

基础研究

应用 RNA 干扰技术抑制神经元 E3B1 基因
表达及对轴突生长的影响

向 强,周 跃,李长青,徐 峰,吕宏琳,郑文杰

(第三军医大学新桥医院骨科 400038 重庆市)

【摘要】目的:探讨应用 RNA 干扰(RNAi)技术抑制神经元 E3B1 基因表达及其对轴突生长的影响。**方法:**选择针对 E3B1(NCBI:NM-024397)RNAi 的 3 个靶位点 Abil1、Abil2、Abil3 和 1 个不针对任何 mRNA 的 RNAi 靶位点(阴性对照)以及甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH,阳性对照),用带有 neo^R 选择标志和 GFP 绿色荧光标志的真核表达载体 pGenesil-1 构建 E3B1 RNAi 质粒,分别转染培养的神经元,在荧光显微镜下观测转染率,经 G418 筛选得到单一的转染细胞,并用 Western blot 法检测各转染组神经元 E3B1 蛋白的表达情况,选出具有最佳抑制效应的 siRNA 转染神经元,加入轴突生长抑制物,观测轴突生长情况。**结果:**成功构建了 RNAi 质粒,各组细胞的转染率相近,均为 34%左右。与阴性对照组相比,Abil1、Abil2 和 Abil3 转染组细胞内 E3B1 mRNA 的表达都受到了不同程度的抑制,其中 Abil3 转染组细胞的 E3B1 mRNA 和蛋白的表达抑制最为显著,加入轴突抑制剂后 Abil3 转染组神经元轴突仍能继续生长。**结论:**应用 RNA 干扰技术能高效特异地抑制神经元 E3B1 基因的表达,E3B1 基因的表达下调可促进神经元轴突的生长。

【关键词】 RNA 干扰;E3B1;神经细胞;轴突

中图分类号:Q786 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2008)-12-0934-05

Influence of RNA interference on expression of E3B1 gene in cultured cortical neurons and neurite regeneration/XIANG Qiang,ZHOU Yue,LI Changqing,et al/Chinese Journal of Spine and Spinal Cord,2008,18(12):934-938

【Abstract】 Objective:To investigate the influence of RNA interference on cultured neurons,and observe the effects of E3B1 gene silencing on neurite regeneration.**Method:**Three RNAi target sites (named as Abil1,Abil2,Abil3) targeting the E3B1(NCBI:NM-024397),an identified target sites (negative control,named as HK) and positive control GAPDH-A were selected.The pGenesil-1 eukaryotic expression vectors with the neo^R mark and GFP green fluorescent mark were selected to construct E3B1 RNAi plasmid.The effect of RNAi targeting various sites on E3B1 genes expression was evaluated by testing the transfection efficiency with fluorescence microscope and western blot.The most effective siRNA in inhibiting E3B1 genes were screened.The most effective siRNA in inhibiting E3B1 genes screened and used to transfect the neuronal cells.After that, the inhibitor of axon growth was added and the axon growth was observed.**Result:**The siRNA expressing plasmids targeting the E3B1 were constructed successfully.The transfecting rate of neurons in each plasmid was about 34% without significant difference.There was no effect of HK on the E3B1 mRNA and protein expression in control group while the E3B1 mRNA and protein expression decreased and showed a significant inhibition effect in the experimental groups of Abil1,Abil2,Abil3.The co-culture of siRNA- Abil3 transfecting neurons with most effective inhibiting effect on E3B1 and the axon inhibitors showed a well growth of the neurons.**Conclusion:**RNA interference can efficiently suppress E3B1 expression in cultured neurons and promote neurite regeneration.

