

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.01272

• 短篇论著 •

## 沉默 CrkL 对缺氧/复氧诱导的心肌细胞凋亡和生存力的影响及其机制

张志升, 杨东艳, 张蕾, 李刚\*, 扶艳波

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** 探讨沉默 CrkL 对缺氧/复氧诱导的心肌细胞凋亡和生存力的影响及其机制。**方法** 分别用空白试剂、阴性慢病毒和 CrkL RNAi 慢病毒(沉默 CrkL mRNA)感染 H9C2 心肌细胞, 并进行缺氧/复氧(H/R)干预。实验分为空白组、阴性病毒组、CrkL 沉默组、空白+H/R 组、阴性病毒+H/R 组、CrkL 沉默+H/R 组。用 RT-PCR 法检测心肌细胞 CrkL mRNA 的表达, 蛋白印迹分析法检测心肌细胞 CrkL 蛋白、p-ERK1/2 蛋白表达, 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** CrkL 沉默组较空白组和阴性病毒组, CrkL 沉默+H/R 组较空白+H/R 组和阴性病毒+H/R 组 CrkL mRNA、CrkL 蛋白、p-ERK1/2 蛋白、细胞增殖率均降低( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 细胞凋亡率均增加( $P < 0.01$ )。**结论** 沉默 CrkL 能加重缺氧/复氧诱导的心肌细胞凋亡和生存力降低。该过程可能是由 p-ERK1/2 蛋白表达降低介导的。

**[关键词]** CrkL; 心肌细胞; 细胞凋亡; 细胞存活; 缺氧/复氧

**[中图分类号]** R 541.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2014)11-1272-05

### Effect of CrkL silence on hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis and survival inhibition in cardiomyocytes and the underlying mechanisms

ZHANG Zhi-sheng, YANG Dong-yan, ZHANG Lei, LI Gang\*, FU Yan-bo

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

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of CrkL silence on hypoxia/reoxygenation (H/R)-induced apoptosis and survival inhibition in cardiomyocytes and the underlying mechanisms. **Methods** H9C2 cardiomyocytes were infected with blank, negative lentivirus and CrkL RNAi lentivirus (CrkL mRNA silence), and then treated with H/R separately. The cardiomyocytes were divided into blank group, negative lentivirus group, CrkL silence group, blank + H/R group, negative lentivirus + H/R group and CrkL silence + H/R group. The expression of CrkL mRNA was detected by RT-PCR, and the expression of CrkL and p-ERK1/2 protein was detected by Western blotting analysis. The apoptosis rate of cardiomyocytes was analyzed by flow cytometry, and the cell proliferation rate was analyzed by MTT. **Results** Compared with blank and negative lentivirus groups, CrkL silence group had significantly decreased CrkL mRNA and protein, p-ERK1 protein, p-ERK1/2 protein and proliferation rate( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), and significantly increased apoptosis rate( $P < 0.01$ ). The same was true for CrkL silence + H/R group when compared with the blank + H/R and negative lentivirus + H/R groups. **Conclusion** CrkL silence can aggravate H/R-induced apoptosis and survival inhibition in cardiomyocytes, which might be mediated by the decrease of p-ERK1/2 protein expression.

**[Key words]** CrkL; cardiac myocytes; apoptosis; cell survival; hypoxia/reoxygenation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(11):1272-1276]

心肌细胞凋亡增加和生存力降低是缺血(缺氧)/再灌注(复氧)诱导的心肌损伤、梗死后病理性心肌重塑、心力衰竭等疾病的重要发病机制<sup>[1-3]</sup>。研

究表明整合素(integrin)的功能对心脏正常发育和心肌与细胞外基质黏附、生长及其生存能力的调节是必要的<sup>[4-5]</sup>。近年来的研究显示,整合素通路的β1

**[收稿日期]** 2014-02-18 **[接受日期]** 2014-07-26

**[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计划资助项目(CSTC 2007BB5276). 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]** 张志升, 硕士生. E-mail: wsheng727905660@163.com

