

文章编号 1006-8147(2020)03-0244-05

论著

# CFL1 的表达对前列腺癌进展影响的研究

肖龙飞, 彭华红, 杨阔, 王玉琢

(天津医科大学第二医院泌尿外科, 天津市泌尿外科研究所, 天津 300211)

**摘要** 目的:探讨 CFL1 在前列腺癌中的表达情况,并明确其对前列腺癌进展的影响。方法:采用免疫组化、qPCR 及 Western blot 检测 CFL1 的表达情况,采用 Transwell 实验检测细胞的迁移及侵袭能力,CCK-8 实验检测细胞的增殖能力。结果:在恶性程度高的前列腺癌中,CFL1 的蛋白及 mRNA 表达水平最高,恶性程度低的次之,良性前列腺增生最低( $P<0.05$ );Transwell 实验表明 si-CFL1 组较 si-NC 组,其迁移和侵袭能力均降低(均  $P<0.05$ );CCK-8 实验显示敲低 CFL1 后,前列腺癌细胞的增殖能力降低( $P<0.05$ )。结论:CFL1 在前列腺癌中高表达,而减低其表达水平可以抑制前列腺癌的进展。

**关键词** 前列腺癌; CFL1; 细胞迁移; 侵袭; 增殖; 凋亡

中图分类号 R697+.3

文献标志码 A

## Effect of CFL1 expression on prostate cancer progression

XIAO Long-fei, PENG Hua-hong, YANG Kuo, WANG Yu-zhuo

(Department of Urology, The Second Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin Institute of Urology, Tianjin 300211, China)

**Abstract Objective:** To investigate the expression of CFL1 in prostate cancer and to determine its effect on the progression of prostate cancer. **Methods:** The immunohistochemistry, qPCR and Western blot were used to detect the expression of CFL1. Transwell assay was used to detect the migration and invasion ability of cells. CCK-8 assay was used to detect the proliferation of cells. **Results:** In prostate cancer with high malignancy, CFL1 had the highest protein and mRNA expression levels, followed by low malignancy and benign prostatic hyperplasia(all  $P<0.05$ ). Transwell experiments showed that the migration and invasion ability were decreased in si-CFL1 group compared with si-NC group( $P<0.05$ ). The CCK-8 experiment showed that the proliferation of prostate cancer cells was decreased after CFL1 knockdown( $P<0.05$ ). **Conclusion:** CFL1 is highly expressed in prostate cancer, and reducing its expression can inhibit the progression of prostate cancer.

**Key words** prostate cancer; CFL1; cell migration; invasion; proliferation; apoptosis

前列腺癌是男性最常见的恶性肿瘤,也是癌症死亡的主要原因<sup>[1]</sup>。中国是前列腺癌发病及死亡较低的国家之一,但我国前列腺癌的发病率在近年来呈现持续快速增长趋势。肌动蛋白细胞骨架的动态变化,如肌动蛋白丝的解聚和断裂,是细胞存活、成形、胞质分裂、迁移等细胞过程所必需的。这些均表明细胞骨架是治疗肿瘤的潜在靶点<sup>[2-4]</sup>。肌动蛋白解聚因子(ADF)/辅酶蛋白(cofilin)是调节肌动蛋白和细胞骨架动力学的蛋白质家族之一<sup>[5]</sup>。CFL1(cofilin-1)是一种普遍存在的调节细胞周期和增殖<sup>[6]</sup>、凋亡<sup>[7]</sup>和兴奋性毒性神经变性<sup>[8]</sup>等细胞功能的蛋白质。此外,CFL1 表达量的增加与某些类型肿瘤和转移的进展有关<sup>[9-10]</sup>。虽然有报道 CFL1 在前列腺癌中充当某种药物或基因的中间因子<sup>[11-12]</sup>,而且 CFL1 在前列腺癌中高表达已被证实<sup>[13]</sup>,但是,CFL1 在前列腺癌中的具体作用仍不清楚。本研究中,笔者收集天津医科大学第二医院 2016 年 1 月-2018 年 12 月良性前列