【Key words】 RNA interference;E3B1;Neuron;Neurite

【Author's address】 Department of Orthopaedics,Xinqiao Hospital,the Third Military University,Chongqing, 400037, China

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30500514)

第一作者简介:男(1972-),博士研究生,主治医师,研究方向:脊髓损伤修复

电话:(023)6877490 E-mail:xqiang163@163.com

通讯作者:李长青

中枢神经系统损伤后,少突胶质细胞及髓鞘碎片产生的轴突生长抑制物能引起神经元内肌动蛋白解聚,细胞骨架不能重建,最终导致神经元轴突回缩、崩溃,轴突再生抑制,限制了神经损伤后

的修复。近期的研究发现, E3B1(又称 Abil)过度表达能引起肌动蛋白的解聚, 抑制细胞骨架的重建^[1]。我们前期的研究证实, 神经元轴突崩溃、回缩时 E3B1 表达明显升高^[2,3]。通过抑制 E3B1 的过度表达能否促进损伤神经元轴突的生长尚不清楚。为此, 我们应用了 RNA 干扰技术构建 siRNA 转染神经元, 探讨其对 E3B1 基因的表达及对轴突生长的影响。

1 材料和方法

1.1 主要材料

分离、培养、鉴定和纯化的孕 18d SD 胎鼠大脑皮层神经元; 参照 Ahmed 等^[4]的方法, 提取和鉴定大鼠脑组织髓鞘质; 人重组胶质细胞源性神经生长因子(GDNF, Sigma); 神经元基础培养基(Sigma); 单链寡核苷酸 DNA 及 E3B1 引物(北京三博远志生物公司); 真核表达载体 pGenesil-1(武汉晶赛生物工程技术有限公司, 带有 neo^R 选择标志和 GFP 绿色荧光标志); DH5 α 工程菌菌株(第三军医大学); 脂质体转染试剂盒 Lipofectamine 2000 (Invitrogen 公司); G418 (BM Scientific 公司); 标准参照物 (100bp DNA ladder)、Taq 酶 (Promega); 羊抗 E3B1 一抗(Sigma)、羊抗 β -肌动蛋白一抗 (Sigma)、羊抗 β -微管蛋白一抗 (Sigma)、兔抗羊 IgG 辣根过氧化物酶标记二抗 (Santa Cruz); 罗丹明 (TRITC) 标记山羊抗小鼠-IgG (北京中杉公司); 考马斯亮蓝 R-250 (Sigma); 醋酸纤维素膜 (Pharmacia); 化学发光增强试剂盒 (Pierce)。

1.2 siRNA 的设计、鉴定

(1) 从基因数据库中获取 E3B1 mRNA 的完整序列, 基因序列号为 NM_024397, 从 AUG 起始密码开始, 寻找“AA”二连序列后的 19 个碱基序列, 选择 GC 比在 40%~50% 的靶基因序列作为潜在的优选序列, 使用 NCBI BLAST (basic local alignment search tool, 基本的局部配对搜索工具) 将选定的序列和相应的大鼠基因数据库进行比较, 排除与其他编码序列和(或)EST 同源的序列, 最终优选出 3 个针对 RNAi 的靶位点 Abil1、Abil2、Abil3, 1 个已明确的不针对任何 mRNA 靶位点(阴性对照), GAPDH-A 为阳性对照。19 个碱基的靶点确定后, 确定需要合成的寡核苷酸序列(由武汉晶赛生物工程技术有限公司代理合成)。重组质粒转化感受态的大肠杆菌菌株 DH5 α , 获得的

阳性克隆菌株进行酶切鉴定。

1.3 siRNA 的转染

转染前 1d, 将培养在 6 孔板中的神经元培养基换成不含抗生素的基础培养基。用 250 μ l 无血清培养基稀释 4.0 μ g siRNA, 轻轻混匀; 将 Lipofectamine 2000 转染试剂轻轻混匀, 取 10 μ l 该试剂用 250 μ l 无血清培养基稀释后轻轻混匀, 在 5min 内与稀释的 siRNA 混合室温放置 20min。将 6 孔板中的旧营养液吸出, 用无血清培养基清洗 2 次, 每孔加入 2ml 无血清培养基。将含转染试剂 Lipofectamine 2000 和 siRNA 的复合物加入到每孔中, 摇动培养板, 轻轻混匀, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 中培养 24~48min 后室温静置, 4~5h 后加入 FCS。在开始转染 1d 后, 向 6 孔板中加入新鲜培养基, 2d 后加入筛选抗生素 G418 进行筛选。

