



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.09.010
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2015.09.010
Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(9):1257-1262.

· 基础研究 ·

AFAP-1L2 对胰腺癌细胞侵袭及转移的影响及机制

刘博¹, 戚诚¹, 刘学臣², 赵晓东¹

(河北医科大学第二医院 1. 肿瘤外科 2. 消化内科, 河北 石家庄 050000)

摘要

目的: 探讨 AFAP-1L2 表达下调对胰腺癌细胞的影响及其机制。

方法: 人胰腺癌 SW1990 细胞分别转染靶向 AFAP-1L2 的干扰质粒 siAFAP-1L2 和阴性对照 siRNA, 以未处理的 SW1990 细胞为空白对照, 检测各组细胞的迁移与侵袭能力, 以及肿瘤浸润相关分子的蛋白与 mRNA 变化; 免疫共沉淀法检测 AFAP-1L2 蛋白与 p85 α 蛋白相互作用关系。

结果: 与空白对照 SW1990 细胞比较, 转染 siAFAP-1L2 下调 AFAP-1L2 后, SW1990 细胞的迁移与侵袭能力明显降低, p85 α 及 α -pAkt 表达降低, α -Akt 表达升高 (均 $P < 0.05$), MMP-9 与 E-cadherin 表达无变化 (均 $P > 0.05$); 转染阴性对照 siRNA 的 SW1990 细胞各项指标无明显变化 (均 $P > 0.05$)。免疫共沉淀显示, 胰腺癌 SW1990 细胞中 AFAP-1L2 蛋白与 p85 α 蛋白存在相互作用。

结论: AFAP-1L2 可能通过与 p85 α 相互作用调控 PI3K/Akt 通路, 从而影响胰腺癌细胞的迁移及浸润, 下调 AFAP-1L2 表达能抑制胰腺癌细胞迁移与侵袭能力。

关键词

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

Influence of AFAP-1L2 on invasion and metastasis of pancreatic cancer cells and the mechanism

LIU Bo¹, QI Cheng¹, LIU Xuechen², ZHAO Xiaodong¹

(1. Department of Surgical Oncology 2. Department of Gastroenterology, the Second Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

Abstract

Objective: To investigate the influence of AFAP-1L2 down-regulation on pancreatic cancer cells and its mechanism.

Methods: Human pancreatic cancer SW1990 cells were transfected with AFAP-1L2 targeting plasmids siAFAP-1L2 or negative control siRNA sequences, using untreated SW1990 cells as blank control, and then the migration and invasion ability, and the protein and mRNA levels of the molecules related to metastasis and invasion in each group of cells were detected. The interaction between AFAP-1L2 and p85 α protein was tested by co-immunoprecipitation assay.

Results: Compared with the blank control SW1990 cells, in SW1990 cells with down-regulated AFAP-1L2 expression after siAFAP-1L2 transfection, the migration and invasion ability was decreased, expressions of p85 α and α -pAkt were decreased, and α -Akt expression was increased (all $P < 0.05$), while the expressions of MMP-9 and

收稿日期: 2015-05-13; 修订日期: 2015-08-06。

作者简介: 刘博, 河北医科大学第二医院主治医师, 主要从事消化道恶性肿瘤临床及基础方面的研究。

通信作者: 赵晓东, Email: larrygh@aliyun.com

E-cadherin showed no significant change (both $P>0.05$); all the studied parameters in SW1990 cells transfected with negative control siRNA sequences had no obvious change (all $P>0.05$). Co-immunoprecipitation assay showed that there was interaction between AFAP-1L2 and p85 α protein in SW1990 cells.

Conclusion: AFAP-1L2 may regulate PI3K/Akt pathway through interaction with p85 α and thereby influence the migration and invasion of pancreatic cancer cells, and down-regulating AFAP-1L2 expression can decrease the migration and invasion ability of pancreatic cancer cells.

