

靶向 NRP1 单克隆抗体对黑色素瘤细胞 B16F10 的增殖、迁移和凋亡的影响

吕莎, 李哲, 王显江, 王生育, 杨芸, 罗芳洪, 吴婷, 颜江华* (厦门大学医学院抗癌研究中心, 福建 厦门 361005)

摘要:目的 研究靶向神经菌毛素 1 (neuropilin1, NRP1) 单克隆抗体 (NRP1 mAb) 对黑色素瘤细胞 B16F10 增殖、迁移和凋亡的影响, 并探讨其作用机制。方法 SDS-PAGE 检测神经菌毛素 1 单克隆抗体的纯度; 蛋白质印迹法、免疫荧光和免疫组化检测神经菌毛素 1 单克隆抗体的特异性和 B16F10 细胞及其移植瘤上神经菌毛素 1 的表达; 四甲基偶氮唑蓝法、划痕实验、Annexin V-FITC/PI 双标记流式细胞术等方法检测不同浓度神经菌毛素 1 单克隆抗体对黑色素瘤细胞增殖、迁移和凋亡的影响; 蛋白质印迹法检测神经菌毛素 1 单克隆抗体作用后细胞内相关信号蛋白的表达。结果 纯化的神经菌毛素 1 单克隆抗体具有高纯度和特异性, 同时 B16F10 细胞及其移植瘤上神经菌毛素 1 高表达。神经菌毛素 1 单克隆抗体能有效抑制 B16F10 细胞的增殖和迁移, 抑制作用呈时间和浓度依赖性 ($P < 0.05$)。神经菌毛素 1 单克隆抗体能显著诱导 B16F10 细胞凋亡, 并呈剂量依赖关系 ($P < 0.05$)。抗体作用后 B16F10 细胞中磷酸化的 Akt 和 ERK1/2 表达下调, Bcl-2 和 Caspase 3 蛋白表达下调, Bax 蛋白的表达上调。结论 纯化的神经菌毛素 1 单克隆抗体能有效地抑制 B16F10 增殖、迁移并明显诱导凋亡, 其可能通过抑制膜上神经菌毛素 1 与相关细胞因子结合而减少其介导的 PI3K/Akt 和 MEK/ERK1/2 信号转导途径的活化来抑制细胞增殖和迁移, 并通过 Bcl-2/Bax/Caspase3 途径诱导细胞凋亡, 从而发挥其抗肿瘤作用。

关键词: 神经菌毛素 1 单克隆抗体; 黑色素瘤细胞; 增殖; 迁移; 凋亡

doi: 10.11669/cpj.2014.20.009 中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2014)20-1807-06

Effects of Anti-NRP1 Monoclonal Antibody on Cell Proliferation, Migration and Apoptosis of Melanoma B16F10 Cells

LÜ Sha, LI Zhe, WANG Xian-jiang, WANG Sheng-yu, YANG Yun, LUO Fang-hong, WU Ting, YAN Jiang-hua* (Cancer Research Center of Medical College Xiamen University, Xiamen 361005, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effect of anti NRP1 monoclonal antibody (NRP1 mAb) on melanoma cell B16F10 proliferation, migration and apoptosis, and explore its mechanism. **METHODS** Western blot, immunofluorescent and immunocytochemistry staining were applied to determine the expression of NRP1 on B16F10 cells and its xenotransplanted tumors by NRP1 mAb. The proliferation, migration and apoptosis of melanoma cells were detected by MTT assay, the scratch test and Annexin V-FITC/PI double labeled flow cytometry after administration with different concentrations of NRP1 mAb. The expression level of some signal molecules was measured by Western blot. **RESULTS** The purified NRP1 mAb has high purity and specificity. B16F10 cells and its xenotransplanted tumors highly expressed NRP1. NRP1 mAb inhibit the proliferation and migration in a time-and dose-dependent manner ($P < 0.05$). Moreover NRP1 mAb induce apoptosis of B16F10 in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). The results of western blot revealed down-regulated expression of p-Akt, p-ERK1/2, Bcl-2 and caspase-3 and up-regulated Bax expression in B16F10 cells treated by NRP1 mAb. **CONCLUSION** The purified NRP1 mAb can effectively inhibit the proliferation and migration of B16F10 and induce apoptosis. Meanwhile, the changed expression of the proteins suggests that NRP1 mAb may inhibit cell proliferation and migration by ERK1/2 and PI3K/Akt pathway and induce cell apoptosis by Bcl-2/Bax/caspase-3 pathway, consequently playing anti-tumor role.

