

## 综述

# 整合素活化及其介导的黏着斑成熟与肿瘤转移

黄梦汶<sup>1</sup>, 林昶东<sup>1</sup>, 陈剑峰<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>细胞生物学国家重点实验室, 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心, 中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所, 中国科学院大学, 上海 200031; <sup>2</sup>中国科学院大学杭州高等研究院生命与健康科学学院, 杭州 310024

**摘要:** 整合素是一类由 $\alpha$ 和 $\beta$ 两个亚基组成的异源二聚体单次跨膜细胞黏附分子, 通过与其对应配体相互作用, 介导细胞与细胞、细胞与胞外基质之间的黏附, 同时可以将细胞外信号传递至胞内, 并招募一系列胞内蛋白与整合素胞内段结合, 在细胞膜上形成超分子结构, 激活下游信号。整合素的活化进程伴随着其胞外结构域由折叠构象转变为伸展构象以及胞内结构域的彼此分离。在细胞迁移过程中, 整合素参与黏着斑的形成, 连接胞外基质和细胞骨架, 传递胞内-胞外的力学信号驱使细胞迁移。肿瘤微环境介导的整合素活化可促进多种类型细胞向肿瘤部位迁移, 共同实现血管生成及肿瘤转移。本文对整合素的活化过程, 其介导黏着斑动态变化引发的细胞迁移及对肿瘤转移的影响进行综述。

**关键词:** 整合素; 活化; 黏着斑; 细胞迁移; 血管生成

**中图分类号:** R363

## Integrin activation, focal adhesion maturation and tumor metastasis

HUANG Meng-Wen<sup>1</sup>, LIN Chang-Dong<sup>1</sup>, CHEN Jian-Feng<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>State Key Laboratory of Cell Biology, Center for Excellence in Molecular Cell Science, Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Chinese Academy of Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China; <sup>2</sup>School of Life Science, Hangzhou Institute for Advanced Study, University of Chinese Academy of Sciences, Hangzhou 310024, China

**Abstract:** Integrins are a large family of heterodimeric cell adhesion molecules composed of  $\alpha$  and  $\beta$  subunits. Through interaction with their specific ligands, integrins mediate cell-cell and cell-extracellular matrix interactions. Via outside-in signaling, integrins can recruit cytoplasmic proteins to their intracellular domains and then cluster into supramolecular structures and trigger downstream signaling. Integrin activation is associated with a global conformation rearrangement from bent to extended in ectodomains and the separation of  $\alpha$  and  $\beta$  subunit cytoplasmic domains. During cell migration, integrins regulate the focal adhesion dynamics and transmit forces between the extracellular matrix and the cell cytoskeleton. In tumor microenvironment, integrins on multiple kinds of cells could be activated, which modulates cell migration into tumor and contributes to angiogenesis and tumor metastasis. Here, we review the mechanism of integrin activation, dynamics of focal adhesions during cell migration and tumor metastasis.

**Key words:** integrin; activation; focal adhesion; cell migration; angiogenesis

整合素 (integrin) 属于异源二聚体 I 类跨膜蛋白, 由  $\alpha$  和  $\beta$  两个亚基组成。两个亚基结构均含有较大的胞外段、单次跨膜的跨膜区和短小的胞内段<sup>[1]</sup>。

在哺乳动物中, 目前主要发现了 18 种  $\alpha$  亚基和 8 种  $\beta$  亚基, 组成的 24 种整合素广泛分布于各个组织器官。不同整合素所结合的配体种类各异, 介导

Received 2020-07-03 Accepted 2021-04-02

Research from the corresponding author's laboratory was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31525016, 31190061, 31271487, 31471309, 31970702, and 31701219), the Youth Innovation Promotion Association of the Chinese Academy of Sciences (No. 2020266) and the Young Elite Scientist Sponsorship Program by China Association for Science and Technology (No. 2019QNRC001).

\*Corresponding author. Tel: +86-21-54921142; E-mail: jfchen@sibcb.ac.cn

细胞在不同组织部位黏附与迁移<sup>[2]</sup>。除了细胞黏附功能,整合素与配体结合后还能够向胞内传递信号,调控细胞增殖、骨架重排和凋亡等生理过程。当结合配体或受到其他信号刺激后,整合素由折叠的非活化构象转变为伸展的活化构象。活化后的整合素分子之间进一步形成聚簇(*clustering*),在细胞膜上组成一个多价的“脚手架”,其胞内段招募胞内信号分子及骨架蛋白,形成会聚黏着斑(*focal adhesion*)。

细胞向不同部位的定向迁移伴随着黏着斑组装和解聚的动态变化。迁移细胞的前端存在大量的新生黏着斑(*nascent adhesion*)。大部分新生黏着斑的寿命很短,通常在60 s后开始解聚。只有少量的新生黏着斑受胞内信号分子调控而成熟、变大,形成会聚黏着斑。黏着斑最终在迁移细胞的后端发生解聚,使尾部收缩。多种胞内信号分子可调控黏着斑的成熟和解聚过程,维持细胞有效地迁移。

整合素介导的细胞黏附与迁移和众多疾病的发生、发展密切相关。在肿瘤微环境中,整合素可通过多种途径调控血管生成,如招募内皮祖细胞至肿瘤部位分化生成血管系统;促进髓细胞迁移浸润至肿瘤内部,分泌促血管生长因子促进血管形成等。当肿瘤细胞表面的整合素活化,肿瘤细胞可快速锚定在血管内皮细胞表面,有效地穿出血管到达组织部位,实现肿瘤转移。

