

文章编号:1004-7220(2010)05-0321-07

力-化学耦合作用在血管内皮细胞迁移中的作用及其力学生物学机制

黄先亮, 刘肖珩, 曾 焯, 赖 怡, 沈 阳, 毛 斌, 高 亭, 俞 焱
(四川大学华西基础医学与法医学院 生物医学工程研究室, 成都 610041)

摘要:目的 研究力学与化学因素的耦合在内皮细胞迁移过程中的作用以及其中的力学生物学机制。方法 在不同大小剪应力下分别用 RT-PCR、Western blot 以及免疫荧光的方法检测内皮细胞 CXCR1 和 CXCR2 的表达变化;用 anti-IL8RA 和 anti-IL8RB 拮抗 CXCR1 和 CXCR2,在剪应力作用下观察内皮细胞迁移情况;采用脂质体包绕法分别将 Rac1 及 RhoA 的野生型、活化型和抑制型 3 种质粒转染入内皮细胞,将转染了 Rac1 的 3 种质粒的细胞分别施加力学(剪应力)和化学(IL-8)刺激,对转染了 RhoA 的 3 种质粒的细胞施加化学刺激,检测以上条件下内皮细胞迁移情况。结果 CXCR1 和 CXCR2 作为新型力学感受器参与调节内皮细胞迁移;Rac1 与 RhoA 的高表达能促进内皮细胞迁移,反之,内皮细胞迁移被抑制。结论 IL-8Rs (CXCR1、CXCR2)、Rac1、RhoA 是将力学、化学信号进行“耦合”的关键信号分子。

关键词: 内皮细胞迁移;剪应力;力学生物学;刺激

中图分类号: R318.01 **文献标志码:** A

Mechanical-chemical interaction and its mechanobiological mechanism on the migration of endothelial cells

HUANG Xian-liang, LIU Xiao-heng, ZENG Ye, LAI Yi, SHEN Yang, MAO Bin, GAO Ting, YU Yi (Institute of Biomedical Engineering, West China School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: Objective To elucidate the mechanical chemical interaction and its mechanobiological mechanism on the migration of endothelial cells. **Method** RT-PCR, Western blot and immunofluorescence were applied to detect the expression of CXCR1 and CXCR2 and their distributions under three levels of shear stress; anti-IL8RA and anti-IL8RB were used to inhibit CXCR1 and CXCR2 to evaluate endothelial cell migration under shear stress; ECs were transfected to obtain the wild type Rac1 (Rac1WT) or RhoA (RhoAWT), the constitutively active forms of Rac1 (Rac1Q61L) or RhoA (RhoA63L), and the dominant negative forms of Rac1 (Rac1T17N) or RhoA (RhoA188A) respectively, with lipofectamine 2000 reagent. ECs transfected with three plasmids of Rac1 were exposed to three levels of shear stress and IL-8, respectively; ECs transfected with three plasmids of RhoA were stimulated by IL-8. **Results** CXCR1 and CXCR2 are novel mechano sensors mediating laminar shear stress induced endothelial cell migration. High expression of Rac1 and RhoA can promote EC migration, while their low expression inhibits EC migration. **Conclusions** CXCR1, CXCR2, Rac1 and RhoA are critical signaling molecules in mechanical chemical interaction of EC migration.

Key words: Endothelial cell migration; Shear stress; Mechnobiology; Stimulation

收稿日期:2010-03-19;修回日期:2010-04-10

基金项目:国家自然科学基金资助项目(10972148, 10772127),四川省青年科技基金(06ZQ026-009),教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-06-0789)。

作者简介:黄先亮(1984-),男,硕士研究生,研究方向:细胞生物力学。

通讯作者:刘肖珩,教授,博士研究生导师,E-mail: liuxiaohg@scu.edu.cn。

细胞迁移是活细胞的一种运动方式。研究血管内皮细胞迁移机制,有利于把握相关条件来控制血管内皮细胞的迁移速度,从而达到治疗疾病的目的。促使血管内皮细胞迁移的诱导因素有很多,IL-8作为一种炎症因子,是一种非常重要的信号分子^[1]。但尚不清楚IL-8是通过何种信号途径来改变血管内皮细胞的迁移能力以及其中的关键调控分子。