Key words: Pancreatic Neoplasms; Actin Filament-Associated Protein 1-Like 2; Neoplasm Invasiveness

CLC number: R735.9

胰腺癌以恶性度高、预后差为特点，生存期短，病死率高，预后差主要原因在与胰腺癌早期转移及侵袭性生长的恶性生物特征^[1]。调控恶性肿瘤细胞转移和浸润的分子机制及细胞生物学特征是研究的热点，通路蛋白及对通路调控的机制是目前研究的主要方向，PI3K/Akt、MMPs及cadherin等信号通路参与胰腺癌细胞的迁移及浸润，以通路蛋白调控基因为靶点的靶向治疗，也是恶性肿瘤治疗的突破点之一^[2-3]。胰腺癌转移及浸润行为是多基因参与的过程，其中包括促癌基因的激活及抑癌基因缺失和或失活的多重作用，导致肿瘤细胞繁殖力、运动性、粘附性及浸润性增强。靶基因筛选和治疗靶点选择可能成为未来胰腺癌治疗提高生存率的主要方法。AFAP-1L2 (actin filament-associated protein 1-like 2, XB130) 是一种接头蛋白，有研究^[4]显示其在甲状腺癌、胃癌、肺癌等恶性肿瘤中表达升高，与这些肿瘤的恶性行为具有相关性。在胰腺癌细胞中AFAP-1L2在蛋白及mRNA水平均有表达，并促进胰腺癌细胞的增殖，减少凋亡。本研究选取胰腺癌SW1990细胞，该细胞来源于人胰腺腺癌脾转移灶，采用小干扰RNA (small interfering RNA, siRNA) 干扰AFAP-1L2表达，观察干扰后胰腺癌SW1990细胞的迁移及浸润能力变化，并探讨其机制。

1 材料与方方法

1.1 材料

人胰腺癌细胞系SW1990购自中科院上海细胞库。采用1640培养基条件下的贴壁细胞培养法。AFAP-1L2山羊抗人多克隆抗体 (sc-138089)、p85 α (磷脂酰肌醇3激酶调节亚基p85 α) 山羊多克隆抗体 (sc-31970)、 α -Akt (α 蛋白激酶) 鼠单克隆抗体 (sc-377457)、 α -pAkt (磷酸化 α 蛋白激酶) 鼠单克隆抗体 (sc-52940)、MMP-9 (金属基质蛋白9) 鼠单克隆抗体 (sc-21733) 及E-cadherin (E-钙黏蛋白) 兔多克隆抗体 (sc-7870) 购自美国Santa Cruz公司。DAB显色试剂盒购自大连宝生物公司，BCA定量及ECL发光试剂盒购自南京凯基生物公司。TRIzol、逆转录及扩增试剂盒购自日本Takara公司。miRNA提取分离试剂盒及A/G-Agarose购自美国Sigma公司。All-in-One™ qPCR Mix试剂盒购自美国GeneCopoeia公司。Matrigel胶购自美国BD Biosciences公司，Transwell小室购自美国Corning Costar公司。引物由北京生工生物工程有进行设计并合成，见表1。siAFAP-1L2及siRNA对照质粒购自美国Addgene公司。MG132购自美国SELLECK公司。

表1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for qRT-PCR

基因	正义	反义
AFAP-1L2	5'-CCGGACGTAACGACTGCATCCG-3'	5'-GCCCAGTTCGUUCGUGCCACG-3'
GADPH	5'-GCCGATCCGTAACGCTACGGCGC-3'	5'-CCGGACGTTTCGACGGCTCCG-3'
p85 α	5'-CGCTCTACCCACGGAGTGGG-3'	5'-ACGGTCCTTGCCCCCGG-3'
α -Akt	5'-GGCTACCGTACTCCGTCACC-3'	5'-GCCCATGCGTGCACGGCCGG-3'
α -pAkt	5'-GCTCCACTGGCCGAACCTCGG-3'	5'-CGGACTCGGGCTACCGCCCG-3'
MMP-9	5'-GCTCCACTGGCCGAACCTCGG-3'	5'-CGGACTCGGGCTACCGCCCG-3'
E-cadherin	5'-CCGTCCGGGCTCGACCCGG-3'	5'-GGCCTCCGATCCCGCCTACGC-3'

