

FMNL2 基因沉默对人大肠癌细胞体内外增殖及侵袭能力的影响

朱曦龄¹, 梁莉², 黎功¹, 李黛¹

(1.武警总医院, 北京 100039; 2.南方医科大学病理学教研室, 广东 广州 510515)

摘要: [目的] 探讨 FMNL2 基因沉默对人大肠癌细胞体内外增殖及侵袭能力的影响。[方法] 筛选并建立 FMNL2 基因沉默的 SW80/M5 细胞系; 荧光定量 RT-PCR 和 Western blot 检测干扰效率; CCK8 法检测 FMNL2 对 SW80/M5 增殖能力的影响; 流式细胞仪检测细胞周期; 侵袭小室实验检测其对 SW80/M5 侵袭能力的影响; 裸鼠皮下成瘤实验和脾注射法体内转移实验检测 FMNL2 基因表达沉默对 SW80/M5 在体内增殖、侵袭能力的影响。[结果] FMNL2 基因沉默后显著抑制 SW80/M5 在体内外增殖、转移及侵袭能力 ($P < 0.05$)。[结论] FMNL2 与大肠癌多种恶性生物学功能的调控密切相关, 可能是潜在的治疗靶点。

关键词: 肠肿瘤; FMNL2 基因; DRFs 家族; 增殖; 侵袭; 转移

中图分类号: R735.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2017)02-0081-06

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2017.02.B001

Effect of FMNL2 Gene Silencing on Proliferation and Invasion of Human Colorectal Cancer Cell in Vivo and Vitro

ZHU Xi-ling¹, LIANG Li², LI Gong¹, et al.

(1. The General Hospital of Chinese Armed Police Forces, Beijing 100039, China; 2. Teaching and Research Section of Pathology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: [Objective] To investigate the effect of FMNL2 gene silence on the proliferation of invasion of human colorectal cancer (CRC) cells in vivo and in vitro. [Methods] Human colorectal cancer SW80/M5 cells were transfected with FMNL2 specific shRNA plasmid vectors, and FMNL2-silenced cells were screened by G418. Quantitative RT-PCR and Western blot analysis were used to detect the expressions of FMNL2 mRNA and protein, respectively. The cell proliferation was determined by CCK8 assay, the cell invasion ability was detected by boyden invasive assay in vitro. Tumorigenesis and metastasis in vivo were examined by whole-body visualizing hepatic metastasis animal model in nude mice. [Results] FMNL2 silencing inhibited cell proliferation, migration and invasion ($P < 0.05$) in vitro and in vivo. [Conclusion] FMNL2 gene may have multiple biological functions during colorectal cancer progression and it may used as a novel therapeutic target against CRC.

Subject words: colorectal neoplasms; FMNL2 gene; DRFs; proliferation; invasion; metastasis

FMNL2 (Formin-like 2) 属于 DRFs (diaphanous-related formins) 家族, 其能够促进肌动蛋白单体聚合成二聚体, 生物学功能与肌动蛋白密切相关^[1]。研究发现 DRFs 家族在肿瘤细胞的侵袭和转移方面起到了重要的作用^[2-4]。在我们的前期研究中, 采用 Affymetrix HG-U133 Plus 3.0 原位合成寡核苷酸芯片, 筛查与

大肠癌转移相关基因, 利用文献挖掘的生物信息学方法^[5]对所筛查到的基因进行分析, 发现 FMNL2 与大肠癌的转移密切相关。为了进一步了解其生物学功能, 在本研究中, 我们通过 RNAi 技术, 下调 SW480/M5 细胞 (我们前期用人大肠癌细胞株 SW480 在裸鼠回盲部反复接种, 经 5 次以上筛选获得的具有高选择肝脏转移特性的 SW480 亚系^[6]) 中 FMNL2 基因表达, 观察 FMNL2 基因沉默前后 SW480/M5 细胞的体内外增殖及侵袭能力的变化, 进一步研究该基因在大肠癌侵袭和转移中的作用。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30400206)

