

文章编号:1004-7220(2010)04-0288-08

## 整合素分布变化与肝癌细胞迁移取向调节的相关性

王红兵<sup>1</sup>, 徐秋华<sup>1</sup>, 刘艳鸣<sup>1</sup>, 于光磊<sup>2</sup>, 杨力<sup>1</sup>, 吴泽志<sup>1</sup>, 杨本艳姿<sup>1</sup>

(1. 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;

2. 重庆大学 数理工程学院, 重庆 400044)

**摘要:** 目的 采用机械拉伸方法并通过衬纤连蛋白(胞外基质成份)调节整合素受配体结合,探索整合素再分布变化对肝癌细胞黏附运动行为的影响,以及骨架重排对整合素再分布变化的影响。方法 运用免疫荧光染色、激光共聚焦显微技术和定量形态学分析法,观察整合素分布变化和细胞骨架装配调整,及对细胞运动变形能力进行检测和定量分析。结果 (1)不同形态细胞的整合素表达和分布特征不同,铺展细胞 $\beta_1$ 整合素表达高于未铺展的圆细胞,分布峰值为基底面,而圆细胞游离面的整合素分布反较基底面多。(2)机械拉伸5 h后不同形态细胞 $\beta_1$ 整合素表达均升高,分布带增宽;卸载1 h整合素表达下调,出现弥散分布倾向,其中以圆细胞最为明显。(3)衬FN后 $\beta_1$ 整合素表达增加,不同形态细胞整合素分布均向基底转移,并使肝癌细胞净迁移距离减小。(4)机械拉伸5 h后60%的细胞长轴取向集中在 $70^\circ \sim 110^\circ$ 之间,细胞骨架倾向垂直于拉伸方向排列,卸载1 h细胞骨架明显解聚。结论 肝癌细胞整合素分布变化受胞内骨架调整和胞外配体数量的影响,单个圆细胞的整合素分布特征与其较强的转移浸润能力相关。

**关键词:** 细胞黏附; 机械拉伸; 细胞培养; 整合素分布; 细胞骨架

**中图分类号:** R318.01 **文献标志码:** A

## Study on the correlation of integrin distribution changes with directional migration of hepatoma cells

WANG Hong-bing<sup>1</sup>, XU Qiu-hua<sup>1</sup>, LIU Yan-ming<sup>1</sup>, YU Guang-lei<sup>2</sup>, YANG Li<sup>1</sup>, WU Ze-zhi<sup>1</sup>, YANG BEN-Yanzi<sup>1</sup> (1. Key Laboratory for Biorheology and Technology of Ministry of Education, College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China; 2. College of Mathematics and Physics, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

**Abstract; Objective** To explore the influence of integrin redistribution on hepatoma cell alignment and migration and the influence of cytoskeleton reassembly on integrin redistribution by the method of mechanical loading-unloading and fibronectin(FN) coating. **Method** By using immunofluorescence staining, cofocal laser scanning microscopy and quantitative morphological analysis, integrin distribution change and cytoskeleton assembly adjustment were observed and the deformation of cell movement was tested and analyzed quantitatively. **Results** (1) cells with different forms have different integrin expressions and distribution features. The  $\beta_1$  integrin expression for spreading cells was higher than that for round (nonspreading) cells. For spreading cells, the strongest staining was found towards the attachment surface. While for round (nonspreading) cells, the integrin staining on the free surface towards medium was stronger than that towards the attachment surface. (2) After 5 hours of mechanical stretch, the  $\beta_1$  integrin expression for both spreading and round cells increased, and distribution peaks towards the attachment surface broadened. At 1 hour after unloading, the  $\beta_1$  integrin expression decreased and the distribution of integrin staining showed the tendency of dispersion, especially for round cells. (3) After

收稿日期:2010-06-10; 修回日期:2010-06-28

基金项目:国家自然科学基金资助项目(10472137),国家211计划资助项目(B0623)。

作者简介:王红兵(1978-),女,Tel:(023)66885061; E-mail:whbdzx@yahoo.com.cn。

通讯作者:杨力,教授,E-mail:yangli@cqu.edu.cn。

coating the substrates with FN, the  $\beta_1$  integrin expression increased. The integrin staining for either spreading or round cells was more towards the attachment surface to reduce the migration of hepatoma cells. 4) After 5 hours of mechanical stretch, 60% of cells showed their orientation of major axes distributed between  $70^\circ \sim 110^\circ$  towards the stretching direction, and the cytoskeleton aligned vertically to the stretching direction. Cytoskeletons were found significantly depolymerized at 1 hour of unloading. **Conclusions** The change of integrin distribution is affected by cytoskeleton aligned and the number of ligand. The distribution feature of the whole integrin expression on the surface of individual round cells is related to their stronger invasion and metastasis capability.

