

肿瘤防治研究

Cancer Research on Prevention and Treatment

NRP-1单克隆抗体对乳腺癌裸鼠移植瘤生长的影响

马超, 王卫星, 苏新辉, 陈国强, 苏福

引用本文:

马超, 王卫星, 苏新辉, 等. NRP-1单克隆抗体对乳腺癌裸鼠移植瘤生长的影响[J]. 肿瘤防治研究, 2019, 46(04): 311-315.

MA Chao, WANG Weixing, SU Xinhui, et al. Influence of NRP-1 Monoclonal Antibody on Growth of Breast Cancer Xenografts in Nude Mouse[J]. *Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu*, 2019, 46(04): 311-315.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2019.18.1235>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

携带人端粒酶反转录酶启动子的溶瘤腺病毒RCA-TERT-Ad35对乳腺癌干细胞的靶向作用

Oncolytic Adenovirus RCA-TERT-Ad35 Carrying Human Telomerase Reverse Transcriptase Promoter Targets Breast Cancer Stem Cells
肿瘤防治研究. 2019, 46(11): 971-976 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2019.18.1987>

前列腺癌移植瘤近红外荧光成像最佳成像时间的实验

Best Imaging Time of Near-infrared Fluorescence Imaging for Prostate Cancer Xenografts
肿瘤防治研究. 2019, 46(06): 499-503 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2019.18.1900>

BCYRN1对乳腺癌细胞MCF7和小鼠移植瘤增殖和转移的影响

Influence of BCYRN1 on Proliferation and Migration of Breast Cancer Cell Line MCF7 and Tumor-bearing Mice
肿瘤防治研究. 2018, 45(4): 205-209 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2018.17.0691>

抑制乳腺癌患者自体CD3AK细胞PD-1的表达对杀伤MCF-7/adr细胞的影响

Improvement of Cytotoxicity of Autologous CD3AK Cells in Breast Cancer Patients to MCF-7/adr Cells by Suppressing PD-1 Expression
肿瘤防治研究. 2017, 44(9): 580-584 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2017.17.0154>

双氢青蒿素对人下咽癌裸鼠移植瘤的抑制作用

Antitumor Effect of Dihydroartemisinin on Hypopharyngeal Cancer in Nude Mice with Transplanted Tumor
肿瘤防治研究. 2017, 44(10): 647-651 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2017.17.0370>



杂志官网



微信公众号

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2019.18.1235

• 基础研究 •

NRP-1单克隆抗体对乳腺癌裸鼠移植瘤生长的影响

马超, 王卫星, 苏新辉, 陈国强, 苏福

Influence of NRP-1 Monoclonal Antibody on Growth of Breast Cancer Xenografts in Nude Mouse

MA Chao, WANG Weixing, SU Xinhui, CHEN Guoqiang, SU Fu

Department of Nuclear Medicine, Zhongshan Hospital Xiamen University, Xiamen 361004, China

Abstract: Objective To investigate the specificity of NRP-1 monoclonal antibody (NRP-1 MAb), and the antitumor effect of NRP-1 MAb at the different doses on nude mice bearing breast cancer xenografts. **Methods** The recognition of NRP-1 protein in MCF7 cells by NRP-1 MAb were detected by Western blot and confocal immunofluorescent analysis. BALB/c nude mice were adopted to establish a tumor-bearing model by inoculating subcutaneously MCF7 cells, and then the passage of tumor tissues was carried out. When the tumor grew to 300-500 mm³, the xenografts nude mice were randomly divided into control group, low-dose group, middle-dose group and high-dose group, 6 mice in each group, and 7 doses in full course by subcutaneous injection. Then we observed the general status, tumor size and body weight in the routine. When the trial ended, relevant tumors were striped and weighed, and then we extracted the protein. Western blot was performed to examine the expression of VEGF and NRP-1. **Results** NRP-1 MAb could bind the NRP-1 protein in MCF7 cells, and significantly inhibit the growth of breast cancer xenograft in nude mice. The corresponding inhibition ratio reached 47.01%, 65.70% and 69.19% in low-dose group, middle-dose group and high-dose group, respectively. **Conclusion** NRP-1 MAb could recognize and bind NRP-1 on the membrane of MCF7 cells and inhibit the growth of the transplanted tumor. The downregulation of VEGF and NRP-1 may play an active role in tumor growth inhibition.