近年来,流体剪应力在内皮细胞中传递与转导机制的研究已取得重大成果^[2-3]。目前认为剪应力诱导内皮细胞信号转导可能经过两条途径:一是通过细胞骨架的改变,修饰受体活性和跨膜通道,将剪应力信号传递到细胞内引起不同的细胞反应,尤其是肌动蛋白结构在信号转导级联的引发中有重要作用;二是通过力学敏感型受体引起的一系列生化反应,从胞浆侧膜上的分子传导至第二信使,激活蛋白激酶路径。因此,内皮细胞迁移是体内力学、化学因素协同作用的结果。而化学因素和力学因素可通过相同或不同信号途径发挥作用。最近研究发现,IL-8受体是一种G蛋白偶联受体,既可直接作为内皮细胞的力学感受器,也可通过细胞膜上的其他力学传感器发生交互对话而间接参与力学信号转导^[4-5]。同时,小G蛋白Rho GTPases,其主要成员主要包括RhoA、Rac1和Cdc42,在内皮细胞迁移过程中也起着重要的调节作用^[6-8]。本文推测:尽管力学信号(切应力)、化学信号(IL-8)具有各自独特的信号途径,但IL-8Rs→Rho GTPase可能是其共同的信号途径。IL-8Rs(CXCR1、CXCR2)、Rho GTPase(RhoA、Rac1、Cdc42)可能是将力学、化学信号进行“耦合”的关键信号分子。

本文着重对剪应力、IL-8诱导内皮细胞迁移的力学化学耦合作用和其中的力学生物学机制进行研究。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

EA.hy926细胞株购自江苏省血液研究所;1640培养基和胰蛋白酶购自Invitrogen公司;小牛血清购自Gibco;HAT购自Sigma;pcDNA3-EGFP-Rac1-WT、pcDNA3-EGFP-Rac1-T17N、pcDNA3-EGFP-Rac1-Q61L购自Addgene;TRIzol Reagent购自美国Invitrogen公司;质粒小量提取试剂盒EaZy Nu-

cleic Acid Isolation购自Omega公司;RevertAid™ first strand cDNA Synthesis Ki、DNA polymerase购自Fermentas公司;纤维粘连蛋白(FN)、FuGENE HD Transfection Reagent购自瑞士Roche公司;anti IL-8RA和anti IL-8RB(mouse monoclonal IgG)购自Santa Cruz公司;4%多聚甲醛Paraformaldehyde、甘油Glycerine购自成都化学试剂厂;牛血清白蛋白、FITC标记山羊抗小鼠IgG购自北京中杉公司;细胞因子IL-8购自Chemicon公司。

1.2 细胞培养

EA.hy926细胞的前期鉴定工作由本实验室完成^[9]。细胞培养选用含有10%胎牛血清的1640培养基,其中加入2% HAT,待细胞铺满瓶底后,用0.125%胰酶消化吹散成单个细胞,取对数生长期细胞进行实验。

1.3 剪应力加载系统

实验中用于加载剪应力的流室系统由本实验室自行开发,并且经过理论和实验证实^[10]。流室测试区满足:(1)层流;(2)二维流动;(3)充分发展的流动。由MASTER FLEX 07524-40型蠕动泵(Cole Parmer公司,美国)为流室系统提供稳定的定常流。经实验校正,在蠕动泵显示输出量为140、240、350 mL/min时,提供剪应力分别为0.556、1.002、1.527 Pa。

1.4 划痕迁移试验

载玻片预先用刀片刻上十字形的空间位置标记。在细胞长满融合的载玻片上,用细胞刮子刮出损伤区域。用于剪应力加载实验的划痕要与剪应力方向垂直。通过对比同一空间位置不同时间拍下的照片可以得到细胞迁移的数据。用于观察的倒置相差显微镜为Olympus公司IX-71型。

若划痕边缘某细胞在实验开始,即0 h时距标记的位置为 L_0 , n h时距标记的位置为 L_n ,则在 n h中该细胞迁移的距离为 $D_n = L_n - L_0$ 。以该视野内细胞的迁移距离的平均数为准。

1.5 Transwell小室试验

选用槽底部膜面积为 4.76 cm^2 ,膜上小孔直径为 $8 \mu\text{m}$ 的Transwell小室(Costar公司产品)进行。将Matrigel用不含血清的1640培养基按1:4的比例进行稀释。稀释以后按 $500 \mu\text{L}$ /孔加入到Transwell小室上层膜上,使用前浸于无血清细胞培养

液,置于37℃孵箱孵育30 min,使Matrigel水化并形成胶冻状,制成类似于细胞基底膜的一层侵袭膜。取对数生长期细胞,按 1×10^6 /孔细胞接种于上室,加入1.5 mL无血清培养基,下室加入浓度为100 $\mu\text{g/L}$ 的IL-8。将Transwell小室置于37℃、5% CO_2 的孵箱中培养6 h后,将Transwell小室取出。用棉棒将膜上层未迁移的细胞和Matrigel胶小心擦去,甲醇固定15 min,0.2%结晶紫染色后,将膜切下,显微镜下随机计数4个高倍镜视野中细胞。

