

肌动蛋白在体外与 p38 激酶结合 并抑制其激酶活性*

杨 琨

(中山医科大学分子医学研究中心, 广州 510080)

姜 勇

(第一军医大学全军休克微循环重点实验室, 广州 510515)

韩家淮

(Department of Immunology, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA92037, USA)

顾 军**

(北京大学生命科学学院生物化学系, 北京 100871)

摘要 p38 激酶(简称 p38)参与炎症、应急、细胞生长与凋亡、细胞周期调控、缺血/再灌注损伤及心肌肥厚等生理、病理过程中的信号转导。为了研究该信号通道的分子机理和调节作用, 寻找 p38 的结合蛋白, 并检测其相互作用对激酶活性的影响, 采用体外蛋白结合试验, 在细菌内毒素或紫外辐射处理的鼠源性巨噬细胞系(RAW264.7)中, 发现有两种蛋白在体外与 p38 直接结合, 其中一种蛋白经肽质谱图鉴定为 β -肌动蛋白(β -actin), 激酶活性检测表明, actin 在体外抑制 p38 的自磷酸化活性, 并抑制 p38 对其底物 ATF2 的磷酸化作用。提示 actin 与 p38 的结合在体内可能产生一种负反馈作用, 调节 p38 通路的信号转导, 从而调节细胞功能。

关键词 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK) p38 激酶 肌动蛋白 蛋白-蛋白相互作用

真核细胞中, 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通道担负着将胞外各种有丝分裂和应急信号传递至胞核, 并调节基因表达的重要使命^[1], p38 信号通道是其中的重要分支^[2]。p38 通过其底物 ATF2 介导炎症信号是其主要功能之一^[3]。人们发现, 抑制 p38 的激活可阻断炎症信号的传递, 从而减轻炎症反应^[4]。近年来人们致力于寻找适用于临床的 p38 特异性抑制剂^[5~7], 也发现 PKC 和 G 蛋白信号调节因子可抑制 p38 的活性^[8~10]。研究 p38 信号通道中内源性的反馈抑制环节, 有助于阐明该信号通道的调节机理, 并为发现治疗炎症相关疾病的药物提供新的思路。

利用体外蛋白结合试验^[11], 发现巨噬细胞中的 β -肌动蛋白(β -actin)在体外能与 p38 结合。进一步的激酶活性检测表明, actin 在体外能抑制 p38 自磷酸化的活性, 并抑制 p38 对其底物 ATF2 的磷酸化作用。由于 actin 是 p38 信号通道中的下游成员^[12], 因此我们的研究提示, actin 在体内可能对 p38 介导的信号转导过程具有负反馈调节作用。

2002-01-19 收稿, 2002-02-26 收修改稿

* 国家自然科学基金重点资助项目(批准号: 39730140)

** 联系人, E-mail: gj@pku.edu.cn

1 材料与方法

1.1 6 × His-p38 重组质粒的转化、表达及 6 × His-p38 重组蛋白的纯化^[13]

将 6 × His-p38 重组质粒(载体为 pET14b)^[13]转化 *E. coli* BL21(DE3)感受态菌株,待转化菌斑长出后,挑一单菌落,接种于 5 mL 2 × YT(Amp⁺)培养液中,37℃振荡培养过夜,然后按 1 : 100 稀释,放大培养至 $A_{600}=0.6\sim 0.8$ 时,加 IPTG(异丙基硫代- β -D-半乳糖苷,终浓度为 1 mmol/L),继续振荡培养 2~3 h. 取 1 mL 培养液,离心去上清,在沉淀中加 Laemmli 上样缓冲液,SDS-PAGE(采用 BioRad 微型垂直电泳系统)检测 6 × His-p38 重组蛋白的表达.

