

# 芹菜素激活 c-Src/NADPH 氧化酶/ROS 通路诱导 HO-1 表达从而抑制小鼠巨噬细胞过度分泌细胞因子

曾赛丽<sup>1</sup>, 吴广<sup>2</sup>, 谢莉<sup>1</sup>, 张秀峰<sup>1</sup>, 谭小武<sup>1</sup>, 何振华<sup>1</sup>, 游晓星<sup>3</sup>, 赵兰华<sup>3</sup>, 曾焱华<sup>3\*</sup>

(1. 南华大学附属第二医院呼吸内科; 2. 南华大学附属第二医院药剂科;  
3. 南华大学病原生物学研究所; 湖南 衡阳 421001)

**摘要:** **目的** 观察芹菜素对脂多糖(LPS)诱导小鼠巨噬细胞分泌细胞因子的影响,并探讨其分子机制。

**方法** 体外培养小鼠巨噬细胞 RAW 264.7,用不同浓度的芹菜素处理后,加入 LPS 刺激 0~16 h。Western blot 检测血红素氧合酶-1(HO-1)的表达以及 c-Src 和 NADPH 氧化酶 p47<sup>phox</sup> 亚基的磷酸化;荧光探针 H<sub>2</sub>DCFDA 检测活性氧(ROS)的产生;ELISA 检测 TNF-α 和 IL-6 的产生。 **结果** 芹菜素作用 RAW 264.7 细胞 30 min 即可诱导 c-Src 和 NADPH 氧化酶亚基 p47<sup>phox</sup> 磷酸化。采用 50 μmol/L c-Src 抑制剂 PPI 预处理细胞后,p47<sup>phox</sup> 磷酸化水平明显降低。同时,芹菜素能上调 RAW264.7 细胞内 ROS 的含量,而 NADPH 氧化酶抑制剂 DPI 可抑制其产生。芹菜素也能诱导 RAW264.7 细胞表达 HO-1,而采用 PPI、DPI 或 ROS 抑制剂 N-乙酰半胱氨酸(NAC)预处理细胞后,HO-1 表达水平明显降低。此外,芹菜素处理能下调 LPS 诱导 RAW264.7 细胞分泌 TNF-α 和 IL-6,而采用 siRNA 沉默 HO-1 表达后,能在一定程度上降低芹菜素对细胞因子的抑制效应。 **结论** 芹菜素可能通过激活 c-Src/NADPH 氧化酶/ROS 通路诱导 HO-1 表达,从而抑制小鼠巨噬细胞过度分泌细胞因子。

**关键词:** 芹菜素;血红素氧合酶-1;小鼠巨噬细胞

中图分类号:R967 文献标识码:A

## Apigenin Induces HO-1 Expression by c-Src/NADPH Oxidase/ROS to Protect Against Excessive Cytokines Secretion in Murine Macrophages

ZENG Saili, WU Guang, XIE Li, et al

(Department of Respiratory Medicine, The Second Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang 421001, Hunan, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the effect and the mechanism of Apigenin on lipopolysaccharides (LPS)-induced cytokines production in murine macrophages. **Methods** The murine macrophage cell line RAW 264.7 cells were cultured in vitro, and were treated with different concentration of Apigenin followed by LPS stimulation. Expression of heme oxygenase-1 (HO-1), phosphorylation of c-Src and p47<sup>phox</sup>, the subunit of NADPH oxidase were detected by Western blot; The intracellular formation of reactive oxygen species (ROS) was detected by using the fluorescent probe H<sub>2</sub>DCFDA; Secretion of TNF-α and IL-6 were detected by ELISA. **Results** Western blot indicated that phosphorylated c-Src and p47<sup>phox</sup> were induced by apigenin after 30min of incubation. While 50 μmol/L of PPI, an inhibitor of c-Src, could significantly inhibit p47<sup>phox</sup> phosphorylation. In addition, Apigenin could also induce RAW264.7 cells accumulation of ROS, and this effect could be abrogated by the NADPH oxidase inhibitor, DPI. HO-1 could be induced by Apigenin, and pretreatment of PPI, DPI and the ROS scavenger N-acetyl-cysteine (NAC) could block HO-1 production. Furthermore, apigenin could inhibit LPS-induced secretion of TNF-α and IL-6, and transfection of HO-1 siRNA could antagonize this action. **Conclusion** Apigenin can induce HO-1 expression by c-Src/NADPH oxidase/ROS to protect against excessive cytokines secretion in murine macrophages.

