

FLNA 在肝癌中的表达及其对细胞增殖、侵袭转移的作用

翟宏芳¹, 张 钧², 刘 青², 杨从容², 孙国贵¹

(1. 唐山市人民医院, 河北 唐山 063000; 2. 河北医科大学第四医院, 河北 石家庄 050017)

摘 要: [目的] 探讨细丝蛋白 A (FLNA) 在肝癌组织中的表达及过表达对肝癌细胞生物表型的影响。[方法] 采用免疫组织化学方法、Western Blot 检测 75 例肝癌组织及距其癌组织边缘 2cm 以上的镜下未见癌浸润的 37 例正常肝脏组织中 FLNA 的表达情况。采用慢病毒转染建立 FLNA 过量表达的肝癌 HepG2 细胞株。荧光定量 PCR 及 Western Blot 检测 FLNA 转染后肝癌 HepG2 细胞株中 FLNA 表达含量的变化。MTT 法、Transwell 检测 FLNA 过量表达对肝癌细胞增殖及细胞侵袭转移的影响。[结果] 免疫组织化学结果表明, FLNA 蛋白在肝癌组织及正常肝脏组织中的表达阳性率分别为 37.3%、89.2%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。Western Blot 结果表明, FLNA 蛋白在肝癌组织的相对表达量较正常肝脏组织明显降低, 两者比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。FLNA 蛋白表达水平与肝癌有无淋巴结转移、临床分期以及组织学分级有关 ($P < 0.05$), 而与患者年龄、性别、肝癌病理类型及 T 分期无关 ($P > 0.05$)。FLNA 高表达的肝癌细胞其增殖能力明显减弱、侵袭转移能力降低, MMP-9 蛋白的表达量明显下调。[结论] 肝癌组织中 FLNA 蛋白表达明显下降, 可能是正常肝脏组织恶性转变的重要生物学标志, 对预测肝癌发生、浸润转移有重要意义。

主题词: 细丝蛋白 A; 肝肿瘤; 基因转染; 肿瘤转移

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2015)04-0304-07

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2015.04.B010

The Expression of FLNA in Hepatocellular Carcinoma and Its Effect on Cell Proliferation and Cell Invasion

ZHAI Hong-fang¹, ZHANG Jun², LIU Qing², et al.

(1. Tangshan People's Hospital, Tangshan 063000, China; 2. The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expression of filamin A (FLNA) in hepatocellular carcinoma and the biological effect on its cell line by FLNA overexpression. [Methods] Immunohistochemistry and Western Blot were used to analyze FLNA protein expression in 75 cases of hepatocellular cancer and 37 cases of normal tissues. FLNA lentiviral vector and empty vector were respectively transfected into hepatocellular cancer HepG2 cell line. Quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR) and Western Blot were used to detect the mRNA level and protein of FLNA. MTT assay, migration and invasion assays were also conducted to detect the influence of the up-regulated expression of FLNA that might be found on HepG2 cell biological effect. [Results] Immunohistochemistry: the level of FLNA protein expression was significantly lower in hepatocellular cancer tissues than that in normal tissues ($P < 0.05$). Western Blot: the relative amount of FLNA protein in hepatocellular cancer tissues was significantly lower than that in normal tissues ($P < 0.05$). The level of FLNA protein expression did not correlate with gender, age, T stage and pathological type ($P > 0.05$), but it correlated with lymph node metastasis, clinic stage and histological grade ($P < 0.05$). The result of biological function showed that HepG2 cell transfected FLNA had a lower survival fraction, decreasing in migration and invasion, and lower Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) protein expression compared with HepG2 cell untransfected FLNA ($P < 0.05$). [Conclusion] FLNA expression decreases in hepatocellular cancer and correlates significantly with lymph node metastasis, clinic stage, histological grade, suggesting that FLNA may play important roles as a negative regulator in hepatocellular cancer HepG2 cell by promoting degradation of MMP-9.

Subject words: FLNA; hepatocellular neoplasms; gene transfection; tumor metastasis

原发性肝癌是全球第 6 位、中国第 3 位最常见

的癌症。根据国际癌症研究中心(IARC)估计, 2000 年全球肝癌发病人数约 56.4 万, 其中 55% 发生在中国, 即我国肝癌发病数约 30.6 万, 死亡数约 30.0 万。因此分析肝癌的生物学特性, 探索其发病病因与治

通讯作者: 孙国贵, 副主任医师, 博士; 唐山市人民医院放疗科, 河北省唐山市路南区胜利路 65 号(063000); E-mail: guogui_sun2013@163.com