1.2 研究方法

1.2.1 Western blot法 将SW1990细胞系细胞应用PBS洗涤3次离心后弃上清,加细胞裂解液提取各细胞株总蛋白,对样品进行BCA法蛋白定量,60 μg蛋白加上样缓冲剂上样后12%十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺进行凝胶电泳分离,转移至PVDF膜。用含有5%脱脂奶粉的TBST缓冲液室温条件下封闭1.5 h后加一抗,4℃条件下孵育过夜。TBST溶液洗膜3次后加入二抗,37℃孵育1 h后TBST溶液清洗3次,采用化学发光凝胶显像仪进行显像,QuantityOne分析灰度值。

1.2.2 实时定量PCR (qRT-PCR)法 按照RNA分离试剂盒和TRIzol试剂盒说明书的要求步骤进行细胞株RNA的提取及纯化,按照逆转录和扩增试剂盒说明书要求步骤进行逆转录及扩增。取1.5 μL样品RNA采用全波长紫外/可见光扫描分光光度计进行总RNA纯度检测,结果显示 A_{260}/A_{280} 为1.8~2.0为纯度较高,无DNA及蛋白质等污染。取RNA样品1 μL进行1%琼脂凝胶电泳检测RNA完整性,结果显示5 s、18 s及28 s RNA条带均完整,总RNA抽取完整。RNA纯度高并且抽取完整可进行进一步实验。以各组细胞cDNA作为模板,每组均设立3个复孔,反应体系:2×All-in-One qPCR Mix 10 μL,45×Syber Green 2 μL,Primer F 1 μL,Primer R 1 μL,cDNA 2 μL,ddH₂O 4 μL,反应条件:95℃ 2 min;95℃ 2 min;95℃ 20 s;60℃ 30 s;75℃ 30 s(45个循环),采用 $\Delta\Delta$ CT法比较不同组别基因表达差异。

1.2.3 siRNA转染 SW1990细胞系分为3组:无干预组(空白对照组)、siAFAP-1L2转染组(siAFAP-1L2组)及siRNA对照转染组(siRNA对照组)。选取对数期生长并且24 h内融合高于80%的细胞按照Lipofectamine™2000说明书步骤进行转染,转染48 h后采用Western blot法及qRT-PCR法对AFAP-1L2蛋白及mRNA表达水平进行检测,评价转染效率。

1.2.4 Transwell法检测迁移和侵袭 依照Transwell试剂盒说明书步骤进行操作,检测转染后各组细胞的迁移能力及侵袭能力。显微镜观察照相计数,每孔任意选取3个200倍视野拍照,对侵袭细胞数量百分比进行计数,计算其平均值。细胞迁移步骤即在Transwell小室中不添加基质胶,

其他步骤同侵袭,每组实验重复3次,计算平均值进行分析。

1.2.5 免疫共沉淀(IP) 取汇合度达80%的SW1990细胞,进行细胞裂解,BCA检测蛋白浓度,进行蛋白浓度定量,取1份蛋白备用为对照组,将剩余的蛋白加入50%蛋白A/G-琼脂糖珠,4℃温度下振摇2~3 h后离心保留上清液。再次加50%蛋白A/G-琼脂糖珠,平均分为2组,一组加入IgG抗体作为阴性对照,另1组加入目的蛋白相应抗体(抗AFAP-1L2抗体或抗p85α抗体),于4℃温度下缓慢旋转孵育过夜。4 000 r/min离心2 min,保留30~50 μL上清液,其余弃去后加裂解液,4℃温度下振摇10 min,4 500 r/min离心2 min,弃去上清液,重复3次后针头吸进所有上清液,与对照管同时加相应加样缓冲液,变性5 min,同时进行Western blot分析。Input:将蛋白裂解液直接上样作为蛋白标志,IgG:蛋白裂解液与兔免疫前血清IgG混合,作为免疫共沉淀对照组。