腺增生和前列腺癌组织标本,并检测其中 CFL1 的表达水平,发现 CFL1 在前列腺癌中明显高表达,且其高表达与前列腺癌不良分化及患者不良预后密切相关。此外,降低内源性 CFL1 水平可显著抑制人前列腺癌细胞的增殖及转移。因此,CFL1 是评价前列腺癌发病及疾病进展的可能的分子标志物,其可能是未来前列腺癌分子治疗的有效靶点之一。

## 1 材料和方法

**1.1 细胞培养及组织** 人前列腺癌细胞系 LNCaP、DU-145、PC-3 及正常前列腺细胞系 RWP-1 均由天津市泌尿外科研究所冻存、复苏,于含 10% 的胎牛血清(FBS)的 RPMI-1640 培养液中 37℃ 5%CO<sub>2</sub> 培养。20 例良性前列腺增生及 40 例前列腺癌组织均取自患者前列腺切除术后的石蜡标本(天津医科大学第二医院)。该研究已经获得天津医科大学伦理委员会的批准。

**1.2 免疫组织化学法检测** 每张切片厚度为 4 μm,脱蜡后将切片放于 0.01 mol/L 的 pH 为 6.0~6.5 的枸橼酸盐中,然后用在微波炉中高火加热 8 min 进行

作者简介 肖龙飞(1993-),男,硕士在读,研究方向:泌尿外科;通信作者:王玉琢,E-mail:460576427@qq.com。

抗原修复。3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 阻断内源性过氧化物酶,正常山羊血清工作液封闭非特异性结合位点后,滴加稀释好的 CFL1(1:100)抗体,4℃过夜。滴加生物素标记的二抗,室温孵育 15 min,用 PBS 洗后,滴加辣根过氧化物酶标记的链卵白素,室温孵育 15 min,DAB 显色及苏木素复染,最后脱水封片。所有切片均由 3 名经验丰富的病理科医师在相同条件下盲法阅片。随机选取 5 个高倍镜视野进行观察,以胞浆出现淡黄色至棕黄色为阳性标志。染色结果分为阴性(-):细胞无染色或很弱;阳性结果分为 3 个等级:“+”为弱阳性染色;“++”为阳性染色;“+++”为强阳性染色。

**1.3 Western blot 检测** 将蛋白酶抑制剂(Solarbio, China)与总蛋白提取试剂(Solarbio, China)以 1:100 的比例混合,充分摇动并与培养细胞混合。通过 BCA 法测定蛋白质浓度,与上样缓冲液混合后每孔加 30 μg 蛋白行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白并在 PVDF 膜上电转移。将膜浸润于相应的一抗中 4℃孵育过夜,再于二抗中室温孵育 1 h。最后,采用 ECL 化学发光法对蛋白条带进行成像处理。抗体浓度 anti-GAPDH (1:1 500, Proteintech, USA), anti-CFL1(1:500, Proteintech, USA), anti-Caspase 3(1:1 000, Proteintech, USA), anti-BCL-2(1:1 000, Proteintech, USA)。

**1.4 实时定量 PCR(qRT-PCR)检测** 用 TRIzol 试剂(Invitrogen, Carlsbad, CA)从前列腺癌细胞中提取总 RNA。使用逆转录试剂盒(CWBIO, China)将总 RNA(3 μg)反转录成 cDNA。接下来,用 SYBR Green Master 试剂盒(Roche, Basel, Switzerland)扩增 cDNA。GAPDH 的表达用于标准作为每个样品中的内源对照 mRNA。所用引物如下:CFL1 上游引物为:5'-TTATGCCAGCTCCAAGGACG-3', 下游引物为:5'-CCTCGTAGCAGTTTGCTTGC-3'; GAPDH 上游引物为:5'-CAGGAGGCATTGCTGATGAT-3', 下游引物为:5'-GAAGGCTGGGGCTCATT-3'。qRT-PCR 引物从 Genewiz(Suzhou, China)获得。

