

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 24520121153228

UDC_____

廈門大學

硕士学位论文

Neuropilin-1 在肝癌中的表达及其单克隆抗体对肝癌生长抑制作用的初步研究

**Preliminary Studies of Neuropilin-1 Expression on HCC and
Inhibitive Effect of Anti-NRP-1 Monoclonal Antibody on
HCC Growth**

张亚飞

指导教师: 苏新辉 教授

专业名称: 影像医学与核医学

论文提交日期: 2015年 5月

论文答辩时间: 2015年 5月

学位授予日期: 2015年 6月

答辩委员会主席: _____

评阅人: _____

2015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

肝癌是最常见的恶性肿瘤之一，男性与女性中肝癌诊断率分别为世界第五和第七，男性及女性肝癌相关死亡率在癌症相关死亡中分别居第二和第六。肝细胞癌占有所有肝癌的 70%-85%，其诊断和治疗取决于多方面因素——肿瘤的大小，范围，全身和肝功能情况。早期确诊的肝癌患者，才有可能接受肝脏切除或移植等治疗。然而仅有 10%-30%的肝细胞癌患者适合根治性治疗，大多数肝细胞癌患者，确诊时已经处于中晚期，无法行根治性治疗，且预后较差。而传统的介入治疗、放化疗存在抗肿瘤效果较差、副作用大等缺点。分子靶向治疗有着良好的肿瘤靶向性，毒副作用也较低，为肝细胞癌治疗提供了新的治疗手段及研究方向；因此，寻找新的药物靶标，开发新的抗肝细胞癌药物具有深远意义。Neuropilin-1 (NRP-1) 是 Semaphorin 3A、血管内皮生长因子 (VEGF) 及多种细胞因子的共受体，参与肿瘤血管新生，肿瘤细胞存活、增殖、侵袭及转移。它在多种肿瘤细胞及组织中高表达，并与多种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。为了发展靶向 NRP-1 的药物，我们实验室前期通过杂交瘤技术制备了一株靶向 NRP-1 的功能性单克隆抗体(NRP-1 mAb, A6)，本文主要研究 NRP-1 与肝细胞癌恶性程度的相关性及其抗 NRP-1 抗体对抗肿瘤的活性。

实验方法

首先通过 PCR 检测肝癌细胞 Bel-7402, HepG2, SMMC-7721 中 mRNA 表达量，然后通过流式细胞术、Western blotting 观察抗体与肝癌细胞的结合能力及 NRP-1 的蛋白表达量；免疫荧光及细胞化学染色检测 NRP-1 mAb 的特异性及在细胞表面的定位；免疫组化观察抗体在肿瘤组织中的定位及 NRP-1 在不同病理学分级肿瘤中表达情况的不同；细胞抑制实验 (MTT) 和集落形成抑制试验检测 NRP-1 mAb 对肝癌细胞株增殖的影响；流式细胞术检测 NRP-1 mAb 对肝癌细胞株凋亡的影响；对荷瘤裸鼠进行 NRP-1 mAb 治疗，验证其活体内抗肿瘤活性；

并通过免疫组化观察治疗后肿瘤内 NRP-1 和 VEGF 的表达以及微血管密度的变化；¹³¹I 标记的 NRP-1 mAb 在荷瘤裸鼠中的显像检测 NRP-1 mAb 在肿瘤中的靶向性及特异性。

实验结果

NRP-1 在不同肝癌细胞株中表达量不同，抗体对肝癌细胞有较高的亲和力。免疫荧光及细胞化学染色实验结果显示抗体定位在细胞表面，免疫组化实验结果显示抗体能够特异性的定位在肝癌细胞上并与肝癌的病理学分级、临床分期等具有正相关性。细胞增殖实验、集落形成抑制试验表明 NRP-1 mAb 对肝细胞癌的生长、集落形成都有一定的抑制作用。细胞凋亡实验结果表明，抗体可诱导肝癌细胞凋亡。动物学实验发现，NRP-1 mAb 可以特异性定位于肿瘤位置，并可对肿瘤生长有明显的抑制作用。