1.4 检测转染率

分别将 Abil1、Abil2、Abil3 转染组、无干扰效应质粒(HK, 空白对照组)转染组、GAPDH 转染组的神经元培养 24~72h, 在波长为 488nm 的荧光显微镜下和波长 488nm 的激光共聚焦显微镜下观察细胞绿色荧光产生情况。记录每个转染细胞培养孔四周和中央 5 个视野内所观察到的细胞数, 并计算转染率。转染率(%)=(发出绿色荧光的细胞数/可见光下总细胞数) $\times$ 100%

1.5 神经元 E3B1 蛋白水平表达的检测

取未转染的神经元及以上 5 组转染细胞共 6 组, 每组各取 5 $\times$ 10⁶ 个细胞, 用放射免疫沉淀测定法(RIPA 法)抽提总蛋白, Bradford 法定量, 各取 45 μ g 总蛋白用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳, 将电泳分离的蛋白质转至醋酸纤维素膜上, 再用羊抗 E3B1 抗体(1:1500)杂交, 洗膜后再与生物素化的兔抗羊 IgG(1:1500)结合, 增强化学发光自显影(ECL)显色, 曝光显影成像。

1.6 神经元 β -微管蛋白的免疫荧光标记

取培养的神经元分为 3 组: A 组, 正常培养的神经元; B 组, 正常培养的神经元, 加入 CNS 髓鞘质 200 μ g/ml; C 组, 转染重组质粒 Abil3 的神经元, 加入 CNS 髓鞘质 200 μ g/ml。继续培养 72h 后去除培养液, 用 0.01M PBS(pH 7.4)液洗涤 3 次, 每次 5min; 用 4% 的多聚甲醛固定 30min, 去除多聚甲醛, 用 0.01M PBS(pH 7.4)溶液洗 3 次, 每次 5min; 用 3% 双氧水封闭内源性过氧化物酶, 室温 30 $^{\circ}$ C; 用 0.01M PBS 洗涤 3 次, 每次 5min; 每片滴

加正常山羊封闭血清 30 μ l, 37 $^{\circ}$ C 孵育 40min; 弃掉血清, 但勿干燥, 滴加 β III 微管蛋白一抗 (1:1000 稀释) 于 4 $^{\circ}$ C 湿盒过夜; PBS 冲洗 3 次, 每次 5min; 加入荧光二抗 (发绿色荧光的 TRITC 标记的二抗, 以 0.01M PBS 按 1:500 稀释) 37 $^{\circ}$ C、60min; 弃掉多余液体, 0.01M PBS 洗涤 3 次, 每次 3min, 再用双蒸水冲洗 1min; 依次经 70%、95% 和无水乙醇脱水 3 次, 每次 1min, 封片。

1.7 RNA、蛋白条带的检测及图像分析

SX-100 凝胶成像仪对前面获得的 RNA 和蛋白条带进行扫描和图像存储。以 Image-pro-plus 图像处理系统进行图像分析, 以平均光密度 OD $\times$ 面积 (OD $\times$ mm 2) 表示, 分别计算目的条带和内参条带的积分光密度值 (IOD 值), 结果以 E3B1/GAPDH 和 β III 微管蛋白/GAPDH 的积分光密度比值表示。

1.8 统计学方法

实验数据用 SPSS 11.5 软件包行双因素方差分析, 分别以 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 作为显著性和非常显著性判定标准, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

