

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 24520111153363

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

靶向 Neuropilin-1 单克隆抗体对皮肤癌细胞
生长抑制作用及其机制的研究

Studies of a Monoclonal Antibody Targeting Neuropilin-1 on
Growth Inhibition of Skin Cancer Cells and Its Mechanisms

吕莎

指 导 教 师: 颜江华教授

专 业 名 称: 药 理 学

论文提交日期: 2014 年 5 月

论文答辩时间: 2014 年 5 月

学位授予日期: 2014 年 6 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2014 年 6 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 日

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

研究背景和目的

在日照丰富的国家，皮肤癌的患病率极高，其病因复杂，发病机制各异，而传统的放疗、化疗手段存在抗肿瘤效果差、副作用大等一系列缺点。分子靶向治疗却有着良好的肿瘤靶向性和较低的毒副作用，为癌症治疗提供了新的治疗手段。近期研究显示神经鞭毛素蛋白-1 (Neuropilin-1, NRP-1)是癌症治疗的新靶标，NRP-1 是一个新型的多功能受体，是 I 型跨膜糖蛋白。NRP-1 可作为轴突导向因子 3 (semaphorin 3, Sema 3)、血管内皮细胞因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 等多种细胞因子的共受体，参与调控多种细胞因子介导的经典信号通路，同时其本身也具有独立的信号通路，与肿瘤血管新生及肿瘤的发生发展密切相关。许多实验证明 NRP-1 在皮肤癌上有较高的表达，并与其发生发展密切相关，但作用机制尚不清楚。本文旨在检测本实验室制备的抗 NRP-1 单克隆抗体 (NRP-1 mAb) 对皮肤癌细胞株生存的影响，并探讨其作用机制，为发展一种以 NRP-1 为靶标的新型抗肿瘤策略奠定基础。

实验方法

利用 Balb/c 鼠生产 NRP-1 mAb; rProtein A 柱纯化抗体; SDS-PAGE 蛋白电泳检测抗体的纯度和浓度; 间接 ELISA 鉴定抗体活性; 流式细胞术、Western blotting、细胞免疫荧光及免疫组化检测 NRP-1 mAb 的特异性及 NRP-1 蛋白在皮肤癌细胞株和皮肤癌组织上的表达情况; 光镜观察 NRP-1 mAb 对细胞形态的影响; 细胞抑制实验 (MTT) 和集落形成抑制试验检测 NRP-1 mAb 对皮肤癌细胞株增殖的影响; 流式细胞术和细胞核荧光染色检测 NRP-1 mAb 对皮肤癌细胞株凋亡的影响; Western blotting 检测凋亡相关蛋白 (Caspase-3、Bax、Bcl-2) 和增殖相关蛋白 (PI3K、p-Akt、Akt、p-ERK1/2、ERK1/2) 的表达, 分析 NRP-1 mAb 对 PI3K/Akt 和 MEK/ERK 信号通路的激活情况, 探讨 NRP-1 mAb 对皮肤癌细胞的作用机制。

实验结果

制备纯化的 NRP-1 mAb 纯度高达 96.5 %，效价约为 1×10^6 ，同时不同批次效价类似，表明其活性稳定。NRP-1 mAb 与 NRP-1 b1b2 蛋白、B16F10 细胞和 A431 细胞分别在 39 KDa、100 KDa 和 130 KDa 处均有特异性的结合带。两株皮肤癌细胞株及皮肤癌组织上 NRP-1 抗原表达呈阳性，主要定位于细胞膜上，且 A431 表达更高；MTT 结果显示 NRP-1 mAb 能抑制皮肤癌细胞株 A431 和 B16F10 的增殖，且抑制作用与剂量和时间正相关。细胞集落形成抑制实验结果表明，不同浓度抗体均可显著抑制细胞集落的形成，并呈剂量依赖性。细胞核 Hoechst 33258 荧光染色、流式细胞术结果表明 NRP-1 mAb 可诱导皮肤癌细胞凋亡，并呈剂量依赖性。Western blotting 检测到 NRP-1 mAb 作用皮肤癌细胞后 Bax 表达上调、Caspase-3 的剪切带增加，Bcl-2、PI3K(85)、p-Akt、p-ERK 1/2 表达下调。

