

·论 著·

[文章编号]1000-8861(2016)11-0921-07; [DOI]10.13431/j.cnki.immunol.j.20160179

抗人NRP-1单克隆抗体对肝癌HepG2细胞株的生长抑制作用及机制初探

谈文娟,高春玲*,颜江华,程小峰,张蓓蓓,王笑良

[摘要] 目的 研究抗人神经纤毛蛋白-1(Neuropilin1, NRP-1)单克隆抗体对肝癌HepG2细胞的生长抑制作用及其机制。方法 小鼠腹水法制备抗NRP-1单克隆抗体(NRP-1 mAb)并用rProteinA亲和柱纯化抗体,间接ELISA检测抗体的滴度水平。Western blot检测NRP-1 mAb对HepG2细胞的特异性,细胞免疫荧光和流式细胞术检测NRP-1蛋白在肝癌细胞株HepG2上的表达,MTT法检测NRP-1 mAb对HepG2的生长抑制作用,Western blot检测ERK1/2、P-ERK1/2、Akt、P-Akt蛋白的表达水平。结果 SDS-PAGE和间接ELISA检测纯化的NRP-1 mAb纯度为95%以上,效价为 1×10^{-6} ;Western blot检测结果显示NRP-1 mAb可与HepG2细胞膜上的NRP-1蛋白特异性结合。细胞免疫荧光染色结果显示NRP-1定位于HepG2细胞膜,流式细胞术结果显示NRP-1蛋白在HepG2细胞上表达水平较高;MTT法检测结果显示NRP-1 mAb对HepG2细胞有生长抑制作用。Western blot检测到在不同浓度NRP-1 mAb作用下,HepG2细胞裂解液P-ERK1/2、P-Akt蛋白的条带信号逐渐减弱。结论 纯化的NRP-1 mAb能抑制HepG2细胞的生长,其抑制作用是通过EGF和HGF信号通路实现的。

[关键词] 人神经纤毛蛋白-1;肝癌;NRP-1单克隆抗体;生长抑制作用

[中图分类号] R73-36+1;R735.7

[文献标识码] A

Inhibitory effect of anti-human NRP-1 monoclonal antibody on hepatocellular carcinoma cell line HepG2 and its mechanism *in vitro*

TAN Wenjuan¹, GAO Chunling^{1*}, YAN Jianghua², CHEN Xiaofeng¹, ZHANG Beibei¹, WANG Xiaoliang¹

1. Department of Radiotherapy, Chenggong Hospital Affiliated to Xiamen University, Xiamen 361003, China;

2. Cancer Research Center, Medical College of Xiamen University, Xiamen 361000, China

*Corresponding Author: GAO Chunling, E-mail: chunlinggao@sina.com

[Abstract] The aim of the experimental is to investigate the inhibitory effect of anti-human nerve cilia protein 1 (Neuropilin-1, NRP-1) monoclonal antibody (NRP-1 mAb) on hepatocellular carcinoma cell line HepG2 and its mechanism *in vitro*. Anti-human NRP-1 monoclonal antibody (NRP-1 mAb) was prepared from mouse ascites and purified by rProteinA affinity column assay. The titer of antibody was determined using indirect ELISA assay; the characteristic of NRP-1 mAb binding to NRP-1 was determined using Western blotting; the expression of NRP-1 protein in hepatocellular carcinoma cell line HepG2 was determined using immunofluorescence assay and flow cytometry assay. Growth inhibition of HepG2 cells treated with different concentrations of NRP-1 mAb was determined using MTT assay, while Western blotting was used to detect the expression levels of ERK1/2, P-ERK1/2, Akt and P-Akt proteins. The results of SDS-PAGE and indirect ELISA showed that the purity of purified NRP-1 mAb was more than 95% and the titer was 1×10^{-6} . Western blotting analysis suggested that NRP-1 mAb could bind specifically to NRP-1 on HepG2 cell; immunofluorescence staining showed that NRP-1 was located in the membrane of HepG2 cells. Flow cytometry analysis showed that the expression level of NRP-1 on HepG2 cell was relatively high. Western blotting analysis suggested that P-ERK1/2 and P-Akt expression levels were down-regulated after having incubated HepG2 cells with different concentrations of NRP-1 mAb. In conclusion, NRP-1 mAb could inhibit the growth of HepG2 cells ($P < 0.05$), and its inhibitory effect is achieved by reducing the P-ERK1/2 and P-Akt expression.