**Key words:** Apigenin; Heme oxygenase-1; Murine macrophages

脓毒血症是指各种致病性微生物或其毒性产物持续存在于血液或组织中,并引起全身炎症反应和器官功能损害为特征的一种临床综合征,全球每年发病人数可达1800万以上。在美国,脓毒血症在ICU中的发病率可达30%~50%。革兰阴性细菌的脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)是引起脓毒血症最常见的致病物质<sup>[1]</sup>。早期革兰阴性细菌感染后,可通过固有免疫系统识别LPS,随后迅速激活单核、巨噬细胞系统,并诱导多种促炎细胞因子如TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6以及一氧化氮、巨噬细胞趋化蛋白-1等物质的产生,从而促进免疫系统清除病原体<sup>[2]</sup>。但如果致炎因素持续存在或炎症失控,最终可导致严重的组织损伤以及多器官功能衰竭<sup>[3,4]</sup>。传统治疗急性炎症反应主要采用固醇类和非甾体类药物,但由于这些药物副作用严重而使其应用受限<sup>[5]</sup>,因此寻求新的抗炎辅助药物对各类炎症相关疾病的治疗具有重要意义。

芹菜素(apigenin, APG)是广泛分布于水果、蔬菜(尤其是芹菜、大蒜和大白菜)中的一种黄酮类化合物,具有抗肿瘤、抗血小板聚集、抗氧化等多种生物学作用<sup>[6]</sup>。此外,体内实验也表明APG具有一定的抗炎效应。如,Wang等研究发现,APG可通过ERK途径抑制巨噬细胞分泌TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ <sup>[7]</sup>。此外,APG也可诱导小鼠原代肝细胞表达血红素氧合酶-1(Heme oxygenase-1, HO-1),同时也能抑制尼古丁和LPS诱导牙周韧带细胞分泌炎症细胞因子<sup>[8]</sup>。也有研究表明,APG能抑制NF- $\kappa$ B的活性<sup>[6]</sup>,但APG是否还存在其它的作用机制目前仍不明了。本研究旨在观察APG对LPS诱导巨噬细胞分泌细胞的影响,并初步探索其分子机制。

## 1 材料与方法

**1.1 试剂** DMEM培养基、胎牛血清购自Invitrogen; APG、 $\beta$ -actin多克隆抗体为Sigma-Aldrich产品。鼠抗人p-c-Src, p-p47<sup>phox</sup>以及鼠抗人total-Src和total-p47<sup>phox</sup>购自Cell Signaling。抗血红素氧合酶-1(Heme oxygenase-1, HO-1)、以及各类二抗购自Santa Cruz。二亚苯基碘(Diphenyleneiodonium, DPI)、N-乙酰-半胱氨酸(N-acetyl-cysteine, NAC)以及2',7'-二氯二氢荧光黄二乙酸酯(2',7'-dichlo-

rodihydrofluorescein diacetate, H<sub>2</sub>DCFDA)、钴原卟啉(Cobalt protoporphyrin, CoPP)购自Sigma-Aldrich。HO-1 siRNA购自Santa Cruz, TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$  ELISA试剂盒购自R&D System。磷酸酶、蛋白酶抑制剂购自Roche, siRNA转染试剂盒购自Qiagen。

**1.2 细胞培养与处理** RAW 264.7细胞(ATCC)用含10%胎牛血清, 100 U/mL青霉素和100 mg/mL链霉素, 4.5 mg/mL L-谷氨酰胺以及4.5 g/mL的DMEM培养基中,于37℃, 5% CO<sub>2</sub>条件下培养。2~3 d换液一次,待细胞生长至密度为80%时,根据不同的实验目的,细胞加入不同浓度的APG作用0~16 h,或随后加入1  $\mu$ g/mL LPS刺激8 h。