离心收集上述经 IPTG 诱导培养的菌体($8000 \times g$, 10 min, 4℃),每 100 mL 细菌培养液收集的菌体重悬于 5 mL 结合缓冲液,在冰上超声裂解细菌细胞,离心除去细胞壁($10000 \times g$, 15 min, 4℃),将上清转入装有 Ni²⁺-NTA-agarose(Qigen 产品)的层析柱(10 × 100 mm)中(每 100 mL 细菌培养液收集的菌体用 0.5 mL Ni²⁺-NTA-agarose),然后用 10 mL 冲洗缓冲液洗涤,再用洗脱缓冲液洗脱 6 × His-p38 重组蛋白(每次收集 0.5 mL 洗脱缓冲液),经 SDS-PAGE 电泳后,用岛津 CS-930 薄层扫描仪在 580 nm 波长下对凝胶上的蛋白条带扫描,确定蛋白纯度,透析后用于激酶活性检测.

1.2 GST-ATF2 重组质粒^[14]的转化、表达及 GST-ATF2 重组蛋白的纯化^[15]

GST-ATF2 重组质粒转化 *E. coli* BL21(DE3)菌株后,按上述方法摇菌、扩大培养、IPTG 诱导,每 100 mL 细菌培养液收集的菌体重悬于 10 mL 裂解缓冲液,在冰上超声裂解细菌细胞,离心除去细胞壁($10000 \times g$, 15 min, 4℃),收集上清,转入装有 1 mL 50% Glutathione-agarose beads 的层析柱中(先用 5 mL 裂解缓冲液洗涤 beads),用 5 mL 裂解缓冲液洗去非结合蛋白,再用 3 mL 洗脱缓冲液洗脱 GST-ATF2 重组蛋白(每次收集 0.5 mL 洗脱缓冲液),SDS-PAGE 和薄层扫描检测纯度,透析后用于激酶活性检测.

1.3 p38 体外激酶活性检测

p38 体外激酶活性检测参考文献[13].

1.4 p38 亲和磁珠的制备

p38 亲和磁珠的制备参考文献[11].

1.5 细胞培养与刺激^[16]

鼠源性巨噬细胞系 RAW264.7 用玻璃培养瓶或玻璃培养皿在 RPMI 1640 培养基(加 10% 热灭活的新生牛血清)中培养,刺激前更换无血清培养液,加细菌内毒素(LPS, 1 ng/mL)或用紫外辐射(UV, 80 J/m²)照射后继续培养 30 min,弃去培养液,用冰预冷的 PBS 洗两次,置于冰上,加细胞裂解液(150 mL 培养瓶或 12 cm 直径培养皿加 0.5 mL 细胞裂解液^[17]: 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 120 mmol/L NaCl, 10%甘油, 1 mmol/L Na₃VO₄, 2 mmol/L EDTA, 1 mmol/L PMSF, 1% Triton X-100),裂解细胞 20 min,用细胞刮板刮下细胞,离心($12000 \times g$, 2 min, 4℃)弃去细胞碎片,细胞裂解上清贮存于-20℃备用.

1.6 蛋白结合试验^[11]

将细胞裂解上清(1 mL)与 p38 亲和磁珠(50 μ L)混合,在脱色摇床上摇动 3 h (4℃),用冲洗缓冲液洗涤磁珠两次(每次 0.5 mL),然后用 20 μ L 洗脱缓冲液洗脱 p38 及其结合蛋白,加等量 Laemmli 上样缓冲液,行 SDS-PAGE,考马斯亮蓝 R-250 染色,再经薄层扫描分析,检测 p38

的结合蛋白。

1.7 p38 结合蛋白的鉴定

从 SDS-PAGE 凝胶上切下 p38 结合蛋白带, 常温贮存于 20% 甘油中, 寄往美国 Scripps 研究院作蛋白鉴定。鉴定方法为样品经 Trypsin 消化后, 用基质辅助激光解吸离子化-飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 测定肽质谱图^[18], 将肽质谱数据输入 Internet 上的 ProFound 蛋白鉴定程序^{[19]1)}, 搜索美国国家生物信息中心 (NCBI) 的蛋白质数据库, 计算匹配概率, 得出候选蛋白。