结论

1. 本课题成功制备了高纯度、高效价且效价稳定的 NRP-1 mAb。
2. NRP-1 mAb 能特异性的结合皮肤癌细胞上 NRP-1 蛋白，且皮肤癌细胞及皮肤癌组织上高表达 NRP-1。
3. NRP-1 mAb 能显著抑制皮肤癌细胞的生长并呈时效、量效关系。
4. NRP-1 mAb 对皮肤癌细胞的生长抑制作用与下调 PI3K/Akt 和 MEK/ERK 信号通路相关。

关键词：Neuropilin-1；单克隆抗体；皮肤癌；增殖；凋亡

Abstract

Background and Purpose

In the abundant sunshine state, the morbidity rate of skin cancer is extremely high, its etiology is complex and pathogenesis is different. But traditional radiotherapy and chemotherapy are used in a restrict range for the disadvantages of low effects and large side effects. Molecular targeted drugs with high tumor-targeting ability and low side effects provide a new strategy for cancers. Recent studies show that Neuropilin-1 (NRP-1) is a new target for cancer therapy. NRP-1 is a multifunctional receptor and a single-spanning transmembrane glycoprotein. It is involved in vascular generation and activation and participated in the malignant phenotype of tumor through independent signal pathway as co-receptor of semaphorin 3 (Sema 3), vascular endothelial growth factor (VEGF), hepatocyte growth factor (HGF) and so on. Many studies proved that NPR-1 was highly expressed in skin cancer and was tightly related to the initial and progress, but mechanism among them remains unclear. This paper aims to detect effect of anti-NRP-1 mAb produced by our laboratory on the growth of skin cancer cell lines and explore the mechanism, which lay a foundation for the development of a new anti-tumor strategy targeting NRP-1.

Methods

NRP-1 mAb was produced from ascites of Balb/c mice and purified by a column with rprotein A. SDS-PAGE detected the concentration and purity of the antibody. Indirect ELISA was used to identify the specialty and titers of the NRP-1 mAb respectively. The expressions of NRP-1 in skin cancer cells A431, B16F10 and their corresponding tissue were detected by flow cytometry, Western blotting, immunofluorescence and immunohistochemistry. MTT was used to evaluate the inhibitory effect of NRP-1 mAb on proliferation. Cell morphology was observed by microscopy. Nuclear staining and flow cytometry were used to observe cell apoptosis.

Western blotting detected the expression of Caspase-3, Bax, Bcl-2, PI3K (85), p-Akt, p-ERK1/2.

Results

The purity of NRP-1 mAb processed by rProteinA is as high as 96.5 % and indirect ELISA showed that the NRP-1 mAb got the titer of 1×10^6 . Western blotting showed the bands of 39 KDa, 100 KDa and 130 KDa respectively, indicating the NRP-1 mAb could bind to both recombinant NRP-1 b1b2 and full-length NRP-1 in cancer cells. Flow cytometry showed that skin cancer cell lines positively expressed NRP-1. Western blotting and immunofluorescence staining indicated that the NRP-1 was localized on the membrane of skin cancer cell lines and immunocytochemistry showed that NRP-1 highly expressed in the skin cancer tissues. MTT and colony forming assay showed that NRP-1 mAb have inhibitory effect on the skin cancer cell lines in dose-dependent method and time-dependent method. Nuclear Hoechst staining and flow cytometry showed that NRP-1 mAb led to apoptosis of skin cancer cell lines in dose-dependent method. Western blotting showed upregulation of the expression of Caspase-3 and Bax, along with the downregulation of Bcl-2, PI3K (85), p-Akt and p-ERK1/2 expression after treatment of NRP-1 mAb on skin cancer cell lines

Conclusions

1. We successfully produce NRP-1mAb with high purity, high titer and stable titration.
2. NRP-1 mAb can bind to the NRP-1 expressed in the skin cancer cell lines.
3. NRP-1 mAb have inhibitory effect on the skin cancer cell lines in dose-dependent method and time-dependent method.
4. The growth inhibitory effect of NRP-1 mAb on the skin cancer cell lines is related to the down regulation of PI3K/Akt and MEK/ERK signaling pathway.

