

CD44-配体相互作用的生物力学与功能调控¹⁾

李林达* 丁奇寒^{†,**} 陈深宝^{†,**} 吕守芹^{†,**,2)} 龙勉^{†,**} 郭兴明^{*,3)}

^{*}(重庆大学生物工程学院, 生物流变科学与技术教育部重点实验室, 重庆 400044)

[†](中国科学院力学研究所生物力学与生物工程中心, 中国科学院微重力重点实验室, 工程化构建与力学生物学北京市重点实验室, 北京 100190)

^{**}(中国科学院大学工程科学学院, 北京 101408)

摘要 作为一种广谱表达的细胞粘附分子, I 型跨膜糖蛋白 CD44(cluster of differentiation 44) 参与细胞增殖、分化、迁移, 血管生成等生物学过程, 对于介导细胞信号转导, 调节组织稳态等功能具有关键作用. 特别地, CD44-选择素、CD44-透明质酸相互作用介导的细胞粘附动力学在经典炎症反应、肿瘤转移或组织特异的肝脏免疫中具有重要作用. 该综述分别从细胞层次粘附动力学、二维与三维条件下的分子层次反应动力学、原子层次微观结构以及胞内信号转导通路等方面综述了 CD44-选择素、CD44-透明质酸相互作用的研究进展及尚待回答的生物力学问题. 力学、物理因素对生命活动的不可或缺性逐渐被研究者们接受, 力学医学、力学免疫学、力学组学等新概念相继提出. 生理、病理条件下, CD44-配体相互作用介导的细胞粘附必将受到血流剪切、基底硬度等力学、物理微环境的调控, 但是其调控机制还远不清楚. 基于此, 本文就 CD44-配体相互作用相关的未来研究方向做出展望, 主要包括: 力学、物理因素如何调控 CD44-配体相互作用介导的细胞粘附动力学及其内在机制; CD44-配体相互作用反应动力学的力学调控规律及结构基础是什么; 以及力学作用下 CD44-配体相互作用原子层次的微观结构如何发生动态演化. 本文可为深入理解 CD44-配体相互作用的生物学功能及其结构功能关系提供线索.

关键词 CD44, 选择素, 透明质酸, 细胞粘附, 力学调控, 炎症反应

中图分类号: Q615 文献标识码: A doi: 10.6052/0459-1879-20-313

BIOMECHANICS AND FUNCTIONAL REGULATIONS OF CD44-LIGAND INTERACTIONS¹⁾

Li Linda* Ding Qihan^{†,**} Chen Shenbao^{†,**} Lü Shouqin^{†,**,2)} Long Mian^{†,**} Guo Xingming^{*,3)}

^{*}(Key Laboratory of Biorheology Science and Technology, Ministry of Education, College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

[†](Beijing Key Laboratory of Engineered Construction and Mechanobiology, Key Laboratory of Microgravity (National Microgravity Laboratory), Center of Biomechanics and Bioengineering, Institute of Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

^{**}(School of Engineering Science, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 101408, China)

Abstract As a widely expressed cellular adhesion molecule, type I transmembrane glycoprotein CD44 is crucial in cell proliferation, differentiation, migration, angiogenesis and other biological processes to induce intracellular signal

2020-07-31 收稿, 2020-11-13 录用, 2020-11-13 网络版发表.

1) 国家自然科学基金资助项目 (91642203, 11972042).

2) 吕守芹, 研究员, 主要研究方向: 生物力学. E-mail: lsq@imech.ac.cn

3) 郭兴明, 教授, 主要研究方向: 生物医学信息检测及处理. E-mail: guoxm@cqu.edu.cn

引用格式: 李林达, 丁奇寒, 陈深宝, 吕守芹, 龙勉, 郭兴明. CD44-配体相互作用的生物力学与功能调控. 力学学报, 2021, 53(2): 539-553
Li Linda, Ding Qihan, Chen Shenbao, Lü Shouqin, Long Mian, Guo Xingming. Biomechanics and functional regulations of CD44-ligand interactions. *Chinese Journal of Theoretical and Applied Mechanics*, 2021, 53(2): 539-553

transduction and regulate tissue homeostasis. Especially, cell adhesion dynamics mediated by CD44-selectin and CD44-hyaluronic acid (HA) interactions play key roles in classic inflammatory cascade, tumor metastasis, or tissue-specific liver immunity. This review discussed the progresses and remaining issues of CD44 selectin and CD44-HA interactions in various aspects of cellular adhesion dynamics, two- and three-dimensional molecular reaction kinetics, atomic microstructural features, and intracellular signal transduction pathways. Nowadays, the importance of mechanical and physical factors to biological activities has been gradually accepted by scientific community. New concepts such as mechanomedicine, mechanoimmunology and mechanomics have been put forward one after another. Under physiological or pathological conditions, cell adhesion mediated by CD44-ligand interactions are regulated by *in vivo* mechanical and physical cues such as blood shear or tissue stiffness, but their regulatory mechanisms are still unclear. From that on, future perspectives related to CD44-ligand interaction were also proposed in this review as follows: how mechanical and physical factors regulate cellular adhesion dynamics and intrinsic mechanism mediated by CD44-ligand interactions; what the mechanical regulation features of molecular reaction kinetics of CD44-ligand interactions and corresponding structural bases are; and how the atomic-level microstructures of CD44-ligand binding evolve dynamically under mechanical forces. This review provides clues for further understanding the biological functions and structure-function relationship of CD44-ligand interactions.

Key words CD44, selectin, HA, cell adhesion, mechanical regulation, inflammation

引 言

CD44 (cluster of differentiation 44) 是一种 I 型跨膜糖蛋白, 广泛分布在心脏、肝脏、肾脏、脾脏、肺等组织器官中, 表达细胞包括内皮细胞、间充质细胞、造血干细胞, 以及单核、巨噬、嗜中性粒、嗜酸性粒细胞和淋巴细胞等血细胞, 同时还包括中胚层来源的细胞等^[1]. CD44 在多种生理和病理过程中发挥作用, 如器官形成、造血、淋巴细胞活化、肿瘤转移及免疫反应^[2] 等, 同时是淋巴瘤、前列腺癌、宫颈癌、肿瘤干细胞及早期动脉粥样硬化的标志物^[3]. 其中通过 CD44-配体相互作用介导的细胞-细胞之间或细胞-基质之间的粘附及胞内信号转导通路是 CD44 在炎症级联反应、肿瘤转移、淋巴细胞归巢等生理、病理过程中发挥作用的重要途径. 因此, 考察 CD44 与不同配体相互作用的反应动力学及其介导的细胞粘附动力学与胞内信号通路特征是阐释其功能的基础. 同时, 炎症级联反应、肿瘤转移或淋巴细胞归巢等过程均发生在血流剪切的力学环境中, 血流对细胞的剪切会转化为 CD44-配体相互作用的外力, 从而调控其分子间相互作用. 此外, 免疫细胞的募集、归巢或癌细胞的转移还受到基底硬度等其他力学微环境的调控. 因此, 进一步考察外力作用如何通过调控 CD44-配体相互作用反应动力学进而调控细胞粘附动力学从而实现特定生物学功能是理解 CD44 功

能的另一重要内容. 基于此, 本文将重点介绍 CD44-配体相互作用在免疫反应过程中的作用及机制研究进展.

1 CD44 概述

人源 CD44 是由 11 号染色体单拷贝编码的跨膜糖蛋白^[4], 按照转录方式不同可将 CD44 前体信使 RNA(messenger RNA, mRNA) 的 20 个外显子分为组成型和变异型拼接外显子, 进而分别转录成标准型 CD44(CD44s) 和变异型 CD44(CD44v), 而 CD44v 又可以通过可变区域的选择性拼接得到不同变异体亚型^[4]. 目前发现人类至少有数十种 CD44 的可变剪切体^[1], 其中最常见的亚型包括 CD44v4-7, CD44v8-10, CD44v3-10 和 CD44v1-10^[5]. 不同亚型的 CD44 表达部位不同, CD44s 主要分布于间质及造血源性细胞, 而 CD44v 主要分布于上皮源性细胞和肿瘤细胞. 另外, CD44 可进行 N 糖基化、O 糖基化翻译后修饰. 最常见的人源 CD44s 由 361 个氨基酸组成 (~37.2 kD), 经过糖基化修饰加工^[6], 蛋白质分子量可达 80~100 kD^[7]; 而变异型 CD44v 分子量变化范围约为 80~250 kD. 采用原子力显微镜 (atomic force microscopy, AFM) 技术扫描 CD44 蛋白的大小, 结果显示 CD44 高度为 2.3 ± 1.4 nm, 三维尺寸约为 $25 \text{ nm} \times 30 \text{ nm} \times 2.5 \text{ nm}$, 与免疫球蛋白大小相类似^[8-9].

CD44 结构从胞外 N 末端至胞内 C 末端包含胞外域、跨膜域和胞内域 3 部分。胞外域又可分为氨基末端和近膜域。氨基末端是含有 6 个保守半胱氨酸残基的球状结构域, 其中保守半胱氨酸形成的二硫键是 N 末端球状结构域正确折叠及结构稳定性的基础^[10]。标准型 CD44s 的氨基末端球状结构域与跨膜段之间是一段由 46 个氨基酸形成的茎状区^[11], 保守性较低, 可被高度糖基化并包含蛋白水解切割位点^[12]。而不同剪接体 CD44v 的可变区可插入在 N 末端球状结构域与茎状区之间^[13]。CD44 跨膜区和胞内区序列高度保守, 其跨膜区结构支持其在细胞膜上的寡聚化 (oligomerisation), 并有助于其定位在富含糖脂的膜微区 (glycolipid enriched membrane microdomains)^[14], 以及其与脂筏的作用^[15]。CD44 的胞内区含有与细胞骨架锚定蛋白 (ankyrin) 和 ERM (ezrin, radixin, moesin) 蛋白的结合位点。Merlin 蛋白 (moesin-ezrin-radixin-like protein) 也可与 CD44 胞内末端发生相互作用^[16]。对于 CD44s, ERM 蛋白与细胞骨架锚定蛋白分别与其胞内段的 292~300, 304~318 位氨基酸结合^[17]。由蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 触发, CD44 胞内尾端丝氨酸 (Ser) 残基的有序磷酸化和/或去磷酸化, 将增强 ERM 蛋白与 CD44 的结合^[18]。激活的 ERM 蛋白 N 末端与 CD44 胞内域结合, 而其 C 末端与 F 肌动蛋白结合, 因此, ERM 蛋白是将 CD44 连接至肌动蛋白细胞骨架的桥梁蛋白^[19], 可启动 CD44 下游的胞内信号传导途径, 行使特定的生物学功能。CD44 潜在的 N 糖基化位点 (天冬酰胺 (Asn) 残基) 多数位于胞外域的 N 末端结构域或可变区, 而 O 糖基化位点 (丝氨酸 (Ser)/苏氨酸 (Thr) 残基) 和 GAG 附着物 (GAG attachments) (Ser-Gly 多肽) 则主要分布在胞外的细胞膜近端区域和可变区^[20-21]。