## 1 整合素的结构与构象变化

### 1.1 整合素的胞外结构域

整合素 $\alpha$ 亚基的胞外结构域通常含有约940个氨基酸残基,主要由以下结构域组成:头部的 $\beta$ -螺旋桨状结构域( $\beta$ -propeller),腿部的thigh、*genu*、*calf-1*和*calf-2*结构域。此外,脊椎动物所含有的18个 $\alpha$ 亚基中,有9个 $\alpha$ 亚基还含有I结构域( $\alpha$ L、 $\alpha$ M、 $\alpha$ X、 $\alpha$ D、 $\alpha$ E、 $\alpha$ 1、 $\alpha$ 2、 $\alpha$ 10和 $\alpha$ 11)<sup>[3]</sup>。 $\beta$ 亚基胞外结构域的拓扑结构相对于 $\alpha$ 亚基更加复杂,包括PSI(*plexin-semaphorin-integrin*)、 $\beta$ I、类免疫球蛋白*hybrid*、I-EGF(*epidermal growth factor*)1~4、 $\beta$ 尾部( $\beta$  tail)结构域<sup>[4]</sup>。当整合素的 $\alpha$ 亚基含有I结构域时, $\alpha$ 亚基I结构域负责结合配体;而对于 $\alpha$ 亚基I结构域缺失的整合素, $\beta$ 亚基I结构域是配体的结合位点。

$\alpha$ 亚基的 $\beta$ -propeller结构域位于 $\alpha$ 亚基N端,含有7个重复的片层。I结构域处于 $\beta$ -propeller的第2和第3片层之间,其顶部含有金属离子结合位

点(*metal-ion-dependent adhesion site*, MIDAS),可结合二价金属离子如镁离子、锰离子,介导整合素与配体的结合<sup>[5,6]</sup>。对于I结构域缺失的 $\alpha$ 亚基, $\beta$ -propeller可参与配体结合。部分的 $\beta$ -propeller-*genu*结构域也含有金属离子结合位点,调控整合素与配体结合的亲和性<sup>[4,7,8]</sup>。

$\beta$ I结构域上有一个由三个金属离子结合位点组成的金属离子结合位点簇,依次为SyMBS(*synergistic metal ion binding site*)、MIDAS和ADMIDAS(*adjacent to MIDAS*)<sup>[4,9,10]</sup>。对于 $\alpha$ 亚基I结构域缺失的整合素, $\beta$ I结构域的MIDAS直接介导配体的结合,两边的SyMBS和ADMIDAS分别是正调控和负调控位点<sup>[11,12]</sup>。对于 $\alpha$ 亚基含有I结构域的整合素, $\beta$ I结构域可通过MIDAS调控 $\alpha$ 亚基I结构域的构象,间接调控整合素的配体亲和性<sup>[13–15]</sup>。

### 1.2 整合素的构象变化

在正常的生理状态下,细胞表面的整合素通常处于非活化状态。整合素的活化与其构象直接相关,包括非活化的折叠构象、伸展构象和高度活化构象<sup>[16,17]</sup>。在非活化状态时,整合素 $\alpha$ 亚基的*genu*和 $\beta$ 亚基的I-EGF1~2结构域弯曲并紧密排列,胞内结构域彼此靠近呈折叠构象;当受到胞内外刺激信号后,腿部结构域完全直立, $\alpha$ 、 $\beta$ 亚基头部结构域远离细胞膜,呈现伸展的构象;腿部结构域进一步分离,*hybrid*结构域外摆并改变腿部构象,头部结构域由“close”转变为“open”,胞内结构域彼此分开<sup>[3]</sup>,整合素胞外结构域可与配体以高亲和力和结合,胞内段可与多种胞内调控蛋白结合。

## 2 整合素的胞内调控蛋白

整合素的活化通常起始于胞内调控蛋白与整合素胞内结构域的结合。在众多整合素结合衔接蛋白(*adaptor protein*)中,踝蛋白(*talin*)和*kindlin*是促进整合素活化的核心调控蛋白<sup>[18]</sup>。

### 2.1 Talin

Talin在哺乳动物中有*talin-1*和*talin-2*两种亚型,两者拥有80%的同源性。*Talin-1*在多种类型细胞中广泛表达,而*talin-2*只在肌肉组织和神经组织中富集<sup>[19]</sup>。Talin蛋白由一个氨基末端FERM(*protein 4.1, ezrin, radixin, moesin*)结构域、一个短且弯曲的连接和一个大的羧基末端杆状结构域组成。在FERM结构域的F3模块中的磷酸化酪氨酸结合基序(*motif*)能够与整合素 $\beta$ 亚基的近膜端NPxY基

序(天冬酰胺-脯氨酸-x-酪氨酸, x可为任意氨基酸)结合,引起整合素活化。杆状结构域中含有多个肌动蛋白(actin)和纽蛋白(vinculin)结合位点<sup>[20]</sup>。当整合素的胞外段与配体结合,结合在 $\beta$ 亚基上的 talin 感知到由整合素传递的胞外拉力信号后,这些结合位点将暴露,供骨架蛋白结合。在杆状结构域的末端存在一个二聚化基序,但该基序的生物学功能目前还不明确。Talin 蛋白功能受到严密的调控,一般处于自抑制状态:其N端FERM结构域的F3模块与C端杆状结构域的R9模块结合,遮挡FERM结构域中的整合素结合位点<sup>[19]</sup>。只有 talin 解除自抑制状态,由约15 nm的折叠构象伸展为约60 nm的线性构象, talin 才能与整合素、actin 和 vinculin 结合,促进整合素的活化和细胞黏附<sup>[21]</sup>。目前发现 talin 头部的F3模块能够与整合素 $\beta$ 亚基胞内段的两个位点结合:近膜端的NPxY基序<sup>[22]</sup>和此基序与细胞膜之间的 $\alpha$ -螺旋区域<sup>[23]</sup>。

Talin 通过其头部结构域(talin head domain, THD)与整合素 $\beta$ 亚基相互作用,打破整合素 $\alpha$ 、 $\beta$ 亚基之间的盐桥,改变 $\beta$ 亚基跨膜区的倾斜角,从而使整合素转变为高度伸展的活化构象<sup>[24]</sup>。此外,磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸[PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>]能够作用于 talin,使 talin 活化后解除自抑制状态,促进其与整合素的结合。虽然单独的 talin 头部FERM结构域能够结合并活化整合素<sup>[25]</sup>,但羧基端的杆状结构域能够与 actin 结合,传递肌动球蛋白(actomyosin)产生的拉力,参与整合素介导的细胞黏附及铺展<sup>[18]</sup>。在会聚黏着斑部位, talin 蛋白上存在10 pN的拉力<sup>[26]</sup>。