Abil1 为 5'-AAGAGGAAAGCTCTAGAA-GAG-3'; Abil2 为 5'-AATGTGCTCCAGCTGCTG-GAT-3'; Abil3 为 5'-AAGACGAAGAAGCT-GCAGTAG-3'; 阴性对照 HK 为: 5'-AAGACTTCATAAGCGCATGT-3'; 阳性对照 GAPDH 为 5'-AGTGGATATTGTTGCCATCGT-3'。pGenesil-1 载体 (晶赛-1 载体) 大小为 4893bp, 带有抗 Kan 基因和抗 Neo 基因, 酶切位点见图 1, 包括 BamH I 和 Hind III 酶切位点。经 Sal I 单酶切, 电泳, 重组质粒均产生 400bp 的片断, 提示 RNAi 质粒构建成功 (图 2)。

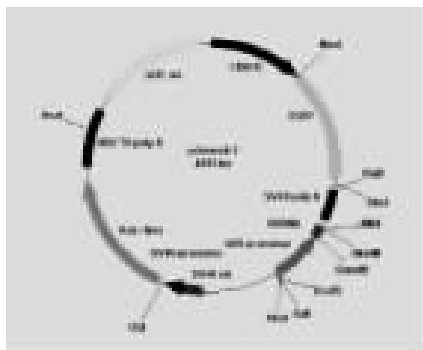


图 1 载体的酶切位点和 RNAi 质粒的构建示意图

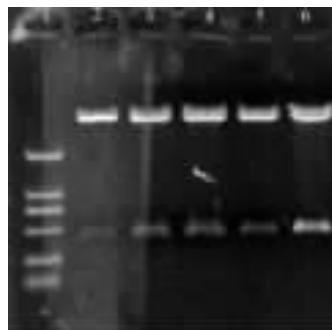


图 2 重组 RNAi 质粒鉴定 (1 DL2000 Marker; 2 Abil1; 3 Abil2; 4 Abil3; 5 HK; 6 GAPDH)

细胞转染后 24h, 光镜下可见部分细胞死亡, 在荧光显微镜下可见部分存活细胞内存在明亮的绿色荧光, 提示部分细胞转染成功。与未转染的神经元相比, 各转染组细胞中有绿色荧光的细胞比率接近, 其转染率分别为 34.2% (HK)、35.1% (GAPDH)、36.3% (Abil1)、33.5% (Abil2) 和 35.7% (Abil3)。经 G418 筛选后, 荧光显微镜下检测所有细胞内都有绿色荧光, 得到了单一的转染细胞 (图 3, 后插页 III)。

E3B1 蛋白表达见图 4。4 组均在 36kD 处显现出清晰的无明显差别的 GAPDH 内参照印迹, 且在 65kD 处显现出特异的 E3B1 蛋白印迹, 其中 Abil1 和 Abil2 转染组印迹浓度相近, 都比 HK 转染组淡, Abil3 转染组印迹浓度明显低于 HK 转染组, 印迹最淡。Abil1 转染组 IOD 值 0.183 ± 0.013 , Abil2 转染组为 0.179 ± 0.012 , Abil3 组为 0.121 ± 0.006 , HK 组为 0.374 ± 0.015 。与 HK 组相比, Abil1、Abil2 和 Abil3 转染组细胞内 E3B1 蛋白表达都受到了不同程度的抑制, 其中 Abil3 转染组抑制最为显著。

神经元 β III 微管蛋白免疫荧光标记显示, A 组 (对照组) 神经元生长良好, 细胞聚集, 突起间连接成网状 (图 5a, 后插页 III); B 组 (加入 CNS 髓鞘质) 神经元突起短缩, 轴突生长抑制 (图 5b, 后插页 III); C 组 (Abil3 转染组加入 CNS 髓鞘质) 神经

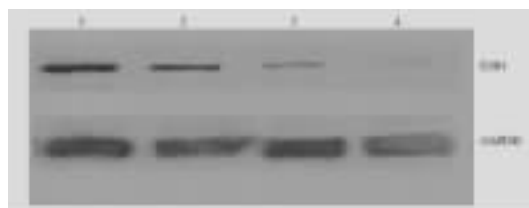


图 4 不同转染组神经元 E3B1 蛋白表达 (1 HK 转染组; 2: Abil1 转染组; 3 Abil2 转染组; 4 Abil3 转染组)