1.8 actin 对 p38 激酶活性的影响

兔骨骼肌 actin 和牛血清白蛋白 (albumin) (均购自上海生工生物工程公司) 溶于激酶反应缓冲液, 在激酶反应体系中分别加入不同剂量的 actin 和 albumin (作为对照蛋白), 检测 p38 的体外激酶活性^[13]。

2 结果

2.1 重组 p38 和 ATF2 蛋白的表达与纯化

经 IPTG 诱导, 重组蛋白 6×His-p38 和 GST-ATF2 在细菌中得到有效表达, 分别经 Ni^{2+} -NTA 和 Glutathion agarose 亲和层析纯化后, 得到的重组 p38 (图 1(a)) 和 ATF2 (图 1(b)) 再经 12% SDS-PAGE, 然后用薄层扫描分析纯度均 > 90%。纯化后的重组蛋白用于体外蛋白结合试验和激酶活性检测。

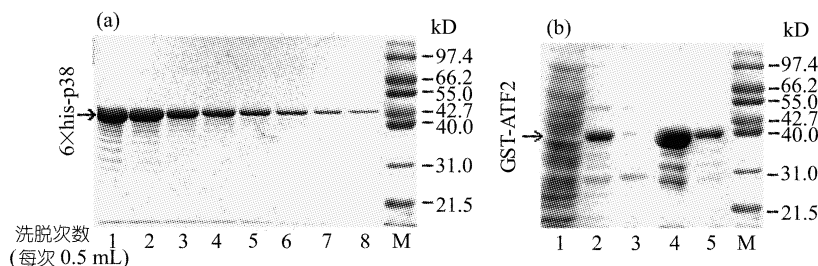


图 1 6×His-p38 和 GST-ATF2 重组蛋白的纯化

(a) 6×His-p38 重组蛋白纯化后的 SDS-PAGE 图谱。1~8 示 6×His-p38 重组纯化蛋白。(b) GST-ATF2 重组蛋白的诱导表达和纯化; 1 示未加 IPTG (无 GST-ATF2 表达); 2 示加 IPTG 诱导 (有 GST-ATF2 表达); 3 示挂柱后的流出液 (无 GST-ATF2); 4 示第 1 次洗脱 (每次 0.5 mL 洗脱液); 5 示第 2 次洗脱。M 示蛋白分子量标准

2.2 p38 激酶结合蛋白的分离

鼠源性巨噬细胞系 RAW264.7 细胞经 LPS 或 UV 刺激后, 细胞裂解上清液经 p38 亲和磁珠吸附, 可以清楚地见到两种与 p38 结合的蛋白, 相对分子质量分别约为 38 和 45 kD (图 2(a)-2 和 3), 记为 p38 结合蛋白 1 和结合蛋白 2。在对照的细胞裂解上清液中, 相应位置上依稀可见两条弱的结合蛋白条带 (图 2(a)-1), 经薄层扫描分析, 分别占 3% 和 2% (图 2(b)-1), 说明对照中也有少量的结合蛋白。

2.3 p38 结合蛋白 1 鉴定为 β -actin

MALDI-TOF MS 法测得 p38 结合蛋白 1 的肽质谱图有 37 条峰 (图 3), 说明 p38 结合蛋白 1 被 Trypsin 水解为 37 条肽链, 每条肽链的质/荷比以及鉴定的初始条件见表 1, 经