1.3 统计学处理

采用GraphPad Prism 6.0软件进行统计分析并作图,计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,二组间比较采用t检验,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转染效率检测

Western blot显示,siAFAP-1L2组SW1990细胞AFAP-1L2表达条带明显淡于siRNA对照组与空白对照组,差异有统计学意义($F=9.360, P < 0.05$) (图1A-B)。qRT-PCR显示,siAFAP-1L2组AFAP-1L2 mRNA表达明显低于siRNA对照组与空白对照组,差异有统计学意义($F=8.248, P < 0.05$),转染效率约为60%~70% (图1C)。

2.2 siAFAP-1L2转染后SW1990细胞迁移能力

Transwell检测显示,siAFAP-1L2组迁移细胞数少于siRNA对照组与空白对照组,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$) (图2)。

2.3 siAFAP-1L2转染后SW1990细胞侵袭能力

Transwell检测显示,siAFAP-1L2组侵袭细胞数少于siRNA对照组与空白对照组,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$) (图3)。

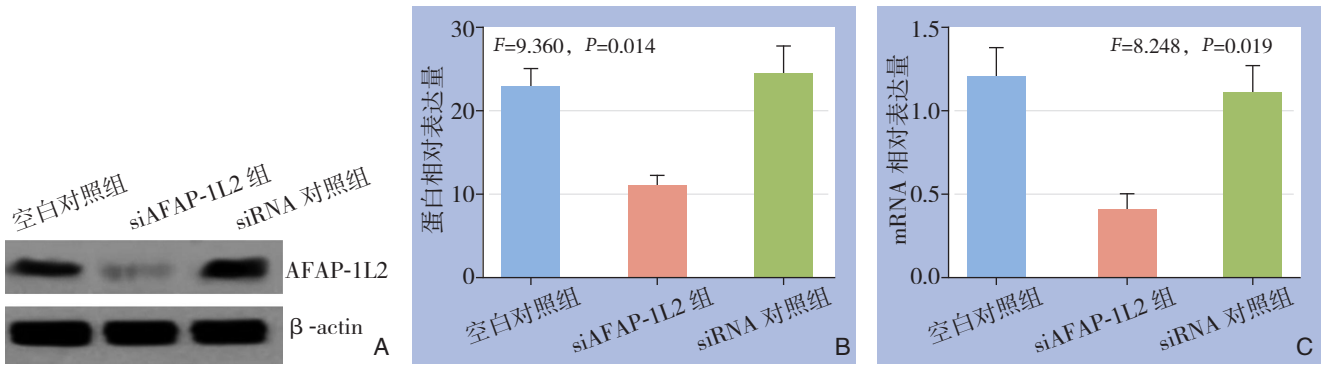


图 1 转染效率的检测 A, B: Western blot 检测 AFAP-1L2 蛋白表达; C: qRT-PCR 检测 AFAP-1L2 mRNA 表达
Figure 1 Transfection efficiency analysis A, B: Western blot detecting AFAP-1L2 protein expression; C: qRT-PCR detecting AFAP-1L2 mRNA expression