[Key words] Neuropilin-1; Hepatocellular carcinoma; NRP-1 mAb; Growth inhibition

基金项目:南京军区医学科技创新项目(12MA061,15MS104)

作者单位:361003,厦门大学附属成功医院放疗科(谈文娟,高春玲,程小峰,张蓓蓓,王笑良);361000,厦门大学医学院抗癌研究中心(颜江华)

*通信作者:高春玲,E-mail:chunlinggao@sina.com

人神经纤毛蛋白-1(Neuropilin-1, NRP-1)是一种 I 型跨膜糖蛋白,它既是 Semaphorin3(Sema3)受体,在神经细胞导向、轴突生长方面发挥调节作用^[1],也是血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的共受体,在多种内皮细胞或肿瘤细胞上表达,可促进 VEGFR-2 介导的 VEGF 的功能,包括内皮细胞的活化、增殖、迁移以及血管生成^[2]。

NRP-1 蛋白的结构有胞内区、跨膜区和胞外区 3 部分组成,其中胞外区又有 3 个不同结构域,分别称为 a1/a2, b1/b2 和 c^[3]。a1/a2 结构域与 b1/b2 结构域是 NRP-1 与配体(Sema3A)结合的位点, b1b2 结构域是与 VEGF165 结合所必需的结构域^[4]。近膜的 c 结构域与 NRP-1 传导其配体的信号密切相关^[5]。

有研究表明 NRP-1 也可不依赖 VEGF 促进内皮细胞信号转导^[6]。NRP-1 还能与成纤维细胞生长因子家族、上皮细胞生长因子(EGF)^[7]、肝细胞生长因子(HGF)^[8]、血小板源性生长因子-B(PDGF-B)^[9]以及转化生长因子 β 1 信号通路^[10]相互作用。NRP-1 广泛分布在人体正常组织中,呈低表达,而在多种肿瘤细胞中高表达如乳腺癌、结肠癌、前列腺癌等^[11]。目前研究发现 NRP-1 与人类多种肿瘤的新生血管生成、肿瘤的生长、迁移及凋亡、疾病的预后密切相关。因此,抗 NRP-1 治疗被认为是一种有潜力的肿瘤治疗靶点。

实验中使用的分泌抗 NRP1/b1b2 单克隆抗体的杂交瘤细胞来自厦门大学医学院抗癌研究中心。该实验室利用基因工程技术克隆与表达了 NRP1/b1b2 蛋白,并利用细胞融合杂交瘤技术建立了能稳定分泌抗 NRP1/b1b2 单克隆抗体的杂交瘤细胞株^[12]。通过研究 NRP-1 mAb 对肝癌 HepG2 细胞株的生长抑制作用及其机制的初步探讨,可为 NRP-1 mAb 应用于临床肝癌的治疗提供理论依据和新的治疗方向。

1 材料与方 法

1.1 细胞与试剂 HepG2 肝癌细胞株来自厦门大学器官移植研究所;抗人 NRP-1 杂交瘤细胞来自厦门大学抗癌研究中心;6~8 周龄雌性 Balb/c 小鼠由厦门大学医学院实验动物中心提供;DMEM 购自 Gibco BRL 公司;胎牛血清购自 PAN Bio Tech 公司;0.25%胰蛋白酶/EDTA 购自 Sigma 公司;;四氮唑蓝(MTT), DMSO 购自上海生工;羊抗鼠 FITC 标记二抗, ERK1/2、P-ERK1/2、Akt、P-Akt 购自 Abcam 公司;Enhanced chemiluminescence(ECL)购自上海生工生物工程公司;荧光染液 DAPI 购自 Roche 公司,

细胞裂解液 RAPI 购自 Millipore 公司;PVDF 膜购自 Bio-Rad 公司。

1.2 细胞培养 人肝癌 HepG2 细胞株常规培养于 DMEM 完全培养液内(含 10%胎牛血清、100 μ g/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素),置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂及饱和湿度的细胞孵育箱中培养。

1.3 抗体的制备与纯化

1.3.1 抗体的制备 1)选取 6~8 周龄的雌性 Balb/c 鼠杂交 F1 代,腹腔接种液体石蜡,0.5 ml/只。2)用基础 DMEM 培养基稀释后的杂交瘤细胞,7 d 后每只小鼠腹腔接种 5×10^5 个杂交瘤细胞。3)每天观察小鼠腹水产生情况,如腹部明显膨大,即脱臼处死小鼠,并用注射器吸取腹水。4)腹水 4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 30 min 后,吸取中间层澄清的腹水于另一离心管(除去细胞成分和其他的沉淀物),冻存于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

1.3.2 抗体的纯化 1)将收集的腹水在 4 $^{\circ}$ C 解冻,用 Buffer A 液稀释 10 倍后,用高速离心管配平,10 000 r/min 离心 30 min,收集上清。2)装柱:转移树脂到柱子,待完全沉淀后,ddH₂O 充分洗涤以除尽基质中的乙醇和空气。3)平衡:以 10 倍柱体积的 pH=9.0 的 Buffer A 洗涤以平衡柱子,调整柱为 pH 9.0。4)上样:将稀释好的腹水加入 rProteinA,使腹水与其充分结合,控制流速,收集上样流出液回收,于 4 $^{\circ}$ C 保存。5)洗涤:以 10 倍柱体积的 pH=9.0 的 Buffer A 洗涤层析柱,以洗脱未与 rProteinA 结合的蛋白,至流出液检出无蛋白为止。6)洗脱:用 pH=3.0 的 Buffer B 进行洗脱,收集洗脱液于 EP 管中 4 $^{\circ}$ C 保存;洗涤直至检出无蛋白。7)调整 pH:收集洗脱液,每个 EP 管约 3 ml 洗脱液中加入 1 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液约 250 μ l 调整 pH 至 7.0。