2 CD44-配体相互作用在炎症级联反应中的作用

炎症反应 (inflammation) 是一种由损害或损伤刺激所诱发的适应性反应 (adaptive response), 分为急性 (acute) 和慢性 (chronic) 炎症反应^[22]。多数急性炎症反应由病毒感染或者机体组织损伤引起, 首先由组织中驻留的巨噬细胞和肥大细胞通过 Toll 样受体 (toll-like receptors, TLRs) 和 NOD 样受体 (nucleotide-binding oligomerization-domain protein-like

receptors, NLRs) 等启动感染识别^[23], 随后产生趋化因子、细胞因子、血管活性胺 (vasoactive amines) 等多种炎性介质, 引发局部炎症, 进而通过炎症级联反应募集血流中的白细胞迁移穿过毛细血管后微静脉 (postcapillary venules) 到达炎症部位, 吞噬病原体^[24]。白细胞从血流向炎症部位募集主要包括被血管内皮细胞捕获, 在内皮细胞表面滚动、粘附、爬行, 最后跨内皮迁移等级联过程。该级联反应由系列受体-配体相互作用介导, 同时受到基质硬度、血流剪切等力学微环境调控。已有研究表明, 表达在白细胞上的糖蛋白 PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand 1) 与表达在内皮细胞上的选择素 (selectin) 的相互作用主要介导初期的捕获与快速滚动过程, CD44-配体相互作用则主要介导白细胞的慢速滚动, 而整合素-配体相互作用则主要介导后期的稳定粘附、爬行等过程^[25]。下文将重点介绍 CD44-配体相互作用在炎症级联反应过程中的作用。

2.1 CD44 配体——选择素

I 型跨膜蛋白选择素是 CD44 介导细胞-细胞粘附的主要配体之一, 包括 P, E 与 L 选择素 3 个家族成员, 其结构从胞外 N 末端至胞内 C 末端依次包括钙型凝集素结构域 (calcium-type lectin domain, Lectin)、类上皮生长因子样结构域 (epidermal growth factor-like module, EGF), 起粘附补体蛋白作用的多个重复序列 (consensus repeats, CR)、跨膜区域 (transmembrane, TM) 和胞内区 (cytoplasmic, Cyto)。三者之间的区别是 P, E 与 L 选择素分别含有 9, 6, 2 个 CR 结构域, 从而具有不同长度^[26-27]。尽管具有相似结构, 但是 3 种选择素具有不同生物学功能。L 选择素在造血干细胞和成熟白细胞上高表达, 并且 L 选择素容易水解, 即使在没有化学因子的刺激下, 力学因素如流体剪切即可以使得中性粒细胞 (polymorphonuclear neutrophil, PMN) 上 L 选择素发生水解^[28]; P 选择素主要表达在血小板和内皮细胞, 并分别储存在 α 颗粒和 Weibel-Palade 小体中, 而促炎刺激可促使 P 选择素通过细胞内储藏小体与质膜的融合, 从而迅速从 α 颗粒转移至细胞表面; E 选择素主要表达在血管内皮细胞上, 其表达水平受到炎症介质的调控。在人源血管内皮细胞中, 由肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α), 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 和白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 诱导上调表达的

主要是 E 选择素^[29]。

炎症反应中 CD44-E 选择素相互作用的研究较为充分。在中性粒细胞参与的炎症反应中, CD44 被鉴定为新型 E 选择素配体, 表明 CD44-E 选择素相互作用可以介导人源及鼠源中性粒细胞在血管内皮细胞上的粘附^[30]。通过小鼠微血管内活体成像, 发现 CD44 介导的中性粒细胞的缓慢滚动依赖于 E 选择素, 而 P 选择素与 PSGL-1 相互作用则是初始捕获和快速滚动所必需的^[30]。CD44-E 选择素相互作用与 PSGL-1-E 选择素相互作用类似, 均可激活中性粒细胞内 Src 家族激酶 (SFK) 和下游信号, 进而激活整合素 $\alpha_1\beta_2$ 变构, 使中性粒细胞发生慢速滚动, 而共同敲除 CD44 和 PSGL-1 的小鼠则有效阻止中性粒细胞在炎症组织部位的募集^[31]。CD44 对于 T 淋巴细胞在炎症反应中的募集同样具有重要作用。T 淋巴细胞上表达的 CD44 是调控其滚动粘附以及从滚动到稳定粘附的主要配体^[32]。另外, 在造血干细胞上表达的 CD44 具有特殊的糖基化, 同时又是 E, L 选择素的配体, 所以又被称为造血细胞 E/L 选择素配体 HCELL^[33]。通过敲低小鼠 CD44 基因实验证实, T 淋巴细胞上的 CD44/HCELL 和 PSGL-1 是 E 选择素的主要配体, 而非 CD43^[34]。而且, CD44-E 选择素相互作用可调控 PSGL-1 与 L 选择素之间的簇集、进而调控中性粒细胞的慢速滚动过程^[35]。利用超分辨荧光显微镜可进一步考察 E 选择素结合对 CD44 分布的调控, 结果表明 CD44 和胞内肌动蛋白细胞骨架的重组是 E 选择素与 CD44 相互作用以及外部剪切应力共同作用的结果^[36]。相比较而言, P 选择素则很少被报道为 CD44 的配体。虽然 L 选择素被认为是 CD44 的配体, 但作为表达在白细胞同侧的两个分子, CD44 与 L 选择素通过何种相互作用介导炎症反应中白细胞的迁移动力学尚不明确。

简言之, CD44-选择素相互作用, 尤其是 E 选择素, 是介导炎症反应中免疫细胞募集的重要分子体系。与 E 选择素与 E 选择素配体-1(ESL-1)、E 选择素与 PSGL-1 相互作用体系相比, 三者炎症反应中具有比较明确的功能分工。PSGL-1 主要在初期白细胞捕获过程中起作用; ESL-1 在初期捕获到稳定慢速滚动过程中起作用; 而 CD44 则主要介导慢速滚动^[35]。

2.2 CD44 配体 —— 透明质酸

透明质酸 (hyaluronic acid, HA) 是脊椎动物中细胞外基质的重要组成部分。HA 是葡萄糖醛酸和 N-乙酰氨基葡萄糖通过交替 β -1,4 和 β -1,3 糖苷键结合的具有重复二糖单元的线性聚合物, 典型分子量约为 1 MDa, 长度可达微米量级, 在多种病理、生理过程 (如炎症反应、免疫应答、胚胎发生、肿瘤发展、骨关节炎和动脉粥样硬化) 中起重要作用^[37-39]。目前观点认为, 低分子量 HAHA(LMW-HA) 起到促进炎症的作用, 而高分子量 HAHA(LMW-HA) 具有抑制炎症的作用^[40]。低分子量 HA 与 CD44 相互作用可促进细胞释放 IL-10 和转化生长因子 β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1), 加剧炎症反应^[41]。低分子量 HA 还可以上调 CD44 表达, 同时增加蛋白激酶 δ (PKC δ) 和蛋白激酶 ϵ (PKC ϵ) 表达, 并对软骨细胞产生损伤, 增强炎症反应。而中、高分子量 HA 对软骨细胞无作用, 并且高分子量 HA 可抑制 PKC δ , PKC ϵ , 核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 的活化和炎症反应^[42]。另外, HA 片段上调 CD44 和 TLR-4 表达, 激活 NF- κ B 易位并增加有害细胞因子 TNF- α , IL-6 和 IL-1 β 分泌。特异性 CD44 阻断抗体可降低 CD44 和细胞因子表达水平^[43]。

CD44 可通过两种方式与 HA 相互作用, 一是细胞膜定位的 CD44 通过特异性相互作用将可溶性 HA 锚定在细胞膜上; 二是免疫细胞或癌细胞表达的 CD44 与其他细胞膜表达或锚定的 HA 相互作用直接介导细胞粘附。细胞表面高表达的 CD44 与富含 HA 的胞外基质相互作用是介导脑癌细胞侵袭的主要分子体系, 并且癌细胞在迁移过程中呈现独特的微触角结构^[44]。与 CD44-选择素相互作用类似, CD44-HA 相互作用介导的细胞粘附同样在炎症反应中起重要作用, 其中报道最多的是其介导的 T 淋巴细胞归巢过程。在化学因子 PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) 诱导条件下, T 淋巴细胞上 CD44 与内皮细胞上 HA 相互作用介导其滚动粘附^[45]。而且, T 细胞的活化增加其表面 CD44 与内皮细胞上 HA 的结合能力。在体研究表明, 注射超抗原葡萄球菌肠毒素 B 后, T 细胞募集到发炎腹膜部位依赖于 CD44 和 HA 之间的相互作用^[46]; TNF- α 诱导的炎症小鼠模型中 Th1 和 Th2 细胞在体内的滚动粘附同样依赖于 CD44-HA 相互作用^[47]。另外, CD44 也是整合素 VLA-4 (integrin

$\alpha_4\beta_1$)-VCAM-1(vascular cellular adhesion molecule 1) 相互作用介导 T 细胞在内皮细胞上稳定粘附的必要条件^[48]。此外, CD44-HA 相互作用同样可以介导中性粒细胞向炎症部位的募集^[49-50]。另一方面, CD44-HA 相互作用受到多种因素的调控。细胞表面 HA 延伸形成的缆状结构可促进巨噬细胞在特定炎症组织的定位^[51]。CD44 胞外域糖基化程度以及 CD44 胞质端特定丝氨酸残基磷酸化均会调控其与 HA 的结合能力^[52]。抗原受体、细胞因子(如 IL-2)、肿瘤坏死因子(TNF)以及趋化因子(包括 MIP-1 β (macrophage inflammatory protein 1 β), IL-8 和 RANTES 等)均可激活 CD44、从而进一步增强其与 HA 的结合促进 T 细胞粘附^[53]。而 IL-1 α , IL-1 β , IL-3, 粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、干扰素 γ (IFN- γ) 和 LPS 等均可通过 TNF 诱导外周血单核细胞上 CD44 与 HA 的结合^[54-55]。综上所述, CD44-HA 相互作用是介导生命体免疫反应的重要分子体系。