KEY WORDS: NRP1 mAb; melanoma; proliferation; migration; apoptosis

恶性黑色素瘤 (malignant melanoma) 是由皮肤、黏膜、眼和中枢神经系统色素沉着区域的异常黑素细胞过度增生引发的皮肤恶性肿瘤。其发生隐匿, 恶性程度极高, 病死率高, 预后差, 平均生存时间仅

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30973485, 81172970); 福建省属公益类科研专项经费 (2011R1039-1, 2013J0138)

作者简介: 吕莎, 女, 硕士, 研究方向: 肿瘤分子靶向药物; * 通讯作者: 颜江华, 男, 教授, 研究方向: 肿瘤分子靶向药物 Tel/Fax: (0592) 2180587 E-mail: jhyan@xmu.edu.cn

为8~9个月。临床发现时多已转移,放化疗效果差,治疗难度大。目前因皮肤癌死亡的患者中,恶性黑色素瘤患者占80%。因此,开发新的抗黑色素瘤药物具有重要意义^[1]。神经菌毛素1(neuropilin 1, NRP1)作为轴突生长因子(semaphorin, Sema)3A、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor receptor, VEGF)等多种细胞因子的受体的共受体^[2-5],参与肿瘤血管新生、肿瘤生长和转移^[6-9]。NRP1在黑色素瘤等多种肿瘤组织中高表达,并与肿瘤的恶性程度密切相关,被认为是一个很有前景的癌症治疗靶点^[10-14]。NRP1蛋白由胞内区、跨膜区和胞外区3部分组成,其中胞外区由3个不同的结构域组成,分别称为a1a2、b1b2和c。其中b1b2结构域是与VEGF165、HGF、TGF- β 、PDGF等细胞因子结合所必需的结构域^[7-8]。因此b1b2是NRP1参与肿瘤血管新生及肿瘤发生发展的重要区域。为了发展新型靶向抗肿瘤药物,本实验室前期通过杂交瘤技术制备筛选出了一株靶向NRP1 b1b2的功能性单克隆抗体,该抗体能与肝癌、胃癌及胶质瘤细胞特异性结合,并对乳腺癌、神经胶质瘤等具有较好的治疗作用^[14-15]。在此基础上,对神经菌毛素1(neuropilin1, NRP1)单克隆抗体(NRP1 mAb)在黑色素瘤细胞增殖、迁移和凋亡中所起作用及其相关分子机制进行研究,这将为开展靶向NRP1药物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株与试剂

黑色素瘤细胞株B16F10(中科院上海细胞库)。NRP1 mAb杂交瘤细胞株由本实验室克隆筛选获得(批号:110514);rProtein A(Sepharose™公司); β -actin抗体、四甲基偶氮唑盐(MTT)和TRITC-标记的羊抗鼠二抗(美国Sigma公司);胎牛血清(上海洛神生物技术有限公司);DMEM高糖培养基(美国Gibico公司);Annexin V/PI凋亡试剂盒(美国BD公司);Akt、p-Akt、ERK1/2和p-ERK1/2抗体(美国Cell Signal公司);Bax、Bcl-2和Caspase-3抗体(美国Santa Cruz公司);HRP标记的羊抗鼠二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司);Hoechst 33258细胞核染色试剂盒,细胞RIPA裂解液(上海碧云天生物技术公司);免疫组化染色试剂盒(深圳欣博盛生物技术公司)。

1.2 NRP1 mAb的制备和纯化

将无菌石蜡油注射到Balb/c小鼠腹腔

(每只0.5 mL);1~2周后,每只腹腔注射杂交瘤细胞 2×10^6 个;7~10 d后,待小鼠腹部膨胀且行动迟缓时抽取腹水;37℃孵育1 h后,3 000 r·min⁻¹离心10 min,弃去脂肪与沉淀,收集中间澄清腹水;rProtein A柱子纯化,PBS透析,冷冻干燥机冻干,超纯水复溶后备用^[15]。取20 μ L蛋白加入上样缓冲液,95℃变性处理10 min,聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)测定纯度。