收稿日期: 2014-02-12; 修回日期: 2014-04-11

疗的新途径成为临床关注的问题^[1]。近年研究发现细丝蛋白 A(filamin A, FLNA)在某些肿瘤中表现出的生物学和遗传学特征具有肿瘤抑癌基因的特性,由此推测 FLNA 在肝癌的形成和发展中具有重要作用^[2-4]。我们采用免疫组织化学方法、Western Blot 法研究 FLNA 在肝癌中的表达情况,并通过改变 FLNA 表达含量的方法来分析其对肝癌细胞生物学行为的影响,以期为肝癌的发病病因与临床治疗找到新的基因靶点。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集 75 例新鲜肝癌组织标本,并收集 37 例距肿瘤边缘 2cm 以上(镜下未见癌)的正常肝脏组织作为对照。其中年龄 23~76 岁,中位年龄 44 岁,其中男性 55 例,女性 20 例; ≤ 45 岁 54 例, >45 岁 21 例;肝细胞型 56 例,胆管细胞型 13 例,混合型者 6 例;肿瘤直径 T_1+T_2 23 例, T_3+T_4 52 例;淋巴结转移中 N_0 33 例, N^+ 42 例;临床分期 I+II 期 24 例,III+IV 期 51 例;组织学分级 I 级 17 例,II~III 级 58 例。所有患者术前均未经放、化疗,标本均为术后立即取材,于液氮中保存,供免疫组织化学及 Western Blot 检测。

1.2 主要试剂

FLNA、MMP-9 兔抗人单克隆抗体(Amcam Inc., USA)。 β -actin 鼠抗人单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司。免疫组织化学试剂盒购自北京中杉金桥生物技术公司。pMD-18T 质粒(Takara 公司)。pDONR221、线性 attB 表达克隆、5 xBP ClonaseTM Reaction Buffer、BP ClonaseTM Enzyme mix、5 xLR ClonaseTM Reaction Buffer、LR ClonaseTM Enzyme mix plenti6/V5-DEST 表达质粒、包装质粒 ViraPowerTM Lentiviral Packaging Mix、Opti-MEM、lipofectamine2000 (Invitrogen 公司)。RNA Trizol 提取试剂盒(索莱宝公司),Superscript III 逆转录试剂盒(Invitrogen 公司)。

1.3 免疫组织化学

将 4 μ m 石蜡切片脱蜡至水,3%过氧化氢 10min 阻断内源性过氧化物酶,胰酶修复 20min,10%山羊血清室温封闭 20min,FLNA 抗体(1:100)湿盒中 4℃ 冰箱过夜,滴加二抗、三抗室温湿盒内孵育各 20min,

DAB 显色,苏木精复染,常规脱水、封片。结果判定:细胞计数在显微镜下,每张切片上随机选择 5 个视野,每个标本计数 3 张切片。FLNA 表达以细胞阳性百分率及细胞染色强度得分之和进行判定。细胞阳性百分率分为 4 个等级: $\leq 5\%$ 计 0 分,5%~25% 计 1 分,25%~50% 计 2 分, $>50\%$ 计 3 分;细胞染色强度分数标准:无染色记 0 分,弱染色(浅黄色)计 1 分,中等染色(黄褐色)计 2 分,强染色(棕黄色)计 3 分。两项标准相加:0 分为阴性(-),1~6 为阳性:包括 1~2 分为弱阳性(+),3~4 分为中等阳性(++),5~6 分为强阳性(+++)。以 PBS 替代一抗作为阴性对照。

1.4 Western Blot

提取肝癌组织及 HepG2 细胞总蛋白。4℃,12 000r/min 离心 20min,取上清,-20℃ 备用。BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度,按每孔上样量 50 μ g 进行 SDS-PAGE 电泳,稳压冰浴电转至硝酸纤维素膜上,5%脱脂牛奶封闭 2h,一抗孵育 4℃ 过夜(FLNA 1:1 000,MMP-9 1:1 000; β -actin 1:5 000),兔抗人红外荧光标记二抗(1:20 000),Odyssey 双色红外荧光扫描系统进行检测,计算蛋白相对值=蛋白 A 值/GAPDH A 值。

1.5 建立 FLNA 过量表达的细胞株

人肝癌 HepG2 细胞置于直径 10cm 的培养皿中,用含 10%胎牛血清的 1640 培养液,置于 37℃、5%CO₂ 的饱和湿度培养箱中培养,细胞密度达到 60%~70% 时进行实验。设 3 孔,分别加入 1ml 含有 FLNA 基因的 pLenti6-FLNA 质粒的病毒液及 1ml 含有 pLenti6/V5-DEST 对照质粒的病毒液,继续培养 24h,更换培养基后加入抗生素 Blastidicin(5 μ g/ml)进行筛选。10d 后挑取克隆接种到 24 孔板中,细胞长满后细胞扩大培养,筛选出 pLenti6/HepG2、pLenti6-FLNA/HepG2 细胞稳定转染株,分别命名为 LeEmpty 细胞、LeFLNA 细胞。

1.6 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)

