



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.250370
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.250370
China Journal of General Surgery, 2026, 35(3):524-534.

· 基础研究 ·

AFAP1L2通过RAS/ERK信号通路促进胰腺癌细胞增殖和转移的机制研究

李子一¹, 郭思岐², 谢沛钦¹, 张敏¹, 钟晓华¹, 魏秀文¹, 胡琛¹

(广东省惠州市中心人民医院 1. 胃肠外科 2. 小儿外科, 广东 惠州 516000)

摘要

背景与目的: 胰腺癌恶性程度高、预后差, 亟需寻找新的分子治疗靶点。肌动蛋白丝相关蛋白1相似蛋白2 (AFAP1L2) 在多种肿瘤中发挥促癌作用, 但其在胰腺癌中的功能及分子机制尚未明确。本研究旨在探讨AFAP1L2在胰腺癌中的表达特征及其对肿瘤增殖与转移的调控机制。

方法: 基于生物信息学分析及Western blot检测AFAP1L2在胰腺癌组织与细胞中的表达, 并分析其与患者预后的关系。通过shRNA沉默AFAP1L2表达, 采用CCK-8、克隆形成、Transwell及划痕实验评估细胞增殖、侵袭与迁移能力; Western blot检测上皮-间充质转化及RAS/ERK信号通路相关蛋白变化; 构建裸鼠皮下移植瘤模型验证体内作用。通过RAS-GTP检测及免疫共沉淀实验探讨其分子机制。

结果: AFAP1L2在胰腺癌组织及细胞中高表达, 且与患者生存期呈负相关。沉默AFAP1L2明显抑制胰腺癌细胞增殖、侵袭和迁移能力, 并抑制裸鼠移植瘤生长。机制研究表明, AFAP1L2可与RASA1结合并抑制其GTP酶激活活性, 导致RAS-GTP水平升高, 激活RAS/ERK信号通路; 而沉默AFAP1L2可恢复RASA1对RAS的负调控作用, 降低ERK、MEK磷酸化水平, 从而抑制肿瘤进展。

结论: AFAP1L2通过结合并抑制RASA1活性, 激活RAS/ERK信号通路, 促进胰腺癌细胞增殖与转移, 具有潜在分子治疗靶点价值。

关键词

胰腺肿瘤; 肌动蛋白丝相关蛋白1相似蛋白2; RAS/ERK通路; 肿瘤浸润
中图分类号: R735.9

Mechanistic study of AFAP1L2 in promoting proliferation and metastasis of pancreatic cancer cells via the RAS/ERK signaling pathway

LI Ziyi¹, GUO Siqi², XIE Peiqin¹, ZHANG Min¹, ZHONG Xiaohua¹, WEI Xiuwen¹, HU Chen¹

(1. Department of Gastroenterology 2. Department of Pediatric Surgery, Huizhou Central People's Hospital, Huizhou, Guangdong 516000, China)

Abstract

Background and Aims: Pancreatic cancer is highly malignant with poor prognosis, and effective molecular targets are still lacking. Actin filament-associated protein 1-like 2 (AFAP1L2) has been

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金资助项目 (2023A1515220195)。

收稿日期: 2025-07-03; **修订日期:** 2026-03-10。

作者简介: 李子一, 广东省惠州市中心人民医院主治医师, 主要从事消化系统肿瘤方面的研究。

通信作者: 胡琛, Email: siemenhus@163.com

reported to promote tumor progression in multiple cancers; however, its role in pancreatic cancer remains unclear. This study aimed to investigate the expression profile and functional mechanism of AFAP1L2 in pancreatic cancer.

Methods: Bioinformatics analysis and Western blot were used to evaluate AFAP1L2 expression in pancreatic cancer tissues and cells, and its association with patient survival was analyzed. AFAP1L2 was silenced by shRNA, and cell proliferation, invasion, and migration were assessed using CCK-8, colony formation, Transwell, and wound healing assays. EMT markers and RAS/ERK pathway-related proteins were detected by Western blot. A nude mouse xenograft model was established to validate in vivo effects. RAS-GTP levels and co-immunoprecipitation assays were performed to explore the underlying mechanism.

Results: AFAP1L2 was highly expressed in pancreatic cancer tissues and cells and was negatively correlated with patient survival. Silencing AFAP1L2 significantly inhibited cell proliferation, invasion, and migration in vitro and suppressed tumor growth in vivo. Mechanistically, AFAP1L2 interacted with RASA1 and inhibited its GTPase-activating activity, leading to increased RAS-GTP levels and activation of the RAS/ERK pathway. Knockdown of AFAP1L2 restored RASA1-mediated negative regulation of RAS, decreased ERK and MEK phosphorylation, and attenuated malignant progression.

Conclusion: AFAP1L2 promotes proliferation and metastasis of pancreatic cancer cells by activating the RAS/ERK signaling pathway through inhibition of RASA1, suggesting its potential as a therapeutic target.

Key words

Pancreatic Neoplasms; Actin Filament Associated Protein 1-Like 2; RAS/ERK Pathway; Neoplasm Invasiveness

CLC number: R735.9

胰腺癌是全球范围内导致癌症相关死亡的主要原因之一^[1]。在我国,胰腺癌的发病率在所有恶性肿瘤中排第10位,病死率排第5位^[2]。大部分胰腺癌患者在就诊时已经达到肿瘤的晚期阶段,甚至出现远处转移,手术治疗的机会少,并且胰腺癌对化疗和放疗的敏感性较差^[3]。因此,寻找新的、有效的治疗胰腺癌的分子靶点是目前临床上亟待解决的关键问题。肌动蛋白丝相关蛋白1相似蛋白2(actin filament associated protein 1-like 2, AFAP1L2)是一种AFAP肌动蛋白丝相关蛋白家族接头蛋白,参与细胞增殖、存活和基因表达^[4]。多项研究发现,AFAP1L2在甲状腺癌、胃癌等肿瘤中发挥促癌基因的角色,通过促进细胞的增殖、迁移等调控肿瘤进展^[5-6]。同样,笔者团队前期研究^[7]发现,AFAP1L2的表达增加可以促进胰腺癌细胞的增殖。因此,AFAP1L2可能作为治疗胰腺癌的潜在的分子靶点。

RAS/ERK信号通路通过调节细胞周期、细胞增殖、分化、侵袭迁移以及血管生成等生物学过程在胰腺癌进展中发挥关键作用^[8]。RAS/ERK信号

通路又被称为MAPK信号级联反应,RAS受到信号转导刺激从非活性RAS-GDP转变为活性RAS-GTP形式,活化的RAS与RAF结合,进一步磷酸化激活MEK和ERK,驱动细胞增殖和存活^[9-11]。因此,针对该通路上的不同的节点进行靶向治疗可以达到肿瘤抑制作用。目前关于AFAP1L2在胰腺癌中的作用及机制研究较少,本研究探索AFAP1L2在胰腺癌细胞增殖、转移过程中扮演的角色及对RAS/ERK信号通路的调控机制,为临床上胰腺癌的靶向治疗提供新的理论基础。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人胰腺癌细胞系PANC-1、CFPAC、BxPC-3、SW1990和E6C7胰腺上皮细胞均购买自中国科学院上海细胞库,根据细胞特性分别选用DMEM培养基以及RPMI 1640培养基(含10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素),并置于5%CO₂、37℃的条件下培养。培养基均购买自Gibco公司。