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

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凋亡、促进其存活, 阻滞缺血(缺氧)/再灌注(复氧)诱导的心肌损伤、梗死后病理性心肌重塑、心力衰竭等疾病的发生发展<sup>[6-8]</sup>。接头蛋白 CrkL 亦是整合素通路的组分之一<sup>[9]</sup>, 我们的前期研究发现 CrkL 蛋白在梗死灶周围非梗死区心肌细胞中存在表达<sup>[10]</sup>, 但 CrkL 蛋白是否具有抗心肌细胞凋亡、促心肌细胞生存等作用及其机制, 目前仍不完全清楚。本研究通过慢病毒介导的 RNA 干扰技术下调 CrkL 蛋白的表达水平并进行缺氧/复氧(H/R)干预, 探讨沉默 CrkL 对缺氧/复氧诱导的 H9C2 心肌细胞凋亡、生存力的影响, 以及 p-ERK1/2 蛋白表达的影响, 以期对缺血/再灌注诱导的心肌损伤、梗死后病理性心肌重塑、心力衰竭等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(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)。阴性慢病毒和 CrkL RNAi 慢病毒(沉默 CrkL mRNA)均由上海吉凯公司合成, CrkL RNAi 慢病毒作用有效的 H9C2 心肌细胞 mRNA 的靶序列为 5'-GGTTTGATTCTTCAGACCGTT-3'。DMEM F-12 培养基、胎牛血清均购自 Gibco 公司。RNA 提取、反转录以及 cDNA 扩增试剂盒均购自 TaKaRa 公司, 小鼠抗大鼠  $\beta$ -actin 抗体 (sc-47778) 购自美国 Santa Cruz 公司, 小鼠抗大鼠 CrkL 抗体 (3182) 及兔抗大鼠 p-ERK1/2 抗体 (4370) 均购自 Cell Signaling 公司。四甲基氮唑盐 (MTT) 为 Sigma 公司产品, 流式细胞技术实验所使用的流式检测试剂盒 (Annexin-PE、7-AAD) 购自碧云天生物技术研究所。

1.2 H9C2 心肌细胞培养、慢病毒感染及 H/R 干预 将  $5 \times 10^5$  H9C2 心肌细胞分别接种于 6 个直径为 10 cm 培养皿中, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM F-12 培养基正常培养(条件为 37℃, 95% 空气, 5% CO<sub>2</sub>), 在细胞密度达到 50% 左右时更换新鲜的培养基, 分别用空白试剂、阴性病毒、CrkL 沉默病毒感染细胞, 将细胞分为空白组、阴性病毒组、CrkL 沉默组 3 组, 每组备两份, 12 h 后更换为新鲜的培养基, 再培养 12 h(感染后 24 h)。荧光显微镜下显示阴性病

毒组和 CrkL 沉默组细胞的感染率均达 90% 以上。重新消化细胞, 细胞计数, 取相同数量细胞, 分别接种于 6 个培养皿(RT-PCR 和蛋白印迹检测时)或多孔板中(MTT 检测时用 96 孔板; 流式细胞计数时用 6 孔板)。从上述 3 组中随机各取一份细胞, 将细胞培养基置换为新鲜的培养基, 在正常条件下再培养 48 h(感染后 72 h); 同时, 另一份的 3 组细胞将培养基置换为生理盐水, 置于缺氧孵箱(条件为 37℃, 1% 空气, 94% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) 缺氧 3 h 后, 重新置换回新鲜的培养基, 在正常条件下复氧继续培养 45 h(感染后 72h)。此时细胞分为空白组、阴性病毒组、CrkL 沉默组、空白 + H/R 组、阴性病毒 + H/R 组、CrkL 沉默 + H/R 组。然后, 收集细胞进行 RT-PCR、蛋白质印迹、MTT、流式细胞计数等实验<sup>[11]</sup>。

1.3 RT-PCR 检测 CrkL mRNA 提取各组的总 RNA, 分别逆转录为 cDNA, 进行 PCR 扩增。引物序列: 大鼠  $\beta$ -actin 上游 5'-AGATGACCCAGAT-CATGTTTGA-3', 下游 5'-TTGGCATAGAG-GTCTTTA-3'。大鼠 CrkL 上游 5'-CGCATAT-GCTCAACCTCAGA-3', 下游 5'-ATAT-GAAAGTCGGCCACCAG-3'。反转录反应条件为: 37℃ 15 min, 85℃ 5 s, 4℃ 5 min。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 30 s, 退火(温度分别为大鼠  $\beta$ -actin 55℃、大鼠 CrkL 58℃) 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共进行 30 个循环。分别等量取各组的上述不同基因 PCR 产物加入同一电泳通道, 电泳成像后进行光密度(D)值定量分析。大鼠 CrkL mRNA 光密度值/大鼠  $\beta$ -actin 光密度值表示大鼠 CrkL mRNA 的相对表达量<sup>[11]</sup>。