通讯作者: 朱曦龄, 主治医师, 博士; 武警总医院肿瘤二科, 北京市海淀区永定路 69 号 (100039); E-mail: zhuxiling2009@126.com

收稿日期: 2016-08-24; **修回日期:** 2016-11-15

1 材料与方法

1.1 材料

SW480/M5 细胞株来自南方医科大学病理学研究室存种;SPF 级 4~6 周龄裸鼠购自南方医科大学动物实验中心;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^[7]。lipofectamineTM2000 及 Opti-MEM 培养基均购自 Invitrogen 公司;*FMNL2* 和 *GAPDH* 引物用 Primer 5.0 软件自行设计,上海英骏生物技术有限公司合成;MTT 和 G418 购自 Sigma 公司;鼠抗人 *FMNL2* 单克隆抗体购自 Abnova 公司;*GAPDH* 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司;侵袭小室购自 Chemicon 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

人大肠癌细胞株 SW480/M5 培养于含 10% 胎牛血清的 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 *FMNL2*-shRNA 和 *Pgenesil-1* 质粒进入 SW480/M5 中,将转染后细胞孵育 48h 后加入含 G418 的培养液进行筛选。筛选培养 2 周后可见抗性克隆长出,挑取单细胞克隆转入 24 孔板继续培养,逐渐扩大培养,4 周左右可获得稳定干扰细胞。然后行后续鉴定和实验。稳定转染 *FMNL2*-shRNA 细胞为实验组称为 SW480/M5-sh*FMNL2* 组,空白组为 SW480/M5-mock,对照组为 SW480/M5。

1.2.3 Real-time PCR

按照逆转录试剂盒操作程序进行逆转录反应。以 *GAPDH* 为内参进行 Real-time PCR 实验,引物 (Table 1) 应用 Mx3000P 定量 PCR 仪 (Stratagene),所有实验均重复 3 次,阴性对照不加模版。以 $Folds = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示实验组与对照组目的基因表达的倍比关系^[8],公式如下: $\Delta\Delta Ct = (Ct_{FMNL2} - Ct_{GAPDH})_{实验组} - (Ct_{FMNL2} - Ct_{GAPDH})_{对照组}$,重复 3 次实验,计算平均值。

Table 1 Primer sequences of genes

Gene	Sequence	Length (bp)
<i>GAPDH</i>	5'-ACGGATTGCTCGTATTGGGCG-3' 5'-CTCCTGGAAGATGGTGATGG-3'	212
<i>FMNL2</i>	5'-TAATCAGCATTAGCATTCTGAGG-3' 5'-AGGAGAGTAAGGCCAGGTTC-3'	145

1.2.4 Western blot

样品各取 50μg 蛋白质,与 2×SDS 上样缓冲液 1:1 混合,10% SDS-PAGE 电泳。电泳完毕后,采用湿转法转至 PVDF 膜上。PVDF 膜用 20ml 封闭液室温孵育 1h,倒去封闭液,加入鼠抗人 *FMNL2* 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, TBST 洗膜后,加入 HRP 标记的抗鼠二抗 (1:4000 稀释) 室温孵育 1h, TBST 洗膜后,加入化学发光试剂孵育 1min,凝胶电泳成像系统进行分析。

1.2.5 CCK8 法检测细胞体外增殖活性

将细胞以 10³ 个/孔的密度接种于 96 孔板,每组设 3 个复孔。在第 1~5d 每天取样,细胞加入 CCK8 溶液,37℃ 继续培养 3h。用酶标仪在波长 450nm 处检测每孔的吸光度值 (A450)。实验重复 3 次,取平均值。

