 R-05; R 619.6; R 342.5; R 392.11

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)02-0316-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.02.033

肌成纤维细胞是由多种细胞如常驻间充质细胞、上皮细胞以及内皮细胞等分化而来的平滑肌表型的成纤维细胞,是胶原蛋白的主要来源,在纤维化的发展中起着重要作用^[1]。许多生长因子在组织修复和再生中发挥重要的作用,其中转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)就能够调节细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的表达。ECM(胶原蛋白I和胶原蛋白III等)具有结构支持、细胞黏附以及阻碍流体和大分子运动的作用,在特定的器官组织中表达特殊的功能。在动物体内, TGF- β 和其他细胞因子(纤溶酶和基质金属蛋白酶等)控制基质蛋白的退化和重塑平衡^[2]。 α 平滑肌肌动蛋白(alpha smooth muscle actin, α -SMA)是能够收缩平滑肌细胞的骨架蛋白。在激活状态下,肌成纤维细胞能够停止增殖,大量表达 α -SMA^[3]。肌成纤维细胞产生的高收缩力有利于组织的生理重塑,能够通过收缩伤口边缘来加速伤口的修复,但是当

肌成纤维细胞过度收缩时就会出现增生性瘢痕,不利于组织修复。因此,在研究纤维化疾病过程中常常把TGF- β 、 α -SMA、胶原蛋白I、胶原蛋白III作为评判纤维化的重要指标。

纤维化疾病的发生受多种因素的调控,其中嘌呤核苷酸发挥着至关重要的作用。三磷酸二磷酸水解酶(ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1, ENTPD1/CD39)和5'-核苷酸酶(ecto-5'-Nucleotidase, NT5E/CD73)介导细胞外的嘌呤代谢,将细胞外的嘌呤信号传递给免疫细胞上的4个蛋白偶联P1腺苷受体^[4],这个过程在多种病理生理中发挥作用。CD39-腺苷能轴在多种人类疾病中的作用使得研究人员越来越意识到通过改变相关通路的分解代谢机制就可以改变某些纤维化疾病的病理生理进程或者逆转结果。因此CD39-腺苷轴在纤维化疾病中的研究成为现阶段的研究热点。

1 CD39-腺苷轴

细胞外的腺苷主要来源途径分别为:①细胞内产生的腺苷运输到细胞外;②细胞外的嘌呤核苷酸水解产生。参与细胞外嘌呤代谢的酶有很多种,其中研究最多的是CD39和CD73。CD39参与嘌呤核苷酸代谢第一步水解。CD39是一种含有510个氨基酸、具有特殊结构特征的细胞膜蛋白,分子量为70~100 ku。分子中含有6个潜在的N-链糖基化位点,11个半氨酸残基和2个跨膜区域。其中2个跨膜结构域分别是由含有氨基和羧基末端片段的细胞质结构域和对酶分解代谢功能至关重要的细胞外疏水结构域组成。CD39在动物体大部分器官中均有表达,主要是在内皮细胞和免疫细胞上表达。CD73参与嘌呤核苷酸代谢的第2步水解。CD73是一种糖基-磷脂酰肌醇(glycosylphosphatidylinositol, GPI)锚定蛋白,是由548个氨基酸组成的二聚体,其分子量约为61 ku。CD73分子N段区域结合二价金属离子,而C端结合单磷酸腺苷(adenosine monophosphate, AMP),主要存在于多种组织中,包括结肠、大脑、心肝肺等^[5]。

当细胞受到刺激时,细胞外三磷酸腺苷(adeno-

2019-11-01 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81270498、81970518);2016年度高校领军人才引进与培养项目(编号:gxbjZD2016032)

作者单位:安徽医科大学药学院,合肥 230032

作者简介:帅 陈,女,硕士研究生;

吕雄文,男,博士,教授,博士生导师,责任作者,E-mail:

lxw31288@aliyun.com

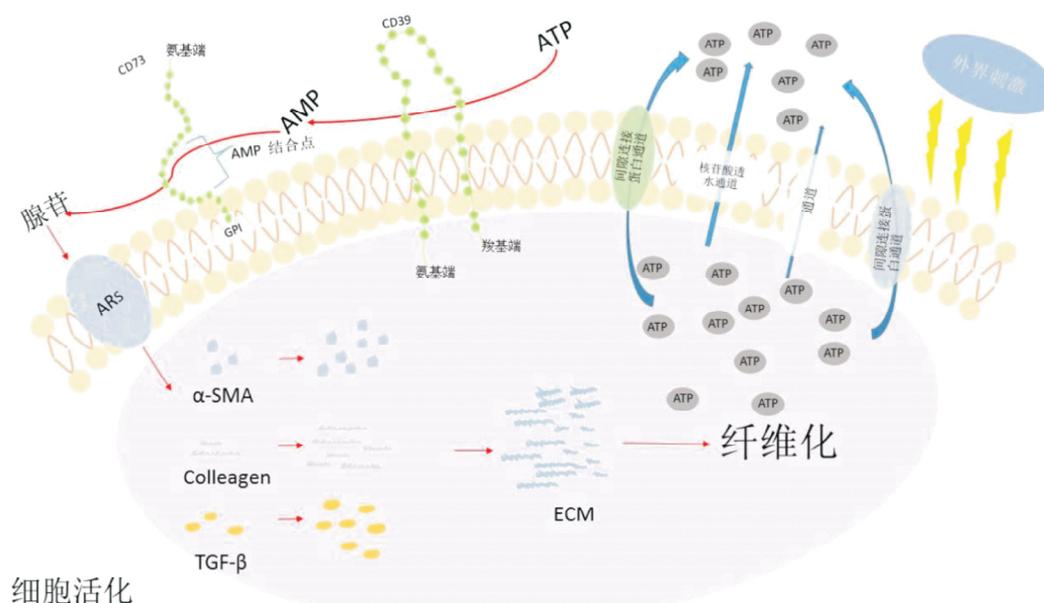


图1 CD39-腺苷能轴调控细胞活化增殖和纤维化的作用机制示意图

sine triphosphate, ATP) 从细胞内释放到细胞外,迅速被细胞表面的 CD39 酶水解生成 AMP 和磷酸并释放能量,随之由下游 CD73 酶将胞外的 AMP 水解为腺苷,释放能量^[6]。产生的腺苷在腺苷水解酶(adenosine deaminase, ADA) 的作用下发生水解或者与靶细胞膜上 4 个 G 蛋白偶联腺苷受体(分别为 A1R、A2R、A3R 和 A4R) 结合发挥生理效应。这个途径从 ATP 到腺苷的生成,被称为 CD39-腺苷能轴。正常情况下,胞外酶 CD39-CD73-ADA 级联反应共同调控腺苷水平,使得体内的腺苷水平处于一个相对稳定的状态。当组织损伤、恶性肿瘤以及自身免疫性疾病等使得人体内环境发生紊乱时,体内腺苷水平稳态被打破,大量释放的腺苷直接或者间接的作用激活腺苷受体,引发一系列下游信号通路,调控免疫应答和炎症反应,如图 1。因此腺苷在参与伤口愈合、组织修复以及纤维化中发挥着重要的作用^[7]。CD39-腺苷能轴在纤维化疾病治疗过程中具有巨大的临床潜力。

2 CD39-腺苷能轴在纤维化疾病中的作用

2.1 CD39-腺苷能轴在皮肤纤维化中的作用

皮肤纤维化是以胶原为主的 ECM 过度聚集在皮肤组织中所出现的一种疾病。在对小鼠进行 CD39/CD73 基因双重敲除后,皮肤抗拉伸强度明显要比野生型小鼠强, TGF- β 和结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF) 的含量减少^[8]。CD39/CD73 能够产生细胞外腺苷,在博来霉素诱导

的真皮损伤甚至真皮纤维化中起重要作用,可能引起皮肤纤维化。CD39 或 CD73 基因敲除的小鼠因嘌呤核苷酸无法水解产生细胞外腺苷,从而明显缓解皮肤纤维化。CD39 或 CD73 的抑制剂有望治疗皮肤纤维化。

2.2 CD39-腺苷能轴在心肌纤维化中的作用

心肌纤维化是指心肌成纤维细胞在心肌组织中活化增殖,致 ECM 过度沉积,导致心室僵硬以及功能障碍,心脏出现不可逆转的心力衰竭。心肌成纤维细胞上的 CD39 酶能够水解 ATP 产生腺苷。CD39 酶的非选择性抑制剂,不仅可以增加 ATP 的促纤维化作用,还能够增加促纤维化因子的合成。为了更好地阐明 CD39 在心肌纤维化中的作用,利用 siRNA 转染技术沉默 CD39 基因可以增加细胞外 ATP 的浓度,增强 ATP 的促纤维化作用^[9]。