结论

1. NRP-1 在肝癌细胞及组织中高表达，并与肿瘤的病理学分级有关，与肿瘤恶性程度相关。NRP-1 mAb 可与肝癌细胞及组织上 NRP-1 特异性结合。
2. NRP-1 mAb 可以抑制肝癌细胞增殖、集落形成并诱导凋亡，具有明显的抗肿瘤活性。NRP-1 mAb 是一个具有前景的抗肿瘤候选药物。
3. NRP-1 mAb 可以特异性定位于荷瘤鼠肿瘤部位并对肿瘤有一定的抑制作用。
4. NRP-1 mAb 治疗后的肿瘤，其 NRP-1、VEGF 的表达以及微血管密度均有减少。

关键词：Neuropilin-1；肝细胞癌；病理学分级；抗肿瘤药物

Abstract

Background

Liver cancer, one of the main malignant tumors, is harmful to human. Liver cancer in men is the fifth most frequently diagnosed cancer worldwide but the second most frequent cause of cancer death. In women, it is the seventh most commonly diagnosed cancer and the sixth leading cause of cancer death. Hepatocellular carcinoma (HCC) accounted for 70% of all the liver cancer, and the diagnosis and treatment of HCC depend on various factors. Only patients with early diagnosis of HCC could be beneficial to the treatment of resection or transplantation. Most HCC patients are not suitable for radical surgery for the late diagnosis, and the prognosis of HCC was unsatisfactory. Traditional therapy 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 HCC. The complexity of the HCC etiology and pathogenesis, lesion sites of different patients are also various, therefore, finding new targets and new drugs for HCC cancer is very important. Neuropilin-1 (NRP-1) is a non-tyrosine kinase receptor for Semaphorin 3A (Sema 3A) and vascular endothelial growth factor (VEGF) involved in tumor angiogenesis, growth and metastasis. NRP-1 is high expressed in multiple tumors including HCC, which is closely related to the tumor malignant degree and regarded as a promising target for cancer therapy. In present study, we investigated the expression of NRP-1 on HCC and the anti-tumor effects of anti-NRP-1 mAb on HCC.

Methods

Firstly, flow cytometry was used to observe combination ability of anti-NRP-1 mAb to Bel7402, HepG2, SMMC-7721 cells and the NRP-1 expression on these HCC cells, immunofluorescence and immunocytochemistry were used to observe the localization of anti-NRP-1mAb in the cells, immunohistochemistry was used to observe the localization of anti-NRP-1mAb in tumor tissues and relationship

between NRP-1 expression and the malignant degree of HCC. Then MTT was used to evaluate the inhibitory effect of NRP-1 mAb on proliferation. Cell morphology was observed by microscopy. Flow cytometry were used to observe cell apoptosis. ¹³¹I labeled NRP-1 mAb was used to detected the targeting and specificity of NRP-1 mAb in the tumor-burdened nude mice mode, and NRP-1 mAb was injected via the tail vein to explore its the curative effect. Immunohistochemical was conducted to obverse the NRP-1 and VEGF expressions as well as the change of MVD after treatment.

Results

Western blotting showed the bands of 130 KDa 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 HCC cell lines positively expressed NRP-1 on various levels. Immunofluorescence and immunocytochemical experiments results showed that the anti-NRP-1 mAb localized on the cell surface, immunohistochemical experiment results showed that the expression of NRP-1 was positively correlated with the tumor grading. MTT and colony forming assay showed that NRP-1 mAb have inhibitory effect on the HCC cell lines in dose-dependent method and time-dependent method. Flow cytometry showed that NRP-1 mAb led to apoptosis of HCC cell lines in dose-dependent method. Experiments on nude models proved the anti-NRP-1 mAb could be localization on the tumor in vivo and plays an important role on tumor treatment.

Conclusions

- (1) NRP-1 was overexpression on different HCC cell lines with different levels and NRP-1 mAb can bind to the NRP-1 expressed in the HCC cell lines, in addition, the NRP-1 expression was related to the tumor malignant degree.
- (2) NRP-1 mAb could be located in the tumor in vivo and has certain effect on tumor treatment.
- (3) NRP-1 mAb have inhibitory effect on the HCC cell lines in dose-dependent method and time-dependent method.