1.2.6 流式细胞术分析细胞周期及凋亡

PBS 清洗经消化收集的细胞,调整细胞密度为 1×10⁶ 个/ml。将细胞悬液转移至试管中,加入 FITC 标记的 PI 溶液,轻轻混匀。室温避光放置 10~15min,加入 400μl 缓冲液,将全部液体转移至 FCM 分析用试管,进行 FCM 分析。

1.2.7 细胞体外侵袭实验

在 Boyden 侵袭小室的上室中加 300μl 无血清的 RPMI-1640 培养液,置于培养箱中孵育 1~2h。制备细胞悬液,密度为 0.5×10⁶~1.0×10⁶ 个/ml。加 500μl 含 10% 胎牛血清的培养液于下室中,加 300μl 细胞悬液于上室中,培养箱中培养 48h。取出小室,吸掉培养液,轻轻擦掉未穿过的 ECMatrix 膜的细胞,中性甲醛固定,苏木素染色。在 200 倍光镜下随机取 5 个视野计数,取其均值代表浸润力量值。

1.2.8 皮下成瘤实验

细胞用胰酶消化制成单细胞悬液,无血清的培养基洗 3 遍后,细胞计数。取裸鼠 6 只,分别将 SW480/M5-sh*FMNL2* 组和 SW480/M5-mock 组细胞 5×10⁶ 个皮下注射于裸鼠左下背侧皮下和右下背侧皮下,连续观察 30d,用 LT-9MACIMSYSPULS 整体荧光体视镜采集、IPP5.0 软件分析 GFP 发出的荧光信号,并用 IPP5.0 软件计算肿瘤的面积。

1.2.9 体内转移实验

调整细胞悬液密度为 2×10⁷ 个/ml。无菌条件下,1% 戊巴比妥钠 (0.1ml/kg) 腹腔注射麻醉裸鼠,取

左侧腹 2.0~2.5cm 切口进腹。结扎、切断脾胃韧带,将脾脏完全显露于腹腔外,从脾脏上极进针,进针深度 1.0cm 以上,分别注入 SW480/M5-shFMNL2 或 SW480/M5-mock 细胞悬液 50 μ l,注射时间为 1min。可见注射部位脾被膜发白肿胀,拔出针头后即用棉球压迫,轻轻按揉 5min。结扎、切断脾蒂,移除脾脏,3-0 丝线单层间断缝合腹壁。每组接种 10 只裸鼠,术后继续在 SPF 条件下饲养。利用 LT-9MACIMSYSPULS 整体荧光体视镜采集、IPP5.0 软件分析 GFP 发出的荧光信号,实时活体观察癌生长情况,2 个月后处死裸鼠,利用整体荧光体视镜结合病理学方法观察裸鼠转移的情况。

1.3 统计学处理

应用 SPSS19.0 软件进行数据分析,侵袭实验采用单因素设计的方差分析,体外增殖实验和皮下成瘤实验采用重复测量设计的方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Real-time PCR 及 Western blot 检测 FMNL2 的表达

利用荧光定量 RT-PCR 检测的表达情况,结果表明稳定转染的 SW480/M5-shFMNL2 细胞中 *FMNL2* mRNA 的表达明显下降,与 SW480/M5-mock 细胞相比,约减少了 72% (Figure 1)。利用 Western blot 进一步验证 FMNL2 蛋白表达情况,结果亦显示干扰组中 FMNL2 蛋白表达明显下降(Figure 2)。

2.2 FMNL2 表达的下调抑制大肠癌细胞体外增殖

FMNL2 基因表达沉默后,CCK8 法观察体外细胞的增殖情况,结果显示与空白组及对照组相比,实验组增殖减慢 ($F=16.497, P=0.001$),对照组与空白组之间无统计学意义 (Figure 3)。流式细胞术分析细胞周期,数据显示,*FMNL2* 基因沉默后,细胞周期中 G_0/G_1 期细胞比例明显增加 ($P=0.001$),S 期的比例明显减少 ($P=0.001$), G_2/M 期细胞比例略有增加,但差异无统计学意义 ($P=0.087$),说明 *FMNL2* 基