CD73 在多种细胞中表达,如免疫细胞、内皮细胞和间充质细胞,一般被认为能够产生腺苷作用于 A2AR^[10]。CD73 水解产生的腺苷通过调节中性粒细胞与内皮细胞黏附和转运,在缺氧诱导的炎症和免疫过程中发挥调节剂作用^[11]。研究^[12]显示 T 细胞缺乏 CD73 对主动脉诱导的心力衰竭有一定的影响,进一步恶化心脏收缩功能,心肌纤维化增加,心肌成纤维细胞活化。心肌成纤维细胞活化能够产生和分泌胶原蛋白,导致心肌细胞被纤维化瘢痕组织替代,从而出现纤维化。这些研究结果显示心肌细胞内稳态和纤维化发生是体内 ATP 和腺苷协调的结果,其中腺苷抗纤维化作用受到酶 CD39 和 CD73

的调控。

2.3 CD39-腺苷能轴在肺纤维化中的作用 肺纤维化是肺周围的细胞组成发生改变和环境紊乱,胶原分泌增加,ECM 过度积聚,最终导致肺功能出现丧失,是许多肺间质性疾病的诱因。腺苷作为信号分子是针对损伤而产生的,在损伤的早期能够对其产生保护作用^[13],但是在疾病发展的慢性阶段如肺纤维化等过程就会产生伤害^[14]。CD39 和 CD73 基因缺失能减少胞外腺苷的形成。

研究^[15]显示,机械性通气能够启动先天免疫调节机制诱导 CD39 和 CD73 的表达,显著增加肺组织中腺苷水平。腺苷通过减少内皮细胞的渗漏达到减轻机械性通气造成肺损伤的目的。CD39/CD73 基因缺失肺水肿和炎症增加,诱导急性肺损伤加重。

但是在辐射照射诱导的模型中 CD73 基因缺失小鼠在肺泡间隔,胶原蛋白 I、胶原蛋白 III 沉积,纤维化灶等肺纤维化现象中明显轻于野生型小鼠,对肺纤维化起到保护作用^[16]。此外,使用聚乙二醇腺苷脱氢酶或者 CD73 抗体治疗全胸照射的野生型小鼠能够显著降低射线诱导的肺纤维化。Volmer et al^[17]注射博来霉素可致小鼠体内胶原蛋白、组织纤维化增加以及促炎和促纤维化介质升高,而 CD73 基因敲除可以减少腺苷的积累,逆转博来霉素诱导的肺纤维化。

这些结果显示 CD39-腺苷轴与肺纤维化具有一定相关性,调节 CD39-腺苷轴中相关机制对治疗肺纤维化有意义。

2.4 CD39-腺苷能轴在肝纤维化中的作用 肝脏作为人体的主要解毒器官,其纤维化主要是由慢性肝损伤、肝炎等肝病过程演变导致的,其治疗受到人们的广泛关注。腺苷参与很多肝脏疾病,如肝脏缺血/再灌注损伤、肝癌和肝纤维化等。

2008 年, Peng et al^[18]研究发现 CD73 基因敲除可以减少 CCl₄ 处理的小鼠体内腺苷水平,降低肝纤维化发生,同时也指出抑制腺苷在胞外形成或阻断腺苷受体有助于预防肝纤维化。同样地, 2010 年有报道^[19]证实 CD73 基因敲除在一定程度上能够防止酒精性脂肪肝和内毒素引起的肝纤维化, A1R 阻断脂肪酸合成基因的表达, A2BR 促进脂肪酸代谢基因的表达,靶向 CD73 基因和腺苷受体可以预防酒精诱导的脂肪肝。关于 CD39 在肝纤维化中的研究鲜有报道,有待进一步的研究。

2.5 CD39-腺苷能轴在肾纤维化中的作用 肾纤维化是肾间质成纤维细胞活化、增殖以及迁移,促使

ECM 累积,肾结构发生变化,其病理表现主要是肾小球硬化、肾小管间质纤维化、炎症浸润以及肾实质丧失。其中肾小管间质纤维化可分为细胞活化和损伤、纤维化信号传导、纤维化、肾损害 4 个阶段^[20]。已有文献^[21]证实,CD39 依赖性产生的腺苷可以减少肾缺血再灌注损伤,减轻其向肾纤维化发展的趋势。

CD73 主要存在于管腔膜、小叶周围成纤维细胞以及系膜细胞中,是肾脏细胞外腺苷的主要来源^[22]。CD73 水解产生的细胞外腺苷是参与肾小管-肾小球反馈的免疫调节剂,在大多数肾脏调节机制中起主导作用^[23]。而 CD73 基因敲除导致腺苷的缺乏会破坏肾小球滤过屏障,增加肾纤维化的发生^[24]。