CD44-HA 相互作用在肝脏免疫中的作用更为凸显。HA 在肝脏中的表达相对于其他器官更高, 而且主要分布在肝血窦内^[56]。肝血窦作为肝脏内特化的毛细血管网络, 是肝脏免疫发生的主要场所。与经典炎症级联反应中白细胞的募集动力学不同, 白细胞在肝脏免疫过程中的募集主要发生于肝血窦内, 仅有 20%~30% 的白细胞在肝血窦后微静脉粘附。由于肝血窦内皮细胞上极少量表达选择素, 白细胞在肝血窦内的募集不会发生滚动粘附^[57]。根据诱发因素不同, 肝血窦内的中性粒细胞主要通过两种途径发生募集。在肝脏无菌炎症损伤中, 凋亡细胞释放的 DAMPs(damage associated molecular patterns) 直接或间接激活中性粒细胞, 并刺激内皮细胞上调表达 ICAM-1(intercellular cell adhesion molecule-1), 进而与中性粒细胞上的粘附分子整合素 $\alpha_M\beta_2$ 发生相互作用, 介导中性粒细胞粘附, 随后中性粒细胞在肝内驻留的巨噬细胞——枯否氏细胞(kupffer cell)等——分泌的趋化因子梯度引导下进行定向爬行, 到达特定定位点进行跨膜迁移进入损伤组织。而在有菌炎症(如内毒素血症和革兰氏阴性菌败血症等)过程中, 高水平 LPS 的刺激促炎因子 IL-10 表达上调、进而抑制 $\alpha_M\beta_2$ 的表达, 此时 CD44 取代行使功能, 通过与 HA 相互作用介导中性粒细胞募集^[58]。CD44 敲除可有效降低 LPS 刺激条件下中性粒细胞的粘附^[59]。更进一步, 阻断 CD44-HA 相互作用有效降低了 LPS 小

鼠肝血窦内中性粒细胞的粘附, 而对其在窦后微小静脉内的滚动粘附过程则没有影响, 而且在此过程中起作用的 CD44 是中性粒细胞上而不是内皮细胞上表达的 CD44^[56]。另外, 一种血清来源的 HA 相关蛋白 SHAP 通过与 HA 共价结合形成 HA/SHAP 复合物, 可显著增强 HA 与 CD44 的相互作用^[60]。

简言之, CD44-HA 相互作用是介导免疫过程中白细胞募集的另一重要分子体系。但是相对于在经典炎症反应中起重要作用的选择素-PSGL-1、选择素-CD44 等分子体系而言, CD44-HA 相互作用更具有其器官特异性, 尤其是在肝脏免疫中起重要作用, 但是其分子机制尚不明确, 其主要原因在于 HA 分子量的多样性及不同组装形式。比如, 不同分子量的可溶性 HA 对炎症反应效果不同, 而不同分子量膜定位的 HA 对介导细胞粘附有什么样的差异? 其不同组装形式对细胞粘附的调控? 膜定位条件下 CD44-HA 相互作用反应动力学特性与其他细胞粘附分子配体相互作用反应动力学之间的区别等问题, 目前均不明确。

3 CD44-配体相互作用的反应动力学及力学调控

受体-配体相互作用反应动力学是调控细胞粘附动力学的基础。分子间相互作用分为三维、二维反应两种形式。三维反应是指特异性相互作用的分子双方至少有一种在溶液中处于游离态(如血液中血浆蛋白和抗体), 具有空间三维运动自由度, 因而易于与另一种分子发生相互作用; 三维反应表征的是大量分子的统计平均性质, 通常可用确定性化学反应动力学理论来描述, 常用的实验测量方法包括表面等离子共振(surface plasmon resonance, SPR)等。二维反应是指特异性相互作用的分子双方分别被锚定在两个表面上, 仅具有沿表面内扩散的二维运动自由度, 但缺乏沿垂直于表面法向运动的自由度(如白细胞或内皮细胞表面的选择素配体相互作用等); 因为接触面受限, 二维反应中参与作用的分子数目少, 表征的是有限数目受体-配体间结合和解离的随机动力学行为; 而且, 二维反应形成的分子复合物为两个相对表面之间提供了直接的物理连接, 因此其反应动力学还受到外力及其他物理因素的调控, 具有力学-化学耦合特征。常用的实验测量方法包括原子力显

显微镜、生物膜力探针 (biomembrane force probe, BFP) 等典型的分子生物力学测量手段^[61-62]。

为进一步理解 CD44 - 选择素、CD44 - HA 相互作用介导的细胞粘附动力学差异, 以下着重介绍该分子体系的反应动力学特征及其力学调控规律。目前已报道的分子层次三维反应动力学参数汇总于表 1 中。在无外力作用下, E 选择素与 PSGL-1 相互作用的负反应率 k_{off} 与 E 选择素与 CD44 相互作用基本相当, 而正反应率 k_{on} 略低, 进而导致其解离常数 K_D ($K_D = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$) 略高, 也就是说 E 选择素与 CD44 相互作用结合更快。虽然不同文献报道的具体数值有差异, 但是二者间的相对趋势保持不变。如果是 E 选择素 - PSGL-1, E 选择素 - CD44 两对分子体系与 CD44 - HA 相互作用去比较, 后者的正反应率显著升高, 而负反应率没有太大差异, 最终导致其解离常数 K_D 远低于 E 选择素配体相互作用, 表明 CD44 - HA 相互作用的结合更快、更稳定。一个例外是当 HA 分子量为 6.4 kD 时, 其与 CD44 相互作用的负反应率 k_{off} 明显高于其他分子量 HA, 提示特别低分子量的 HA 与 CD44 相互作用较弱。另外, 从已有数据可以看出, 当 HA 分子量 >100 kD 时, 其与 CD44 相互作用的正反应率从 6.4, 31 kD 时的 $\sim 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 显著升高至 $10^6 \sim 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, 表明 CD44 - HA 相互作用能力与 HA 的分子量密切相关。而只有 HA 寡糖大于 20 个

残基才能有效与 CD44 结合^[63]。

力学调控下不同分子间相互作用反应动力学参数汇总于表 2 中, 主要是基于 AFM 技术对不同 CD44 亚型配体相互作用的测量。结果显示: 在大致可比的加载率条件下 (0.46 ~ 4.58 或 0.45 ~ 5.22 nN/s), 不管是单键还是多键相互作用, CD44 - HA 相互作用断裂力强度约在 20 ~ 50 pN, 相应的零力下负反应率分别约为 0.3 ± 0.5 , $0.57 \pm 0.11 \text{ s}^{-1}$ 。不管是变异体 CD44v 或标准型 CD44s, 其与 HA 相互作用的负反应率显著低于其与 P 选择素、纤维蛋白或纤维蛋白原的相互作用, 说明 CD44 - HA 相互作用更稳定。对于同样表达 CD44 的细胞, AFM 探针上直接包被 HA 与探针上固定包被 HA 的微珠的测量则表现出明显差异。前者获得的 CD44 - HA 相互作用的断裂力范围与底板直接包被 CD44 或含 CD44 的磷脂双分子层的实验体系基本可比, 约为几十皮牛。而探针上固定包被有 HA 的微珠时, 断裂力则增加至 nN 量级; 这可能与细胞较软, 与微珠接触面大, 从而导致是多键相互作用有关。另外, 比较不同分子量 HA 与 CD44 相互作用发现, 高分子量 HA 的断裂力更低^[67]。从表 2 统计也可以看出, 二维条件下获得的 CD44 - 配体相互作用负反应率明显高于三维条件下 (表 1) 的结果, 表明二维约束及外力作用对其反应动力学的调控作用。

表 1 基于表面等离子共振技术的不同分子体系三维反应动力学参数比较

Table 1 Comparison of three-dimensional interaction kinetic parameters for different molecular systems based on SPR technology

Interaction pairs		[NaCl]/	Form of	K_D /	$k_{\text{on}}/$	$k_{\text{off}}/$	Ref.
selectin/HA	ligand	nM	selectin	nM	($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	s^{-1}	
E-selectin	PSGL-1	50	dimer	178 ± 22	1100 ± 106	$(2.0 \pm 0.2) \times 10^{-4}$	[64]
		200	dimer	1150 ± 118	165 ± 13	$(1.9 \pm 0.2) \times 10^{-4}$	
	CD44	50	dimer	137 ± 6	1200 ± 82	$(1.7 \pm 0.1) \times 10^{-4}$	
		200	dimer	663 ± 48	226 ± 28	$(1.5 \pm 0.1) \times 10^{-4}$	
E-selectin	PSGL-1	150	—	467 ± 95	52 ± 5.5	$(25 \pm 4.7) \times 10^{-6}$	[34]
	CD44	150	—	777 ± 40	61 ± 24	$(4.9 \pm 2.1) \times 10^{-5}$	
E-selectin	PSGL-1	150	—	259 ± 34	793 ± 166	$(1.9 \pm 0.3) \times 10^{-4}$	[65]
	CD44	150	—	233 ± 9	903 ± 156	$(1.9 \pm 0.4) \times 10^{-4}$	
HA-6.4 kD	CD44	150	—	<u>2711</u>	$(6.27 \pm 0.1) \times 10^4$	0.17 ± 0.0039	[66]
HA-31 kD	CD44	150	—	<u>2.52</u>	$(3.44 \pm 0.02) \times 10^4$	$(8.68 \pm 0.89) \times 10^{-5}$	
HA-132 kD	CD44	150	—	<u>7.98×10^{-3}</u>	$(1.83 \pm 0.03) \times 10^7$	$(1.46 \pm 0.11) \times 10^{-4}$	
HA-700 kD	CD44	150	—	—	$(6.7 \pm 0.03) \times 10^6$	—	
HA-1500 kD	CD44	150	—	—	$(1.76 \pm 0.06) \times 10^7$	—	

Note: K_D , equilibrium dissociation constant; k_{off} , dissociation rate; k_{on} , association rate. Most data are obtained from literatures directly except those underlined which are calculated by $K_D = k_{\text{off}} / k_{\text{on}}$.

