

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.01060

· 论 著 ·

细胞黏附分子 L1 基因沉默对胰腺癌细胞 Capan-2 神经侵袭能力的影响

安 薇[△], 贲其稳[△], 李桂香, 吴红玉, 金 晶, 李兆申*

第二军医大学长海医院消化内科, 上海 200433

[摘要] **目的** 观察沉默细胞黏附分子 L1 基因(L1CAM)表达后对胰腺癌 Capan-2 细胞体外神经侵袭能力的影响。**方法** 应用慢病毒介导的 L1CAM-shRNA 干扰载体转染胰腺癌 Capan-2 细胞,以 L1CAM-NC 转染细胞为对照。分别将 L1CAM-shRNA 组及 L1CAM-NC 组细胞与大鼠背根神经节(DRG)、基质胶(matrigel)一起构成共培养神经侵袭模型,倒置显微镜下观察神经突及细胞生长情况并拍照,利用 Image pro plus 图像分析软件对照片进行分析。**结果** 共培养模型中, L1CAM-NC 对照组细胞向 DRG 方向不断迁移增殖,包绕神经突起并沿之向 DRG 爬行,而 L1CAM-shRNA 组中并未观察到该现象。共培养第 3 天和第 5 天时, L1CAM-NC 对照组细胞集落面积显著高于 L1CAM-shRNA 组($P < 0.01$),但两组的神经突生长差异无统计学意义。**结论** 干扰 L1CAM 的表达可能通过抑制细胞集落形成及迁移爬行的方式抑制胰腺癌 Capan-2 细胞的神经侵袭作用。

[关键词] 胰腺肿瘤;细胞黏附分子 L1;RNA 干扰;神经侵袭**[中图分类号]** R 735.9**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2012)10-1060-05

Effect of L1 cell adhesion molecule gene silencing on perineural invasion ability of pancreatic cancer Capan-2 cells

AN Wei[△], BEN Qi-wen[△], LI Gui-xiang, WU Hong-yu, JIN Jing, LI Zhao-shen*

Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To evaluate the effect of L1 cell adhesion molecule (L1CAM) gene expression silencing by short hairpin RNA (shRNA) on perineural invasion of pancreatic cancer Capan-2 cells *in vitro*. **Methods** We transfected Capan-2 cells with lentivirus-mediated shRNA targeting L1CAM (L1CAM-shRNA) and negative control shRNA (L1CAM-NC), and then the transfected Capan-2 cells were co-cultured with mouse dorsal root ganglia (DRG) in matrigel matrix. The procession of neurite outgrowth and cell colony growth were observed by inverted microscope. Areas of cell colonies and neurites were quantitated using Image pro plus software. **Results** The cancer cells migrated to DRG and grew around the neurites in the L1CAM-NC/DRG group, which was not observed in the L1CAM-shRNA/DRG group. On day 3 and 5 of co-culture, the area of cell colonies in the L1CAM-shRNA/DRG group was significantly less than that in L1CAM-NC/DRG group ($P < 0.01$); however, there was no difference in neurite outgrowth between the two groups. **Conclusion** It is demonstrated that down-regulation of L1CAM can suppress the perineural invasion of Capan-2 cells *in vitro* by inhibiting cell proliferation and migration.

[Key words] pancreatic neoplasms; L1 cell adhesion molecule; RNA interference; perineural invasion

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(10):1060-1064]

外周神经侵袭(perineural invasion, PNI)是胰腺癌术后发生腹膜后转移、预后不良的重要原因^[1-3],然而胰腺癌 PNI 发生发展的机制尚不清楚。细胞黏附分子 L1 (L1 cell adhesion molecule, L1CAM)是免疫球蛋白超家族的成员之一,广泛表

达于神经系统中,在神经系统发育和修复过程中扮演着重要角色^[4]。近年研究发现,L1CAM 过表达于胰腺癌侵犯的神经内,且与胰腺癌神经侵犯呈正相关^[5]。我们通过构建以 L1CAM 为靶基因的 shRNA 慢病毒干扰载体,应用胰腺癌 PNI 体外模型,观