元生长较好,仍有明显的突起连接成网状,与对照组相比轴突生长有所抑制,但明显长于 B 组(图 5c,后插页Ⅲ)。A 组平均轴突长度为 $896\pm 71\mu\text{m}$, B 组为 $31\pm 9\mu\text{m}$, C 组为 $572\pm 67\mu\text{m}$ 。

神经元 β Ⅲ微管蛋白的表达见图 6。3 组都在 36KD 处显现出清晰的无明显差别的 GAPDH 内参照印迹,在 45KD 处显现出特异的 β Ⅲ微管蛋白印迹,其中对照组、Abil3 转染组印迹浓度均较高,分别为 0.851 ± 0.017 、 0.538 ± 0.015 ;加入 CNS 髓鞘质组蛋白印迹浓度明显降低,为 0.143 ± 0.012 ,与对照组和 Abil3 转染组比较差异有显著性($P<0.05$)。表明对照组、Abil3 转染组神经元轴突生长较好,加入 CNS 髓鞘质组轴突生长受到明显抑制。

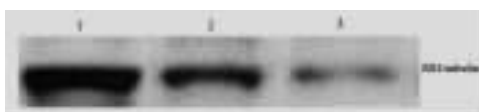


图 6 3 组神经元 β -Ⅲ微管蛋白的表达情况(1 对照组;2 Abil3 转染组;3 加入 CNS 髓鞘质组)

3 讨论

中枢神经系统损伤后,轴突生长抑制因子使神经元轴突再生失败的关键在于其使得神经元骨架肌动蛋白发生解聚、应力纤维形成以及抑制细胞骨架重建,从而引起轴突回缩、崩溃^[9]。因此,通过调控细胞骨架关键基因的表达,直接调节神经元肌动蛋白发生聚合作用,促进细胞骨架重建有可能为解决轴突生长抑制这一难题提供新的途径。

E3B1 于 1995 年作为调节细胞生长和增殖相关的非受体蛋白酪氨酸激酶 Abl(也称为 Eps8)的结合蛋白得到分离和鉴定,Eps8 最初是作为表皮生长因子(EGFR)激酶的底物被发现的,进一步研究发现 Eps8 具有信号转导分子的典型结构,N 末端是 PTB 区域,中间有 SH3 区域,C 末端的效应区使 Eps8 结合在细胞上激活 GTPase 和 Rac 导致肌动蛋白细胞骨架重聚。Eps8 又通过 SH3 区与 E3B1 或 RN-tre 结合,与鸟嘌呤核苷酸交换因子 Sos1 形成 Eps8-E3B1-Sos1 三聚体,而这个三聚体复合物是激活 Rac 所必需的^[6,7]。有研究证实,通过激活 Rac、CDC42^[8]以及灭活 RhoA 等^[9]途径可以启动神经元内肌动蛋白发生聚合,细胞骨架重

建,促进损伤神经元轴突生长。Borisoff 等^[10]证实 E3B1 参与了神经元骨架肌动蛋白聚合作用及细胞骨架重建。Fan 等^[11]发现 E3B1 过度表达能够引起肌动蛋白的解聚以及抑制细胞骨架重建。因此推测 E3B1 可能是调控肌动蛋白聚合和细胞骨架重建的关键性基因。这些都为我们从细胞内水平出发通过 E3B1 的表达调控,调节神经元肌动蛋白发生聚合作用,促进细胞骨架重建,探索促进 CNS 再生修复的新途径提供了理论依据。

