

学校编码: 10384

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_

学号: 24520091152985

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

# Neuropilin-1 单克隆抗体抑制胶质瘤生长的 实验研究

## In Vitro and in Vivo Study on the Suppressive Effect of Neuropilin-1 Monoclonal Antibody on human glioma cells

唐小勇

指导教师姓名: 陈陆旭 副教授

专 业 名 称: 外 科 学

论文提交日期: 2012 年 4 月

论文答辩日期: 2012 年 5 月

学位授予日期 2012 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2012 年 5 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文(包括纸质版和电子版)，允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

(        )1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于  
年 月 日解密，解密后适用上述授权。

(        )2.不保密，适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。)

声明人(签名)：

年 月 日

## 摘要

### 背景

Neuropilin-1 (NRP-1) 属于跨膜糖蛋白, 作为轴突导向因子 (Semaphorin, Sema) 的受体, 在神经细胞导向、轴突生长方面发挥调节作用。近年来, 大量研究结果显示 NRP-1 可表达于新生血管的内皮细胞和多种肿瘤细胞。NRP-1 在胶质瘤的各个发展阶段都有较高的表达, 并影响肿瘤的发生发展。研究表明, NRP-1 作为跨膜糖蛋白, 在胶质瘤内涉及独立的细胞信号通路; NRP-1 对胶质瘤细胞的增殖、迁移和转移具有抑制作用。

### 目的

制备高纯度和高特异性的 NRP-1 单克隆抗体(NRP-1 MAb); 检测胶质瘤细胞株 U251、U87、C6 及胶质瘤组织中 NRP-1 蛋白的表达情况; 研究 NRP-1 MAb 对胶质瘤细胞的增殖、迁移、侵袭等的抑制作用; 探讨 NRP-1 MAb 在胶质瘤裸鼠模型的肿瘤靶向作用和抑制效应。

### 方法

利用 Balb/c 鼠生产 NRP-1 MAb, rProtein A 纯化抗体, ELISA 鉴定活性。培养胶质瘤细胞株 U251、U87 和 C6, 免疫印迹法(Western blot)及细胞免疫组化检测 NRP-1 蛋白在胶质瘤细胞株和胶质瘤组织的表达。细胞抑制实验、划痕实验、transwell 实验等研究 NRP-1 MAb 对胶质瘤细胞的增殖、迁移、侵袭等的作用。荧光素标记 NRP-1 MAb 后, 进行胶质瘤裸鼠模型(U87)的活体成像, 观察 NRP-1 MAb 的肿瘤靶向性。用 NRP-1 MAb 治疗胶质瘤裸鼠模型 (U87), 观察肿瘤的生长情况。

### 结果

rProtein A 纯化的 NRP-1 MAb 纯度高达 95%, 滴度  $1 \times 10^{-6}$ - $5 \times 10^{-6}$ 。胶质瘤细胞株 (U251、U87、C6) 的 Western blot 实验结果显示, NRP-1 MAb 能特异结合 NRP-1 蛋白; 细胞免疫荧光染色显示 NRP-1 MAb 定位于细胞膜。体外细胞实验结果显示, NRP-1 MAb 对胶质瘤细胞的增殖、迁移和侵袭具有抑制作用。胶质

瘤裸鼠模型（U87）的活体成像显示，NRP-1 MAb 能特异靶向肿瘤组织；治疗实验表明 NRP-1 MAb 对胶质瘤的生长有抑制作用。

### 结论

1. 本实验成功制备了高纯度和高特异性的 NRP-1 MAb。
2. NRP-1 MAb 能结合在胶质瘤细胞株（U251、U87、C6）的细胞膜上。
3. NRP-1 MAb 对胶质瘤细胞的增殖、迁移、转移等有抑制作用。
4. NRP-1 MAb 具有肿瘤靶向性和抑制肿瘤生长的效应，为深入开展胶质瘤靶向治疗的研究奠定了基础。

### 关键词

Neuropilin-1；单克隆抗体；胶质瘤；抑制作用

## Abstract

Neuropilin-1 (NRP-1) is a 120–130kDa single spanning trans-membrane glycoprotein, which is described as a co-receptor implicated in neuronal guidance that binds members of the semaphorins family. NRP-1 is expressed on endothelial cells and various tumor cells, such as glioma cells. The over-expression of NRP-1 in glioma is correlated with tumor progression, migration and metastasis, therefore, use of monoclonal antibodies targeting NRP-1 maybe an effective anti-glioma therapeutic strategy.