2.6 CD39-腺苷能轴在其他器官纤维化中的作用

胰腺星状细胞是胰腺基质蛋白的主要生产者,参与胰腺纤维化的发展。胰腺星状细胞的活化能够刺激 ECM 合成,减少 ECM 降解,整体 ECM 积累^[25]。ECM 的积累是发生胰腺纤维化的关键因素。实验中发现胰腺炎小鼠中胰腺星状细胞高表达 CD39,其中 CD39 基因缺失抑制实验性胰腺炎中胰腺星状细胞活化、增殖,前胶原蛋白 $\alpha 1$ 表达以及胰腺纤维化。数据显示细胞外腺苷调节胰腺星状细胞的增殖和胶原的生成^[26]。

最后,CD39 在人体组织上皮细胞、炎症细胞以及内皮细胞中表达,调节过量的核苷酸浓度,这可能与重建嘌呤信号通路调控囊性纤维化有关^[27]。

3 小结与展望

纤维化疾病几乎可以在人体的各个器官发生,其中肝、肾、心脏、肺、皮肤等器官或者组织中研究较多。纤维化是由慢性损伤造成的,是个缓慢的过程。现阶段主要的研究除了器官移植外,还有基因治疗、细胞治疗、药物治疗等。但是由于器官移植存在供不应求的问题,所以满足不了大部分患者的需求,导致很多患者得不到很好的治疗。基因治疗、细胞治疗的方法主要是重组 RNA 或者修正离子运输缺陷等,但是目前尚未导致可行的治疗。因此不断设计和合成新的靶点化合物,并通过结构优化提高药物在体内的稳定性,达到更优的治疗效果,将具有更大的治疗前景。

上面的研究显示腺苷及其受体亚型在调节纤维化疾病方面所发挥的作用有差异。作为水解细胞外 ATP 为腺苷的胞外酶,CD39 和 CD73 不论是动物还

是人体中都广泛存在并且发挥着必不可少的作用。近年来,随着 CD39 和 CD73 在各种疾病中的研究,比如器官缺血再灌注损伤、免疫炎症、纤维化以及肿瘤癌症等方面,人们开始越来越多地认识到了胞外酶 CD39 和 CD73 在水解产生腺苷中的重要性。

纤维化疾病是在慢性损伤中逐渐形成的,假如在炎症损伤初期就对腺苷水平进行调控,那么就能够有效地预防纤维化疾病的发生。正如本文中讨论的,越来越多 CD39-腺苷轴上的分子和信号通路介质可用来开发治疗纤维化疾病的药物。然而,关于 CD39-腺苷轴仍然有许多重要的问题束之高阁,比如关于 CD39 和 CD73 在纤维化疾病中参与组织重塑的机制。另外,正如上面所描述的实验中,腺苷作为分子信号,既能产生保护作用又能产生损伤作用,那么组织损伤或者疾病阶段经 CD39 和 CD73 介导产生的腺苷到底是产生有利还是不利的影 响还需要进一步的研究。最后,关于该轴的研究大部分都尚处于基础动物研究阶段,如何将基础动物研究成果实化为具体药物应用到治疗临床疾病上,仍然有很长的一段路需要摸索。因此,需要更多的实验研究阐明 CD39-腺苷轴的作用机制,为纤维化疾病的治疗提供更多的药物靶点和治疗手段。