**Key words** : Cell adhesion; Mechanical stretch; Cell culture; Integrins distribution; Cytoskeleton

整合素是肿瘤细胞侵袭转移过程中调节细胞黏附和运动行为的重要分子,整合素代谢异常与其迁移运动异常高度相关<sup>[1-4]</sup>,近年对肿瘤细胞的迁移运动提出了2种模型,即动力依赖型(haptokinetic)迁移和非动力依赖型(non-haptokinetic)迁移<sup>[5]</sup>,前一类细胞迁移由整合素介导,整合素介导细胞黏附于胞外基质,提供胞外基质和细胞骨架之间的物理连接,并通过诱发细胞收缩而使细胞极化伸长,形成梭状形态<sup>[6-7]</sup>。后一类细胞的迁移不依赖整合素,因细胞与基底黏附不牢,所以它们多呈现圆形。当细胞迁移运动时,通常会通过收缩挤压自身,促使细胞变形以穿过胞外基质中的间隙。实验观测发现在肿瘤侵袭过程中,两种迁移模型可以相互转化以适应周围环境的变化,从而大大增强了其恶性转移潜能<sup>[8-14]</sup>。目前该研究方向的热点主要集中在如何诱导肿瘤细胞两种迁移模式转换调控上,其中最常运用的方法就是通过抗体下调 $\beta_1$ 整合素介导的黏附<sup>[12-15]</sup>。显然在这两种迁移运动方式中,细胞会呈现出2种不同的形态,整合素为跨膜蛋白主要分布于细胞表面和基底面,这两部分的动态变化不仅影响细胞形态特征,而且与细胞运动调节高度相关。但相关研究对两种形态迥异的细胞其整合素分布有无不同,以及这种不同于其迁移特性的关联并无描述。因此,对肿瘤细胞黏附运动异常的本质原因进行解析时,需要了解肿瘤细胞形态变化与整合素分布调整的关系,以及整合素分布变化的实现过程。

通常肿瘤细胞体外培养时其形态也会呈现梭形和圆形等不同形态特征,同时其运动能力也存在差异。本实验研究首先对体外培养的人肝癌细胞HepG2整合素进行量化表征,着重考查圆细胞与铺展细胞整合素分布特征;继而采用机械拉伸刺激促使整合素在细胞基底和游离面间转移,并通过裱衬纤连蛋白(胞外基质成份)调节整合素受-配体结

合;在诱发肝癌细胞HepG2整合素再分布变化的基础上,总结整合素再分布变化趋势和特征;并结合肝癌细胞黏附运动变化规律,探索整合素再分布变化对肝癌细胞黏附运动行为的影响,以及骨架重排对整合素再分布变化的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人肝癌细胞株,株名HepG2(购自上海细胞所)。倒置显微镜(Olympus公司,日本),激光共聚焦显微镜(Leica公司,德国,型号:TCS-SP2)。基底膜拉伸加载装置(自主研发,中国),RPMI-1640培养基(Hyclone公司,德国),L-谷氨酰胺(L-Glutamine, Hyclone公司,德国),牛血清/胎牛血清(Hyclone公司,德国),HEPES(Hyclone公司,德国),胰蛋白酶(Hyclone公司,德国),纤维连接蛋白(Fibronectin, FN, FC010 Chemicon International, Inc), DMSO(分析纯产品, Amresco公司),鼠抗人 $\beta_1$ 整合素抗体, FITC羊抗鼠IgG均购自Santa Cruz公司, FITC标记的鬼笔环肽(Sigma公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞力学加载实验

(1) 实验系统:由细胞培养槽和谐波应变加载部分构成。加载部分的基本原理是将硅胶膜安装在前后膜架上,而前后膜架可在导轨上水平滑动,从而可以实现膜初始位置的调整及张紧;膜安装调整后,将前膜架在导轨上锁定,后膜架可以在驱动杆的牵引下,沿导轨作往复运动,从而实现膜的拉伸加载(细胞生长在膜上)。弹性膜厚 $100\ \mu\text{m}$ ,有效长度为 $6\ \text{cm}$ ,宽度为 $2\ \text{cm}$ ,透明(见图1)。

(2) 方法:膜安装调整并消毒灭菌后,将 $5 \times 10^4$ 个/mL的HepG2单细胞悬液接种于弹性硅胶膜上,继续培养12 h后,施加应变为10%,频率为30次/

min 的拉伸刺激,并设立先行拉伸刺激后卸载的实验组,同时分别设置静态对照实验。实验结束取出弹性硅胶膜,进行活细胞间接免疫荧光染色,观察整合素分布和骨架取向变化。