1.6 剪应力作用下IL-8受体的表达与内皮细胞迁移的关系

用3种剪应力(0.556、1.002、1.527 Pa)作用内皮细胞,同时以静止状态为对照组,观察不同时间点后IL-8受体的分布及表达情况;在不同剪应力组,加入CXCR1、CXCR2的抗体anti-CXCR1、anti-CXCR2,不同作用时间后观察内皮细胞迁移情况。

1.7 Rac1在剪应力诱导的内皮细胞中的作用

采用脂质体包绕法将Rac1野生型(pcDNA3-EGFP-Rac1-WT)、主导抑制型Rac1T17N(pcDNA3-EGFP-Rac1-T17N)和稳定表达持续活化型Rac1Q61L(pcDNA3-EGFP-Rac1-Q61L)突变质粒转染入EA.hy926细胞,分别对经3种质粒转染后的内皮细胞施加3种剪应力(0.556、1.002、1.527 Pa),以静止状态为对照,观察不同时间点后内皮细胞的迁移情况。

1.8 Rac1、RhoA在IL-8诱导的内皮细胞迁移中的作用

采用脂质体包绕法分别将Rac1野生型、主导抑制型Rac1T17N和稳定表达持续活化型Rac1Q61L及RhoA野生型、主导抑制型RhoA188A和稳定表达持续活化型RhoA63L突变型质粒转染进入血管内皮细胞后,对于Rac1在IL-8诱导的内皮细胞迁

移的实验中,将Rac1WT组、Rac1T17N组、Rac1Q61L组和对照组加入Transwell小室,下层加入IL-8,在作用6 h后,对迁移的细胞进行计数及统计学分析;同理,对于RhoA在IL-8诱导的内皮细胞迁移的实验中,将RhoAWT组、RhoA188A组、RhoA63L组和对照组加入Transwell小室,下层加入IL-8,在6 h后,对迁移至下层的内皮细胞进行计数及统计学分析。

1.9 统计学分析

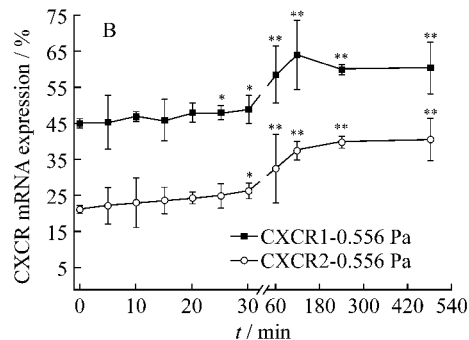
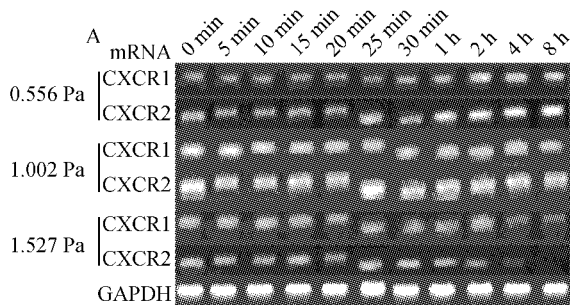
所有实验重复3次($n=3$),实验数据在统计软件SPSS10.0中用One-Way ANOVA进行统计分析, $P<0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 CXCR1、CXCR2作为力学感受器参与剪应力诱导的内皮细胞迁移

研究发现,流体剪应力能调节IL-8受体mRNA表达。低剪应力(0.556 Pa)使CXCR1、CXCR2 mRNA表达增加;高剪应力(1.527 Pa)使两种受体mRNA表达降低(见图1)。同时用Western blot检测剪应力作用后CXCR1、CXCR2蛋白表达情况,与以上结果一样,低剪应力使两种蛋白表达增加,高剪应力使两种蛋白表达降低(见图2)。

前期结果显示^[11],在静止条件下,内皮细胞CXCR1、CXCR2荧光表达主要集中在胞膜上,胞浆内荧光表达较弱。在0.556、1.002、1.527 Pa剪应力作用一段时间之后,CXCR1、CXCR2的表达逐渐由胞膜转移到胞浆(见图3),说明剪应力的作用能改变内皮细胞的受体分布,使其由胞膜向胞浆转移,即低剪应力促进CXCR1、CXCR2表达,高剪应力抑制CXCR1、CXCR2表达。