按 Trizol 和反转录试剂说明书要求提取 LeEmpty 细胞、LeFLNA 细胞中总 RNA,反转录成 cDNA,以 cDNA 为模板行 PCR 扩增。FLNA 基因上游引物为 5'-GAGAGCTGCTGAGACTCTCCTCTCC-3',下游引物为 5'-CCATCTGTATTAGCCTTGTGCCTTCTC-3'; β -actin 为内参照,上游引物为 5'-ATCGTCCACCGCAAATGCTTCTA-3',下游引物为

5'-AGCCATGCCAAT CTCATCTTGTT-3'。PCR 反应条件:预变性 95℃ 3min;变性 95℃ 60s,退火 95℃ 15s,延伸 60℃ 60s,35 个循环。

1.7 MTT 实验

取接种密度 70%~80% LeEmpty 细胞、LeFLNA 细胞,按 5 000 个/孔细胞,每孔体积 200μl 接种于 96 孔培养板内。分别于 24、48、72、96h 分别终止培养。终止培养前 4h,加入 5mg/ml MTT 溶液 20μl,继续培养 4h,除去每孔中培养基,加入 DMSO 200μl/孔,振荡至结晶溶解。全自动酶标仪检测各孔吸光度 D 值,检测波长 490nm,参考波长 620nm。肿瘤细胞存活率(%)=实验组 D 值/对照组 D 值×100%。

1.8 Transwell 细胞迁移实验

聚碳酸脂微孔滤膜上铺 Matrigel 凝胶(8.4g/L) 50μl,LeEmpty 细胞、LeFLNA 细胞均以无血清培养基制成 1×10⁶ 个/ml 的细胞悬液;各取 50μl 移入小室,下室加入 800μl 10% 1640 完全培养基;培养 13h 后,用棉签刮除滤膜上室面的细胞,侵袭并粘附至下室面的细胞以 4%多聚甲醛固定,0.1%结晶紫染色 20min。每张膜中央部分和周围部分各随机取 5 个视野。计数每个视野内穿过 8μm 微孔的细胞数,以每个视野的平均数表示肿瘤细胞的侵袭能力。

1.9 统计学处理

经 SPSS16.0 统计软件分析,所有均数以 $\bar{x}\pm s$ 表示。率的比较采用 χ^2 检验,FLNA 蛋白表达量的比较采用 One-Way ANOVA 分析,LeEmpty 细胞、LeFLNA 细胞之间比较采用 Independent-Samples *t* 或 One-Way ANOVA 检验。各实验均重复 3 次。以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