1) 网址: <http://prowl.rockefeller.edu/cgi-bin/ProFound>

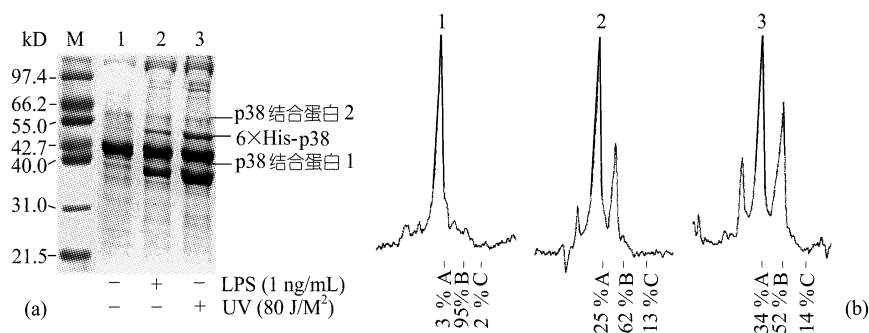


图 2 $6 \times \text{His-p38}$ 蛋白结合试验

1 示对照(无 LPS 或 UV 刺激); 2 示 LPS 刺激; 3 示 UV 刺激. (a) p38 蛋白结合试验的 SDS-PAGE 图; M 示蛋白分子量标准. (b) p38 结合蛋白的薄层扫描分析; A 示 p38 结合蛋白 2; B 示 $6 \times \text{His-p38}$; C 示 p38 结合蛋白

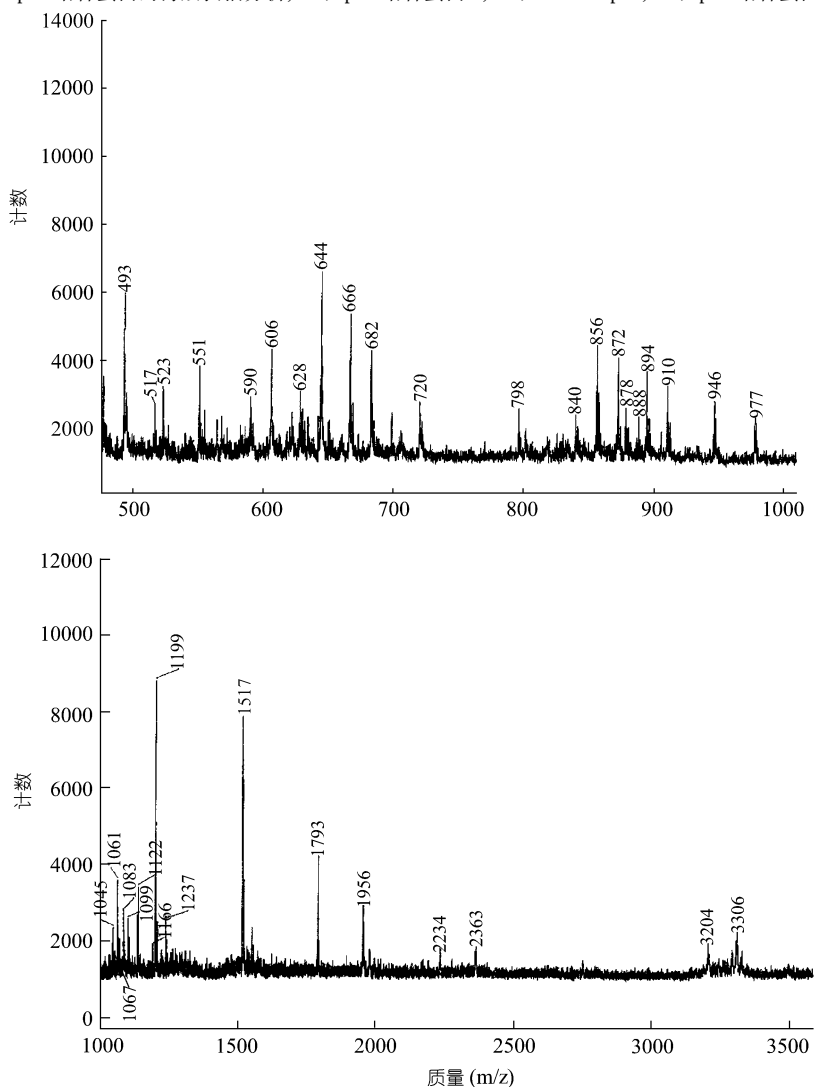


图 3 p38 结合蛋白 1 经 Trypsin 水解后的肽质谱图

ProFound 程序搜索 NCBI 的蛋白质数据库得到的候选蛋白中, 匹配概率最大的 5 个列于表 2. 其中, 与 β -actin 的匹配概率为 1, 与其他蛋白的匹配概率均很小, 据此推定 p38 结合蛋白 1 应为 β -actin.