Keywords: Neuropilin-1; HCC; Pathology classification; Antineoplastic Agents

目录

摘要.....	I
Abstract.....	III
前言.....	1
一、肝癌概述	1
1 肝癌的发病原因及发病机制	2
1.1 肝癌的发病原因.....	2
1.2 肝癌的发病机制.....	2
2 肝癌的治疗	3
二、Neuropilin-1 概述	5
1 NRP-1 的结构及其异构体	5
2 NRP-1 在正常组织中的表达及功能	6
2.1 NRP-1 正常组织中的表达.....	6
2.2 NRP-1 与生长发育.....	6
2.3 NRP-1 与免疫调节.....	7
3 NRP-1 在肿瘤中的表达及作用	7
3.1 NRP-1 在肿瘤中的表达.....	7
3.2 NRP-1 与肿瘤的发生发展.....	8
3.3 NRP-1 表达与肿瘤进展的机制.....	9
4 NRP-1 的共受体	10
4.1 Plexin.....	10
4.2 VEGFR.....	11
4.3 TGFR.....	11
4.4 c-met.....	12
4.5 PDGFR.....	12
4.6 EFGR.....	12
4.7 Integrin.....	13
5 NRP-1 靶点治疗药物	13

5.1 单克隆抗体类.....	13
5.2 小分子肽类.....	14
5.3 可溶性 NRP-1 类.....	14
5.4 干扰 RNA 类.....	15
5.4 Semaphorins 类.....	15
三、NRP-1 在肝癌中研究进展.....	15
四、研究目的和内容.....	16
第一章 NRP-1 在肝癌细胞株及肝癌组织中的表达.....	18
一、材料和方法.....	18
1 材料.....	18
1.1 细胞株及组织.....	18
1.2 主要试剂及耗材.....	18
1.3 主要仪器及设备.....	19
1.4 主要溶液的配制.....	19
2 方法.....	24
2.1 肝癌细胞培养.....	24
2.2 细胞 mRNA 水平表达量.....	24
2.3 流式细胞术.....	27
2.4 Western blotting.....	28
2.5 细胞免疫化学染色.....	29
2.6 细胞免疫荧光染色.....	30
2.7 免疫组织化学染色 (IHC).....	31
二、结果与分析.....	32
1 细胞 mRNA 水平表达量.....	32
2 流式细胞术.....	33
3 Western blotting.....	34
4 细胞免疫化学染色.....	35
5 细胞免疫荧光染色.....	36
6 免疫组织化学染色.....	37
三、讨论.....	38
第二章 NRP-1 mAb 对肝癌细胞的生长抑制作用.....	40

一、材料和方法	40
1 材料	40
1.1 细胞株	40
1.2 主要试剂及耗材	40
1.3 主要仪器及设备	40
1.4 主要溶液的配制	41
2 方法	41
2.1 细胞计数	41
2.2 细胞生长抑制试验	42
2.3 集落形成抑制试验	42
2.4 流式细胞术检测细胞凋亡	43
2.5 统计学处理	44
二、结果与分析	44
1 抗 NRP-1 抗体抑制细胞增殖	44
1.1 普通显微镜法观察细胞形态变化	44
1.2 MTT 法	46
1.3 集落形成抑制试验	49
2 NRP-1mAb 促进细胞凋亡	51
三、讨论	53
第三章 NRP-1 mAb 对肝癌移植瘤的抑制作用	55
一、材料和方法	55
1 材料	55
1.1 细胞株及实验动物	55
1.2 主要试剂及耗材	55
1.3 主要仪器及设备	56
1.4 主要溶液的配制	56
2 方法	56
2.1 NRP-1mAb 的体内抗肿瘤活性	56
2.2 组织 mRNA 水平变化量	57
2.3 Western blotting	57
2.4 免疫组织化学染色	58