1.3.3 抗体纯度及效价的鉴定 采用 BCA 法检测纯化后抗体的浓度,并用 SDS-PAGE 凝胶电泳进行纯度测定,用间接 ELISA 法检测抗体的滴度,即用 NRP-1/b1b2 融合蛋白以 5 μ g/ml 的质量浓度包被,每孔 100 μ l,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。用正常小鼠血清做阴性对照。

1.3.4 Western blot 检测 NRP-1 mAb 对 HepG2 细胞的特异性 常规培养 HepG2 和 BGC823 细胞 24 h, BGC823 高表达 NRP-1 蛋白^[12],吸去培养基,用预冷的 PBS 洗涤 3 次,每皿加入 1 ml PBS,用细胞刮刮几次,收集于 1.5 ml EP 管中,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,再向每个 EP 管中加入 60 μ l 的 RAPI 裂解液和 PMSF 混合液置于冰上裂解 45 min,每隔 10 min 涡旋 1 次。于 4 $^{\circ}$ C、13 200 r/min 离心 15 min,小心吸取

上清,即为蛋白样品。BCA法测蛋白质量浓度。10% SDS-PAGE电泳分离蛋白,将胶置于转膜液15 V, 1 h,蛋白转到PVDF膜上。加入NRP-1 mAb,4℃摇床低速孵育过夜,TBST洗涤3次,每次15 min。加入羊抗鼠HRP标记的二抗,孵育1 h,TBST洗涤3次,每次15 min,加ECL液反应3 min,暗室曝光显影。

1.4 细胞免疫荧光分析 NRP-1 在 HepG2 上的表达

1)将盖玻片泡酸过夜,清洗干净后浸泡于无水乙醇中,用三蒸水冲洗3遍,烘干后高压灭菌,高压后取出置60℃烘箱中过夜。2)将盖玻片置于6孔板中,取对数期生长良好的细胞于盖玻片上贴壁生长,12 h后用4℃预冷的PBS冲洗3次,加入4%多聚甲醛固定30 min。3)吸掉固定液,PBS洗3遍,每次3 min。4)在6孔板中加入1:100稀释的抗体或等体积的PBS,37℃孵育1 h。5)弃掉一抗溶液,用PBS洗3遍,每次3 min。在培养板上加1:50稀释羊抗鼠IgG荧光(TRITC)标记二抗,37℃避光孵育1 h,弃掉荧光二抗,用PBS洗3次,每次3 min。6)加入0.5 ml DAPI染色液,室温染色5 min,弃掉染色液。7)滴一滴甘油于载玻片上,盖上贴有细胞的盖玻片,荧光共聚焦扫描显微镜下观察并拍片。

1.5 流式细胞术检测 HepG2 细胞上 NRP-1 的表达

常规培养HepG2细胞24 h,PBS洗涤离心3次,收集于2个EP管,每个EP管细胞数目约为 1×10^6 个。2)每个EP管加4%多聚甲醛1 ml,室温固定30 min,PBS洗涤离心3次(1 200 r/min,5 min)。3)每个EP管分别加入1 ml小鼠IgG和NRP-1 mAb,质量浓度均为5 μg/ml,37℃反应1 h,PBS洗涤离心3次。4)每个EP管加入100 μl 1:50稀释的羊抗鼠FITC-IgG,37℃反应1 h。每个EP管分别加900 μl PBS混悬细胞,上机操作。5)实验数据分析用FlowJo7.6。

1.6 MTT 法检测 NRP-1 mAb 对 HepG2 的细胞毒性效应

取对数期HepG2细胞,用0.25%EDTA-胰酶消化,制成单细胞悬液加入96孔培养板中,每孔加入100 μl,使细胞数终为 3×10^3 /ml。5%CO₂、37℃孵育24 h后,加入0、0.025、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4 mg/ml的NRP-1 mAb,每孔200 μl,继续培养24 h、48 h和72 h,各设4个复孔。PBS作为空白对照。每孔加5 mg/ml MTT溶液20 μl。继续避光孵育4 h。弃掉上清,每孔加150 μl DMSO,置摇床上低速振荡10 min,在酶联免疫检测仪上570 nm处测定各孔光吸收值,实验重复3次,取其平均值。计算细胞抑制率:抑制率=(对照组值-实验组值)/对照组值×100%。