参考文献

- [1] Wynn T A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis [J]. *J Pathol*, 2008, 214(2): 199–210.
- [2] Branton M H, Kopp J B. TGF- β and fibrosis [J]. *Microbes Infect*, 1999, 1(15): 1349–65.
- [3] Cherng S, Young J, Ma H. Alpha-smooth muscle actin (α -SMA) [J]. *J Am Sci*, 2008, 4(4): 7–9.
- [4] Kishore B K, Robson S C, Dwyer K M. CD39-adenosinergic axis in renal pathophysiology and therapeutics [J]. *Purinergic Signal*, 2018, 14(2): 109–20.
- [5] Antonioli L, Pacher P, Vizi E S. CD39 and CD73 in immunity and inflammation [J]. *Trends Mol Med*, 2013, 19(6): 355–67.
- [6] Linden J, Koch-Nolte F, Dahl G. Purine release, metabolism, and signaling in the inflammatory response [J]. *Annu Rev Immunol*, 2019, 37: 325–47.
- [7] Feoktistov I, Biaggioni I, Cronstein B N. Adenosine receptors in wound healing, fibrosis and angiogenesis [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2009(193): 383–97.
- [8] Fernández P, Perez-Aso M, Smith G, et al. Extracellular generation of adenosine by the ectonucleotidases CD39 and CD73 promotes dermal fibrosis [J]. *Am J Pathol*, 2013, 183(6): 1740–6.
- [9] Lu D, Insel P A. Hydrolysis of extracellular ATP by ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (ENTPD) establishes the set point for fibrotic activity of cardiac fibroblasts [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(26): 19040–9.
- [10] Linden J. Regulation of leukocyte function by adenosine receptors [J]. *Adv Pharmacol*, 2011, 61: 95114.
- [11] Eltzschig H K, Thompson L F, Karhausen J, et al. Endogenous adenosine produced during hypoxia attenuates neutrophil accumulation: coordination by extracellular nucleotide metabolism [J]. *Blood*, 2004, 104(13): 3986–92.
- [12] Quast C, Alter C, Ding Z, et al. Adenosine formed by CD73 on T cells inhibits cardiac inflammation and fibrosis and preserves contractile function in transverse aortic constriction – induced heart failure [J]. *Circ Heart Fail*, 2017, 10(4): e003346.
- [13] Hart M L, Gorzolla I C, Schittenhelm J, et al. SP1-dependent induction of CD39 facilitates hepatic ischemic preconditioning [J]. *J Immunol*, 2010, 184(7): 4017–24.
- [14] Chunn J L, Molina J G, Mi T, et al. Adenosine-dependent pulmonary fibrosis in adenosine deaminase-deficient mice [J]. *J Immunol*, 2005, 175(3): 1937–46.
- [15] Eckle T, Füllbier L, Wehrmann M, et al. Identification of ectonucleotidases CD39 and CD73 in innate protection during acute lung injury [J]. *J Immunol*, 2007, 178(12): 8127–37.
- [16] Wirsdörfer F, De Leve S, Cappuccini F, et al. Extracellular adenosine production by ecto-5'-nucleotidase (CD73) enhances radiation-induced lung fibrosis [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(10): 3045–56.
- [17] Volmer J B, Thompson L F, Blackburn M R. Ecto-5'-nucleotidase (CD73)-mediated adenosine production is tissue protective in a model of bleomycin-induced lung injury [J]. *J Immunol*, 2006, 176(7): 4449–58.
- [18] Peng Z, Fernandez P, Wilder T, et al. Ecto-5'-nucleotidase (CD73)-mediated extracellular adenosine production plays a critical role in hepatic fibrosis [J]. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2008, 27(6): 821–4.
- [19] Robson S C, Schuppan D. Adenosine: tipping the balance towards hepatic steatosis and fibrosis [J]. *J Hepatol*, 2010, 52(6): 941–3.
- [20] Eddy A A. Molecular basis of renal fibrosis [J]. *Pediatr Nephrol*, 2000, 15(3–4): 290–301.
- [21] Grenz A, Zhang H, Hermes M, et al. Contribution of E-NTPDase1 (CD39) to renal protection from ischemia-reperfusion injury [J]. *FASEB J*, 2007, 21(11): 2863–73.
- [22] Le Hir M, Kaissling B. Distribution and regulation of renal ecto-5'-nucleotidase: implications for physiological functions of adenosine [J]. *Am J Physiol*, 1993, 264(3 Pt 2): F377–87.
- [23] Huang D Y, Vallon V, Zimmermann H, et al. Ecto-5'-nucleotidase (cd73)-dependent and-independent generation of adenosine participates in the mediation of tubuloglomerular feedback in vivo [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006, 291(2): F282–8.
- [24] Blume C, Felix A, Shushakova N, et al. Autoimmunity in CD73/Ecto-5'-nucleotidase deficient mice induces renal injury [J]. *PLoS one*, 2012, 7(5): e37100.
- [25] Haber P S, Keogh G W, Apte M V, et al. Activation of pancreatic stellate cells in human and experimental pancreatic fibrosis [J]. *Am J Pathol*, 1999, 155(4): 1087–95.
- [26] Künzli B M, Nuhn P, Enyoji K, et al. Disordered pancreatic inflammatory responses and inhibition of fibrosis in CD39-null mice [J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(1): 292–305.
- [27] Fausther M, Pelletier J, Ribeiro C M, et al. Cystic fibrosis remodels the regulation of purinergic signaling by NTPDase1 (CD39) and NTPDase3 [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2010, 298(6): L804–18.