

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.01172

· 论 著 ·

鸟苷酸交换因子 C3G 对心肌细胞生存力的影响及其可能机制

张 旭, 李 刚*

重庆医科大学附属第一医院老年科心血管病组, 重庆 400016

[摘要] **目的** 探讨过表达鸟苷酸交换因子 C3G (Crk SH3-domain-binding guanine-nucleotide-releasing factor) 对心肌细胞生存力的影响及其机制。**方法** 分别用 pCXN2-Flag、pCXN2-Flag-hC3G (过表达人 C3G mRNA) 质粒瞬时转染 H9C2 心肌细胞, 并进行缺氧/复氧 (H/R) 干预。实验分为空白组、空质粒组、C3G 过表达组、空白+H/R 组、空质粒+H/R 组、C3G 过表达+H/R 组。用 RT-PCR 法检测心肌细胞 C3G mRNA 的表达, 蛋白质印迹分析法检测心肌细胞 C3G、p-ERK1/2 蛋白的表达, MTT 法检测细胞的增殖率, 流式细胞术检测细胞的凋亡率。**结果** C3G 过表达组较空白组和空质粒组, C3G 过表达+H/R 组较空白+H/R 组和空质粒+H/R 组人 C3G mRNA、C3G 蛋白、p-ERK1 蛋白、细胞增殖率均增加 (P 均 < 0.01), 凋亡率均降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); C3G 过表达+H/R 组较空白+H/R 组、空质粒+H/R 组 p-ERK2 蛋白增加 ($P < 0.01$)。**结论** 过表达 C3G 能促进心肌细胞的生存力, 该过程可能是由 p-ERK1/2 蛋白表达增加和心肌细胞凋亡降低介导的。

[关键词] 鸟嘌呤核苷酸交换因子类; C3G; 心脏肌细胞; 细胞存活

[中图分类号] R 541.4

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2012)11-1172-06

Effect of guanine nucleotide exchange factor C3G overexpression on survival of cardiomyocytes and its underlying mechanisms

ZHANG Xu, LI Gang*

Division of Cardiology, Department of Geriatrics, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of the guanine nucleotide exchange factor C3G (Crk SH3-domain-binding guanine-nucleotide-releasing factor) overexpression on the survival of cardiomyocytes and the underlying mechanisms. **Methods** H9C2 cardiomyocytes were transiently transfected with pCXN2-Flag or pCXN2-Flag-hC3G (overexpressing human C3G mRNA) plasmids, and then were exposed to hypoxia/reoxygenation (H/R) treatment. The cardiomyocytes were divided into blank group, empty plasmid group, C3G overexpression group, blank+H/R group, empty plasmid+H/R group, and C3G overexpression+H/R group. The expression of C3G mRNA was detected by RT-PCR, and the expression of C3G and p-ERK1/2 protein was detected by Western blotting analysis. The apoptosis rates of cardiomyocytes were analyzed by flow cytometry in each group, and the cell proliferation rates were analyzed by MTT. **Results** C3G overexpression increased cell proliferation rate and expression of C3G mRNA and protein, p-ERK1 protein (all $P < 0.01$), and decreased apoptosis rate ($P < 0.05$, $P < 0.01$) compared to the blank and empty plasmid groups; the same was true for C3G overexpression+H/R group when compared to the blank+H/R and empty plasmid+H/R groups. Expression of p-ERK2 protein in C3G overexpression+H/R group was increased compared to blank+H/R and empty plasmid+H/R groups ($P < 0.01$). **Conclusion** C3G overexpression can promote cell survival in the cardiomyocytes, which might be mediated by the increase of p-ERK1/2 protein expression and apoptosis inhibition.

[Key words] guanine nucleotide exchange factors; C3G; cardiac myocytes; cell survival

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(11):1172-1177]

[收稿日期] 2012-08-06

[接受日期] 2012-10-25

[基金项目] 重庆市卫生局医学科学技术研究项目(2009-2-290, 04-2-154), 重庆市科委自然科学基金(CSTC2007BB5276). Supported by the Medical Science & Technology Research Project of Chongqing Health Bureau(2009-2-290, 04-2-154) and the Natural Science Foundation of Chongqing Science & Technology Commission(CSTC2007BB5276).