## 2.2 Kindlin

哺乳动物中的 kindlin 蛋白存在三种亚型, kindlin-1、kindlin-2 和 kindlin-3,并且在结构上均含有FERM结构域<sup>[13, 20, 27]</sup>。其中, kindlin-1 主要表达于上皮细胞内, kindlin-2 较为广泛地表达在除造血系统以外的多种组织中, kindlin-3 则表达于造血系统中。Kindlin 与整合素 $\beta$ 亚基的结合充当了蛋白之间衔接的作用,能够将PINCH(particularly interesting new Cys-His-rich protein)-parvin 复合体、桩蛋白(paxillin)和肌动蛋白相关蛋白2/3(actin related protein 2/3, Arp2/3)复合体与整合素连接,活化FAK、Rac1 和 Arp2/3 复合体,促进细胞铺展<sup>[13, 28]</sup>。

Kindlin 与 $\beta$ 亚基的结合通常发生在 talin 之后<sup>[18, 29]</sup>。在中性粒细胞归巢过程中, talin-1 优先与整合素 $\beta$ 2亚基结合,使整合素 $\alpha$ L $\beta$ 2活化为中等亲和力构象,

介导中性粒细胞可以在血管内皮上发生滚动黏附,随后中性粒细胞穿出血管内皮的过程需要 talin-1 和 kindlin-3 的共同作用,引发整合素的进一步活化<sup>[30]</sup>。Kindlin 通过与 $\beta$ 亚基远膜端的NxxY基序(天冬酰胺-x-x-酪氨酸)和阴离子膜磷脂的结合能够协助 talin,促进整合素尾部结构分离,使其转变为活化构象<sup>[31, 32]</sup>。

整合素与配体结合亲和性及其所介导的胞内-胞外信号传递是一个动态调节的过程。在无任何刺激的情况下,大部分整合素处于低亲和力的折叠构象。当细胞接收到激活信号后,胞内调控蛋白(如 talin、kindlin)可与整合素 $\alpha$ 、 $\beta$ 亚基胞内段结合,通过由内向外(inside-out)信号使整合素转变为活化构象。另一方面,整合素的胞外段与细胞外基质中的配体结合,引发整合素构象变化和整合素分子之间在细胞膜上的聚簇,通过由外向内(outside-in)信号激活胞内信号通路。当胞内信号通路被激活后,结合在活化的整合素上的 kindlin、talin 将进一步招募胞内蛋白,如 vinculin、paxillin、纤维形肌动蛋白(F-actin)等,连接整合素与细胞骨架蛋白,形成不同形态、大小的黏着斑,介导细胞向前迁移<sup>[33]</sup>。

## 3 整合素介导的黏着斑成熟

在细胞迁移的过程中,前端的细胞膜向前延伸突出,突出部位存在一系列整合素介导生成的黏着斑。细胞通过膜表面的黏着斑传递胞外基质和骨架蛋白之间的力学信号,产生驱动细胞前端向前延伸、细胞后端向内收缩的牵引力。

迁移细胞前端的整合素与细胞外基质结合后,能够招募细胞内骨架蛋白和信号通路蛋白至新生黏着斑处。这种微米级的整合素介导的黏着斑通过进一步成熟、增大,形成黏着复合物(focal complex)、黏着斑、纤维黏连(fibrillar adhesion)、足体(podosome)和侵入状伪足(invadopodia)等不同状态下的黏附结构,并参与黏附介导的信号通路、细胞迁移和侵袭、胞外基质重塑、组织形成等生理活动。

整合素与胞外配体结合而呈现高亲和力的活化构象时,结合在整合素 $\beta$ 亚基上的 talin 与 vinculin 紧密结合,从而加强 talin 与 F-actin 的连接,为细胞提供更为稳定的内在拉力,促进整合素稳定在活化状态<sup>[34]</sup>。在细胞迁移的过程中,前端部分主要分为两个区域:伪足(lamellipodium)和片层(lamel-lum)。细胞迁移前端1~3  $\mu$ m的伪足部分,在不依

赖于肌球蛋白 (myosin II) 的情况下, F-actin 在 Arp2/3 作用下发生多聚化形成错落的网状结构, 使细胞前端随机前伸及收缩。与此同时, 大量由整合素及胞内蛋白形成的新生黏着斑 ( $< 0.25 \mu\text{m}^2$ ) 富集在细胞突出前端的伪足部分。这些新生黏着斑中除了整合素, 还包含 talin、vinculin、辅肌动蛋白 ( $\alpha$ -actinin)、paxillin、黏着斑激酶 (focal adhesion kinase, FAK) 等一些富含磷酸化酪氨酸的蛋白。新生黏着斑的形成过程目前还存在争议。部分研究者认为, 当细胞外基质中的配体与整合素结合后, 整合素发生聚簇并通过胞内段招募 talin、 $\alpha$ -actinin、vinculin 和树状的肌动蛋白微丝等形成新生黏着斑<sup>[35-37]</sup>。另有一部分研究表明, vinculin、 $\alpha$ -actinin 等在胞浆先与 Arp2/3 复合物结合, 当整合素与胞外配体结合后, 在 talin 的介导下 vinculin、 $\alpha$ -actinin 等与树状的肌动蛋白微丝一同与整合素连接, 稳定新生黏着斑的形成<sup>[38, 39]</sup>。新生黏着斑的寿命很短, 在几分钟内这些黏着斑或大部分发生解聚, 或通过招募骨架蛋白进一步变大, 并在伪足-片层边界形成稳定的黏着复合物<sup>[20, 40-42]</sup>。随着 actin 微丝多聚、交联, 以及 myosin II 收缩力介导的多种蛋白如血管扩张刺激磷酸蛋白 (vasodilator-stimulated phosphoprotein, VASP)、斑联蛋白 (zyxin) 聚集, 黏着复合物可以成熟为更为稳定的会聚黏着斑<sup>[41, 43]</sup>, 最终与  $\beta$  亚基结合的 talin 被张力蛋白 (tensin) 取代, 形成纤维黏着斑<sup>[44]</sup>。