1.3 蛋白质印迹法

取对数生长期细胞B16F10接种至6孔板中,37℃,5% CO₂培养箱中培养24 h,不同浓度的NRP1 mAb处理48 h;用细胞刮收集细胞,PBS洗涤2次,100 μ L RIPA裂解液(用时加入1% 100 mmol·L⁻¹ PMSF),4℃裂解细胞15 min,4℃14 000 r·min⁻¹离心取上清;经常规12% SDS-PAGE电泳后,转膜、封闭,分别加入一抗NRP1 mAb(1:100稀释),Bcl-2、Bax和Caspase3(1:200稀释),Akt、p-Akt、ERK1/2和p-ERK1/2(1:1 000稀释)4℃孵育过夜;TBST(Tris-Buffered Saline and Tween 20)冲洗3次;HRP标记的羊抗鼠二抗(1:10 000稀释)孵育1 h,TBST冲洗3次后,ECL曝光显影。

1.4 免疫荧光检测B16F10上NRP1的表达

取对数生长期细胞接种至已放置无菌盖玻片的6孔板中,待细胞达30%融合时,4%多聚甲醛固定30 min;用10%羊血清的PBS于37℃孵育30 min;加入NRP1 mAb(1:50稀释)4℃孵育过夜;PBS清洗3次,加入TRITC标记的羊抗鼠二抗(1:64稀释)37℃避光孵育1 h,PBS清洗3次;加入Hoechst 33258孵育5 min;PBS清洗3次;抗荧光淬灭剂封片。使用Olympus共聚焦荧光显微镜观察并拍照,软件分析结果。

1.5 免疫组化检测B16F10移植瘤上NRP1的表达

取对数生长期细胞用0.25%胰酶消化成单细胞悬液,以1 000 r·min⁻¹离心5 min,除去上清液,在无菌条件下于裸鼠背侧腋窝皮下接种每只0.2 mL(相当于 2×10^6 个细胞);接种后5~6 d可见肿瘤生长,取肿瘤组织块0.3 cm×0.5 cm×0.3 cm大小,置于10%中性福尔马林中固定;常规石蜡切片,切片厚5 μ m;免疫组化染色具体步骤参照说明书。

1.6 MTT法检测细胞增殖

取对数生长期细胞接种于96孔板(1 000个·孔⁻¹),培养24 h;更换培养基,每孔加入不同质量

浓度的 NRP1 mAb (100、200 和 400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) ,对对照组加入同体积 PBS ,实验组和对照组均设 6 个复孔 ,分别孵育 24、48、72 和 96 h ;每孔加入 MTT (5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 20 μL ,避光孵育 4 h ;小心弃去上清 ,每孔加入 150 μL 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide , DMSO) ,振荡 5 min ;用酶联免疫检测仪在 570 nm 波长处测定其吸光度 (A) 值 ,并计算抑制率。

抑制率 (%) = (实验组平均吸光度 - 对照组平均吸光度) / 对照组平均吸光度 \times 100%

1.7 划痕实验检测细胞迁移

取对数生长期细胞接种于 6 孔板中 ,待细胞汇合成单层后 ,用 10 μL 枪头于培养皿划一道宽约 1 mm 的划痕 ,每组设 6 个观察点 ,拍照记录划痕区 ;分组给予 100、200 和 400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 NRP1 mAb 处理 ,对照组为 PBS ,此时培养基血清浓度更换为 2% ;分别培养 24 和 48 h 后 ,拍照记录 ;采用 Image-Pro Plus 软件测量划痕区相对距离并计算细胞迁移率。

迁移率 (%) = (药物处理前划痕区相对距离 - 药物处理后划痕区相对距离) / 药物处理前划痕区相对距离 \times 100%

1.8 流式细胞术检测细胞凋亡

取对数生长期细胞接种于 6 孔板中 (每孔 5×10^4 个) ,每孔加入不同质量浓度的 NRP1 mAb (100、200 和 400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) ,对照组加入同体积 PBS ,48 h 后收集细胞 ,制备单细胞悬液 ;取 100 μL 悬液 ,Annexin V-FITC / PI 染色 15 min ,1 h 内上机检测。