[作者简介] 张 旭, 硕士. E-mail: xuzhangcqmu@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 023-89011640, E-mail: ganglicqmu@126.com

心肌细胞生存力降低和凋亡增加是许多心血管疾病发病的重要机制之一^[1-2],近年来的研究显示整合素通路的 $\beta 1$ 亚基、整合素连接激酶 (ILK) 和焦点黏附激酶 (FAK) 等组分可抑制心肌细胞的凋亡、促进其存活^[3-5]。鸟苷酸交换因子 C3G (Crk SH3-domain-binding guanine-nucleotide-releasing factor) 是整合素通路的组分之一^[6-7],我们前期研究发现 C3G 蛋白在梗死灶周围非梗死区心肌细胞中的表达显著增加^[8],提示 C3G 蛋白与梗死灶周围非梗死区心肌细胞生存力降低和凋亡增加相关,但其机制仍不清楚。人 C3G mRNA 与大鼠 C3G mRNA 序列相似度达 99%,而人 C3G 蛋白与大鼠 C3G 蛋白氨基酸序列完全相同,为便于转化为临床应用,本研究通过转染外源性人 C3G mRNA 使人 C3G 蛋白在大鼠 H9C2 心肌细胞中过表达,并进行缺氧/复氧 (H/R) 干预,探讨过表达 C3G 对 H9C2 心肌细胞的生存、增殖、凋亡、细胞骨架及 p-ERK1/2 蛋白表达的影响,以期对心血管疾病发病机制的阐明及其防治寻找新的思路。

1 材料和方法

1.1 实验材料 大鼠 H9C2 心肌细胞株购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心 (源自 ATCC 细胞库)。pCXN2-Flag (空质粒)、重组真核质粒 pCXN2-Flag-hC3G (人 C3G 过表达质粒) 均由重庆医科大学附属第一医院妇产科令狐华教授惠赠。DMEM 高糖培养液购自 Gibco 公司,胎牛血清购自 Hyclone 公司,无内毒素质粒小量抽提试剂盒为 Omega Bio-Tek 公司产品, RNA 提取、反转录及 cDNA 扩增试剂盒购自 TaKaRa 公司,转染试剂脂质体 LTX 和 Plus 为 Invitrogen 公司产品。小鼠抗大鼠 β -actin 抗体 (sc-47778)、兔抗大鼠及人 C3G 抗体 (sc-15359) 购自 Santa Cruz 公司,兔抗大鼠 p-ERK1/2 抗体 (4370) 购自 Cell Signaling 公司。细胞凋亡检测试剂盒 (Annexin V-FITC/PI) 购自江苏碧云天生物研究所,四甲基偶氮唑盐 (MTT)、鬼笔环肽、碘化丙啶 (PI) 为 Sigma 公司产品。

1.2 H9C2 心肌细胞培养、质粒转染及 H/R 干预 将处于对数生长期的 5×10^5 个 H9C2 心肌细胞分别接种于 6 个直径 10 cm 的培养皿中 (条件为 37°C、95% 空气、5% CO₂),在细胞密度约达 60% 时置换为无血清的 DMEM 培养液,分别用空白试剂、空质粒、人 C3G 过表达质粒瞬时转染 H9C2 心肌细

胞,将细胞分为 3 组:空白组、空质粒组、C3G 过表达组。每组备 2 份,培养 9 h 后,重新消化细胞,细胞计数,从上述 6 个培养皿中分别取相同细胞,分别接种于 6 个平板中 (RT-PCR 检测、蛋白质印迹分析用培养皿; MTT 检测用 96 孔平板;流式细胞计数用 6 孔板;细胞骨架检测用 24 孔平板),培养液置换为含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,培养 15 h (转染后 24 h)。从上述 3 组中随机各取一份细胞,将细胞培养液置换为新鲜含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,在正常培养条件下培养 48 h (转染后 72 h);同时,3 组剩余的另一份细胞将培养液置换为生理盐水,置于低氧孵箱 (条件为 37°C、1% 空气、94% N₂、5% CO₂) 缺氧 3 h 后,重新置换回含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液 (即为复氧),在正常培养条件下继续培养 45 h (转染后 72 h)。此时将细胞分为空白组、空质粒组、C3G 过表达组、空白 + H/R 组、空质粒 + H/R 组、C3G 过表达 + H/R 组。