黏着斑的形成赋予细胞感知胞外基质或胞内 actomyosin 介导的收缩力, 并将其转化为生物信号, 调控多种细胞功能, 如迁移、分化和增殖。另外, 细胞或组织硬度的改变可通过黏着斑产生信号, 调控细胞内蛋白转录而引起组织的病理改变。细胞内外的力传导是相互的: 当胞外基质对整合素施加拉力后, 整合素的胞内段与多种衔接蛋白 [如: talin、tensin、细丝蛋白 (filamin) 或  $\alpha$ -actinin 等] 结合, 这些衔接蛋白通过与 actin 结合将拉力信号传递至细胞内<sup>[26, 45-47]</sup>; actin 多聚化或 myosin II 作用的牵引力也可通过黏附斑传递至胞外。只有细胞外基质-整合素介导生成的黏着斑-肌动蛋白 (ECM-integrin adhesion-actin) 连接后, 整合素才能发挥信号传导的作用。当衔接蛋白与 actin 的连接受到破坏后, 整合素将在细胞膜表面滑动而不会传递力信号。

不同硬度的细胞外基质能够通过整合素改变黏着斑的生成、解聚, 改变细胞形态及迁移能力。之前有研究显示, 当成纤维细胞铺展在硬度为 2 MPa

的胞外基质上, 整合素与胞外基质结合后向胞内传递的拉力能够维持细胞骨架蛋白与黏着斑稳定连接, 使黏着斑进一步成熟, 促进细胞迁移。而当胞外基质硬度减小到 5 kPa 后, 骨架蛋白不能与黏着斑连接, 黏着斑无法成熟变大, 细胞迁移能力减弱。此外, 若胞外基质过硬或过软, 都会影响整合素的聚簇及黏附斑的形成。当整合素与过柔软的胞外基质结合时, 由 actomyosin 作用的胞内牵引力无法被传递至胞外<sup>[48]</sup>; 当整合素与硬度过高的胞外基质结合时, 会聚黏着斑无法解聚, 黏着斑动态性减弱<sup>[49]</sup>。因此只有在一定硬度范围内的胞外基质才能促进细胞在整合素的介导下快速有效地迁移。此外, 胞外基质对细胞功能的影响也取决于细胞表面整合素的种类。 $\alpha 5 \beta 1$  和  $\alpha v \beta 6$  整合素均能与胞外基质蛋白纤维粘连蛋白 (fibronectin) 结合, 当人乳腺肌上皮细胞与不同硬度的胞外基质结合时, 随着胞外基质硬度增强, 由  $\alpha 5 \beta 1$  或  $\alpha v \beta 6$  整合素介导产生的细胞内牵引力、黏着斑形态变化均不同<sup>[50]</sup>。

参与黏着斑形成、成熟等活动的蛋白共同组成整合素黏附小体 (integrin adhesome)。目前已知的整合素黏附小体中有 232 种蛋白成分, 其中 148 种形成黏着斑、84 种能够在黏着斑形成后与之结合<sup>[51, 52]</sup>。这些蛋白的功能主要分为两类: (1) 将细胞骨架蛋白与整合素连接, 直接参与黏着斑的形成; (2) 通过信号通路间接调控黏着斑的形成与解聚。

Rho GTP 酶能够调控黏着斑的形成。在细胞向前突出的过程中, Rho GTP 酶主要通过增强 actin 多聚化而促进黏着斑成熟、稳定。丝切蛋白 (cofilin) 的活性在 Rho GTP 酶调控下, 介导 actin 单体的形成, 促进 actin 在迁移前端的多聚化<sup>[53]</sup>; 形成素 (formin) 在 Rho GTP 酶作用下能激活 Arp2/3 复合物, 调控 actin 的成核及分支, 调节 actin 的延伸等<sup>[54]</sup>。在这些 Rho GTP 酶中, Rac 和 CDC42 能够活化维斯科特-奥尔德里奇综合征蛋白 (Wiskott Aldrich Syndrome Protein, WASP) 家族成员, 使其与 Arp2/3 复合物作用并改变 Arp2 和 Arp3 两个亚基的构象, 使 Arp2/3 复合物转变为活化构象, 介导 actin 成核以及多聚。Rho GTP 酶的磷酸化能够抑制 myosin II 的磷酸化, 减弱细胞内部骨架蛋白施加的收缩力<sup>[55]</sup>。

相反, Rho GTP 酶的活性也受到整合素及黏着斑信号的调节。黏着斑部位与整合素结合的 paxillin、FAK 调节 Rho GTP 酶活性<sup>[56]</sup>。FAK 是黏着斑的成分之一, 除了参与黏着斑的形成外, FAK 和

Src 酪氨酸激酶也参与调控细胞前端黏着斑的解聚。当整合素活化后, FAK 和 paxillin 最早结合在整合素胞内段, 参与形成新生黏着斑。FAK 招募并活化 Src, 后者进一步引起 FAK 和 paxillin 的磷酸化<sup>[57, 58]</sup>。磷酸化后的 paxillin 可与一个或多个 Ras 的鸟苷酸交换因子 (GEF) 及 Ras GTP 酶活化蛋白 (GAP) 结合, 活化 Rac 和 CDC42<sup>[56]</sup>。FAK/Src 信号通路在 Rho GTP 酶上游, 通过调控 Rho GTP 酶活性, 间接影响黏着斑和 actin 多聚化。在细胞迁移过程中, 受到前端相关信号的招募及黏着斑的动态调控, GFF/GAP 及 Rho GTP 酶呈极性分布: 细胞迁移的前端 Rac 活性最高, 尾部则活性最低<sup>[59-61]</sup>。

#### 4 整合素参与肿瘤转移、血管生成

血管生成对肿瘤发展、转移至关重要。在肿瘤部位新生成的血管有两种产生方式, 一种是在原有的血管系统中衍生出新血管, 另一种则通过招募循环的骨髓来源的内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells) 到达肿瘤部位, 分化产生新血管系统<sup>[62, 63]</sup>。整合素作为一类介导细胞与细胞、细胞与细胞外基质相互作用的表面受体, 能通过促进内皮细胞胞内信号传导、细胞迁移和细胞存活的方式影响血管生成。