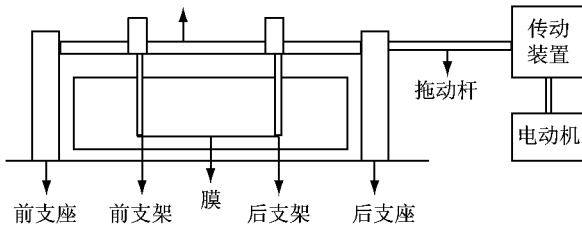


图1 谐波应变加载装置原理图

Fig. 1 The schematic diagram of harmonic straining device

### 1.2.2 纤连蛋白(FN)裱衬培养肝癌细胞

于弹性硅胶膜上,裱衬浓度为 10 mg/L 的纤连蛋白(FN)1.00 mL 过夜,挥干后用 PBS 溶液轻轻洗涤 3 次。将  $5 \times 10^4$  个/mL HepG2 悬液接种于纤连蛋白裱衬后的弹性硅胶膜上,继续培养 12 h 后,取出弹性硅胶膜,进行间接免疫荧光染色,观察整合素分布和细胞迁移特征变化。

### 1.2.3 间接免疫荧光染色和激光共聚焦显微镜检测整合素分布

(1) 用 4% 多聚甲醛对弹性硅胶膜上的细胞进行固定,5% TritonX-100 处理样本增强细胞膜的通透性,分别加入一抗(鼠抗人  $\beta_1$  整合素抗体)和二抗(FITC 羊抗鼠 IgG)于 37 °C 温育后甘油封片。采用激光共聚焦显微镜进行由细胞基底至游离面的断层扫描检测,步进间距为 2.0  $\mu\text{m}$ ,取平均荧光强度值,比较对照组和实验组  $\beta_1$  整合素的分布情况。

(2) 用 4% 多聚甲醛对弹性硅胶膜上的细胞进行固定。5% TritonX-100 处理样本增强细胞膜的通透性,50  $\mu\text{L}$  的 FITC-鬼笔环肽溶液覆盖样本,在 37 °C 下孵育甘油封片后使用激光共聚焦显微镜观察样本。分别对对照组、加载组和卸载组细胞进行上述染色标记,观察机械刺激对肌动蛋白微丝的影响。

(3) 细胞组别的划分:为了解细胞不同铺展状态和细胞间连结对细胞整合素分布及其再分布变化趋势的影响,分别对 3 种典型细胞状态的整合素表达和分布进行检测:① 未铺展的圆细胞;② 与周围

无连接关系的单个铺展细胞;③ 与周围有连接关系的铺展细胞个体(简称群居细胞)。

### 1.2.4 肝癌细胞运动迁移行为表征

(1) 细胞迁移净距离定量分析:细胞迁移净位移是指细胞从起始时间到所测时间点移动的直线距离,对细胞在 60 min 内迁移运动进行连续定点的拍照。用 Image Tool 测量从初始至 60 min 细胞几何中心距离物理标记的距离变化,每张图至少取 10 个细胞。

(2) 垂直取向集中度:细胞长轴与主应变方向间的夹角为细胞取向角,取向角在 70° ~ 110° 区域内的细胞数占总细胞数的比例为垂直取向集中度。

### 1.2.5 统计学处理

实验结果以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm sd$ ) 表示,两组数据间的差异性采用 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 不同形状肝癌细胞 $\beta_1$ 整合素分布比较

#### 2.2.1 静态培养下不同形状肝癌细胞基底面至游离面的整合素分布比较

对静态培养条件下的 3 种细胞,即圆细胞、铺展细胞和群居细胞的整合素分布进行比较(见图 2)。在细胞基底面,群居细胞荧光强度最强,铺展细胞次之,圆细胞最弱;群居细胞和铺展细胞整合素分布呈现基底面高于游离面的趋势,但圆细胞游离面整合素反较基底面为多,分布峰值为距基底 2  $\mu\text{m}$  平面。

#### 2.2.2 力学加载状态下不同形状肝癌细胞基底面至游离面的整合素分布变化比较

对圆细胞、铺展细胞和群居细胞加载 5 h 后的整合素分布变化进行比较(见图 3)。加载后细胞荧光强度整体上升,分布发生变化即峰值均下移至基底面,但分布带扩展。

#### 2.2.3 卸载状态下不同形状肝癌细胞基底面至游离面的整合素分布变化比较

对圆细胞、铺展细胞和群居细胞加载 5 h 之后卸载 1 h,其整合素分布变化进行比较(见图 4)。细胞荧光强度弱提示  $\beta_1$  整合素表达下调,同时弥散分布倾向增大,游离面整合素普遍增多;与静态对照和加载组相比, $\beta_1$  整合素基底面与游离面分布量落差减小,且圆细胞整合素分布峰值出现上移至距基底 6  $\mu\text{m}$  平面,并明显高于基底面。