1.3 RT-PCR 检测心肌细胞 C3G mRNA 的表达 分别提取各组的总 RNA,然后反转录为 cDNA,再进行 PCR 扩增。引物序列:大鼠 β -actin 上游 5'-AGA TGA CCC AGA TCA TGT TTG A-3',下游 5'-TTG GCA TAG AGG TCT TTA-3';大鼠 C3G 上游 5'-CAG GAT GGA CAG CAG ACA GA-3',下游 5'-CTG CGG TGT CTG GTA GAA CA-3';人 C3G 上游 5'-CCA GGT CTC AAA GGC AGA AG-3',下游 5'-CTT CTG AGT TCA CGC CTT CC-3'。PCR 扩增反应条件:94°C 预变性 3 min,94°C 变性 30 s,退火 (温度分别为大鼠 β -actin 55°C、大鼠 C3G 58°C、人 C3G 60°C) 30 s,72°C 延伸 30 s,共进行 35 个循环。分别取等量各组的上述不同基因的 PCR 产物加入同一电泳通道,电泳成像后进行光密度值定量分析,以大鼠 C3G mRNA 光密度值/大鼠 β -actin 光密度值表示大鼠 C3G mRNA 的相对表达量,人 C3G mRNA 光密度值/大鼠 β -actin 光密度值表示人 C3G mRNA 的相对表达量。

1.4 蛋白质印迹分析检测心肌细胞 C3G 及 p-ERK1/2 蛋白表达 分别提取各组的细胞总蛋白,用 BCA 法测定蛋白浓度。用 10% SDS 聚丙烯酰胺分离凝胶,上样 20 μ g 蛋白,电泳分离后电转至 PVDF 膜上。4% 牛奶 37°C 封闭 2 h 后,加一抗孵育过夜,洗膜,孵育二抗,然后洗膜,用 ECL 发光试剂盒显影成像,进行光密度值定量分析。以 C3G 光密度值/ β -actin 光密度值表示 C3G 蛋白的相对表达

量, p-ERK1 光密度值/ β -actin 光密度值表示 p-ERK1 蛋白的相对表达量, p-ERK2 光密度值/ β -actin 光密度值表示 p-ERK2 蛋白的相对表达量。

1.5 MTT 法检测心肌细胞的增殖率 分别检测各组转染后 24、72 h 的 H9C2 心肌细胞的光密度值,在相应的时间点取细胞加 MTT 液 20 μ l (5 mg/ml), 4 h 后弃液体,加 200 μ l DMSO,37 $^{\circ}$ C 摇床培养 30 min 后,用酶标仪 (570 nm 波长)测定光密度值。细胞增殖率(%)=(72 h 光密度值-24 h 光密度值)/24 h 光密度值 \times 100%。

1.6 流式细胞术检测心肌细胞凋亡率 分别检测各组转染后 72 h 的 H9C2 心肌细胞凋亡率。收集细胞,将其悬浮后加入 Annexin V-FITC/PI 进行双标记流式细胞术检测细胞凋亡。Annexin V-FITC 标记凋亡与坏死的细胞,PI 标记坏死的细胞,Annexin V-FITC 染色阳性、PI 染色阴性的细胞为凋亡细胞。细胞凋亡率(%)=凋亡细胞数/总细胞数 \times 100%。