在肿瘤血管生成过程中, 内皮细胞表面的整合素活化水平显著提高, 进而活化参与细胞迁移及存活的整合素胞内下游信号。在此阶段的整合素活化主要受两方面调控: 细胞表面整合素表达水平和胞内信号通路<sup>[5, 64]</sup>。多种促血管生成的生长因子 (pro-angiogenic growth factors) 和趋化因子 (chemokine) 上调内皮细胞表面整合素的表达水平。在肿瘤部位高表达的血管生长因子中, 碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-8 (interleukin-8, IL-8) 均能通过促进转录水平的方式上调血管内皮细胞表面  $\alpha_v$  整合素的表达<sup>[65]</sup>。当凝血酶、肾上腺素与各自在血小板表面的受体结合后, 激活胞内信号通路, 通过“inside-out”通路活化  $\alpha_{IIb}\beta_3$  整合素。内皮细胞表面的  $\alpha_v\beta_3$  整合素活化后, 能够活化促分裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)、FAK 和 Src 等激酶, 增强内皮细胞增殖和迁移能力<sup>[66]</sup>。

除调控内皮细胞增殖、分化和迁移等功能外, 整合素也作用于骨髓来源的髓细胞 (myeloid cells), 介导血管生成。髓细胞表面的  $\alpha_4\beta_1$  整合素与内皮

细胞表面的血管细胞黏附蛋白 (vascular cell adhesion molecule, VCAM) 和 fibronectin 结合, 使髓细胞黏附于血管内皮细胞上<sup>[67]</sup>。基质细胞和肿瘤细胞分泌多种细胞因子, 如基质细胞衍生因子-1 (stromal cell derived factor-1, SDF-1)、集落刺激因子 (colony stimulating factors, CSF), 促进细胞表面整合素活化, 协助髓细胞穿出血管内皮到达肿瘤环境<sup>[68-70]</sup>。其中, 部分髓细胞进一步分化为巨噬细胞, 分泌血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 和其他促血管生成生长因子, 稳定血管生成过程。对 Lewis 肺癌造模的小鼠注射  $\alpha_4\beta_1$  整合素的拮抗剂后, 肿瘤组织部位的单核细胞数目和血管密度明显下降<sup>[67, 71]</sup>。

循环肿瘤细胞 (circulating tumor cells, CTCs) 穿过内皮细胞转移至其他组织部位的过程也需要整合素的协助。肿瘤细胞表面的  $\alpha_3\beta_1$  和  $\alpha_6\beta_1$  通过结合基底膜的层粘蛋白 (laminin), 促进血管内的肿瘤细胞锚定、穿出血管内皮<sup>[72, 73]</sup>。相反, Cao 等在透明细胞肾细胞癌和胰腺癌动物模型中发现, 血管内皮细胞表面的  $\alpha_5\beta_1$  整合素可与肿瘤细胞表面的神经毡蛋白-2 (neuropilin-2, NRP-2) 结合, 将肿瘤细胞锚定于血管内皮<sup>[74]</sup>。血小板在  $\alpha_{IIb}\beta_3$  介导下沉降在血管内, 与肿瘤细胞和血纤蛋白 (fibrin) 一起招募血浆中的纤维粘连蛋白。肿瘤细胞表面的  $\alpha_v\beta_3$  与血纤蛋白-纤维粘连蛋白 (fibrin-fibronectin) 复合物结合后, 快速活化进而促进肿瘤细胞黏附, 穿出内皮细胞<sup>[75]</sup>。

#### 5 展望

整合素在多种组织细胞表面广泛表达, 其介导形成的黏着斑及其相关信号在细胞生理、病理中发挥重要作用。但对于黏着斑的动态调控过程还存在诸多疑问。如: 细胞迁移前端和尾部, 黏着斑的解聚机制是否相同? 在坚硬和柔软的细胞外基质上, 由整合素介导的胞内力学信号传导过程完全不同, 此过程的决定性因素目前还不明确。

整合素介导的细胞黏附和迁移等功能参与多种疾病, 如慢性炎症或肿瘤的转移、血管生成。近年来, 整合素与其配体的结合作用、黏着斑的动态调控都成为了众多新药研究的筛选靶点。内皮细胞在整合素的介导下能快速迁移、增殖, 从而产生新的血管系统。但由于细胞膜表面的多种整合素之间存在交互作用 (crosstalk), 单一调节某一种整合素并不能发

挥疾病治疗的作用。前期研究证实, 抑制  $\alpha 4\beta 1$  的活化能够促进  $\alpha 5\beta 1$  介导的淋巴细胞在纤维粘连蛋白上的迁移进而穿过血管内皮细胞<sup>[76]</sup>。整合素  $\alpha v\beta 3$  与  $\alpha 5\beta 1$  对于肿瘤部位血管生成十分重要<sup>[77]</sup>, 注射抑制性抗体或小分子药物抑制两种整合素的功能将干扰其血管生成能力。有趣的是, 当  $\alpha v\beta 3$  的功能缺失, 细胞表面的  $\beta 1$  整合素活化水平升高, 促进了血管生成的过程<sup>[78]</sup>。如何精准调控整合素之间的下游信号通路? 是否可以调控整合素活性从而调控细胞向组织部位迁移的能力? 整合素活化以及非活化构象之间的转变是否能够通过药物干预? 这些问题都需在日后研究中进一步探讨。