表 2 基于原子力显微镜技术的不同分子体系的二维反应动力学参数比较

Table 2 Comparison of two-dimensional interaction kinetic parameters for different molecular systems based on AFM technology

Interaction pairs	Design	$k_{\text{off}}/\text{s}^{-1}$	Rupture force	Loading rate/ ($\text{nN}\cdot\text{s}^{-1}$)	Single/ multibonds	Ref.
CD44-HA	substrate: CD44 tip: HA	0.3 ± 0.5	<u>24 ~ 44 pN</u>	0.46 ~ 4.58	single	[68]
	substrate: CD44 tip: HA	0.57 ± 0.11	<u>26 ~ 48 pN</u>	0.45 ~ 5.22	Multi	[68]
	substrate: CD44 decorated lipid bilayer tip: HA	0.63 ± 0.37	<u>30 ~ 60 pN</u>	0.83 ~ 6.84	Multi	[68]
CD44v-P-selectin	substrate: CD44v decorated lipid bilayer tip: P-selectin	0.16 ± 0.03	<u>35 ~ 40 pN</u>	0.05 ~ 2	—	[69]
CD44v-fibrin	substrate: CD44v decorated lipid bilayer tip: fibrin	0.43 ± 0.1	<u>30 ~ 40 pN</u>	0.05 ~ 2	—	[69]
CD44s-fibrin	substrate: CD44s decorated lipid bilayer tip: fibrin	0.44 ± 0.05	<u>20 ~ 120 pN</u>	<u>0.01 ~ 5</u>	—	[70]
CD44s-fibrinogen	substrate: CD44s decorated lipid bilayer tip: fibrinogen	0.62 ± 0.06	<u>20 ~ 120 pN</u>	<u>0.01 ~ 5</u>	—	[70]
CD44v-HA	substrate: CD44v decorated lipid bilayer tip: HA	0.005 ± 0.003	<u>60 ~ 80 pN</u>	<u>0.01 ~ 5</u>	—	[70]
CD44s-HA	substrate: CD44s decorated lipid bilayer tip: HA	0.004 ± 0.002	<u>60 ~ 80 pN</u>	<u>0.01 ~ 5</u>	—	[70]
HA-CD44-expressed cell	substrate: CD44-expressed cell tip: HA	—	15 pN	—	single	[71]
HA-CD44-expressed cell	substrate: CD44-expressed cell tip: HA-coated bead	—	0.9 nN	—	—	[72]
LWM-HA-CD44-expressed cell	substrate: CD44-expressed cell tip: HA-coated bead	—	7.6 ± 2.4 nN	—	—	[67]
HWM-HA-CD44-expressed cell	substrate: CD44-expressed cell tip: HA-coated bead	—	2.4 ± 0.7 nN	—	—	[67]

Note: Most data are from literatures directly, but those underlined data are estimated from figures of literatures.

另外, 针对 CD44-选择素、CD44-HA 相互作用体系而言, 虽然已有研究报道了二维条件下的相互作用强度及零力下负反应率, 但是负反应率随外力的变化规律则鲜有报道. 需要说明的是, 考虑到不同实验条件、实验手段之间的差异, 导致无法对测量结果进行直接比较, 所以这里没有将选择素与 PSGL-1 相互作用的结果统计在内.

除了上述二维、三维条件下分子层次定量反应动力学测量, 外力作用下 CD44-配体相互作用介导的离体细胞层次粘附动力学也有系列报道, 最典型的是模拟血流剪切的平板流动腔技术. 已有研究表明, 虽然生理条件下 CD44 同为三种选择素的配体^[73-74], 但是其结合强度不尽相同. 流体剪切条件下, 结肠癌

细胞 LS17T, T84 等来源的 CD44v 与选择素相互作用介导的微珠滚动速度表现为 E 选择素最慢, 次之是 P 选择素, 而 L 选择素最快^[75-76]. 另一方面, 流体剪切条件下, 表达有 CD44 的白血病细胞株 KG-1a 在 HA 包被的底板上呈现多相粘附特征: 在约 0.2 dyn/cm^2 下发生滚动粘附, 而且滚动细胞数目随着流体剪切的增加而增加, 在 $0.7 \sim 1.0 \text{ dyn/cm}^2$ 时滚动细胞数量达到最高, 然后随着流体剪切的进一步增加滚动细胞数量逐渐减少, 抗剪切能力甚至可达 100 dyn/cm^2 ^[77]. 造血祖细胞在包被 HA 的底板上也存在类似现象, 最优剪切力在 1.0 dyn/cm^2 左右^[78]. 此外, CD44 介导的人源胶质母细胞瘤的粘附和迁移速度取决于 HA 水凝胶的硬度^[79], 表明 CD44-HA 相互作用除受流体

剪切外,同时受到硬度等力学微环境的调控.值得注意的是,CD44-HA 相互作用介导的细胞粘附动力学随流体剪切呈现的多相特征与选择素-PSGL-1 相互作用介导的细胞粘附动力学类似,而该特征是由外力作用下选择素与 PSGL-1 相互作用的逆锁键特征决定的^[80].不同流体剪切条件下白细胞滚动动力学改变的研究结果表明,外力可以将 HA-CD44 相互作用从低亲和力状态转变为高亲和力状态^[81].而 CD44-选择素相互作用介导的细胞粘附动力学具有什么样的特征?外力如何调控等问题,则鲜有报道.

综上所述,CD44-选择素/HA 相互作用不论是在分子层次的反应动力学还是在细胞层次的粘附动力学,以及力学调控规律的研究还不完善.而 CD44 不同剪接体或糖基化修饰等的多样性、HA 不同分子量大小或组装方式,以及不同实验条件、手段的差异等,导致现有数据之间难以进行直接比较,从而无法更好地阐释其生物学功能.

4 CD44-配体相互作用的微观结构基础

结构决定功能,分子微观结构特征决定了分子间相互作用反应动力学,进而决定细胞层次粘附动力学及其生物学功能.因此,明确 CD44-配体相互作用的微观结构特征有利于更好阐释 CD44-配体相互作用的差异以及在炎症级联反应过程中的作用.已有研究通过系列氨基酸位点突变实验表明 CD44 胞外氨基末端的球状结构域(32~132 位氨基酸)是 CD44 的配体—胶原蛋白,层粘连蛋白,纤连蛋白以及细胞表面受体(如 E/L 选择素)—的主要结合位点^[82-83],且该结构域内的二硫键对于 CD44 与 HA 的结合也至关重要^[84].此外,CD44 的胞外区有两段高度保守的 BX7B 多肽片段,其中一段为 38~46 位氨基酸片段,参与其与 HA 的结合(其中 B 代表精氨酸 Arg 或赖氨酸 Lys, X7 代表任何 7 个非酸性氨基酸).另一个 BX7B 片段位于第一个片段“下游”约 100 个氨基酸的位置,同样可以与 HA 作用^[85].但是其微观结构特征尚不清楚.

目前报道的原子层次精细结构主要包括 CD44 N-末端的 HABD(HA binding domain)结构域^[86],以及 HABD-HA 相互作用的复合物结构^[87-88].通过比较 HA 结合前后的构象变化,提出了 CD44-HABD 结构域存在两种不同程度的变构效应:一是 HA 结

合导致 HABD 结构域的 Link domain C-末端扩展区的有序 β 9-sheet 变成高度无序的 loop 区,并从 Link domain 脱离,而且 HABD 的 C-末端片段在 HA 结合状态下柔性增加.根据该构象差异,将未结合状态 and HA 结合状态下的 HABD 构象分别称为“有序(O)”和“部分无序(PD)”构象.超过 90% 的 HABD 被认为在 HA 结合状态下采用 PD 状态,也就是说 PD 构象具有更高的亲和性^[89].二是 HA 的结合导致 HABD 上 R45 位(人源蛋白对应于 R41 位)精氨酸位点附近的 loop 区发生取向变化,进而导致其与 HA 结合能力的调整^[88](图 1(a)和图 1(b)).CD44-HA 相互作用主要是静电与范德华相互作用,虽然通过结构生物学手段获得的复合物结构显示 HA 与 HABD 的结合仅存在一种结合模式,而后续分子模拟则预测 HA 与 HABD 的结合可以存在 3 种不同取向,分别是晶体结合模式,平行结合模式和直立结合模式,其中晶体结合模式结合能力最强,后两个是亚稳状态^[90],体现出 CD44-HA 相互作用的复杂性.

HA 的结合可诱导 CD44 构象改变、进而调控其结合能力的观点得到一系列研究的支持,并验证了外力调控其相互作用的重要性.在此基础上考察外力在 CD44 介导的细胞(微珠)滚动中的作用,发现当 HABD 通过 C 末端标签连接到微珠时,滚动行为仅在高剪切应力时才稳定发生,表明高剪切应力下 HABD 从 O 构象转变到 PD 构象,增强了其与 HA 的相互作用,从而更好地抵抗流体剪切的作用.而采用 O 构象或 PD 构象的 HABD 突变体包被的微珠则没有上述随流体剪切增高而粘附增强的现象.分子动力学模拟表明,作用于 C 末端的外力可破坏 C 末端区域和该结构域主体结构之间的相互作用,从而实现了从 HABD 结构域从 O 构象态到 PD 构象态的变构;同时在 C 末端施加的外力可更快地诱导高亲和力 PD 的构象、增强 HABD-HA 相互作用,从而更有效介导白细胞的炎症反应和造血祖细胞归巢^[81].此外,CD44-HA 相互作用介导的细胞粘附和迁移速度取决于 HA 水凝胶的硬度,提示基于 CD44 的信号传导具有机械敏感性^[79],进一步支持了力学因素调控 CD44 不同亲和态构象进而调控其与 HA 的结合能力的观点.