表 1 鉴定 p38 结合蛋白 1 的初始条件

鉴定日期	: Sat Dec 1 13:38:19 2001									
数据库	: NCBIInr (更新: 05/30/2001)									
种属	: 啮齿动物									
搜索	: 单一蛋白质									
蛋白质分子量范围	: 38~40 kD									
样品标号	: Band 1									
肽链裂解方式	: 胰蛋白酶									
半胱氨酸修饰	: 无									
最大错误裂解	: 0									
误差(平均)	: 0.5%									
误差(单链)	: 0.1%									
肽链质量	: 493.00	517.00	523.00	568.00	590.00	606.00	628.00	644.00	666.00	682.00
(MH+, 单一肽链)	720.00	796.00	840.00	855.00	872.00	878.00	888.00	910.00	946.00	977.00
	984.00	1045.00	1061.00	1067.00	1083.00	1099.00	1133.00	1188.00	1199.00	1237.00
	1516.00	1791.00	1954.00	2234.00	2363.00	3204.00	3306.00			
肽链数	: 37									

表 2 鉴定 p38 结合蛋白 1 的候选蛋白(其中与 β -actin 的匹配概率为 1)

排序	概率	蛋白名称	来源	MW /kD
1	1.0×10^{-00}	gi 49868 emb CAA27396.1 (X03765) put. beta-actin (aa 27~375) (mus musculus)	mus musculus	39
2	1.6×10^{-08}	gi 90263 pir B25819 actin, fetal skeletal/adult cardiac muscle-mouse (fragment)	mus musculus	39
3	6.9×10^{-12}	gi 2117989 pir I76573 phosphoprotein phosphatase (EC 3.1.3.16) 1 catalytic chain - rat	rattus norvegicus	39
4	6.9×10^{-12}	gi 109652 pir C32550 phosphoprotein phosphatase (EC 3.1.3.16) dis2m1 - mouse	mus musculus	39
5	1.9×10^{-12}	gi 12853398 dbj BAB29733.1 (AK015165) putative (mus musculus)	mus musculus	39

2.4 actin 抑制 p38 的自磷酸化

激酶活性检测表明, p38 既能发生自磷酸化作用, 即对自身进行磷酸化(图 4(a)-1 和(b)-1), 又能使其底物 ATF2 磷酸化(图 4(c)-1 和(d)-1), 说明在原核细胞 *E. coli* 中表达的真核基因 p38 和 ATF2 都具有生物活性.

为了探讨 actin 对 p38 激酶活性的影响, 用兔骨骼肌 actin 进行了初步实验. 首先检测了兔骨骼肌 actin 对 p38 自磷酸化的影响. 在 p38 自磷酸化反应体系中, 分别加入不同剂量的 actin 和对照蛋白 albumin, 37℃反应 30 min 后电泳, 放射自显影显示, actin 对 p38 的自磷酸化活性有抑制作用, 且随着 actin 量的增加而增强(图 4(a)-2~4). 反之, 在反应体系中加入 albumin, 不表现任何抑制作用(图 4(b)-2~4), 说明 actin 可以对 p38 的自磷酸化活性产生特异性抑制作用.