二、结果与分析	58
1 肿瘤的生长抑制作用	58
2 组织 mRNA 水平变化量	60
3 Western blotting	60
4 免疫组织化学染色	61
三、讨论	63
第四章 NRP-1 mAb 在肝癌中的靶向性	65
一、材料和方法	65
1 材料	65
1.1 细胞株及实验动物	65
1.2 主要试剂及耗材	65
1.3 主要仪器及设备	65
1.4 主要溶液的配制	65
2 方法	67
2.1 ¹³¹ I-A6-mAb 制备:	67
2.2 ¹³¹ I-A6-mAb 的免疫活性测定	67
2.3 ¹³¹ I-A6-mAb 荷肝癌移植瘤裸鼠生物学分布	68
2.4 ¹³¹ I-A6-mAb 荷肝癌移植瘤裸鼠 SPECT-CT 显像	68
二、结果与分析	69
1 ¹³¹ I-A6-mAb 的标记率	69
2 ¹³¹ I-A6-mAb 的放射性化学纯度	69
3 ¹³¹ I-A6-mAb 的免疫活性	70
4 ¹³¹ I-A6-mAb 的体内生物学分布	71
5 ¹³¹ I-A6-mAb 在荷瘤鼠体内 SPECT-CT 显像	72
三、讨论	73
结 论	75
本文存在的问题及今后应开展的研究	76
参考文献	77
致谢	90

Contents

Abstract (Chinese)	I
Abstract	III
Introduction	1
I. Hepatocellular carcinoma(HCC)	1
1. Etiology and pathogenesis of hepatocellular carcinoma	2
1.1 Pathogeny of hepatocellular carcinoma	2
1.2 Pathogenesis of hepatocellular carcinoma	2
2. Current treatment of hepatocellular carcinoma	3
II. Advanced research of Neuropilin-1	5
1. The structure of NRP-1	5
2. NRP-1 expression in normal tissue and function	6
2.1 NRP-1 epression in normal tissue	6
2.2 NRP-1 and embryonic development	6
2.3 NRP-1 and imunity.....	7
3. NRP-1 expression in tumor and function	7
3.1 NRP-1 expression in tumor	7
3.2 NRP-1 and tumor development.....	8
3.3 NRP-1 expression and tumor progression.....	9
4. The receptors of NRP-1	10
4.1 Plexin.....	10
4.2 VEGFR.....	11
4.3 TGFR.....	11
4.4 c-met.....	12
4.5 PDGFR	12
4.6 EGFR.....	12
4.7 Integrin	13
5. The molecule drugs drugs of NRP-1	13
5.1 Monoclonal antibody.....	13

5.2	Peptides	14
5.3	γ NRP-1	14
5.4	siRNA	15
5.5	Semaphorins	15
III.	The research of NRP-1 on HCC.....	16
IV.	The purpose and content of the research.....	18
Chapter I Neuropilin-1 expression on HCC cell lines and tissues.....		18
I.	Materials and methods.....	18
1	Materials	18
1.1	Cell lines and tissues	18
1.2	Main reagents and consumables.....	18
1.3	Main instruments and equipment	19
1.4	Main solution preparation	19
2	Methods.....	24
2.1	Hepatoma cells culture	24
2.2	mRNA expression in cells	24
2.3	Flow cytometry.....	27
2.4	Western blotting.....	28
2.5	Immunocytochemical staining	29
2.6	Immunofluorescence staining.....	30
2.7	Immunohistochemical staining.....	31
II.	Results and analyses	32
1	mRNA expression in cells	32
2	Flow cytometry	33
3	Western blotting	34
4	Immunocytochemical staining	35
5	Immunofluorescence staining	36
6	Immunohistochemical staining	37
III.	Discussion.....	38
Chapter II NRP-1 mAb inhibitive effect on HCC cell lines growth ...		40
I.	Materials and methods.....	40

1	Materials	40
1.1	Cell lines	40
1.2	Main reagents and consumables	40
1.3	Main instruments and equipment	40
1.4	Main solution preparation	41
2	Methods	41
2.1	Cell count	41
2.2	Cell growth inhibition test	42
2.3	Colony forming inhibition assay	42
2.4	Flow cytometry to detect cell apoptosis	43
2.5	Statistical processing	44
II.	Results and analyses	44
1	NRP-1 mAb inhibited cell proliferation	44
1.1	Morphological observation	44
1.2	MTT assay	46
1.3	Colony forming inhibition assay	49
2	NRP-1 mAb induced cell apoptosis	51
III.	Discussion	53
Chapter III NRP-1 mAb inhibitive effect on HCC xenograft		55
I.	Materials and methods	55
1	Materials	55
1.1	Cell lines	55
1.2	Main reagents and consumables	55
1.3	Main instruments and equipment	56
1.4	Main solution preparation	56
2	Methods	56
2.1	NRP-1mAb antineoplastic reactivity in vivo	56
2.2	NRP-1 mRNA expression in tissues	57
2.3	Western blotting	57
2.4	Immunohistochemical staining	58
II.	Results and analyses	58