因的沉默抑制了细胞的增殖速度 (Table 2)。提示 *FMNL2* 表达下调抑制大肠癌细胞的体外增殖能力。

2.3 FMNL2 表达下调抑制大肠癌细胞体外的侵袭能力

Boyden 实验检测细胞侵袭能力结果显示,SW480/M5-mock 细胞的浸润力量值为 97.43 ± 8.077 ,

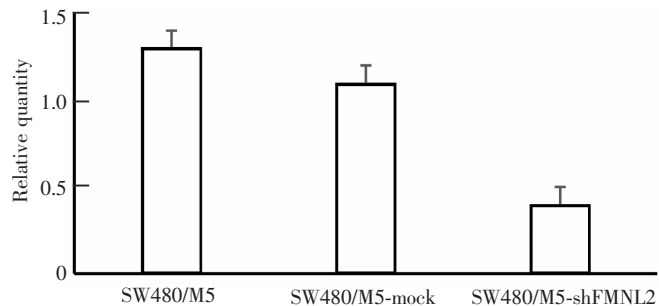


Figure 1 Screening of the most effective clone by Real Time PCR

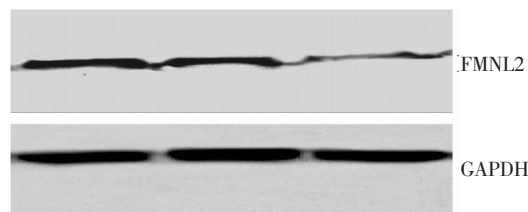


Figure 2 Identification of FMNL2 protein expression by Western blot

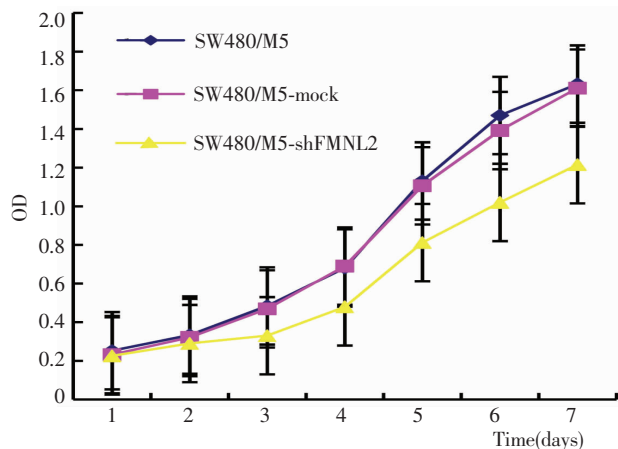


Figure 3 Cell growth curve of SW480/M5, SW480/M5-mock and SW480/M5-shFMNL2 cells

Table 2 Detection of the cell cycles of SW480/M5 and SW480/M5-shFMNL2 cells by flow cytometry

Cells	G_0/G_1 (%)	S(%)	G_2/M (%)
SW480/M5-mock	47.054 ± 3.418	63.000 ± 2.402	58.430 ± 1.765
SW480/M5-FMNL2	68.792 ± 0.886	48.400 ± 0.916	63.587 ± 0.884
P	0.001	0.001	0.087

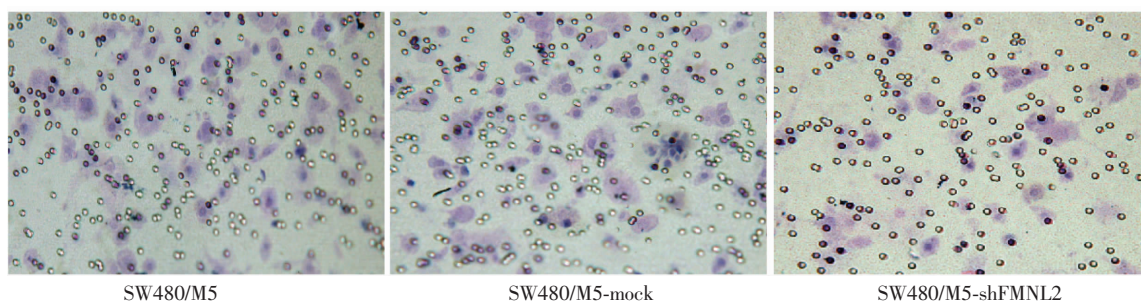


Figure 4 Comparison of invasion potency in vitro of SW480/M5, SW480/M5-mock and SW480/M5-shFMNL2 cells