**1.5 细胞转染** 针对 CFL1(siCFL1)的特异性 siRNA 购自 GenePharma(Suzhou, China)具有暂时沉默 CFL1 表达的作用。使用一个杂乱的无作用的序列作为对照 siRNA(siCtrl)。使用 Roche 转染试剂(Basel, Switzerland)将细胞与 siCFL1 或 siCtrl 一起孵育 6 h, 通过蛋白质印迹和 qRT-PCR 检测敲低效率<sup>[14]</sup>。

**1.6 CCK-8 增殖实验** 细胞增殖采用 CCK-8 试剂进行检测,将细胞铺板每组 6 孔,饥饿过夜,然后采

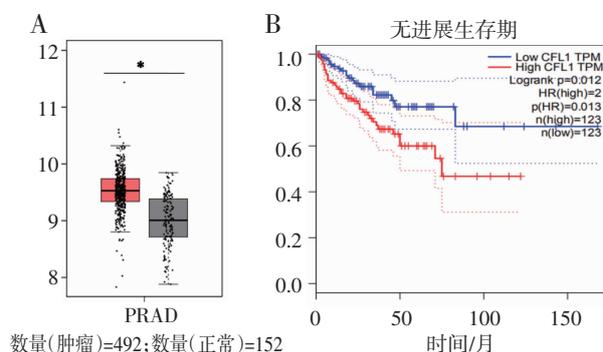
用 10%血清培养基在 37℃、5%CO<sub>2</sub> 条件下培养,分别于接种 24、48、72 h 后在 450 nm 光下进行吸光度检测,绘制细胞生长曲线。

**1.7 细胞侵袭及迁移实验** 使用具有 8.0 μm 孔径的 Transwell 小室(Corning Costar, Corning, NY, USA)进行体外侵袭测定和迁移测定。对于侵袭实验,将密度为 6×10<sup>4</sup>/200 μL 的细胞接种在无血清培养基中。上腔室加入 50 μL 的基质胶,而 600 μL 含有 10%血清的 1640 培养基加入下腔室。24 h 后,对通过膜的细胞用 DAPI 染色,并在荧光显微镜下计数细胞数。随机选取 5 个视野进行计数并做统计分析<sup>[15]</sup>。对于迁移实验,除了不加入基质胶外,操作流程与侵袭实验相同。

**1.8 统计学分析** 使用 SPSS22 进行数据分析。所有实验至少进行 3 次。所有数据均表示为  $\bar{x} \pm s$ 。t 检验用于比较两组之间的差异。多组样本均数的比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  被认为反映了统计学上的显著差异。

## 2 结果

**2.1 TCGA 数据库显示 CFL1 在前列腺癌中的表达较正常前列腺高** 为了明确 CFL1 是否在前列腺癌的发生或进展中发挥重要作用,首先利用 TCGA 数据库对 CFL1 在前列腺癌中的表达进行预测,显示 CFL1 在前列腺癌样本中的表达较正常前列腺样本明显升高(图 1A)。而且,CFL1 与前列腺癌的无进展生存期密切相关(图 1B),结果显示,CFL1 的表达越高,前列腺癌患者的无进展生存期越短。



注:A.CFL1 在前列腺癌样本和正常前列腺样本中的表达;B. CFL1 在前列腺癌中的无进展生存期

图 1 CFL1 在 TCGA 数据库中的情况

Fig 1 CFL1 in the TCGA database

**2.2 免疫组化染色显示 CFL1 蛋白在前列腺癌中高表达** CFL1 蛋白在良性前列腺增生组织中低表达,在前列腺癌分期 I、II 期的组织中中度表达,而在 III、IV 期的组织中 CFL1 呈现高表达(图 2)。各组织的具体阳性率比较见表 1。