### 参考文献

- Hynes RO. Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002; 110(6): 673–687.
- Humphries JD, Byron A, Humphries MJ. Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci* 2006; 119(19): 3901–3903.
- Shimaoka M, Springer TA. Therapeutic antagonists and conformational regulation of integrin function. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2(9): 703–716.
- Xiong JP, Stehle T, Diefenbach B, Zhang RG, Dunker R, Scott DL, Joachimiak A, Goodman SL, Arnaout MA. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha V beta 3. *Science* 2001; 294(5541): 339–345.
- Cox D, Brennan M, Moran N. Integrins as therapeutic targets: lessons and opportunities. *Nat Rev Drug Disc* 2010; 9(10): 804–820.
- Shimaoka M, Xiao T, Liu JH, Yang YT, Dong YC, Jun CD, McCormack A, Zhang RG, Joachimiak A, Takagi J, Wang JH, Springer TA. Structures of the alpha L I domain and its complex with ICAM-1 reveal a shape-shifting pathway for integrin regulation. *Cell* 2003; 112(1): 99–111.
- Yu YM, Zhu JH, Mi LZ, Walz T, Sun H, Chen JF, Springer TA. Structural specializations of alpha(4)beta(7), an integrin that mediates rolling adhesion. *J Cell Biol* 2012; 196(1): 131–146.
- Zhang K, Chen J. The regulation of integrin function by divalent cations. *Cell Adh Migr* 2012; 6(1): 20–29.
- Xiong JP, Stehle T, Zhang R, Joachimiak A, Frech M, Goodman SL, Arnaout MA. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science* 2002; 296(5565): 151–155.
- Chen JF, Takagi J, Xie C, Xiao T, Luo BH, Springer TA. The relative influence of metal ion binding sites in the I-like domain and the interface with the hybrid domain on rolling and firm adhesion by integrin alpha(4)beta(7). *J Biol Chem* 2004; 279(53): 55556–55561.
- Chen JF, Salas A, Springer TA. Bistable regulation of integrin adhesiveness by a bipolar metal ion cluster. *Nat Struct Biol* 2003; 10(12): 995–1001.
- Pan YP, Zhang K, Qi JP, Yue JA, Springer TA, Chen JF. Cation-pi interaction regulates ligand-binding affinity and signaling of integrin alpha<sub>4</sub>beta<sub>7</sub>. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(50): 21388–21393.
- Campbell ID, Humphries MJ. Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; 3(3): a004994.
- Humphries MJ. Integrin structure. *Biochem Soc Trans* 2000; 28: 311–339.
- Chen J, Yang W, Kim M, Carman CV, Springer TA. Regulation of outside-in signaling and affinity by the beta<sub>2</sub> I domain of integrin alpha<sub>4</sub>beta<sub>2</sub>. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(35): 13062–13067.
- Schurpf T, Springer TA. Regulation of integrin affinity on cell surfaces. *EMBO J* 2011; 30(23): 4712–4727.
- Zhu J, Zhu J, Springer TA. Complete integrin headpiece opening in eight steps. *J Cell Biol* 2013; 201(7): 1053–1068.
- Theodosiou M, Widmaier M, Bottcher RT, Rognoni E, Veelders M, Bharadwaj M, Lambacher A, Austen K, Muller DJ, Zent R, Fassler R. Kindlin-2 cooperates with talin to activate integrins and induces cell spreading by directly binding paxillin. *Elife* 2016; 5: e10130.
- Calderwood DA, Campbell ID, Critchley DR. Talins and kindlins: partners in integrin-mediated adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; 14(8): 503–517.
- Atherton P, Stutchbury B, Jethwa D, Ballestrem C. Mechanosensitive components of integrin adhesions: Role of vinculin. *Exp Cell Res* 2016; 343(1): 21–27.
- Dedden D, Schumacher S, Kelley CF, Zacharias M, Bier-tumpfel C, Fassler R, Mizuno N. The architecture of Talin1 reveals an autoinhibition mechanism. *Cell* 2019; 179(1): 120–131.e13.
- Haydari Z, Shams H, Jahed Z, Mofrad MRK. Kindlin assists talin to promote integrin activation. *Biophys J* 2020; 118(8): 1977–1991.
- Anthis NJ, Wegener KL, Ye F, Kim C, Goult BT, Lowe ED, Vakonakis I, Bate N, Critchley DR, Ginsberg MH, Campbell ID. The structure of an integrin/talin complex reveals the basis of inside-out signal transduction. *EMBO J* 2009; 28(22): 3623–3632.
- Kim CH, Ye F, Hu XH, Ginsberg MH. Talin activates integrins by altering the topology of the beta transmembrane domain. *J Cell Biol* 2012; 197(5): 605–611.
- Elliott PR, Goult BT, Kopp PM, Bate N, Grossmann JG, Roberts GC, Critchley DR, Barsukov IL. The Structure of the talin head reveals a novel extended conformation of the