2.5 actin 抑制 p38 激酶对底物 ATF2 的磷酸化

为了进一步确定 actin 对 p38 活性的影响, 测定了 actin 对 p38 使其底物 ATF2 磷酸化的影

响. 转录因子 ATF2 是 p38 的一个特异底物, p38 可以使 ATF2 磷酸化, 从而激活 ATF2. 在 p38 磷酸化 ATF2 的反应体系中, 分别加入不同剂量的 actin 和 albumin, 37℃ 反应 30 min 后电泳, 进行放射自显影检测. 结果表明, 在反应体系中加入 actin, p38 对 ATF2 的磷酸化作用受到抑制, 这种抑制也呈现剂量效应(图 4(c)-2~4), 而在反应体系中加入 albumin, 不表现任何抑制作用(图 4(d)-2~4). 这进一步表明, actin 可以抑制 p38 的激酶活性, 而且这种抑制作用是特异的.

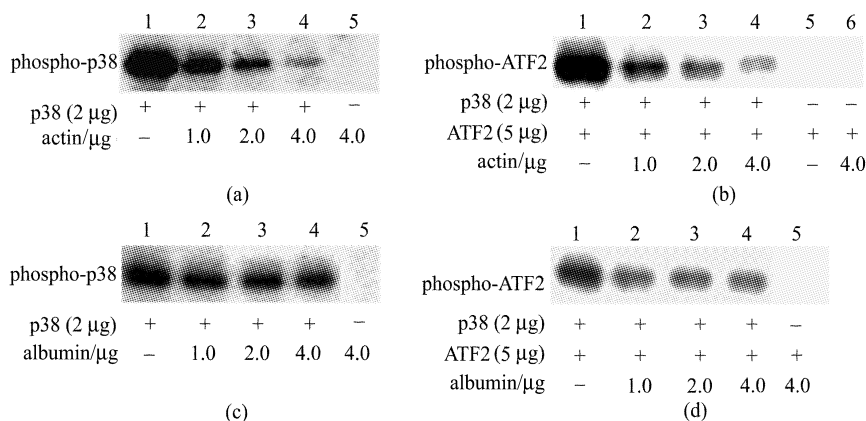


图 4 actin 对 p38 和 ATF2 磷酸化影响的放射自显影图
albumin 示对照蛋白

3 讨论

体外蛋白结合试验是分离相互作用蛋白的一种有效手段^[20]. 利用 p38 蛋白结合试验, 我们初步在体外分离了两种 p38 结合蛋白, 其中一种经 ProFound 蛋白鉴定程序推定为 β -actin.

actin 作为细胞骨架的主要成分, 参与并调节许多细胞信号的转导^[21,22], 例如, actin 参与胰岛素、肿瘤坏死因子的信号转导^[23,24], 并调节白细胞介素-1、血清应答因子的信号活性^[25,26]. 因此, actin 是一种重要的信号传递和信号调节分子^[27~29].

在 LPS 和 UV 刺激的细胞中, 单体 actin(G-actin)被磷酸化并聚合为丝状 actin(F-actin)^[30,31]. 在蛋白结合试验中, 我们观察到受 LPS 和 UV 刺激细胞中有大量的 actin 与 p38 结合, 而对照细胞中的结合量很少(图 2), 说明与 p38 结合的主要是聚合状态的 F-actin. p38 信号通道是传递 LPS 和 UV 信号的主要途径^[2], 已有实验证明, p38 的激活也可使 G-actin 磷酸化并聚合为 F-actin, 导致细胞骨架重排, 从而调节细胞的运动^[32]. 但这一过程的信号转导不是 p38 直接对 G-actin 进行磷酸化, 而是通过 p38→MAPK 激活的蛋白激酶-2→热休克蛋白 27(HSP27)→G-actin 信号途径, 由被激活的 HSP27 使 G-actin 磷酸化^[32]. 体外实验也证明, p38 不能直接使 actin 磷酸化, 因为在放射自显影检测中, 没有发现 actin 的磷酸化条带.

最近有人报道, actin 作为表皮生长因子受体(EGF-R)的结合蛋白, 参与 EGF-R 介导的信号传递, 并反馈抑制 EGF-R 信号^[33,34]. 虽然 actin 参与 p38 信号的传递, 但它又不是 p38 的直接底物, 那么它们之间的相互作用是否对 p38 信号有反馈调节作用呢?

