

• 论 著 •

fmnl2 基因沉默抑制 SW620 体外侵袭能力的机制^{*}

朱曦龄, 黎 功, 李 黛

(中国武警总医院肿瘤二科, 北京 100039)

摘 要:目的 研究 *fmnl2* 基因沉默抑制 SW620 体外侵袭能力的机制。方法 筛选并建立 *fmnl2* 基因沉默的 SW620 细胞; 反转录(RT)-聚合酶链反应(PCR)和蛋白质印迹(Western blot)检测干扰效率; Boyden 试验检测 *fmnl2* 基因对 SW620 侵袭能力的影响。利用 Active Rho pull-down 试验和 Western blot 检测 *fmnl2* 基因沉默后, 细胞中 RhoA、RhoB、RhoC 活性和蛋白水平的变化; 利用 Western blot 检测 RhoA/Rock 信号转导通路中 3 种效应蛋白[Phospho-肌球蛋白轻链(MLC)、Phospho-LIM 激酶(LIMK)、Phospho-Cofilin]及细胞内肌动蛋白纤维(F-actin)、核内 MAL 的蛋白变化。检测 *fmnl2* 基因沉默前后, 磷脂酸(LPA)对细胞体外侵袭能力、RhoA 的活性和蛋白水平、Phospho-MLC 及 MLC 的影响。结果 *fmnl2* 基因沉默后明显抑制 SW620 体外侵袭能力。*fmnl2* 表达沉默后, 细胞中 RhoA 活性降低, 但蛋白水平没有明显变化; 细胞中 Phospho-Cofilin、Phospho-LIMK、Phospho-MLC、F-actin 和核内 MAL 的蛋白水平均减少。*fmnl2* 表达沉默后, LPA 对细胞体外侵袭能力, RhoA 活性及 Phospho-MLC 均无影响。结论 *fmnl2* 表达沉默后, 通过抑制 RhoA/Rock 信号转导通路, 会影响肿瘤细胞的侵袭运动能力。

关键词: 大肠癌; *fmnl2* 基因; DRFs 家族; 侵袭; Rho 蛋白

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2017. 22. 001 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-9455(2017)22-3279-04

Mechanism of *fmnl2* gene silencing for inhibiting in vitro invasion ability of SW620^{*}

ZHU Xiling, LI Gong, LI Dai

(Second Department of Oncology, China Armed Police General Hospital, Beijing 100039, China)

Abstract: **Objective** To explore the mechanism of *fmnl2* gene silencing for inhibiting the in vitro invasion ability of SW620. **Methods** SW620 cells with *fmnl2* gene silencing were screened and established. specific shRNA plasmid vectors as well as controls. *fmnl2* silenced cells were screened by G418. The real time fluorescence quantitative RT-PCR and Western blot analysis were used to detect the interference efficiency; the influence of *fmnl2* on SW620 invasion ability was detected by the Boyden test. The active Rho pull-down test and Western blot were used to detect the Rho A, Rho B, Rho C activity and protein level change after *fmnl2* gene silencing; the 3 kinds of effector proteins Phospho MLC, Phospho-LIMK, Phospho Cofilin, and F-actin, intranuclear MAL protein changes. The in vitro invasion ability of LPA on cells, RhoA activity and protein level, Phospho-MLC and MLE influence were detected before and after *fmnl2* gene silencing. **Results** *fmnl2* gene silencing significantly inhibited the SW620 cell invasion ability in vitro. After *fmnl2* expression silencing, the intracellular RhoA activity was decreased, but the protein level had no obvious change; the protein levels of Phospho-Cofilin, Phospho-LIMK, Phospho-MLC, F-actin and intranuclear MAL were decreased. After *fmnl2* expression silencing, LPA had no influence on the cell in vitro invasion ability, RhoA-activity and Phospho-MLC. **Conclusion** *fmnl2* silencing could influence the invasion and motor ability of tumor cells by inhibiting the RhoA/Rock signaling transduction pathway.