虽然关于 CD44 HABD 结构域及 HABD-HA 相互作用的微观结构特征有系列报道,但是 CD44 其他结构域或不同糖基化的微观结构特征及其对 HA 结

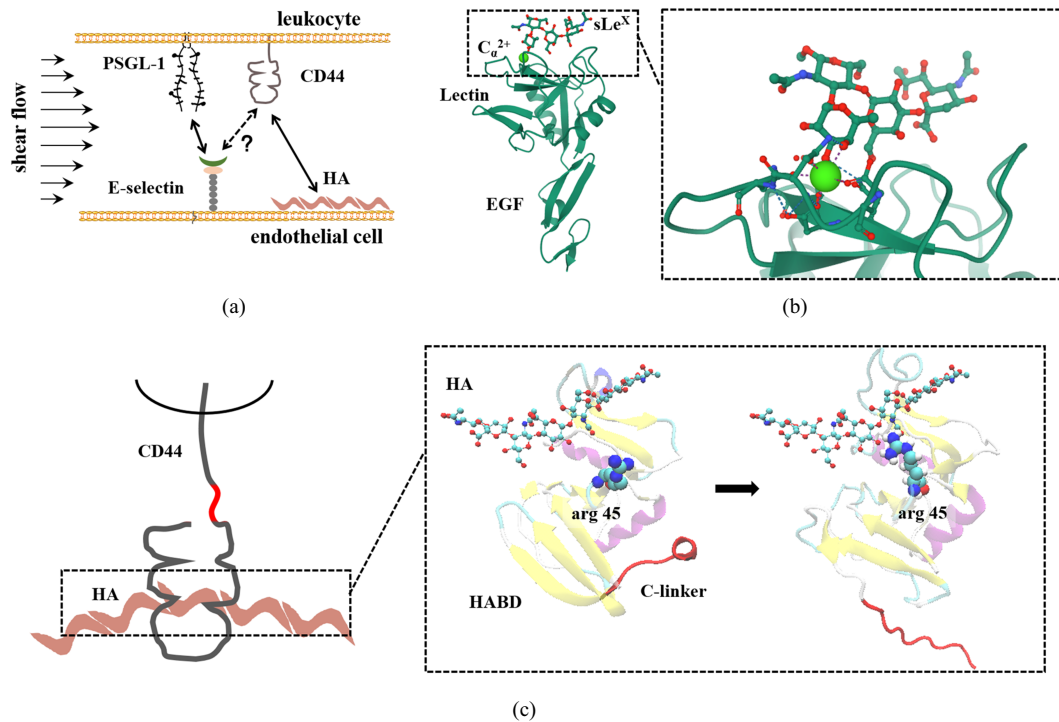


图 1 CD44-配体相互作用的微观结构特征: (a) 细胞粘附分子 PSGL-1、CD44、E 选择素与 HA 的分布及相互作用网络; (b) PSGL-1 的 N 末端糖基 sLe^x 作用在 E 选择素 Lectin 结构域的钙离子附近; (c) HA 作用导致 CD44 HABD 结构域发生构象改变

Fig. 1 Microstructural features of CD44-ligands interactions: (a) Schematic interaction network among PSGL-1, CD44, E-selectin and HA; (b) conformational allostery of CD44 HABD domain induced by HA binding; (c) crystallized E-selectin-sLe^x interaction complex

合的贡献还不清楚. 另外, 尽管选择素的微观结构研究相对完善, 包括构象动力学及其与配体 PSGL-1 相互作用的特征^[91-94] (图 1(a) 和图 1(b)), 但是 CD44-选择素相互作用的微观结构特征还尚无报道. 因此, 进一步从微观结构层次考察 CD44-选择素相互作用特征及其力学调控规律, 是深入理解其结构功能-关系的基础.

5 CD44-配体相互作用介导的胞内信号通路

HA 是与 CD44 结合进而通过胞内信号通路调控细胞迁移、生长与增殖等功能的主要配体之一. 在调控细胞迁移方面: CD44 通过其胞内结构域与细胞骨架相关蛋白相互作用进而调控细胞迁移^[95-96]. ERM 是桥接 CD44 与胞质肌动蛋白的主要蛋白之一^[5], 其结合位点位于 CD44 胞质段的碱性氨基酸序列^[97]. HA 结合 CD44 导致蛋白激酶 C(PKC) 激活, 使得 CD44 胞内端磷酸化, 增强其与 ERM 蛋白的结合, 进而加强 CD44 与细胞骨架的相互作用, 促进细胞迁移^[18,98-99]. 另外, HA 与 CD44 的结合可以促进 c-Src

激酶募集至 CD44 部位并激活 c-Src, 继而增加细胞骨架蛋白 cortactin 的酪氨酸磷酸化. Cortactin 的酪氨酸磷酸化减弱了其交联丝状肌动蛋白的能力, 从而调节细胞的迁移能力, 促进细胞的募集^[100]. HA 与 CD44 相互作用还可以激活 Rho GTPase(如 Cdc42, Rac1 等)信号, 该信号通过不同的效应分子来调控细胞骨架的重组, 进而调控细胞迁移. HA-CD44 相互作用可以通过 Cdc42 调节 F 肌动蛋白进而调节细胞骨架, 促进细胞的募集^[101]; HA 与某些表达 CD44 的细胞结合也可激活 Rac1 信号传导, 进而调控细胞膜皱褶结构或细胞运动. CD44v3 与 Tiam1 之间的相互作用促进了 Rac1 信号转导和细胞骨架介导的乳腺肿瘤迁移^[102]. HA 的结合促进 CD44 与癌蛋白 Vav 家族成员 Vav2 蛋白的相互作用, 维持 Rac1 和 Ras 活化, 促进卵巢肿瘤细胞生长和迁移增加^[103] (图 2(a)). 另外, HA 与 CD44 相互作用还可通过不同信号通路调控细胞的生长、增殖、存活等. CD44-HA 相互作用可通过 Rho 激活诱导 PI3K, 再由 PI3K 激活丝氨酸/苏氨酸激酶 (Akt), 进而促进细胞增殖和存活^[104]. 同时, CD44 还通过 HA 合成酶 HAS2, HA 及 Akt 信号通路之间的正反馈回路诱导乳腺癌细胞中 Akt 信号的持续激活,

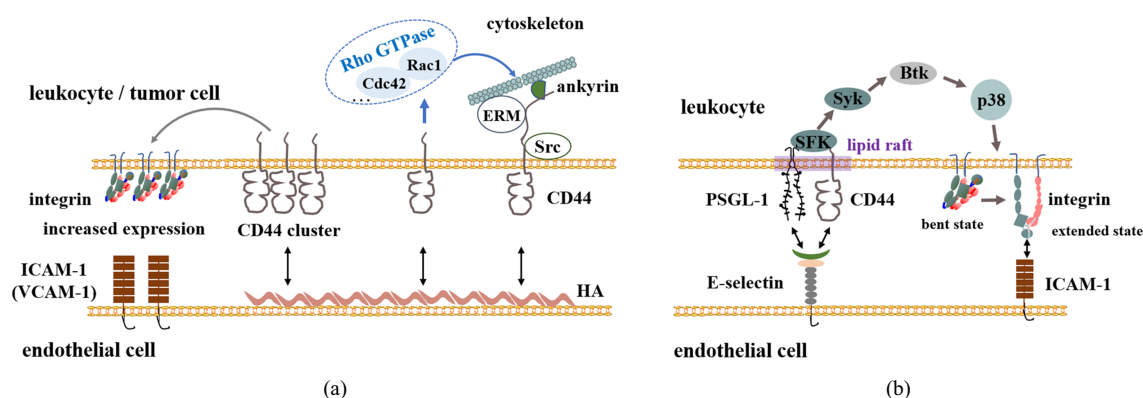


图 2 介导细胞粘附与迁移的 CD44 胞内信号通路: (a) HA 与 CD44 相互作用启动的 CD44 胞内信号通路;
(b) E 选择素与 CD44 相互作用启动的 CD44 胞内信号通路

Fig. 2 CD44-mediated intracellular signaling pathways for cell adhesion and migration: (a) CD44-HA interaction mediated intracellular signaling pathways; (b) CD44-E-selectin interaction mediated intracellular signaling pathways

最终克服凋亡并维持细胞存活^[105]. 外源性 HA 通过骨髓巨噬细胞样细胞上两种不同的 HA 受体增强造血功能. 其中一种是 HA-CD44 与激活 p38 丝裂原活化蛋白 (MAP) 激酶的途径相关, CD44-HA 增强了细胞的增殖^[106]. HA-CD44 相互作用还可通过细胞外信号相关激酶 1 和 2(ERK1/2) 介导内皮细胞的活化和增殖^[107]; 或通过激活 ERK2, 进一步磷酸化 Elk-1, 促进细胞迁移以及增殖^[101]. CD44 也可以作为共同受体而行使生物学功能, 通过与肝细胞生长因子 HGF 结合, CD44v6 与 Met 以及 HGF 形成三体复合物并促进 Met 激活, 去除 CD44 胞质尾部依旧可以激活 Met, 但需有 CD44 胞质尾部与 ERM 蛋白相互作用、才能激活 Ras-MAPK 途径^[108]. CD44v6-ECM 结合还促进 PI3K / Akt 途径激活和 Met 转录^[109-110].

另一蛋白 Merlin 在 CD44 胞内端的结合位点与 ERM 存在竞争性作用, Merlin 的激活发生在 ERM 蛋白失活之后. Merlin 的激活引起皮质肌动蛋白细胞骨架的重组, 同时阻止 Ras 激活以及 Ras 依赖性信号传导, 并抑制了多种受体酪氨酸激酶的信号传递^[5]. 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 PAK2 可使 Merlin 磷酸化^[111], 但同时导致 Merlin 失活并抑制其与 CD44 的结合^[99]. 高细胞密度或高分子量 HA 的加入会触发 Merlin 的去磷酸化, 从而导致生长抑制复合物的形成, 使得细胞增殖受限^[5]. 因此, ERM 蛋白和 Merlin 蛋白具有控制细胞增殖的“开关”作用.

除上述 HA 结合启动 CD44 胞内信号通路在细胞生长、增殖、细胞骨架重组等过程中的作用外, CD44 作为细胞粘附分子则呈现出不同的信号通路.

从现象上来讲, CD44-HA 相互作用介导的 T 细胞外渗同时依赖于整合素 VLA-4 与配体 VCAM-1 相互作用^[112], 而 CD44 胞内端缺失则破坏了 VLA-4 整合素介导的 T 细胞稳定粘附和出渗^[113], 提示 CD44 可能通过胞内某种信号通路与 VLA-4 整合素协同作用. CD44-HA 相互作用也可增加整合素信号传导, 从而导致细胞铺展^[114]. 高表达 CD44 的结肠癌细胞通过 CD44 交联或低分子量 HA 刺激可诱导 β_2 整合素 $\alpha_L\beta_2$ 的表达, 并进一步通过 $\alpha_L\beta_2$ -ICAM-1 相互作用促进癌细胞在内皮细胞上的粘附和跨内皮迁移, 通过加入 PKC 酶抑制剂, 可阻断该过程的发生^[115]. 类似地, CD44 交联导致 MDA-MB-435S 或 Hs578T 乳腺癌细胞系上整合素 $\alpha_L\beta_2$ 与 VLA-4 表达上调, 并进一步通过整合素-配体相互作用促进乳腺癌细胞跨内皮迁移^[116] (图 2(a)). E 选择素结合也可触发 CD44 胞内信号、从而激活整合素. E 选择素与 CD44 相互作用可以介导中性粒细胞的慢速滚动过程, 其原因在于 E 选择素的结合可通过脂筏上 CD44 胞内端 SFK → Syk → Btk → p38 的信号通路激活整合素 $\alpha_L\beta_2$, 进而通过 $\alpha_L\beta_2$ -ICAM-1 相互作用促进细胞的慢速滚动^[31] (图 2(b)).