1.2 shRNA 沉默AFAP1L2基因表达

从基因公司（吉凯基因）购买包被好shAFAP1L2的慢病毒，将 1×10^4 个细胞种到6孔板里。16~24 h后加入40 μL 的转染增强试剂和20 μL 病毒（MOI=10）。培养12~18 h后更换2 mL新鲜培养液，继续培养48~72 h。加入2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的嘌呤霉素处理3~5 d进行细胞筛选。使用Western blot检测进行转染效率的鉴定。

1.3 Western blot检测蛋白的表达

使用RIPA细胞裂解液（含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂，均购自碧云天公司）裂解细胞后超声破碎细胞，4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 $14\,000 \times g$ 离心10 min。取上清液后使用BCA试剂盒（购自碧云天）检测蛋白浓度。将SDS-PAGE凝胶放入电泳槽中，加入电泳液和蛋白样本，80 V条件下电泳至分子量标记（Marker）分离，130 V电泳至溴酚蓝见底。将电泳好的SDS-PAGE凝胶和NC膜放入电转槽中，200 mA的恒定电流在冰上进行转膜1~2 h，脱脂牛奶封闭1 h，加入一抗（anti-AFAP1L2 Ab 1:1 000、anti-ERK Ab 1:1 000、anti-P-ERK Ab 1:1 000、anti-MEK Ab 1:1 000、anti-P-MEK Ab 1:1 000、anti-E-cadherin Ab 1:1 000、anti-vimentin Ab 1:1 000 购自CST公司；anti-GAPDH Ab 1:2 000、anti- β -actin Ab 1:2 000 购自武汉三鹰公司）4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。第2天使用PBST洗膜后加入山羊抗兔二抗（1:2 000，购自Abcam公司），避光孵育1 h后通过ECL工作液显影。

1.4 CCK-8检测细胞活力

将1 000个细胞加到96孔板里，并在每个孔里加200 μL 的细胞培养液。每组细胞分别培养2、4、6 d。到达各组的实验时间后，吸净培养液，添加100 μL 的新的培养液和10 μL 的CCK-8（购自碧云天）。避光，37 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下分别孵育1、2、3 h。在450 nm的条件下检测细胞的吸光度。使用GraphPad软件进行数据分析。

1.5 Transwell和划痕实验检测细胞侵袭、迁移能力

将细胞种于Transwell小室中，小室内加入不含血清的培养液，小室外加入含有血清的培养液，培养24 h后，使用甲醇固定细胞30 min，结晶紫染色后将基底膜切下，置于载玻片上，中性树脂封片，在高倍镜下观察并拍照。其次，将细胞种在6孔板中，待细胞长满后更换无血清培养基，使用移液枪在瓶底划数条直线，培养12 h后观察划痕面积。

1.6 克隆实验检测胰腺癌细胞的增殖情况

以50、100、200个细胞的梯度密度将胰腺癌细胞接种在6孔板中，使细胞分散均匀，培养15 d后显微镜下观察细胞集落形成情况。

1.7 活化RAS pulldown检测试剂盒检测RAS-GTP水平

活化RAS pulldown检测试剂盒购买自Thermo Fisher Scientific。在培养皿中加入0.5 mL裂解缓冲液后冰上孵育5 min。收集4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下裂解液 $16\,000 \times g$ 离心5 min后收集上清液。加入10 μL pH 8.0的0.5 mol/L EDTA，加入5 μL 的10 mmol/L GTP γ S或者5 μL 的100 mmol/L GDP，30 $^{\circ}\text{C}$ 孵育15 min后加入32 μL 的1 mol/L MgCl_2 。旋转谷胱甘肽树脂瓶以彻底重悬琼脂糖珠，将100 μL 的50%树脂浆液加入带收集管的离心杯中， $6\,000 \times g$ 离心30 s。弃上清，加入400 μL 缓冲液， $6\,000 \times g$ 离心30 s后弃上清。将80 μg GST-Raf1-RBD加入到含有谷胱甘肽树脂的离心杯中。将700 μL 的细胞裂解物转移到离心杯中，涡旋振荡后4 $^{\circ}\text{C}$ 轻轻摇动孵育1 h。 $6\,000 \times g$ 离心30 s。加入400 μL 缓冲液， $6\,000 \times g$ 离心30 s，重复2次。将 β -巯基乙醇与2 \times SDS样品缓冲液以1:20混合。向树脂中加入50 μL 2 \times 还原样品缓冲液， $6\,000 \times g$ 离心2 min后去掉离心杯。将洗脱的样品在100 $^{\circ}\text{C}$ 加热5 min后进行Western blot分析。

1.8 HE染色观察肿瘤组织结构变化和细胞病变情况

将肿瘤组织石蜡切片分梯度浸到二甲苯、不同浓度的乙醇中浸泡进行脱蜡。将切片放到苏木素中染色5 min，使用蒸馏水洗5 min。用含1%盐酸的乙醇溶液分化切片数秒。再使用0.6%氨水浸泡切片1 min后用自来水洗切片5 min。将经过苏木素染色后的切片放到伊红中染色约1~3 min。将染色好的切片分别放到不同浓度的乙醇、二甲苯中进行梯度脱水，然后使用中性树脂封片。显微镜镜检，图像采集分析。

1.9 Ki-67免疫组化检测细胞的增殖

石蜡切片常规脱水，蒸馏水冲洗3次，3% H_2O_2 室温孵育10 min，灭活内源性过氧化物酶，PBS漂洗5 min \times 3次，用枸橼酸钠进行高压抗原修复5 min，PBS漂洗5 min \times 3次，滴加10%山羊血清孵育30 min。封闭非特异性抗原，PBS漂洗5 min \times 3次，加入一抗稀释液，4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。PBS漂

洗 5 min × 3 次, 滴加二抗室温孵育 30 min, PBS 漂洗 5 min × 3 次。滴加辣根酶标记的工作液室温孵育 30 min, PBS 漂洗 5 min × 3 次。DAB 显色, 苏木素复染, 0.1% 盐酸分化, 反蓝, 常规脱水透明, 中性树胶封固。PBS 取代一抗做阴性对照。

1.10 免疫共沉淀实验

裂解胰腺癌细胞, 加入特异性抗体 (Anti-AFAP1L2)、同型 IgG 抗体 (等量) 4 °C 旋转孵育过夜。加入预处理好的 Protein A/G 磁珠 4 °C 旋转孵育 2~4 h, 形成“磁珠-抗体-靶蛋白-互作蛋白”复合物。低速离心弃上清, 用预冷的 PBS 缓冲液重悬磁珠, 轻柔旋转洗涤 5 min。重复洗涤 3~4 次后吸尽残留液体。加入适量 2 × SDS 样品缓冲液, 95~100 °C 加热 5~10 min。离心取上清进行 Western Blot 检测。

1.11 裸鼠皮下移植瘤模型构建

选择 5~6 周龄的雄性 BALB/c 裸鼠并随机分为两组 ($n=6$)。将 1×10^6 个 BxPC-3 或 BxPC-3/AFAP1L2-shRNA 细胞注射在裸鼠背部的右下侧。皮下肿瘤成功后, 每天使用游标卡尺检测肿瘤的大小, 肿瘤大小计算公式为: $V = (L \times W^2) \times 0.5$ 。V 代表肿瘤的体积, L 是长度, W 是宽度。当对照组中的肿瘤达到 1 000 mm³ 时, 裸鼠吸入异氟烷麻醉后颈椎脱臼安乐死裸鼠, 随后切除肿瘤。并称量每个肿瘤的质量。然后将每个肿瘤分为两半。将其中的一半固定在 10% 浓度的福尔马林中进行肿