1.9 统计学处理

应用 SPSS13.0 软件 ,对数据进行单因素方差分析 t 检验及相关性分析 ;数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示 , $0 \leq r \leq 1$ 为正相关 , $-1 \leq r \leq 0$ 为负相关 , $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 NRP1 mAb 的制备和纯化

腹水经 rProtein A 亲和层析柱纯化后 ,SDS-PAGE 凝胶电泳扫描鉴定其纯度为 95% 以上 (图 1) 。第二泳道为纯化抗体 ,其在相对分子质量为 50×10^3 和 25×10^3 处呈现 2 条带 ,分别相当于抗体的重链和轻链的相对分子质量 ,表明通过纯化得到较高纯度的抗体。

2.2 B16F10 细胞上 NRP1 的表达

蛋白质印迹法分析结果显示 NRP1 mAb 能特异性结合 NRP1 b1b2 蛋白和 B16F10 细胞上的 NRP1

蛋白 (图 2A) 。免疫组化和免疫荧光实验结果显示 ,该抗体能特异性结合到黑色素瘤细胞 B16F10 及其移植瘤上 ,并且 B16F10 细胞及其移植瘤上均高表达 NRP1 (图 2B ,C) 。

2.3 不同 NRP1 mAb 浓度对 B16F10 细胞增殖的影响

对照组细胞贴壁良好 ,汇合生长 ,多数呈梭形及长圆形 ,轮廓清楚 ,生长旺盛 。在 NRP1 mAb 作用过程中 ,细胞形态逐渐变得不规则 ,细胞出现皱缩、变

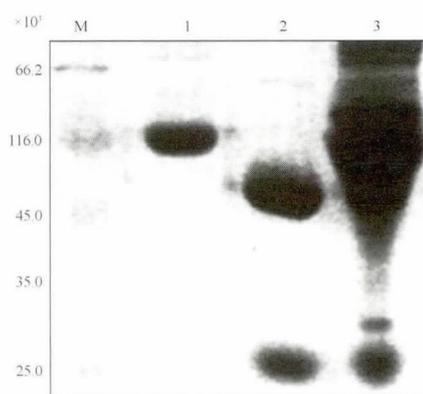


图 1 SDS-PAGE 电泳分析抗体腹水经 rProtein A 纯化后的纯度

M - 蛋白相对分子质量标准 ;1 - 牛血清蛋白 ;2 - 纯化的 NRP1 mAb ;3 - 腹水

Fig. 1 SDS-PAGE Analysis of the mAbs after purification

M - protein marker ;1 - BSA ;2 - purified NRP1 mAb ;3 - ascites

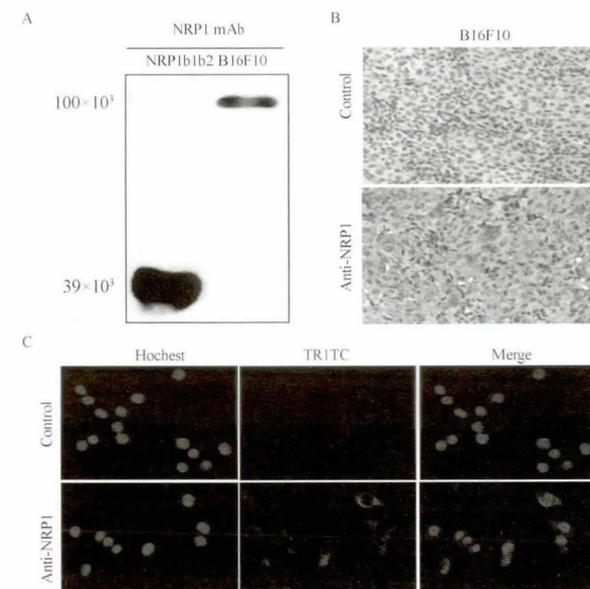


图 2 蛋白质印迹法 (A) 、免疫组化 (B) 和免疫荧光分析 (C) 抗体识别 NRP1 蛋白的特异性

Fig. 2 Western blot (A) , immunocytochemistry staining (B) and confocal immunofluorescent analysis (C) for the binding specificity of the mAbs with NRP1