1.4 蛋白免疫印迹检测心肌细胞 CrkL 及 p-ERK1/2 蛋白表达 分别提取各组细胞总蛋白, 用 BCA 法测定蛋白浓度, 用 10% SDS 聚丙烯酰胺分离凝胶, 上样 50  $\mu$ g 蛋白, 电泳分离后电转至 PVDF 膜上。5% 牛奶封闭 2 h 后, 孵一抗, 过夜, 洗膜, 孵二抗, 然后洗膜, 再用 ECL 发光试剂盒显影成像, 进行光密度值定量分析。以 CrkL 光密度值/ $\beta$ -actin 光密度值表示心肌细胞 CrkL 蛋白的相对表达量, 以 p-ERK1 的光密度值/ $\beta$ -actin 光密度值表示 p-ERK1 蛋白的相对表达量, 用 p-ERK2 的光密度值/ $\beta$ -actin 光密度值表示 p-ERK2 蛋白的相对表达量<sup>[11]</sup>。

1.5 MTT法检测细胞增殖率 分别检测各组转染后24 h、72 h细胞的吸光度值,在上述时间点取细胞分别加MTT液20 μL (5 mg/mL),4 h后弃液体,加200 μL DMSO,37℃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 × 100%<sup>[11]</sup>。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡率 分别检测各组转染后72 h的凋亡率。重新消化细胞,终止,离心,用1 mL PBS重悬后加入Annexin-PE、7-AAD,用流式细胞仪检测细胞凋亡。Annexin-PE标记凋亡和坏死的细胞,7-AAD标记坏死的细胞,Annexin-PE染色阳性、7-AAD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 × 100%<sup>[11]</sup>。

1.7 统计学处理 应用SPSS17.0软件分析,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,检验水准( $\alpha$ )为0.05。

## 2 结果

2.1 心肌细胞CrkL mRNA的表达 RT-PCR结果显示(图1),较空白组和阴性病毒组,CrkL沉默组的CrkL mRNA表达明显降低( $P < 0.01$ ),而空白组和阴性病毒组之间CrkL mRNA的表达差异无统计学意义。经过H/R干预后,CrkL沉默+H/R组的CrkL mRNA的表达明显较空白+H/R组和阴性病毒+H/R组低( $P < 0.01$ ),而空白+H/R组和阴性病毒+H/R组之间差异无统计学意义。并且经H/R干预后,较未干预组(空白组、阴性病毒组、CrkL沉默组),各干预组(空白+H/R组、阴性病毒+H/R组、CrkL沉默+H/R组)的CrkL mRNA表达均明显降低( $P < 0.01$ )。

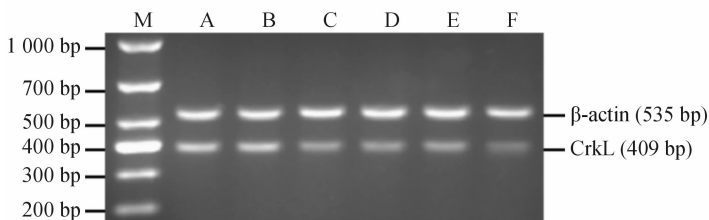
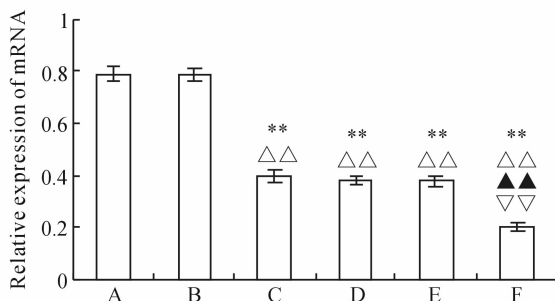