[收稿日期] 2012-05-17 **[接受日期]** 2012-09-16**[基金项目]** 国家自然科学基金(8107205)。Supported by National Natural Science Foundation of China(8107205)。**[作者简介]** 安 薇, 博士生。E-mail: anweisusan@gmail.com; 贲其稳, 博士, 主治医师。E-mail: benqw0908@126.com[△]共同第一作者(Co-first authors)。

* 通信作者(Corresponding author)。Tel: 021-31161353, E-mail: zhaoshen_lj@126.com

察沉默 L1CAM 表达后对胰腺癌 Capan-2 细胞体外神经侵袭能力的影响。

1 材料和方法

1.1 shRNA 慢病毒干扰载体的构建 靶向 L1CAM 的 shRNA 序列^[6]为 5'-AGG GAU GGU GUC CAC UUC AAA TT-3', 对照 shRNA 的序列为 5'-TTC TCC GAA CGT GTC ACG T -3'; L1CAM-shRNA 慢病毒干扰载体构建由上海吉玛公司完成。步骤简述如下: 将上述 shRNA 序列合成 DNA Oligo: 5'-GAT CCG AGG GAT GGT GTC CAC TTC AAA TTC AAG AGA TTT GAA GTG GAC ACC ATC CCT CTT TTT TG-3' (含 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切位点); 经退火形成双链 DNA, 经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切后连接至 pGLV-U6-EGFP 穿梭载体(上海吉玛制药有限公司); 连接产物转化 DH5 大肠杆菌(TaKaRa 公司), 挑取重组阳性克隆行 PCR 及测序鉴定; 取对数生长期的 293T 细胞(上海吉玛制药有限公司)接种于 6 孔板中, 转染前 2 h 将细胞培养液更换为无血清培养液(Gibco 公司), 将慢病毒表达载体 pGLV-U6-EGFP 与混合包装载体质粒(PG-P1-VSVG, PG-P2-REV 及 PG-P3-RRE, 上海吉玛制药有限公司)混匀于 opti-MEM 去血清培养液(Gibco 公司)中, 用 LipofectamineTM2000(Invitrogen 公司)共转染于 293T 细胞中, 转染后 24 h 更换为完全培养液; 转染 72 h 收集上清进行过滤浓缩; 最后用孔稀释法测定浓缩液病毒的滴度。阴性对照(L1CAM-NC)也采用同样的方法构建。

1.2 细胞培养及转染 人胰腺癌细胞系 Capan-2 由第二军医大学长海医院消化内科实验室保存, 常规培养、传代。取对数生长期的 Capan-2 细胞, 以每瓶 1.5×10^5 个接种于细胞培养瓶中, 培养 24 h 后分为未转染组、L1CAM-NC 组及 L1CAM-shRNA 组, 吸弃细胞培养瓶中的培养液。将 $60 \mu\text{l}$ 病毒原液 (1×10^9 UT/ml) 及 $3 \mu\text{l}$ 聚凝胺(上海吉玛公司)加入 RPMI 1640 培养液(Gibco 公司)中混合成 3 ml 的病毒稀释液, L1CAM-NC 组及 L1CAM-shRNA 组分别加入对应的病毒稀释液 3 ml, 未转染组则加入 3 ml 完全培养液。24 h 后更换完全培养液, 转染 48 h 后, 每日观察荧光表达率。

1.3 干扰效果的鉴定 转染 96 h 后, 收集上述 3 组细胞, 加入适量的蛋白裂解液及蛋白酶抑制剂, 冰上放置 15 min, $15\ 000 \times g$, 4°C 离心 15 min, 取上清,

常规行蛋白质印迹检测 L1CAM 的表达。鼠抗人 L1CAM 单抗购自英国 Abcam 公司; 鼠抗 GAPDH 抗体购自上海康城公司; HRP 标记的兔抗鼠 IgG 抗体购自美国 Jackson Immuno Research 公司。采用 ECL 发光法显影, ImageJ 软件计算条带灰度值, 以各组目的蛋白与自身 GAPDH 灰度值比值作为蛋白的相对表达量。独立实验重复 3 次。