1.7 激光扫描共聚焦显微镜观察细胞骨架 分别检测各组转染后 72 h 的 H9C2 心肌细胞骨架。用鬼

笔环肽染色肌动蛋白细胞骨架后,用 PI 复染细胞核,在激光扫描共聚焦显微镜下观察。

1.8 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA),两组间比较采用 Tukey 检验,检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 H9C2 心肌细胞 C3G mRNA 的表达 RT-PCR 检测结果显示,空白组、空质粒组的鼠 C3G mRNA 出现明显表达,而人 C3G mRNA 不表达; C3G 过表达组的鼠 C3G mRNA 的表达量与空白组和空质粒组比较差异无统计学意义,而人 C3G mRNA 出现表达($P < 0.01$)。H/R 干预后,空白+H/R 组、空质粒+H/R 组与未干预组相比,大鼠 C3G mRNA 表达降低($P < 0.01$);C3G 过表达+H/R 组的鼠 C3G mRNA 和人 C3G mRNA 与未干预组比较均降低($P < 0.01$,图 1)。

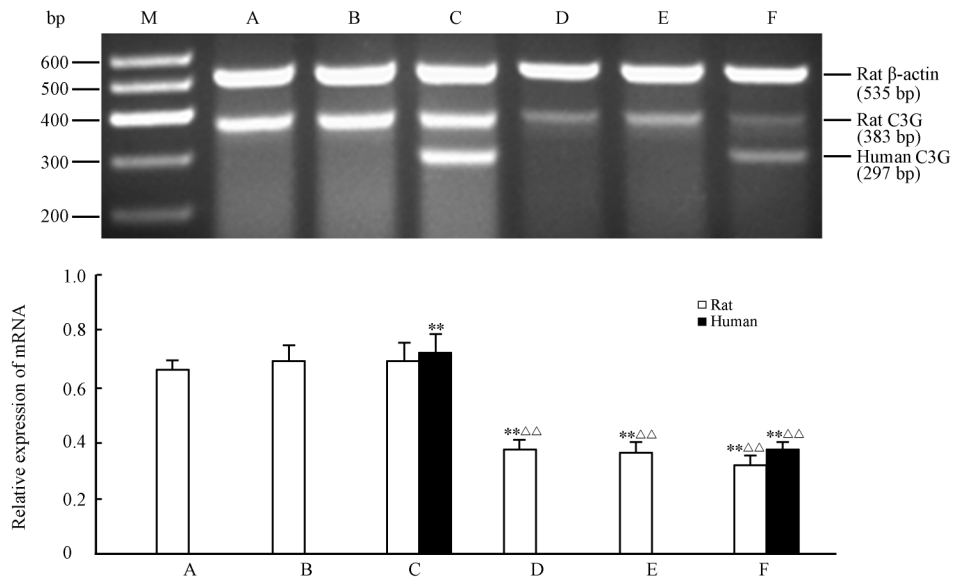


图 1 H9C2 心肌细胞 C3G mRNA 的表达

Fig 1 Expression of C3G mRNA in H9C2 cardiomyocytes

A: Blank group; B: Empty plasmid group; C: C3G overexpression group; D: Blank+H/R group; E: Empty plasmid+H/R group; F: C3G overexpression+H/R group. M: Marker; H/R: Hypoxia/reoxygenation. There was no human C3G mRNA expression in group A, B, D, or E. ** $P < 0.01$ vs group A and B; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs group C. $n = 7, \bar{x} \pm s$

2.2 H9C2 心肌细胞 C3G、p-ERK1/2 蛋白的表达 蛋白质印迹分析结果显示,与空白组和空质粒组比较,C3G 过表达组 C3G、p-ERK1 蛋白表达增加($P < 0.01$)。H/R 干预后,空白+H/R 组、空质粒+

H/R 组与未干预组相比, C3G、p-ERK1、p-ERK2 蛋白表达下降($P < 0.01$);与空白+H/R 组、空质粒+H/R 组比较, C3G 过表达+H/R 组 C3G、p-ERK1、p-ERK2 蛋白表达均增加($P < 0.01$,图 2)。