在动物实验中,我们发现急性脊髓损伤后损伤脊髓组织中 E3B1 mRNA 和蛋白的表达均明显高于正常脊髓组织,这种高表达在损伤后维持了较长时间。初步表明脊髓损伤后 E3B1 的表达上调与脊髓损伤后组织病变密切相关^[2]。进一步的离体实验表明 E3B1 蛋白的表达,主要位于神经元胞体和突起部^[12],与 Courtney 等^[3]发现 E3B1 定位于神经元的丝状伪足及片状伪足上基本吻合。在轴突生长抑制时 E3B1 mRNA 和蛋白的表达显著升高。提示 E3B1 基因的过度表达与轴突生长抑制密切相关。RNAi 是一种新兴的基因阻断技术,能特异高效抑制目的基因的表达活性。本实验中我们应用了 siRNA 技术在体外转录合成了 4 段 E3B1 的特异性 siRNA,用以转染神经元。RT-PCR 检测显示,4 段 siRNA 均使转染的神经元 E3B1 mRNA 表达下降,其中 siRNA-Abil3(325-345)对 E3B1 mRNA 的表达抑制最明显,其蛋白表达水平也出现了类似的变化。说明 siRNA 技术能可靠地抑制神经元 E3B1 基因的表达。实验中我们将 E3B1 表达抑制最明显的神经元与轴突生长抑制物共培养,结果发现神经元在 CNS 髓鞘质存在的情况下,轴突仍能较好地生长,反映神经元轴突生长情况的 β Ⅲ微管蛋白也有较高水平的表达,与对照组比较有显著性差异。表明抑制神经元内 E3B1 的过度表达可促进神经元轴突生长。其机制可能与 E3B1 对肌动蛋白的聚合和细胞骨架重建以及解聚和抑制的双向调节作用有关^[11]。因为在正常情况下,E3B1 通过与-COOH 末端存在 2 个肌动蛋白结合位点的 Abl 结合,同时和 Sos-1 形成 Abl/E3B1/Sos-1 三联复合物同时参与了 Ras 激活 Rac 的信号途径以及 PI3K 激活 Rac 的信号途径;或与 Sos-1、Nap1、WAVE2 形成复合体,调控 Ras 激活 Rac 的活性^[13]。Rac 的激活可以启动肌动蛋白聚合和细胞骨架重建,从而促进轴突的

生长。这一过程依赖于存在于细胞膜上的桥接蛋白 Grb2 通过 SH3 区域与 Sos-1 结合,使 Sos-1 定位于膜上,与法尼基化的 Ras 于膜上结合,使 Ras 与 GDP 解离,转而与 GTP 结合的活化状态,激活下游 Rac 的信号转导,调节肌动蛋白的聚合、细胞骨架的重建^[14,15]。当 E3B1 过度表达时,E3B1 与 Sos-1 的结合竞争性地抑制了 Grb-Sos-1 复合物的形成,使得 Ras 与 GDP 无法解离,处于失活状态,从而使肌动蛋白的聚合、细胞骨架的重建受到抑制^[16,17],继而轴突生长受到抑制。此外,RN-tre 也与 E3B1 竞争性的结合 Eps8,与 Sos-1 形成 Eps8-E3B1-Sos1 三聚体,也抑制了 Grb-Sos-1 复合物的形成,从而抑制了肌动蛋白的聚合和细胞骨架的重建^[18]。通过 RNA 干扰抑制了过多 E3B1 的表达,恢复了 E3B1-Sos-1 与 Grb-Sos-1 的平衡关系,调节神经元肌动蛋白发生聚合作用,促进了细胞骨架重建和轴突的生长。实验中我们也注意到与正常培养的神经元相比,实验组神经元轴突的长度和 β III 微管蛋白的表达量也有明显差异,说明调控神经元内 E3B1 的表达仅能部分解除轴突生长抑制物对轴突生长的抑制作用,出现这一现象的原因可能是轴突生长抑制物对轴突生长的抑制作用是通过多条信号突进实现的,与 E3B1 相关的只是其中的部分信号途径,另外 RNAi 不能完全彻底抑制 E3B1 的表达也可是原因之一,确切机制尚需进一步研究。

本研究结果显示,应用 siRNA 转染神经元可抑制 E3B1 表达,部分解除了轴突的再生抑制,促进轴突生长。为解决 CNS 损伤后轴突再生抑制、促进 CNS 的再生修复提供了新的思路,值得更进一步研究。