Key words: NRP-1; VEGF; Breast cancer; Transplanted tumor in nude mice; Targeted drug

摘要: 目的 探讨NRP-1单克隆抗体(NRP-1 MAb)的特异性, 以及不同剂量的NRP-1 MAb治疗乳腺癌裸鼠移植瘤的疗效。**方法** Western blot和共聚焦免疫荧光法检测NRP-1 MAb是否识别MCF7细胞上NRP-1蛋白。将MCF7细胞接种于BALB/c裸鼠皮下建立乳腺癌细胞移植瘤模型, 并进行瘤组织传代。传代的肿瘤体积生长至300~500 mm³时, 随机分为对照组、NRP-1 MAb低剂量组、中剂量组和高剂量组, 每组6只, 给药7次。观察荷瘤裸鼠一般状况, 测量瘤体大小及裸鼠体重。实验结束时剥离瘤体称重, 提取组织蛋白, Western blot检测组织中VEGF蛋白和NRP-1蛋白的表达量。**结果** NRP-1 MAb成功识别MCF7细胞上的NRP-1蛋白; NRP-1 MAb能够有效抑制MCF7细胞裸鼠移植瘤的生长, 低剂量组(1 mg/kg)抑瘤率为47.01%, 中剂量组(5 mg/kg)抑瘤率为65.70%, 高剂量组(10 mg/kg)抑瘤率为69.19%。**结论** NRP-1 MAb能够识别并有效结合MCF7细胞膜上的NRP-1蛋白, 且可抑制MCF7细胞移植瘤的生长, NRP-1 MAb抑制移植瘤的增长可能与下调NRP-1和VEGF表达有关。

关键词: NRP-1; 血管内皮生长因子; 乳腺癌; 裸鼠移植瘤; 靶向药物

中图分类号: R737.9

文献标识码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



0 引言

乳腺癌被列为全球第二大最常见的癌症, 是

严重威胁女性健康的恶性肿瘤之一^[1]。全世界每年约新增150万乳腺癌患者, 同时有50余万女性死于该病^[2]。目前, 乳腺癌的治疗提倡手术、放疗、内分泌及分子靶向治疗相结合的综合治疗措施, 治疗水平较以往有了很大的提高, 但是整体临床疗效仍不能让人满意, 特别是晚期乳腺癌疗效依然较差。治疗失败的原因主要有原发肿瘤转移、

收稿日期: 2018-08-29; 修回日期: 2018-12-29

作者单位: 361004 厦门, 厦门大学附属中山医院核医学科

作者简介: 马超(1987-), 男, 硕士, 主治医师, 主要从事肿瘤靶向分子探针的研究

治疗后复发和耐药, 其中较早发生血行转移是主要因素^[3]。因此, 探寻治疗乳腺癌的新靶点, 提高其疗效是仍然是亟待解决的临床难题。

Soker等发现神经纤毛蛋白-1 (neuropilin-1, NRP-1) 与血管生成存在关系, 是血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的新型受体, 在血管内皮细胞增殖和迁徙过程中有促进作用^[4]。近来也有大量研究表明, NRP-1在血管生成方面起着重要作用, 可能为抗血管生成治疗提供潜在的靶点。NRP-1在乳腺癌中高表达, 而且可作为乳腺癌的独立预后因素^[5]。已有研究通过沉默或过表达NRP-1观察乳腺癌细胞在细胞增殖、侵袭、转移和凋亡等生物学行为方面的变化, 但是关于NRP-1单克隆抗体 (NRP-1 monoclonal antibody, NRP-1 MAb) 治疗乳腺癌裸鼠移植瘤的研究国内外尚未见报道。

本研究将从细胞水平检测NRP-1 MAb是否能有效识别乳腺癌MCF7细胞上的NRP-1蛋白, 并从动物水平观察NRP-1 MAb对乳腺癌MCF7细胞移植瘤生长的影响, 从分子水平检测肿瘤组织中VEGF、NRP-1的表达情况, 分析潜在机制, 从而为NRP-1单克隆抗体靶向药物的研究提供数据基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂、材料