**Objective:** To prepare and characterize NRP-1 MAb; to detect the expressions of NRP-1 on glioma cell lines (U251, U87 and C6) and glioma tissues; to investigate the effect of NRP-1 MAb on glioma cell lines *in vitro* and the effect on nude mice bearing glioma tumor (U 87) *in vivo*.

**Methods:** NRP-1 MAb was produced from ascites of Balb/c mice and purified by rprotein A column. SDS-PAGE and indirect ELISA were used to characterize the purity and titers of the NRP-1 MAb. The expressions of NRP-1 on glioma cell lines and glioma tissues were detected by Western blot, Immunofluorescence staining and Immunocytochemistry staining. MTT, the scratch test and transwell test were used to evaluate the inhibitory effect of NRP-1 MAb on proliferation, migration and metastasis of glioma cell lines. The tissue distribution and tumor targeting capability of NRP-1 MAb in U87 Xenografts nude mice was determined in Optical Imaging. Anti-glioma experiment was carried out by NRP-1 MAb on U87 Xenografts nude mice.

**Results:** SDS-PAGE and indirect ELISA showed that the NRP-1 MAb got purity of above 95% and titer of  $1 \times 10^{-6}$ - $5 \times 10^{-6}$ . Western blot, Immunofluorescence staining and Immunocytochemistry staining indicated that the NRP-1 was over-expressed on glioma cell lines (U251, U87 and C6) and glioma tissues. NRP-1 MAb was showed to inhibit the proliferation, migration and invasion of glioma cells *in vitro*. NRP-1 MAb

can specifically target the tumor in U87 Xenografts nude mice and reduce the proliferation activity of the tumor.

**Conclusions:** The results of this study indicate that NRP-1 MAb can inhibit the proliferation, migration and metastasis of glioma cell lines *in vitro* and can target the glioma tumor to reduce tumor growth *in vivo*. Therefore, NRP-1 MAb may be an effective agent for glioma therapy.

**Key words:** Neuropilin-1; Monoclonal antibody; Glioma; Inhibitory effect

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 目录

摘要.....	I
Abstract.....	III
目录.....	V
Content.....	VIII
前言.....	1
一、胶质瘤的病理生理.....	1
二、胶质瘤的治疗现状.....	2
三、Neuropilin-1 的研究进展.....	6
四、Neuropilin-1 与胶质瘤.....	11
五、研究目的和内容.....	12
第一章 NRP-1 MAb 的制备、纯化及鉴定.....	13
一、材料和方法.....	13
1 材料.....	13
2 方法.....	15
2.1 细胞培养.....	15
2.2 抗体的生产.....	16
2.3 抗体的纯化.....	16
2.4 滴度测定.....	16
二、结果与分析.....	17
1 NRP-1 MAb 的纯化.....	17
2 滴度测定.....	18
三、讨论.....	18
第二章 NRP-1 在胶质瘤细胞株及胶质瘤组织的表达.....	20
一、材料和方法.....	20
1 材料.....	20
2 方法.....	23
2.1 Western blot.....	23