瘤组织的石蜡包埋和免疫组化实验。另一半快速冷冻并保存在液氮中, 进行后续的 Western blot 等实验。本研究的动物实验已经过广东医科大学动物伦理委员会批准 (GDY2302514)。

1.12 统计学处理

数据表示为平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$)。通过 SPSS 19.0 软件统计数据, 两组间数据比较使用 *t* 检验, 多组间数据比较采用单因素方差分析配合 Tukey 事后检验进行。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AFAP1L2 在胰腺癌中的表达及其与患者预后、胰腺癌细胞功能的关系

GEPIA 数据库分析发现 AFAP1L2 在胰腺癌组织中高表达 (图 1A), 并且高表达 AFAP1L2 的胰腺癌患者生存期明显降低 (图 1B)。Western blot 检测结果显示, AFAP1L2 在 PANC-1、CFPAC、BxPC-3、SW1990 人胰腺癌细胞中的表达均较 E6C7 胰腺上皮细胞升高, 并且 AFAP1L2 在 PANC-1 和 BxPC-3 这两种细胞株中表达最高 (图 2A)。因此, 选用 PANC-1 和 BxPC-3 进行后续实验。CCK-8 实验检测到分别在 PANC-1 和 BxPC-3 中沉默 AFAP1L2 的表达后 (图 2B), 胰腺癌细胞的活性明显降低 (图 2C)。克隆实验可见沉默 AFAP1L2 后, 胰腺癌细胞的增殖明显受到抑制 (图 2D)。

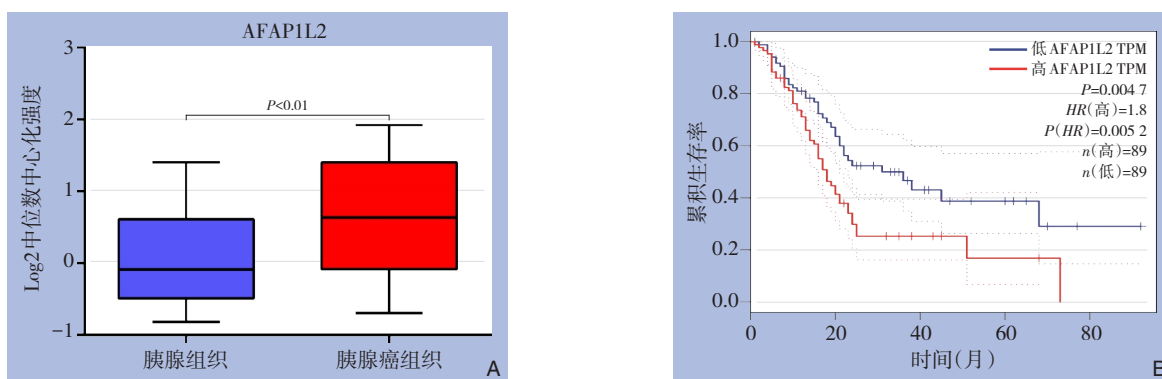


图 1 AFAP1L2 在胰腺癌细胞中的表达及其与患者预后的关系 A: GEPIA 数据库分析正常胰腺组织和胰腺癌组织中 AFAP1L2 的表达情况; B: GEPIA 数据库展示不同 AFAP1L2 表达水平胰腺癌患者的总生存曲线

Figure 1 Expression of AFAP1L2 in pancreatic cancer and its association with patient prognosis A: AFAP1L2 expression in normal pancreatic tissues and pancreatic cancer tissues based on GEPIA database; B: Overall survival curves of pancreatic cancer patients with different AFAP1L2 expression levels

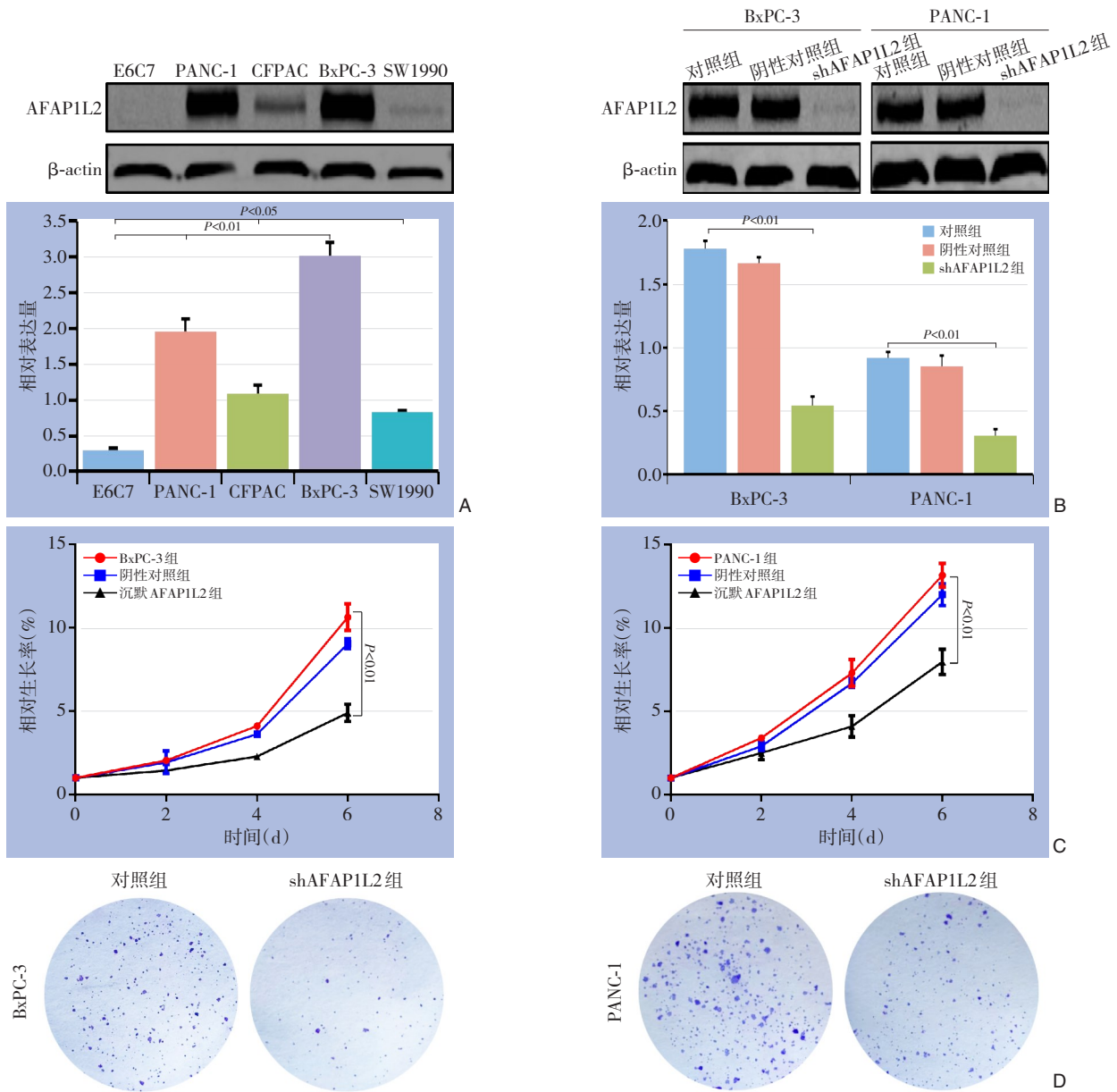


图2 沉默AFAP1L2后胰腺癌细胞增殖情况 A: 不同胰腺癌细胞和胰腺上皮细胞中AFAP1L2的表达情况; B: 沉默AFAP1L2后BxPC-3和PANC-1细胞中AFAP1L2表达; C: 沉默AFAP1L2对BxPC-3和PANC-1细胞活性的影响; D: 沉默AFAP1L2对BxPC-3和PANC-1细胞增殖的影响