RPMI1640培养基、胎牛血清为GIBCO公司产品 (美国), Hoechst染色试剂盒为上海碧云天生物技术有限公司产品 (中国), 羊抗鼠IgG-TRITC罗丹明 (Tetramethylrhodamine, TRITC) 荧光标记二抗为Sigma公司产品 (美国), VEGF抗体为Abcam公司产品 (美国), 蛋白Marker/预染蛋白Marker、PVDF膜为Fermentas公司产品 (美国), 增强化学发光 (Enhanced chemiluminescence, ECL) 试剂盒为鹭隆公司产品 (中国)。NRP-1单克隆抗体为厦门大学抗癌研究中心颜江华教授课题组馈赠^[6]。

1.2 实验动物、细胞株

6~8周龄SPF级雌性BALB/C裸鼠, 由厦门大学动物实验动物中心提供。乳腺癌MCF7细胞, 为本实验室保存的细胞株。

1.3 细胞培养

乳腺癌MCF7细胞常规培养 (在含10%胎牛血清的RPMI1640培养液, 37℃、5%CO₂饱和湿度的培养箱中培养), 每2~3 d传代, 取对数生长期细

胞用于后续实验。

1.4 抗体特异性的鉴定

为了鉴定抗体的特异性, 实验设有空白对照组 (Blank control, BC), 阴性对照组 (Negative control, NC)。收集各组细胞, 提取总蛋白, 进行蛋白免疫印记 (Western blot) 检测。即经SDS-PAGE电泳后将蛋白转到PVDF膜上, 5%脱脂奶粉封闭膜后加入稀释的NRP-1 MAb (1:1 000), 4℃反应过夜后取出用膜洗涤液 (TBST) 洗涤3次, 加入HRP酶标二抗 (1:8 000) 室温反应1 h, 洗涤5次, 加入化学发光液反应, 在凝胶成像仪成像。

将MCF7接种于盖玻片贴壁生长, 当细胞长至80%左右, 用4℃预冷的磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤3次; 加入Hoechst染色试剂盒的固定液0.5 ml, 4℃固定30 min; 弃掉固定液, PBS洗3遍, 3 min每次。甩干, 加入1:200稀释的NRP-1抗体, 37℃孵育1 h, 弃掉一抗溶液, PBS洗3遍, 3 min每次; 在细胞片上加1:50稀释的羊抗鼠IgG-TRITC荧光标记二抗, 37℃避光孵育1 h, 弃掉荧光二抗, PBS洗3遍, 3 min每次; 加入0.5 ml Hoechst染色液, 于摇床上晃动, 室温染色5 min, 弃掉染色液, 用PBS洗涤3遍。甩干, 滴1滴抗荧光淬灭封片液于载玻片上, 盖上贴有细胞的玻片, 尽量避免气泡; 共聚焦扫描显微镜下观察, 其中Hoechst激发波长在350 nm左右, 发射波长在460 nm左右; 而TRITC最大吸引光波长为550 nm, 最大发射光波长为620 nm。

1.5 裸鼠移植瘤模型的建立

取对数生长期的乳腺癌MCF7细胞, 0.25%胰酶消化后加入含血清培养基中和胰酶, 吹打成单细胞悬液。用PBS离心洗涤3次, 弃上清液, 细胞沉淀用PBS制成 1×10^7 个/毫升单细胞悬液, 以每只0.2 ml注入裸鼠右前腋下。接种后隔天观察1次小鼠, 记录皮下接种点的成瘤情况。当皮下成瘤并生长至约800 mm³时开始传代, 剥离瘤块剪切成均匀的小块 (2 mm×2 mm×2 mm), 移植到30~35只裸鼠右前腋部皮下。

1.6 分组及用药

当小鼠移植瘤瘤体长至约100 mm³将荷瘤裸鼠按随机数字表法分为4组, 每组6只。对照组 (PBS组) 腹部皮下注射PBS, 0.2 ml, 2次/周; NRP-1 MAb低剂量组腹部皮下注射NRP-1 MAb, 1 mg/kg, 2次/周; NRP-1 MAb中剂量组腹部皮下注射NRP-1 MAb, 5 mg/kg, 2次/周; NRP-1 MAb高剂量组腹部皮下注射NRP-1 MAb, 10 mg/kg,