Keywords: neuropilin-1; monoclonal antibody; skin cancer; proliferation; apoptosis

目录

摘要.....	I
Abstract.....	III
前言.....	1
一、皮肤癌概述	1
1 皮肤癌的发病原因及发病机制.....	1
1.1 皮肤癌的发病原因.....	1
1.2 皮肤癌的发病机制.....	2
2 皮肤癌的治疗.....	3
二、Neuropilin-1 概述	4
1 NRP-1 的结构及其异构体.....	4
2 NRP-1 的表达.....	6
3 NRP-1 的配体与共受体.....	7
3.1 Plexin 和 semaphorin.....	8
3.2 VEGF 和 VEGFR.....	8
3.3 TGF- β 和 TGFR.....	9
3.4 FGF、HGF 和 c-met.....	9
3.5 PDGF 和 PDGFR.....	9
3.6 EGF 和 EFGR.....	10
3.7 Fibronectin 和 Integrin.....	10
4 NRP-1 的功能.....	11
4.1 NRP-1 与血管生成.....	11
4.2 NRP-1 与神经发育.....	12
4.3 NRP-1 与肿瘤的发生发展.....	13
4.4 NRP-1 与免疫调节.....	13
5 靶向 NRP-1 的药物.....	14

三、NRP-1 在皮肤癌中研究进展.....	14
四、研究目的和内容.....	15
第一章 NRP-1 mAb 的制备、纯化及鉴定.....	17
一、材料和方法.....	17
1 材料.....	17
1.1 细胞株和实验动物.....	17
1.2 主要试剂及耗材.....	17
1.3 主要仪器及设备.....	18
1.4 主要溶液的配制.....	18
2 方法.....	22
2.1 杂交瘤细胞培养.....	22
2.2 抗体的生产.....	23
2.3 抗体的纯化.....	23
2.4 抗体的透析和冻干.....	24
2.5 抗体的纯度鉴定.....	24
2.6 抗体的浓度测定.....	25
2.7 抗体的滴度鉴定.....	25
二、结果与分析.....	26
1 纯度测定.....	26
2 滴度测定.....	27
三、讨论.....	28
第二章 NRP-1 在皮肤癌细胞株及皮肤癌组织中的表达.....	29
一、材料和方法.....	29
1 材料.....	29
1.1 细胞株.....	29
1.2 主要试剂及耗材.....	29
1.3 主要仪器及设备.....	29
1.4 主要溶液的配制.....	30
2 方法.....	30

2.1 流式细胞术	30
2.2 Western blotting	31
2.3 细胞免疫荧光染色	32
2.4 免疫组织化学染色	33
二、结果与分析	34
1 流式细胞术	34
2 Western blotting	35
3 细胞免疫荧光染色	35
4 免疫组织化学染色	36
三、讨论	38
第三章 NRP-1 mAb 对皮肤癌细胞的生长抑制作用	39
一、材料和方法	39
1 材料	39
1.1 细胞株	39
1.2 主要试剂及耗材	39
1.3 主要仪器及设备	39
1.4 主要溶液的配制	40
2 方法	40
2.1 细胞计数	40
2.2 细胞生长抑制试验	41
2.3 集落形成抑制实验	41
2.4 流式细胞术检测细胞凋亡	42
2.5 荧光显微镜法观察细胞凋亡	42
2.6 统计学处理	43
二、结果与分析	43
1 抗 NRP-1 抗体抑制细胞增殖	43
1.1 普通显微镜法观察细胞形态变化	43
1.2 MTT 法	45
1.3 集落形成抑制实验	47