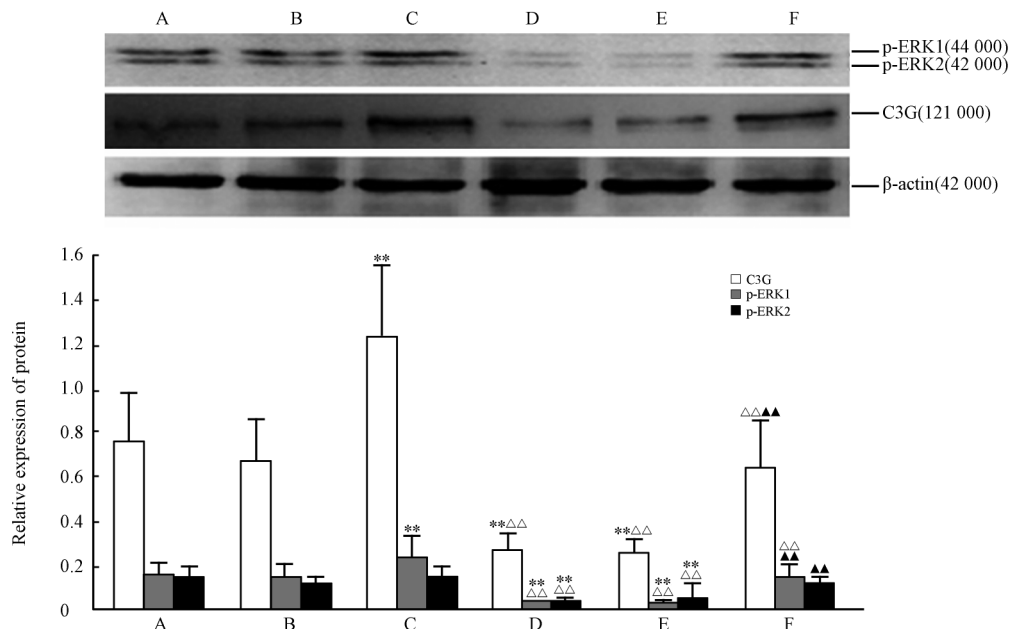


图 2 H9C2 心肌细胞 C3G、p-ERK1/2 蛋白表达

Fig 2 Expression of C3G and p-ERK1/2 protein in H9C2 cardiomyocytes

A: Blank group; B: Empty plasmid group; C: C3G overexpression group; D: Blank+H/R group; E: Empty plasmid+H/R group; F: C3G overexpression+H/R group. H/R: Hypoxia/reoxygenation. ** $P < 0.01$ vs group A and B; △△ $P < 0.01$ vs group C; ▲▲ $P < 0.01$ vs group D and E. $n = 7$, $\bar{x} \pm s$

2.3 H9C2 心肌细胞增殖率 MTT 法检测结果显示,与空白组、空质粒组比较,C3G 过表达组细胞增殖率增高;H/R 干预后,空白+H/R 组、空质粒+H/R 组与未干预组比较,细胞增殖率下降 ($P < 0.01$);与空白+H/R 组、空质粒+H/R 组比较,C3G 过表达+H/R 组细胞增殖率增高 ($P < 0.01$, 图 3)。

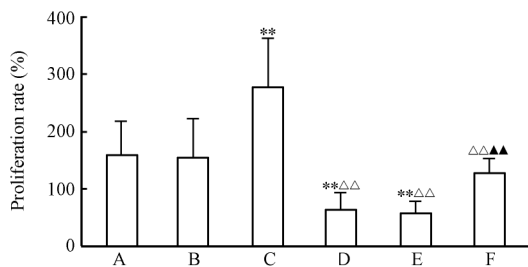


图 3 H9C2 心肌细胞的增殖率

Fig 3 Proliferation rates of H9C2 cardiomyocytes in each group

A: Blank group; B: Empty plasmid group; C: C3G overexpression group; D: Blank+H/R group; E: Empty plasmid+H/R group; F: C3G overexpression+H/R group. H/R: Hypoxia/reoxygenation. ** $P < 0.01$ vs group A and B; △△ $P < 0.01$ vs group C; ▲▲ $P < 0.01$ vs group D and E. $n = 15$, $\bar{x} \pm s$

2.4 H9C2 心肌细胞凋亡率 流式细胞术检测结

果显示,与空白组、空质粒组比较,C3G 过表达组细胞凋亡率降低 ($P < 0.05$)。H/R 干预后,空白+H/R 组、空质粒+H/R 组与未干预组比较,细胞凋亡率升高 ($P < 0.01$);与空白+H/R 组、空质粒+H/R 组比较,C3G 过表达+H/R 组细胞凋亡率降低 ($P < 0.01$, 图 4)。