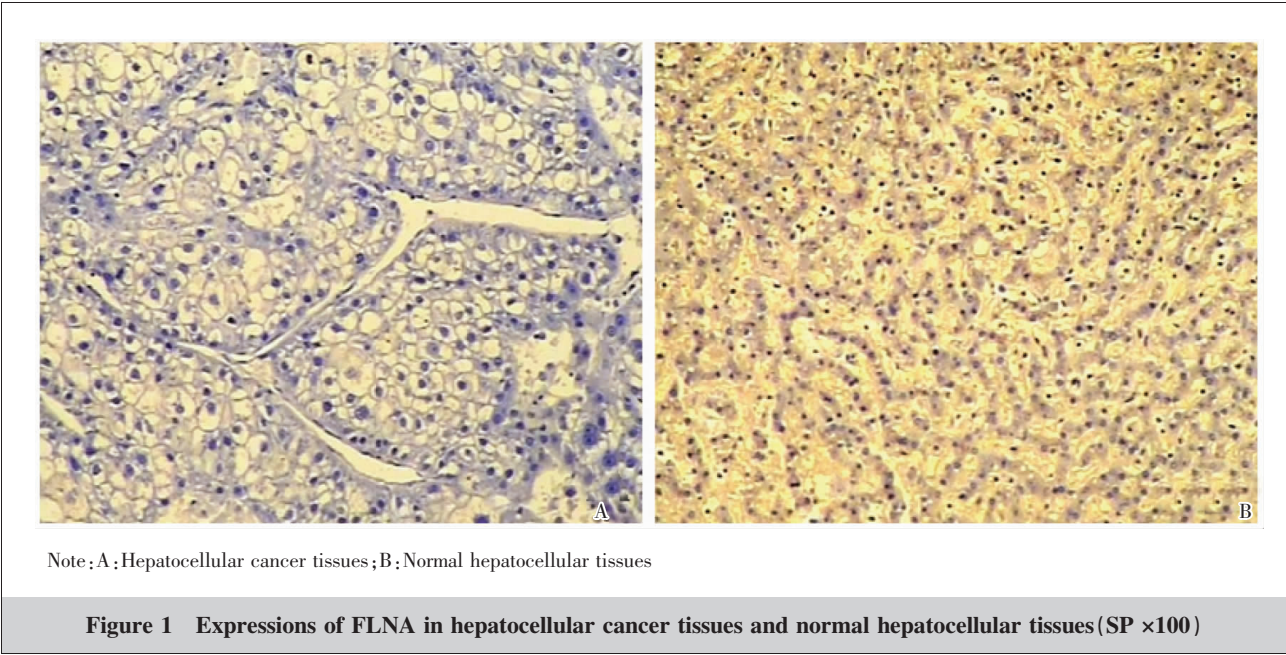
2 结 果

2.1 FLNA 在肝癌组织中的表达

免疫组织化学结果显示,FLNA 主要定位于细胞浆,阳性表达主要表现为细胞染成浅黄色、黄褐色或棕黄色。FLNA 在肝癌组织、正常肝组织的阳性表达率分别为 37.3%(28/75) 及 89.2%(33/37),两组之间比较差异具有统计学意义($P=0.000$)(Table 1,Figure 1)。Western Blot 结果显示,FLNA 蛋白在肝癌组织的表达量为 0.383 ± 0.045 ,明显低于正常肝组织(0.768 ± 0.065),两组之间比较差异具有统计学意义 ($t=8.391, P=0.001$)(Figure 2)。

Table 1 Expressions of FLNA in hepatocellular cancer tissues and normal tissues

Groups	N	Expression of FLNA protein				χ^2	P
		-	+	++	+++		
Normal tissues	37	4	11	13	9	27.290	0.000
Cancer tissues	75	47	11	9	8		



2.2 FLNA 与肝癌临床病理参数的关系

临床因素分析表明,FLNA 蛋白在肝癌有无淋巴结转移、不同临床分期及组织分级中的表达差异具有统计学意义($P<0.05$),而与患者性别、年龄及肝癌病理分型及肿瘤 T 分期无关($P>0.05$)(Table 2)。

2.3 稳定转染肝癌细胞中 FLNA 过量表达的鉴定

qRT-PCR 结果显示,FLNA mRNA 在 LeEmpty、LeFLNA 细胞中的相对表达量分别为 0.317 ± 0.043 、 0.864 ± 0.067 ,两细胞之间差异具有统计学意义($t=11.901$, $P=0.000$)(Figure 3A)。蛋白质印迹结果显示,FLNA 蛋白相对表达量分别为 0.284 ± 0.021 、 0.728 ± 0.063 ,两细胞之间差异具有统计学意义($t=11.580$, $P=0.000$)(Figure 3B)。

2.4 FLNA 转染对 HepG2 细胞株增殖的影响

MTT 检测结果表明,细胞接种培养 24、48、72、96h,与 LeEmpty 细胞存活率相比,LeFLNA 细胞存活率下调,两组细胞存活率在各时间点之间比较,差异具有统计学意义($P<0.05$)(Figure 4)。

2.5 FLNA 转染对 HepG2 细胞株侵袭转移的影响

Transwell 结果表明,LeEmpty 细胞的穿膜数为 106 ± 21 ,LeFLNA 细胞的穿膜数为 53 ± 14 ,两组细胞穿膜数比较差异具有统计学意义($t=3.637$, $P=0.022$)(Figure 5)。

2.6 FLNA 转染对 MMP-9 蛋白表达的影响

蛋白质印迹结果显示,FLNA 转染后,LeEmpty 细胞中 MMP-9 蛋白表达的相对量为 0.843 ± 0.087 ,LeFLNA 细胞中 MMP-9 蛋白表达的相对量为 0.359 ± 0.041 ,两细胞之间比较差异具有统计学意义($t=8.716$, $P=0.001$)(Figure 6)。