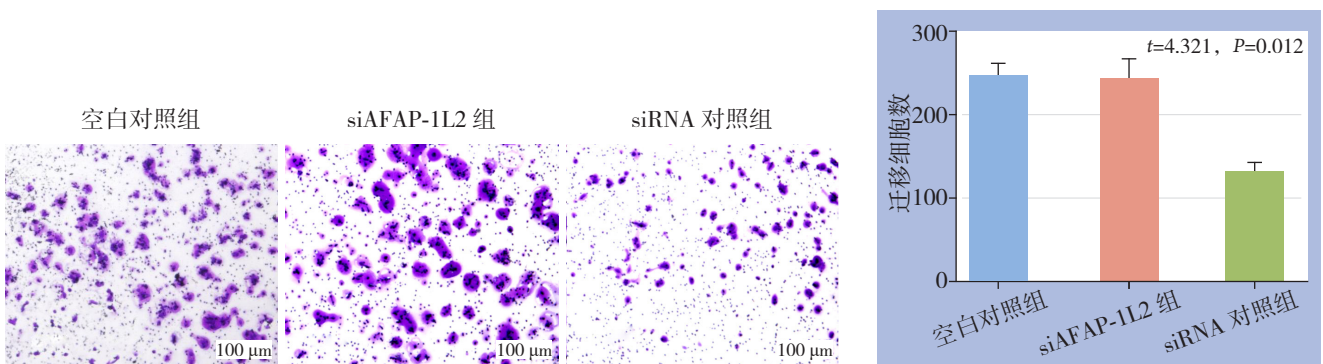


图 2 Transwell 检测细胞迁移能力
Figure 2 Cell migration detected by Transwell assay

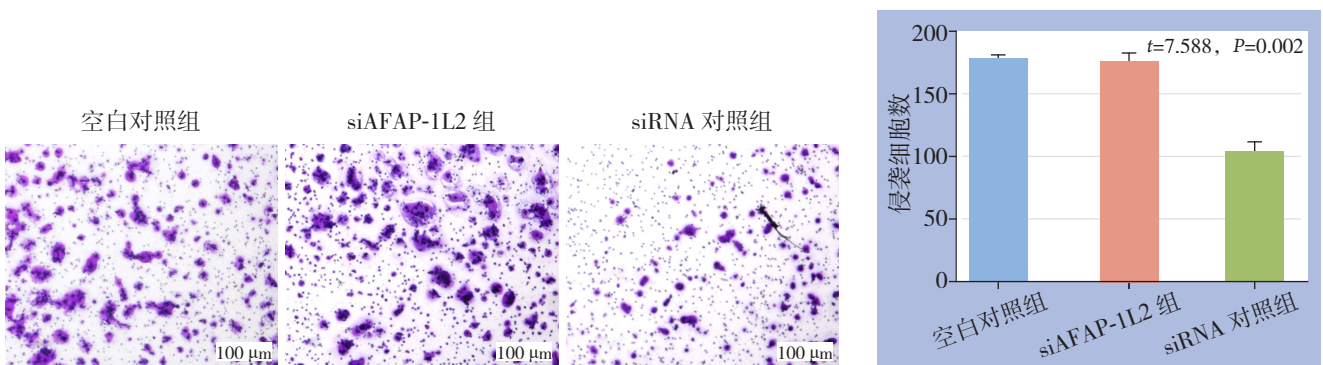


图 3 Transwell 检测细胞侵袭能力
Figure 3 Cell invasion detected by Transwell assay

2.4 siAFAP-1L2 转染后转移及侵袭相关通路分子的表达

Western blot显示, p85 α 蛋白在siAFAP-1L2组的表达量明显低于空白对照组与siRNA对照组 ($F=6.579$, $P=0.031$), siAFAP-1L2组 α -Akt表达量高于空白对照组与siRNA对照组 ($F=8.257$, $P=0.014$), 而 α -pAkt表达量低于空白对照组与siRNA对照组 ($F=6.002$, $P=0.041$); MMP-9在3组间差异无统计学意义 ($F=1.213$, $P=0.217$), E-cadherin在3组间差异无统计学意义 ($F=1.632$,

$P=0.158$) (图4A-B); qRT-PCR结果显示, p85 α mRNA在siAFAP-1L2组的表达量明显低于空白对照组与siRNA对照组 ($F=9.732$, $P=0.003$), α -Akt mRNA在siAFAP-1L2组的表达量高于空白对照组与siRNA对照组 ($F=8.382$, $P=0.007$), 而 α -pAkt mRNA表达量低于空白对照组与siRNA对照组 ($F=7.539$, $P=0.017$), MMP-9 mRNA在3组间差异无统计学意义 ($F=2.393$, $P=0.199$), E-cadherin mRNA在3组间差异无统计学意义 ($F=1.338$, $P=0.275$) (图4C)。