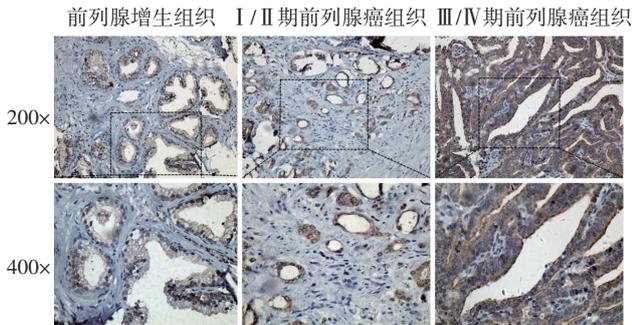
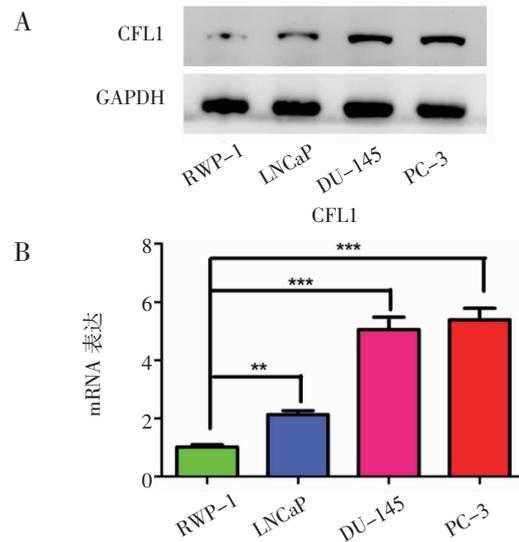
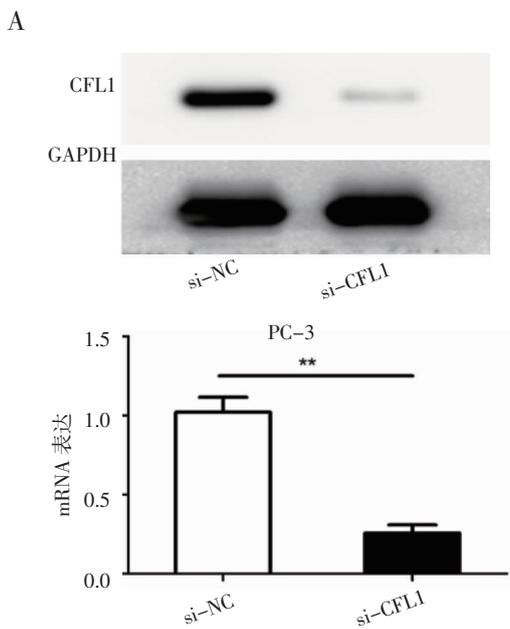


图 2 CFL1 在前列腺增生及前列腺癌组织中的表达  
Fig 2 Expression of CFL1 in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer

表 1 CFL1 在前列腺增生及前列腺癌组织中的表达  
Tab 1 Expression of CFL1 in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer

| 组织           | 例数 | 染色强度 /% |       |       |       | P     |
|--------------|----|---------|-------|-------|-------|-------|
|              |    | -       | +     | ++    | +++   |       |
| 前列腺增生组织      | 20 | 10(50)  | 7(35) | 3(15) | 0(0)  |       |
| I/II 期前列腺癌   | 20 | 4(20)   | 6(30) | 8(40) | 2(10) | <0.05 |
| III/IV 期前列腺癌 | 20 | 0(0)    | 4(20) | 8(40) | 8(40) |       |

2.3 CFL1 在恶性程度高的前列腺癌细胞系中表达量较高 为了进一步了解 CFL1 在前列腺癌中的作用, 验证它在正常前列腺细胞系 RWP-1 和不同恶性程度前列腺癌细胞系 LNCaP、DU-145、PC-3 中的表达水平, 发现 CFL1 在 RWP-1 中表达量最低, LNCaP 中次之, DU-145 和 PC-3 中最高 (图 3), 而 DU-145 和 PC-3 细胞系的恶性程度比 LNCaP 和 RWP-1 细胞系高。上述结果表明, CFL1 的表达随前列腺癌细胞的恶性程度增高而增高。