1.4 神经侵袭共培养模型的建立及观察 采用长海医院消化内科实验室先前成功建立的神经侵袭体外模型^[7]进行构建。构建方法简述如下: 参照文献^[8]的方法获取大鼠背根神经节(DRG), 将取下的 DRG 用 PBS 清洗 3 次, 置于无血清培养液中 4°C 保存备用。参照文献^[9]的方法建立胰腺癌细胞与 DRG 的共培养模型, 将基质胶(matrigel, BD 公司)以每孔 $100 \mu\text{l}$ 置于 6 孔板孔中央, 胶内植入一枚大鼠 DRG, 将 1×10^5 个 L1CAM-shRNA 细胞(转染 96 h)接种至神经节附近(上述操作于冰上进行)。随后将 6 孔板置于 37°C 细胞培养箱中孵育 30 min, 加入 3 ml RPMI 1640 完全培养液, 并放回细胞培养箱培养。采用同样方法建立 L1CAM-NC 细胞与 DRG 的共培养模型作为对照。上述两组模型在细胞培养箱中培养 144 h, 每隔 1 d 在倒置显微镜(Olympus 公司)下观察胰腺癌细胞 Capan-2 的迁移、集落形成及 DRG 神经突的生长情况并拍照, 用专业图像分析软件 Image pro plus 6.0 进行分析。参照 Ayala 等^[10]的方法, 分别计算第 3 天及第 5 天 40 倍镜的照片中 DRG 发出的神经突及选定区域细胞集落的面积。独立实验重复 3 次。

1.5 统计学处理 采用统计软件 SPSS 16.0 进行分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异的比较采用 *t* 检验, 检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 转染率与干扰效果 将慢病毒转染 Capan-2 细胞 96 h 后, L1CAM-NC 及 L1CAM-shRNA 组细胞在形态上与未转染组细胞无明显差异(图 1), 并且 L1CAM-NC 组与 L1CAM-shRNA 组转染率也无明显差异 [$(85.3 \pm 3.6)\%$ vs $(87.4 \pm 6.1)\%$, $P = 0.635$]。采用蛋白质印迹的方法检测 L1CAM 的表达, 未转染组、L1CAM-NC 组及 L1CAM-shRNA 组细胞中 L1CAM 相对 GAPDH 的蛋白表达量分别为 0.699 ± 0.050 、 0.706 ± 0.069 及 0.222 ± 0.027 , L1CAM-shRNA 组中 L1CAM 表达较 L1CAM-NC 组及未转染组明显下调(P 均 < 0.01 , 图 2)。