1.7 Western blotting 检测 Akt、P-Akt、ERK1/2、

P-ERK1/2 蛋白的表达 取对数期HepG2细胞,用0.25%EDTA-胰酶消化,制成单细胞悬液加入6孔培养板中,每孔加入2 ml,使终细胞数为 3×10^5 /ml。5%CO₂,37℃孵育24 h后,倒掉培养基,实验组加入NRP-1 mAb,使终质量浓度为0.1、0.2、0.3、0.4 mg/ml,对照组加入DMEM培养液,继续培养48 h。吸掉培养液,用预冷的PBS洗涤3次,每皿加入1 ml PBS,用细胞刮刮几次,收集于1.5 ml EP管中,1 000 r/min离心5 min,弃上清,再向每个EP管中加入60 μl的RAPI裂解液和PMSF混合液置于冰上裂解45 min,每隔10 min涡旋1次。于4℃、13 200 r/min离心15 min,小心吸取上清,即为蛋白样品。BCA法检测蛋白质量浓度。12%SDS-PAGE电泳分离蛋白,将胶置于转膜液15 V、1 h,蛋白转到PVDF膜上。加入相应一抗,4℃摇床低速孵育过夜,TBST洗涤3次,每次15 min。加入HRP标记的二抗,孵育1 h,TBST洗涤3次,每次15 min,加ECL液反应3 min,暗室曝光显影。

1.8 统计学分析 采用SPSS Statistic 17.0软件进行统计分析,数据用均数±标准差表示,组间均数比较应用t检验或者单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义, $P > 0.05$ 认为差异无统计学意义。

2 结果

2.1 抗体的制备与纯化 从Balb/c杂交F1代小鼠腹腔收集的腹水,经rProteinA亲和层析柱纯化后,进行12%SDS-PAGE电泳检测分析,如图1所示,泳道1~4分别为Marker、BSA、腹水、纯化后的抗体。SDS-PAGE凝胶电泳扫描鉴定其纯度为95%以上(图1)。抗体在相对分子质量约为50 000和25 000处出现2个条带,分别相当于NRP-1 mAb抗体重链和轻链的相对分子质量,结果显示通过纯化后,得到较高纯度的抗体。BCA法测定抗体质量浓度为2 mg/ml。

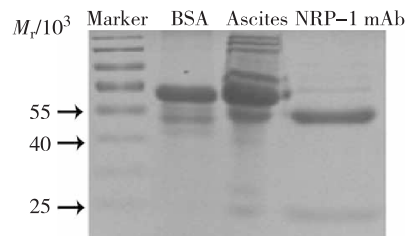
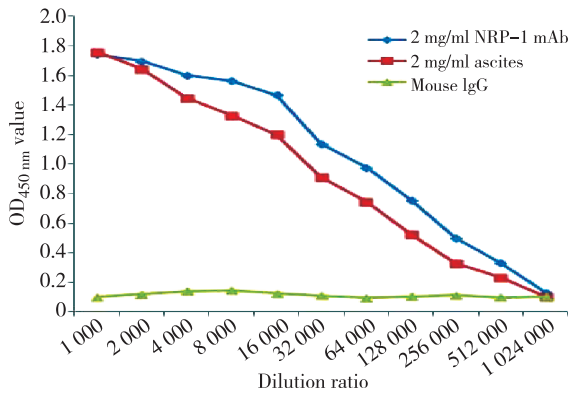


图1 SDS-PAGE检测NRP-1单克隆抗体的纯度

Fig 1 SDS-PAGE analysis of the purity of NRP-1 mAb

2.2 抗体滴度的测定 用间接ELISA方法检测抗体滴度,结果如图2所示,随着抗体浓度下降,OD_{490 nm}读数逐渐下降,纯化后抗体的效价为 1×10^6 。同时也表明NRP-1 mAb能与NRP-1/b1b2融合蛋白特异性结合。



Blue) NRP-1 mAb; Red) Ascites; Green) Negative control.

图2 间接ELISA法测定抗体的效价

Fig 2 The titer of antibody determined by indirect ELISA method

2.3 Western blot检测NRP-1 mAb对HepG2细胞的特异性 Western blot检测结果如图3所示,第1和2泳道在相对分子质量100 000和130 000左右分别有一条带,说明NRP-1 mAb能够很好地结合细胞中的全长NRP1蛋白(相对分子质量130 000左右),可能也与可溶性的NRP1蛋白或者NRP1异构体(相对分子质量100 000左右)相结合。第3泳道在约39 000有一条带,这与NRP-1/b1b2融合蛋白的理论相对分子质量相接近。

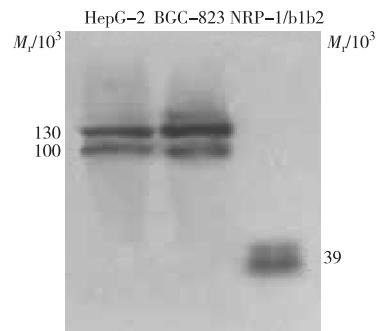


图3 Western blotting分析NRP-1 mAb识别HepG2细胞中NRP-1蛋白的特异性

Fig 3 Western blotting analysis for the binding specificity of the NRP-1 mAb to NRP-1 protein in HepG2 cell