Key words: colorectal cancer; *fmnl2* gene; DRFs family; invasion; Rho protein

肿瘤的侵袭、转移是非常复杂的过程, 其中肌动蛋白细胞骨架是重要因素之一, 供细胞附着、伸展、运动甚至生长^[1]。肌动蛋白细胞骨架是动态结构, 受多种细胞内机制及相应蛋白的调节^[1]。Rho 是小 G 蛋白超家族的成员。研究表明, Rho-三磷酸鸟苷(GTP)酶是细胞骨架肌动蛋白的重要调节因子之一, 其作为分子开关, 能够诱导肌动蛋白细胞骨架组织发生相应改变, 以引发大量不同的生物反应(如趋化性、细胞生长和运动及细胞周期过程等)^[2]。Rho-GTP 对肿瘤的发生、发展有不可忽视的作用, 与肿瘤的侵袭和转移密切相关^[3]。*fmnl2* 属于 DRFs 家族, 该家族不仅是肌动蛋白细胞骨架的重要调节因子^[4], 并且具有能够与 Rho-GTP 相结合的结构域, 在 Rho 相关的信号转导途径中起重要作用^[5]。前期研究发现 *fmnl2* 与大肠癌的侵袭转移有一定相关性, 因此, 本研究中笔者通过建

立 *fmnl2* 稳定沉默的大肠癌细胞株, 观察沉默前后细胞 Rho 信号通路中关键蛋白表达的变化, 研究 *fmnl2* 基因在 Rho 信号通路中的作用及其影响细胞侵袭转移能力的机制。现报道如下。

1 材料和方法

1.1 一般材料 SW620 细胞株来自南方医科大学病理学研究室存种; 针对 *fmnl2* 的 shRNA 质粒载体(*fmnl2*-shRNA)和空白质粒(Pgenesil-1)由南方医科大学病理学研究室构建。*fmnl2* 和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)引物采用 Primer 5.0 软件设计; LipofectamineTM 2000 转染试剂由 Invitrogen 公司提供; 鼠抗人 *fmnl2* 单克隆抗体由 Abnova 公司提供; 磷脂酸(LPA)由 Sigma 公司提供; Rho 活性测定试剂盒和 RhoA、RhoB、RhoC 多克隆抗体由 Upstate 公司提供; 细胞核蛋白与

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30400206)。

作者简介: 朱曦龄, 女, 主治医师, 主要从事大肠癌靶向治疗方面的研究。

细胞质蛋白抽提试剂盒由上海康成生物技术研究所提供;肌球蛋白轻链(MLC)、Phospho-MLC、Phospho-LIM 激酶(LIMK)和 Phospho-Cofilin 单克隆抗体由 CST 公司提供;肌动蛋白纤维(F-actin)单克隆抗体由 GenWay 公司提供;laminB、GAPDH 单克隆抗体和 MAL 多克隆抗体由 Santa Cruz 公司提供。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 细胞株 SW620 培养于含 10% 胎牛血清(FBS)的 RPMI-1640 培养基,在 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养。

1.2.2 细胞转染及克隆筛选 使用脂质体法转染 *fmln2*-shRNA 和 Pgenesil-1 质粒进入 SW620 细胞中,将转染后细胞孵育 48 h 后加入含遗传霉素(G418)的培养液中进行筛选。抗性克隆长出后扩大培养,最后获得稳定克隆。稳定转染的 *fmln2* 基因干扰质粒的细胞作为试验组(称为 SW620-sh*fmln2*),空白组称为 SW620-mock,对照组为 SW620。获得稳定转染的细胞经鉴定后行后续试验。

1.2.3 反转录(RT)-聚合酶链反应(PCR) 用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA,进行 RT 反应。以 GAPDH 为内参进行实时荧光定量 PCR 试验,应用 Mx3000P 定量 PCR 仪,以 Folds = $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示试验组与对照组目的基因表达的倍比关系,重复 3 次试验,计算平均值。引物序列:GAPDH 为 5'-ACG GAT TTG GTC GTA TTG GGC G-3'、5'-CTC CTG GAA GAT GGT GAT GG-3',扩增产物 212 bp;*fmln2* 为 5'-TAA TCA GCA TTA GCA TTT CTG AGG-3'、5'-AGG AGA GTA AGG CCA GGT TCC-3',扩增产物 145 bp。