Figure 2 Effects of AFAP1L2 knockdown on proliferation of pancreatic cancer cells A: Expression of AFAP1L2 in pancreatic cancer cell lines and normal pancreatic epithelial cells; B: AFAP1L2 expression in BxPC-3 and PANC-1 cells after knockdown; C: Effect of AFAP1L2 knockdown on cell viability; D: Effect of AFAP1L2 knockdown on cell proliferation

2.2 AFAP1L2与胰腺癌细胞上皮-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 及侵袭和转移的关系

EMT是恶性肿瘤发生转移和侵袭的重要原因,其明显特征是E-cadherin蛋白的丢失,和vimentin蛋白表达的增加^[12]。Western blot实验结果可见,沉默

AFAP1L2的表达后,胰腺癌细胞中E-cadherin的表达增加,vimentin的表达降低(图3A)。说明AFAP1L2可以促进胰腺癌细胞的转移。Transwell和划痕实验显示,AFAP1L2敲除后抑制了胰腺癌细胞的侵袭和迁移(图3B-C)。

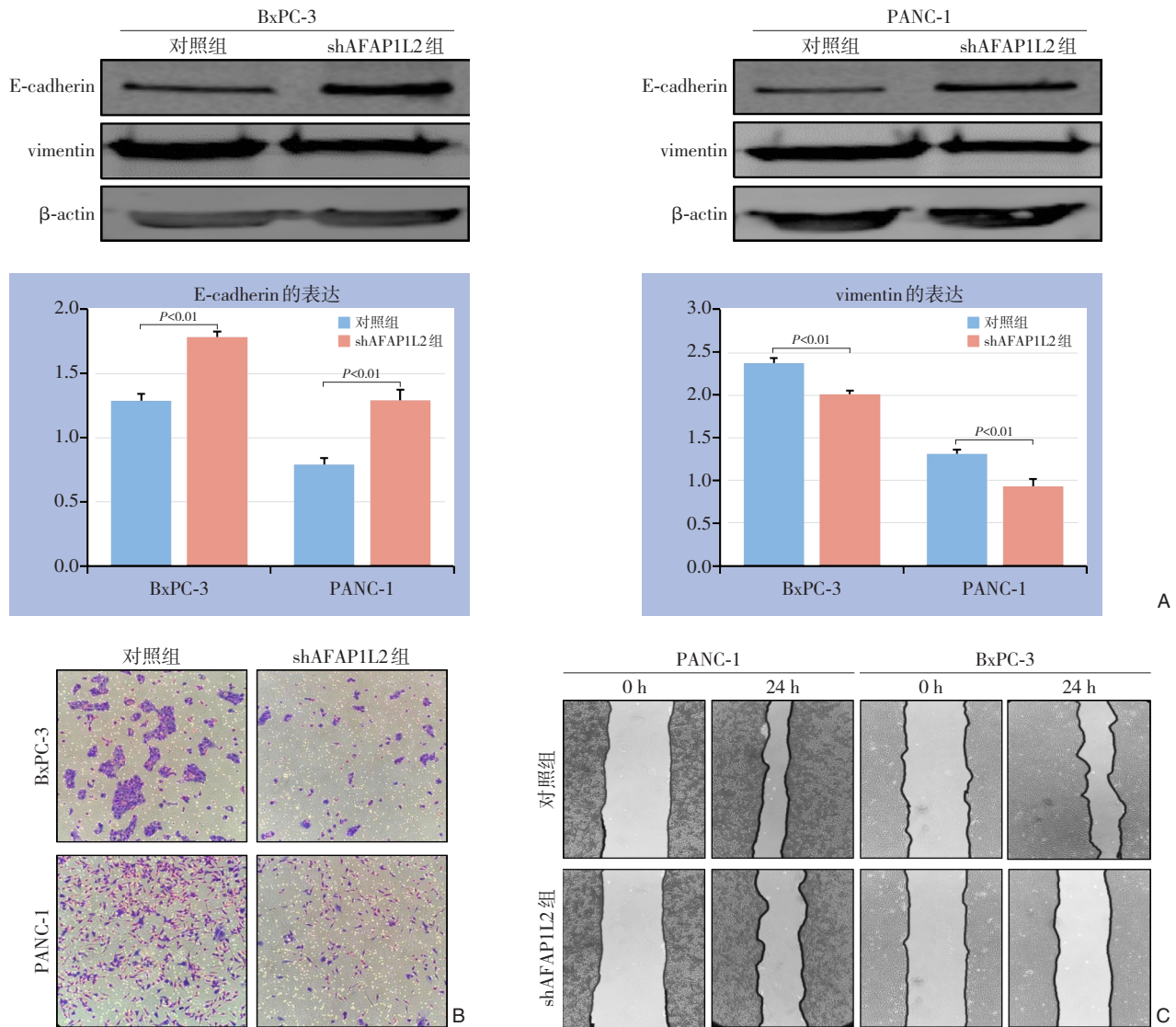


图3 沉默AFAP1L2对胰腺癌细胞EMT相关蛋白表达及侵袭和迁移的影响 A: Western blot检测胰腺癌细胞EMT相关蛋白的表达; B: Transwell实验检测细胞的侵袭能力; C: 划痕实验检测细胞的迁移能力

Figure 3 Effects of AFAP1L2 knockdown on EMT, invasion, and migration of pancreatic cancer cells A: Expression of EMT-related proteins detected by Western blot; B: Cell invasion assessed by Transwell assay; C: Cell migration assessed by wound healing assay

2.3 AFAP1L2与胰腺癌细胞中RAS/ERK信号通路的关系

Western blot 检测结果显示, 沉默 AFAP1L2 后, 胰腺癌细胞中 P-ERK 及 P-MEK 的水平明显降低, ERK 和 MEK 的水平没有明显变化 (图 4), 说明沉默 AFAP1L2 的表达抑制了 RAS/ERK 信号通路中 ERK 及 MEK 的活性。

2.4 AFAP1L2对胰腺癌细胞体内生长的影响

将正常 BxPC-3 细胞和沉默 AFAP1L2 质粒转染的 BxPC-3 细胞分别注射到裸鼠背部皮下, 构建裸鼠皮下移植瘤模型。经过 1 个月后, BxPC-3/

AFAP1L2-shRNA 组肿瘤的质量明显小于对照组, 肿瘤的质量同样明显减少 (图 5A)。肿瘤组织的 HE 染色和 Ki-67 免疫组化可见 BxPC-3/AFAP1L2-shRNA 组中肿瘤细胞明显坏死, 增殖受到抑制 (图 5B)。Western blot 检测结果显示, BxPC-3/AFAP1L2-shRNA 组中 P-ERK、P-MEK、vimentin 的水平下降, E-cadherin 的表达水平增加 (图 6), 说明沉默 AFAP1L2 在体内同样抑制了 RAS/ERK 信号通路, 并且抑制胰腺癌细胞的生长和 EMT, 这与细胞实验结果一致。