2次/周。以上各组均于瘤组织移植接种后第3天开始给药,共给药7次。

1.7 肿瘤重量、体积测量及抑瘤率

模型分组给药后,每天观察裸鼠的一般情况并记录:精神状态、食欲、体重等。隔5天测一次肿瘤长径(a)、短径(b)和小鼠体重。于治疗后第33天脱颈处死,剥离完整肿瘤,称重,投入液氮中保存、备用。用Steel公式计算肿瘤体积(V)。V = a×b²/2。抑瘤率(Tumor Growth Inhibition, TGI) (%) = (Cx-Tx)/Cx×100% (Cx为给药结束后PBS组测量的平均肿瘤体积, Tx为给药结束后各治疗组测量的平均肿瘤体积)。根据测量数据绘制治疗后肿瘤质量的变化,以及实验进程中小鼠体重变化等图表。

1.8 Western blot检测相关蛋白的表达

肿瘤组织研磨破碎,加蛋白裂解液,提取总蛋白,BCA法测定蛋白浓度。将等量蛋白样品点于SDS-聚丙烯酰胺凝胶小孔进行电泳。电泳后进行转膜,将转好的PVDF膜用TBST洗涤后、浸没于封闭液封闭,然后根据预染Marker所指示大小,将内参条带(GAPDH)和目的条带(VEGF、NRP-1)剪开,分别加入对应的一抗,4℃孵育过夜,TBST洗涤3次,加入相应的二抗孵育30 min,洗涤数次,滴加ECL显影剂,通过设备曝光显影观察蛋白条带。

1.9 统计学方法

使用SPSS19.0统计分析软件对原始数据进行统计分析,最终结果数据用样本均数t检验分析,P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NRP-1单克隆抗体的特异性

Western blot方法检测抗体特异性结果显示

NRP-1 MAb能够与线性NRP-1蛋白结合,无明显杂带,见图1A。说明抗体特异性良好,且能应用于后续实验,即采用Western blot方法检测肿瘤细胞PD-L1蛋白的表达量。

NRP-1 MAb孵育的乳腺癌细胞MCF7后经免疫荧光染色,使用荧光共聚焦显微镜观察结果。当使用550 nm做激发光,检测TRITC的荧光时,对照组的细胞检测不到红色荧光,而经NRP-1 MAb(标记有TRITC荧光)处理的细胞可以看到清晰的红色荧光;当使用350 nm做激发光,检测Hoechst的荧光时,可见细胞核带有蓝色荧光,且未对细胞核的形态造成损伤;将2个图像融合,融合图像显示未加抗体的细胞膜未出现红色荧光,而加入NRP-1 MAb的有红色荧光,且主要呈现在细胞膜上,见图1B。结果表明,NRP-1 MAb能够有效识别乳腺癌细胞MCF7上天然的NRP-1蛋白,且主要定位在细胞膜上。

2.2 各组裸鼠体重及肿瘤体积、重量的变化

实验进程中,各组荷瘤小鼠生长状况良好,饮食规律,排泄无异常,无意外伤害及死亡,成瘤率100%。肿瘤体积从给药后第3天开始测量,根据各个时间点的测量结果绘制肿瘤生长曲线。数据显示从第13天开始实验组的肿瘤体积明显要小于对照组(P=0.00018),不同NRP-1 MAb剂量给药组的抑瘤率随着给药剂量的增加而增高。NRP-1 MAb低剂量组(1 mg/kg)抑瘤率为47.01%,NRP-1 MAb中剂量组(5 mg/kg)抑瘤率为65.70%,NRP-1 MAb高剂量组(10 mg/kg)抑瘤率为69.19%,见图2。肿瘤的生长依赖于新生血管提供养分,而NRP-1在肿瘤血管生成中充当重要角色。NRP-1 MAb理论上可通过阻断NRP-1与其受体结合,抑制肿瘤血管生成,进而影响肿瘤的增长速度。实验结果显示与该推断一致。给