3 讨论

FLNA 主要分布在细胞质,具有多种功能,其 N 末端的肌动蛋白结合结构域能与 ABP 结合,可交联肌动蛋白形成稳固的细胞骨架,与细

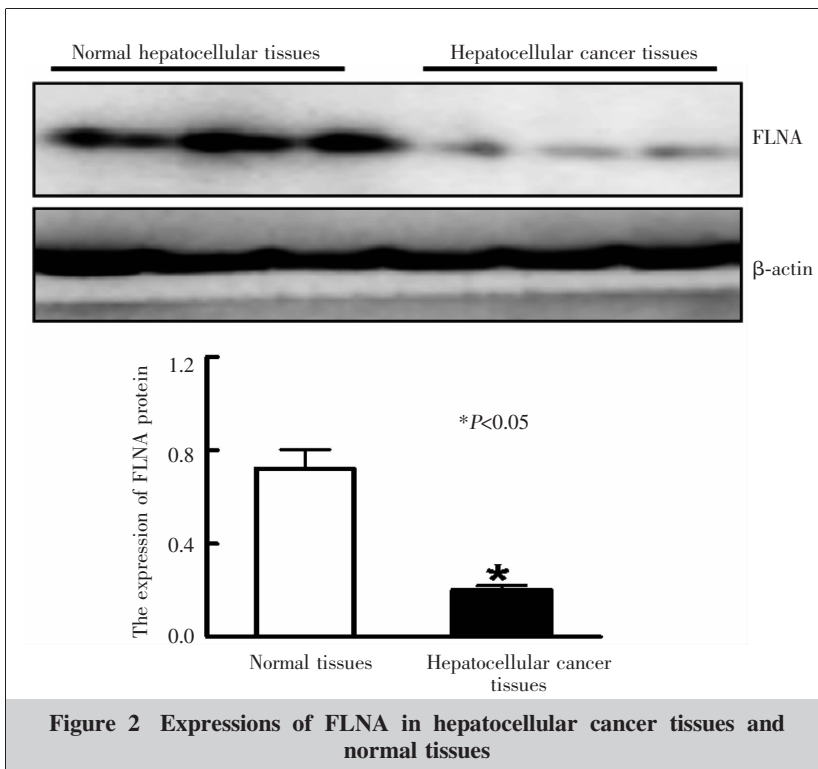
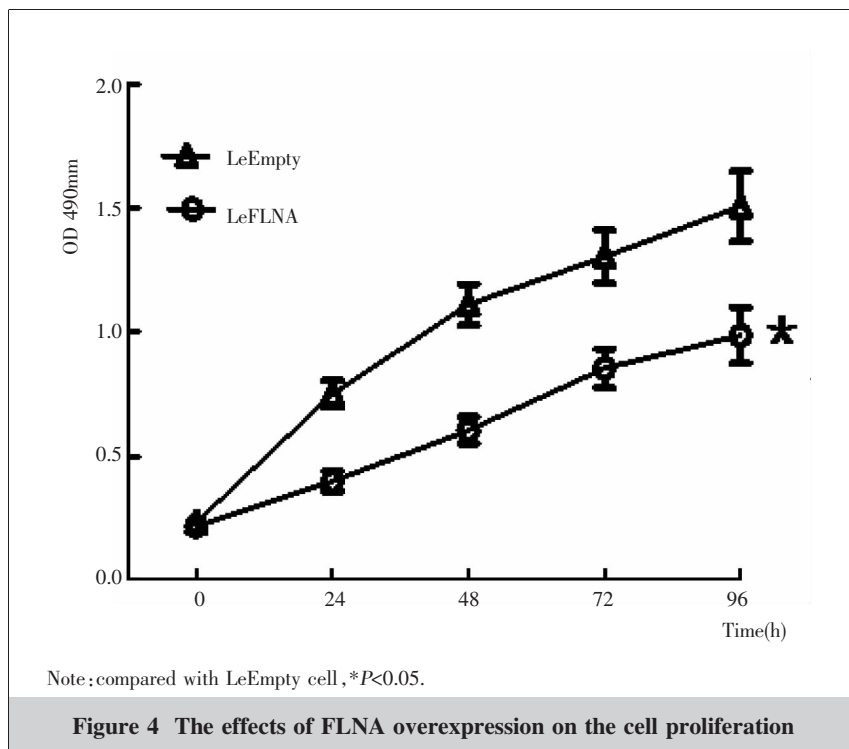
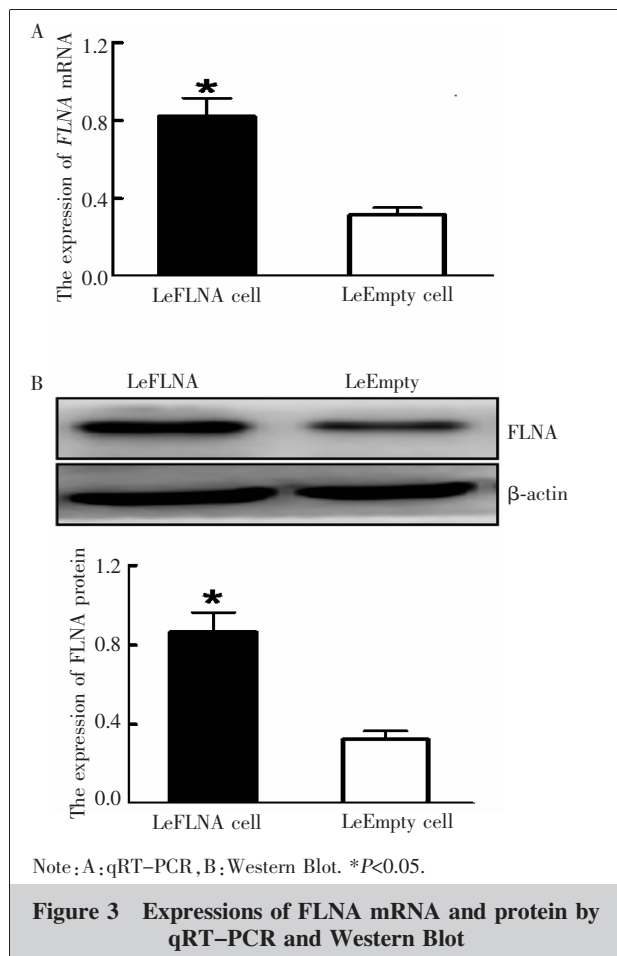