利用兔骨骼肌 actin, 我们做了初步的 actin 对 p38 激酶活性影响的体外实验. 结果表明, actin 不仅可以抑制 p38 激酶的自磷酸化, 也能抑制 p38 激酶对底物 ATF2 的磷酸化, 且这种抑

制是 actin 特异的, 因为对照蛋白 albumin 对 p38 激酶活性不产生任何影响。

许多胞外刺激信号都可激活 p38 信号通道^[2,3], 然而, 被激活的 p38 信号通道是如何受到调控的, 特别是该通道成员之间的反馈调节到目前为止还没有报道。我们的研究提示, actin 在体外对 p38 激酶活性的抑制可能反映了体内的一种负反馈调节作用, 有可能是 p38 信号通道中的一个调控环节, 这对开发内源性的 p38 抑制剂具有重要的参考价值。因此, 有必要进一步证明在体内 p38 与 actin 的结合, 以及体内 actin 是否也能反馈抑制 p38 的激酶活性, 并阐明其生物学意义。

参 考 文 献

- 1 Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, 2001, 410(6824): 37~40
- 2 Ono K, Han J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal*, 2000, 12(1): 1~13
- 3 New L, Han J. The p38 MAP kinase pathway and its biological function. *Trends Cardiovasc Med*, 1998, 8(5): 220~228
- 4 Lee J C, Kumar S, Griswold D E, et al. Inhibition of p38 MAP kinase as a therapeutic strategy. *Immunopharmacology*, 2000, 47(2-3): 185~201
- 5 Lee J C, Kassiss S, Kumar S, et al. p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors —— mechanisms and therapeutic potentials. *Pharmacol Ther*, 1999, 82(2-3): 389~397
- 6 Badger A M, Griswold D E, Kapadia R, et al. Disease-modifying activity of SB 242235, a selective inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase, in rat adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, 2000, 43(1): 175~183
- 7 Wadsworth S A, Cavender D E, Beers S A, et al. RWJ 67657, a potent, orally active inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999, 291(2): 680~687
- 8 Zhang Z, Xin S M, Wu G X, et al. Endogenous delta-opioid and ORL1 receptors couple to phosphorylation and activation of p38 MAPK in NG108-15 cells and this is regulated by protein kinase A and protein kinase C. *J Neurochem*, 1999, 73(4): 1502~1509
- 9 Jun C D, Oh C D, Kwak H J, et al. Overexpression of protein kinase C isoforms protects RAW264.7 macrophages from nitric oxide-induced apoptosis: involvement of c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase, p38 kinase, and CPP-32 protease pathways. *J Immunol*, 1999, 162(6): 3395~3401
- 10 Zhang Y, Neo S Y, Han J, et al. RGS16 attenuates G-protein-dependent p38 mitogen-activated protein kinase activation by platelet-activating factor. *J Biol Chem*, 1999, 274(5): 2851~2857
- 11 Zimmermann B, Herberg F W. Interactions of 6 × His-tagged protein kinase A catalytic subunit examined using Ni-NTA magnetic agarose beads. *QIAGEN News*, 1998, 4: 9~10
- 12 Landry J, Huot J. Modulation of actin dynamics during stress and physiological stimulation by a signaling pathway involving p38 MAP kinase and heat-shock protein 27. *Biochem Cell Biol*, 1995, 73(9-10): 703~707
- 13 Jiang Y, Chen C, Li Z, et al. Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *J Biol Chem*, 1996, 271(30): 17920~17926
- 14 Han J, Lee J D, Jiang Y, et al. Characterization of the structure and function of a novel MAP kinase kinase (MKK6). *J Biol Chem*, 1996, 271(6): 2886~2891
- 15 Guan K L, Dixon J E. Eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli*: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase. *Anal Biochem*, 1991, 192(2): 262~267
- 16 Virca G D, Kim S Y, Glaser K B, et al. Lipopolysaccharide induces hyporesponsiveness to its own action in RAW 264.7 cells. *J Biol Chem*, 1989, 264(36): 21951~21956
- 17 Jiang Y, Gram H, Zhao M, et al. Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta. *J Biol Chem*, 1997, 272(48): 30122~30128