圆、脱落(图3A)。MTT统计结果表明,与对照组比较,各给药组均具有增殖抑制作用($P < 0.05$),其中48 h以后高剂量组抑制作用更加明显($P < 0.01$),同时NRP1 mAb作用24、48和72 h时细胞的增殖抑制率与浓度的相关系数(r)分别为0.185、0.756和0.955;不同浓度NRP1 mAb作用时细胞的增殖抑制率与作用时间的相关系数分别为0.978、0.998和0.910;各组与对照组相比差异有统计学意义,NRP1 mAb对细胞的增殖抑制作用呈一定浓度和时间依赖性(图3B)。

2.4 不同NRP1 mAb浓度对B16F10细胞迁移的影响

划痕实验结果显示,NRP1 mAb作用后划痕愈合程度逐渐减少(图4A)。统计结果表明,与对照组相比,NRP1 mAb作用后细胞的迁移能力显著下降($P < 0.05$),其中NRP1 mAb质量浓度为 $400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时抑制作用最为显著($P < 0.01$),同时NRP1 mAb作用24和48 h时细胞的迁移率与浓度的相关系数分别为0.430和0.803;不同浓度NRP1 mAb作用时细胞的迁移率与作用时间的相关系数分别为0.727 6、0.910、0.769和0.744;各组与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$),故抑制作用呈一定浓度和时间依赖性(图4B)。

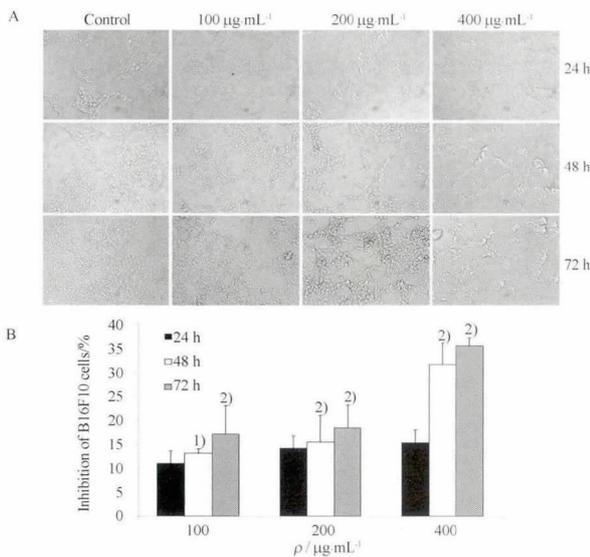


图3 NRP1 mAb对B16F10细胞的形态(A, $\times 200$)和增殖(B)的影响。 $n = 6 \bar{x} \pm s$
与对照组相比, ¹⁾ $P < 0.05$ ²⁾ $P < 0.01$

Fig. 3 Morphological changes (A, $\times 200$) and proliferation (B) of B16F10 cells treated with NRP1 mAb. $n = 6 \bar{x} \pm s$
¹⁾ $P < 0.05$ ²⁾ $P < 0.01$, vs controls

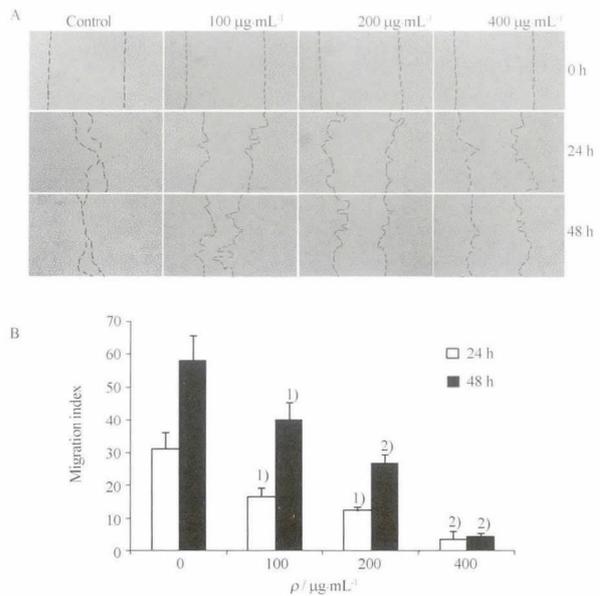


图4 划痕实验分析B16F10细胞的迁移形态(A, $\times 200$)和迁移率(B)情况。 $n = 6 \bar{x} \pm s$
与对照组相比, ¹⁾ $P < 0.05$ ²⁾ $P < 0.01$