Table 2 Relation between FLNA expression and clinic characteristics in hepatocellular cancer tissues

Factors	N	Expression of FLNA protein		χ^2	P
		-	+~+++		
Gender					
Male	55	33	22	0.627	0.428
Female	20	14	6		
Age (years)					
≤45	54	33	21	0.199	0.655
>45	21	14	7		
Pathological types					
Hepatocellular type	56	34	22	1.194	0.551
Cholangiocarcinoma type	13	8	5		
Mixed cell type	6	5	1		
Tumor invasion					
T ₁ +T ₂	23	13	10	0.535	0.464
T ₃ +T ₄	52	34	18		
Lymph node metastasis					
N ₀	33	15	18	7.462	0.006
N ⁺	42	32	10		
Clinic stage					
I~II	24	10	14	6.653	0.010
III~IV	51	37	14		
Histological grade					
I	17	6	11	7.040	0.008
II~III	58	41	17		



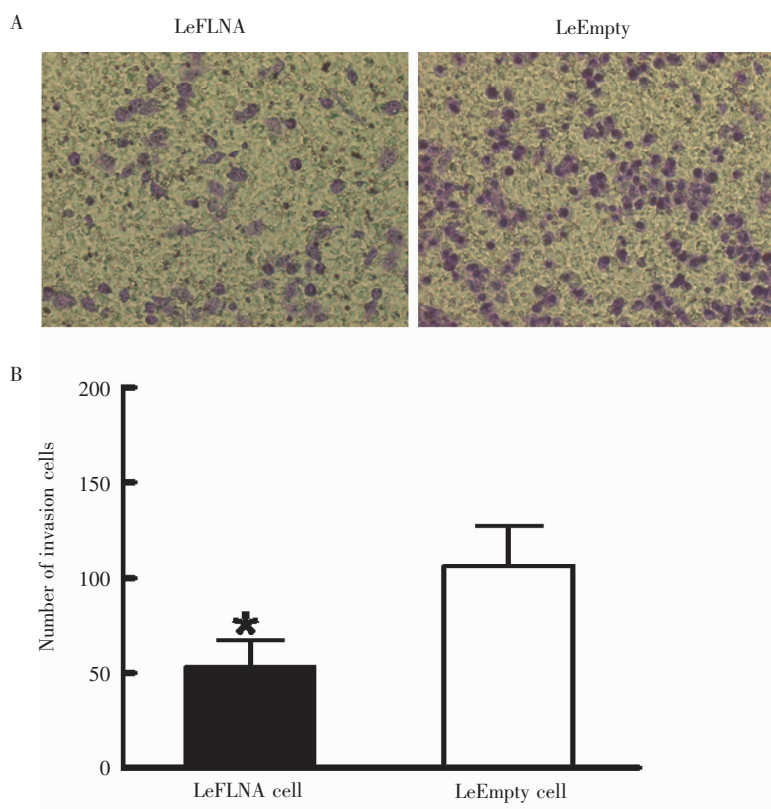
胞运动有关;多重 β 片层结构为蛋白质—蛋白质相互作用提供了平台,能够与多种具有重要功能的蛋白质相互作用。因此,FLNA分子作为重要的信号转导支架蛋白参与细胞增殖、粘附、侵袭等多种行为^[5]。此外,FLNA还与其他ABP一起影响多种受体在细胞内的表达,干预多条与肿瘤形成有关的信号转导通路,对肿瘤的发生发展至关重要^[6]。

本研究首次用免疫组织化学及Western Blot技术对肝癌组织及正常肝脏组织进行定性及定量检测,结果显示FLNA蛋白、mRNA在肝癌组织中的表达水平均显著低于正常肝脏组织,取得了一致结果。本研究结果的单因素分析也显示,FLNA蛋白、mRNA的表达水平与肝癌有无淋巴结转移、临床分期及分化程度有关。这一研究与FLNA在正常胃黏膜组织^[7]、食管黏膜组织^[8]、结直肠组织^[9]及正常肺组织^[10]中的阳性表达率高于其相应癌组织阳性表达率的结果一致,但与FLNA在浸润性乳腺癌组织中的表达随着分化程度降低而增高的结果相悖^[11]。Bedolla等^[12]使用免疫组化法检测了不同进展阶段的前列腺癌组织标本FLNA蛋白表达情况,发现与良性前列腺、前列腺上皮内瘤和原位癌的FLNA蛋白表达相比,转移性前列腺癌FLNA蛋白细胞质内FLNA表达明显减少,而细胞核内表达明显增多,并分析这可能与癌细胞恶性程度增加有关。对于这些不同的结果,还难以解释,可能是由于FLNA对不同部位、不同病理类型的瘤细胞存在着不同的作用,其机制还有待于进一步探讨^[13,14]。