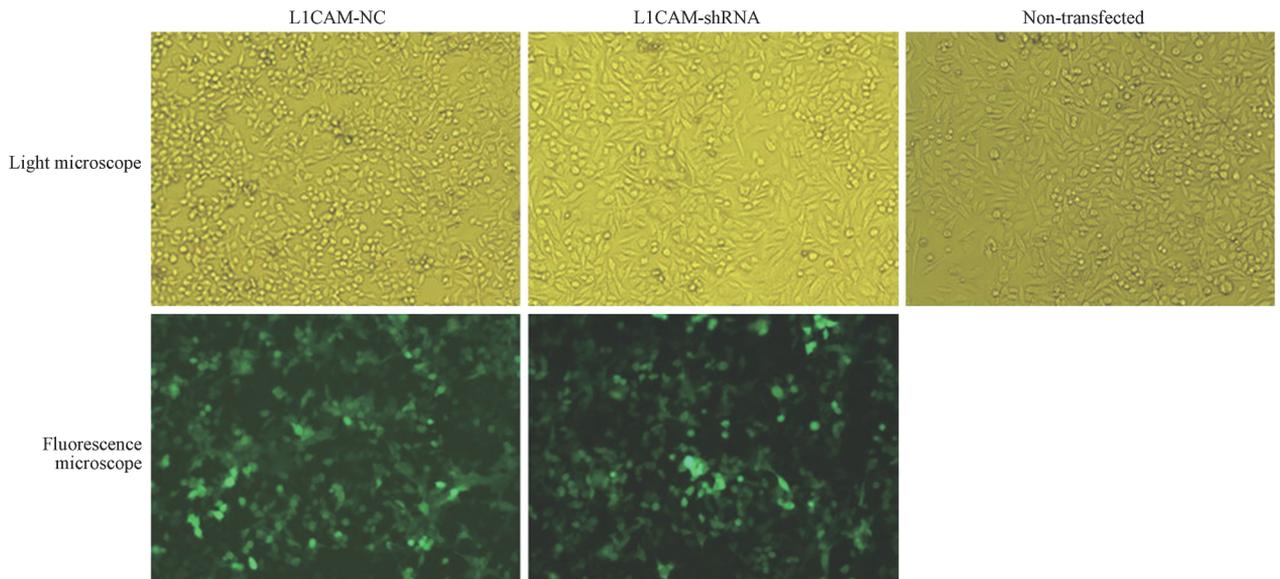


图 1 LICAM-NC 组、LICAM-shRNA 组及未转染组 Capan-2 细胞的形态

Fig 1 Characterization of Capan-2 cells of LICAM-NC and LICAM-shRNA transfected and non-transfected groups

Original magnification: ×200

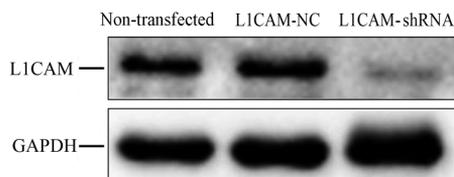


图 2 未转染组、LICAM-NC 组及 LICAM-shRNA 组 Capan-2 细胞中 LICAM 表达的比较

Fig 2 Detection of LICAM protein contents

in Capan-2 cells of non-transfected and

LICAM-NC and LICAM-shRNA transfected groups

2.2 LICAM 在胰腺癌 Capan-2 细胞体外神经侵袭中的作用 为了探讨 LICAM 是否参与了胰腺癌的神经侵袭,我们将 LICAM-NC 组及 LICAM-shRNA 组细胞分别与大鼠 DRG 共培养,比较两组之间神经突及细胞生长的变化。结果显示,在 LICAM-NC 组中 Capan-2 细胞向 DRG 方向不断爬行迁移,包绕神经突起形成串珠样或纺锤样的形状,并沿着突起向 DRG 爬行,而 LICAM-shRNA 组中并未观察到该现象(图 3)。