2.2 细胞免疫荧光染色.....	23
2.3 免疫组织化学染色.....	24
二、结果与分析.....	26
1 Western blot .....	26
2 免疫荧光与免疫组化.....	26
三、讨论.....	29
第三章 NRP-1 MAb 对胶质瘤细胞的抑制作用（体外研究） .....	31
一、材料和方法.....	31
1 材料.....	31
2 方法.....	32
2.1 细胞培养.....	33
2.2 细胞增殖抑制试验（MTT） .....	34
2.3 细胞划痕实验.....	34
2.4 细胞侵袭试验.....	34
二、结果与分析.....	35
1 细胞增殖抑制试验（MTT） .....	35
2 细胞划痕实验.....	36
3 形态学观察.....	38
4 细胞侵袭试验（U87 cell） .....	38
三、讨论.....	39
第四章 NRP-1 MAb 对裸鼠胶质瘤模型的抑制作用（体内研究） .....	41
一、材料和方法.....	41
1.材料.....	41
2.方法.....	42
2.1 肿瘤动物模型的建立、分组及治疗.....	42
2.2 裸鼠体重的称量及组织处理.....	43
2.3 荷瘤裸鼠活体体内成像.....	43
二、结果与分析.....	44
1.各组裸鼠肿瘤重量及体积情况.....	44

2.活体成像.....	46
三、讨论.....	47
结论.....	49
总结与展望.....	50
参考文献.....	51
致 谢.....	56

厦门大学博硕士论文摘要库

## Content

Abstract.....	I
Abstract.....	III
Content.....	V
Content.....	VIII
Introduction.....	1
I Pathophysiology of Glioma .....	1
II The current Glioma therapy .....	2
III Advanced research of Neuropilin-1 .....	6
IV Neuropilin-1 and Glioma .....	11
IV The purpose and content of this thesis.....	12
Chapter I Production, purification and characterization of NRP-1 MAb .....	13
I Materials and methods .....	13
1 Materials .....	13
2 Methods.....	15
2.1 Cell Culture.....	15
2.2 Antibody production .....	16
2.3 Antibody purification .....	16
2.4 Titer determination.....	16
II Results and analyses .....	17
1 Purity of NRP-1 MAb.....	17
2 Titer of NRP-1 MAb .....	18
III Discussion .....	18
Chapter II Expression of NRP-1 on glioma cell lines and glioma tissues.....	20
I Materials and methods .....	20
1 Materials .....	20
2 Methods.....	23

2.1 Western blot .....	23
2.2 Immunofluorescent staining.....	23
2.3 Immunohistochemistry staining.....	24
II Results and analyses .....	26
1 Western blot .....	26
2 Immunohistochemistry staining.....	26
III Discussion .....	29
Chapter III Inhibitory effect of NRP-1 MAb on glioma cell lines.....	31
I Materials and methods .....	31
1 Materials .....	31
2 Methods.....	32
2.1 Cell Culture.....	33
2.2 MTT .....	34
2.3 Cellular scratches experiment.....	34
2.4 Cellular invasion test.....	34
II Results and analyses .....	35
1 MTT .....	35
2 Cellular scratches experiment.....	36
3 Morphological observation .....	38
4 Cellular invasion test.....	38
III Discussion .....	39
Chapter IV Inhibition of NRP-1 MAb on glioma .....	41
I Materials and methods .....	41
1. Materials .....	41
2. Methods.....	42
2.1 Construction of U87 Xenografts nude mice .....	42
2.2 Measurement of tumor volumn.....	43
2.3 Optical imaging.....	43
II Results and analyses .....	44
1 Anti-glioma experiment.....	44

2.Optial imaging .....	46
III Discussion .....	47
Conclusion .....	49
Summary .....	50
References .....	51
Acknowledgments.....	56