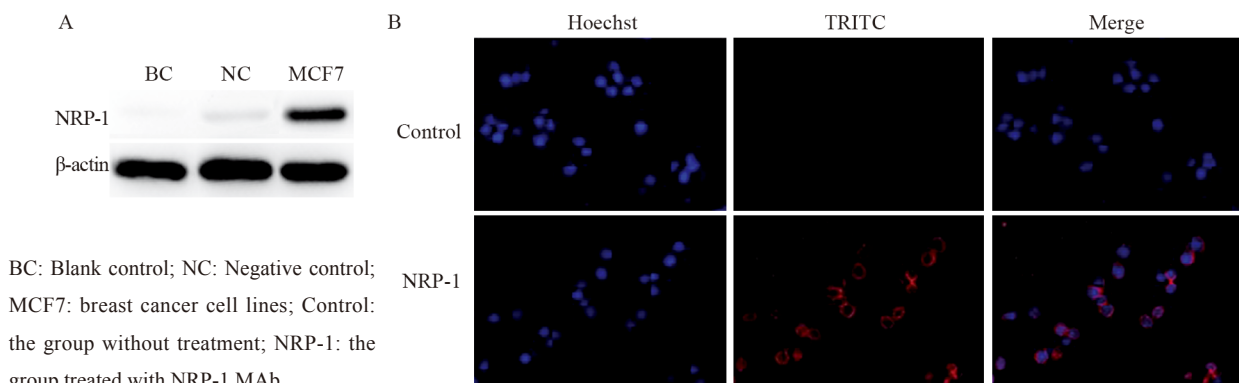


图1 Western blot法(A)和共聚焦免疫荧光法(B)分析NRP-1 MAb的特异性

Figure1 Specificity of NRP-1 MAb in MCF7 cells analyzed by Western blot(A) and Confocal immunofluorescent analysis(B)

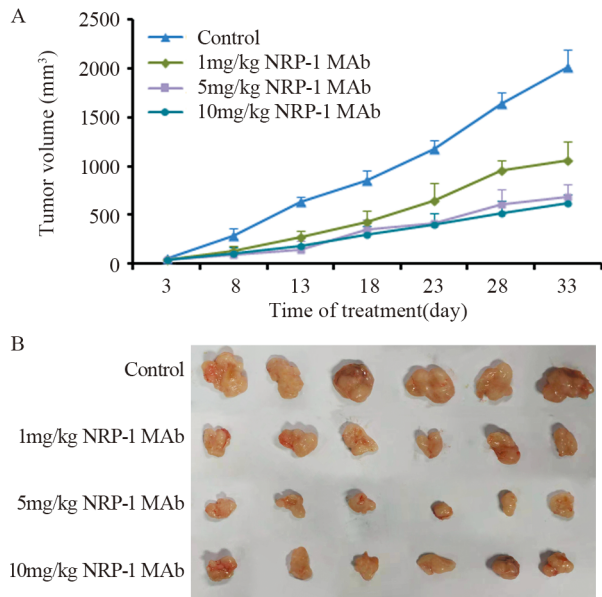
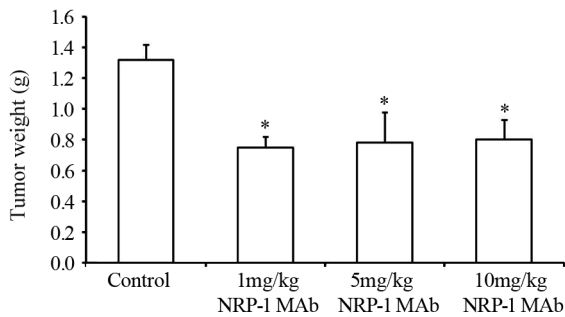


图2 治疗后各组裸鼠肿瘤的生长曲线(A)及大小(B)
Figure2 Growth curves(A) and size(B) of tumors in nude mice after treatment

药治疗33天后，剥离肿瘤组织称重，实验组的肿瘤明显小于对照组（高中低组相应的P值为：0.029、0.025、0.016），见图3。随着荷瘤小鼠给药进程，小鼠体重增长差异不大，无体重骤减现象，见图4。说明NRP-1 MAb用药对荷瘤小鼠毒副作用小。