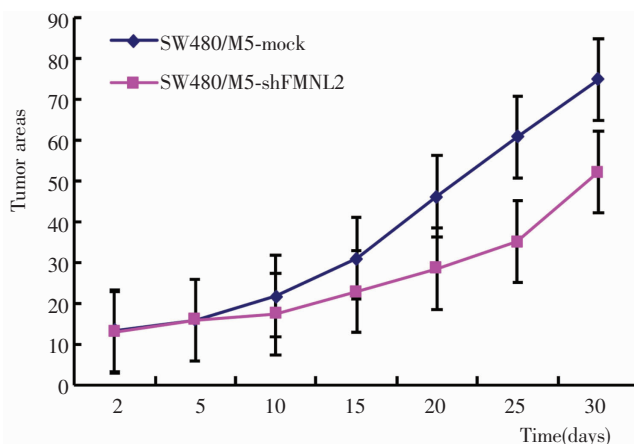
SW480/M5 细胞的浸润力量值为 100.12 ± 8.865 , SW480/M5-shFMNL2 细胞的浸润力量值为 47.44 ± 5.42 , SW480/M5-shFMNL2 组侵袭能力明显降低 ($F=45.747, P<0.01$) (Figure 4)。说明 *FMNL2* 表达沉默显著抑制了大肠癌细胞的体外侵袭能力。

2.4 *FMNL2* 表达下调降低大肠癌细胞体内成瘤能力

SW480/M5-mock 与 SW480/M5-shFMNL2 两组细胞的体内生长差异从第 20d 开始, 到第 30d 的时候差异最大, 达到 1.4 倍 (Figure 5)。提示 *FMNL2* 表达下调明显抑制体内移植瘤的生长。

2.5 *FMNL2* 表达下调降低大肠癌细胞体内转移能力

分别将 5×10^6 个 SW480/M5-mock 和 SW480/M5-shFMNL2 细胞通过脾脏注射法分别接种到 10 只裸鼠的体内, 利用整体荧光体视镜实时观察肿瘤的生长和转移的情况。实验结果显示, SW480/M5-



(The tumor areas were calculated by IPP5.0 software and indicated as mean $\pm$ SD of six mice.)

Figure 5 *FMNL2* gene silencing suppresses cell proliferation in vivo

mock 组术后 4~5 周开始, 裸鼠日渐消瘦, 腹部膨隆, 100% (10/10) 的裸鼠发生了肝脏转移, 肝脏出现多发性转移病灶, 且部分转移结节融合, 其余脏器均未见转移病灶。SW480/M5-shFMNL2 组 40% (4/10) 的裸鼠形成肝脏转移 (Figure 6)。