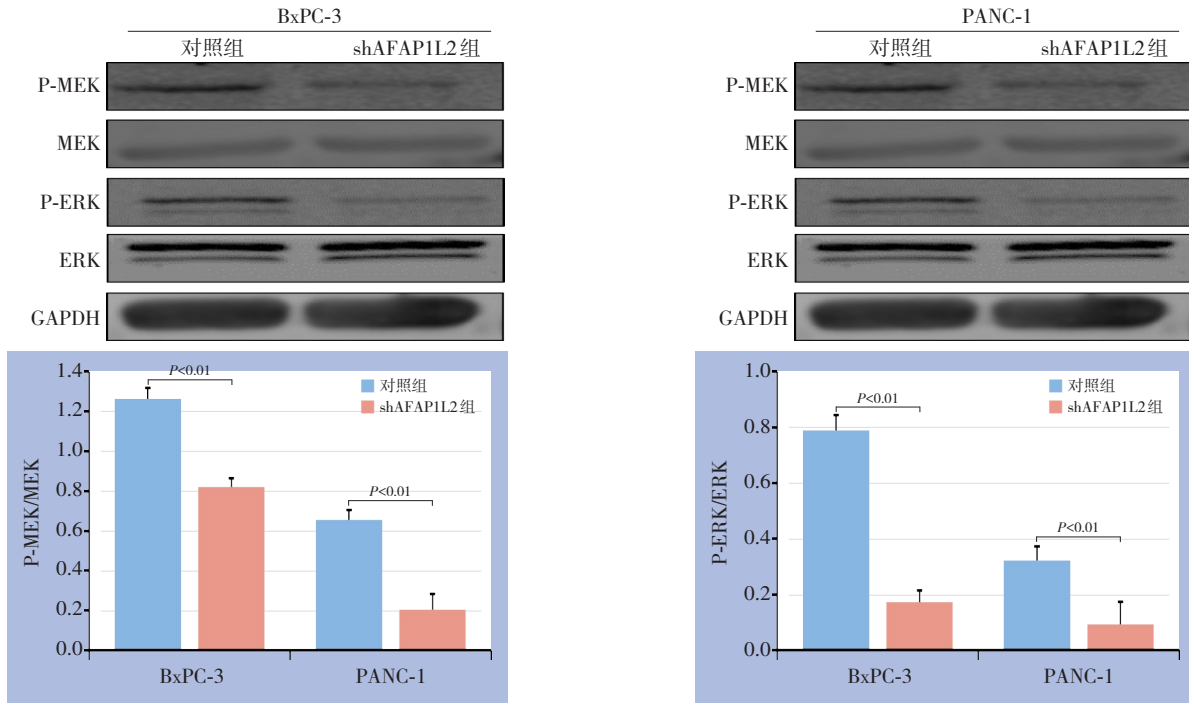


图4 沉默AFAP1L2对胰腺癌细胞中RAS/ERK通路相关蛋白表达的影响

Figure 4 Effects of AFAP1L2 knockdown on RAS/ERK signaling pathway-related proteins in pancreatic cancer cells

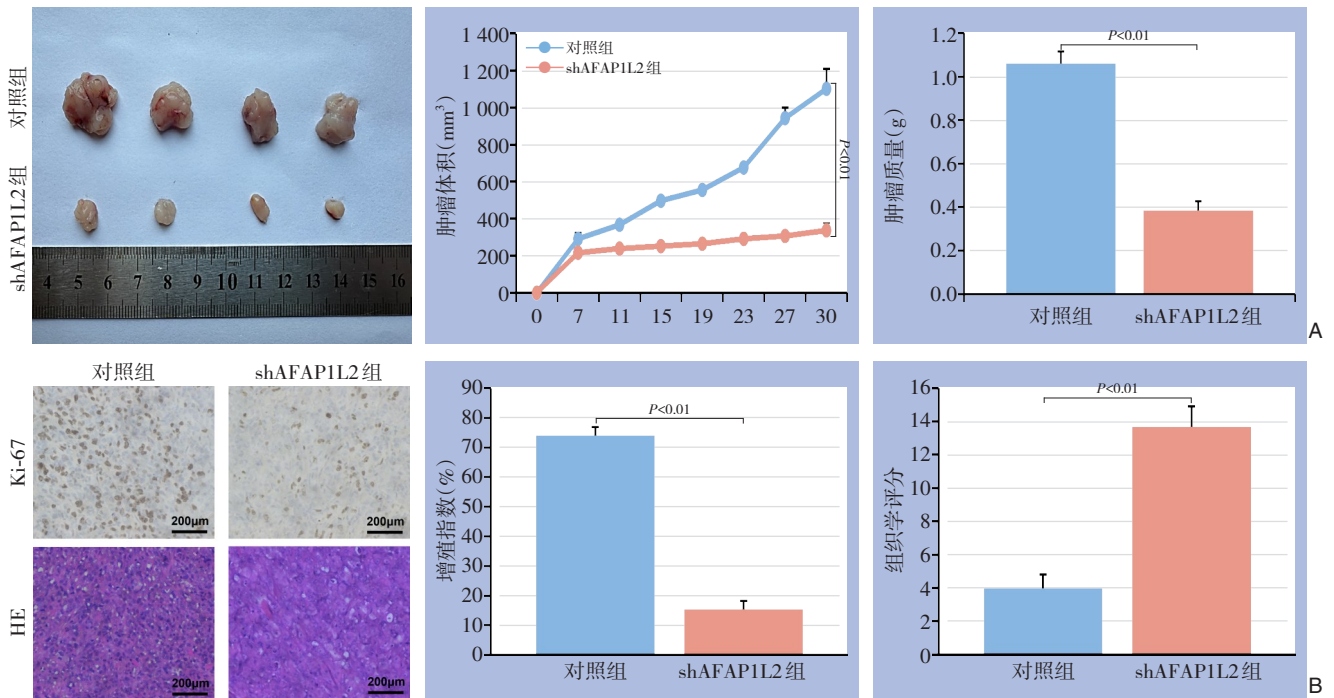


图5 AFAP1L2对胰腺癌移植瘤生长的影响 A: 胰腺癌移植瘤的体积与质量; B: 胰腺癌移植瘤Ki-67免疫组化染色和HE染色

Figure 5 Effects of AFAP1L2 on growth of pancreatic cancer xenografts A: Tumor volume and weight of xenografts; B: Ki-67 immunohistochemistry and HE staining of tumor tissues

