

整合素 $\alpha 5\beta 1$ 在脉络膜血管新生中的研究进展

王雯秋, 孙晓东

作者单位: (200080) 中国上海市, 上海交通大学附属第一人民医院眼科

作者简介: 王雯秋, 女, 在读博士, 研究方向: 玻璃体视网膜疾病。

通讯作者: 孙晓东, 男, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向: 玻璃体视网膜疾病。xdsun@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2010-09-28 修回日期: 2010-10-15

Research advancement on integrin $\alpha 5\beta 1$ for choroidal neovascularization

Wen-Qiu Wang, Xiao-Dong Sun

Department of Ophthalmology, the First Affiliated People's Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China

Correspondence to: Xiao-Dong Sun. Department of Ophthalmology, the First Affiliated People's Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China. xdsun@sjtu.edu.cn

Received: 2010-09-28 Accepted: 2010-10-15

Abstract

• Choroidal neovascularization (CNV) is the major cause of blindness in retinal diseases worldwide. Integrin $\alpha 5\beta 1$ plays an important role in CNV pathogenesis. This article presents a review in the structure, mechanism of function, expression of retinal cells as well as the application of integrin $\alpha 5\beta 1$ inhibitors in CNV treatment.

• KEYWORDS: integrin; choroidal neovascularization; therapy

Wang WQ, Sun XD. Research advancement on integrin $\alpha 5\beta 1$ for choroidal neovascularization. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2010; 10(12): 2319-2321

摘要

脉络膜血管新生(choroidal neovascularization, CNV)是眼内后极部病理性血管新生的重要表现,是造成视力损伤的主要病因之一。整合素 $\alpha 5\beta 1$ 因在 CNV 的形成过程中发挥重要作用而受到广泛关注。我们就整合素 $\alpha 5\beta 1$ 的结构、分布、活性调节,及在视网膜色素上皮细胞及脉络膜内皮细胞中的表达及对脉络膜新生血管的调节进行综述,探讨抑制血管新生的有效方法。

关键词: 整合素; 脉络膜新生血管; 治疗

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-5123. 2010. 12. 029

王雯秋, 孙晓东. 整合素 $\alpha 5\beta 1$ 在脉络膜血管新生中的研究进展. *国际眼科杂志* 2010; 10(12): 2319-2321

0 引言

血管新生(angio genesis)是一个程序化的级联事件^[1]。促血管新生因素活化内皮细胞,内皮细胞增殖并迁

移至血管周围,形成原始的血管芽,产生蛋白水解酶,如基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP),降解基膜和细胞外基质(extracellular matrix, ECM),侵入无血管区,并进一步形成毛细血管襻,生成新的毛细血管。这一过程需要通过细胞-细胞、细胞-ECM的共同介导才能完成,而整合素家族是其中最重要的黏附分子之一,在调节细胞黏附、迁移、增殖、存活等方面起着重要作用。其中整合素 $\alpha 5\beta 1$ 更因其在胚胎发育、肿瘤侵袭、血管新生中发挥着多种特定功能而受到广泛关注。我们就整合素 $\alpha 5\beta 1$ 在眼科脉络膜血管新生中的研究进展进行综述。