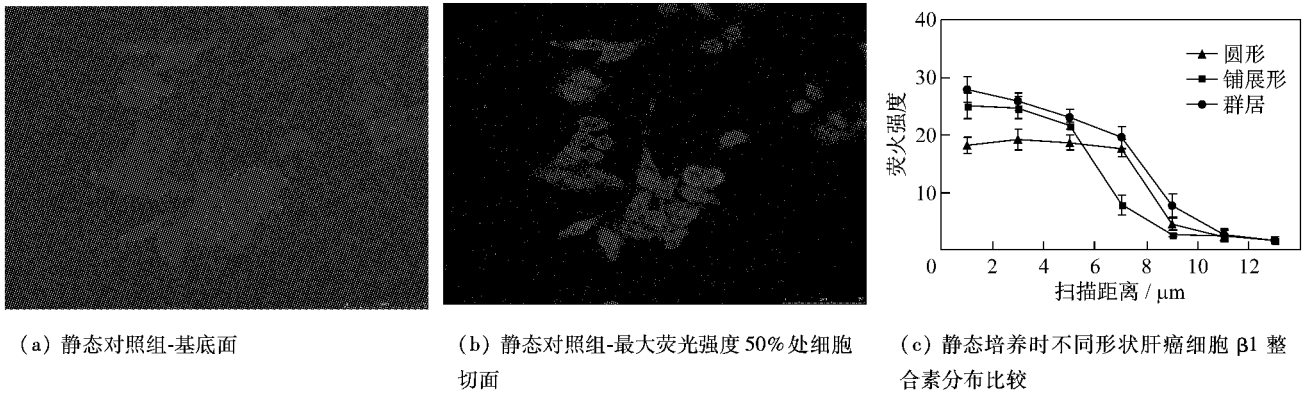


图 2 不同组别细胞整合素分布

Fig.2 The integrin distribution of different cell morphology in the control

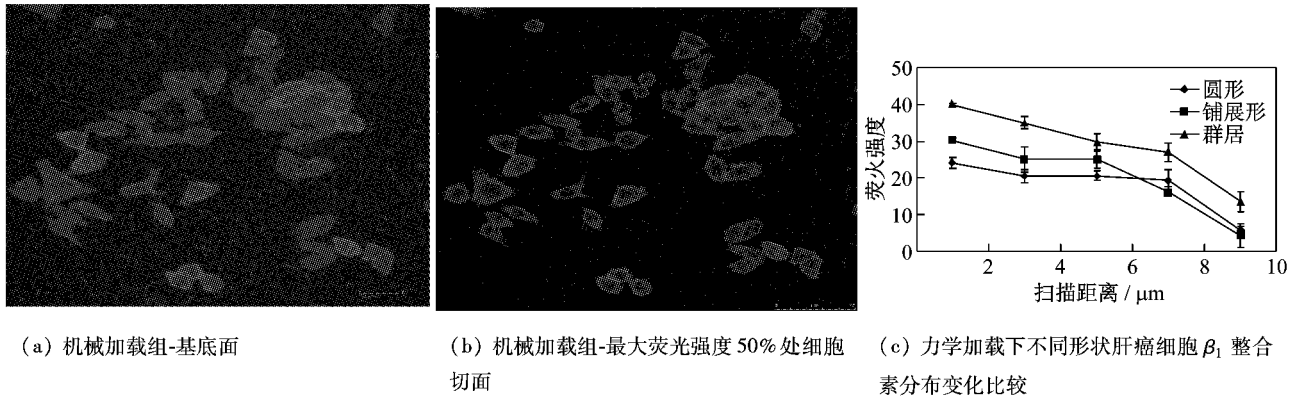


图 3 不同组别细胞力学加载后整合素分布

Fig.3 The integrin distribution of different cell morphology after mechanical loading