2 抗 NRP-1 抗体促进细胞凋亡.....	48
2.1 流式细胞术检测细胞凋亡.....	48
2.2 荧光显微镜法观察细胞凋亡.....	50
三、讨论.....	50
第四章 NRP-1 mAb 对皮肤癌细胞生长抑制作用机制.....	52
一、材料和方法.....	52
1 材料.....	52
1.1 细胞株.....	52
1.2 主要试剂及耗材.....	52
1.3 主要仪器及设备.....	52
1.4 主要溶液的配制.....	52
2 方法.....	53
二、结果与分析.....	53
1 增殖相关蛋白 PI3K(85)、p-Akt 和 p-ERK1/2 的表达.....	53
2 凋亡相关蛋白 Caspase-3、Bax 和 Bcl-2 的表达.....	55
三、讨论.....	56
结论.....	60
本文存在的问题及今后应开展的研究.....	61
参考文献.....	62
致谢.....	76

Contents

Abstract (Chinese)	I
Abstract	III
Introduction	1
I. skin cancer	1
1. Etiology and pathogenesis of skin cancer.....	1
1.1 Pathogeny of skin cancer.....	1
1.2 Pathogenesis of skin cancer.....	2
2. Current treatment of skin cancer.....	3
II. Advanced research of Neuropilin-1	4
1. The structure of NRP-1	4
2. The expression of NRP-1.....	6
3. The ligands and receptors of NRP-1	7
3.1 Plexin and semaphorin	8
3.2 VEGF and VEGFR.....	8
3.3 TGF- β and TGFR	9
3.4 FGF, HGF and c-met	9
3.5 PDGF and PDGFR	9
3.6 EGF and EFGR	10
3.7 Fibronectin and Integrin	10
4. The function of NRP-1.....	11
4.1 NRP-1 in angiogenesis	11
4.2 NRP-1 in neural development	12
4.3 NRP-1 in tumorigenesis and tumor development	13
4.4 NRP-1 in immune regulation	13
5. The monoclonal antibody drugs of NRP-1	14
III. The research of NRP-1 on skin cancer	14

IV. The purpose and content of the research.....	15
Chapter I Production, purification and characterization of NRP-1 mAb.....	17
I. Materials and methods.....	17
1 Materials.....	17
1.1 Cell lines and experimental animal	17
1.2 Main reagents and consumables.....	17
1.3 Main instruments and equipment	18
1.4 Main solution preparation	18
2 Methods.....	22
2.1 Hybridoma cell culture	22
2.2 Antibody production.....	23
2.3 Antibody purification	23
2.4 Antibody dialysis and lyophilization.....	24
2.5 Identification of antibody purity.....	24
2.6 Identification of antibody concentration	25
2.7 Identification of antibody titer.....	25
II. Results and analyses	26
1 Purity of NRP-1 mAb	26
2 Titer of NRP-1 mAb.....	27
III. Discussion.....	28
Chapter II Expression of NRP-1 on skin cancer cell line and tissues..	29
I. Materials and methods.....	29
1 Materials.....	29
1.1 Cell lines.....	29
1.2 Main reagents and consumables.....	29
1.3 Main instruments and equipment	29
1.4 Main solution preparation	30
2 Methods.....	30
2.1 Flow cytometry.....	30