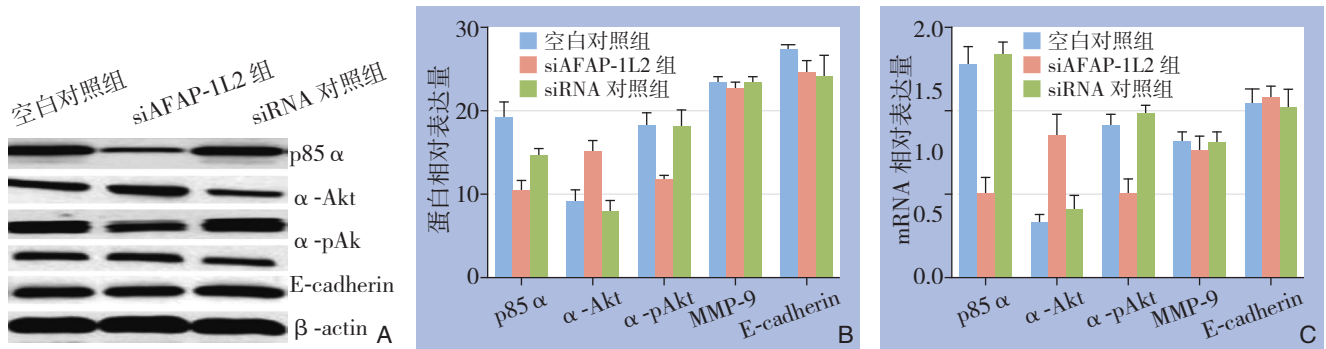


图4 转移与侵袭相关分子的表达 A, B: 蛋白表达检测; C: mRNA 表达检测

Figure 4 Expressions of the molecules related to metastasis and invasion A, B: Protein expressions; C: mRNA expressions

2.5 AFAP-1L2 与 p85α 相互作用检测

免疫共沉淀后经Western blot显示, 当抗体将AFAP-1L2从SW1990细胞裂解液中拉出的同时, p85α 也被拉出, 表现为在相应位置显示出灰黑色

蛋白条带; 当抗体将p85α从SW1990细胞裂解液拉的同时, AFAP-1L2也被拉出, 表现为在相应位置显示出灰黑色蛋白条带, 提示胰腺癌SW1990细胞中AFAP-1L2 与p85α 有相互作用(图5)。

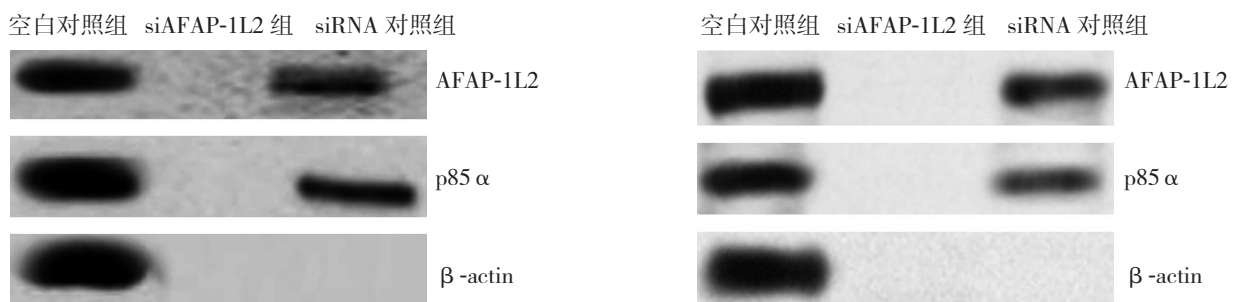


图5 免疫共沉淀检测 SW1990 细胞中 AFAP-1L2 与 p85α 的相互关系

Figure 5 Interaction between AFAP-1L2 with p85α in SW1990 cells detected by co-immunoprecipitation