1.2.4 蛋白质印迹(Western blot) 裂解细胞并且提取总蛋白,行十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)。采用湿转法转至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上。PVDF 膜用封闭后,加入鼠抗人 *fmln2* 单克隆抗体(1:500 稀释)和鼠抗人 GAPDH 多克隆抗体(1:200 稀释),4℃ 孵育过夜,三乙醇胺缓冲盐水溶液-吐温(TBST)洗膜后,加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗鼠二抗(1:4 000 稀释)室温孵育 1 h, TBST 洗膜后,加入化学发光试剂孵育 1 min,采用凝胶电泳成像系统进行分析。

1.2.5 细胞体外侵袭试验 300 μ L 无血清的培养液加入 Boyden 小室的上室中,孵育 1~2 h。加入 300 μ L 细胞悬液 [(0.5~1.0) $\times 10^6$ cells/mL] 于上室中,加 500 μ L 含 10% FBS 的培养液于下室中,培养 48 h 后取出小室,擦掉未穿过膜的细胞,苏木素染色。在高倍镜下,随取 5 个视野计数细胞,取其平均值。

1.2.6 Rho 活性检测 当细胞长到 80%~90% 时,LPA 处理组用 25 μ mol/L 的 LPA 刺激 1 min,弃去培养基,加入含 25 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)、150 mmol/L 氯化钠、10 mmol/L 氯化镁、1 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)、2 μ g/mL Aprotinin、2 μ g/mL Leupeptin、1 mmol/L 苯甲基磺酰氟(PMSF)、5 mmol/L 磷酸酶抑制剂的适量冰冷裂解缓冲液(MLB)于细胞表面,用细胞刮刀将细胞从瓶壁上刮离。离心 5 min 后,收集上清液。在细胞裂解液中加入 Rhotekin RBD 琼脂糖,在 4℃ 轻轻搅拌 45 min,通过短暂的离心形成琼脂小球,然后行 12% SDS-PAGE,电泳完毕后,采用湿转法转至 PVDF 膜上。封闭后,分别加入鼠抗 RhoA、RhoB、RhoC 多克隆抗体 4℃ 孵育过夜, TBST 洗膜后,加入 HRP 标记的抗鼠二抗室温孵育,进行显影、定影并扫描记录。采用 FLA5100 分子成像仪扫描图像,并采用其分析软件 Lprocess(Ver. 2.2)计算目的蛋

白条带的灰度值,进而评估 RhoA、RhoB、RhoC 的活性。

1.2.7 Rho 总蛋白检测 细胞中 RhoA、RhoB、RhoC 蛋白的水平检测使用 Western blot 法,步骤如上所示。

1.2.8 核蛋白与浆蛋白的制备 具体步骤见说明书。

1.2.9 细胞中 Phospho-MLC、Phospho-LIMK、Phospho-Cofilin、F-actin 和核内 MAL 蛋白水平的检测 采用二喹啉甲酸(BCA)法测量以上制备的细胞质和胞核蛋白水平,Western blot 分别检测细胞中 Phospho-MLC、Phospho-LIMK、Phospho-Cofilin、胞核内 MAL 和细胞质内 F-actin 的蛋白水平,步骤同前。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计学软件进行分析,析因设计的方差检验用于体外侵袭试验。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实时荧光定量 PCR 及 Western blot 检测 *fmln2* 的表达

利用实时荧光定量 RT-PCR 检测的表达情况,SW620 相对量为 $0.982 2 \pm 0.089 0$,SW620-mock 相对量为 $0.973 5 \pm 0.074 0$,SW620-sh*fmln2* 相对量为 $0.225 6 \pm 0.009 0$ 。稳定转染的 SW620-sh*fmln2* 中 *fmln2* mRNA 的表达明显下降,与 SW620-mock 比较减少了 70%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 *fmln2* 表达下调抑制 SW620 体外侵袭能力 SW620-mock 细胞的浸润力量值为 101.430 ± 6.015 ,SW620 细胞的浸润力量值为 113.120 ± 5.382 ,SW620-sh*fmln2* 细胞的浸润力量值为 67.320 ± 5.02 ,侵袭能力明显降低,差异有统计学意义($P = 0.032$),说明 *fmln2* 表达沉默明显抑制了 SW620 体外侵袭能力。