2.2	Western blotting.....	31
2.3	Immunofluorescence staining.....	32
2.4	Immunohistochemical staining.....	33
II.	Results and analyses	34
1	Flow cytometry	34
2	Western blotting	35
3	Cell immunofluorescence staining.....	35
4	Immunohistochemical staining	36
III.	Discussion	38
Chapter III NRP-1 mAb inhibitory effect on the growth of skin cancer cells.....		
39		
I.	Materials and methods	39
1	Materials.....	39
1.1	Cell lines.....	39
1.2	Main reagents and consumables.....	39
1.3	Main instruments and equipment	39
1.4	Main solution preparation	40
2	Methods.....	40
2.1	Cell count	40
2.2	Cell growth inhibition test.....	41
2.3	Colony forming inhibition assay	41
2.4	Flow cytometry to detect cell apoptosis	42
2.5	Fluorescence microscopy to observe apoptosis.....	42
2.6	Statistical processing	43
II.	Results and analyses	43
1	NRP-1 mAb inhibited cell proliferation.....	43
1.1	Morphological observation.....	43
1.2	MTT assay	45
1.3	Colony forming inhibition assay	47
2	NRP-1 mAb induced cell apoptosis	48
2.1	Flow cytometry to detect cell apoptosis	48

2.2	Fluorescence microscopy to observe apoptosis.....	49
III.	Discussion.....	50
Chapter IV Mechanism of NRP-1 mAb's inhibitory effect on skin cancer cells.....		
		52
I.	Materials and methods.....	52
1	Materials.....	52
1.1	Cell lines.....	52
1.2	Main reagents and consumables.....	52
1.3	Main instruments and equipment	52
1.4	Main solution preparation	52
2	Methods.....	53
II.	Results and analyses	53
1	Expression of PI3K(85), p-Akt , p-ERK1/2.....	53
2	Expression of Caspase-3, Bax and Bcl-2	55
III.	Discussion.....	56
Conclusion		60
Existing problems and future development.....		61
References.....		62
Acknowledgments.....		76

前言

一、皮肤癌概述

皮肤癌是指皮肤表皮发生的恶性肿瘤，皮肤癌患者表现为皮肤出现不规则的肿块、色斑，同时还有肿块、色斑边缘参差、肿块颜色斑驳，色斑为黑、啡、红、白混杂，同时还伴有溃烂、流血等症状。在日照丰富的国家，皮肤癌的患病率极高，在白色人种中却是常见的恶性肿瘤之一，超过所有其他恶性肿瘤的总和。在澳大利亚南部地区皮肤癌的发病率至少达 650/10 万，在美国的高加索人中，皮肤癌的发病率亦高达 165/10 万，为我国发病率的 100 倍。皮肤癌虽在我国的总体发病率很低，但是在局部地区如：海南，西藏等，仍然是皮肤癌高发区^[1]。

皮肤癌可分为基底细胞癌（BCC）、鳞状细胞癌（SCC）和黑色素瘤（MM），多发生于长期暴露在阳光下的皮肤如面部、颈部等，而黑色素瘤可发生于皮肤任何部位。三种皮肤癌相比较而言，典型的 BCC 一般增殖比较慢，只在组织附近扩散，总的来说不转移，但亦有例外，转移后平均存活时间是 10 个月。SCC 发生率最高，一般增殖较快，有很强的肿瘤扩散和转移潜力。MM 虽是一种少见的肿瘤，但其致死率最高占皮肤肿瘤死亡病例的极大部分且发病率有逐渐增加趋势。2012 年在美国有超过 76000 黑色素瘤的新发病例，导致超过 9000 人死亡^[1]。少数早期患者可以通过外科手术的方法治疗，但因其对放化疗不敏感，晚期恶性黑色素瘤病人的临床治疗十分棘手。此外，恶性黑色素瘤还是进展最快的一种肿瘤，其中位生存期只有 8—9 个月，3 年生存率仅 10-15%，病死率高，预后差^[2-3]。

1 皮肤癌的发病原因及发病机制

1.1 皮肤癌的发病原因

皮肤癌发病原因尚未完全明了，皮肤癌的诱发因素多种多样，对皮肤的损害非一日之久，所以大多数皮肤癌往往发生在 40 岁以后。紫外线（UV）辐射能使皮肤发生病变，过度暴露于阳光下能诱发皮肤癌。因此，紫外线辐射是目前已

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 for delivery details.

廈門大學博碩士論文摘要庫