1	Inhibitory effect on tumor development	58
2	NRP-1 mRNA expression in tissues	60
3	Western blotting	60
4	Immunohistochemical staining	61
III.	Discussion	63
Chapter IV NRP-1 mAb targeting in HCC		65
I.	Materials and methods	65
1	Materials	65
1.1	Cell lines and experimental animals	65
1.2	Main reagents and consumables	65
1.3	Main instruments and equipment	65
1.4	Main solution preparation	65
2	Methods	67
2.1	¹³¹ I-A6-mAb preparation	67
2.2	¹³¹ I-A6-mAb purification detection	67
2.3	¹³¹ I-A6-mAb biodistribution in HCC xenograft mice	68
2.4	¹³¹ I-A6-mAb SPECT-CT imagine in HCC xenograft mice	68
II.	Results and analyses	69
1	¹³¹ I-A6-mAb labelling rate	69
2	¹³¹ I-A6-mAb radio purification	69
3	¹³¹ I-A6-mAb immuno reactivity	70
4	¹³¹ I-A6-mAb biodistribution in vivo	71
5	¹³¹ I-A6-mAb SPECT-CT imagine in vivo	72
III.	Discussion	73
Conclusion		75
Existing problems and future development		76
References		77
Acknowledgments		90

前言

一、肝癌概述

肝癌是指发生于肝脏的恶性肿瘤，可分原发性及继发性两类。原发性肝脏恶性肿瘤简称肝癌，多源于肝脏细胞或肝内胆管上皮细胞，继发性肝癌指其他器官起源的恶性肿瘤侵犯至肝脏。原发性肝癌患者早期可无明显特异性症状，出现典型症状患者多已进入中晚期，常因肿瘤生长累及肝脏包膜表现为肝区胀痛，肝脏表面癌结节破裂可表现急腹症；肝脏体积增大，患者可出现黄疸症状，在肝硬化基础上发生的肝癌患者，可出现难治性腹水，甚至血性腹水。肝癌患者通常有进行性消瘦、发热、食欲不振、乏力、营养不良、恶病质等临床表现，终末期可出现肝性脑病等并发症，引起死亡。

肝癌是最常见的人类恶性肿瘤之一，发病率位居恶性肿瘤第五位，死亡率位居癌症相关死亡的第三位。发展中国家的肝癌发病率明显较发达国家高，而男性的患病率及死亡率远高于女性^[1, 2]。肝癌在我国的发病率位居恶性肿瘤的第二位。在中国，90%的肝癌患者具有乙型肝炎病毒（HBV）感染，而黄曲霉素、亚硝胺等均会可能引发肝癌。近年来，由于对乙肝感染的控制，发病率有下降趋势，但仍是危害人类健康的重要癌症之一。

肝癌可分为肝细胞肝癌（Hepatocellular carcinoma, HCC）、胆管细胞癌以及混合型肝癌，其中以肝细胞肝癌多见。起病隐匿，早期临床症状不明显，常继发于肝硬化或以转移灶为首发症状，临床易漏诊误诊，确诊时多已进入中晚期阶段。肝脏血供丰富，肝内癌细胞易侵犯门脉及分支形成癌栓，引发肝内转移；肝外转移常见血行转移至肺部。肝癌对放化疗均不敏感，常用的治疗方法包括根治性手术切除，肝移植，介入治疗，射频消融等。肝癌根治性切除术是目前最行之有效的方方法之一，但只有少数人适合根治性手术^[3]。由于缺乏特异的治疗方法，中晚期肝癌患者的预后很差，死亡率高。

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts 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.