2.3 *fmln2* 表达下调抑制 RhoA 蛋白活性 Rho 活性测定试剂盒测定 SW620-mock 细胞和 SW620-sh*fmln2* 细胞 Rho 家族的活性,发现在 SW620-sh*fmln2* 细胞中 RhoA-GTP 的水平减少,RhoA 的活性降低。而 RhoB 和 RhoC 的活性没有明显变化。见图 1。

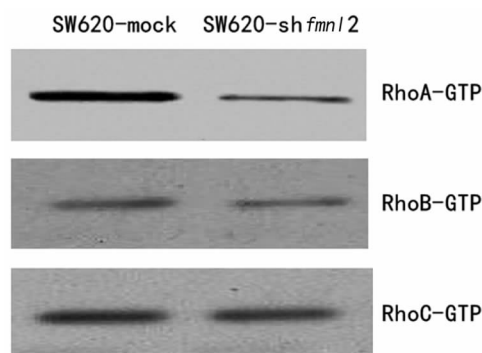


图 1 SW620-mock 和 SW620-sh*fmln2* 细胞中 RhoA、RhoB、RhoC 活性检测图

2.4 细胞中 Phospho-MLC、Phospho-LIMK、Phospho-Cofilin 蛋白的检测 通过 Western blot 检测 SW620-mock 细胞和 SW620-sh*fmln2* 细胞中 Phospho-LIMK、Phospho-MLC、Phospho-Cofilin 的蛋白水平,与 SW620-mock 细胞比较,SW620-sh*fmln2* 细胞中 Phospho-LIMK、Phospho-MLC、Phospho-Cofilin 的蛋白水平均下降。见图 2。

2.5 F-actin 及 MAL 的蛋白变化 通过 Western blot 检测 SW620-mock 细胞和 SW620-sh*fmln2* 细胞质中 F-actin 和细胞

核中 MAL 的蛋白水平,与 SW620-mock 细胞比较,SW620-sh*fmln2* 细胞中 F-actin 及 MAL 的蛋白水平均明显下降。

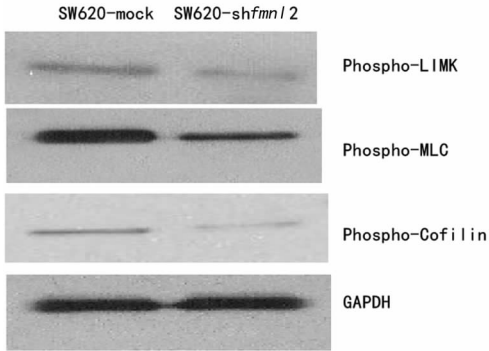


图 2 Western blot 检测 SW620-mock 和 SW620-sh*fmln2* 细胞中 Phospho-LIMK、Phospho-MLC、Phospho-Cofilin 的蛋白水平

2.6 LPA 作用后细胞体外侵袭能力的变化 Boyden 小室检测在 25 $\mu\text{mol/L}$ LPA 作用下 SW620-mock 和 SW620-sh*fmln2* 细胞体外侵袭能力的变化。LPA 作用前 SW620-sh*fmln2* 体外侵袭能力为 50.08, LPA 作用后 SW620-sh*fmln2* 体外侵袭能力为 62.41, 差异无统计学意义 ($P=0.089$)。LPA 作用前 SW620-mock 体外侵袭能力为 95.89, LPA 作用后 SW620-mock 体外侵袭能力为 195.65, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 说明 *fmln2* 基因沉默后, 明显抑制了 LPA 促进细胞侵袭的作用。

2.7 LPA 刺激后细胞内 RhoA 活性与蛋白水平的变化 25 $\mu\text{mol/L}$ 的 LPA 分别作用于 SW620-mock 和 SW620-sh*fmln2* 细胞 1 min 后, SW620-sh*fmln2* 细胞在 LPA 作用前后 RhoA 活性和蛋白水平差异无统计学意义 ($P>0.05$); 而 SW620-mock 细胞在 LPA 作用后, RhoA-GTP 的水平明显上升, RhoA 活性增强, 而 RhoA 蛋白水平没有明显变化。见图 3。