2.4 细胞免疫荧光分析NRP-1在HepG2上的表达 免疫荧光共聚焦显微镜结果图4显示当使用488 nm做激发光检测DAPI的荧光时,可见HepG2细胞的细胞核带蓝色荧光;当使用550 nm做激发光检测TRITC的荧光时,对照组检测不到红色荧光,而加入NRP-1 mAb的HepG2细胞膜上可看到红色荧光,2种荧光叠加,融合图像显示,对照组的细胞膜上未出现红色荧光,而加了NRP-1 mAb组的红色荧光主要分布在细胞膜上。结果表明,NRP-1主要分布在HepG2细胞膜上,并且NRP-1 mAb可以与HepG2细胞上的NRP-1蛋白特异性结合。

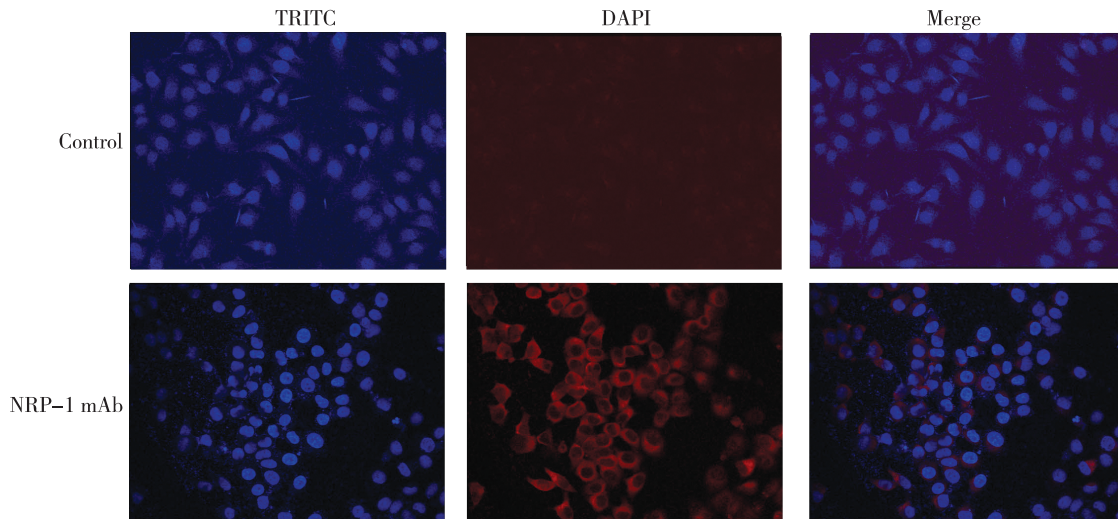


图4 细胞免疫荧光分析NRP-1在HepG2细胞上的表达(x200)

Fig 4 Immunofluorescence analysis of NRP-1 localization on HepG2 cells (x200)

2.5 流式细胞术分析NRP-1在HepG2上的表达 流式细胞术检测HepG2细胞膜上NRP-1的表达水平,检测结果如图5显示,孵育NRP-1 mAb后细胞的荧光强度(蓝色曲线)大于空白对照组(红色曲线),与小鼠IgG相比,NRP-1蛋白在HepG2细胞膜上表达水平较高。

2.6 普通显微镜法观察细胞形态变化 普通光学显

微镜观察NRP-1 mAb作用48 h后对HepG2细胞形态学影响,结果显示,空白对照组细胞贴壁性良好,多数呈梭形,轮廓清晰,生长旺盛。当用不同浓度的NRP-1 mAb作用后,HepG2细胞形态逐渐变得不规则,细胞出现皱缩、变圆、脱落、细胞增殖受到抑制,并随着NRP-1 mAb浓度增高,作用时间延长,细胞数量逐渐减少,细胞之间连接消失,可见细胞大量碎

片,如图6所示。

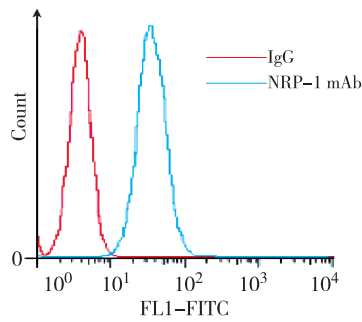
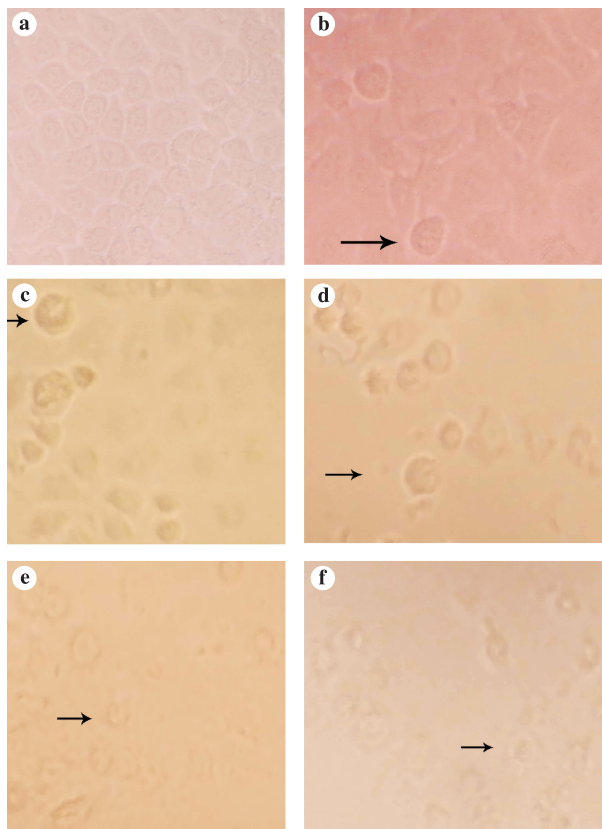