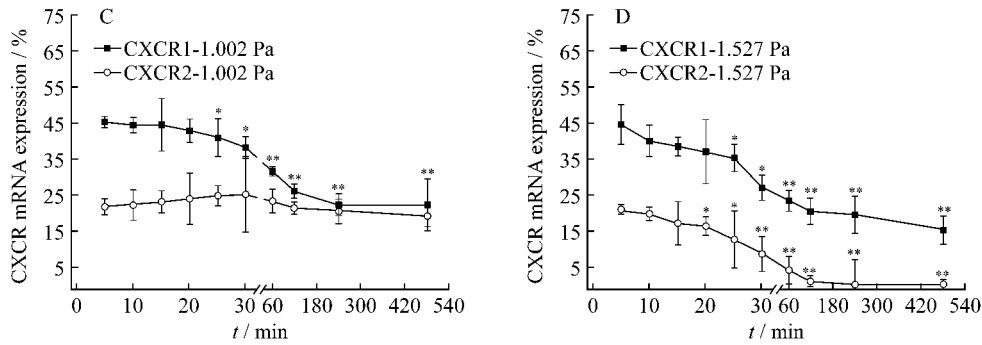


图1 在3种剪应力(0.556、1.002、1.527 Pa)作用下 CXCR1 和 CXCR2 mRNA 表达情况 (n=3, *P<0.05 vs. static control, **P<0.001 vs. static control)

Fig.1 The mRNA expression of CXCR1 and CXCR2 under three levels of shear stress (0.556, 1.002, 1.527 Pa) (n=3, *P<0.05 vs. static control, **P<0.001 vs. static control)

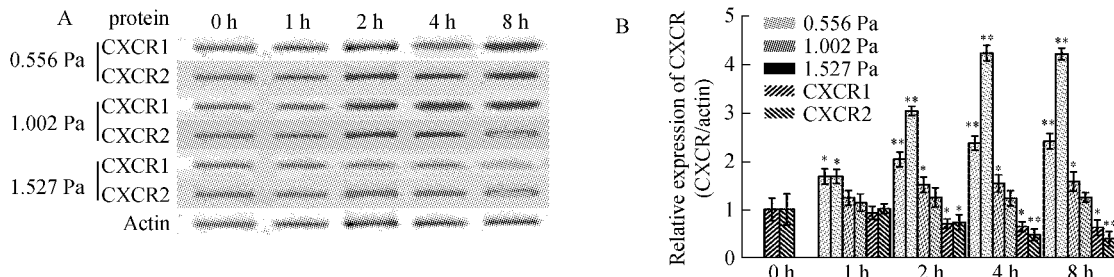


图2 在3种剪应力(0.556、1.002、1.527 Pa)作用下 CXCR1 和 CXCR2 蛋白表达情况 (n=3, *P<0.05 vs. static control, **P<0.001 vs. static control)

Fig.2 The protein expression of CXCR1 and CXCR2 under three levels of shear stress (0.556, 1.002, 1.527 Pa) (n=3, *P<0.05 vs. static control, **P<0.001 vs. static control)

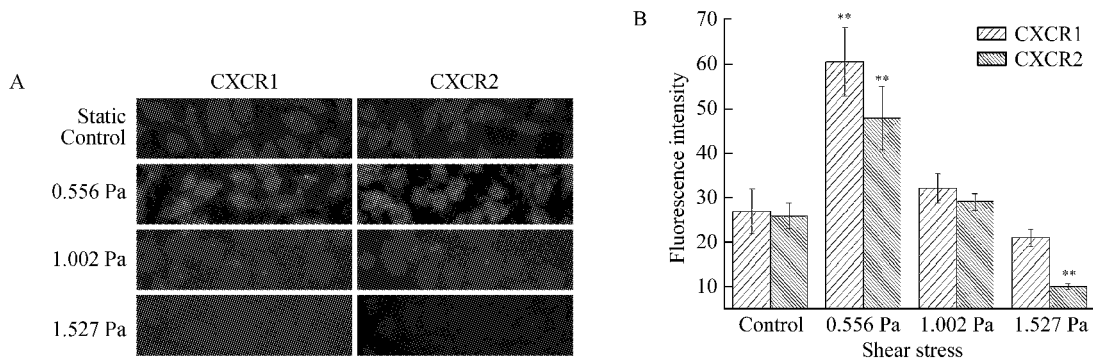


图3 不同大小剪应力作用4h引起EA.hy926细胞CXCR1、CXCR2表达的变化 (A)内皮细胞中IL-8受体CXCR1、CXCR2在荧光染色的情况;(B)对荧光照片进行灰度定量分析后的荧光强度图(n=3, **P<0.001 vs. Control)