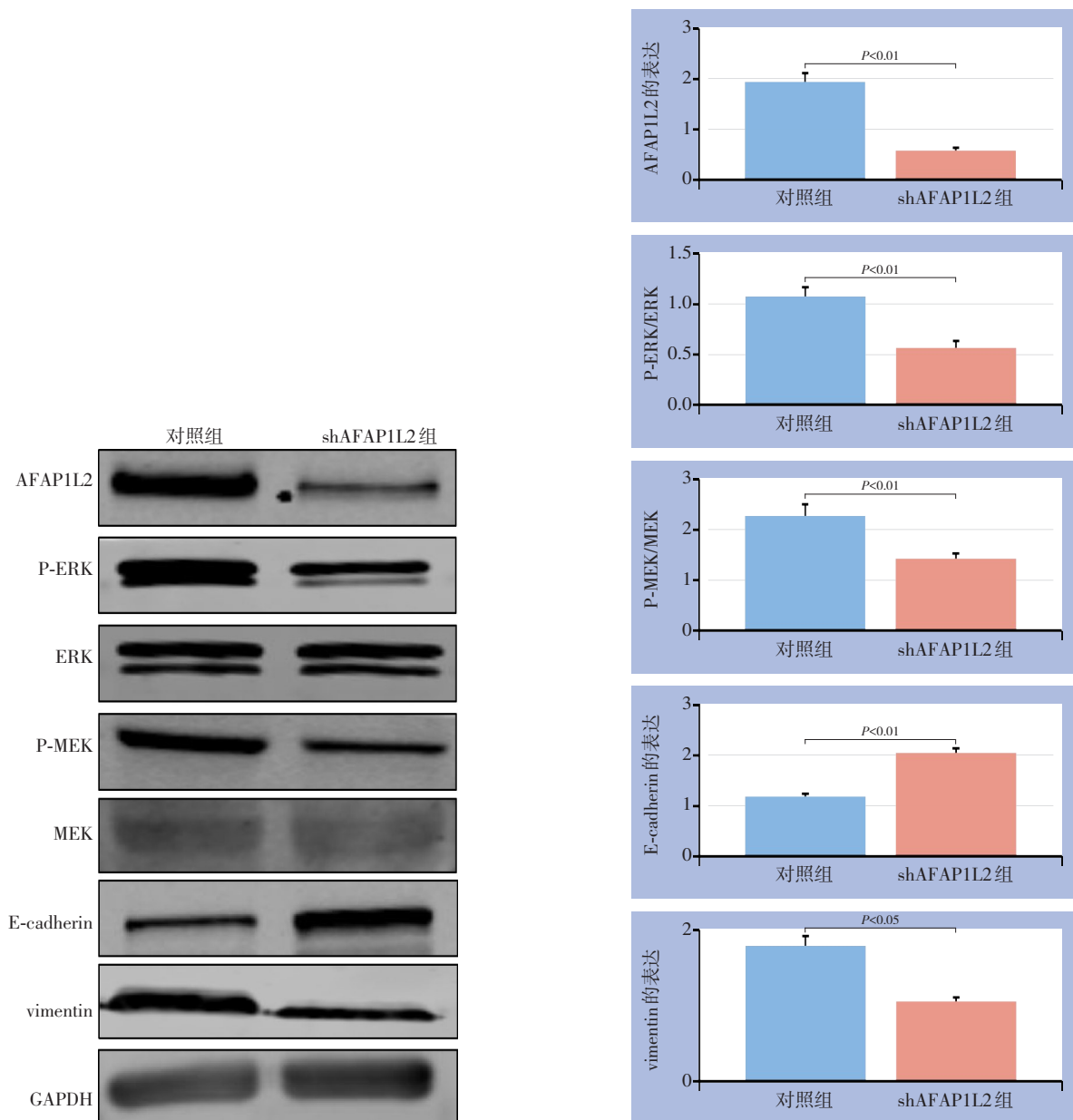


图6 胰腺癌移植瘤中RAS/ERK通路及EMT相关蛋白的表达

Figure 6 Expression of RAS/ERK pathway and EMT-related proteins in pancreatic cancer xenografts

2.5 AFAP1L2调控RAS/ERK通路的机制

RAS p21 蛋白激活因子 1 (RAS p21 protein activator1, RASA1) 是一种内源性的 RAS-GTP 酶激活蛋白 (RAS-GTPase-activating protein, RAS-GAP), 可以加速 RAS-GTP 的水解使 RAS 处于非激活状态, 进而抑制 RAS/ERK 通路^[13]。本研究结果表明沉默 AFAP1L2 的表达后, RAS-GTP 的水平明显降低 (图 7A); 单独沉默 RASA1 可以增加 RAS-GTP 的水平, 然而当同时沉默 RASA1 和 AFAP1L2 时, RAS-

GTP 的水平未发生明显变化 (图 7B), 说明 RAS 的活性受 RASA1 调控, 而 AFAP1L2 不直接调控 RAS 活性; 沉默 AFAP1L2 降低 RAS 活性的效应依赖于 RASA1 的存在。由于 AFAP1L2 是一种接头蛋白, 通过与靶蛋白相互结合发挥作用^[4]。通过免疫共沉淀实验发现, AFAP1L2 可以与 RASA1 特异性结合 (图 7C)。以上结果说明 AFAP1L2 通过与 RASA1 特异性结合并抑制其水解酶的活性, 从而激活 RAS/ERK 信号通路。

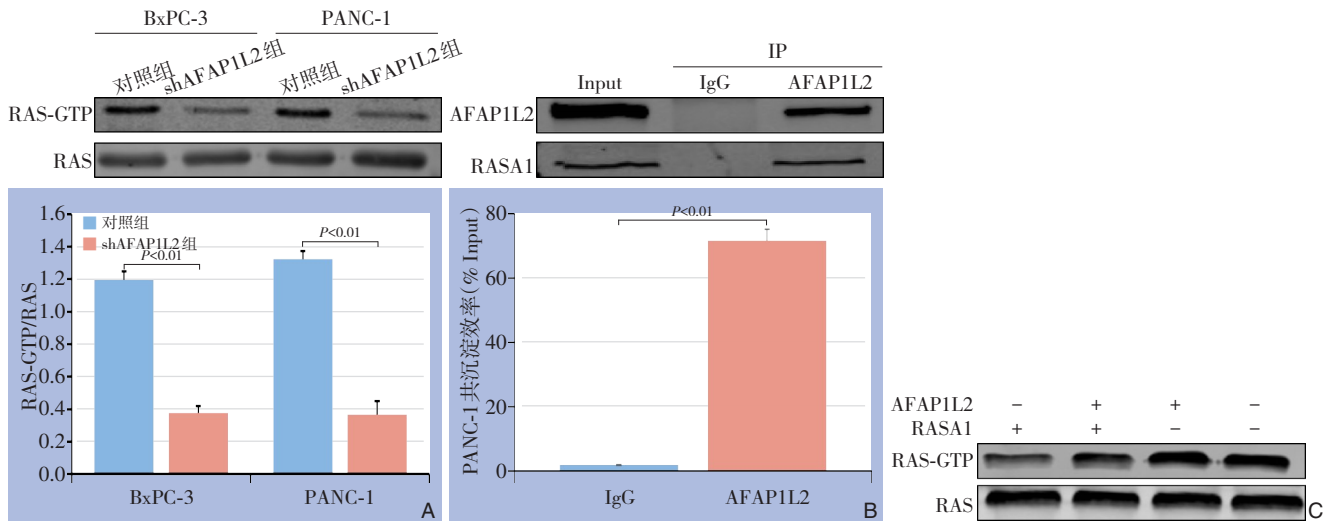


图7 AFAP1L2调控RAS/ERK通路的机制分析 A: 沉默AFAP1L2后胰腺癌细胞中RASA1和RAS-GTP的水平变化; B: 分别沉默AFAP1L2以及RASA1后检测RAS-GTP的水平变化; C: 免疫共沉淀实验分析AFAP1L2与RASA1的关系

Figure 7 Mechanism of AFAP1L2 regulation of the RAS/ERK signaling pathway A: Changes in RASA1 and RAS-GTP levels after AFAP1L2 knockdown; B: RAS-GTP levels after knockdown of AFAP1L2 and/or RASA1; C: Interaction between AFAP1L2 and RASA1 detected by co-immunoprecipitation

3 讨论

胰腺癌是一种恶性程度高、预后差的消化系统恶性肿瘤，约90%为胰腺导管癌^[14]。胰腺癌早期症状不明显，诊断时即为晚期，高达85%的胰腺癌患者不适合进行根治性手术^[15]，即使符合肿瘤组织切除条件的早期癌症患者5年生存率也不足31%^[16]。目前治疗胰腺癌最好的辅助化疗方案包括FOLFIRINOX方案和白蛋白结合型紫杉醇联合吉西他滨治疗，但该方案患者的生存效益不明显，且毒性较大^[17]。此外，多种靶向药物（如西妥昔单抗、贝伐单抗、阿西替尼等）及厄洛替尼联合吉西他滨方案，均未显著改善患者总生存期或显示出明确的临床获益^[18-19]。因此，寻找新的分子靶点对于临床上治疗胰腺癌具有十分重大的意义。