*: $P < 0.05$, compared with control group

图3 治疗后各组裸鼠瘤体平均瘤重
Figure3 Mean weight of tumors in nude mice after treatment

2.3 肿瘤组织中VEGF和NRP-1蛋白的表达

Western blot法分析各组中NRP-1和VEGF的表达。以GAPDH为内参蛋白进行调平，结果显示对照组肿瘤组织中NRP-1和VEGF均有表达，不同剂量用药组NRP-1和VEGF的表达则呈现递减趋势，见图5。

3 讨论

我国乳腺癌的发病率逐年上升，且具有年轻

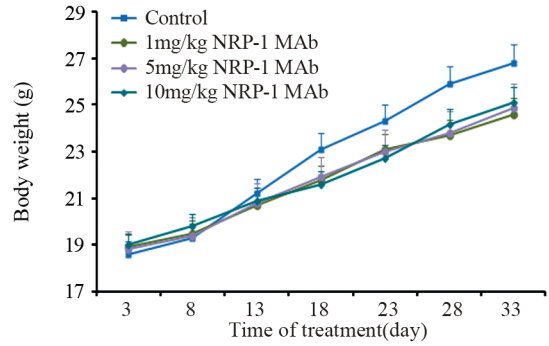


图4 治疗后各组裸鼠体重变化情况
Figure4 Change of body weight of nude mice after treatment

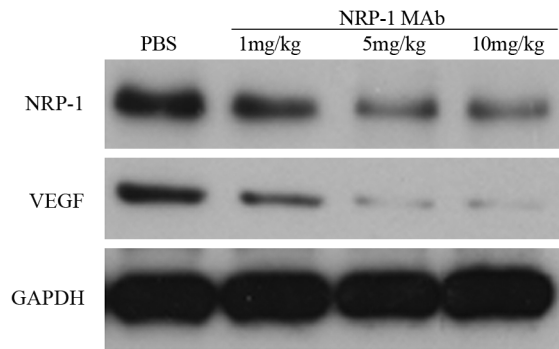


图5 Western blot检测各组肿瘤组织中NRP-1和VEGF的表达
Figure5 Expression of VEGF and NRP-1 in tumors of each group detected by Western blot

化的趋势。近年来，NRP-1如何参与肿瘤的发生发展过程已成为研究热点。在乳腺癌的研究中显示，恶性、癌前病变的乳腺样本中肿瘤脉管系统和肿瘤细胞表达有NRP-1蛋白，显示NRP-1可能和乳腺癌生长和进展有关^[7]。

NRP-1作为VEGFR-2的共受体可增强VEGF165与VEGFR-2的结合，增加VEGFR2的蛋白磷酸化程度，负责诱导内皮细胞趋化作用，促进肿瘤血管生成^[8]。而且，NRP-1还能够以不依赖VEGF的方式，通过与酪氨酸激酶ABL1形成复合物，重塑肌动蛋白，诱导血管新生^[9]。Bachelder等^[10]发现恶性乳腺癌细胞中激活VEGF诱导的PI3K信号转导通路的作用是非常重要的。在NRP-1阳性、VEGFR2阴性的乳腺癌细胞株中，VEGF165通过激活PI3k激酶通路阻止凋亡，并与NRP-1的水平 and 细胞生存直接相关^[11]。另外，在介导乳腺癌迁移和转移中NRP-1也起了重要作用。这些研究共同提示了抗NRP-1可能为靶向治疗乳腺癌提供新的途径。

传统化疗药物旨在短时间内最大程度杀伤肿瘤细胞，诱导肿瘤细胞凋亡，但较长的化疗间歇使得受损的肿瘤血管系统得以重建，不能带来持

久疗效，且不良反应大，常伴有肿瘤耐药。靶向治疗作为据手术、放疗、化疗三大传统治疗手段之外的一种全新的治疗方法，特异性强、不良反应小，能够改善化疗药的弊端。以NRP-1为靶点的分子靶向治疗研究，在结肠癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌等瘤种的体内外实验中体现出较好的抗肿瘤疗效^[12]。