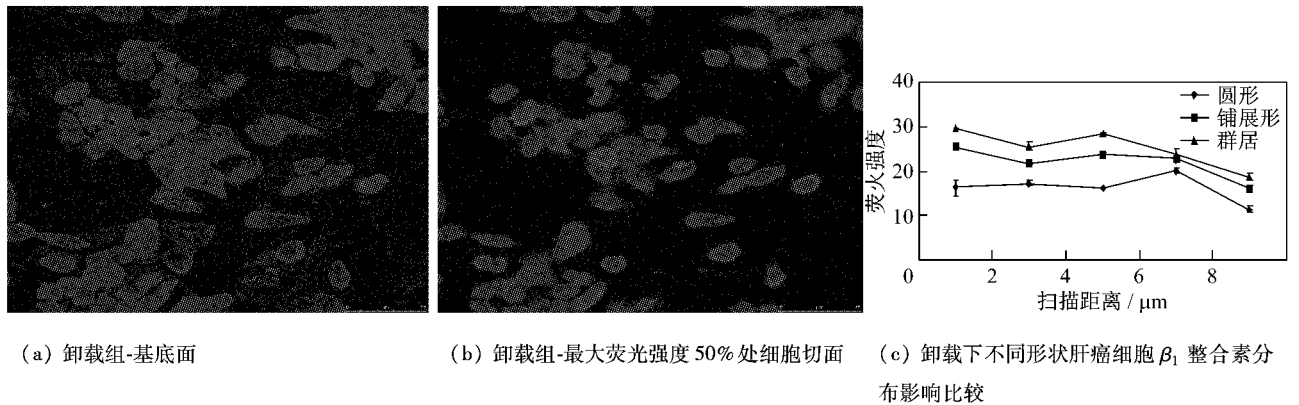


图 4 不同组别细胞卸载外力后整合素分布

Fig.4 The integrin distribution of different cell morphology after unloading

### 2.3 裱衬 FN 不同形状肝癌细胞基底面至游离面的整合素分布比较

对裱衬 FN 后圆细胞、铺展细胞和群居细胞的整合素分布变化进行比较(见图 5)。裱衬 FN 后,

细胞荧光强度整体上升,基底面明显多于游离面分布量,裱衬组不同形态细胞基底面整合素分布量均大于静态组,并以圆细胞尤为明显,同时其整合素分布带缩窄。

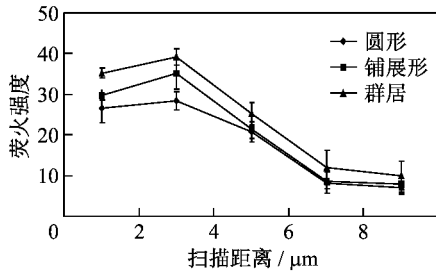


图5 裱衬 FN 对不同形状肝癌细胞  $\beta_1$  整合素分布影响比较  
Fig.5 The integrin distribution of different HepG2 cell morphology coated with FN

### 2.4 裱衬 FN 对肝癌细胞黏着斑形成和迁移净位移定量分析

如图6所示, A 为对照组, B 为裱衬 FN(10 mg/L) 组的细胞基底面整合素荧光强度比较, 裱衬组荧光强度明显高于对照组, 且沿细胞膜边缘出现散在的斑片状强荧光区。C、D 分别为对照组与裱衬 FN 组铺展细胞和圆细胞迁移净位移直方图, 在 1 h 内, 裱衬组较对照组细胞迁移净距离明显减小。

### 2.5 加载对肝癌细胞取向的影响

在应变10%的周期拉伸5 h, 肝癌细胞出现明

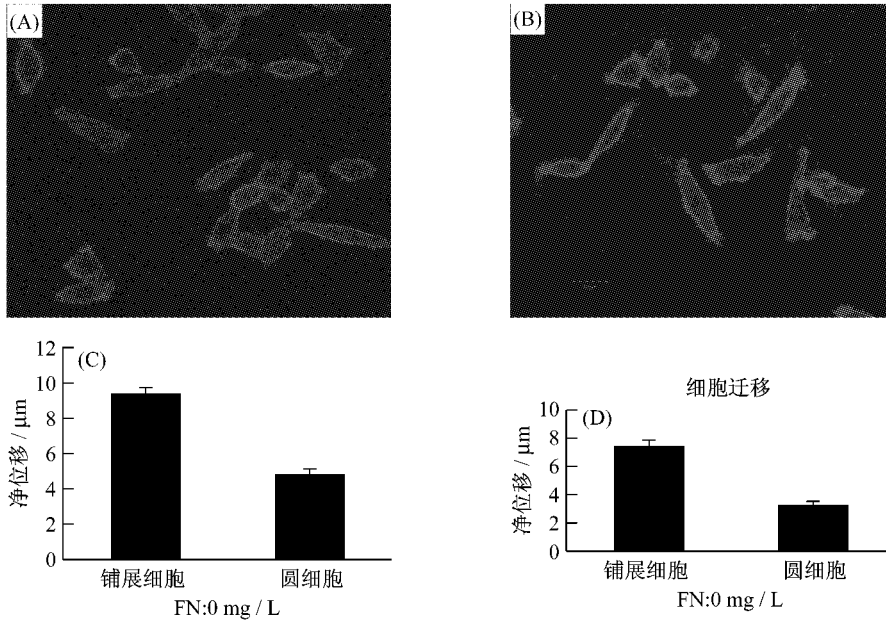


图6 裱衬 FN 对肝癌细胞黏着斑形成和净位移影响的比较  
Fig.6 The migration distance of HepG2 cells onto glass or FN coated surfaces (C:  $P=0.041$ , D:  $P=0.013$ )