Fig.2 The expression of CXCR1 and CXCR2 in EA.hy926 cells under different shear stress for 4 hours (A) The fluorescence staining of IL-8 receptors CXCR1 and CXCR2; (B) The quantified fluorescence intensity (n=3, **P<0.001 vs. Control)

平行流动腔实验显示(见图4),CXCR1、CXCR2的抗体 anti-IL8RA、anti-IL8RB 的加入能有效抑制内皮细胞向损伤部位迁移。在不同的剪应力组,用抗体阻断 IL-8Rs 都能有效抑制内皮细胞迁移。相比

anti-IL8RB,anti-IL8RA 对迁移的抑制更强烈,因此 CXCR1 在剪应力诱导的内皮细胞迁移中的角色比 CXCR2 更重要。CXCR1 和 CXCR2 两种受体同时阻断,内皮细胞迁移受到进一步抑制。

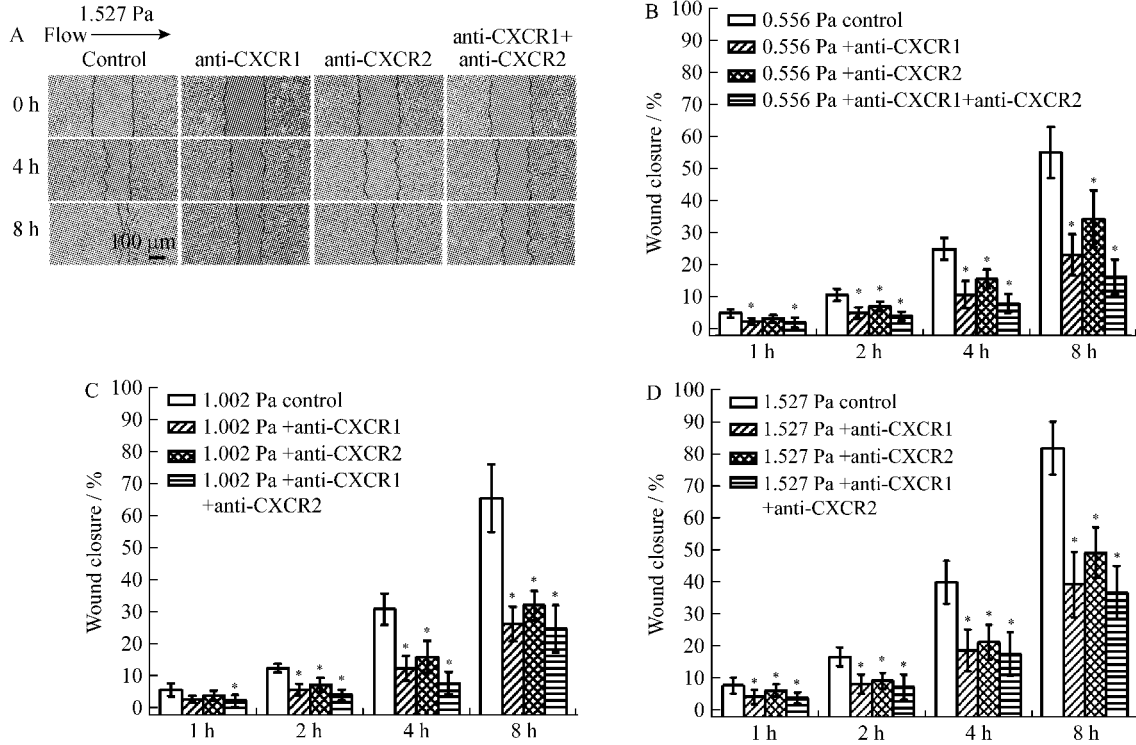


图4 anti-CXCR1 与 anti-CXCR2 在剪应力诱导的内皮细胞迁移中的作用。A 表示内皮细胞在 1.527 Pa 剪应力作用下,对照组与各实验组在 0、4、8 h 的划痕愈合情况。B、C、D 分别表示在 3 种剪应力作用下,对照组与实验组在不同时间点划痕愈合面积。(n=3, P<0.05 vs. Control)

Fig.4 Effect of anti-CXCR1 and anti-CXCR2 on shear stress-induced EC migration. A shows effect of EA. hy926 cells wound closure progression in control group and experimental groups at 0 hour, 4 hour and 8 hour under the shear stress of 1.527 Pa. B, C and D illustrate wound closure progression in control group and experimental groups under three levels of shear stress at different time. (n=3, P<0.05 vs. Control)