本研究在细胞水平上，通过Western blot和共聚焦免疫荧光法检测NRP-1 MAb的特异性，结果显示其可有效结合乳腺癌细胞MCF7上的NRP-1蛋白。NRP-1在肿瘤生长、发展中参与血管新生、肿瘤细胞侵袭等过程，本研究在动物水平上，探讨了NRP-1 MAb以不同剂量治疗乳腺癌细胞裸鼠移植瘤，不同NRP-1 MAb剂量给药组的抑瘤率随着给药剂量的增加而增高。为了进一步阐释疗效的潜在机制，本研究在分子水平上，初步检测了肿瘤组织中的VEGF和NRP-1的表达情况，结果显示高剂量用药后肿瘤组织中VEGF和NRP-1表达量下调，证实NRP-1 MAb可通过下调VEGF和NRP-1表达，而抑制肿瘤的增长。但是荷瘤小鼠肿瘤生长抑制实验结果显示，中、高浓度抗体的抑瘤作用却没有低浓度显著，提示肿瘤发生发展是个综合复杂的过程，涉及多物质多通路的参与，NRP-1 MAb抑制肿瘤生长不是唯一途径，只是机体中的一种途径，后续研究可以考虑联合用药来提高抗体在实际应用中的有效性。综上，NRP-1 MAb可能通过结合NRP-1蛋白而下调VEGF和NRP-1的表达，从而减少肿瘤组织中血管的生成，发挥一定的抑制肿瘤增长的作用。

参考文献：

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015[J]. *Cancer J Clin*, 2015, 65(1): 5-29.
- [2] Lauby-Secretan B, Loomis D, Straif K. Breast-Cancer Screening-Viewpoint of the IARC Working Group[J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(15): 1479.

- [3] Jahagirdar D, Purohit S, Jain A, *et al.* Export of microRNAs: A Bridge between Breast Carcinoma and Their Neighboring Cells[J]. *Front Oncol*, 2016, 6: 147.
- [4] Soker S, Takashima S, Miao HQ, *et al.* Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor[J]. *Cell*, 1998, 92(6): 735-45.
- [5] Seifi-Alan M, Shams R, Bandehpour M, *et al.* Neuropilin-1 expression is associated with lymph node metastasis in breast cancer tissues[J]. *Cancer Manag Res*, 2018, 10: 1969-74.
- [6] Li X, Luo F, Wang S, *et al.* Monoclonal antibody against NRP-1 b1b2[J]. *Hybridoma (Larchmt)*, 2011, 30(4): 369-73.
- [7] Zhang L, Chen Y, Wang H, *et al.* miR-376a inhibits breast cancer cell progression by targeting neuropilin-1 NR[J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11(0): 5293-302.
- [8] Hu C, Zhu P, Xia Y, *et al.* Role of the NRP-1-mediated VEGFR2-independent pathway on radiation sensitivity of non-small cell lung cancer cells[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2018, 144(7): 1329-37.
- [9] Xu ZC, Shen HX, Chen C, *et al.* Neuropilin-1 promotes primary liver cancer progression by potentiating the activity of hepatic stellate cells[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(2): 2245-51.
- [10] Bachelder RE, Yoon SO, Franci C, *et al.* Glycogen synthase kinase-3 is an endogenous inhibitor of Snail transcription: implications for the epithelial-mesenchymal transition[J]. *J Cell Biol*, 2005, 168(1): 29-33.
- [11] Hein TW, Rosa RH Jr, Ren Y, *et al.* VEGF Receptor-2-Linked PI3K/Calpain/SIRT1 Activation Mediates Retinal Arteriolar Dilations to VEGF and Shear Stress[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015, 56(9): 5381-9.
- [12] Graziani G, Lacial PM. Neuropilin-1 as Therapeutic Target for Malignant Melanoma[J]. *Front Oncol*, 2015, 5: 125.

[编辑：周永红；校对：邱颖慧]

作者贡献：

- 马 超：抗体鉴定，Western blot等实验实施及论文撰写
 王卫星：参与细胞相关实验及论文撰写
 苏新辉、陈国强：共同参与实验设计、数据分析等工作
 苏 福：参与动物实验