显取向调整, 约 60% 以上细胞的取向角集中在  $70^\circ \sim 110^\circ$  (见图7)。

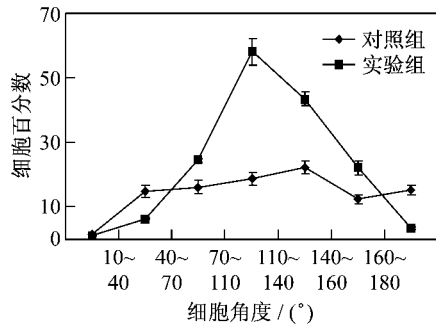


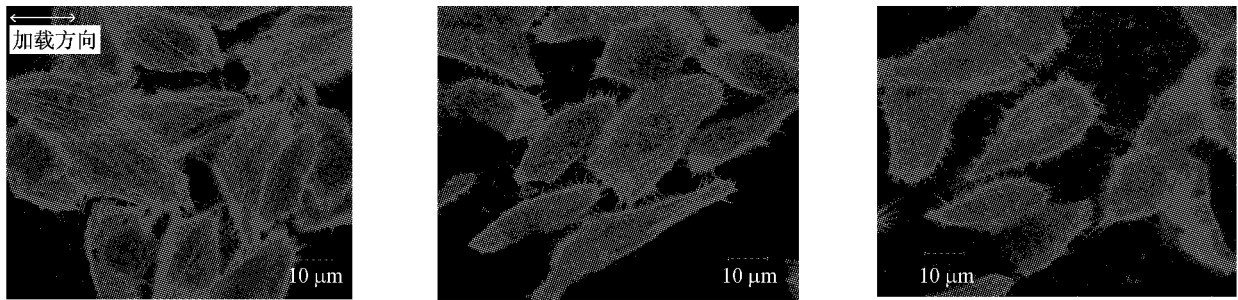
图7 加载 5 h 肝癌细胞取向角度分布图  
Fig.7 HepG2 cells' angle distribution after loading for 5 h

### 2.6 加载和卸载对肝癌细胞骨架取向影响的比较

对照组肝癌细胞内的 F-actin 呈弥散分布, 应力纤维纤细。加载 5 h 后, 肝癌细胞 F-actin 的含量上升(荧光更亮), 应力纤维增粗, 排布趋向于沿与主应变垂直的方向。基底可见斑点状的荧光增强区, 卸载 1 h, 肝癌细胞应力纤维变细。细胞膜处的 F-actin 数量和荧光强度介于对照组和加载组之间(见图8)。

## 3 讨论

肝细胞整合素表达与其他上皮细胞不同, 正常成人肝细胞没有基膜, 仅低水平表达3种整合素:



(a) 加载 5 h(肝癌细胞 100 ×) (b) 卸载后 1 h(肝癌细胞 100 ×) (c) 对照组(肝癌细胞 100 ×)

图 8 加、卸载对肝癌细胞骨架装配和取向影响比较

Fig. 8 F-actin rearrangement under different stress conditions

$\alpha_1\beta_1$  (胶原蛋白及层黏蛋白受体)、 $\alpha_5\beta_1$  (纤维蛋白受体)、 $\alpha_9\beta_1$  (张力蛋白受体)。但肝细胞癌变时,细胞表面的整合素受体有较大改变,整合素的表达明显高于正常肝细胞<sup>[16-18]</sup>。

整合素为 $\alpha$ 和 $\beta$ 亚基非共价键连接而形成的异二聚体跨膜糖蛋白,是一类重要的细胞表面受体。一方面,通过受-配体间的特异性反映,与基质蛋白形成局部黏附连接,传感细胞微环境诸多理化信息的变化;另一方面,其 $\beta$ 亚单位在胞内可与多种骨架蛋白如肌动蛋白(actin)、纽蛋白(vinculin)、踝蛋白(talin)等形成连结,并通过与黏着斑激酶(FAK)的氨基端反应,进一步与各种信号分子反应,如C-Src、PI-3激酶等,这些信号分子又进一步激活各种下游蛋白的级联反应,包括促有丝分裂原激活蛋白激酶(MAPK)、PIP-5激酶、蛋白激酶C(PKC)等,从而参与细胞的跨膜信息传递,影响细胞增殖和迁移运动等生物学行为<sup>[19-20]</sup>。细胞外基质-整合素-胞内骨架被认为是细胞与基底相互作用的结构基础,整合素是这一信号转导分子路径的感受器,目前研究认为,整合素也是感受环境机械刺激的力学传感器<sup>[21]</sup>。通过力学加载刺激来诱发整合素分布调整,既可促使骨架重组,又可相当直观地获得细胞与基底相互作用过程中的一些相关信息。

对人肝癌 HepG2 细胞  $\beta_1$  整合素分布趋势进行分析发现, $\beta_1$  整合素在细胞基底面分布较多,细胞游离面分布较少。周期机械拉伸(10% 拉伸, 30 r/min)作用 5 h 后,  $\beta_1$  整合素表达上调,分布带增宽(见图 1~5)。胞内应力纤维增粗倾向于与主应力垂直方向排列,约 60% 以上细胞的取向角集中在  $70^\circ \sim 110^\circ$ ;而去除机械拉伸刺激后,即卸载 1 h 后

发现  $\beta_1$  整合素表达下调,整合素向游离面分布增多,并出现弥散分布倾向,细胞骨架解聚等变化(见图 7,8)。此外,分析比较不同形状细胞整合素的总体分布趋势,发现群居细胞的  $\beta_1$  整合素表达最强,铺展细胞次之,圆细胞最弱,但圆细胞游离面整合素反较基底面多。上述实验结果反映出 2 个重要信息:① 肝癌细胞虽可通过调节整合素表达和骨架重排对机械刺激作出响应,但在此过程中整合素呈现弥散分布趋势,提示肿瘤细胞因其骨架发育存在缺陷,导致其力信号转导分子路径的结构稳定性较差;② 处于不同状态的圆细胞其游离面  $\beta_1$  整合素分布总是多于其他形状 of 细胞,提示圆细胞更具转移侵袭潜能。因为癌组织内黏附分子配体严重缺,肝癌细胞黏附分子增多将进一步影响受体-配体比例平衡,既可造成对已形成的黏附复合物稳定性的影响(受体-配体频繁交换),促进细胞从原发灶脱落;同时细胞游离面的整合素受体为了积极寻求新配体结合的努力,可能会促使癌细胞向正常组织(含丰富的配体)趋近,所以对病变的发生发展产生重要影响。