- FERM domain. *Structure* 2010; 18(10): 1289–1299.
- 26 Austen K, Ringer P, Mehlich A, Chrostek-Grashoff A, Kluger C, Klingner C, Sabass B, Zent R, Rief M, Grashoff C. Extracellular rigidity sensing by talin isoform-specific mechanical linkages. *Nat Cell Biol* 2015; 17(12): 1597–1606.
- 27 Rognoni E, Ruppert R, Fassler R. The kindlin family: functions, signaling properties and implications for human disease. *J Cell Sci* 2016; 129(1): 17–27.
- 28 Bottcher RT, Veelders M, Rombaut P, Faix J, Theodosiou M, Stradal TE, Rottner K, Zent R, Herzog F, Fassler R. Kindlin-2 recruits paxillin and Arp2/3 to promote membrane protrusions during initial cell spreading. *J Cell Biol* 2017; 216(11): 3785–3798.
- 29 Kahner BN, Kato H, Banno A, Ginsberg MH, Shattil SJ, Ye F. Kindlins, integrin activation and the regulation of Talin recruitment to  $\alpha$ IIB $\beta$ 3. *PLoS One* 2012; 7(3): e34056.
- 30 Lefort CT, Rossaint J, Moser M, Petrich BG, Zarbock A, Monkley SJ, Critchley DR, Ginsberg MH, Fassler R, Ley K. Distinct roles for talin-1 and kindlin-3 in LFA-1 extension and affinity regulation. *Blood* 2012; 119(18): 4275–4282.
- 31 Bouaouina M, Goult BT, Huet-Calderwood C, Bate N, Brahme NN, Barsukov IL, Critchley DR, Calderwood DA. A conserved lipid-binding loop in the Kindlin FERM F1 domain is required for Kindlin-mediated  $\alpha$ IIb  $\beta$ 3 integrin coactivation. *J Biol Chem* 2012; 287(10): 6979–6990.
- 32 Lu L, Lin CD, Yan ZJ, Wang S, Zhang YH, Wang SH, Wang JL, Liu C, Chen JF. Kindlin-3 is essential for the resting  $\alpha$ 4  $\beta$ 1 integrin-mediated firm cell adhesion under shear flow conditions. *J Biol Chem* 2016; 291(19): 10363–10371.
- 33 Wehrle-Haller B. Assembly and disassembly of cell matrix adhesions. *Curr Opin Cell Biol* 2012; 24(5): 569–581.
- 34 Springer TA, Dustin ML. Integrin inside-out signaling and the immunological synapse. *Curr Opin Cell Biol* 2012; 24(1): 107–115.
- 35 Bachir AI, Zareno J, Moissoglu K, Plow EF, Gratton E, Horwitz AR. Integrin-associated complexes form hierarchically with variable stoichiometry in nascent adhesions. *Curr Biol* 2014; 24(16): 1845–1853.
- 36 Geiger B, Yamada KM. Molecular architecture and function of matrix adhesions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; 3(5): a005033.
- 37 Parsons JT, Horwitz AR, Schwartz MA. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11(9): 633–643.
- 38 Alexandrova AY, Arnold K, Schaub S, Vasiliev JM, Meister JJ, Bershadsky AD, Verkhovsky AB. Comparative dynamics of retrograde actin flow and focal adhesions: formation of nascent adhesions triggers transition from fast to slow flow. *PLoS One* 2008; 3(9): e3234.
- 39 Choi CK, Vicente-Manzanares M, Zareno J, Whitmore LA, Mogilner A, Horwitz AR. Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. *Nat Cell Biol* 2008; 10(9): 1039–1050.
- 40 Zimerman B, Volberg T, Geiger B. Early molecular events in the assembly of the focal adhesion-stress fiber complex during fibroblast spreading. *Cell Motil Cytoskeleton* 2004; 58(3): 143–159.
- 41 Bouvard D, Pouwels J, De Franceschi N, Ivaska J. Integrin inactivators: balancing cellular functions *in vitro* and *in vivo*. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; 14(7): 430–442.
- 42 Shan YL, Yu LH, Li Y, Pan YD, Zhang QG, Wang FB, Chen JF, Zhu XL. Nudel and Fak as antagonizing strength modulators of nascent adhesions through paxillin. *PLoS Biol* 2009; 7(5): e1000116.
- 43 Stehbens S, Wittmann T. Targeting and transport: How microtubules control focal adhesion dynamics. *J Cell Biol* 2012; 198(4): 481–489.
- 44 McCleverty CJ, Lin DC, Liddington RC. Structure of the PTB domain of tensin1 and a model for its recruitment to fibrillar adhesions. *Protein Sci* 2007; 16(6): 1223–1229.
- 45 Kumar A, Ouyang M, Van den Dries K, McGhee EJ, Tanaka K, Anderson MD, Groisman A, Goult BT, Anderson KI, Schwartz MA. Talin tension sensor reveals novel features of focal adhesion force transmission and mechanosensitivity. *J Cell Biol* 2016; 213(3): 371–383.
- 46 Grashoff C, Hoffman BD, Brenner MD, Zhou R, Parsons M, Yang MT, McLean MA, Sligar SG, Chen CS, Ha T, Schwartz MA. Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics. *Nature* 2010; 466(7303): 263–266.
- 47 Meacci G, Wolfenson H, Liu S, Stachowiak MR, Iskratsch T, Mathur A, Ghassemi S, Gauthier N, Tabdanov E, Lohner J, Gondarenko A, Chander AC, Roca-Cusachs P, O’Shaughnessy B, Hone J, Sheetz MP.  $\alpha$ -Actinin links extracellular matrix rigidity-sensing contractile units with periodic cell-edge retractions. *Mol Biol Cell* 2016; 27(22): 3471–3479.
- 48 Kechagia JZ, Ivaska J, Roca-Cusachs P. Integrins as biomechanical sensors of the microenvironment. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2019; 20(8): 457–473.
- 49 Oria R, Wiegand T, Escribano J, Elosegui-Artola A, Uriarte JJ, Moreno-Pulido C, Platzman I, Delcanale P, Albertazzi L, Navajas D, Trepast X, Garcia-Aznar JM, Cavalcanti-Adam EA, Roca-Cusachs P. Force loading explains spatial sensing of ligands by cells. *Nature* 2017; 552(7684): 219–224.