2.2 Rac1 在剪应力诱导的内皮细胞迁移过程中起重要作用

研究表明,剪应力作用下 Rac1 mRNA 的表达随时间增加而增高,与剪应力促进的内皮细胞迁移增加相一致,提示 Rac1 参与剪应力诱导的内皮细胞迁移并可能是其中的重要信号分子。为了更进一步探讨 Rac1 是否在这个过程中不可或缺,本研究转染了 Rac1 WT、Rac1Q61L、Rac1T17N3 种质粒进入细胞,观察在不同大小剪应力刺激下细胞迁移能力的变化。结果表明,Rac1T17N 组细胞迁移能力较对照组

低,Rac1Q61L 组较对照组高(见图5)。

2.3 Rac1、RhoA 在 IL-8 诱导的内皮细胞迁移中起重要的调节作用

前期研究表明 IL-8 能够促进血管内皮细胞的迁移,并且在浓度为 100 μg/L 时的细胞迁移率最大^[12]。用 Transwell 小室来检测转染了 Rac1Q61L、Rac1T17N、Rac1 WT3 种质粒的内皮细胞在 IL-8 刺激下的迁移情况。结果显示,Rac1Q61L 转染组细胞迁移数量较其他组有明显增加,而 Rac1T17N 较其他组明显减少(见图6),结果具有统计学意义。

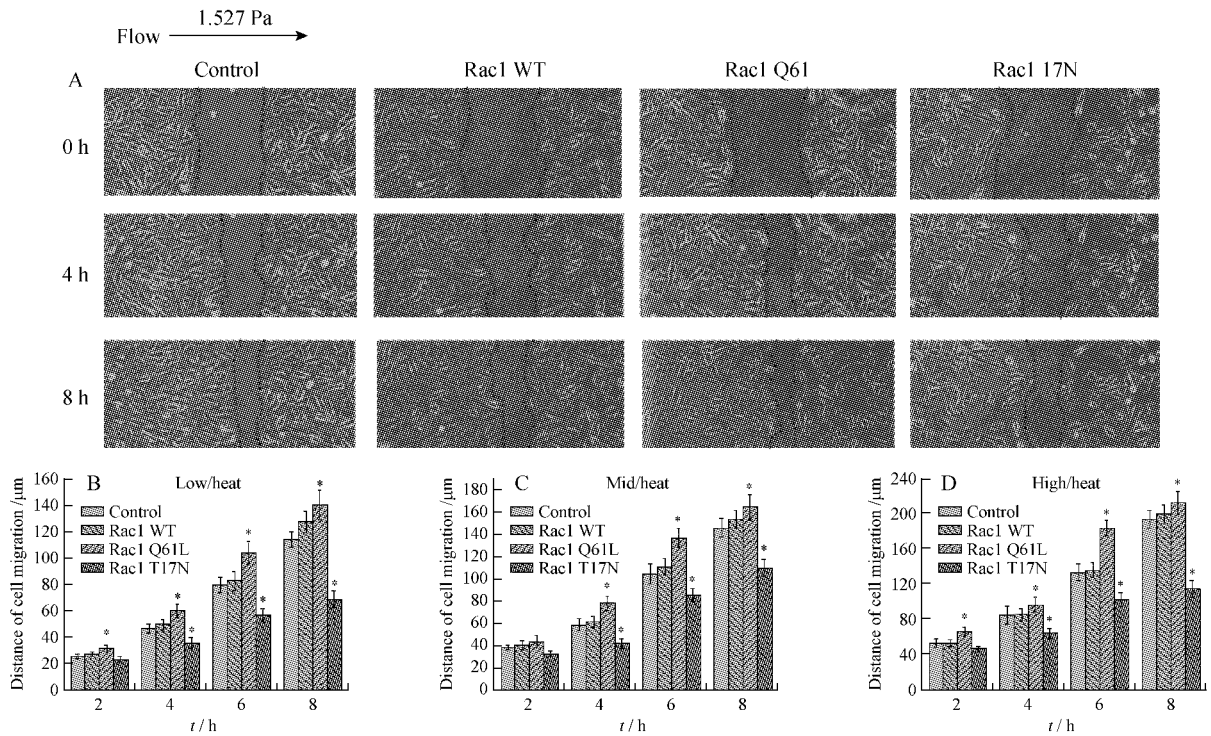


图5 Rac1 在剪应力诱导的内皮细胞迁移中的作用。A 表示内皮细胞在 1.527 Pa 剪应力作用下,对照组与各实验组在 0、4、8 h 的迁移情况。B、C、D 分别表示在低(0.556 Pa)、中(1.002 Pa)、高(1.527 Pa)3 种剪应力作用下,对照组与实验组在不同时间点内皮细胞迁移距离。(n = 3, P < 0.05 vs. Control)