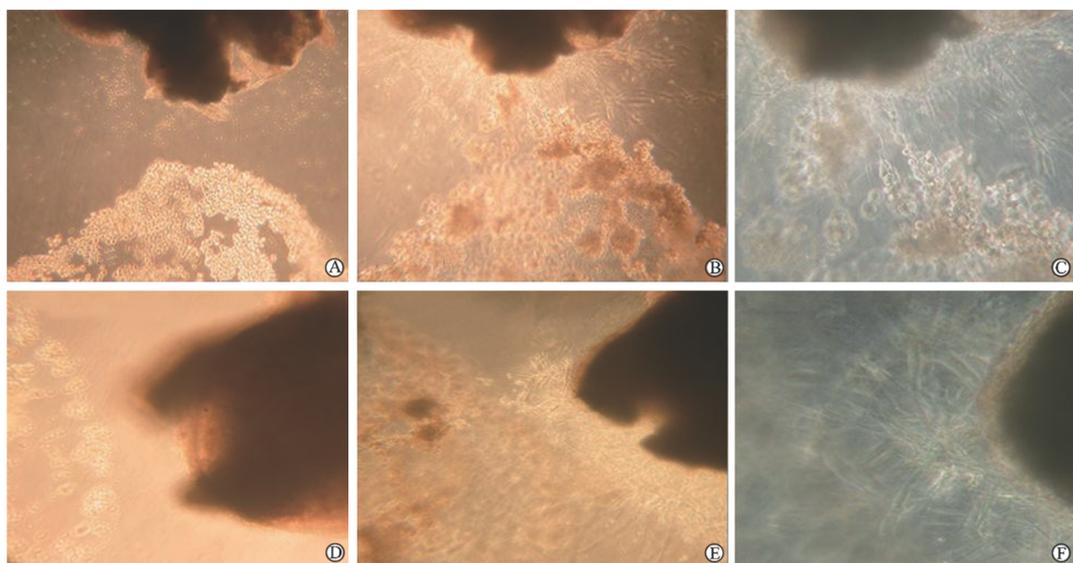


图 3 LICAM-NC、LICAM-shRNA 组 Capan-2 细胞分别与 DRG 共培养时细胞及 DRG 的生长变化

Fig 3 Characterization of LICAM-NC cell/DRG nerve co-culture and LICAM-shRNA cell/ DRG nerve co-culture

A: LICAM-NC cell/DRG nerve co-culture at day 1; B,C: LICAM-NC cell/DRG nerve co-culture at day 5; D: LICAM-shRNA cell/DRG nerve co-culture at day 1; E,F: LICAM-shRNA cell/DRG nerve co-culture at day 5. Original magnification: ×100 (A,B,D,E); ×200(C,F)

共培养第3天时, L1CAM-NC组细胞集落面积为 $(152.97 \pm 4.19) \mu\text{m}^2$, 高于L1CAM-shRNA组的 $(127.51 \pm 3.81) \mu\text{m}^2$, 差异有统计学意义($P=0.001$); 第5天, L1CAM-NC组较L1CAM-shRNA组细胞集落面积约增加了34% [$(308.24 \pm 18.37) \mu\text{m}^2$ vs $(230.31 \pm 14.89) \mu\text{m}^2$, $P=0.005$]. 在神经突生长方面, L1CAM-NC组神经突的面积稍高于L1CAM-shRNA组, 第3天时两组神经突面积分别为 $(122.15 \pm 11.47) \mu\text{m}^2$ 和 $(107.33 \pm 12.80) \mu\text{m}^2$, 第5天时分别为 $(304.27 \pm 11.47) \mu\text{m}^2$ 和 $(282.68 \pm 10.32) \mu\text{m}^2$, 但两组间差异无统计学意义(第3天: $P=0.210$; 第5天: $P=0.073$).

3 讨论

目前普遍认为癌细胞与神经的相互作用及肿瘤微环境的变化导致PNI的发生^[11], 而变化后的微环境可能更有利于癌细胞增殖。既往组织学研究显示, 在神经周围的癌细胞的增殖活性远高于远离神经的细胞^[12], 随后, 首个体外PNI共培养模型发现PNI是一个主动性、特异性、相互作用的过程, 在此过程中伴随着癌细胞的增殖与迁移^[10]。Dai等^[9]利用体外共培养实验发现胰腺癌MIA PaCa细胞具有嗜神经生长特性, 并且共培养组细胞增殖指数明显高于细胞单培养组, 而凋亡细胞比例则减少, 凋亡抑制相关基因的表达也成倍增加。本实验应用体外PNI模型, 也观察到了胰腺癌细胞Capan-2的嗜神经生长现象。然而共培养过程中DRG与癌细胞相互促进增长的机制并不清楚, 核因子 κB 信号通路^[13]及神经生长因子^[14]、胶质细胞神经营养因子^[15]、神经细胞黏附分子^[16]等均可能在其中扮演了一定角色。

L1CAM与神经细胞黏附分子同属一个家族, 与肿瘤侵袭转移有密切的关系。在胰腺癌组织中, L1CAM的表达率从20%到92.7%不等^[5, 17-18], 但特别过表达在肿瘤侵袭的前端、受累淋巴结及肝转移病灶内^[17, 19]。Ben等^[5]的研究显示L1CAM表达在胰腺癌侵犯的神经内, 且与胰腺癌神经侵犯程度呈正相关。体内外实验均证实, L1CAM的存在能提高癌细胞增殖活性、黏附迁移及侵袭转移的能力^[20-22]。此外, L1CAM能通过RGD位点与整合素结合或与埃兹蛋白结合, 持续性激活核因子 κB 信号通路^[23-24]。本实验观察到干扰L1CAM的表达后胰腺癌Capan-2细胞侵袭神经突的现象消失, 并且向