2.5 H9C2 心肌细胞骨架 激光扫描共聚焦显微镜观察结果显示, C3G 过表达组(图 5C)细胞骨架较空白组(图 5A)和空质粒组(图 5B)肌丝排列整齐、密集;H/R 可导致细胞骨架肌丝排列紊乱、稀疏,细胞萎缩,H/R 干预后,与空白+H/R 组(图 5D)、空质粒+H/R 组(图 5E)相比,C3G 过表达+H/R 组细胞骨架肌丝排列较整齐、密集(图 5F)。

3 讨论

研究提示整合素信号通路组分,如整合素 $\beta 1$ 、 $\beta 3$ 亚基及其下游的 FAK、ILK 具有促进心肌细胞存活,抑制其凋亡的作用^[9-11]。完全敲除整合素 $\beta 1$ 亚基^[12]和 FAK^[5]可增加心肌细胞凋亡、降低其存活,加速心肌梗死后病理性心脏重塑,使心脏功能恶化;过表达 ILK 可抑制心肌细胞凋亡、促进其增殖与存活,阻止心肌梗死后病理性心脏重塑、改善心肌细胞功能^[13];且研究表明整合素信号通路抑制心肌细胞凋亡、促进其存活的机制与其激活 ERK 等促细胞存

活信号分子有关^[14]。整合素通路组分 C3G 是 Rap1/Raf 的上游信号分子^[13],而心肌细胞中存在 Rap1/Raf-ERK 信号途径^[15-16],由此我们可以推测,

C3G 通过作用于 Rap1/Raf-ERK 信号通路也具有抑制心肌细胞凋亡、促进心肌细胞存活的作用。

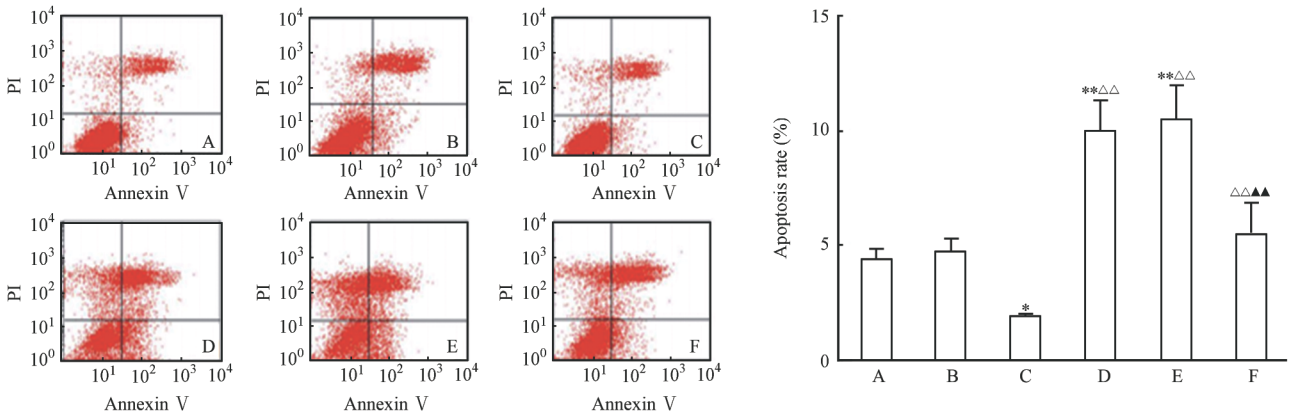


图 4 H9C2 心肌细胞的凋亡率

Fig 4 Apoptosis rates of H9C2 cardiomyocytes in each group

A: Blank group; B: Empty plasmid group; C: C3G overexpression group; D: Blank+H/R group; E: Empty plasmid+H/R group; F: C3G overexpression+H/R group. H/R: Hypoxia/reoxygenation. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs group A and B; $\triangle\triangle P < 0.01$ vs group C; $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ vs group D and E. $n=7, \bar{x} \pm s$