Fig.5 Effect of Rac1 on shear stress-induced EC migration. A shows effect of Rac1 in EA. hy 926 cell migration in control group and experimental groups at 0 hour, 4 hour and 8 hour, under the shear stress of 1.527 Pa. B, C and D illustrate distance of EC migration in control group and experimental groups under three levels of shear stress at different time. (n=3, P<0.05 vs. Control)

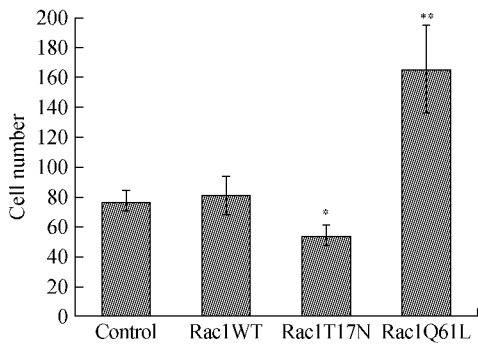


图6 Transwell 法检测 Rac1 在 IL-8 诱导的内皮细胞迁移中的作用 (n=3, * P < 0.05 vs. Control, ** P < 0.001 vs. Control)

Fig.6 Effect of Rac1 on IL-8-induced EC migration by Transwell method (n=3, * P < 0.05 vs. Control, ** P < 0.001 vs. Control)

在针对 RhoA 的研究中,同样采取质粒转染,结果与以上结果具有相似性^[13],因此认为 Rac1、RhoA 在 IL-8 诱导的内皮细胞迁移中起着重要调节作用。

3 讨论

CXCR1/2 是调节血管内皮细胞生理活动的重要受体。为研究 CXCR1/2 在剪应力诱导血管内皮细胞迁移中的作用检测了剪应力作用下内皮细胞 CXCR1 和 CXCR2 表达变化;并以 anti-IL8RA 和 anti-IL8RB 拮抗 CXCR1 和 CXCR2,由流室系统提供不同大小的剪应力,对比对照组与受体拮抗组内皮细胞在划痕实验中的迁移情况。结果表明,CXCR1 和 CXCR2 被 anti-IL8RA 和 anti-IL8RB 拮抗后,内皮细胞的迁移也被有效抑制。其中,anti-IL8RA 的抑制作用强于 anti-IL8RB(P < 0.05);在同时加入两种受体拮抗剂的情况下,内皮细胞迁移受到进一步抑制。以上结果提示,CXCR1 和 CXCR2 作为血管内皮细胞力学-化学耦合作用的重要信号分子参与与剪应力诱导的内皮细胞迁移,而以 CXCR1 作用更为明显。

近年来,有关 Rac1 的研究越来越深入,与 Rac1 相关的信号传导途径被逐渐阐明。这些研究证实,Rac1 不但参与内皮细胞的迁移,并且起着重要的作用^[14-15],但其分子机制尚不清楚。本文选择了3种基因 Rac1WT、Rac1Q61L 和 Rac1T17N 对内皮细胞进行稳定转染来研究该分子在剪应力及 IL-8 诱导的内皮细胞迁移过程中所起的作用。Rac1WT 为 Rac1 蛋白的野生型;Rac1Q61L 是 Rac1 蛋白稳定表达持续活化型;Rac1T17N 为 Rac1 蛋白的主导抑制型。结果表明,在剪应力及 IL-8 诱导的内皮细胞迁移中,Rac1Q61L 组能显著促进内皮细胞迁移,而 Rac1T17N 组则对内皮细胞迁移有抑制作用。本研究结果提示在内皮细胞迁移过程中,Rac1 是将力学、化学信号进行耦合的关键信号分子。