正常生理条件下 CD44 成簇定位于细胞膜脂筏上, 因此脂筏的破坏与否对其与配体相互作用的能力、胞内信号的传递及相应生物学功能有明显调控作用. 通过甲基- β -环糊精 (M β CD) 消耗膜胆固醇、降低 CD44 在脂筏中的聚集, 可增强 T 细胞上 CD44 与 HA 的结合, 进而增加了生理流动条件下 T 细胞发生滚动粘附的细胞数量^[117]. 而高水平的胆固醇促进

CD44 进入脂筏, CD44-Ezrin 结合力减弱, 抑制肿瘤细胞的迁移和侵袭^[118]。另外, 多数 Src 家族激酶可被特定的脂质修饰, 而这些脂质可以将 Src 激酶引导至具有高胆固醇和糖磷脂含量的脂筏区域。因此, CD44 与脂筏中的 c-Src 激酶直接结合可促进 HA 介导的 c-Src 激酶活性并介导细胞骨架调节的细胞迁移^[119]。高分子量 HA 可以加强 CD44 成簇, 而 HA 片段似乎没有作用^[120-121]。有趣的是, 寡糖 HA 孵育细胞后, 能够减少先前由高分子量 HA 诱导形成的 CD44 簇^[122]。

简言之, CD44 通过复杂的胞内信号网络介导细胞的生长、增殖、迁移等多种生物学过程, 而且受到力学、CD44 糖修饰、CD44 簇集及不同配体作用等多种因素调控。作为细胞粘附分子, HA 或 E 选择素的结合均可通过 CD44 胞内信号通路激活整合素, 进而通过整合素-配体相互作用实现免疫细胞募集、癌细胞迁移等过程的级联反应。需要说明的是, 就目前的报道可以发现, HA 与 CD44 相互作用主要是激活 T 淋巴细胞或癌细胞上整合素的表达上调, 进而通过增强整合素-配体相互作用的亲和力 (avidity), 促进细胞间粘附或跨膜迁移; 而 E 选择素与 CD44 相互作用则主要是激活中性粒细胞上整合素构象的改变, 进而通过增强整合素配体相互作用的亲和性 (affinity), 促进细胞间的粘附或跨膜迁移, 从而表明不同配体与 CD44 相互作用介导不同的生物学功能。作为在肝脏免疫中起重要作用的分子体系, HA 与 CD44 相互作用如何调控中性粒细胞在肝血窦内的募集, 其与整合素之间存在怎样的协同作用等问题尚不清楚。

6 结论与展望

作为干细胞鉴定或疾病检测、病程发生发展的标志物, 胞内多种复杂信号网络的触发分子, 以及介导细胞粘附的重要受体, CD44 分子的生物学重要性毋庸置疑, 其相应内在机制的研究也日趋深入。随着人们对生命活动规律及内在机制认知的加深, 研究者们逐渐认识到力学、物理因素对生命活动的不可或缺性, 重要研究进展包括力学因素对发育^[123-127]、遗传^[128]、免疫^[129]等重要生命活动的调控, 并催生了力学医学、力学免疫学、力学组学新概念, 发展了生物力学与力学生物学等交叉研究领域, 但是其内在机制还远不清楚。如上所述, CD44 作为细胞膜表达分子, 其与配体 HA 或选择素相互作用介导的细胞粘附

受到生理力学、物理微环境的调控, 包括流体剪切、基质硬度等。

虽然目前关于 CD44 与配体相互作用微观结构特征、分子反应动力学、细胞粘附动力学及胞内信号通路均有报道, 但是力学因素调控 CD44 与配体相互作用的规律及内在机制还远不清楚, 均需深入研究。在不同力学因素对细胞粘附动力学的调控规律及内在机制方面: 主要包括外力作用下 CD44 与选择素相互作用介导的细胞粘附动力学具有什么样的特征; 外力作用下不同分子量膜定位的 HA 与 CD44 相互作用介导的细胞粘附动力学差异; 其不同组装形式对细胞粘附的调控等。在分子相互作用反应动力学的调控规律及结构基础方面: 主要包括分子层次 CD44 与选择素/HA 相互作用的力学调控规律, 及相互间的差异; 不同分子量 HA-CD44 相互作用的力学调控规律, 及其组装方式的影响; 原子层次 CD44 与选择素相互作用特征及其力学调控特征等。特别地, 作为肝脏免疫过程中起重要作用的分子体系, 尚待考察的问题包括其独特力学、物理微环境如何调控 CD44 与 HA 相互作用介导的细胞粘附动力学? 其生物学功能如何体现其组织特异性等。

参 考 文 献

- 1 Babasola O, Rees-Milton KJ, Bebe S, et al. Chemically modified N-acetylated hyaluronan fragments modulate proinflammatory cytokine production by stimulated human macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(36): 24779-24791
- 2 Katoh S, Maeda S, Fukuoka H, et al. A crucial role of sialidase Neu1 in hyaluronan receptor function of CD44 in T helper type 2-mediated airway inflammation of murine acute asthmatic model. *Clinical and Experimental Immunology*, 2010, 161(2): 233-241
- 3 Krolkoski M, Monslow J, Puré E. The CD44-HA axis and inflammation in atherosclerosis: A temporal perspective. *Matrix Biology*, 2019, 78-79: 201-218
- 4 Sreaton GR, Bell MV, Jackson DG, et al. Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89(24): 12160-12164
- 5 Ponta H, Sherman L, Herrlich P A. CD44: From adhesion molecules to signalling regulators. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2003, 4(1): 33-45
- 6 Naor D, Nedvetzki S, Golan I, et al. CD44 in cancer. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 2002, 39(6): 527-579
- 7 Brown TA, Bouchard T, John TS, et al. Human keratinocytes express a new CD44 core protein (CD44E) as a heparan-sulfate intrinsic membrane proteoglycan with additional exons. *Journal of Cell Biology*, 1991, 113(1): 207-221

- 8 Jiang L, Liu G, Liu H, et al. Molecular weight impact on the mechanical forces between hyaluronan and its receptor. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 197: 326-336
- 9 Murai T, Hokonohara H, Takagi A, et al. Atomic force microscopy imaging of supramolecular organization of hyaluronan and its receptor CD44. *IEEE Transactions on Nanobioscience*, 2009, 8(4): 294-299
- 10 Greenfield B, Wang WC, Marquardt H, et al. Characterization of the heparan sulfate and chondroitin sulfate assembly sites in CD44. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(4): 2511-2517
- 11 Screamon G, Bell M, Bell J, et al. The identification of a new alternative exon with highly restricted tissue expression in transcripts encoding the mouse Pgp-1 (CD44) homing receptor. Comparison of all 10 variable exons between mouse, human, and rat. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268(17): 12235-12238
- 12 Okamoto, I. Kawano, Y. Murakami, D. et al Proteolytic release of CD44 intracellular domain and its role in the CD44 signaling pathway. *Journal of Cell Biology*, 2001, 155(5): 755-762
- 13 Kalnina Z, Zayakin P, Silina K, et al. Alterations of pre-mRNA splicing in cancer. *Genes Chromosomes & Cancer*, 2005, 42(4): 342-357
- 14 Liu D, Sy MS. Phorbol myristate acetate stimulates the dimerization of CD44 involving a cysteine in the transmembrane domain. *Journal of Immunology*, 1997, 159(6): 2702-2711
- 15 Neame SJ, Uff CR, Sheikh H, et al. CD44 exhibits a cell type dependent interaction with Triton X-100 insoluble, lipid rich, plasma membrane domains. *Journal of Cell Science*, 1995, 108 (9): 3127-3135
- 16 Stamenkovic I, Yu Q. Merlin, a "Magic" linker between the extracellular cues and intracellular signaling pathways that regulate cell motility, proliferation, and survival. *Current Protein & Peptide Science*, 2010, 11(6): 471-484
- 17 Williams K, Motiani K, Giridhar PV, et al. CD44 integrates signaling in normal stem cell, cancer stem cell and (pre)metastatic niches. *Experimental Biology and Medicine*, 2013, 238(3): 324-338
- 18 Legg JW, Lewis CA, Parsons M, et al. A novel PKC-regulated mechanism controls CD44-ezrin association and directional cell motility. *Nature Cell Biology*, 2002, 4(6): 399-407
- 19 Mori T, Kitano K, Terawaki S, et al. Structural basis for CD44 recognition by ERM proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(43): 29602-29612
- 20 Lesley J, Hyman R, Kincade P. CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Advances in Immunology*, 1993, 54:271-335
- 21 Naor D, Sionov R, Ish-Shalom D. CD44: Structure, function and association with the malignant process. *Advances in Cancer Research*, 1997, 71: 241-319
- 22 Medzhitov R, Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 2008, 454(7203): 428-435
- 23 Barton, MG. A calculated response: Control of inflammation by the innate immune system. *Journal of Clinical Investigation*, 2008, 118(2): 413-420
- 24 Nathan, C. Neutrophils and immunity: Challenges and opportunities. *Nature Reviews Immunology*, 2006, 6(3): 173-182
- 25 Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 2013, 13(3): 159-175
- 26 McEver RP. Adhesive interactions of leukocytes, platelets, and the vessel wall during hemostasis and inflammation. *Thrombosis and Haemostasis*, 2001, 86(3): 746-756
- 27 Vestweber D and Blanks JE. Mechanisms that regulate the function of selectins and their ligands. *Physiological Reviews*, 1999, 79(1): 181-213
- 28 Lee D, Schultz JB, Knauf PA, et al. Mechanical shedding of L-selectin from the neutrophil surface during rolling on sialyl Lewis x under flow. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(7): 4812-4820
- 29 Yao L, Setiadi H, Xia L, et al. Divergent inducible expression of P-selectin and E-selectin in mice and primates. *Blood*, 1999, 94(11): 3820-3828
- 30 Katayama Y, Hidalgo A, Chang JS, et al. CD44 is a physiological E-selectin ligand on neutrophils. *Journal of Experimental Medicine*, 2005, 201(8): 1183-1189
- 31 Yago T, Shao B, Miner JJ, et al. E-selectin engages PSGL-1 and CD44 through a common signaling pathway to induce integrin alpha(L)beta(2)-mediated slow leukocyte rolling. *Blood*, 2010, 116(3): 485-494
- 32 Nacher M, Blazquez AB, Shao BJ, et al. Physiological contribution of CD44 as a ligand for E-selectin during inflammatory T-cell recruitment. *American Journal of Pathology*, 2011, 178(5): 2437-2446
- 33 Jacobs PP, Sackstein R. CD44 and HCELL: Preventing hematogenous metastasis at step 1. *FEBS Letters*, 2011, 585(20): 3148-3158
- 34 Ali AJ, Abuelela AF, Merzaban JS. An analysis of trafficking receptors show that CD44 and P-Selectin glycoprotein ligand-1 collectively control the migration of activated human T-cells. *Frontiers in Immunology*, 2017, 8: 492
- 35 Hidalgo A, Peired AJ, Wild MK, et al. Complete identification of E-selectin ligands on neutrophils reveals distinct functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44. *Immunity*, 2007, 26(4): 477-489
- 36 AbuZineh K, Joudeh LI, Al Alwan B, et al. Microfluidics-based super-resolution microscopy enables nanoscopic characterization of blood stem cell rolling. *Science Advances*, 2018, 4(7): eaat5304
- 37 Day A, Motte C. Hyaluronan cross-linking: A protective mechanism in inflammation? *Trends in Immunology*, 2006, 26(12): 637-643
- 38 Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan as an immune regulator in human diseases. *Physiological Reviews*, 2011, 91(1): 221-264
- 39 Toole BP, Wight TN, Tammi MI. Hyaluronan-cell interactions in cancer and vascular disease. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(7): 4593-4596
- 40 Tavianatou AG, Caon I, Franchi M, et al. Hyaluronan: molecular size-dependent signaling and biological functions in inflammation and cancer. *FEBS Journal*, 2019, 286(15): 2883-2908
- 41 Ghosh S, Hoselton SA, Wanjara SB, et al. Hyaluronan stimulates ex vivo B lymphocyte chemotaxis and cytokine production in a murine model of fungal allergic asthma. *Immunobiology*, 2015, 220(7): 899-909
- 42 Campo GM, Avenoso A, Campo S, et al. Differential effect of molecular size HA in mouse chondrocytes stimulated with PMA. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2009, 1790(10): 1353-1367
- 43 Campo GM, Avenoso A, Campo S, et al. Small hyaluronan oligosaccharides induce inflammation by engaging both toll-like-4 and CD44 receptors in human chondrocytes. *Biochemical Pharmacology*, 2010, 80(4): 480-490