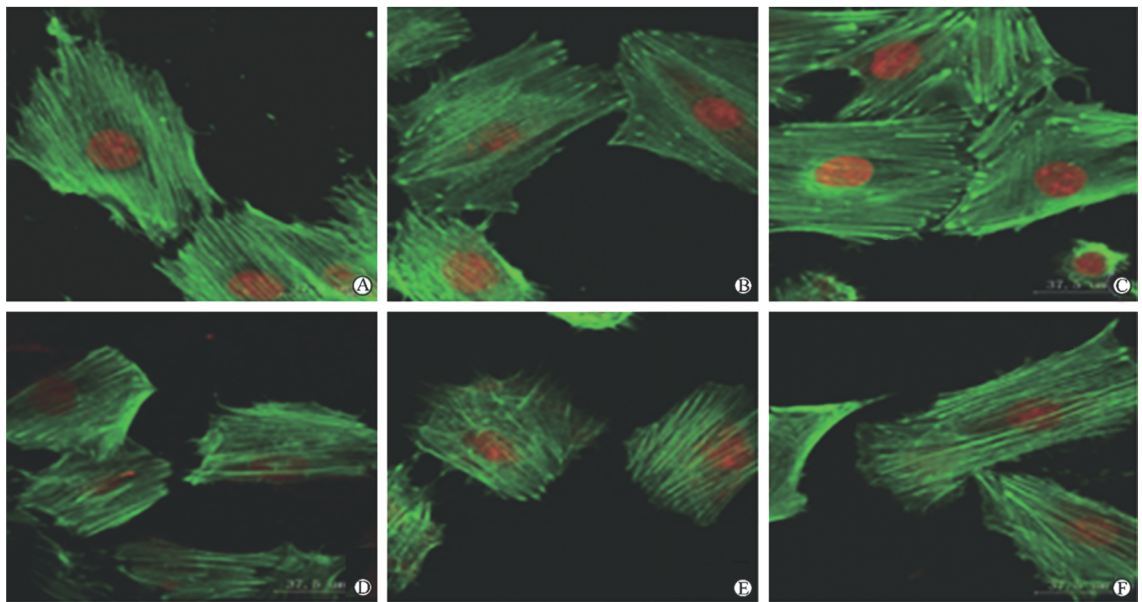


图 5 H9C2 心肌细胞骨架

Fig 5 Cytoskeleton of H9C2 cardiomyocytes in each group

A: Blank group; B: Empty plasmid group; C: C3G overexpression group; D: Blank + H/R group; E: Empty plasmid + H/R group; F: C3G overexpression+H/R group. Compared with blank(A) and empty plasmid group(B), the F-actin cytoskeleton was thicker, longer, and more orderly in the C3G overexpression group(C). F-actin fiber cytoskeleton was shorter, disorderly and sparsely rearranged, and the cells were atrophied in the H/R-induced H9C2 cardiomyocytes(D,E,F). H/R: Hypoxia/reoxygenation. Original magnification: $\times 800$

本研究结果显示过表达 C3G 具有促 H9C2 心肌细胞增殖、抗心肌细胞凋亡作用,并且能够逆转 H/R 诱导的 H9C2 心肌细胞增殖率降低、凋亡增加;过表达 C3G 可对抗 H/R 诱导的 H9C2 心肌细

胞的皱缩、骨架蛋白 F-actin 减少、骨架破坏。本研究还发现,过表达 C3G 组 p-ERK1 蛋白表达增加,且在 H/R 诱导损伤时,C3G 过表达组 p-ERK1、p-ERK2 表达均增加,表明过表达 C3G 促进了

p-ERK1/2 的表达, 提示过表达 C3G 可能是通过 ERK1/2 抑制 H/R 诱导的心肌细胞凋亡、稳定细胞骨架, 从而发挥促进 H9C2 心肌细胞存活的作用。