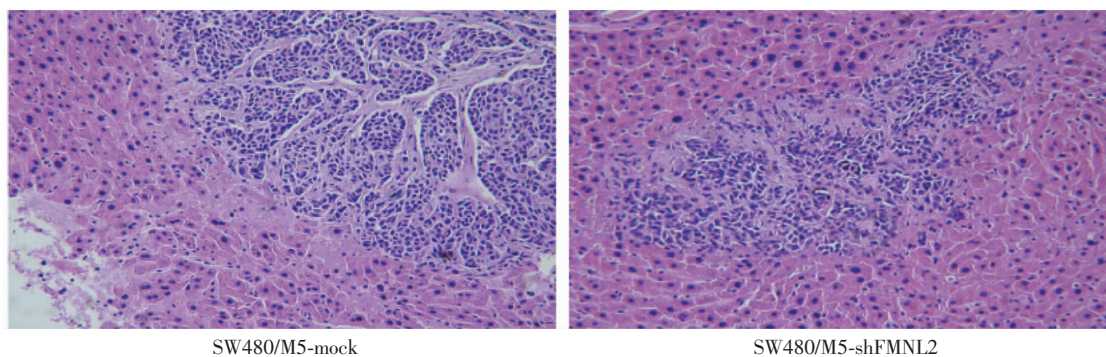


Figure 6 *FMNL2* gene silencing suppresses cell invasion in vivo

3 讨论

大肠癌是临床常见肿瘤,15%~25%的患者在原发肿瘤诊断时即有肝转移^[9],20%~35%的患者肝脏为唯一转移部位^[10]。对大肠癌肝转移的机制及特性进行研究,在临床上具有十分重要的意义。因此在本研究中,应用我们前期研究中发现的一种具有肝转移特性的细胞株——SW480/M5为研究对象,来探索与大肠癌转移相关的基因,以期大肠癌抗转移治疗寻找新的靶点。建立小鼠体内人大肠癌肝转移模型的方法主要有盲肠壁种植法和脾脏种植法。盲肠壁种植法肝转移发展过程较慢,肝转移发生率相对低,肠梗阻致死率高;脾脏种植法肝转移发展过程较快,肝转移发生率相对高。1984年,Kozlowski等^[11]首次提出研究人类肿瘤肝脏转移的最佳模式为脾脏内移植瘤细胞。本研究中,我们采用了脾注射法建立肝转移动物模型来检测细胞的体内侵袭能力。

DRFs家族是维持细胞骨架的肌动蛋白的调节因子,通过其C'端保守的formin homology 2(FH2)结构域促进肌动蛋白单体聚集二聚体以及加快肌动蛋白纤维的延伸,是细胞中重要的肌动蛋白成核因子之一^[12-14]。在器官的发生、正常组织内环境的稳定以及肿瘤细胞的侵袭和迁移等方面起到了重要的作用^[15,16]。近年来,DRFs蛋白对于肌动蛋白为基础的细胞间过程如细胞运动,细胞黏附,胞质分裂以及细胞极性的形成等的调节作用越来越引起人们的重视^[17]。DRFs蛋白可以与肌动蛋白结合蛋白RhoGTPase相互作用,是Rho信号转导通路,Src酪氨酸激酶信号转导通路以及wnt信号转导通路中的组成成分^[18-20]。DRFs家族的成员,如DAAM1、DAAM2在WNT-PCP旁路中起着重要的作用,可以激活Rho信号级联放大,Rho信号级联放大则可以诱导细胞肌动蛋白骨架重建和细胞的运动,参与细胞的侵袭和转移^[21]。胞质分裂是细胞增殖的主要过程,而收缩环的形成在胞质分裂中具有极重要的作用。通过RNAi技术,发现DRFs家族和很多有机体细胞的收缩环的形成组装有关^[22,23]。此外,DRFs家族蛋白还在有丝分裂纺锤体的定位和形成方面也有一定的作用。Kato等^[24]观察到在细胞分裂的不同时期,DRFs家族中的mDia都定位于纺锤体上。*FMNL2*基因编码产物具有DRFs家族典型的结构特征,但由于

*FMNL2*是一种新近发现的基因^[25],目前少有关于*FMNL2*功能研究的报道,人们通过生物信息学的方法发现*FMNL2*在弥散性胃癌、乳腺癌、软组织肉瘤、皮肤黑色素瘤以及恶性胶质瘤等的组织和肿瘤细胞系中均有表达^[15,25]。我们通过联系本实验室前期基因芯片的结果,猜测具有DRFs蛋白相似结构的*FMNL2*可能与大肠癌的侵袭、转移相关。因此,我们选定*FMNL2*作为一个新的大肠癌转移候选基因,对其功能进行研究。