Fig. 4 The migratory morphological changes (A, $\times 200$) and migratory index (B) of B16F10 cells detected by the scratch test. $n = 6 \bar{x} \pm s$
¹⁾ $P < 0.05$ ²⁾ $P < 0.01$, vs controls

2.5 不同NRP1 mAb浓度对B16F10细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测结果显示,48 h不同浓度的NRP1 mAb均明显促进B16F10细胞凋亡,且主要集中在早期凋亡,但在 $400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 质量浓度出现晚期凋亡和坏死细胞碎片增多,其凋亡数明显较100和 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 干预组增加($P < 0.05$),实验结果同MTT结果符合(图5A,表1)。Hoechst 33258细胞核染色结果显示,NRP1 mAb质量浓度为 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ B16F10细胞可见染色质固缩、边集,常呈新月形,核膜皱褶,裂解;质量浓度为 $400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时细胞核碎裂成块状并致密浓染(图5B)。

2.6 NRP1 mAb对B16F10上p-Akt、p-ERK1/2、Bcl-2、Bax和caspase-3蛋白表达的影响

蛋白质印迹法结果显示,与对照组相比,在相同时间内,经不同浓度NRP1 mAb处理后的B16F10细胞中p-Akt、p-ERK1/2、Bcl-2、Bax和caspase-3蛋白的表达存在差异性,随NRP1 mAb浓度增加p-Akt、p-ERK1/2和Bcl-2蛋白表达下调,Bax蛋白表达上调,同时caspase-3的剪切条带增加,而 β -actin的表达无明显变化(图6)。

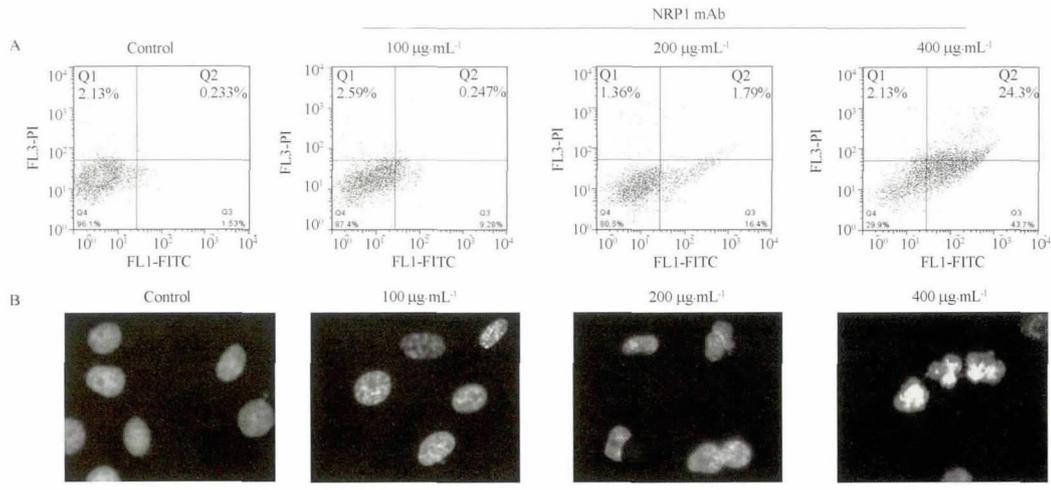


图5 流式细胞术和核荧光染色检测 B16F10 细胞凋亡(A)和核形态变化(B, ×400)情况

Fig. 5 Morphological and apoptotic index changes of B16F10 cells by flow cytometry analysis(A) and nuclear fluorescent staining (B, ×400)

表1 NRP1 MAb 作用后细胞凋亡率及相关性分析. % $n=3 \bar{x} \pm s$

Tab. 1 The percentage of cell apoptosis of B16F10 treated with NRP-1 mAb and the correlation analysis. % $n=3 \bar{x} \pm s$

Groups	Control	100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	<i>r</i>
Early apoptosis(Q3)	1.54 ± 1.35	13.63 ± 1.84 ²⁾	17.00 ± 2.65 ²⁾	38.93 ± 4.15 ²⁾	0.975 ²⁾
Late apoptosis(Q4)	0.23 ± 0.20	3.50 ± 0.42	7.12 ± 5.57 ¹⁾	23.60 ± 0.60 ²⁾	0.939 ²⁾