图1 H9C2心肌细胞CrkL mRNA表达

M: 标记物; A: 空白组; B: 阴性病毒组; C: CrkL沉默组; D: 空白+H/R组; E: 阴性病毒+H/R组; F: CrkL沉默+H/R组; H/R: 缺氧/复氧. \*\*  $P < 0.01$  与空白组比较;  $\triangle\triangle P < 0.01$  与阴性病毒组比较;  $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$  与CrkL沉默组比较;  $\nabla\nabla P < 0.01$  与空白+H/R组和阴性病毒+H/R组比较.  $n=7, \bar{x} \pm s$



2.2 心肌细胞CrkL及p-ERK1/2蛋白表达 图2可见,与空白组及阴性病毒组比较,CrkL沉默组CrkL、p-ERK1、p-ERK2蛋白表达明显降低( $P < 0.01$ );与空白+H/R组及阴性病毒+H/R组比较,CrkL沉默+H/R组CrkL、p-ERK1/2蛋白表达均明显降低( $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ );较未干预组(空白组、阴性病毒组、沉默病毒组),各干预组(空白+H/R组、阴性病毒+H/R组、CrkL沉默+H/R组)的CrkL( $P < 0.01$ )、p-ERK1/2蛋白表达均降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。

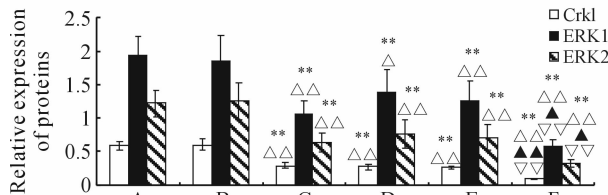
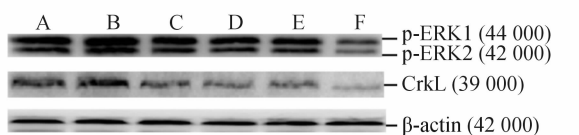


图2 H9C2心肌细胞CrkL、p-ERK1/2蛋白表达

A: 空白组; B: 阴性病毒组; C: CrkL沉默组; D: 空白+H/R组; E: 阴性病毒+H/R组; F: CrkL沉默+H/R组; H/R: 缺氧/复氧. \*\*  $P < 0.01$  与空白组比较;  $\triangle\triangle P < 0.01$  与阴性病毒组比较;  $\triangle P < 0.05$  与阴性病毒组比较;  $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$  与CrkL沉默组比较;  $\blacktriangle P < 0.05$  CrkL沉默组比较;  $\nabla\nabla P < 0.01$  与空白+H/R组和阴性病毒+H/R组比较.  $n=7, \bar{x} \pm s$

2.3 心肌细胞增殖率 图3可见,较空白组、阴性病毒组,CrkL沉默组的细胞增殖率明显降低( $P < 0.01$ );较空白+H/R组、阴性病毒+H/R组,CrkL沉默+H/R组的细胞增殖率明显降低( $P < 0.01$ )。

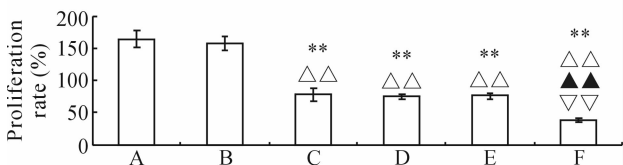


图 3 H9C2 心肌细胞的增殖率

A: 空白组; B: 阴性病毒组; C: CrkL 沉默组; D: 空白 + H/R 组; E: 阴性病毒 + H/R 组; F: CrkL 沉默 + H/R 组; H/R: 缺氧/复氧. \*\*  $P < 0.01$  与空白组比较;  $\triangle\triangle P < 0.01$  与阴性病毒组比较;  $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$  与 CrkL 沉默组比较;  $\nabla\nabla P < 0.01$  与空白 + H/R 组和阴性病毒 + H/R 组比较.  $n = 12$ ,  $\bar{x} \pm s$