1 整合素 $\alpha 5\beta 1$ 的概况

1.1 整合素 $\alpha 5\beta 1$ 结构 整合素于 20 世纪 90 年代由 Richard 最早发现,是一类细胞膜表面的糖蛋白受体家族分子,主要介导细胞与细胞、细胞与 ECM 之间的黏附,使细胞内骨架与 ECM 得以整合形成整体^[2]。每一种整合素均是由一个 α 亚基和一个 β 亚基通过共价键形成。目前已发现约有 18 种 α 亚基和 8 种 β 亚基,至少可构成 24 种整合素。 $\alpha 5\beta 1$ 由一个 $\alpha 5$ 亚基和一个 $\beta 1$ 亚基形成的异二聚体,为 I 型跨膜蛋白,分子量为 114 536 Da,含有 1 049 个氨基酸。目前,虽然 $\alpha 5\beta 1$ 高清晰度的结构仍未获得,但通过晶状体结构^[3]测试显示,其与整合素 $\alpha v\beta 3$ 及 $\alpha II b\beta 3$ 具有高度相似性。 $\alpha 5\beta 1$ 与配体的结合主要是通过识别配体中精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Arg-Gly-Asp, RGD)序列, RGD 结合域是由 α 亚基顶端 β 螺旋域与 β 亚基 A 域形成的类似“口袋”形状结构,同时该区域也是某些 $\alpha 5\beta 1$ 拮抗剂的识别区^[4,5]。

1.2 整合素 $\alpha 5\beta 1$ 的分布 $\alpha 5\beta 1$ 可表达于多种细胞,在细胞中的分布因细胞种类的不同而有差异,上皮细胞中 $\alpha 5\beta 1$ 随机分布在胞膜的腹侧面或沿边界分布;在间充质来源的细胞中, $\alpha 5\beta 1$ 呈向心性分布;或在与 F-肌动蛋白纤维连接处呈狭长集中分布。 $\alpha 5\beta 1$ 是纤维结合素的特异性受体,可随可溶性纤维结合素分布不同而导致细胞进行黏附的重分布及细胞骨架的收缩。不同细胞, $\alpha 5\beta 1$ 表达水平存在差异,如 $\beta 1$ 在表皮性肿瘤中表达下降,而在骨肉瘤中表达上调。Schirmer 等^[6]报道用整合素 $\alpha 5\beta 1$ 的 cDNA 转染结肠癌 HT-29 细胞,高表达的 $\alpha 5\beta 1$ 可抑制 HT-29 细胞的肺转移,提示这种细胞表面 $\alpha 5\beta 1$ 的表达可能不利于其增殖。 $\alpha 5\beta 1$ 也可因细胞的不同状态而表达改变。在静息期血管内皮细胞表面, $\alpha 5\beta 1$ 呈低水平表达,但在 VEGF 或肿瘤介导的新生血管的内皮细胞明显上调^[7]。

1.3 整合素 $\alpha 5\beta 1$ 的活性调节 整合素介导的信号传导具有双向性,既可以将细胞外的信号向内传导(outside-in-signalling),也可以通过胞内区将细胞内的信号向外传导(inside-out-signalling),上调蛋白和配体的结合能力,这个过程也称整合素的活化。经研究认为,整合素 β 亚基胞内区是进行信号传递的主要部位,而 α 亚基只起调节作用; $\beta 1$ 自身的活性均接受来自细胞内部的信号调节。细胞迁移时,整合素介导的细胞黏附发生快速的转变,在细胞的前进方向不断形成新的黏着斑(focal adhesion, FA),

而位于细胞尾端的FA不断解体。这就提示,整合素的活性在高和低之间不断地切换。已有实验证据支持这种观点,如果让整合素始终处于活化的状态,反而可以抑制细胞迁移^[8]。整合素的胞内片段虽然很短,但是却对整合素的活性调节有很重要的作用,切除任何一个亚基的胞内保守序列,如GFFKR,LLV-iHDR等,均可以使整合素活化。同时研究显示^[9],两个亚基的胞内区域只有在彼此分开时才可以激活整合素。将富含酸性和碱性氨基酸的肽段引入 $\alpha 5\beta 1$ 的胞内区,使胞内区紧密结合,再用蛋白酶在紧贴细胞膜的外表面将 $\beta 1$ 亚基切断,可以使两个亚基的胞内区分开约14nm,此时 $\alpha 5\beta 1$ 整合素和配体纤粘连蛋白(fibronectin)的结合能力大大增强。这就提示,在空间上使胞内段分离可能是整合素活化的机制之一。