4 参考文献

- Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton[J].Science, 1998,279(5350):509-514.
- 向强,周跃,李长青,等.E3B1 基因在急性脊髓损伤中的表达变化研究[J].中国急救医学,2007,27(7):619-621.
- Courtney KD,Grove M,Vandongen H, et al. Localization and phosphorylation of Abl-interactor proteins,Abi1 and Abi2,in the developing nervous system [J].Mol Cell Neurosci,2000,16(3):244-257.
- Ahmed Z,Dent RG,Suggate EL, et al. Disinhibition of neurotrophin-induced dorsal root ganglion cell neurite outgrowth on CNS myelin by siRNA-mediated knock down of NgR, p75NTR and Rho-A[J].Mol Cell Neurosci 2005,28(3):509-523.
- Paul A,Janmey B,Meyera J,et al.Creating a niche in the cytoskeleton:actin reorganization by a protein kinase[J].PNAS, 2001,98(26):14745-14747.
- Di Fiore PP, Scita G. Eps8 in the midst of GTPases[J].Int J Biochem Cell Biol,2002,34(10):1178-1183.
- Offenhäuser N,Castelletti D,Mapelli L,et al.Increased ethanol resistance and consumption in Eps8 knockout mice correlates with altered actin dynamics[J].Cell,2006,127(6):213-226.
- Innocenti M,Frittoli E,Ponzanelli I,et al. Phosphoinositide 3-kinase activates Rac by entering in a complex with Eps8, Abi1,and Sos-1[J].J Cell Biol,2005,160(1):17-23.
- Shekarabi M,Kimothy TK. The netrin-1 receptor DCC promotes filopodia formation and cell spreading by activating Cdc42 and Rac1[J].Mol Cell Neurosci,2002,19(3):1-17.
- Borisoff JF,Chan CC,Hiebert GW,et al.Suppression of Rho-kinase activity promotes axonal growth on inhibitory CNS substrates[J].Mol Cell Neurosci,2003,22(3):405-416.
- Fan PD,Goff SP. Abl interactor 1 binds to sos and inhibits epidermal growth factor and v-Abl-induced activation of extracellular signal-regulated kinases [J].Mol Cell Biol,2000,20(20):7591-7601.
- 向强,周跃,李长青,等.脊髓运动神经元轴突抑制前后 E3B1 基因的表达变化及意义 [J]. 中华实验外科杂志,2008,25(1):89-91.
- Steffen A,Rottner K,Ehinger J,et al. Sra-1 and Nap1 link Rac to actin assembly driving lamellipodia formation [J].EMBO J,2004,23(4):749-759.
- Jenei V, Andersson T, Jakus J, et al. E3B1,a human homologue of the mous gene product Abi -1,sensitizes activation of Rap1 in response to epidermal growth factor[J]. Exp Cell Res,2005,310(2):463-473.
- Innocenti M,Frittoli E,Ponzanelli I,et al.Phosphoinositide 3-kinase activates Rac by entering in a complex with Eps8, Abi1,and sos-1[J].J Cell Biol,2003,160(3):17-23.
- Kalil K,Dent EW.Touch and go:guidance cues signal to the growth cone cytoskeleton [J].Curr Opin Neurobiol,2005,15(5):521-526.
- Disanza A,Carlier MF,Stradal TE,et al.Eps8 controls actin-based motility by capping the barbed ends of actin filaments [J].Nat Cell Biol,2004,6(12):1147-1149.
- Offenhäuser N,Borgonovo A,Disanza A,et al.The eps8 family of proteins links growth factor stimulation to actin reorganization generating functional redundancy in the Ras/Rac pathway[J].Mol Biol Cell,2004,15(1):91-98.

(收稿日期:2008-05-26 修回日期:2008-08-01)

(英文编审 郭万首)

(本文编辑 卢庆霞)