**1.3 细胞总蛋白提取** 细胞处理结束后的细胞用冰冷PBS(pH7.4)漂洗1次,随后加入100  $\mu$ L裂解缓冲液A(10 mmol/L HEPES pH 7.9, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mmol/L DTT, 5  $\mu$ mol/L亮抑蛋白酶肽, 2  $\mu$ mol/L胃酶抑素A, 1  $\mu$ mol/L抑肽酶, 20  $\mu$ mol/L PMSF和1 $\times$ 磷酸酶抑制剂混合物),通过反复冻融以充分裂解细胞。随后1 000  $\times$  g离心10 min,获取上清再次离心15 min(10 000  $\times$  g)后即得胞浆总蛋白。

**1.4 Western blot** 采用含有蛋白酶抑制剂的RIPA缓冲液(25 mmol/L Tris-HCl pH7.4, 150 mmol/L NaCl, 1% NP-40, 1% SDS)裂解细胞,并用Bradford法于595 nm波长处测定蛋白浓度。取等量蛋白经8%~10% SDS-PAGE后,转印至PVDF膜上,用5%脱脂奶粉封闭后,分别加入一抗和HRP标记二抗孵育,ECL显影。

**1.5 ROS测定** 以H<sub>2</sub>DCFDA为荧光探针检测细胞内ROS水平。其原理是不发荧光的H<sub>2</sub>DCFDA能被过氧化物、氢过氧化物等氧化分解为二氯荧光黄而产生荧光,通过测定荧光的强度来反应ROS的含量。即,细胞中加入终浓度5  $\mu$ mol/L的H<sub>2</sub>DCFDA染液,37℃避光孵育30 min。PBS洗细胞3次,重悬细胞,荧光分光光度计(SynergyHT, Bio-Tek)测量荧光强度(激发波长485 nm,发射波长530 nm),计算荧光的相对值(Relative fluorescence intensity)。

**1.6 TNF- $\alpha$ 和IL-6测定** 当生长于6孔板中的细胞长满80~90%视野时,弃培养基,并加入不同

浓度的 APG 作用 1 h 后加入 LPS 作用 8 h。操作方法按照试剂盒提供的双抗体夹心法进行。通过测定 450 nm 处的吸光度值,并根据标准曲线计算分泌至细胞外的 TNF- $\alpha$  和 IL-6 含量。

**1.7 细胞转染** 约  $5 \times 10^5$  细胞接种于 60 mm 培养皿中 18 ~ 24 h。随后按照 Qiagen 提供的操作步骤,将 100 nmol/L HO-1 siRNA 或对照 siRNA 混合物孵育细胞。孵育 4h 后,用 PBS 漂洗细胞,换成完全培养基培养用于下一步研究。

**1.8 统计学分析** 所有实验数据重复 3 次,应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,并采用单因素方差分析数据,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 APG 诱导 RAW264.7 细胞 c-Src 磷酸化

采用 20  $\mu\text{mol/L}$  APG 作用 RAW264.7 细胞 30 min 即可诱导 RAW264.7 细胞中 c-Src 磷酸化,60 min 后达到峰值,随后逐渐降低并持续至 4 h,而细胞内总 c-Src 含量保持恒定(图 1)。