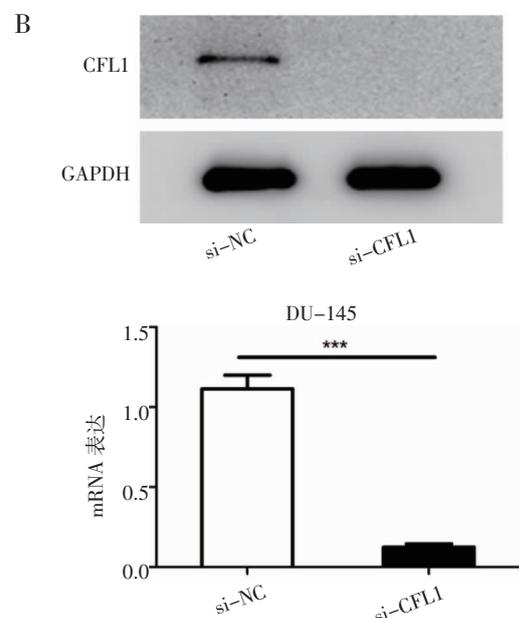


注: A.不同细胞系中 CFL1 蛋白表达水平; B.不同细胞系中 CFL1 mRNA 表达水平; 与 RWP-1 相比, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$

图 3 CFL1 在不同细胞系中的表达  
Fig 3 Expression of CFL1 in different cell lines

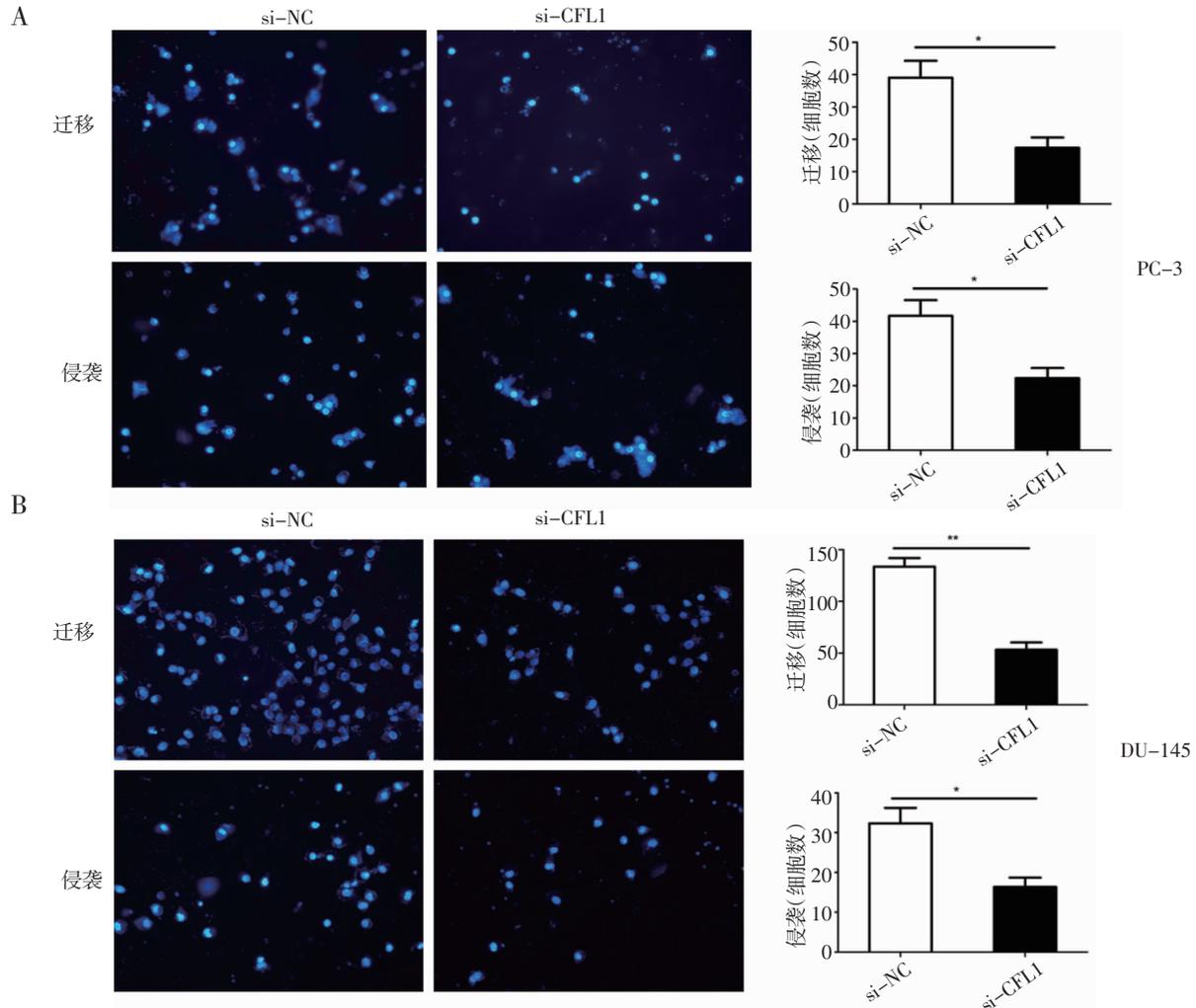
2.4 验证 CFL1 的敲低效率 笔者用 siRNA 分别在 PC-3 (图 4A) 和 DU-145 细胞系 (图 4B) 中敲低 CFL1, 并在 mRNA 和蛋白水平上检测敲低效率。经验证, 在两个细胞系中 CFL1 均达到敲低效果。