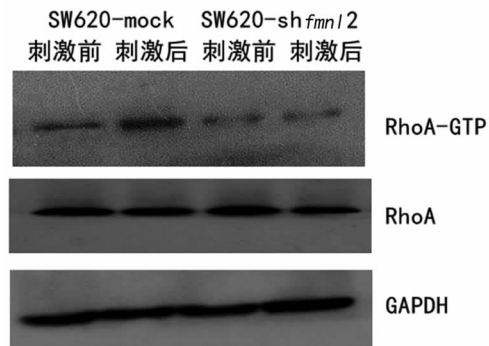


图 3 LPA 刺激后 SW620-mock 和 SW620-sh*fmln2* 中 RhoA 活性与蛋白水平的变化

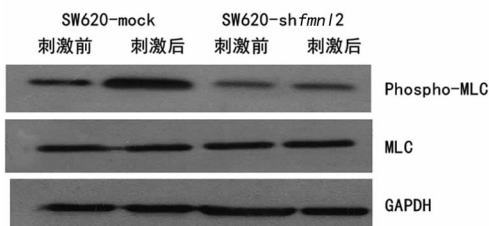


图 4 LPA 刺激后 SW620-mock 和 SW620-sh*fmln2* 中 MLC 与 Phospho-MLC 水平的变化

2.8 LPA 刺激后细胞内 MLC 与 Phospho-MLC 水平的变

化 25 $\mu\text{mol/L}$ 的 LPA 分别作用于 SW620-mock 和 SW620-sh*fmln2* 细胞 24 h 后, SW620-sh*fmln2* 细胞在 LPA 作用前后 Phospho-MLC 和 MLC 蛋白水平差异无统计学意义 ($P>0.05$); SW620-mock 细胞中在 LPA 作用后, Phospho-MLC 的水平明显上升, 而 MLC 蛋白水平没有明显变化。见图 4。

3 讨论

Rho 家族蛋白是小 G 蛋白的 Ras 超家族成员, 是一组相对分子质量为 $(20\sim30)\times10^3$ 的鸟苷酸结合蛋白, 具有 GTP 酶活性。1985 年, Rho 作为 Ras 同源物首先被克隆出来, 成为 Ras 相关单体 GTP 酶。Rho 具有 RhoA、RhoB 和 RhoC 等 3 种异构体, Rho 家族蛋白参与调节了细胞的多种生命过程, 包括肌动蛋白细胞骨架重组、细胞黏附、细胞运动、分裂及转录等^[6]。近年研究发现, Rho 家族蛋白与肿瘤的发生发展均有联系, 包括肿瘤的生长和增殖、侵袭和转移、细胞凋亡、肿瘤新生血管的形成等^[7]。Rho 家族, 特别是 RhoA 在多种肿瘤组织中表达增加, 和肿瘤恶性程度相关, 提示其在肿瘤发生和转移中具有重要作用^[8]。目前, RhoA 与恶性肿瘤侵袭、转移的关系已成为研究热点之一。

RhoA 可以被多种外界刺激信号活化, 从二磷酸鸟苷 (GDP) 结合的失活状态转变为 GTP 结合的活化状态并发生膜转位。沉默状态下游离在细胞质中的 Rho 向细胞膜聚集并与膜结合, 活化的 RhoA 将信号传递给 Rock, 使其分子中的 854 位丝氨酸和 697 位苏氨酸磷酸化而激活, 活化的 Rock 通过直接磷酸化 MLC 和抑制肌球蛋白轻链磷酸酯酶 (MLCP), 以增加 MLC 磷酸化程度, 使细胞质内磷酸化 MLC 水平提升, 肌动-肌球蛋白交联增加, 从而促进肌动蛋白微丝骨架的聚合, 激活肌球蛋白三磷酸腺苷 (ATP) 酶, 增强收缩性能, 参与张力丝和黏着斑的形成^[9]。Rock 还可以激活 LIMK, LIMK 磷酸化 Cofilin。Cofilin 是肌动蛋白丝解聚的必需成分, 其磷酸化后肌动蛋白脱聚合的活性受抑制, 增加了肌动蛋白张力丝的稳定性的^[8]。磷酸化/脱磷酸化级联反应在 RhoA/Rock 信号转导通路至关重要, 由此可调节细胞微丝骨架的聚合, 达到控制细胞收缩、趋化、移动和黏附等多种生物学行为的目的。若 RhoA/Rock 通路被抑制, 细胞的迁移和侵袭能力就会受到影响。本研究发现 *fmln2* 基因沉默后, 细胞体外侵袭能力明显降低, 同时细胞中 RhoA-GTP 酶活性降低, RhoA/Rock 信号通路下游 3 种效应蛋白 (Phospho-MLC、Phospho-LIMK、Phospho-Cofilin) 的水平降低, 由此说明 *fmln2* 表达沉默后, 通过抑制 RhoA/Rock 信号转导通路, 影响了肿瘤细胞的侵袭运动能力。