3 讨论

胰腺癌以早期转移及浸润为主要的恶性特征, 由于转移出现早, 无论手术、放疗或化疗均不能明显提高生存期及降低近远期病死率^[5]。胰腺癌细胞的迁移及浸润过程是多基因和多因素共同作用结果。AFAP-1L2也被称为XB130, 其结构与肌动蛋白丝相关蛋白(AFAP)相似, 是一种新型接头蛋白^[6]。AFAP-1L2在甲状腺癌、食道癌及胃癌等恶性肿瘤中具有促进肿瘤生长及转移等作用^[7]。有研究^[4]认为发现, AFAP-1L2在胰腺导管腺癌组织中为高表达, 预示着胰腺癌的不良预后, 在胰腺癌细胞中也有表达, 参与肿瘤细胞增殖及凋亡的过程。本研究选择来自胰腺癌脾转移灶的SW1990细胞, 观察AFAP-1L2表达干扰后SW1990细胞迁移及浸润行为的变化, 探讨其机制。有研究^[8]显示, PI3K/Akt信号通路对胰腺癌的增殖及浸

润等恶性行为发挥重要作用, MMPs及钙黏附素家族也在胰腺癌转移及浸润过程中扮演重要角色^[3, 9]。p85α是PI3K重要的亚单位, 是PI3K/Akt信号通路中的上游蛋白, p85α磷酸化激活该通路, 影响肿瘤细胞的增殖及浸润等恶性行为。Shiozaki等^[10]研究显示, AFAP-1L2自N'端以酪氨酸54为起点的序列可以与磷酸化的p85α的N'端或C'的SH2区域结合, 发挥活性, Akt在Ser375位点的磷酸化是Akt激活的主要标志。

本研究经Transwell检测显示, AFAP-1L2表达下调后, SW1990细胞迁移及浸润能力均明显下降, 说明AFAP-1L2对胰腺癌细胞转移及浸润可能有促进作用。进一步对机制研究中显示, AFAP-1L2表达下调后, PI3K/Akt信号通路中, PI3K亚单位p85α及α-pAkt蛋白表达量降低, α-Akt蛋白表达量升高, p85α作为该通路的上游蛋白, 在AFAP-1L2下调后表达下降, 进而引起其下游蛋白

α -Akt磷酸化降低, 通路活性受到抑制。Lodyga等^[6]在胃癌中的研究也认为AFAP-1L2与p85 α 相互关系密切, 共同对PI3K/Akt信号通路进行调节, 从而影响肿瘤细胞的浸润。研究显示, 基质金属蛋白中MMP-9及钙黏附素家族主要成员E-cadherin蛋白表达量无变化, AFAP-1L2对胰腺癌细胞转移及浸润的调控可能与基质金属蛋白及钙黏附素家族没有关联。qRT-PCR结果显示, AFAP-1L2下调后, p85 α mRNA及 α -pAkt mRNA表达量降低, α -Akt mRNA表达量升高, MMP-9 mRNA及E-cadherin mRNA表达量无变化。AFAP-1L2对PI3K/Akt信号通路的调控在mRNA水平可能已经发生, 但需要进一步实验证明。免疫共沉淀显示, 胰腺癌SW1990细胞中AFAP-1L2蛋白与p85 α 蛋白有相互作用, 进一步说明二者可能形成复合体形式对PI3K/Akt信号通路进行调控。Lodyga等^[11]研究认为, 肿瘤细胞在诱发因素作用下, AFAP-1L2会向细胞膜聚集, 肿瘤细胞伪足形成增多, 活动能力增强, 从而突破血管基底膜向远隔器官移动、黏附、种植及浸润生长, 形成转移灶。Zheng等^[12]也认为PI3K/Akt信号通路被抑制后, 胰腺癌细胞的增殖凋亡等活性减弱, 肿瘤细胞对厄洛替尼化疗的敏感性增强。但胰腺癌的发生及发展过程中有多种信号通路参与, 这些通路中关键的蛋白调控受到多因素影响^[13-14]。本研究认为AFAP-1L2从基因转录水平通过p85 α 相互作用对PI3K/Akt通路即发挥调控作用。AFAP-1L2对cSrc及Rac等信号通路同时可能也具有调控作用, 对恶性肿瘤细胞迁移与浸润均具有促癌作用^[15-16]。