- 18 Pappin D J. Peptide mass fingerprinting using MALDI-TOF mass spectrometry. *Methods Mol Biol*, 1997, 64: 165~173
- 19 Zhang W, Chait B T. ProFound: An expert system for protein identification using mass spectrometric peptide mapping information. *Analytical Chemistry*, 2000, 72(11): 2482~2489
- 20 Phizicky E M, Fields S. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol Rev*, 1995, 59(1): 94~123
- 21 Machesky L M, Insall R H. Signaling to actin dynamics. *J Cell Biol*, 1999, 146(2): 267~272
- 22 Zigmond S H. Signal transduction and actin filament organization. *Curr Opin Cell Biol*, 1996, 8(1): 66~73
- 23 Tsakiridis T, Wang Q, Taha C, et al. Involvement of the actin network in insulin signalling. *Soc Gen Physiol Ser*, 1997, 52: 257~271
- 24 Peppelenbosch M, Boone E, Jones G E, et al. Multiple signal transduction pathways regulate TNF-induced actin reorganization in macrophages: inhibition of Cdc42-mediated filopodium formation by TNF. *J Immunol*, 1999, 162(2): 837~845
- 25 Zhu P, Xiong W, Rodgers G, et al. Regulation of interleukin 1 signalling through integrin binding and actin reorganization: disparate effects on NF-kappaB and stress kinase pathways. *Biochem J*, 1998, 330(Pt 2): 975~981
- 26 Sotiropoulos A, Gineitis D, Copeland J, et al. Signal-regulated activation of serum response factor is mediated by changes in actin dynamics. *Cell*, 1999, 98(2): 159~169
- 27 Goebel J, Franks A, Robey F, et al. Attenuation of IL-2 receptor signaling by CD4-ligation requires polymerized cytoskeletal actin but not P56LCK. *Transplant Proc*, 1999, 31(1-2): 822~824
- 28 Holsinger L J, Graef I A, Swat W, et al. Defects in actin-cap formation in Vav-deficient mice implicate an actin requirement for lymphocyte signal transduction. *Curr Biol*, 1998, 8(10): 563~572
- 29 Edwards D C, Sanders L C, Bokoch G M, et al. Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat Cell Biol*, 1999, 1(5): 253~259
- 30 Chakravorty D, Nanda-Kumar K S. Bacterial lipopolysaccharide induces cytoskeletal rearrangement in small intestinal lamina propria fibroblasts: actin assembly is essential for lipopolysaccharide signaling. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1500(1): 125~136
- 31 Maekawa T L, Takahashi T A, Fujihara M, et al. Effects of ultraviolet B irradiation on cell-cell interaction; implication of morphological changes and actin filaments in irradiated cells. *Clin Exp Immunol*, 1996, 105(2): 389~396
- 32 Schafer C, Ross S E, Bragado M J, et al. A role for the p38 mitogen-activated protein kinase/Hsp 27 pathway in cholecystokinin-induced changes in the actin cytoskeleton in rat pancreatic acini. *J Biol Chem*, 1998, 273(37): 24173~24180
- 33 den-Hartigh J C, van-Bergen-en-Henegouwen P M, Verkleij A J, et al. The EGF receptor is an actin-binding protein. *J Cell Biol*, 1992, 119(2): 349~355
- 34 Rijken P J, van-Hal G J, van-der-Heyden M A, et al. Actin polymerization is required for negative feedback regulation of epidermal growth factor-induced signal transduction. *Exp Cell Res*, 1998, 243(2): 254~262