2.5 敲低 CFL1 可抑制前列腺癌细胞的迁移和侵袭 为了评价 CFL1 的生物学功能, 使用 Transwell 实验检测敲低 CFL1 后前列腺癌细胞迁移和侵袭能力的变化。实验结果表明, 敲低 CFL1 后 PC-3 细胞的迁移和侵袭能力均有明显的降低 (图 5A)。在 DU-145 细胞系中也可以看到同样的结果 (图 5B)。



注: A.CFL1 在 PC-3 细胞系中的敲低效率; B.CFL1 在 DU-145 细胞系中的敲低效率; 与 si-NC 相比, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$

图 4 验证 CFL1 的敲低效率  
Fig 4 Verify the knockdown efficiency of CFL1



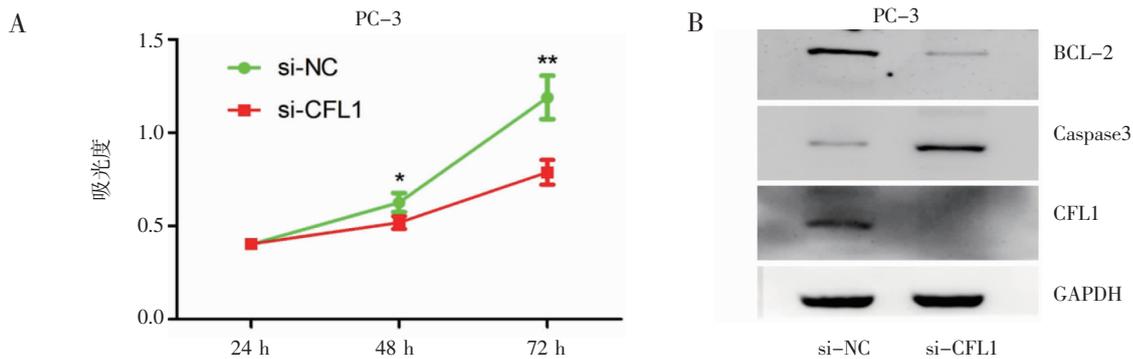
注:A.在 PC-3 细胞系中敲低 CFL1 后迁移和侵袭能力的检测;B.在 DU-145 细胞系中敲低 CFL1 后迁移和侵袭能力的检测;与 si-NC 相比,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$