本研究结论为下调AFAP-1L2表达胰腺癌细胞迁移及浸润能力减弱, AFAP-1L2通过与p85 α 相互作用调控PI3K/Akt通路影响胰腺癌细胞的迁移及浸润。

参考文献

- [1] Pourhoseingholi MA, Vahedi M, Baghestani AR. Burden of gastrointestinal cancer in Asia; an overview[J]. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, 2015, 8(1):19-27.
- [2] Bassagañas S, Carvalho S, Dias AM, et al. Pancreatic cancer cell glycosylation regulates cell adhesion and invasion through the modulation of α 2 β 1 integrin and E-cadherin function[J]. *PLoS One*, 2014, 9(5):e98595. doi: 10.1371/journal.pone.0098595.
- [3] Ma C, Wu B, Huang X, et al. SUMO-specific protease 1 regulates pancreatic cancer cell proliferation and invasion by targeting MMP-9[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(12):12729-12735.
- [4] Snyder BN, Cho Y, Qian Y, et al. AFAP1L1 is a novel adaptor protein of the AFAP family that interacts with cortactin and localizes to invadosomes[J]. *Eur J Cell Biol*, 2011, 90(5):376-389.
- [5] 曾复, 葛春林. 胰腺癌185例诊治回顾分析[J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(3):336-342.
- [6] 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(12):937-949.
- [7] 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.
- [8] Albury TM, Pandey V, Gitto SB, et al. Constitutively active Akt1 cooperates with KRas(G12D) to accelerate in vivo pancreatic tumor onset and progression[J]. *Neoplasia*, 2015, 17(2):175-182.
- [9] Zhang W, Li H, Yang Y, et al. Knockdown or inhibition of aldoketo reductase 1B10 inhibits pancreatic carcinoma growth via modulating Kras-E-cadherin pathway[J]. *Cancer Lett*, 2014, 355(2):273-280.
- [10] Shiozaki A, Shen-Tu G, Bai X, et al. XB130 mediates cancer cell proliferation and survival through multiple signaling events downstream of Akt[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8):e43646. doi: 10.1371/journal.pone.0043646.
- [11] 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.
- [12] Zheng YT, Yang HY, Li T, et al. Amiloride sensitizes human pancreatic cancer cells to erlotinib in vitro through inhibition of the PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2015, 6(5):614-626.
- [13] Layton MJ, Saad M, Church NL, et al. Autophosphorylation of serine 608 in the p85 regulatory subunit of wild type or cancer-associated mutants of phosphoinositide 3-kinase does not affect its lipid kinase activity[J]. *BMC Biochem*, 2012, 13(12):30. doi: 10.1186/1471-2091-13-30.
- [14] 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.
- [15] Clump DA, Yu JJ, Cho Y, et al. A Polymorphic Variant of AFAP-110 Enhances cSrc Activity[J]. *Transl Oncol*, 2010, 3(4):276-285.
- [16] Cain RJ, Vanhaesebroeck B, Ridley AJ. The PI3K p110 α isoform regulates endothelial adherens junctions via Pyk2 and Rac1[J]. *J Cell Biol*, 2010, 188(6):863-876.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 刘博, 戚诚, 刘学臣, 等. AFAP-1L2对胰腺癌细胞侵袭及转移的影响及机制[J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(9):1257-1262. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.09.010

Cite this article as: LIU B, QI C, LIU XC, et al. Influence of AFAP-1L2 on invasion and metastasis of pancreatic cancer cells and the mechanism[J]. *Chin J Gen Surg*, 2015, 24(9):1257-1262. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.09.010