图5 流式检测 HepG2 细胞膜上 NRP-1 的表达

Fig 5 Flow cytometry analysis for the expression of NRP-1 in HepG2 cells

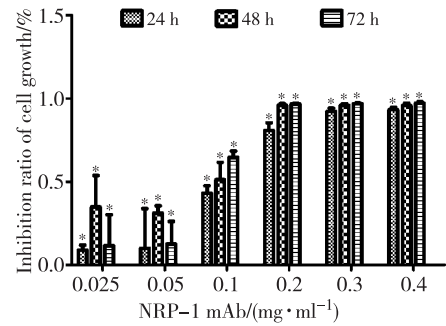


a) Control; b) 0.025 mg/ml NRP-1 mAb; c) 0.05 mg/ml NRP-1 mAb; d) 0.1 mg/ml NRP-1 mAb; e) 0.2 mg/ml NRP-1 mAb; f) 0.3 mg/ml NRP-1 mAb.

图6 NRP-1 mAb 作用 HepG2 细胞 48 h 后的形态学变化和增殖情况(x400)

Fig 6 The morphological changes and proliferation of HepG2 cells treated with different concentrations of NRP-1 mAb for 48 hours (x400)

2.7 MTT 法检测 NRP-1 mAb 对 HepG2 的细胞毒性效应 MTT 法测细胞增殖,统计结果如图7所示,结果表明 NRP-1 mAb 对 HepG2 细胞的生长有抑制作用,并随着作用时间和药物浓度的增加而增加,呈一定时间和剂量依赖性。

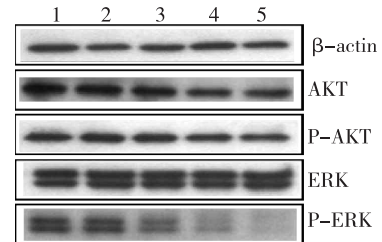


NRP-1 mAb inhibits the growth of HepG2 cells in a time and dose dependence manner. * $P < 0.05$, compared to the controls.

图7 MTT 法检测不同浓度 NRP-1 mAb 对 HepG2 细胞增殖抑制作用

Fig 7 Inhibitory effects of anti-NRP-1 mAb on HepG2 cell proliferation detected by MTT assay

2.8 Western blot 检测 AKT、P-AKT、ERK1/2、P-ERK1/2 蛋白的表达 将不加抗体的 DMEM 作为对照组,0.1、0.2、0.3、0.4 mg/ml 的 NRP-1 mAb 作为实验组,培养 HepG2 细胞 48 h 后,提取细胞蛋白,通过 Western blot 检测 Akt、P-Akt、ERK1/2、P-ERK1/2 的表达。检测结果显示 P-Akt、P-ERK1/2 条带的信号随着 NRP-1 mAb 质量浓度的增加而增强,并呈负相关,见图8。以上结果证明 NRP-1 mAb 是通过 EGF/EGFR、HGF/c-Met 信号通路来抑制肝癌细胞的增殖,并且其抑制作用呈剂量依赖性。



The levels of P-Akt and P-ERK1/2 proteins were significantly decreased, as compared with control group. 1-5) respectively represent the 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 mg/ml concentration of NRP-1 mAb.

图8 Western blot 检测 Akt、P-Akt、ERK1/2、P-ERK1/2 蛋白的表达

Fig 8 The expression of Akt, P-Akt, ERK1/2, and P-ERK1/2 proteins in HepG2 cells treated with NRP-1 mAb detected by Western blotting

3 讨论

肝癌是最常见的人类恶性肿瘤之一,肝癌的发病率和死亡率均较高。肝癌中以肝细胞肝癌最常见,起病隐匿,早期临床症状不明显,确诊时多进入中晚期阶段,且容易发生转移。肝癌对放化疗均不敏感,目前最有效的方法之一是肝癌根治性切除术,但只有少数人适合根治性切除术。由于缺乏特异的