整合素配体主要为细胞外基质(ECM)蛋白。整合素通过识别胞外基质蛋白、介导细胞与细胞外基质、细胞与细胞间的黏附反应,并接受、传导级联信号以及调节细胞的存活、运动、增殖等生理活动,在胚胎发育、肿瘤发生和侵袭转移、伤口愈合等过程中起重要的作用<sup>[22-24]</sup>。纤连蛋白(FN)是 ECM 的主要成分,是一种大型的糖蛋白,分子量约为 550 KDa,由  $\alpha\beta 2$  条多肽链构成,两条链在羧基端以二硫键相连。FN 肽链中的一些短肽如 RGD(Arg-Gly-Asp)序列是细胞表面的各种 FN 受体识别与结合的

最小结构单位。有研究表明,肿瘤细胞或组织中 FN 的表达与肿瘤的恶性程度有关,恶性程度越高或具有转移能力的肿瘤细胞,其 FN 的表达水平越低<sup>[25-26]</sup>。而整合素的胞外基质配体如纤连蛋白、层黏连蛋白、胶原等则广泛存在于正常组织中。文献[4]中指出,肝癌细胞  $\beta_1$  整合素表达明显高于正常肝细胞。本文实验结果表明,圆细胞和机械刺激后的肝癌细胞出现整合素弥散分布倾向,那么肝癌细胞的这些特征对其向正常组织趋近有什么作用呢?因此,本文研究了肝癌 HepG2 细胞在袪衬 FN 后其表面  $\beta_1$  整合素的分布变化以及这种分布变化对细胞迁移的影响。

在对照组中,肝癌细胞整合素主要呈细小的斑点状弥散分布,而在袪衬 FN 的实验组中,肝癌细胞整合素分布发生聚集重组,出现大量斑片状的局部黏附结构(见图6)。有效的局部黏附形成,必须有受体聚集和配体共同启动的协同反应。由于局部黏附部位含有许多骨架调控蛋白,这些蛋白可调控肌动蛋白单体聚合并形成应力纤维,同时向聚焦黏附部位靠拢,在基底-整合素-细胞骨架之间形成“桥连”,其中受-配体结合的内在潜能是整合素分布调整的原动力。袪衬 FN 对 HepG2 肝癌细胞迁移能力有明显的抑制作用,同时,细胞迁移的净位移与形态有很大的关联性。总之,铺展细胞迁移的净位移大致是圆细胞的2倍(见图6)。细胞迁移运动是细胞与基质之间黏着斑反复形成和解的动态过程。FN 是黏着斑的组成之一,袪衬 FN 增加了黏着斑的数量与大小,一方面会提高细胞与基质间的黏着强度,另一方面又限制了黏着斑的转换率。圆细胞因与基底黏附不稳,频繁变换角度,故净位移较小。

由于人肝癌 Hep G2 细胞表面  $\beta_1$  整合素分布特征呈现基底面多于游离面的特点,不同形状相同切面整合素分布比较发现细胞铺展和连结形成可促进整合素向基底聚集,未铺展圆细胞的整合素分布存在弥散倾向,故不同铺展和连结状态对肝癌细胞整合素分布有一定调节作用。单个圆细胞的整合素分布特征(弥散、游离面较多)支持其浸润转移能力较强的特性。

人肝癌 HepG2 细胞表面  $\beta_1$  整合素分布和表达受其黏附状态和预张力改变的调节,加-卸载诱发整合素分布和骨架重组的变化趋势,预示肝癌细胞

整合素分布调节与其骨架重构高度相关。袪衬 FN 明显诱发肝癌细胞整合素表达升高,并向基底转移聚集;其中对圆细胞整合素分布调整影响最大,预示肝癌细胞自身整合素再分布调节倾向和正常组织内蕴含丰富的配体,共同促进了肝癌细胞的浸润转移行为。