侵袭生长是恶性肿瘤的一个重要特征,也是肿瘤患者治疗失败甚至死亡的主要原因之一。对细胞外基质的降解是启动肿瘤细胞侵袭的前提条件。MMP家族是高度保守的一类酶,主要由内皮细胞、粒细胞及肿瘤细胞等合成和分泌^[15]。MMP-9是MMP家族中相对分子质量最大的成员,其主要作用底物是IV、V型胶原和明胶。MMP-9在多种恶性肿瘤组织、培养的肿瘤细胞及癌基因转化细胞中表达增强,体外侵袭实验证实肿瘤细胞的高侵袭能力与

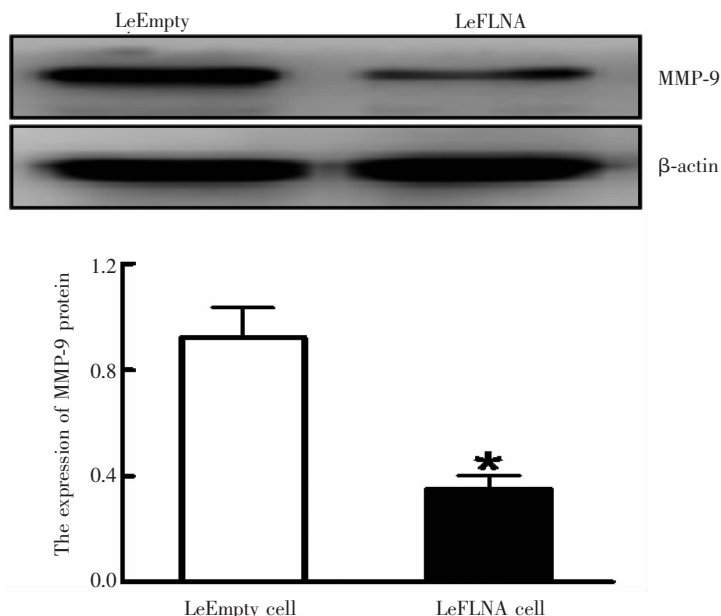
细胞恶性程度增加有关。对于这些不同的结果,还难以解释,可能是由于FLNA对不同部位、不同病理类型的瘤细胞存在着不同的作用,其机制还有待于进一步探讨^[13,14]。

侵袭生长是恶性肿瘤的一个重要特征,也是肿瘤患者治疗失败甚至死亡的主要原因之一。对细胞外基质的降解是启动肿瘤细胞侵袭的前提条件。MMP家族是高度保守的一类酶,主要由内皮细胞、粒细胞及肿瘤细胞等合成和分泌^[15]。MMP-9是MMP家族中相对分子质量最大的成员,其主要作用底物是IV、V型胶原和明胶。MMP-9在多种恶性肿瘤组织、培养的肿瘤细胞及癌基因转化细胞中表达增强,体外侵袭实验证实肿瘤细胞的高侵袭能力与



Note: compared with LeEmpty cell, * $P < 0.05$.

Figure 5 The effects of FLNA overexpression on invasion



Note: compared with LeEmpty cell, * $P < 0.05$.

Figure 6 The effects of FLNA overexpression on MMP-9

MMP-9 的表达增强有关^[16,17]。进一步体外实验首次发现,FLNA 高表达的肝癌 HepG2 细胞其增殖能力、侵袭转移明显减弱、MMP-9 蛋白的表达量明显下调。黑色素瘤细胞 M2 缺乏 FLNA 表达,亚克隆 M2A7 稳定地表达 FLNA。研究发现,M2 细胞的 MMP-9 分泌的能力及活性均远远强于 M2A7,因为 FLNA 可通过抑制 Ras/MAPK 细胞外的信号调节激酶(ERK)级联活性而下调 MMP-9 的表达^[18]。国内作者研究发现认为,FLNA 能够通过抑制 Ras/MAPK 级联反应,降低 MMP-9 的表达,最终降低肿瘤细胞的侵袭力^[19]。免疫共沉淀实验和体外结合分析表明 FLNA 与胰岛素受体(IR)结合,能够抑制胰岛素依赖的 MAPK 通路的活化,且不受胰岛素和细胞松弛素 D 所致的肌动蛋白解聚的影响。利用 FLNA 的 C 末端片段的异常表达阻遏 FLNA 与 IR 结合后,FLNA 对 MAPK 途径的抑制作用消失^[20]。

本研究结果提示,FLNA 在肝癌组织中表达下调,且与肝癌淋巴结转移、临床分期及细胞分化有关。FLNA 可能通过调控 MMP-9 蛋白表达参与肝癌细胞增殖、侵袭转移这一生物学过程。

参考文献:

- [1] Lo KW, To KF, Huang DP. Focus on nasopharyngeal carcinoma [J]. Cancer Cell, 2004, 5(5): 423-428.
- [2] Zhou X, Boren J, Akyurek LM. Filamins in cardiovascular development[J]. Trends Cardiovasc Med, 2007, 17(7): 222-229.
- [3] Ai J, Huang H, Lv X, et al. FLNA and PGK1 are two potential markers for progression in hepatocellular carcinoma[J]. Cell Physiol Biochem, 2011, 27(3-4): 207-216.