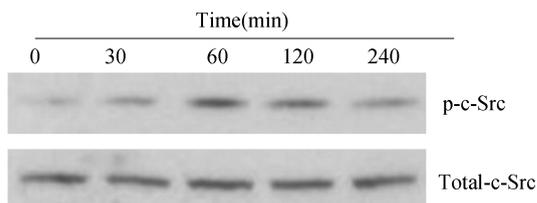


图 1 APG 诱导 RAW 264.7 细胞 c-Src 磷酸化

### 2.2 APG 诱导 RAW264.7 细胞中 NADPH 氧化酶 p47<sup>phox</sup> 亚基磷酸化

Western blot 结果显示,空白对照组细胞 NADPH 氧化酶亚基 p47<sup>phox</sup> 磷酸化水平极低,20  $\mu\text{mol/L}$  APG 孵育 30 min 后,磷酸化 p47<sup>phox</sup> 有所增加,1 h 后达到峰值。而同时采用 50  $\mu\text{mol/L}$  c-Src 抑制剂 PPI 处理细胞 1 h 后,p47<sup>phox</sup> 磷酸化水平明显降低(图 2)。

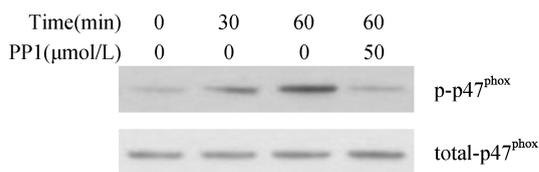


图 2 APG 经 c-Src 诱导 p47<sup>phox</sup> 亚基磷酸化

### 2.3 APG 激活 NADPH 氧化酶诱导 ROS 产生

20  $\mu\text{mol/L}$  APG 处理 RAW264.7 细胞 4 h 后,可有效增加细胞内 ROS 的含量。而细胞在 APG 处理前给予 10  $\mu\text{mol/L}$  DPI 预处理 1 h,结果显示 ROS 含量明显降低(图 3)。

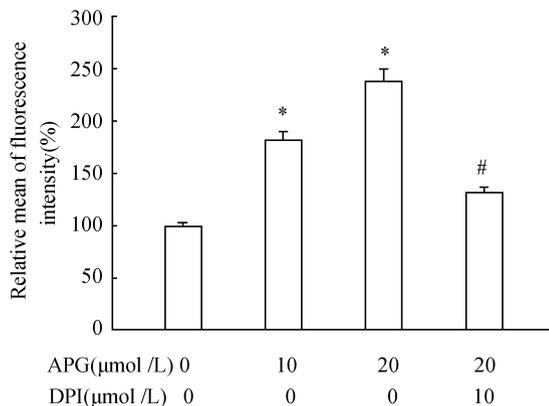


图 3 APG 与 DPI 对 ROS 产生的影响 与对照组(0  $\mu\text{mol/L}$  APG)相比,\*  $P < 0.05$ ;与 20  $\mu\text{mol/L}$  APG 相比,# $P < 0.05$

### 2.4 APG 对 HO-1 表达的影响

0 ~ 20  $\mu\text{mol/L}$  APG 作用 RAW264.7 细胞 16 h 后,可显著诱导其表达 HO-1,并且呈一定的剂量依赖性(图 4A)。随后用 20  $\mu\text{mol/L}$  APG 作用细胞 4 h 后即可诱导 RAW264.7 细胞表达 HO-1,随 APG 作用时间的延长,HO-1 表达水平逐渐递增,持续到 12 h ~ 16 h(图 4B)。

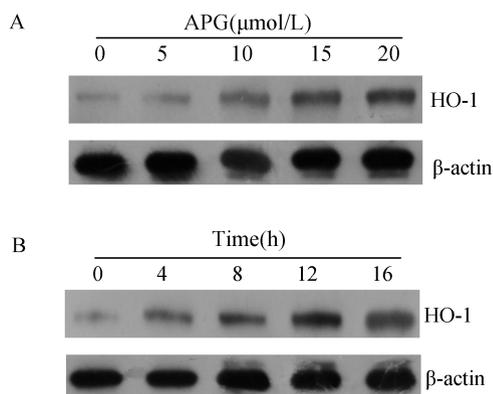


图 4 APG 诱导 RAW 264.7 细胞表达 HO-1 A. 不同浓度 APG 诱导 RAW264.7 细胞表达 HO-1;B. 20  $\mu\text{mol/L}$  APG 在不同时间内诱导 RAW264.7 细胞表达 HO-1