RhoA 蛋白是细胞接受外源信号而发生迁移的细胞内信号转导途径的关键调控分子。过去的研究表明^[12],IL-8 可以诱导内皮细胞发生迁移,且 IL-8 的最佳浓度为 100 $\mu\text{g/L}$,但是 IL-8 信号在内皮细胞内传递是不是由 RhoA 介导的呢? 本文选择了 RhoAWT、RhoA63L 和 RhoA188A 3 种基因对内皮细胞进行稳定转染来研究该分子在 IL-8 诱导的内皮细胞迁移过程中所起的作用。RhoAWT 为 RhoA 蛋白的野生型;RhoA63L 是 RhoA 蛋白稳定表达持续活化型;RhoA188A 为 RhoA 蛋白的主导抑制型。用 Transwell 小室,检测各组在 IL-8 (100 $\mu\text{g/L}$) 刺激下的迁移能力,发现 RhoAWT 转染组细胞迁移能力稍高于对照组,RhoA63L 转染组细胞迁移能力远高于对照组,而 RhoA188A 转染组细胞迁移能力则被明显抑制。对比各组活性 RhoA 含量和细胞迁移能力,说明 RhoA 作为信号分子,在 IL-8 诱导的内皮细胞迁移中起重要调节作用。同时,本文还在继续研究 RhoA 在剪应力诱导的内皮细胞迁移中的作用。

综上所述,在血管内皮细胞迁移过程中,尽管力学信号(剪应力)、化学信号(IL-8)具有各自独特的信号途径,但 IL-8Rs \rightarrow Rho GTPase 可能是其共同的信号途径。IL-8Rs (CXCR1、CXCR2)、Rho GTPase (RhoA、Rac1、Cdc42)可能是将力学、化学信号进行“耦合”的关键信号分子。然而,对于这几者相互之间的关系和作用还需要进一步地研究,相关结果将在未来的论文中给予阐述。

参考文献:

- [1] Li A, Varney ML, Valasek J. Autocrine role of interleukin-8 in induction of endothelial cell proliferation, survival, migration and MMP-2 production and angiogenesis [J]. *Angiogenesis*, 2005, 8: 63-71.
- [2] Shiu YT, Li Song, William AM. Rho mediates the shear-enhancement of endothelial cell migration and traction force generation [J]. *Biophys J*, 2004, 86: 2558-2565.
- [3] Li S. Analysis of endothelial cell migration under flow [J]. *Methods Mol Biol*, 2005, 294: 107-121.
- [4] Addison CL, Daniel TO, Burdick MD. The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR(+) CXC chemokine-induced angiogenic activity [J]. *J Immunol*, 2000, 165: 5269-77.
- [5] Varney ML, Johansson SL, Singh RK. Distinct expression of CXCL8 and its receptors CXCR1 and CXCR2 and their association with vessel density and aggressiveness in malignant melanoma [J]. *Am J Clin Pathol*, 2006, 125: 209-216.
- [6] Cascone I, Audero E, Giraudo E, et al. Tie-2-dependent activation of RhoA and Rac1 participates in endothelial cell motility triggered by angiotensin-1 [J]. *Blood*, 2003, 102 (7): 2482-2490.
- [7] 赖怡,刘肖珩,吴江,等. Rac1 参与调节 IL-8 诱导的内皮细胞迁移 [J]. *生物医学工程学杂志*, 2008, 25(2): 357-362.
- [8] Tzima E. Role of small GTPases in endothelial cytoskeletal dynamics and the shear stress response [J]. *Circ Res* 2006, 98(2): 176-185.
- [9] 张怡,李艳,涂秋芬,等. 流体剪切应力对 EA. hy926 细胞 IL-8 基因表达的影响 [J]. *航天医学与医学工程*, 2007, 20(4): 240.
- [10] 刘肖珩,陈槐卿. 流室系统的流体动力学模拟 [J]. *生物医学工程学杂志*, 1999, 16(4): 441-444.
- [11] 孙胡蓉,韦琳,刘肖珩,等. CXCR1/2 在剪应力诱导血管内皮细胞迁移中的作用 [J]. *生物医学工程学杂志*, 2009, 26(3): 512-517.
- [12] 邹敏君,刘肖珩,李毅,等. IL-8 诱导血管内皮细胞迁移的实验研究 [J]. *生物医学工程学杂志*, 2006, 23(5): 1013-1016.
- [13] 尹红梅,邹敏君,成丽,等. RhoA 蛋白参与调节白介素 8 诱导的血管内皮细胞迁移 [J]. *航天医学与医学工程*, 2008, 21(6): 472-476.
- [14] Lee Sok-Hyong, Kunz Jeannette, Lin Sue-Hwa. 16-kDa prolactin inhibits endothelial cell migration by down-regulating the Ras-Tiam1-Rac1-Pak1 signaling pathway [J]. *Cancer Res*, 2007, 67: 11045-11053.
- [15] Jaffe Aron B, Hall Alan. Rho GTPases: biochemistry and biology [J]. *ARI*, 2005, 21: 247-270.