DRG方向迁移减少、增殖也被抑制, 从另一个角度印证了L1CAM可能参与胰腺癌Capan-2细胞体外神经侵袭的过程。

总结本实验, 应用体外PNI模型, 我们观察到干扰L1CAM的表达后胰腺癌Capan-2细胞侵袭神经突的现象消失, 并且向DRG方向迁移及增殖也被抑制, 推测L1CAM参与了胰腺癌Capan-2细胞体外神经侵袭的过程。然而其中的分子学机制并不清楚, L1CAM是否通过与神经外膜或肿瘤微环境中的蛋白质分子如整合素、埃兹蛋白、神经菌毛素及神经黏附分子等^[25]结合从而启动相关信号, 进而促进癌细胞向神经侵袭, 需要进一步研究证实。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Marchesi F, Piemonti L, Fedele G, Destro A, Roncalli M, Albaro L, et al. The chemokine receptor CX3CR1 is involved in the neural tropism and malignant behavior of pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Cancer Res*, 2008, 68:9060-9069.
- [2] Ceyhan G O, Bergmann F, Kadihasanoglu M, Altintas B, Demir I E, Hinz U, et al. Pancreatic neuropathy and neuropathic pain — a comprehensive pathomorphological study of 546 cases[J]. *Gastroenterology*, 2009, 136:177-186.
- [3] Hirai I, Kimura W, Ozawa K, Kudo S, Suto K, Kuzu H, et al. Perineural invasion in pancreatic cancer[J]. *Pancreas*, 2002, 24:15-25.
- [4] Schäfer M K, Altevogt P. L1CAM malfunction in the nervous system and human carcinomas[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2010, 67:2425-2437.
- [5] Ben Q W, Wang J C, Liu J, Zhu Y, Yuan F, Yao W Y, et al. Positive expression of L1-CAM is associated with perineural invasion and poor outcome in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Ann Surg Oncol*, 2010, 17:2213-2221.
- [6] Doberstein K, Wieland A, Lee S B, Blaheta R A, Wedel S, Moch H, et al. L1-CAM expression in ccRCC correlates with shorter patients survival times and confers chemoresistance in renal cell carcinoma cells[J]. *Carcinogenesis*, 2011, 32:262-270.
- [7] 安薇, 李平, 李桂香, 吴红玉, 金晶, 李兆申, 等. 胰腺癌神经浸润体外模型的构建与观察[J]. *中华胰腺病杂志*, 2012, 12:160-163.
- [8] Tonge D A, Golding J P, Edbladh M, Kroon M, Ekström P E, Edström A. Effects of extracellular matrix components on axonal outgrowth from peripheral nerves of adult animals *in vitro* [J]. *Exp Neurol*, 1997, 146:81-90.
- [9] Dai H, Li R, Wheeler T, Ozen M, Ittmann M, Anderson M, et al. Enhanced survival in perineural invasion of pancreatic cancer: an *in vitro* approach[J]. *Hum Pathol*, 2007, 38:299-307.
- [10] Ayala G E, Wheeler T M, Shine H D, Schmelz M, Frolov A,

Chakraborty S, et al. *In vitro* dorsal root ganglia and human prostate cell line interaction; redefining perineural invasion in prostate cancer[J]. *Prostate*, 2001, 49: 213-223.

[11] 周杭城, 陈 炯. 胰腺癌神经侵犯研究进展[J]. *国际外科学杂志*, 2011, 38: 393-395.

[12] Yang G, Wheeler T M, Kattan M W, Scardino P T, Thompson T C. Perineural invasion of prostate carcinoma cells is associated with reduced apoptotic index[J]. *Cancer*, 1996, 78: 1267-1271.

[13] Ayala G E, Dai H, Ittmann M, Li R, Powell M, Frolov A, et al. Growth and survival mechanisms associated with perineural invasion in prostate cancer[J]. *Cancer Res*, 2004, 64: 6082-6090.