总之, 本研究结果证实, 过表达 C3G 可使 H9C2 心肌细胞 p-ERK1/2 蛋白表达、增殖率及生存力增加, 凋亡率降低, 且过表达 C3G 可抑制 H/R 诱导的 H9C2 心肌细胞 ERK1/2 蛋白表达、增殖率及生存力的降低和凋亡率增加。C3G 可促进心肌细胞存活, 其机制可能与 C3G 增加心肌细胞 p-ERK1/2 的蛋白表达、降低凋亡有关。C3G 有望发展成为治疗心血管疾病的潜在重要靶点。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Morissette M R, Rosenzweig A. Targeting survival signaling in heart failure[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2005, 5: 165-170.
- [2] Dorn G W 2nd. Apoptotic and non-apoptotic programmed cardiomyocyte death in ventricular remodelling [J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 81: 465-473.
- [3] Menon B, Singh M, Ross R S, Johnson J N, Singh K. beta-Adrenergic receptor-stimulated apoptosis in adult cardiac myocytes involves MMP-2-mediated disruption of beta1 integrin signaling and mitochondrial pathway [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006, 290: C254-C261.
- [4] Chen H, Huang X N, Yan W, Chen K, Guo L, Tummalapali L, et al. Role of the integrin-linked kinase/PINCH1/alpha-parvin complex in cardiac myocyte hypertrophy [J]. *Lab Invest*, 2005, 85: 1342-1356.
- [5] Hakim Z S, DiMichele L A, Rojas M, Meredith D, Mack C P, Taylor J M. FAK regulates cardiomyocyte survival following ischemia/reperfusion [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2009, 46: 241-248.
- [6] Lal H, Verma S K, Foster D M, Golden H B, Reneau J C, Watson L E, et al. Integrins and proximal signaling mechanisms in cardiovascular disease [J]. *Front Biosci*, 2009, 14: 2307-2334.
- [7] Radha V, Mitra A, Dayma K, Sasikumar K. Signalling to actin: role of C3G, a multitasking guanine-nucleotide-exchange factor [J]. *Biosci Rep*, 2011, 31: 231-244.
- [8] 牟 杨, 李 刚, 张灿晶, 王志华. 大鼠非梗死区心肌 C3G 蛋白的表达及苯肾上腺素对其的干预 [J]. *中国循环杂志*, 2010(5): 391-394.
- [9] Harston R K, Kuppaswamy D. Integrins are the necessary links to hypertrophic growth in cardiomyocytes [J]. *J Signal Transduct*, 2011, 2011: 521742.
- [10] Johnston R K, Balasubramanian S, Kasiganesan H, Baicu C F, Zile M R, Kuppaswamy D. Beta3 integrin-mediated ubiquitination activates survival signaling during myocardial hypertrophy [J]. *FASEB J*, 2009, 23: 2759-2771.
- [11] Communal C, Singh M, Menon B, Xie Z, Colucci W S, Singh K. beta1 Integrins expression in adult rat ventricular myocytes and its role in the regulation of beta-adrenergic receptor-stimulated apoptosis [J]. *J Cell Biochem*, 2003, 89: 381-388.
- [12] Krishnamurthy P, Subramanian V, Singh M, Singh K. Deficiency of beta1 integrins results in increased myocardial dysfunction after myocardial infarction [J]. *Heart*, 2006, 92: 1309-1315.
- [13] Ding L, Dong L, Chen X, Zhang L, Xu X, Ferro A, et al. Increased expression of integrin-linked kinase attenuates left ventricular remodeling and improves cardiac function after myocardial infarction [J]. *Circulation*, 2009, 120: 764-773.
- [14] Häuselmann S P, Rosc-Schlüter B I, Lorenz V, Plaisance I, Brink M, Pfister O, et al. beta1-Integrin is up-regulated via Rac1-dependent reactive oxygen species as part of the hypertrophic cardiomyocyte response [J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 51: 609-618.
- [15] Kwak H J, Park K M, Choi H E, Chung K S, Lim H J, Park H Y. PDE4 inhibitor, roflumilast protects cardiomyocytes against NO-induced apoptosis via activation of PKA and Epac dual pathways [J]. *Cell Signal*, 2008, 20: 803-814.
- [16] Wang Z, Dillon T J, Pokala V, Mishra S, Labudda K, Hunter B, et al. Rap1-mediated activation of extracellular signal-regulated kinases by cyclic AMP is dependent on the mode of Rap1 activation [J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26: 2130-2145.

[本文编辑] 商素芳