注: 与对照组相比, ¹⁾ $P < 0.05$ ²⁾ $P < 0.01$

Note: ¹⁾ $P < 0.05$ ²⁾ $P < 0.01$, vs controls

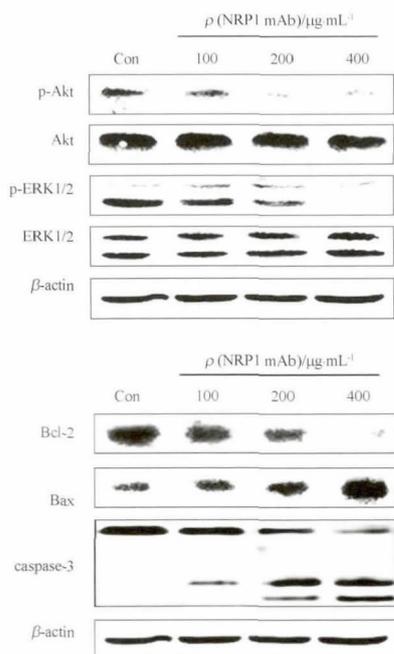


图6 Western blot 检测 p-Akt、p-ERK1/2、Bcl-2、Bax 和 caspase-3 蛋白表达情况

Fig. 6 Expression of p-Akt, p-ERK1/2, Bcl-2, Bax and caspase-3 protein detected by Western blot

3 讨论

本实验主要考察抗体的抗肿瘤活性, 研究抗体对黑色素瘤 B16F10 细胞增殖、迁移和凋亡等的影响, 并探讨相关机制。NRP1 作为 VEGF、Sema、EGF、PDGF、FN 等的共受体与这些细胞因子的受体共同参与肿瘤的发生、生长和转移^[3, 5]。文献报道, 通过 siRNA 干扰 NRP1 的表达, 可以抑制黑色素瘤细胞的生长和迁移^[11]。前期实验通过克隆筛选出一株活性稳定、特异性强的单克隆抗体, 该抗体性质为 IgG^[15], 同时发现抗体可以抑制胶质瘤细胞 U87、U251 和乳腺癌 MCF7 等细胞的增殖、迁移和黏附等活性。

研究表明, 纯化的 NRP-1 mAb 具备较高纯度, 且能特异性结合 NRP-1 b1b2 蛋白并具有较高的亲和力, 在黑色素瘤细胞以及黑色素瘤组织中具有较好的靶向性, 因而该抗体的抗黑色素瘤作用值得研究。在这基础上, 探讨了 NRP1 mAb 对黑色素瘤细胞 B16F10 增殖、迁移和凋亡的影响, 结果表明, NRP1 mAb 能有效杀伤 B16F10 细胞, 抑制其增殖、迁移和凋亡, 作用效果呈浓度和时间依赖性。同时, 我们利用蛋白质印迹法研究 NRP1 mAb 的作用原

理 结果表明 ,NRP1 mAb 处理 B16F10 细胞后 ,细胞内 Akt 和 ERK1/2 磷酸化降低、Bcl-2 蛋白表达下调 而 Bax 蛋白表达上调 ,同时 caspase-3 的剪切条带增加(图 6) 。

根据实验结果推测其可能作用机制 ,NRP-1 MAb 与 NRP-1 结合 ,占据了 NRP1 与其共受体(如 VEGFR ,TGFR ,PDGFR 等) 的结合位点 ,抑制 NRP1 与其共受体的结合 ,从而抑制了 PI3K 和 MEK1/2 的磷酸化。这直接导致 Akt 和 ERK1/2 的磷酸化受到抑制 ,Akt 和 ERK1/2 的磷酸化受到抑制一方面会影响某些转录因子的活性 ,使得这些转录因子调节各自靶基因的转录受到影响 ,引起特定蛋白的表达或活性改变 ,最终影响细胞代谢和功能 ,从而影响细胞的生长和迁移。另一方面它们无法激活下游前凋亡蛋白 BAD ,促凋亡蛋白 Bax 与抗凋亡活性蛋白 Bcl-2 等表达平衡被打破 ,Bcl-2 表达下降 ,其磷酸化又受到抑制 ,而增多的 Bax 进一步启动下游的 caspase 级联反应 ,促进细胞凋亡的发生。