厦门大学博硕士论文摘要库

## 前言

胶质瘤是发生于神经外胚层的肿瘤，故亦称神经外胚层肿瘤或神经上皮肿瘤，是中枢神经系统最常见的原发性肿瘤，约占颅内肿瘤的 35~60%<sup>[1]</sup>，按照世界卫生组织脑肿瘤的分类，根据恶性程度共分 I、II、III、IV 级，其中 III 级为间变型胶质瘤，IV 级为多形性胶质母细胞瘤，它们均为恶性肿瘤。胶质瘤具有侵袭性生长、细胞增殖快、易复发的特点。传统治疗策略以手术为主，并结合放疗和化疗。但总体来说，治疗效果差，易复发，生存期短，同时放/化疗对中枢神经系统的毒副作用也不容忽视。III 级间变型胶质瘤的中位生存期约为 18 个月，而 IV 级多形性胶质母细胞瘤的中位生存期仅为 9-12 个月<sup>[2, 3]</sup>。上述情况在近 30 年的临床实践中未能得到根本性的改善。因此，人脑胶质瘤仍是神经外科领域的难治性疾病，对其病因、发病机理、生物学特性以及新的治疗手段的探索，一直是神经外科领域的研究热点。

### 一、胶质瘤的病理生理

胶质瘤起源于神经间质细胞，即神经胶质、室管膜、脉络丛上皮和神经实质细胞，即神经元。大多数肿瘤起源于不同类型的神经胶质，但根据组织发生学来源及生物学特征，对发生于神经外胚层的各种复杂肿瘤，一般都称为神经胶质瘤。

胶质瘤的分类方法很多，临床工作者往往采用的是分类比较简单的 Kernohan 分类法<sup>[4]</sup>。各型胶质瘤中，以星形细胞瘤最多，其次为胶质母细胞瘤，随后依次为髓母细胞瘤、室管膜瘤、少枝胶质瘤、松果体瘤、混合性胶质瘤、脉络丛乳头状瘤、未分类胶质瘤及神经元性肿瘤。各型胶质瘤的好发部位不同，如星形细胞瘤，成人多见于大脑半球，儿童则多见于小脑；胶质母细胞瘤几乎均发生于大脑半球；髓母细胞瘤好发于小脑蚓部；室管膜瘤多见于第 4 脑室；少枝胶质瘤大多发生于大脑半球<sup>[5]</sup>。

胶质瘤以男性较多见，特别在多形性胶质母细胞瘤、髓母细胞瘤，男性明显多于女性。各型胶质母细胞瘤多见于中年，室管膜瘤多见于儿童及青年，髓母细胞瘤几乎都发生在儿童。胶质瘤的部位与年龄也有一定关系，如大脑星形细胞瘤

和胶质母细胞瘤多见于成人<sup>[6]</sup>，小脑胶质瘤（星形细胞瘤、髓母细胞瘤、室管膜瘤）多见于儿童<sup>[7]</sup>。

胶质瘤的病程一般为数周至数月，少数可达数年。恶性程度高的和后颅窝病灶则病史较短，偏良性的或位于静区的肿瘤则病史较长。肿瘤若有出血或囊变，症状会突然加重，甚至有类似脑血管病的发病过程。胶质瘤的临床症状可分两个方面，一是颅内压增高症状，如头痛、呕吐、视力减退、复视、精神症状等；另一方面是肿瘤压迫、浸润、破坏脑组织所产生的局灶症状，早期可表现为刺激症状如局限性癫痫，后期表现为神经功能缺失症状如偏瘫等<sup>[8]</sup>。

由于肿瘤逐渐增大，形成颅内占位性病变，常伴有周围脑水肿，当超过代偿程度时，即产生颅内压增高。肿瘤阻塞脑脊液循环，或压迫静脉导致静脉回流障碍时，将加重颅内压增高。如肿瘤内发生出血、坏死及囊肿形成，可加快其进程。当颅内压增高达到临界点时，颅内容积的小量增加，都将导致颅内压迅速增高<sup>[9]</sup>。

由于局部颅内压力增高，颅内各分腔间产生压力梯度，造成脑移位，逐渐加重则形成脑疝<sup>[10]</sup>。幕上大脑半球肿瘤可产生大脑镰下疝，扣带回越过中线，可造成楔形坏死。胼周动脉亦可受压移位，严重的可发生供应区的脑梗塞。更危险的是发生小脑幕切迹疝，即颞叶内侧沟回通过小脑幕切迹向后颅窝移位疝出，同侧动眼神经受压麻痹，瞳孔散大，光反应消失，中脑的大脑脚受压产生对侧偏瘫。有时对侧大脑脚压迫于小脑幕边缘，产生同侧偏瘫。脉络膜后动脉及大脑后动脉亦可受压引起缺血性坏死，最后可因脑疝而死亡。