- 50 Elosegui-Artola A, Bazellieres E, Allen MD, Andreu I, Oria R, Sunyer R, Gomm JJ, Marshall JF, Jones JL, Trepas X, Roca-Cusachs P. Rigidity sensing and adaptation through regulation of integrin types. *Nat Mater* 2014; 13(6): 631–637.
- 51 Zaidel-Bar R, Itzkovitz S, Ma'ayan A, Iyengar R, Geiger B. Functional atlas of the integrin adhesome. *Nat Cell Biol* 2007; 9(8): 858–867.
- 52 Winograd-Katz SE, Fassler R, Geiger B, Legate KR. The integrin adhesome: from genes and proteins to human disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15(4): 273–288.
- 53 Zhong Z, Grasso L, Sibilla C, Stevens TJ, Barry N, Bertolotti A. Prion-like protein aggregates exploit the RHO GTPase to cofilin-1 signaling pathway to enter cells. *EMBO J* 2018; 37(6): e97822.
- 54 Eisenmann KM, Peng J, Wallar BJ, Alberts AS. Rho GTPase-formin pairs in cytoskeletal remodelling. *Novartis Found Symp* 2005; 269: 206–218; discussion 219–230.
- 55 Vicente-Manzanares M, Zareno J, Whitmore L, Choi CK, Horwitz AF. Regulation of protrusion, adhesion dynamics, and polarity by myosins IIA and IIB in migrating cells. *J Cell Biol* 2007; 176(5): 573–580.
- 56 Brown MC, Turner CE. Paxillin: Adapting to change. *Physiol Rev* 2004; 84(4): 1315–1339.
- 57 Parsons SJ, Parsons JT. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* 2004; 23(48): 7906–7909.
- 58 Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6(1): 56–68.
- 59 Muller PM, Rademacher J, Bagshaw RD, Wortmann C, Barth C, van Unen J, Alp KM, Giudice G, Eccles RL, Heinrich LE, Pascual-Vargas P, Sanchez-Castro M, Brandenburg L, Mbamalu G, Tucholska M, Spatt L, Czajkowski MT, Welke RW, Zhang S, Nguyen V, Rrustemi T, Trnka P, Freitag K, Larsen B, Popp O, Mertins P, Gingras AC, Roth FP, Colwill K, Bakal C, Pertz O, Pawson T, Petsalaki E, Rocks O. Systems analysis of RhoGEF and RhoGAP regulatory proteins reveals spatially organized RAC1 signalling from integrin adhesions. *Nat Cell Biol* 2020; 22(4): 498–511.
- 60 Kraynov VS, Chamberlain C, Bokoch GM, Schwartz MA, Slabaugh S, Hahn KM. Localized Rac activation dynamics visualized in living cells. *Science* 2000; 290(5490): 333–337.
- 61 Huttenlocher A, Horwitz AR. Integrins in cell migration. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; 3(9): a005074.
- 62 Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(6): 464–478.
- 63 Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, Chadburn A, Heissig B, Marks W, Witte L, Wu Y, Hicklin D, Zhu ZP, Hackett NR, Crystal RG, Moore MAS, Hajjar KA, Manova K, Benezra R, Rafii S. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 2001; 7(11): 1194–1201.
- 64 Brooks PC, Montgomery AMP, Rosenfeld M, Reisfeld RA, Hu TH, Klier G, Cheresch DA. Integrin  $\alpha_v\beta_3$  antagonists promote tumor-regression by inducing apoptosis of angiogenic blood-vessels. *Cell* 1994; 79(7): 1157–1164.
- 65 Brooks PC, Clark RA, Cheresch DA. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science* 1994; 264(5158): 569–571.
- 66 Eliceiri BP, Klemke R, Stromblad S, Cheresch DA. Integrin alphavbeta3 requirement for sustained mitogen-activated protein kinase activity during angiogenesis. *J Cell Biol* 1998; 140(5): 1255–1263.
- 67 Jin H, Aiye A, Su J, Borgstrom P, Stupack D, Friedlander M, Varner J. A homing mechanism for bone marrow-derived progenitor cell recruitment to the neovasculature. *J Clin Invest* 2006; 116(3): 652–662.
- 68 Priceman SJ, Sung JL, Shaposhnik Z, Burton JB, Torres-Collado AX, Moughon DL, Johnson M, Lusic AJ, Cohen DA, Iruela-Arispe ML, Wu L. Targeting distinct tumor-infiltrating myeloid cells by inhibiting CSF-1 receptor: combating tumor evasion of antiangiogenic therapy. *Blood* 2010; 115(7): 1461–1471.
- 69 Schmid MC, Avraamides CJ, Foubert P, Shaked Y, Kang SW, Kerbel RS, Varner JA. Combined blockade of integrin- $\alpha_4\beta_1$  plus cytokines SDF-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$  potently inhibits tumor inflammation and growth. *Cancer Res* 2011; 71(22): 6965–6975.
- 70 Jaillon S, Ponzetta A, Di Mitri D, Santoni A, Bonocchi R, Mantovani A. Neutrophil diversity and plasticity in tumour progression and therapy. *Nat Rev Cancer* 2020; 20(9): 485–503.
- 71 Jin H, Su J, Garmy-Susini B, Kleeman J, Varner J. Integrin alpha4beta1 promotes monocyte trafficking and angiogenesis in tumors. *Cancer Res* 2006; 66(4): 2146–2152.
- 72 Wang H, Fu W, Im JH, Zhou Z, Santoro SA, Iyer V, DiPersio CM, Yu QC, Quaranta V, Al-Mehdi A, Muschel RJ. Tumor cell alpha3beta1 integrin and vascular laminin-5 mediate pulmonary arrest and metastasis. *J Cell Biol* 2004; 164(6): 935–941.
- 73 Ishikawa T, Wondimu Z, Oikawa Y, Gentilcore G, Kiessling R, Egyhazi Brage S, Hansson J, Patarroyo M. Laminins 411 and 421 differentially promote tumor cell migration via alpha6beta1 integrin and MCAM (CD146). *Matrix Biol* 2014; 38: 69–83.



- 74 Cao Y, Hoepfner LH, Bach S, Guangqi E, Guo Y, Wang EF, Wu JM, Cowley MJ, Chang DK, Waddell N, Grimmond SM, Biankin AV, Daly RJ, Zhang XH, Mukhopadhyay D. Neuro-pilin-2 promotes extravasation and metastasis by interacting with endothelial alpha 5 integrin. *Cancer Res* 2013; 73(14): 4579–4590.
- 75 Knowles LM, Gurski LA, Engel C, Gnarr JR, Maranchie JK, Pilch J. Integrin alpha v beta 3 and fibronectin upregulate slug in cancer cells to promote clot invasion and metastasis. *Cancer Res* 2013; 73(20): 6175–6184.
- 76 Gonzalez AM, Bhattacharya R, deHart GW, Jones JC. Trans-dominant regulation of integrin function: mechanisms of crosstalk. *Cell Signal* 2010; 22(4): 578–583.
- 77 Cooper J, Giancotti FG. Integrin signaling in cancer: Mechanotransduction, Stemness, epithelial plasticity, and therapeutic resistance. *Cancer Cell* 2019; 35(3): 347–367.
- 78 Reynolds LE, Wyder L, Lively JC, Taverna D, Robinson SD, Huang X, Sheppard D, Hynes RO, Hodivala-Dilke KM. Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking beta3 integrin or beta3 and beta5 integrins. *Nat Med* 2002; 8(1): 27–34.