### 2.5 APG 经 c-Src/NADPH 氧化酶/ROS 诱导 HO-1 表达

RAW264.7 细胞在 APG 处理前,分别用 50  $\mu\text{mol/L}$  c-Src 抑制剂 PPI、10  $\mu\text{mol/L}$  NADPH 氧

化酶抑制剂 DPI 和 10 mmol/L ROS 抑制剂 NAC 预处理 1 h, 随后再用 20  $\mu\text{mol/L}$  APG 孵育 16 h。结果显示, PP1、DPI 和 NAC 处理后, HO-1 蛋白表达水平显著降低(图 5)。

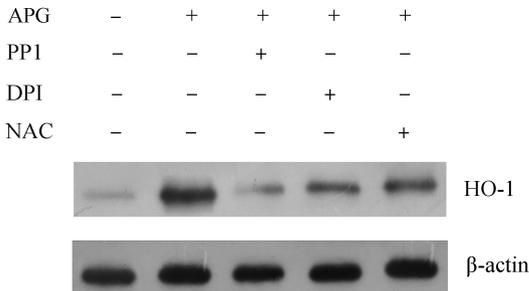


图 5 PP1、DPI、NAC 对 APG 诱导 HO-1 表达的影响

**2.6 APG 上调 HO-1 表达从而负调控 TNF- $\alpha$  和 IL-6 过度分泌** RAW264.7 细胞经 APG 处理后, 可显著下调 LPS 诱导其分泌 TNF- $\alpha$  和 IL-6。而 RAW264.7 细胞采用 siRNA 干扰 HO-1 表达后, 与未转染组相比, TNF- $\alpha$  和 IL-6 含量明显增高。此外, LPS 刺激前采用 10  $\mu\text{mol/L}$  HO-1 激动剂 CoPP 诱导 4 h 也得到了类似结果(图 6)。