## 二、胶质瘤的治疗现状

虽然以手术为主的综合治疗使胶质瘤的疗效有了明显提高，特别是低级别的星形细胞瘤和少突胶质细胞瘤患者可以达到 6~10 年的平均生存时间，但间变型胶质瘤和多形性胶质母细胞瘤患者的平均生存时间还分别只有 30~36 个月和 12~15 个月<sup>[2, 3]</sup>。胶质母细胞瘤患者的 1 年生存率约为 30%，五年生存率还不足 5%。因此，如何进一步提高胶质瘤特别是恶性胶质瘤的治疗效果是胶质瘤治疗研究的挑战之一。

根据美国国立综合癌症网络(National Comprehensive Cancer Network, NCCN)2011 年<sup>[11]</sup>的临床准则，恶性胶质瘤规范化治疗的基本原则为，以手术为

主的分类-分级-连续-个体化-综合治疗。即在尽可能保全重要神经功能的前提下，最大限度地手术切除肿瘤；而肿瘤位于重要脑功能区，手术极度困难且风险极大者，应尽可能进行立体定向活检术。对每位病人，依据肿瘤的病理分类和分级、以及肿瘤的分子生物学特征和病人的免疫状态，再辅以放疗±化疗。而手术、放疗、化疗三大常规治疗以外的许多新疗法，只能在一些有条件的单位作为临床研究，而不能作为一线治疗手段。

以下就胶质瘤的药物治疗做一些探讨。

### （一）胶质瘤的化疗现状

20 世纪 60 年代以来，仅有三种化疗药物：卡莫司汀（Carmustine）<sup>[12]</sup>、洛莫司汀（Lomustine）<sup>[13]</sup>和替莫唑胺（temozolomide, TMZ）<sup>[14]</sup>，获得美国食品药品监督管理局（Food and Drug Administration, FDA）批准而应用于临床<sup>[13]</sup>。由于存在血脑屏障等障碍，而且胶质瘤对化疗药物具有较强的耐受性，所以，尽管术后辅助化疗，几乎所有的恶性胶质瘤最终都要复发<sup>[13]</sup>。一般来说，化疗药物难以投放至瘤区，使得肿瘤细胞内的药物浓度低且作用时间短，这些均是影响胶质瘤化疗效果的主要原因。脑组织血液供应的特殊性也明显降低了化疗药物的理论疗效。

上述三种药物，卡莫司汀的有效率大约为 40%，在年龄大于 40 岁的患者中效果有限，而且其半衰期短，仅为 12-20 分钟，更受到化疗药物引起骨髓抑制、致命的肺纤维化以及肾功能障碍等的限制。

目前，替莫唑胺是较受青睐的一种化疗药物。作为一种新型的烷化剂，对脑胶质瘤患者进行术后辅助性治疗，可改善胶质瘤患者的生存质量。大量临床研究显示，替莫唑胺不仅对复发的多形性胶质母细胞瘤和间变型星形细胞瘤等顽固性肿瘤有显著疗效，且对间变型少突胶质瘤及颅内转移瘤也有较好的效果<sup>[15]</sup>。

### （二）胶质瘤的生物治疗

肿瘤的生物治疗种类繁多，从操作模式上，分为非细胞治疗和细胞治疗。细胞治疗包括：1、淋巴因子激活的杀伤细胞(lymphokine activated killer cells, LAK)；2、肿瘤浸润淋巴细胞（tumor infiltrating lymphocyte, TIL）；3、细胞因子诱导的杀伤细胞（Cytokine-induced killer cell, CIK）等。非细胞治疗包括：1、抗体治疗；2、多肽疫苗；3、基因靶向治疗；4、细胞因子治疗等。在这个领



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库