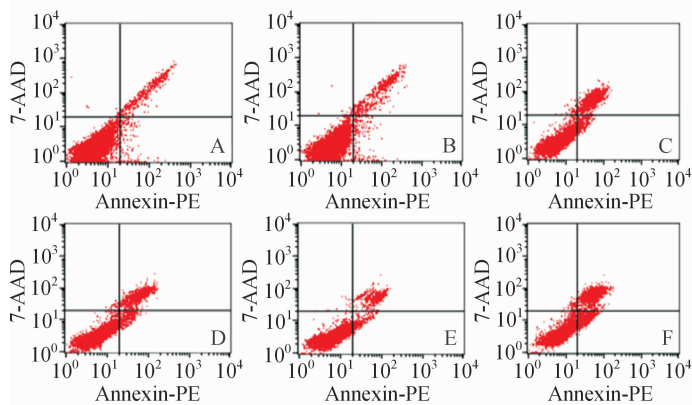


图 4 H9C2 心肌细胞的凋亡率

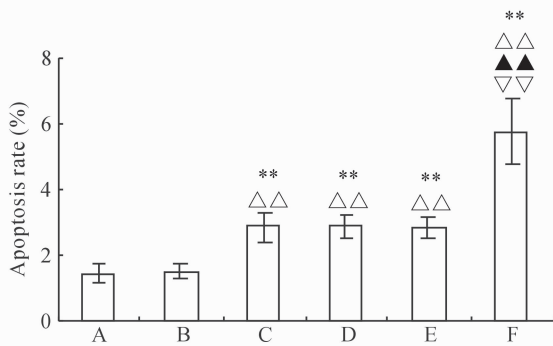
A: 空白组; B: 阴性病毒组; C: CrkL 沉默组; D: 空白 + H/R 组; E: 阴性病毒 + H/R 组; F: CrkL 沉默 + H/R 组; H/R: 缺氧/复氧. \*\*  $P < 0.01$  与空白组比较;  $\triangle\triangle P < 0.01$  与阴性病毒组比较;  $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$  与 CrkL 沉默组比较;  $\nabla\nabla P < 0.01$  与空白 + H/R 组和阴性病毒 + H/R 组比较.  $n = 7$ ,  $\bar{x} \pm s$

### 3 讨论

研究表明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 具有抗心肌细胞凋亡和生存力降低的作用, 可阻滞扩张性心肌病、梗死后缺血性心肌病和心力衰竭的进展<sup>[6-8, 12]</sup>。过表达 ILK、鸟苷酸交换因子 Dock180、C3G 可抗心肌细胞凋亡和生存力降低<sup>[11-13]</sup>, 且可抑制 H/R 诱导的心肌细胞凋亡增加和生存力降低<sup>[11, 13]</sup>, 从而可改善梗死后缺血性心肌病和心力衰竭<sup>[7]</sup>。且研究表明整合素信号通路抗心肌细胞凋亡和生存力降低的作用是通过其下游促生存信号分子如 ERK<sup>[11, 14-16]</sup>、PI3K/AKT/mTOR/p70S6K<sup>[13, 15-19]</sup> 而介导的。CrkL 是整合素信号通路中的一种接头蛋白, 其 SH2 结构域与上游的 Cas 等整合素组分交互作用, 其 SH3 结构域与下游的 Dock180、C3G、Sos 等鸟苷酸交换因子交互作用<sup>[20-21]</sup>。由此可以推测, CrkL 通过与上述整合素通路组分相互作用, 从而也具有抑制心肌细胞凋

较未干预组, 各干预组(空白 + H/R 组、阴性病毒 + H/R 组、CrkL 沉默 + H/R 组)的细胞增殖率均明显降低( $P < 0.01$ )。

2.4 心肌细胞凋亡率 图 4 可见, 较空白组、阴性病毒组, CrkL 沉默组的细胞凋亡率明显增加( $P < 0.01$ ); 较空白 + H/R 组、阴性病毒 + H/R 组, CrkL 沉默 + H/R 组的细胞凋亡率明显增加( $P < 0.01$ ); 较未干预组, 各干预组(空白 + H/R 组、阴性病毒 + H/R 组、CrkL 沉默 + H/R 组)的细胞凋亡率均明显增加( $P < 0.01$ )。