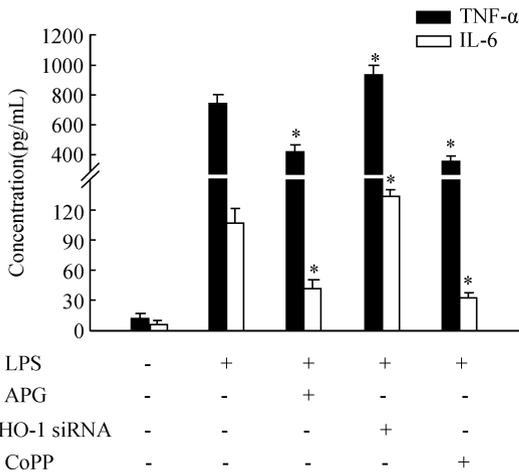


图 6 HO-1 对 TNF- $\alpha$  和 IL-6 分泌的影响 与 LPS 相比, \*  $P < 0.05$

### 3 讨 论

巨噬细胞在各种病原微生物引起的炎症反应中发挥重要作用。各种细菌和病毒均可活化巨噬细胞并诱导其分泌一系列炎症细胞因子和介质。尽管在

急性期这些物质对清除病原体感染、维持机体的稳态方面具有积极作用, 但巨噬细胞的持续活化也是引起各种病理性损伤的重要原因<sup>[3]</sup>。因此采用药物干预炎症反应发生的强度, 是有效预防各类病理损伤的重要途径。HO-1 是催化血红素降解为胆红素、 $\text{Fe}^{2+}$  和 CO 的限速酶, 又称为热休克蛋白 32。HO-1 为诱导型, 多种病理生理状态可诱导其表达等<sup>[9]</sup>。Stuart 等研究表明, LPS 通过上调 HO-1 的表达, 从而抑制单核细胞系 THP-1 过度分泌细胞因子<sup>[10]</sup>。此外, 在动物模型中, 诱导 HO-1 表达可调节流感病毒引起的免疫反应<sup>[11]</sup>。而 HO-1 基因敲出动物对氧化应激以及多器官功能衰竭的敏感性增加<sup>[12]</sup>, 因此 HO-1 的表达可能是宿主细胞免受氧化应激与炎症损伤的一种获得性保护机制。在本研究当中, 我们证实 APG 能上调 HO-1 的表达。但其调控机制尚不明了。一般认为, HO-1 的表达主要受核转录因子 Nrf2 的调控, 此外, PKC, PI3K/Akt 和 NADPH 氧化酶也参与了 HO-1 的表达<sup>[13]</sup>。为了进一步探讨 APG 的调控机制, 本研究对 HO-1 可能的调控分子进行了观察。c-Src 是一种非受体酪氨酸蛋白激酶, c-Src 未激活时, 其 527 位酪氨酸残基 (Tyr527) 处于磷酸化状态而使 c-Src 呈空间卷曲。各种因素导致 c-Src 激活后, Tyr527 发生去磷酸化, 同时诱导其 Tyr416 残基磷酸化而使 c-Src 处于开放构象而激活<sup>[14]</sup>。有研究显示, 多种病原体致病物质可通过激活 c-Src 而诱导 HO-1 表达<sup>[15]</sup>。本研究也证实, 巨噬细胞经 APG 处理 30min 后即可检测出磷酸化 c-Src。c-Src 激活后能发挥广泛的酪氨酸激酶作用, 如激活 NADPH 氧化酶/ROS 信号通路而诱导多种抗氧化、抗炎症相关蛋白的表达<sup>[15]</sup>。NADPH 氧化酶是一个多组分活化的酶复合体, 主要由质膜结合成分 (包括 gp91<sup>phox</sup>, p22<sup>phox</sup>, 小 GTP 酶结合蛋白 Rap1A) 及胞浆成分组成 (p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup>, 小 GTP 酶结合蛋白 Rac2, Cdc42 等) 组成。外源性因素刺激下可诱导 NADPH 氧化酶胞浆亚基 p47<sup>phox</sup> 磷酸化, 随后转位到质膜或颗粒体膜, 从而组装成有功能的 NADPH 氧化酶。因此 p47<sup>phox</sup> 的磷酸化是 NADPH 氧化酶激活的标志<sup>[16]</sup>。在人体单核、巨噬细胞或中性粒细胞中, NADPH 氧化酶可通过一系列电子传递催化 ROS 的生成 (氧化爆发), 这是氧化应激或炎症条件下 ROS 的主要来源。ROS 是生物体内产生的活性含氧化合物的总称, 包括超氧阴离子 ( $\text{O}_2 \cdot^-$ )、过氧化氢 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )、羟自由基 ( $\text{HO} \cdot$ )、一氧化氮 ( $\text{NO} \cdot$ ) 等。过量的 ROS 可引起细胞大分子的氧化损伤, 适

量的 ROS 是调节细胞生理功能状态的重要信号分子。本研究结果显示,APG 处理后可诱导 p47<sup>phox</sup> 磷酸化,并能诱导细胞内 ROS 产生。且采用 c-Src 抑制剂 PP1 处理后,p47<sup>phox</sup> 磷酸化水平明显降低。此外,采用 NADPH 氧化酶抑制剂 DPI 处理后,ROS 含量也明显减少,表明 APG 处理后可激活 c-Src/NADPH 氧化酶/ROS 通路。最后,分别采用 c-Src、NADPH 氧化酶、ROS 抑制剂 PP1、DPI 和 NAC 处理细胞后,HO-1 的表达显著降低。这表明 APG 诱导 HO-1 的表达受 c-Src/NADPH 氧化酶/ROS 调控。

HO-1 可通过多种机制发挥对细胞的保护作用及免疫调控作用。为了进一步探讨为了明确 HO-1 在负调控炎症反应中的作用,本研究通过靶向沉默 HO-1 表达以及药物诱导的方式对 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的分泌进行了观察。RNA 干扰 HO-1 表达后,与单纯 LPS 处理相比,TNF- $\alpha$  和 IL-6 分泌显著增高。同时采用 CoPP 诱导 HO-1 表达后,TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  水平再次降低。以上结果表明 HO-1 表达能在一定程度上调控炎症反应的强度,从而发挥对免疫功能的调控。