2 整合素 $\alpha 5\beta 1$ 与血管内皮细胞

已发现表达于内皮细胞的整合素有9种,包括 $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 2$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ ^[10-12], $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha v\beta 8$, $\alpha 6\beta 4$,分别在不同部位和不同激活状态下的血管内皮细胞表面表达。在静息期,血管内皮细胞表面整合素 $\alpha v\beta 3$ 呈低水平表达,而血管新生时,在细胞因子和生长因子的刺激下,其表达上升。研究发现,在缺血发生后2~3h,大量 $\alpha v\beta 3$ 产生先于血管重塑。 $\alpha v\beta 3$ 可以识别大量的配体,增加内皮细胞黏附、迁移及对ECM应答的能力。虽然抑制 αv 整合素能够减少新生血管的形成,但Ryenolds的研究发现, $\beta 3$ 或 $\beta 5$ 整合素基因敲除小鼠仍能发生肿瘤,并有新生血管的形成^[13]。因此除了 $\alpha v\beta 3$ 之外, $\alpha 5\beta 1$ 在调整血管新生中也起了重要作用。 $\alpha 5\beta 1$ 不足的小鼠因血管发育缺陷,在胚胎发育早期死亡。整合素 $\alpha 5\beta 1$ 在静止期内皮细胞中表达低水平^[11],但在VEGF或肿瘤介导的新生血管的内皮细胞明显上调^[14]。在肿瘤细胞^[15]中下调 $\alpha 5\beta 1$ 能够通过减低Akt,Erk1/2激酶,c-Jun癌基因的活性,抑制MMP-2胶原酶的表达,减少肿瘤细胞的转移。 $\alpha 5\beta 1$ 结合配体后可激活FAK,PI3K/Akt,抑制bcl-2的转录,可以避免内皮细胞的凋亡^[16]。

3 整合素 $\alpha 5\beta 1$ 与视网膜色素细胞

整合素对于维持视网膜,包括视网膜色素细胞(retinal epithelial cell,RPE)的各项生理功能起了重要作用。Zarbin^[17]对分别来自于胎儿及老年人的RPE细胞进行体外培养,发现两种RPE细胞均能够表达多种整合素,包括 $\beta 1$, $\beta 2$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha 5\beta 1$, αM 。虽然体外培养的RPE细胞能够表达 $\alpha 5\beta 1$,但在正常视网膜切片染色却未发现,仅有 $\beta 2$ 及 $\alpha 4$ 为阳性;在增生性玻璃体视网膜病变(proliferative vitreoretinopathy,PVR)及增生性糖尿病性视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy,PDR)的增殖膜标本中,却有 $\alpha 5\beta 1$ 显著增加;在诱发新生血管实验中,RPE合成 $\alpha 5\beta 1$ 也显著增加。抑制人RPE细胞整合素 $\beta 1$ 亚单位能够明显降低RPE对ECM及Bruch's膜的黏附性。而经TGF- $\beta 2$ ^[18]处理过的RPE能增加 $\alpha 5\beta 1$ 的表达,由此促进细胞黏附与迁移。

4 整合素 $\alpha 5\beta 1$ 与脉络膜血管新生

CNV是眼内后极部病理性血管新生的重要表现,与眼部多种疾病有关,如湿性AMD,特发性CNV,病理性近视及眼外伤等。CNV常累及黄斑,致使反复出血、渗出、疤痕形成,严重损害中心视力。在CNV生成的早期起始阶段,通常认为是由于各种病变和外伤破坏了Bruch's膜的完整性,和/或损伤了RPE细胞和光感受器细胞,RPE细胞分泌VEGF等血管生成因子,同时蛋白水解酶活化,