图 5 敲低 CFL1 后细胞迁移和侵袭能力的改变

Fig 5 Changes in cell migration and invasion capacity after CFL1 knockdown

2.6 CFL1 低表达可抑制前列腺细胞的增殖并且促进凋亡 为了进一步探索 CFL1 在前列腺癌中的生物学功能,在 PC-3 细胞系中敲低 CFL1,然后通过 CCK-8 实验检测细胞增殖能力的改变,结果显示,敲低 CFL1 后,PC-3 细胞的增殖能力显著降低(图 6A)。

通过 Western blot 实验检测敲低 CFL1 后细胞凋亡标志物的改变,发现凋亡促进因子 caspase3 的表达量增加,凋亡抑制因子 BCL-2 的表达量降低(图 6B)。结果表明,敲低 CFL1 可以促进前列腺癌细胞的凋亡。



注:A.CCK-8 实验检测 PC-3 细胞系增殖的改变;B.通过 Western blot 检测敲低 CFL1 后凋亡相关标志物的变化;与 si-NC 相比 \* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$

图 6 敲低 CFL1 后细胞增殖和凋亡能力的改变

Fig 6 Changes in cell proliferation and apoptosis after CFL1 knockdown

### 3 讨论

CFL1 在很多肿瘤中都扮演着很重要的作用。已有研究显示, CFL1 在乳腺癌中高表达并且可以作为预测治疗反应的生物标志物<sup>[16-17]</sup>。而且, Aurora 激酶 A 可以通过诱导 CFL-1 活性, 从而促进乳头状甲状腺癌迁移及淋巴结转移<sup>[18]</sup>。还有报道, miR-182-5p 可以通过调节 CFL1, 影响人膀胱癌细胞的增殖、迁移和侵袭<sup>[19]</sup>。CFL1 在前列腺癌中也起着某些作用, CFL1 是人前列腺癌细胞中转化生长因子  $\beta$  信号转导的细胞内效应物<sup>[20]</sup>。同时, 通过碳纳米角递送 siRNA 敲低 CFL1, 增强了人前列腺癌细胞中多西紫杉醇介导的细胞毒性<sup>[21]</sup>。然而, 关于 CFL1 在前列腺癌中具体的作用及影响尚未有人研究。在这项研究中, 笔者试图研究 CFL1 在前列腺癌中的不同作用。

在目前的研究中, 笔者证明了 CFL1 在晚期前列腺癌中的表达高于早期前列腺癌和良性前列腺增生。此外, 还发现 CFL1 在侵袭性前列腺癌细胞系 DU-145 和 PC-3 中高度表达。当 CFL1 在 DU-145 和 PC-3 细胞系中被敲低时, 前列腺癌细胞的迁移、侵袭及增殖均被抑制, 而凋亡却增加。然而, 关于 CFL1 具体影响前列腺癌进展的机制尚不清楚, 这些需要进一步研究。

总的来说, 本研究数据证实了 CFL1 在前列腺癌细胞中高表达, 而且可以促进前列腺癌的发生、发展。这些均表明, CFL1 可作为前列腺癌潜在的肿瘤分子标志物及可能的靶向治疗分子靶点, 对于前列腺癌的治疗进展有着极大地借鉴作用。