- 44 Wolf KJ, Shukla P, Springer K, et al. A mode of cell adhesion and migration facilitated by CD44-dependent microtentacles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(21): 11432-11443
- 45 DeGrendele, CH. CD44 and its ligand hyaluronate mediate rolling under physiologic flow: A novel lymphocyte-endothelial cell primary adhesion pathway. *Journal of Experimental Medicine*, 1996, 183(3): 1119-1130
- 46 DeGrendele CH. Requirement for CD44 in activated T cell extravasation into an inflammatory site. *Science*, 1997, 278(5338): 672-675
- 47 Bonder CS, Clark SR, Norman MU, et al. Use of CD44 by CD4(+) Th1 and Th2 lymphocytes to roll and adhere. *Blood*, 2006, 107(12): 4798-4806
- 48 Pauline Johnson BR. CD44 and its Role in Inflammation and Inflammatory Disease. *Inflammation & Allergy Drug Targets*, 2009, 8(3): 208-220
- 49 Hutás G, Bajnok E, Gál I, et al. CD44-specific antibody treatment and CD44 deficiency exert distinct effects on leukocyte recruitment in experimental arthritis. *Blood*, 2008, 112(13): 4999-5006
- 50 Khan AI, Kerfoot SM, Heit B, et al. Role of CD44 and hyaluronan in neutrophil recruitment. *Journal of Immunology*, 2004, 173(12): 7594-7601
- 51 Motte CADL, Hascall VC, Drazba J, et al. Mononuclear leukocytes bind to specific hyaluronan structures on colon mucosal smooth muscle cells treated with polyinosinic acid: Polycytidylic acid - inter-alpha-trypsin inhibitor is crucial to structure and function. *American Journal of Pathology*, 2003, 163(1): 121-133
- 52 Skelton PT. Glycosylation provides both stimulatory and inhibitory effects on cell surface and soluble CD44 binding to hyaluronan. *Journal of Cell Biology*, 1998, 140(2): 431-446
- 53 Degrendele HC, Kosfiszter M, Estess P, et al. CD44 activation and associated primary adhesion is inducible via T cell receptor stimulation. *Journal of Immunology*, 1997, 159(6): 2549-2553
- 54 Maiti A, Maki G, Johnson P. TNF- α induction of CD44-mediated leukocyte adhesion by sulfation. *Science*, 1998, 282(5390): 941-943
- 55 Underhill CB, Nguyen HA, Shizari M, et al. CD44 positive macrophages take up hyaluronan during lung development. *Developmental Biology*, 1993, 155(2): 324-336
- 56 McDonald B, McAvoy EF, Lam F, et al. Interaction of CD44 and hyaluronan is the dominant mechanism for neutrophil sequestration in inflamed liver sinusoids. *Journal of Experimental Medicine*, 2008, 205(4): 915-927
- 57 Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 2013, 13(3): 159-175
- 58 Menezes GB, Lee WY, Zhou H, et al. Selective down-regulation of neutrophil mac-1 in endotoxemic hepatic microcirculation via IL-10. *Journal of Immunology*, 2009, 183(11): 7557-7568
- 59 Choudhury SR, Babes L, Rahn JJ, et al. Dipeptidase-1 is an adhesion receptor for neutrophil recruitment in lungs and liver. *Cell*, 2019, 178(5): 1205-1221
- 60 Zhuo L, Kanamori A, Kannagi R, et al. SHAP potentiates the CD44-mediated leukocyte adhesion to the hyaluronan substratum. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(29): 20303-20314
- 61 Long M, Lü SQ, Sun GY. Kinetics of receptor-ligand interactions in immune responses. *Cellular & Molecular Immunology*, 2006, 3(2): 79-86
- 62 Li N, Lü SQ, Zhang Y, et al. Mechanokinetics of receptor-ligand interactions in cell adhesion. *Acta Mechanica Sinica*, 2015, 31(2): 248-258
- 63 Lesley J, English N, Charles C, et al. The role of the CD44 cytoplasmic and transmembrane domains in constitutive and inducible hyaluronan binding. *European Journal of Immunology*, 2000, 30(1): 245-253
- 64 AbuSamra DB, Al-Kilani A, Hamdan SM, et al. Quantitative characterization of E-selectin interaction with native CD44 and P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) using a real time immunoprecipitation-based binding assay. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(35): 21213-21230
- 65 AbuSamra DB, Aleisa F A, Al-Amoodi A S, et al. Not just a marker: CD34 on human hematopoietic stem/progenitor cells dominates vascular selectin binding along with CD44. *Blood Advances*, 2017, 1(27): 2799-2816
- 66 Mizrahy S, Raz SR, Hasgaard M, et al. Hyaluronan-coated nanoparticles: The influence of the molecular weight on CD44-hyaluronan interactions and on the immune response. *Journal of Controlled Release*, 2011, 156(2): 231-238
- 67 Sapudom J, Ullm F, Martin S, et al. Molecular weight specific impact of soluble and immobilized hyaluronan on CD44 expressing melanoma cells in 3D collagen matrices. *Acta Biomaterialia*, 2017, 50: 259-270
- 68 Bano F, Banerji S, Howarth M, et al. A single molecule assay to probe monovalent and multivalent bonds between hyaluronan and its key leukocyte receptor CD44 under force. *Scientific Reports*, 2016, 6: 34176
- 69 Raman PS, Alves CS, Wirtz D, et al. Single-molecule binding of CD44 to fibrin versus P-selectin predicts their distinct shear-dependent interactions in cancer. *Journal of Cell Science*, 2011, 124(11): 1903-1910
- 70 Raman PS, Alves CS, Wirtz D, et al. Distinct kinetic and molecular requirements govern CD44 binding to hyaluronan versus fibrin(ogen). *Biophysical Journal*, 2012, 103(3): 415-423
- 71 Lamontagne CA, Grandbois M. PKC-induced stiffening of hyaluronan/CD44 linkage; local force measurements on glioma cells. *Experimental Cell Research*, 2008, 314(2): 227-236
- 72 Martin S, Wang HQ, Rathke T, et al. Polymer hydrogel particles as biocompatible AFM probes to study CD44/hyaluronic acid interactions on cells. *Polymer*, 2016, 102: 342-349
- 73 Dimitroff CJ, Lee JY, Rafii S, et al. CD44 is a major E-selectin ligand on human hematopoietic progenitor cells. *Journal of Cell Biology*, 2001, 153(6): 1277-1286
- 74 Dimitroff CJ, Lee JY, Fuhlbrigge RC, et al. A distinct glycoform of CD44 is an L-selectin ligand on human hematopoietic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(25): 13841-13846
- 75 Hanley WD, Napier SL, Burdick MM, et al. Variant isoforms of CD44 are P- and L-selectin ligands on colon carcinoma cells. *FASEB Journal*, 2006, 20(2): 337-339
- 76 Napier SL, Healy ZR, Schnaar RL, et al. Selectin ligand expression regulates the initial vascular interactions of colon carcinoma cells - The roles of CD44V and alternative sialofucosylated selectin ligands. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(6): 3433-3441
- 77 Christophis C, Taubert I, Meseck G R, et al. Shear stress regulates adhesion and rolling of CD44+ leukemic and hematopoietic progen-