在本研究中,我们利用基因敲除技术,沉默SW480/M5中*FMNL2*基因的表达,通过CCK8法检测了*FMNL2*对大肠癌细胞增殖的影响,通过5d的连续比较,发现*FMNL2*基因沉默明显降低了大肠细胞的体外增殖能力。流式细胞术检测细胞周期发现*FMNL2*基因沉默的SW480/M5其S期细胞比例减少,表明细胞增殖减慢。此外,我们将大肠癌细胞注射于裸鼠的皮下,建立可视化的动物模型,发现*FMNL2*基因沉默的SW480/M5在体内生长速度明显减慢。这些结果均说明*FMNL2*表达下调后,能显著性地抑制肿瘤细胞体内外生长,*FMNL2*基因是大肠癌的增殖相关基因。本研究中还采用boyden小室对基因沉默前后SW480/M5侵袭能力进行了检测;boyden小室中的人工基底膜胶与哺乳动物细胞基底膜成份类似,可以很好地模拟大肠癌体内环境的侵袭转移路径。结果表明,*FMNL2*基因沉默后SW480/M5的体外侵袭能力明显降低。利用脾注射法体内转移实验,对比检测了*FMNL2*基因沉默前后SW480/M5在裸鼠体内侵袭能力的变化,结果显示*FMNL2*基因沉默后SW480/M5的体内侵袭能力也明显降低。说明*FMNL2*基因与大肠癌细胞的转移侵袭能力显著相关。

综合上述,通过RNAi技术沉默*FMNL2*可以在体内外抑制SW480/M5增殖能力和侵袭能力。可以将*FMNL2*作为抑制大肠癌生长和转移的期望靶点,通过抑制其基因表达,达到阻止大肠癌细胞增殖和转移的目的。

参考文献:

- [1] Grikscheit K, Frank T, Wang Y, et al. Junctional actin assembly is mediated by Formin-like 2 downstream of Rac1 [J]. J Cell Biol, 2015, 209(3): 367-376.
- [2] Kitzing TM, Sahadevan AS, Brandt DT, et al. Positive