引起ECM降解。脉络膜内皮细胞(choroidal endothelial cell,CEC)在细胞因子作用下发生增生和移行,穿过Bruch膜的破口进入RPE层下或视网膜神经感觉层下间隙,发生增生、分化。CNV中的RPE细胞由已存在的视网膜外层RPE增生、移行而来,RPE细胞移行到基质后,失去顶端微绒毛和基底内褶。因此,在CNV发生过程中,RPE及CEC细胞均起着重要的调控作用^[19]。CNV膜上整合素 $\alpha 5\beta 1$ 表达显著增加, $\alpha 5\beta 1$ 与其配体结合,能促进黏着斑激酶(FAK)的表达上调,通过链接可溶性细胞因子信号和整合素-ECM降解信号,参与调控CNV的生成。 $\alpha 5\beta 1$ 参与了多个血管新生通路,包括VEGF,bFGF,IL-8及TNF α 等,已在多个管腔形成和鸡胚绒毛尿囊膜血管生成实验中得到验证^[11]。同时研究显示^[20], $\alpha 5\beta 1$ 随着bFGF或者TGF β 的表达而上调,同时抑制 $\alpha 5\beta 1$ 并不改变促血管因子如bFGF,VEGF的mRNA表达。由此可以假设, $\alpha 5\beta 1$ 在血管新生过程的下游发挥效应,因此抗 $\alpha 5\beta 1$ 拮抗剂已成为目前眼部新生血管治疗的研究热点。

5 整合素 $\alpha 5\beta 1$ 在脉络膜新生血管中的靶向治疗

研究证实,VEGF是新生血管性眼病形成的主要刺激因子,并且在调节血管的渗透性和炎症反应中起着重要的作用。因此,抗VEGF成为治疗CNV的主要手段,包括pegaptanib sodium(商品名:macugen;Eyetech Pharmaceuticals Inc,New York,NY),ranibizumab(商品名:lucentis;Genentech Inc,San Francisco,CA),bevacizumab(商品名:avastin;Genentech Inc,South San Francisco,CA)等。虽然此类药物能够明显抑制血管新生,但仍有部分患者治疗效果不佳,或者经过一段时间治疗对此类药物反应性下降。因此,寻找VEGF/VEGFR途径以外的靶位点成为了CNV治疗的突破口。整合素信号通路是调节血管新生的重要途径之一,而整合素 $\alpha 5\beta 1$ 因其独特的生理功能,亦成为了研究热点。JSM6427为化学合成类药物,可通过与 $\alpha 5\beta 1$ 结合,抑制ERK1/2磷酸化,促进内皮凋亡,继而抑制血管新生^[9,21]。动物研究显示^[22],虽然JSM6427系统用药能够有效抑制CNV,但是玻璃体腔内注射并未产生相同效果。而另一类基于 $\alpha 5\beta 1$ 的肽类抑制剂,如基于RGD等序列的线性肽、环肽等^[23,24],由于其分子量小,生物活性更高,免疫原性较低,使其更具药用价值。目前,被证明能抑制血管新生的肽类多达50余种,被广泛应用于抗肿瘤侵袭及血管新生,虽然还未报道应用于临床研究,然而其已被明确证实具有抗血管新生的作用。因此可以相信,在不久的将来,CNV患者将会获得更多的治疗选择及更高的视觉质量。

参考文献

- 1 Maruotti N, Cantatore FP, Crivellato E, et al. Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Histol Histopathol* 2006;21(5):557-566
- 2 Hynes RO. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 1987;48(4):549-554
- 3 Xiong JP, Stehle T, Zhang R, et al. Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha v\beta 3$ in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science* 2002;296(5565):151-155
- 4 Xiao T, Takagi J, Collier BS, et al. Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics. *Nature* 2004;432(7013):59-67
- 5 Springer TA, Zhu J, Xiao T. Structural basis for distinctive recognition of fibrinogen gammaC peptide by the platelet integrin $\alpha IIb\beta 3$. *J Cell Biol* 2008;182(4):791-800
- 6 Schirmer M, Herzberg F, Schmidt R, et al. Integrin $\alpha 5\beta 1$: a potent inhibitor of experimental lung metastasis. *Clin Exp Metastasis*