亡、促进心肌细胞存活的作用。

本研究结果显示, 沉默 CrkL 后 H9C2 心肌细胞生存力明显降低, 细胞凋亡率明显增加, 并且能够降低 H/R 诱导的 H9C2 心肌细胞增殖, 增加细胞凋亡率。本研究还发现, 沉默 CrkL 可使 p-ERK1/2 表达降低。本研究结果提示, 沉默 CrkL 可促进心肌细胞凋亡, 其机制可能与沉默 CrkL 导致的 p-ERK1/2 蛋白表达、心肌细胞增殖降低有关。CrkL 有望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] Wang L, Li G, Wang Z, Liu X, Zhao W. Elevated expression of C3G protein in the peri-infarct myocardium of rats[J]. Med Sci Monit Basic Res. 2013, 19: 1-5.
- [2] Liu X L, Li G, Wang Z H, Zhao W J, Wang L P. Increased expression of Dock180 protein in the nonin-

- farcted myocardium in rats[J]. *J Chin Med Assoc*, 2013,76:164-168.
- [3] 赵文菊,刘小兰,李刚,王志华,王丽平.大鼠非梗死区心肌 Sos1/2 蛋白表达的改变[J]. *临床心血管病杂志*, 2012, 28:865-867.
- [4] Shai S Y, Harpf A E, Ross R S. Integrins and the myocardium[J]. *Genet Eng (N Y)*, 2002,24:87-105.
- [5] Valencik M L, Keller R S, Loftus J C, McDonald J A. A lethal perinatal cardiac phenotype resulting from altered integrin function in cardiomyocytes[J]. *J Card Fail*, 2002,8:262-272.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] Sattler M, Salgia R, Shrikhande G, Verma S, Uemura N, Law S F, et al. Differential signaling after beta1 integrin ligation is mediated through binding of CRKL to p120(CBL) and p110(HEF1)[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272:14320-14326.
- [10] 朱雪锋,李刚,张灿晶. CrkL 在  $\beta$  受体过度激动促进心肌梗死后心室间质重塑中的作用[J]. *中国老年学杂志*, 2010, 30:1083-1085.
- [11] 张旭,李刚.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[J]. *第二军医大学学报*, 2012,33:1172-1177.
- Zhang X, Li G. Effect of guanine nucleotide exchange factor C3G overexpression on survival of cardiomyocytes and its underlying mechanisms[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2012,33:1083-1085.
- [12] Gu R, Bai J, Ling L, Ding L, Zhang N, Ye J X. Increased expression of integrin-linked kinase improves cardiac function and decreases mortality in dilated cardiomyopathy model of rats[J]. *PLoS One*, 2012, 7:e31279.
- [13] Yan A, Li G, Zhang X, Zhu B B, Linghu H. Pro-survival effect of Dock180 overexpression on rat-derived H9C2 cardiomyocytes[J]. *Med Sci Monit Basic Res*, 2013, 19:12-19.
- [14] Communal C, Singh M, Menon B, Xie Z, Colucci W S, Singh K.  $\beta$ 1 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.
- [15] Li R, Wu Y, Manso A M, Gu Y S, Liao P, Lsraili S, et al.  $\beta$ 1 integrin gene excision in the adult murine cardiac myocyte causes defective mechanical and signaling responses[J]. *Am J Pathol*, 2012,180:952-962.
- [16] Lu H, Fedak P W, Dai X, Du C, Zhou Y Q, Henkelman M, et al. Integrin-linked kinase expression is elevated in human cardiac hypertrophy and induces hypertrophy in transgenic mice[J]. *Circulation*, 2006,114:2271-2279.
- [17] White D E, Coutu P, Shi Y F, Tardif J C, Nattel S, St Arnaud R, et al. Targeted ablation of ILK from the murine heart results in dilated cardiomyopathy and spontaneous heart failure[J]. *Genes Dev*, 2006, 20:2355-2360.
- [18] Harston R K, Kuppuswamy D. Integrins are the necessary links to hypertrophic growth in cardiomyocytes [J]. *J Signal Transduct*, 2011:521742.
- [19] Balasubramanian S, Kuppuswamy D. RGD-containing peptides activate S6K1 through  $\beta$ 3 integrin in adult cardiac muscle cells[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278:42214-42224.
- [20] Feller S M. Crk family adaptors-signalling complex formation and biological roles[J]. *Oncogene*, 2001, 20:6348-6371.
- [21] Birge R B, Kalodimos C, Inagaki F, Tanaka S. Crk and CrkL adaptor proteins: networks for physiological and pathological signaling[J]. *Cell Commun Signal*, 2009, 7:13.