- itor cells on hyaluronan. *Biophysical Journal*, 2011, 101(3): 585-593
- 78 Hanke M, Hoffmann I, Christophis C, et al. Differences between healthy hematopoietic progenitors and leukemia cells with respect to CD44 mediated rolling versus adherence behavior on hyaluronic acid coated surfaces. *Biomaterials*, 2014, 35(5): 1411-1419
- 79 Kim Y, Kumar S. CD44-mediated adhesion to hyaluronic acid contributes to mechanosensing and invasive motility. *Molecular Cancer Research*, 2014, 12(10): 1416-1429
- 80 Marshall BT, Long M, Piper JW, et al. Direct observation of catch bonds involving cell-adhesion molecules. *Nature*, 2003, 423(6936): 190-193
- 81 Suzuki T, Suzuki M, Ogino S, et al. Mechanical force effect on the two-state equilibrium of the hyaluronan-binding domain of CD44 in cell rolling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(22): 6991-6996
- 82 Ishii S, Ford R, Thomas P, et al. CD44 participates in the adhesion of human colorectal carcinoma cells to laminin and type IV collagen. *Surgical Oncology*, 1993, 2(4): 255-264
- 83 Jalkanen, S. Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *Journal of Cell Biology*, 1992, 116(3): 817-825
- 84 Misra S, Hascall VC, Markwald RR, et al. Interactions between hyaluronan and its receptors (CD44, RHAMM) regulate the activities of inflammation and cancer. *Frontiers in Immunology*, 2015, 6: 201
- 85 Johnson P, Maiti A, Brown K, et al. A role for the cell adhesion molecule CD44 and sulfation in leukocyte-endothelial cell adhesion during an inflammatory response? *Biochemical Pharmacology*, 2000, 59(5): 455-465
- 86 Teriete P, Banerji S, Noble M, et al. Structure of the regulatory hyaluronan binding domain in the inflammatory leukocyte homing receptor CD44. *Molecular Cell*, 2004, 13(4): 483-496
- 87 Takeda M, Ogino S, Umemoto R, et al. Ligand-induced structural changes of the CD44 hyaluronan-binding domain revealed by NMR. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(52): 40089-40095
- 88 Banerji S, Wright AJ, Noble M, et al. Structures of the Cd44-hyaluronan complex provide insight into a fundamental carbohydrate-protein interaction. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2007, 14(3): 234-239
- 89 Ogino S, Nishida N, Umemoto R, et al. Two-state conformations in the hyaluronan-binding domain regulate CD44 adhesiveness under flow condition. *Structure*, 2010, 18(5): 649-656
- 90 Vuorio J, Vattulainen I, Martinez-Seara H. Atomistic fingerprint of hyaluronan-CD44 binding. *PLOS Computational Biology*, 2017, 13(7): e1005663
- 91 Somers WS, Tang J, Shaw GD, et al. Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P- and E-selectin bound to SLc(X) and PSGL-1. *Cell*, 2000, 103(3): 467-479
- 92 Lü SQ, Zhang Y, Long M. Visualization of allostery in P-selectin lectin domain using MD simulations. *PLOS One*, 2010, 5(12): e15417
- 93 Lü SQ, Chen SB, Mao DB, et al. Contribution of the CR domain to P-selectin lectin domain allostery by regulating the orientation of the EGF domain. *PLOS One*, 2015, 10(2): e0118083
- 94 Lou J, Zhu C. A structure-based sliding-rebinding mechanism for catch bonds. *Biophysical Journal*, 2007, 92(5): 1471-1485
- 95 Bourguignon LYW. CD44 isoform-cytoskeleton interaction in oncogenic signaling and tumor progression. *Frontiers in Bioscience*, 1998, 3(4): 637-649
- 96 冯世亮, 周吕文, 吕守芹等. 悬浮态上皮细胞粘附的力学化学耦合模型及数值模拟. *力学学报*, 2020, 52(3): 255-264 (Feng Shiliang, Zhou Lüwen, Lü Shouqin, et al. Mechanochemical coupling model and numerical simulation for cell-cell adhesion in suspended epithelial cells. *Chinese Journal of Theoretical and Applied Mechanics*, 2020, 52(3): 854-863 (in Chinese))
- 97 Tsukita S. ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. *Journal of Cell Biology*, 1994, 126(2): 391-401
- 98 Ng T, Parsons M, Hughes WE, et al. Ezrin is a downstream effector of trafficking PKC-integrin complexes involved in the control of cell motility. *The EMBO Journal*, 2001, 20(11): 27232741
- 99 Morrison H. The NF2 tumor suppressor gene product, merlin, mediates contact inhibition of growth through interactions with CD44. *Genes & Development*, 2001, 15(8): 968-980
- 100 Bourguignon LYW, Zhu H, Shao L, et al. CD44 interaction with c-Src kinase promotes cortactin-mediated cytoskeleton function and hyaluronic acid-dependent ovarian tumor cell migration. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(10): 7327-7336
- 101 Bourguignon LYW, Gilad E, Rothman K, et al. Hyaluronan-CD44 interaction with IQGAP1 promotes Cdc42 and ERK signaling, leading to actin binding, Elk-1/Estrogen receptor transcriptional activation, and ovarian cancer progression. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(12): 11961-11972
- 102 Bourguignon LYW, Zhu HB, Shao LJ, et al. CD44 interaction with Tiam1 promotes Rac1 signaling and hyaluronic acid-mediated breast tumor cell migration. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(3): 1829-1838
- 103 Bourguignon LYW, Zhu H, Zhou B, et al. Hyaluronan promotes CD44v3-Vav2 interaction with Grb2-p185HER2 and induces Rac1 and Ras signaling during ovarian tumor cell migration and growth. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(52): 48679-48692
- 104 Manning BD, Toker A. AKT/PKB signaling: Navigating the network. *Cell*, 2017, 169(3): 381-405
- 105 Liu S, Cheng C. Akt signaling is sustained by a CD44 splice isoform-mediated positive feedback loop. *Cancer Research*, 2017, 77(14): 3791-3801
- 106 Khaldoyanidi S, Moll J, Karakhanova S, et al. Hyaluronate-enhanced hematopoiesis: Two different receptors trigger the release of interleukin-1 β and interleukin-6 from bone marrow macrophages. *Blood*, 1999, 94(3): 940-949
- 107 Slevin M, Krupinski J, Kumar S, et al. Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan induce protein tyrosine kinase activity in endothelial cells and cytoplasmic signal transduction pathway resulting in proliferation. *Laboratory Investigation*, 1998, 78(8): 987-1003
- 108 Orian-Rousseau V, Ponta H. Adhesion proteins meet receptors: A common theme? *Advances in Cancer Research*, 2008, 101: 63-92
- 109 Krause DS, Etten RAV. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *New England Journal of Medicine*, 2005, 353(2): 172-187
- 110 Hoon DSB, Kitago M, Kim J, et al. Molecular mechanisms of metastasis. *Cancer & Metastasis Reviews*, 2006, 25(2): 203-220
- 111 Kissil JL, Johnson KC, Eckman MS, et al. Merlin phosphorylation by p21-activated kinase 2 and effects of phosphorylation on merlin localization. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(12): 10394-10399

- 112 Siegelman MH, Stanescu D, Estess P. The CD44-initiated pathway of T-cell extravasation uses VLA-4 but not LFA-1 for firm adhesion. *Journal of Clinical Investigation*, 2000, 105(5): 683-691
- 113 Nandi A, Estess P, Siegelman M. Bimolecular complex between rolling and firm adhesion receptors required for cell arrest: CD44 association with VLA-4 in T cell extravasation. *Immunity*, 2004, 20(4): 455-465
- 114 Chopra A, Murray ME, Byfield FJ, et al. Augmentation of integrin-mediated mechanotransduction by hyaluronic acid. *Biomaterials*, 2014, 35(1): 71-82
- 115 Fujisaki T, Tanaka Y, Fujii K, et al. CD44 stimulation induces integrin-mediated adhesion of colon cancer cell lines to endothelial cells by up-regulation of integrins and c-Met and activation of integrins. *Cancer Research*, 1999, 59(17): 4427-4434
- 116 Wang HS, Ying H, Su CH, et al. CD44 Cross-linking induces integrin-mediated adhesion and transendothelial migration in breast cancer cell line by up-regulation of LFA-1 (α L β 2) and VLA-4 (α 4 β 1). *Experimental Cell Research*, 2005, 304(1): 116-126
- 117 Murai T, Sato C, Sato M, et al. Membrane cholesterol modulates the hyaluronan-binding ability of CD44 in T lymphocytes and controls rolling under shear flow. *Journal of Cell Science*, 2013, 126(15): 3284-3294
- 118 Yang Z, Qin W, Chen Y, et al. Cholesterol inhibits hepatocellular carcinoma invasion and metastasis by promoting CD44 localization in lipid rafts. *Cancer Letters*, 2018, 429:66-77
- 119 Turley E, Noble P, Bourguignon L. Signaling properties of hyaluronan receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(7): 4589-4592
- 120 Anastasia, Tavianatou, Ilaria, et al. Hyaluronan: molecular size-dependent signaling and biological functions in inflammation and cancer. *FEBS Journal*, 2019, 286(15): 2883-2908
- 121 Petrey A C, de la Motte CA. Hyaluronan, a crucial regulator of inflammation. *Frontiers in Immunology*, 2014, 5(5): 101
- 122 Yang C, Cao M, Liu H, et al. The high and low molecular weight forms of hyaluronan have distinct effects on CD44 clustering. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(51): 43094-43107
- 123 Wu X, Hu J, Li G, et al. Biomechanical stress regulates mammalian tooth replacement via the integrin beta 1-RUNX2-Wnt pathway. *The EMBO Journal*, 2020, 39(3): e102374
- 124 Lorenz L, Axnick J, Buschmann T, et al. Mechanosensing by β 1 integrin induces angiocrine signals for liver growth and survival. *Nature*, 2018, 562(7725): 128-132
- 125 Qi JY, Wu BB, Feng SL, et al. Mechanical regulation of organ asymmetry in leaves. *Nature Plants*, 2017, 3(9): 724-733
- 126 Huang G, Xu F, Genin GM, et al. Mechanical microenvironments of living cells: a critical frontier in mechanobiology. *Acta Mechanica Sinica*, 2019, 35(002): 265-269
- 127 Zhou Z, Li W, Huang C, et al. Mechanical microenvironment as a key cellular regulator in the liver. *Acta Mechanica Sinica*, 2019, 35(2): 289-298
- 128 Tajik A, Zhang Y, Wei F, et al. Transcription upregulation via force-induced direct stretching of chromatin. *Nature Materials*, 2016, 15(12): 1287-1296
- 129 Zhu C, Chen W, Lou JZ, et al. Mechanosensing through immunoreceptors. *Nature Immunology*, 2019, 20(10): 1269-1278