总之,本研究证实 APG 对 LPS 诱导巨噬细胞分泌细胞因子具有抑制作用。APG 通过激活 c-Src/NADPH 氧化酶/ROS 信号通路,从而诱导 HO-1 的表达。当然,除了 NADPH 氧化酶以及 ROS 外,HO-1 的表达还受 PI3K/Akt 以及蛋白激酶 C 的调控,在随后的研究当中我们将会对其开展更深一步探讨。

#### 参考文献:

[1] Park BS, Lee JO. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes [J]. *Exp Mol Med*, 2013, 45:e66.

[2] Roger T, Delaloye J, Chanson AL, et al. Macrophage migration inhibitory factor deficiency is associated with impaired killing of gram-negative bacteria by macrophages and increased susceptibility to *Klebsiella pneumoniae* sepsis[J]. *J Infect Dis*, 2013, 207(2):331-339.

[3] Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders [J]. *Nature*, 2006, 444(7121):860-867.

[4] Rosenblat JD, Cha DS, Mansur RB, et al. Inflamed moods: a review of the interactions between inflammation and mood disorders [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2014, 53:23-34.

[5] Walker JS, Nguyen TV, Day RO. Clinical response to non-steroidal anti-inflammatory drugs in urate-crystal induced inflammation: a simultaneous study of intersubject and in-

trasubject variability [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 1994, 38(4):341-347.

[6] Lefort EC, Blay J. Apigenin and its impact on gastrointestinal cancers [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2013, 57(1):126-144.

[7] Wang J, Liao Y, Fan J, et al. Apigenin inhibits the expression of IL-6, IL-8, and ICAM-1 in DEHP-stimulated human umbilical vein endothelial cells and in vivo [J]. *Inflammation*, 2012, 35(4):1466-1476.

[8] Huang CS, Liu CK, Lin AH, et al. Protection by chrysin, apigenin, and luteolin against oxidative stress is mediated by the Nrf2-dependent up-regulation of heme oxygenase 1 and glutamate cysteine ligase in rat primary hepatocytes [J]. *Arch Toxicol*, 2013, 87(1):167-178.

[9] 游晓星, 马小华, 刘良专, 等. 支原体脂肽经 TLR2, 6/c-Src/PI3K 通路诱导单核细胞表达血红素氧合酶-1 [J]. *中国免疫学杂志*, 2014, 30(5):587-590.

[10] Rushworth SA, MacEwan DJ, O'Connell MA. Lipopolysaccharide-induced expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 and heme oxygenase-1 protects against excessive inflammatory responses in human monocytes [J]. *J Immunol*, 2008, 181(10):6730-6737.

[11] Cummins NW, Weaver EA, May SM, et al. Heme oxygenase-1 regulates the immune response to influenza virus infection and vaccination in aged mice [J]. *FASEB J*, 2012, 26(7):2911-2918.

[12] Gozzelino R, Jeney V, Soares MP. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1 [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2010, 50:323-354.

[13] Zou W, Chen C, Zhong Y, et al. PI3K/Akt pathway mediates Nrf2/ARE activation in human L02 hepatocytes exposed to low-concentration HBCDs [J]. *Environ Sci Technol*, 2013, 47(21):12434-12440.

[14] Byeon SE, Yi YS, Oh J, et al. The role of Src kinase in macrophage-mediated inflammatory responses [J]. *Mediators Inflamm*, 2012, 2012:512926.

[15] Lee IT, Wang SW, Lee CW, et al. Lipoteichoic acid induces HO-1 expression via the TLR2/MyD88/c-Src/NADPH oxidase pathway and Nrf2 in human tracheal smooth muscle cells [J]. *J Immunol*, 2008, 181(7):5098-5110.

[16] Pick E. Role of the Rho GTPase Rac in the activation of the phagocyte NADPH oxidase: outsourcing a key task [J]. *Small GTPases*, 2014, 5:e27952.