治疗方法,中晚期肝癌患者预后较差,死亡率高。因此寻求一种新的肝癌治疗方法迫在眉睫。

Berge 等^[11]研究表明 NRP-1 表达在人类健康的肝内皮细胞和肝癌组织中,而不表达于正常肝细胞中,并且肝癌细胞 NRP-1 的表达水平的增加与原发性肝癌的发生显著相关,拮抗 NRP-1 可抑制小鼠肝癌肿瘤的生长,并减少肿瘤血管的生成。Li 等^[13]研究发现胃癌组织中高表达 NRP-1,其表达与临床分期、肿瘤分化程度及病理类型相关。拮抗 NRP-1 可上调 P27,并下调 cyclinE 和细胞周期蛋白依赖性激酶 2 诱导细胞周期阻滞在 G₁/S 期,从而抑制胃癌细胞增殖。拮抗 NRP-1 也可通过抑制 FAK 的磷酸化降低胃癌细胞的迁移能力。下调 NRP-1 可抑制细胞增殖和肿瘤血管生成、抑制肿瘤发生、肿瘤的生长以及肺转移。

NRP-1 可与表皮细胞生长因子受体(EGFR)相互作用并促进信号通路下游分子表皮细胞因子对肿瘤细胞的刺激作用^[7]。目前研究证明拮抗 NRP-1 可降低配体诱导的 EGFR 的活化,表现为 EGFR 信号通路的 2 个下游分子 MEK 和 ERK 磷酸化的降低^[14]。NRP-1 也参与肝细胞生长因子(HGF)活化诱导的信号转导和引起肿瘤细胞的细胞反应^[15],表现为 HGF/c-Met 通路导致的 PI3K/Akt 信号通路的活化。研究表明用特异性拮抗 NRP-1 的 NRP-1shRNA 作用 BGC803 细胞后可抑制其增殖,其作用机制是拮抗 NRP-1 后可抑制 VEGF/VEGFR、EGF/EGFR、HGF/c-Met 通路的激活。拮抗 NRP-1 抑制肿瘤细胞增长的细胞信号通路图见图 9。

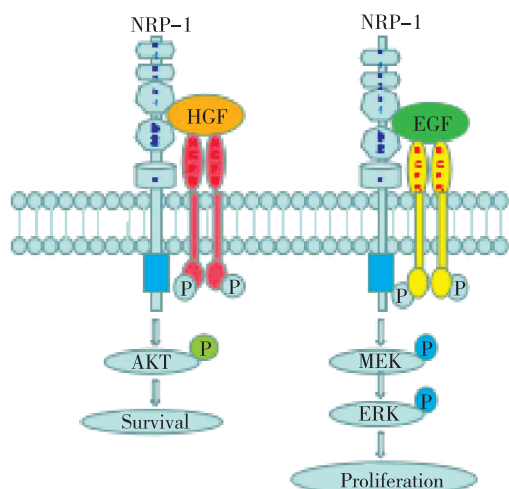


图9 NRP-1 mAb抑制肿瘤细胞增殖的细胞信号通路

Fig 9 The signaling pathway of NRP-1 mAb inhibiting tumor cell proliferation

本实验中制备并纯化出较高纯度和效价的抗 NRP-1 单克隆抗体。细胞免疫荧光共聚焦和流式细

胞术结果显示,NRP-1 蛋白主要分布在 HepG2 肝癌细胞膜上,NRP-1 mAb 能特异性的结合 HepG2 细胞膜上的 NRP-1 蛋白。MTT 结果显示,NRP-1 mAb 对 HepG2 肝癌细胞有生长抑制作用,并随着 NRP-1 mAb 浓度的增加抑制作用更加明显。Western blotting 结果显示,随着 NRP-1 mAb 浓度增加,P-Akt、P-Erk1/2 蛋白条带信号逐渐减弱,表明 NRP-1 mAb 对 HepG2 的生长抑制作用是通过减少 EGF/EGFR、HGF/c-Met 信号通路的活化实现的,并且其抑制增殖作用呈剂量依赖性。

Zeng 等^[16]通过实验证明靶向抗 NRP-1 mAb 可抑制 MCF7 乳腺癌细胞的增殖,还可通过减少 $\alpha_5\beta_1$ 整合素-NRP-1 复合物的形成,抑制 FAK/p130cas 信号通路的活化,从而使细胞黏附受到抑制。因此,提示抗 NRP-1 mAb 能抑制肿瘤细胞的迁移,降低恶性肿瘤的侵袭潜能。综上所述,抗 NRP-1 可作为一种抗肿瘤治疗的新靶点。全面认识 NRP-1 在肿瘤细胞内信号转导中的作用及相关分子机制的意义重大,并运用不同方式阻断其信号通路以抑制肿瘤细胞的增殖,迁移、凋亡及肿瘤血管的新生也是今后研究的热点。本实验只研究了 NRP-1 mAb 对 HepG2 肝癌细胞的影响,并未涉及其他肝癌细胞系,NRP-1 mAb 是否也能抑制其他肝癌细胞的增殖有待进一步探究。