LPA 是第 1 个被发现能激活 RhoA 的物质, LPA 在多种人类癌症细胞的增殖和转移中发挥重要作用^[10]。LPA 通过跨膜的 G 蛋白耦联受体 G12/13 蛋白、1 个或多个特异性 Rho-GEF 激活 RhoA/Rock 信号通路, 诱导细胞骨架收缩和细胞圆形运动^[10]。有报道称 LPA 刺激细胞后 1 min, RhoA 的活性达到 1 个峰值^[10]。因此, 在本研究中, 笔者于 LPA 刺激 1 min 后裂解细胞, 检测 RhoA 的活性变化。笔者观察到 LPA 作用后, SW620-mock 细胞的侵袭能力明显增强, RhoA 的活性增强, Phospho-MLC 水平上升, 而 SW620-sh*fmln2* 细胞的侵袭能力无明显改变, RhoA 活性和 Phospho-MLC 无明显改变。由此, 笔者推测 *fmln2* 可能作为 RhoA/Rock 信号通路的上游蛋白, 在 LPA 诱导的 RhoA 活化环节中发挥重要作用。 *fmln2* 如何调控 RhoA 活化的机制尚不清楚, 推测 *fmln2* 可能通过结合某个 Rho 或新的相互作用蛋白, 导致 RhoA 的活化, 从而参与细胞骨架的调控。

(下转第 3286 页)

ta, 2014, 20(430):164-170.

[2] Runyon BA, AASLD. Introduction to the revised American Association for the study of liver diseases practice guideline management of adult patients with ascites due to cirrhosis[J]. Hepatol, 2013, 57(4):1651-1653.

[3] Lutz P, Nischalke HD, Strassburg CP, et al. Spontaneous bacterial peritonitis: The clinical challenge of a leaky gut and a cirrhotic liver[J]. World J Hepatol, 2015, 7(3):304-314.

[4] Preto-Zamperlini M, Farhat SC, Perondi MB, et al. Elevated C-reactive protein and spontaneous bacterial peritonitis in children with chronic liver disease and ascites[J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2014, 58(1):96-98.

[5] Cho Y, Park SY, Lee JH, et al. High-sensitivity C-reactive protein level is an independent predictor of poor prognosis in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis [J]. J Clin Gastroenterol, 2014, 48(5):444-449.

[6] Maseda E, Suarez-De-La-Rica A, Anillo VA, et al. Procalcitonin-guided therapy may reduce length of antibiotic treatment in intensive care unit patients with secondary peritonitis; a multicenter retrospective study [J]. J Crit Care, 2015, 30(3):537-542.

[7] 鲁炳怀, 时琰丽, 李雪清, 等. 血清降钙素原在诊断老年肺

部感染中的临床价值[J]. 首都医科大学学报, 2014, 35(4):456-462.

[8] Cekin Y, Cekin AH, Duman A, et al. The role of plasma procalcitonin levels in predicting ascitic fluid infection in hospitalized cirrhotic and non-cirrhotic patients[J]. Int J Med Sci, 2013, 10(10):1367-1374.

[9] 党燕, 于艳华, 刘新, 等. 血清降钙素原和内毒素在肝硬化患者腹腔积液感染中的诊断价值[J]. 首都医科大学学报, 2014, 35(4):452-455.