AFAP1L2是一种细胞质接头蛋白，其N端和C端包含多个蛋白质-蛋白质、蛋白质-脂质互作的功能序列，介导信号转导和级联反应，参与调控细胞周期和基因表达^[4]。AFAP1L2与多种肿瘤恶性进展有关，有研究^[5]报道，AFAP1L2能够促进甲状腺癌肿瘤细胞增殖、迁移、抑制癌细胞死亡。AFAP1L2高表达胃癌患者生存率显著降低，复发率升高，同时反映患者对化疗的敏感性^[20]。此外，AFAP1L2可能作为预测晚期肺癌患者生存结局的重要预后工具^[21]。在早期的研究中发现AFAP1L2可能作为治疗胰腺癌的潜在分子靶点^[7]，但其具体作

用机制尚未明确。值得注意的是，本研究显示AFAP1L2在胰腺癌细胞中高表达，并且生存曲线分析发现AFAP1L2的表达与患者生存时间负相关，说明AFAP1L2可能作为促癌基因在胰腺癌细胞中发挥作用。功能实验证实，沉默AFAP1L2的表达后可抑制胰腺癌细胞的增殖与侵袭、转移能力。此外，在体内沉默AFAP1L2显著抑制肿瘤生长。

研究发现，RAS/ERK信号通路通过调节细胞周期、细胞增殖、分化、侵袭迁移、血管生成和肿瘤耐药等过程在胰腺癌进展中发挥关键作用^[8, 22-23]。Frank等^[24]发现，利用变构抑制剂RMC-4550联合LY3214996体外处理胰腺癌细胞能够抑制RAS上游SHP2和下游ERK的表达，严重干扰RAS/ERK信号通路水平，进而促进胰腺癌细胞凋亡，达到协同抗肿瘤作用。Sugito等^[25]利用化学方法修饰miRNA得到的MIR143#12，通过抑制RAS、Akt和ERK整个RAS信号网络以抑制胰腺癌和结直肠癌细胞增殖，从而发挥抗肿瘤作用。基于以往研究，笔者对AFAP1L2调控胰腺癌增殖、迁移的作用机制进行了探究。与以往研究一致，本研究数据显示，在体内和体外实验中沉默AFAP1L2的表达后，RAS/ERK通路相关蛋白ERK、MEK的磷酸化水平均明显降低，这提示AFAP1L2可能通过激活RAS/ERK信号通路促进胰腺癌进展。

RASA1是RasGAP家族成员之一，通过促进RAS-GTP水解为RAS-GDP来负调控RAS/ERK通路，

从而导致RAS失活^[26-28]。通过实验,笔者发现沉默RASA1可以增加RAS-GTP水平。与此同时,沉默AFAP1L2后,RAS-GTP的水平下降,提示沉默AFAP1L2可促进RASA1对RAS的负调控作用。有趣的是,沉默AFAP1L2无法逆转敲低RASA1对RAS-GTP的水平促进作用,表明AFAP1L2可能间接作用于RAS蛋白,其中需要RASA1作为“桥梁”。基于先前研究中提出AFAP1L2可以与其他蛋白相互结合调控细胞增殖和存活^[29],本研究通过免疫共沉淀实验证实了AFAP1L2可以与RASA1特异性结合。因此推测在正常生理情况下,AFAP1L2通过与RASA1相互作用,阻碍了RASA1对RAS的GTP酶活性的调控。当AFAP1L2被沉默后,这种抑制作用被解除,使得细胞内既有的RASA1蛋白能够充分发挥其催化潜能,显著加速RAS-GTP向RAS-GDP的水解转化,从而导致活性RAS-GTP水平的急剧下降,最终造成RAS信号通路的失活。

目前为止,AFAP1L2与RASA1的结合位点仍不清楚。通过文献发现RASA1的SH2结合域可以与含有YXXP(Y代表酪氨酸,X代表任意氨基酸,P代表脯氨酸)SH2结合序列的蛋白特异性结合^[30]。通过美国国家生物技术信息中心数据库进行氨基酸序列分析显示,AFAP1L2蛋白第161~164位氨基酸残基构成YQWP序列,符合潜在的SH2结合基序特征^[31-32]。因此,笔者推测AFAP1L2可能通过其161~164(YQWP)SH2结合序列与RASA1的SH2结合域特异性结合,这一关键的蛋白互作界面可能成为开发干预胰腺癌进展的潜在药物靶点。其次,鉴于AFAP1L2位于RAS上游并通过抑制负调控因子RASA1来激活通路,靶向AFAP1L2可能与现有的MEK或ERK抑制剂产生协同效应。这些推测需要在后续实验进一步验证。

综上所述,AFAP1L2可特异性结合RASA1,导致RAS-GTP向RAS-GDP的转化受抑制,进而激活RAS/ERK信号通路促进胰腺癌细胞的增殖和转移,发挥促癌基因作用。

作者贡献声明:李子一负责分子生物学实验文章撰写;郭思岐负责细胞培养;谢沛钦负责动物饲养;张敏负责免疫组化;钟晓华负责统计学分析;魏秀文、胡琛负责研究设计及论文审核。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3):209-249. doi:10.3322/caac.21660.
- [2] 赵银峰,梁云,魏天天,等.长链非编码RNA PCAT19对胰腺癌细胞增殖与侵袭的影响及其作用机制[J]. *中国普通外科杂志*, 2023, 32(9): 1333-1340. doi: 10.7659/j. issn. 1005-6947.2023.09.006.
Zhao YF, Liang Y, Wei TT, et al. Effect of long non-coding RNA PCAT19 on proliferation and invasion in pancreatic cancer cells and its action mechanism[J]. *China Journal of General Surgery*, 2023, 32(9): 1333-1340. doi: 10.7659/j. issn. 1005-6947.2023.09.006.
- [3] 王云峰,夏俊伟,徐白莹.脂代谢异常在胰腺癌发生发展中作用的研究进展[J]. *中国普通外科杂志*, 2024, 33(3):416-423. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2024.03.013.
Wang YF, Xia JW, Xu BY. Role of lipid metabolism disorders in the occurrence and development of pancreatic cancer: a review of research progress[J]. *China Journal of General Surgery*, 2024, 33(3): 416-423. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2024.03.013.
- [4] Lodyga M, Bai XH, Kapus A, et al. Adaptor protein XB130 is a Rac-controlled component of lamellipodia that regulates cell motility and invasion[J]. *J Cell Sci*, 2010, 123(Pt 23):4156-4169. doi:10.1242/jcs.071050.
- [5] Shiozaki A, Lodyga M, Bai XH, et al. XB130, a novel adaptor protein, promotes thyroid tumor growth[J]. *Am J Pathol*, 2011, 178(1):391-401. doi:10.1016/j.ajpath.2010.11.024.
- [6] Li GM, Liang CJ, Zhang DX, et al. XB130 knockdown inhibits the proliferation, invasiveness, and metastasis of hepatocellular carcinoma cells and sensitizes them to TRAIL-induced apoptosis[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2018, 131(19):2320-2331. doi: 10.4103/0366-6999.241800.
- [7] Li Z, Xie X, Tan G, et al. Disulfiram synergizes with SRC inhibitors to suppress the growth of pancreatic ductal adenocarcinoma cells in vitro and in vivo[J]. *Biol Pharm Bull*, 2021, 44(9):1323-1331. doi:10.1248/bpb.b21-00353.
- [8] Wang S, Zheng Y, Yang F, et al. The molecular biology of pancreatic adenocarcinoma: translational challenges and clinical perspectives[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1):249. doi: 10.1038/s41392-021-00659-4.
- [9] Parikh N, Shuck RL, Nguyen TA, et al. Mouse tissues that undergo neoplastic progression after K-Ras activation are distinguished by nuclear translocation of phospho-Erk1/2 and robust tumor suppressor responses[J]. *Mol Cancer Res*, 2012, 10(6): 845-855. doi:10.1158/1541-7786.MCR-12-0089.
- [10] Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(1):11-22. doi:10.1038/nrc969.