- [4] Stossel TP, Condeelis J, Cooley L, et al. Filamins as integrators of cell mechanics and signalling[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2(2):138-145.
- [5] Roberson SP, Twigg SR, Sutherland-Smith AJ, et al. Localized mutations in the gene encoding the cytoskeletal protein filamin A cause diverse malformations in humans [J]. *Nat Genet*, 2003, 33(4):487-491.
- [6] Keshamouni VG, Michailidis G, Grasso CS, et al. Differential protein expression profiling by iTRAQ-2DLC-MS/MS of lung cancer cells undergoing epithelial-mesenchymal transition reveals a migratory/invasive phenotype[J]. *J Proteome Res*, 2006, 5(5):1143-1154.
- [7] Sun GG, Hu WN, Zhang J, et al. Expression of Flna in stomach adenocarcinoma and clinical significance[J]. *Chinese Journal of General Practice*, 2013, 11(2):220-222. [孙国贵, 胡万宁, 张钧, 等. 细丝蛋白 A 在胃癌组织中的表达及临床意义[J]. *中华全科医学*, 2013, 11(2):220-222.]
- [8] Zhang J, Liang J, Sun GG, et al. Expression of filamin A protein and mRNA in esophageal squamous cell carcinoma and clinical significance[J]. *Clinical Focus*, 2011, 26(8):684-687. [张钧, 梁健, 孙国贵, 等. 细丝蛋白 A 及其 mRNA 在食管鳞癌组织中的表达及临床意义[J]. *临床荟萃*, 2011, 26(8):684-687.]
- [9] Zhang J, Liang J, Sun GG, et al. Expression of filamin A in rectal cancer tissues and its significance[J]. *Clinical Focus*, 2011, 26(11):965-967. [张钧, 梁健, 孙国贵, 等. 直肠癌组织中细丝蛋白 A 的表达及临床意义[J]. *临床荟萃*, 2011, 26(11):965-967.]
- [10] Zhai HF, Zhao G, Sun GG. Expression of filamin A in lung squamous cell carcinoma tissues and its significance [J]. *China Cancer*, 2013, 22(2):130-133. [翟宏芳, 赵刚, 孙国贵. 细丝蛋白 A 在肺鳞癌组织中的表达及临床意义[J]. *中国肿瘤*, 2013, 22(2):130-133.]
- [11] Wu YP, Li JB, Zhao RJ, et al. Expression of filamin A in invasive breast cancer tissues and its significance [J]. *Tumor*, 2009, 29(7):659-662. [吴艳萍, 李京彬, 赵瑞景, 等. 细丝蛋白 A 在浸润性乳腺癌中的表达及意义[J]. *肿瘤*, 2009, 29(7):659-662.]
- [12] Bedolla RG, Wang Y, Asuncion A, et al. Nuclear versus cytoplasmic localization of filamin A in prostate cancer: immunohistochemical correlation with metastases[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(3):788-796.
- [13] Sun GG, Lu YF, Zhang J, et al. Filamin A regulates MMP-9 expression and suppresses prostate cancer cell migration and invasion[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(4):3819-3826.
- [14] Sun GG, Sheng SH, Jing SW, et al. An antiproliferative gene FLNA regulates migration and invasion of gastric carcinoma cell in vitro and its clinical significance[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(3):2641-2648.
- [15] Watanabe H. Extracellular matrix-regulation of cancer invasion and metastasis[J]. *Gan To Kagaku Ryoho*, 2010, 37(11):2058-2061.
- [16] Yu HB, Zhang HF, Li DY, et al. Matrine inhibits matrix metalloproteinase-9 expression and invasion of human hepatocellular carcinoma cells[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2011, 13(3):242-250.
- [17] Zhang M, Zhu GY, Gao HY, et al. Expression of tissue levels of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in gastric adenocarcinoma [J]. *J Surg Oncol*, 2011, 103(3):243-247.
- [18] Yang S, Du J, Wang Z, et al. BMP-6 promotes E-cadherin expression through repressing delta EF1 in breast cancer cells[J]. *BMC Cancer*, 2007, 7(11):211.
- [19] Zhu TN, He HJ, Kole S, et al. Filamin A-mediated down-regulation of the exchange factor Ras-GRF1 correlates with decreased matrix metalloproteinase-9 expression in human melanoma cells [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(20):14816-14826.
- [20] He HJ, Kole S, Kwon YK, et al. Interaction of filamin A with the insulin receptor alters insulin-dependent activation of the mitogen-activated protein kinase pathway[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(29):27096-27104.