[10] Abdel-Razik A, Mousa N, Elhammady D, et al. Ascitic fluid calprotectin and serum procalcitonin as accurate diagnostic markers for spontaneous bacterial peritonitis [J]. Gut Liver, 2016, 10(4):624-631.

[11] Li S, Huang X, Chen Z, et al. Neutrophil CD64 expression as a biomarker in the early diagnosis of bacterial infection; a meta-analysis[J]. Int J Infect Dis, 2013, 17(1):e12-23.

[12] Dang Y, Lou JL, Yan Y, et al. The role of the neutrophil Fcγ receptor I (CD64) index in diagnosing spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients[J]. Int J Infect Dis, 2016, 49(1):154-160.

(收稿日期:2017-05-14 修回日期:2017-08-02)

(上接第 3281 页)

DRFs 家族蛋白是肌动蛋白的成核因子, 促进游离态的肌动蛋白单体(G-actin)聚合成 F-actin, 从而稳定细胞骨架, 控制细胞形态、运动等生物效应。MAL 是血清反应因子(SRF)转录的辅助因子, 在细胞质中 MAL 与 G-actin 结合。当 G-actin 聚合成 F-actin 时, MAL 被释放, 进入核内与 SRF 结合, 激活其转录活性, 从而上调细胞骨架靶蛋白的合成。本研究中, 当 *fml2* 细胞的水平下降时, 影响细胞内肌动蛋白丝的形成, 进而使核内 MAL 蛋白减少, 血清应答因子的转录活性降低, 影响细胞骨架靶蛋白的合成。

综上所述, 笔者推测, *fml2* 在细胞内通过调控 RhoA 信号转导通路上游的某个环节, 影响 RhoA/Rock 的激活, 从而改变细胞侵袭和转移能力。同时, *fml2* 又可以通过促进肌动蛋白聚合, 激活 MAL-SRF 的转录活性, 影响细胞骨架靶蛋白的合成。Rho-GTP 酶可通过与 *fml2* 的 GBD 区结合, 改变其构象, 释放功能区, 激活 *fml2*。*fml2* 与 Rho 信号通路可能是一种正反馈机制。*fml2* 具体通过何种途径影响 Rho/Rock 信号通路尚需进一步的研究。

参考文献

[1] Voudouri K, Nikitovic D, Berdiaki A, et al. Heparin regulates B6FS cell motility through a FAK/actin cytoskeleton axis[J]. Oncol Rep, 2016, 36(5):2471-2480.

[2] Dhaliwal A, Maldonado M, Lin C, et al. Cellular cytoskeleton dynamics modulates non-viral gene delivery through RhoGTPases[J]. PLoS One, 2012, 7(4):e35046.

[3] Ma L, Zhu Z, Liu T, et al. H₂O₂ inhibits proliferation and

mediates suppression of migration via DLC1/RhoA signaling in cancer cells[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 16(4):1637-1642.

[5] Lash L, Wallar J, Turner D, et al. Small-molecule intramimics of formin autoinhibition; a new strategy to target the cytoskeletal remodeling machinery in cancer cells [J]. Cancer Res, 2013, 73(22):6793-6803.

[6] Louis F, Deroanne C, Nusgens B, et al. RhoGTPases as key players in mammalian cell adaptation to microgravity [J]. Biomed Res Int, 2015(29):747693-747694.

[7] Fortin EP, Mathews T, Symons H, et al. Implications of Rho GTPase signaling in glioma cell invasion and tumor progression[J]. Front Oncol, 2013, 3(3):241-243.

[8] Oconnor K, Chen M. Dynamic functions of RhoA in tumor cell migration and invasion[J]. Small Gtpases, 2014, 4(3):141-147.

[9] Cai AP, Li LW, Zhou YL. Pathophysiological effects of RhoA and Rho-associated kinase on cardiovascular system[J]. J Hypertens, 2016, 34(1):3-10.

[10] Ha JH, Ward JD, Radhakrishnan R, et al. Lysophosphatidic acid stimulates epithelial to mesenchymal transition marker Slug/Snail2 in ovarian cancer cells via Gai2, Src, and HIF1α signaling nexus[J]. Oncotarget, 2016, 7(25):37664-37679.

(收稿日期:2017-05-06 修回日期:2017-07-24)