- [11] Montagut C, Settleman J. Targeting the RAF-MEK-ERK pathway in cancer therapy[J]. *Cancer Lett*, 2009, 283(2): 125–134. doi: 10.1016/j.canlet.2009.01.022.
- [12] 毛娜, 李扬, 丁韩梦, 等. 白藜芦醇对小鼠甲状腺乳头癌细胞移植瘤的抑制作用及机制研究[J]. *中国普通外科杂志*, 2023, 32(11): 1770–1777. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2023.11.016.
- Mao S, Li Y, Ding HM, et al. Inhibitory effect of resveratrol on transplanted tumors of papillary thyroid cancer cells in mice and its mechanism[J]. *China Journal of General Surgery*, 2023, 32(11): 1770–1777. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2023.11.016.
- [13] Sot B, Behrmann E, Raunser S, et al. Ras GTPase activating (RasGAP) activity of the dual specificity GAP protein Rasal requires colocalization and C2 domain binding to lipid membranes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(1): 111–116. doi:10.1073/pnas.1201658110.
- [14] Tonini V, Zanni M. Pancreatic cancer in 2025: Have we found a solution? [J]. *World J Gastroenterol*, 2025, 31(43): 111433. doi: 10.3748/wjg.v31.i43.111433.
- [15] Landman A, Feetham L, Stuckey D. Working together to reduce the burden of pancreatic cancer[J]. *Lancet Oncol*, 2020, 21(3): 334–335. doi:10.1016/S1470-2045(20)30088-7.
- [16] Picozzi VJ, Oh SY, Edwards A, et al. Five-year actual overall survival in resected pancreatic cancer: a contemporary single-institution experience from a multidisciplinary perspective[J]. *Ann Surg Oncol*, 2017, 24(6): 1722–1730. doi: 10.1245/s10434-016-5716-z.
- [17] Conroy T, Hammel P, Hebbar M, et al. FOLFIRINOX or gemcitabine as adjuvant therapy for pancreatic cancer[J]. *N Engl J Med*, 2018, 379(25):2395–2406. doi:10.1056/NEJMoa1809775.
- [18] Golan T, Hammel P, Reni M, et al. Maintenance olaparib for germline BRCA-mutated metastatic pancreatic cancer[J]. *N Engl J Med*, 2019, 381(4):317–327. doi:10.1056/NEJMoa1903387.
- [19] Assenat E, Mineur L, Mollevi C, et al. Phase II study evaluating the association of gemcitabine, trastuzumab and erlotinib as first-line treatment in patients with metastatic pancreatic adenocarcinoma (GATE 1) [J]. *Int J Cancer*, 2021, 148(3): 682–691. doi: 10.1002/ijc.33225.
- [20] Shi M, Huang W, Lin L, et al. Silencing of XB130 is associated with both the prognosis and chemosensitivity of gastric cancer[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8):e41660. doi:10.1371/journal.pone.0041660.
- [21] Zhao H, Zhang XN, Guo L, et al. A robust seven-gene signature associated with tumor microenvironment to predict survival outcomes of patients with stage III–IV lung adenocarcinoma[J]. *Front Genet*, 2021, 12:684281. doi:10.3389/fgene.2021.684281.
- [22] Ryu WJ, Han G, Lee SH, et al. Suppression of Wnt/ β -catenin and RAS/ERK pathways provides a therapeutic strategy for gemcitabine-resistant pancreatic cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 549:40–46. doi:10.1016/j.bbrc.2021.02.076.
- [23] Ma Q, Wu H, Xiao Y, et al. Upregulation of exosomal microRNA-21 in pancreatic stellate cells promotes pancreatic cancer cell migration and enhances Ras/ERK pathway activity[J]. *Int J Oncol*, 2020, 56(4):1025–1033. doi:10.3892/ijo.2020.4986.
- [24] Frank KJ, Mulero-Sánchez A, Berninger A, et al. Extensive preclinical validation of combined RMC-4550 and LY3214996 supports clinical investigation for KRAS mutant pancreatic cancer[J]. *Cell Rep Med*, 2022, 3(11): 100815. doi: 10.1016/j.xcrm.2022.100815.
- [25] Sugito N, Heishima K, Akao Y. Chemically modified MIR143-3p exhibited anti-cancer effects by impairing the KRAS network in colorectal cancer cells[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2022, 30:49–61. doi:10.1016/j.omtn.2022.09.001.
- [26] Chen D, Tang Y, Lapinski PE, et al. EPHB4-RASA1 inhibition of PIEZO1 ras activation drives lymphatic valvulogenesis[J]. *Circ Res*, 2024, 135(11): 1048–1066. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.124.325383.
- [27] Chen D, Van der Ent MA, Lartey NL, et al. EPHB4-RASA1-mediated negative regulation of ras-MAPK signaling in the vasculature: implications for the treatment of EPHB4- and RASA1-related vascular anomalies in humans[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2023, 16(2):165. doi:10.3390/ph16020165.
- [28] Zhang J, Liu X, Gao YL. The long noncoding RNA MEG3 regulates Ras-MAPK pathway through RASA1 in trophoblast and is associated with unexplained recurrent spontaneous abortion[J]. *Mol Med*, 2021, 27(1):70. doi:10.1186/s10020-021-00337-9.
- [29] Wang Q, Liu L, Gou X, et al. The 3'-untranslated region of XB130 regulates its mRNA stability and translational efficiency in non-small cell lung cancer cells[J]. *Oncol Lett*, 2023, 26(4):427. doi: 10.3892/ol.2023.14013.
- [30] Cacalano NA, Sanden D, Johnston JA. Tyrosine-phosphorylated SOCS-3 inhibits STAT activation but binds to p120 RasGAP and activates Ras[J]. *Nat Cell Biol*, 2001, 3(5):460–465. doi: 10.1038/35074525.
- [31] Xu J, Bai XH, Lodyga M, et al. XB130, a novel adaptor protein for signal transduction[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(22): 16401–16412. doi:10.1074/jbc.M701684200.
- [32] Lodyga M, De Falco V, Bai XH, et al. XB130, a tissue-specific adaptor protein that couples the RET/PTC oncogenic kinase to PI 3-kinase pathway[J]. *Oncogene*, 2009, 28(7): 937–949. doi: 10.1038/onc.2008.447.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 李子一, 郭思岐, 谢沛钦, 等. AFAP1L2 通过 RAS/ERK 信号通路促进胰腺癌细胞增殖和转移的机制研究[J]. *中国普通外科杂志*, 2026, 35(3): 524–534. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.250370

Cite this article as: Li ZY, Guo SQ, Xie PQ, et al. Mechanistic study of AFAP1L2 in promoting proliferation and metastasis of pancreatic cancer cells via the RAS/ERK signaling pathway[J]. *Chin J Gen Surg*, 2026, 35(3):524–534. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.250370