综上所述 ,NRP1 mAb 能有效抑制黑色素瘤细胞 B16F10 增殖和转移并诱导凋亡 ,其可能通过 PI3K /Akt ,MEK/ERK1/2 以及 Bcl-2/Bax/caspase-3 途径抑制细胞增殖和迁移并诱导细胞凋亡。然而 ,作为多种细胞因子的共受体参与细胞内的信号传导 ,NRP1 在黑色素瘤细胞中主要通过何种细胞因子的信号传导途径影响细胞的生长和迁移 ,尚有待进一步实验研究证明。

REFERENCES

[1] LÜ J J ,TAO X J. The progress on treatment of malignant melanoma [J]. *China Cancer* (中国肿瘤) ,2012 ,21(8) : 606-610.
[2] KLAGSBRUN M ,TAKASHIMA S ,MAMLUK R. The role of

neuropilin in vascular and tumor biology [J]. *Adv Exp Med Biol* ,2002 ,515: 33-48.
[3] SOKER S ,MIAO H Q ,NOMI M ,et al. VEGF165 Mediates formation of complexes containing VEGFR-2 and neuropilin-1 that enhance VEGF165-receptor binding [J]. *Cell Biochem* ,2002 ,85(2) : 357-368.
[4] BECKER P M ,WALTENBERGER J ,YACHECHKO R ,et al. Neuropilin-1 regulates vascular endothelial growth factor-mediated endothelial permeability [J]. *Circ Res* ,2005 ,96(12) : 1257-1265.
[5] KITSUKAWA T ,SHINIZU M ,SANBO M ,et al. Neuropilin-semaphorin III/D-mediated chemorepulsive signals play a crucial role in peripheral nerve projection in mice [J]. *Neuron* ,1997 ,19(5) : 995-1005.
[6] BAGRI A ,TESSIER-LAVIGNE M ,WATTS R J. Neuropilins in tumor biology [J]. *Clin Cancer Res* ,2009 ,15(6) : 1860-1864.
[7] GUTTMANN-RAVIV N ,KESSLER O ,SHRAGA-HELED N ,et al. The neuropilins and their role in tumorigenesis and tumor progression [J]. *Cancer Lett* ,2006 ,231(1) : 1-11.
[8] BIELENBERG D R ,PETTAWAY C A ,TAKASHIMA S ,et al. Neuropilins in neoplasms: Expression , regulation , and function [J]. *Exp Cell Res* ,2006 ,312(5) : 584-593.
[9] BAGCI T ,WU J K ,PFANNL R ,et al. Autocrine semaphorin 3A signaling promotes glioblastoma dispersal [J]. *Oncogene* ,2009 ,28(40) : 3537-3550.
[10] CAO Y ,WANG L ,NANDY D ,et al. Neuropilin-1 upholds differentiation and propagation phenotypes of renal cell carcinoma cells by activating Akt and sonic hedgehog axes [J]. *Cancer Res* ,2008 ,68(21) : 8667-8672.
[11] MAZUREK A M ,OLBRYT M. The influence of neuropilin-1 silencing on semaphorin 3A and 3C activity in B16(F10) murine melanoma cells [J]. *Neoplasia* ,2011 ,10(1) : 4149-4157.
[12] PEI X K ,CAI M ,ZHOU H M ,et al. Effect of Neuropilin-1 in proliferation of mice melanoma cells [J]. *Mod Oncol* (现代肿瘤医学) ,2010 ,18(2) : 233-235.
[13] BECK B ,DRIESENS G ,GOOSSENS S ,et al. A vascular niche and a VEGF-NRP1 loop regulate the initiation and stemness of skin tumours [J]. *Nature* ,2011 ,478(7369) : 399-403.
[14] NI E R ,ZENG F W ,WANG S Y ,et al. Characterization and application of monoclonal antibodies against human NRP1 [J]. *Immunol J* (免疫学杂志) ,2012 ,28(8) : 651-655.
[15] LI X ,LUO F H ,WANG S Y ,et al. Monoclonal antibody against NRP1 b1b2 [J]. *Hybridoma* ,2011 ,30(4) : 369-373.
(收稿日期: 2014-02-21)