#### 参考文献:

- [1] Michael Z Gilcrease. Integrin signaling in epithelial cells [J]. *Cancer Lett*, 2007,247(1):1-25.
- [2] Schirner M, Herzberg F, Schmidt R, *et al*. Integrin alpha5 beta1: a potent inhibitor of experimental lung metastasis [J]. *Clin Exp Metastasis*, 1998, 16(5): 427-435.
- [3] Hugh Kin, Anita Sengupta, Michael Glogauer, *et al*. Filamin A regulates cell spreading and survival via  $\beta_1$  integrins [J]. *Experimental Cell Research*, 2008,314(4):834-846.
- [4] Michele L Lemons, Maureen L, Condic. Integrin signaling is integral to regeneration [J]. *Exp Neurol*, 2008, 209(2): 343-352.
- [5] Giovanna M. D Abaco, Andrew H. Kaye. Integrins: Molecular determinants of glioma invasion [J]. *J Clin Neurosci*, 2007,14(11):1041-1048.
- [6] Yamazaki D, Kurisu S, Takenawa T. Regulation of cancer cell motility through actin reorganization [J]. *Cancer Sci*, 2005, 96(7):379-386.
- [7] Carl GG, Susanna CF, Susanna MN, *et al*. Regulation of integrin activity and signalling [J]. *Biochimica et Biophysica*, 1790(2009):431-444.
- [8] Tomonori T, Takayuki F, Nobuhiro A, *et al*. Mechanical stretch stimulates integrin  $\alpha V\beta_3$ -mediated collagen expression in human anterior cruciate ligament cells [J]. *Journal of Biomechanics*,2009(42):2097-2103.
- [9] Akihide Masumoto, Shuichi Arao, Makoto Otsuki. Role of  $\beta_1$  integrins in adhesion and invasion of hepatocellular carcinoma cells [J]. *Hepatology*, 1999, 29:1.
- [10] Algirdas Velyvis, Julia Vaynberg, Yanwu Yang, *et al*. Structural and functional insights into PINCH LIM4 domain-mediated integrin signaling [J]. *Nature Structural Biology*,2003, 10(7):558-564.
- [11] Schwartz MA, Ginsberg MH. Networks and crosstalk: integrin signaling spreads [J]. *Nature Cell Biol*, 2002, 4(4): E65-E68.
- [12] Fong YC, Hsu SF, Wu CL, *et al*. Transforming growth factor- $\beta_1$  increases cell migration and  $\beta_1$  integrin up-regulation in human lung cancer cells [J]. *Lung Cancer*,2009(64):13-21.

- [13] Johnson JP. Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 1999, 18(3):345-357.
- [14] Thomas L, Flanigan MD, David H, *et al.* The effects of increased extracellular deformation, pressure, and integrin phosphorylation on fibroblast migration[J]. *Journal of Surgical Research*, 2009(156):103-109.
- [15] Jalali S, Del Pozo MA, Chen K, *et al.* Integrin-mediated mechanotransduction requires its dynamic interaction with specific extracellular matrix (ECM) ligands[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 30, 98(3):1042-1046.
- [16] Choi YA, Kim DK, Kang SS, *et al.* integrin signaling and cell spreading alterations by rottlerin treatment of chick limb bud mesenchymal cells[J]. *Biochimie*, 2009(91):624-631.
- [17] Holzmann B, Gossler U, Bittner M. Alpha4 integrins and tumor metastasis[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1998, 231:125-141.
- [18] Peter J. M, Stroeken, Ellen A. M, *et al.* Target-ed disruption of the  $\beta_1$  integrin gene in a lymphoma cell line greatly reduces metastatic capacity[J]. *Cancer Res*, 1998, 58:1569.
- [19] Coplen DR, Brown EJ, McGarr J, *et al.* Characterization of fibronectin attachment by a human transitional cell carcinoma line[J]. T24. *J Urol*, 1991, 145(6):1312-1315.
- [20] Rosales C, O'Brien V, Kornberg L, *et al.* Signal transduction by cell adhesion receptors[J]. *Biochim Biophys Acta*. 1995, 28, 1242(1):77-98.
- [21] Morrison BL, Jose CC, Cutler ML. Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) enhances lactogenic differentiation of mammary epithelial cells via integrin-mediated cell adhesion[J]. *BMC Cell Biol*, 2010, 11(1):35.
- [22] Meacock WR, Spalton DJ, Stanford MR. Role of cytokines in the pathogenesis of posterior capsule opacification[J]. *Br J Ophthalmol*, 2000, 84(3):332-326.
- [23] Taverna D, Ullman-Cullere M, Rayburn H, *et al.* A test of the role of alpha5 integrin/fibronectin interactions in tumorigenesis[J]. *Cancer Res*, 1998, 58(4):848-853.
- [24] Takenaka k, Shibuya M, Takeda Y, *et al.* Altered expression and function of beta1 integrins in a highly metastatic human lung adenocarcinoma cell line [J]. *Int J Oncol*, 2000, 17(6):1187-1194.
- [25] Mukhopadhyay R, Theriault RT, Priceje, *et al.* Increased levels of alpha6 integrins are associated with the metastatic phenotype of human breast cancer cells[J]. *Clin Exp Metastasis*, 1999, 17(4):325.
- [26] Schalken JA, Ebeling SB, Isaacs JT, *et al.* Down modulation of fibronectin mRNA in metastasizing rat prostatic cancer cells revealed by differential hybridization analysis[J]. *Cancer Res*, 1988, 48(8):2042-2046.