[14] Ma J, Jiang Y, Jiang Y, Sun Y, Zhao X. Expression of nerve growth factor and tyrosine kinase receptor A and correlation with perineural invasion in pancreatic cancer[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2008, 23: 1852-1859.

[15] Liu H, Li X, Xu Q, Lv S, Li J, Ma Q. Role of glial cell line-derived neurotrophic factor in perineural invasion of pancreatic cancer[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1826: 112-120.

[16] Li R, Wheeler T, Dai H, Ayala G. Neural cell adhesion molecule is upregulated in nerves with prostate cancer invasion[J]. *Hum Pathol*, 2003, 34: 457-461.

[17] Tsutsumi S, Morohashi S, Kudo Y, Akasaka H, Ogasawara H, Ono M, et al. L1 cell adhesion molecule (L1CAM) expression at the cancer invasive front is a novel prognostic marker of pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *J Surg Oncol*, 2011, 103: 669-673.

[18] Bergmann F, Wandschneider F, Sipos B, Moldenhauer G, Schniewind B, Welsch T, et al. Elevated L1CAM expression in precursor lesions and primary and metastatic tissues of pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2010, 24: 909-915.

[19] Chen M M, Lee C Y, Leland H A, Silletti S. Modification of the L1-CAM carboxy-terminus in pancreatic adenocarcinoma cells[J]. *Tumour Biol*, 2011, 32: 347-357.

[20] Senner V, Kismann E, Püttmann S, Hoess N, Baur I, Paulus W. L1 expressed by glioma cells promotes adhesion but not migration[J]. *Glia*, 2002, 38: 146-154.

[21] Gavert N, Conacci-Sorrell M, Gast D, Schneider A, Altevogt P, Brabletz T, et al. L1, a novel target of beta-catenin signaling, transforms cells and is expressed at the invasive front of colon cancers[J]. *J Cell Biol*, 2005, 168: 633-642.

[22] Gavert N, Sheffer M, Raveh S, Spaderna S, Shtutman M, Brabletz T, et al. Expression of L1-CAM and ADAM10 in human colon cancer cells induces metastasis[J]. *Cancer Res*, 2007, 67: 7703-7712.

[23] Kiefel H, Pfeifer M, Bondong S, Hazin J, Altevogt P. Linking L1CAM-mediated signaling to NF-kappaB activation [J]. *Trends Mol Med*, 2011, 17: 178-187.

[24] Kiefel H, Bondong S, Erbe-Hoffmann N, Hazin J, Riedle S, Wolf J, et al. L1CAM-integrin interaction induces constitutive NF-kappaB activation in pancreatic adenocarcinoma cells by enhancing IL-1beta expression [J]. *Oncogene*, 2010, 29: 4766-4778.

[25] Haspel J, Grumet M. The L1CAM extracellular region: a multi-domain protein with modular and cooperative binding modes [J]. *Front Biosci*, 2003, 8: s1210-s1225.

[本文编辑] 孙 岩

• 书 讯 •

《现代心血管疾病的临床诊断与治疗》即将出版

《现代心血管疾病的临床诊断与治疗》由马丽萍、秦永文、赵仙先主编,第二军医大学出版社出版,ISBN 978-7-5481-0436-0, 16开。

《现代心血管疾病的临床诊断与治疗》一书由长期从事心血管内科和相关科室的临床专家编写,分为常见症状及鉴别诊断、心脏影像学诊断、高血压病、心肌病、心律失常等 20 个篇章,全面系统地阐述了心血管方面的各种疾病的诊断与治疗,具有前沿性、实用性和可读性的特点,并辅以典型病例分析。

《现代心血管疾病的临床诊断与治疗》主要为心血管内科专业医师的培训而编写。同时,也适用于心血管内科的医师、研究生、进修生及相关专业的人员学习和借鉴。

该书由第二军医大学出版社出版发行科发行,全国各大书店均有销售。

通信地址:上海市翔殷路 800 号,邮编:200433

邮购电话:021-65344595,65493093

http://www.smmup.cn