- 1998;16(5):427-435
- 7 Boudreau NJ, Vamer JA. The homeobox transcription factor Hox D3 promotes integrin alpha5beta1 expression and function during angiogenesis. *J Biol Chem* 2004;279(6):4862-4868
- 8 Huttenlocher A, Ginsberg MH, Horwitz AF. Modulation of cell migration by integrin-mediated cytoskeletal linkages and ligand-binding affinity. *J Cell Biol* 1996;134(6):1551-1562
- 9 Takagi J, Erickson HP, Springer TA. C-terminal opening mimics 'inside-out' activation of integrin alpha5beta1. *Nat Struct Biol* 2001;8(5):412-416
- 10 Francis SE, Goh KL, Hodivala-Dilke K, et al. Central roles of alpha5beta1 integrin and fibronectin in vascular development in mouse embryos and embryoid bodies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22(6):927-933
- 11 Kim S, Bell K, Mousa SA, et al. Regulation of angiogenesis in vivo by ligation of integrin alpha5beta1 with the central cell-binding domain of fibronectin. *Am J Pathol* 2000;156(4):1345-1362
- 12 Rehn M, Veikkola T, Kukk-Valdre E, et al. Interaction of endostatin with integrins implicated in angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(3):1024-1029
- 13 Hiran TS, Mazurkiewicz JE, Kreienberg P, et al. Endothelial expression of the alpha6beta4 integrin is negatively regulated during angiogenesis. *J Cell Sci* 2003;116(Pt 18):3771-3781
- 14 Parsons-Wingter P, Kasman IM, Norberg S, et al. Uniform overexpression and rapid accessibility of alpha5beta1 integrin on blood vessels in tumors. *Am J Pathol* 2005;167(1):193-211
- 15 Morozovich G, Kozlova N, Cheglakov I, et al. Integrin alpha5beta1 controls invasion of human breast carcinoma cells by direct and indirect modulation of MMP-2 collagenase activity. *Cell Cycle* 2009;8(14):2219-2225
- 16 Jan Y, Matter M, Pai JT, et al. A mitochondrial protein, Bit1, mediates apoptosis regulated by integrins and Groucho/TLE corepressors. *Cell* 2004(5);116(5):751-762
- 17 Zarbin MA. Analysis of retinal pigment epithelium integrin expression and adhesion to aged submacular human Bruch's membrane. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2003;101:499-520
- 18 Priglinger SG, Alge CS, Neubauer AS, et al. TGF-beta2-induced cell surface tissue transglutaminase increases adhesion and migration of RPE cells on fibronectin through the gelatin-binding domain. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(3):955-963
- 19 Patel S. Combination therapy for age-related macular degeneration. *Retina* 2009;29(6 Suppl):S45-48
- 20 Collo G, Pepper MS. Endothelial cell integrin alpha5beta1 expression is modulated by cytokines and during migration *in vitro*. *J Cell Sci* 1999;112(Pt 4):569-578
- 21 Li R, Maminishkis A, Zahn G, et al. Integrin alpha5beta1 mediates attachment, migration, and proliferation in human retinal pigment epithelium; relevance for proliferative retinal disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(12):5988-5996
- 22 Umeda N, Kachi S, Akiyama H, et al. Suppression and regression of choroidal neovascularization by systemic administration of an alpha5beta1 integrin antagonist. *Mol Pharmacol* 2006;69(6):1820-1828
- 23 Arosio D, Belvisi L, Colombo L, et al. A potent integrin antagonist from a small library of cyclic RGD pentapeptide mimics including benzyl-substituted azabicycloalkane amino acids. *Chem Med Chem* 2008;3(10):1589-1603
- 24 Meerovitch K, Bergeron F, Leblond L, et al. A novel RGD antagonist that targets both alphavbeta3 and alpha5beta1 induces apoptosis of angiogenic endothelial cells on type I collagen. *Vascul Pharmacol* 2003;40(2):77-89