3 讨论

LNα4是血管生成过程中非常重要的ECM分子，而其功能的发挥则主要依赖表达于血管内皮细胞表面的整合素受体，尤其是αvβ3整合素受体[10]。本课题组在前期研究中鉴定了αvβ3整合素在LNα4中结合的一段肽$G^{1121-1139}$（G19肽），但G19肽尚不是LNα4结合αvβ3整合素的最短肽序列，肽段中起作用的关键氨基酸残基也尚不清楚。本研究首先根据G19肽的同源性序列比较结果确定了G19肽中的保守性氨基酸残基，并以此为基础进行点突变，以确定G19肽中的关键氨基酸残基。这也是目前通常采用的、有效的确定关键氨基酸残基的方法。结合Nam等[11]的报道，YH基序（指序列中连续的YH氨基酸残基）是αvβ3整合素结合的重要基序，课题组选取了第4位的I，第10位的H和第16位的Y进行突变，突变对象采用具有短侧链的氨基酸残基G和S，以尽量减少对整体肽链空间结构的影响。同时，第4位和第16位也兼顾了所有保守性氨基酸残基的分布。结果显示，这3个位点的氨基酸残基均与整个肽段的功能密切相关，是G19肽中的关键氨基酸位点。缺失突变实验也进一步证实了涵盖所有保守氨基酸残基在内的$G^{1124-1137}$肽段是αvβ3整合素所结合的最短肽段。

人脐静脉内皮细胞表面通常表达少量的αvβ3整合素受体，使用$MnCl_2$刺激后可以促进αvβ3整合素受体的表达[12]。因此，功能性的αvβ3整合素结合肽可以通过与αvβ3整合素的结合而促进细胞的黏附及管样结构的形成。G14肽与G19肽均能够有效促进HUVEC的黏附与管样结构形成且无显著差异，从而在体外实验证明了G14肽具备了结合αvβ3整合素并发挥其功能的作用。体内的CAM血管生成实验进一步证实了G14肽在促血管生成方面的功能，这也是LNα4的一项重要功能，从而印证了G14肽作为αvβ3整合素在LNα4中结合位点的重要功能。

综上所述，我们成功地鉴定了αvβ3整合素在LNα4中的最小结合位点及关键氨基酸残基，证实了G14肽所具有的促血管生成功能，从而为进一步阐明LNα4的功能及其在肿瘤转移过程中的作用提供了依据。

参考文献：

[1] Guarnieri D, Battista S, Borzacchiello A, *et al*. Effects of fibronectin and laminin on structural, mechanical and transport properties of 3D collageneous network[J]. J Mater Sci Mater Med, 2007, 18(2): 245-253.

[2] Chen J, Jing L, Gilchrist C L, *et al*. Expression of laminin isoforms, receptors, and binding proteins unique to nucleus pulposus cells of immature intervertebral disc[J]. Connect Tissue Res, 2009, 50(5): 294-306.

[3] Garcia-Nieto S, Johal R K, Shakesheff K M, *et al*. Laminin and fibronectin treatment leads to generation of dendritic cells with superior endocytic capacity[J]. PLoS One, 2010, 5(4): e10123.

[4] Bunch T A. Integrin alphaIIbbeta3 activation in Chinese hamster ovary cells and platelets increases clustering rather than affinity[J]. J Biol Chem, 2010, 285(3): 1841-1849.

[5] Quemelo P R, Simoes D L, Peres L C. Beta1 integrin and VEGF expression in an experimental model of brain tissue heterotopia in the lung[J]. Childs Nerv Syst, 2010, 26(6): 807-810.

[6] Abrass C K, Hansen K M, Patton B L. Laminin alpha4-null mutant mice develop chronic kidney disease with persistent overexpression of platelet-derived growth factor[J]. Am J Pathol, 2010, 176(2): 839-849.

[7] Munoz J, Zhou Y, Jarrett H W. LG4-5 domains of laminin-211 binds alpha-dystroglycan to allow myotube attachment and prevent anoikis[J]. J Cell Physiol, 2010, 222(1): 111-119.

[8] Lian J, Dai X, Li X, *et al*. Identification of an active site on the laminin alpha4 chain globular domain that binds to alphavbeta3 integrin and promotes angiogenesis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 347(1): 248-253.

[9] Kostidou E, Topouridou K, Daniilidis A, *et al*. Oxidized laminin-1 induces increased monocyte attachment and expression of ICAM-1 in endothelial cells[J]. Int J Exp Pathol, 2009, 90(6): 630-637.

[10] Flynn R S, Murthy K S, Grider J R, *et al*. Endogenous IGF-I and alphaVbeta3 integrin ligands regulate increased smooth muscle hyperplasia in stricturing Crohn's disease[J]. Gastroenterology, 2010, 138(1): 285-293.

[11] Nam J O, Kim J E, Jeong H W, *et al*. Identification of the alphavbeta3 integrin-interacting motif of betaig-h3 and its anti-angiogenic effect[J]. J Biol Chem, 2003, 278(28): 25902-25909.

[12] Cai K, Dong H, Chen C, *et al*. Inkjet printing of laminin gradient to investigate endothelial cellular alignment[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2009, 72(2): 230-235.

（收稿 2010-09-19 修回 2010-10-12）

（编辑 汪勤俭）

《第三军医大学学报》荣获第五届全军医学期刊奖

据总后卫生部卫科训[2010]130号文件通知，我刊荣获第五届全军医学期刊奖，为直接授予优秀期刊奖的七种期刊之一。本刊编辑部主任冷怀明、编辑栾嘉被评为第三届全军优秀医学编辑工作者。

本刊编辑部