近年来,肿瘤血管靶向药物已经成为一种有效的抗肿瘤治疗策略,也是一个有价值的治疗肝癌的方法。目前靶向 VEGF 药物改善生存期的作用不明显,因此,探求一种新分子靶点并通过抗血管生成治疗提高肝癌疗效是很有必要的。目前有研究表明 NRP-1 能够调节血管形成和改变血管通透性^[17],拮抗 NRP-1 可抑制 NRP-1/VEGF-A₁₆₅ 相互作用,阻止转基因小鼠肝癌的血管重塑和肿瘤生长^[14]。提示抗 NRP-1 或许可使肿瘤血管正常化,改善组织缺氧,提高放射治疗敏感性。但抗 NRP-1 的抗血管生成作用机制尚不清楚,以及抗 NRP-1 能否与放射治疗联合应用提高肿瘤治疗效果尚不可知,为此我们将在后续研究中对抗 NRP-1 的抗血管生成机制及其与放射治疗联合应用的可行性及其作用机制进行深入探究。

【参考文献】

[1] Kolodkin AL, LeVengood DV, Rowe EG, et al. Neuropilin is a semaphorin III receptor[J]. Cell, 1997, 90(4):753-762.
 [2] Fuh G, Garcia KC, de Vos AM. The interaction of neuropilin-1 with vascularendothelial growth factor and its receptor flt-1[J]. J Biol Chem, 2000, 275(35):

- 26690-26695.
- [3] 裴向克,石炳毅. Neuropilin-1 研究进展[J]. 免疫学杂志, 2007, 23(5): 580-582.
- [4] 倪二茹,曾凡伟,王生育. 抗人 NRP1 单克隆抗体的活性鉴定及初步应用[J]. 免疫学杂志, 2012, 28(8): 651-655.
- [5] Roskoski R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2007, 62(3): 179-213.
- [6] Wang L, Zeng H, Wang P, et al. Neuropilin-1-mediated vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-dependent endothelial cell migration[J]. J Biol Chem, 2003, 278(49): 48848-48860.
- [7] Rizzolio S, Rabinowicz N, Rainero E, et al. Neuropilin-1-dependent regulation of EGF-receptor signaling[J]. Cancer Res, 2012, (72):5801-5811.
- [8] Sulpice E, Plouet J, Berge M, et al. Neuropilin-1 and neuropilin-2 act as coreceptors, potentiating proangiogenic activity[J]. Blood, 2008, 111(4): 2036-2045.
- [9] Banerjee S, Sengupta K, Dhar K, et al. Breastcancer cells secreted platelet-derived growth factor-induced motility ofvascular smooth muscle cells is mediated through neuropilin-1[J]. Mol Carcinog, 2006, 45(11):871-880.
- [10] Glinka Y, Prud'homme GJ. Neuropilin-1 is a receptor for transforming growth factor beta-1, activates its latent form, and promotes regulatory T cell activity[J]. J Leukoc Biol, 2008, 84(1): 302-310.
- [11] Berge M, Allanic D, Bonnin P, et al. Neuropilin-1 is upregulated in hepatocellular carcinoma and contributes to tumour growth and vascular remodelling[J]. J Hepatol, 2011, 55(4):866-875.
- [12] Li X, Luo F, Wang S, et al. Monoclonal antibody against NRP-1b1b2[J]. Hybridoma (Larchmt), 2011, 30(4): 369-373.
- [13] Li LH, Jiang X, Zhang Q, et al. Neuropilin-1 is associated with clinicopathology of gastric cancer and contributes to cell proliferation and migration as multifunctional co-receptors[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2016, 35:16.
- [14] Chakraborty S, Li L, Puliappadamba VT, et al. Constitutive and ligand-induced EGFR signalling triggers distinct and mutually exclusive downstream signalling networks[J]. Nat Commun, 2014, 5: 5811.
- [15] Matsushita A, Götze T, Korc M. Hepatocyte growth factor-mediated cell invasion in pancreatic cancer cells is dependent on neuropilin-1[J]. Cancer Res, 2007, 67(21): 10309-10316.
- [16] Zeng F, Luo F, Sha L, et al. A monoclonal antibody targeting neuropilin-1 inhibits adhesion of MCF7 breast cancer cells to fibronectin by suppressing the FAK/p130cas signaling pathway[J]. Anticancer Drugs, 2014, 25(6):663-672.
- [17] Plein A, Fantin A, Ruhrberg C. Neuropilin regulation of angiogenesis, arteriogenesis and vascular permeability[J]. Microcirculation, 2014, 21(4):315-323.

(收稿日期:2016-03-30;修回日期:2016-06-13)

(编辑 侯 瑞)

更 正

发表于本刊2016年8月第32卷第8期681页的文章《间充质干细胞对系统性红斑狼疮T淋巴细胞的免疫调节作用》,原第一作者罗利梅(贵州省遵义市第一人民医院检验科,563002)和第二作者骆辑(贵州省贵州大学药学院,550002)应为共同第一作者。

本刊编辑部