- feedback between Dial, LARG, and RhoA regulates cell morphology and invasion[J]. *Genes Dev*, 2007, 21(12): 1478–1483.
- [3] Carreira S, Goodall J, Denat L, et al. Misregulation of Dial controls melanoma proliferation and invasiveness[J]. *Genes Dev*, 2006, 20(24): 3426–3439.
- [4] Favaro PM, Traina F, Vassallo J, et al. High expression of FMNL1 protein in Tnon-Hodgkin's lymphomas [J]. *Leuk Res*, 2006, 30(6): 735–738.
- [5] Huang ZX, Sun Q, Ding YQ, et al. Mining microarray gene expression data of metastatic colorectal cancer by literature profiling [J]. *Journal of Southern Medical University*, 2003, 23(11): 1195–1197. [黄仲曦, 孙青, 丁彦青, 等. 用文献轮廓挖掘大肠癌转移芯片表达谱 [J]. *第一军医大学学报*, 2003, 23(11): 1195–1197.]
- [6] Zhang YF, Li L, Ding YQ. Isolation and characterization of human colorectal cancer cell subline with unique metastatic potential in the liver [J]. *Journal of Southern Medical University*, 2007, 27(2): 126–130. [张艳飞, 刘莉, 丁彦青. 具有肝转移倾向的结肠癌细胞亚系的筛选与鉴定[J]. *南方医科大学学报*, 2007, 27(2): 126–130.]
- [7] Zhu XL, Liang L, Ding YQ. Construction of Formin-like 2 specific small hairpin RNA expressing plasmid and its effect on proliferation in SW620 [J]. *Clinical Medicine of China*, 2008, 24(6): 513–517. [朱曦龄, 梁莉, 丁彦青. FMNL2 shRNA 表达质粒的构建及其对 SW620 增殖活性的影响[J]. *中国综合临床*, 2008, 24(6): 513–517.]
- [8] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [9] Knerr T, Bleichrodt RP. Treatment of liver metastases, an update on the possibilities and results [J]. *Eur J Cancer*, 2002, 38(7): 1023–1033.
- [10] Mattar RE, Al-Alem F, Simoneau E, et al. Preoperative selection of patients with colorectal cancer liver metastasis for hepatic resection [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(2): 567–581.
- [11] Kozlowski JM, Fidler IJ, Campbell D, et al. Metastatic behavior of human tumor cell lines grown in the nude mouse [J]. *Cancer Res*, 1984, 44: 3522–3529.
- [12] Yang C, Czech L, Gerboth S, et al. Novel roles of formin mDia2 in lamellipodia and filopodia formation in motile cells[J]. *PLoS Biol*, 2007, 5(11): e317.
- [13] Goode BL, Eck MJ. Mechanism and function of formins in the control of actin assembly[J]. *Annu Rev Biochem*, 2007, 76: 593–627.
- [14] Kühn S, Erdmann C, Kage F, et al. The structure of FMNL2-Cdc42 yields insights into the mechanism of lamellipodia and filopodia formation[J]. *Nat Commun*, 2015, 12(6): 7088.
- [15] Krainer EC, Ouderkirk JL, Miller EW, et al. The multiplicity of human formins: expression patterns in cells and tissues[J]. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 2013, 70(8): 424–438.
- [16] Gardberg M, Heuser VD, Koskivuo I, et al. FMNL2/FMNL3 formins are linked with oncogenic pathways and predict melanoma outcome [J]. *J Pathol Clin Res*, 2016, 2(1): 41–52.
- [17] Gardberg M, Talvinen K, Kaipio K, et al. Characterization of Diaphanous-related formin FMNL2 in human tissues[J]. *BMC Cell Biol*, 2010, 11: 55.
- [18] Habas R, Kato Y, He X. Wnt/PCP activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel Formin homology protein Daam1[J]. *Cell*, 2001, 107(7): 843–854.
- [19] Ishizaki T, Morishima Y, Okamoto M, et al. Coordination of microtubules and the actin cytoskeleton by the Rho effector mDia1[J]. *Nat Cell Biol*, 2001, 3(1): 8–14.
- [20] Wang Y, Arjonen A, Pouwels J, et al. Formin-like 2 promotes β 1-integrin trafficking and invasive motility downstream of PKC α [J]. *Dev Cell*, 2015, 34(4): 475–483.
- [21] Aspenstrom P, Richnau N, Johansson AS. The diaphanous-related formin DAAM1 collaborates with the Rho GTPases RhoA and Cdc42, CIP4 and Src in regulating cell morphogenesis and actin dynamics[J]. *Exp Cell Res*, 2006, 312(12): 2180–2194.
- [22] Peng J, Wallar BJ, Flanders A, et al. Disruption of the Diaphanous-related formin Drf1 gene encoding mDia1 reveals a role for Drf3 as an effector for Cdc42[J]. *Curr Biol*, 2003, 13(7): 534–545.
- [23] Tolliday N, VerPlank L, and Li R. Rho1 directs formin-mediated actin ring assembly during budding yeast cytokinesis[J]. *Curr Biol*, 2002, 12(21): 1864–1870.
- [24] Kato T, Watanabe N, Morishima Y, et al. Localization of a mammalian homolog of diaphanous, mDia1, to the mitotic spindle in HeLa cells[J]. *J Cell Sci*, 2001, 114(Pt 4): 775–784.
- [25] Katoh M and Katoh M. Identification and characterization of human FMNL1, FMNL2 and FMNL3 genes in silico[J]. *Int J Oncol*, 2003, 22(3): 1161–1168.