#### 参考文献:

- [1] Attard G, Parker C, Eeles R A, et al. Prostate cancer[J]. Lancet, 2016, 387(10013):70
- [2] Van Troys M, Huyek L, Leyman S, et al. Ins and outs of ADF/cofilin activity and regulation[J]. Eur J Cell Biol, 2008, 87(8/9):649
- [3] Estornes Y, Gay F, Gevrey J C, et al. Differential involvement of destrin and cofilin-1 in the control of invasive properties of Isrecol human colon cancer cells[J]. Int J Cancer, 2007, 121(10):2162
- [4] Zhang Y, Tong X. Expression of the actin-binding proteins indicates that cofilin and fascin are related to breast tumour size[J]. J Int Med Res, 2010, 38 (3):1042
- [5] Ono S. Regulation of actin filament dynamics by actin depolymerizing factor/cofilin and actin-interacting protein 1: new blades for twisted filament[J]. Biochemistry, 2003, 42(46): 13363
- [6] Abe H, Obinata T, Minamide L S, et al. Xenopus laevis actin-depolymerizing factor/cofilin: a phosphorylation-regulated protein essential for development[J]. J Cell Biol, 1996, 132(5): 871
- [7] Zhu B, Fukada K, Zhu H, et al. Prohibitin and cofilin are intracellular effectors of transforming growth factor beta signaling in human prostate cancer cells[J]. Cancer Res, 2006, 66(17): 8640
- [8] Posadas I, Perez-Martinez F C, Guerra J, et al. Cofilin activation mediates Bax translocation to mitochondria during excitotoxic neuronal death[J]. J Neurochem, 2012, 120(4):515
- [9] Wang W, Eddy R, Condeelis J. The cofilin pathway in breast cancer invasion and metastasis[J]. Nat Rev Cancer, 2007, 7(6):429
- [10] Yang Z L, Miao X Y, Xiong L, et al. CFL1 and Arp3 are biomarkers for metastasis and poor prognosis of squamous cell/adenosquamous carcinomas and adenocarcinomas of gallbladder[J]. Cancer Invest, 2013, 31(2):132
- [11] Perez-Martinez F C, Carrion B, Lucio M I, et al. Enhanced docetaxel-mediated cytotoxicity in human prostate cancer cells through knockdown of cofilin-1 by Carbon nanohorn delivered siRNA [J]. Biomaterials, 2012, 33(32):8152
- [12] Xiao P, Ma T J, Zhou C W, et al. Anticancer effect of docetaxel induces apoptosis of prostate cancer via the cofilin-1 and paxillin signaling pathway[J]. Mol Med Rep, 2016, 13(5):4079
- [13] Lu L, Fu N, Luo X, et al. Overexpression of cofilin 1 in prostate cancer and the corresponding clinical implications[J]. Oncol Lett, 2015, 9(6):2757
- [14] Tang G L, Du R Y, Tang Z B, et al. MiRNAlet-7a mediates prostate cancer PC-3 cell invasion, migration by inducing epithelial-mesenchymal transition through CCR7/MAPK pathway [J]. J Cell Biochem, 2018, 119(4): 3725
- [15] Monet M, Lehen'kyi V, Gackiere F, et al. Role of cationic channel TRPV2 in promoting prostate cancer migration and progression to androgen resistance[J]. Cancer Res, 2010, 70(3): 1225
- [16] Leong S, Mckay M J, Christopherson R I. Biomarkers of breast cancer apoptosis induced by chemotherapy and TRAIL[J]. J Proteome Res, 2012, 11(2):1240
- [17] Tahtamouni L H, Shaw A E, Hasan M H, et al. Non-overlapping activities of ADF and cofilin-1 during the migration of metastatic breast tumor cells[J]. BMC Cell Biol, 2013, 14(3):45
- [18] Maimaiti Y, Jie T, Jing Z, et al. Aurora kinase A induces papillary thyroid cancer lymph node metastasis by promoting cofilin-1 activity[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 473(1):212
- [19] Wang F, Wu D, Xu Z, Chen J, et al. miR-182-5p affects human bladder cancer cell proliferation, migration and invasion through regulating Cofilin 1[J]. Cancer Cell Int, 2019, 19:42
- [20] Zhu B, Fukada K, Zhu H, et al. Prohibitin and cofilin are intracellular effectors of transforming growth factor beta signaling in human prostate cancer cells[J]. Cancer Res, 2006, 66(17): 8640
- [21] Perez-Martinez F C, Carrion B, Lucio M I, et al. Enhanced docetaxel-mediated cytotoxicity in human prostate cancer cells through knockdown of cofilin-1 by Carbon nanohorn delivered siRNA [J]. Biomaterials, 2012, 33(32):8152