学校编码：10384 分类号______ 密级______
学号：24520141153457 MDC______

厦门大学

硕 士 学 位 论 文

NRP-1 对乳腺癌细胞生物学特性的影响及其分子机制初步研究

The Effect of NRP-1 on Biological Characteristics of Breast Cancer Cells and Its mechanism

陈娜

指导教师姓名：颜江华 教授
专 业 名 称：微生物学
论文提交日期：2017 年 04 月
论文答辩时间：2017 年 05 月
学位授予日期：2017 年 月

答辩委员会主席：__________
评 阅 人：__________

2017 年 月

厦门大学博硕士论文摘要库

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

厦门大学博硕士论文摘要库

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

厦门大学博硕士论文摘要库

英文缩略词表

英文缩写	英文全称	中文全称
AKT	Protein Kinase B	丝氨酸/苏氨酸激酶
mAb	monoclonal antibody	单克隆抗体
ELISA	Enzyme-Linked Immμnosorbent Assay	酶联免疫吸附试验
HER-2	Hμman epidermal growth factor receptor-2	表皮生长因子受体 2
HGF	Heparin growth factors	肝细胞生长因子
HLECs	Hμman Lymphatic endothelial cells	淋巴管内皮细胞
IgG	Immμnoglobμlin G	免疫球蛋白 G
IHC	Immμnohistochemistry	免疫组织化学
NRP-1	Neμropilin1	神经纤毛蛋白 1
OD	Optical Density	光密度
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase	磷脂酰肌醇 3-激酶
Real-time PCR	Real-time flμorescence qμantitative polymerase chain reaction	实时荧光定量聚合酶链式反应
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction	逆转录聚合酶链式反应
TGF-β	Transforming growth factor-β	转化生长因子-β
VEGF	Vascμlar Endothelial Growth Factor	血管内皮生成因子

厦门大学博硕士论文摘要库

摘 要

研究背景及目的

乳腺癌是女性恶性肿瘤之一，晚期患者生存时间较短，患者手术治疗后复发转移的风险日益增大。乳腺癌复发转移是一个多因素的复杂过程，癌细胞可以通过侵入血管以及淋巴管的途径实现转移。其中淋巴道转移是乳腺癌常见的转移方式，很多患者往往早期已经出现淋巴结转移现象。Neμropilin-1（NRP-1）与多种细胞因子的信号传递有关，在肿瘤增殖、粘附、转移、淋巴管及血管形成中发挥重要作用。它的表达直接影响多种肿瘤的恶性程度，目前 NRP-1 被认为是癌症的一个很有前景的潜在治疗靶点。但关于 NRP-1 对乳腺癌细胞的生物活性及其对乳腺癌新生淋巴管形成的作用尚不清楚。本文旨在以转移性乳腺癌 MDA-MB-231 为研究对象，通过 RNA 干扰及功能性单克隆抗体阻断方法抑制 NRP-1 功能，观察 NRP-1 对乳腺癌细胞生物活性及其对于淋巴管生成的影响，并通过检测分析 NRP-1 与 PI3K、AKT 相关信号分子的表达，阐明 NRP-1/PI3K/AKT 信号通路调控乳腺癌生物学特性的分子机制，为靶向 NRP-1 分子的肿瘤治疗提供新的思路和理论依据。

实验方法

1. 利用 NRP-1 的 b1b2 片段(NRP-1-b1b2)作为免疫原，免疫 4-6 周龄雌性 Balb/c 小鼠；构建、筛选稳定分泌 NRP-1-b1b2 的单克隆抗体的杂交瘤细胞株；杂交瘤细胞扩大培养，接种于 Balb/c 小鼠腹腔中；获得含有 NRP-1 mAb 的腹水，然后 rProtein A 亲和柱纯化单克隆抗体；SDS-PAGE 电泳检测 NRP-1 mAb 的纯度；间接 ELISA 鉴定活性；共聚焦荧光扫描显微镜观察 NRP-1mAb 在乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中的分布定位。
2. 运用 RNAi 技术，设计并合成 4 对寡核苷酸序列，其中 3 对为靶向 NRP-1 的特异性干扰序列，1 对为非特异性对照序列（non-target）；构建 PLV-NRP-1shRNA 重组质粒，以脂质体 Lipofectamine 2000 转染试剂将携带

厦门大学博硕士论文摘要库

NRP-1-shRNA 的质粒转染 MDA-MB-231 细胞。转染细胞后，用荧光显微镜观察转染效率，使用 BSD 药物进行初步筛选，并采用 Real-time PCR 以及 Western blot 方法检测 NRP-1 基因和蛋白表达情况，鉴定出稳转细胞株。

3．通过 NRP-1 mAb 及 RNAi 抑制乳腺癌中 NRP-1 的表达，采用 MTT 法检测各组 MDA-MB-231 细胞增殖，划痕实验检测各组细胞迁移能力和流式细胞术检测各组细胞凋亡情况。

4．分别收集 NRP-1 mAb 和 RNAi 组的 MDA-MB-231 细胞的培养上清，制备 HLECs 的条件培养基，或建立将 NRP-1 表达降低后的 MDA-MB-231 细胞与 HLECs 共培养系统，通过 CCK-8 法、小管形成实验、小室迁移及侵袭实验，观察 HLECs 增殖能力、体外小管形成能力和迁移侵袭能力。

5．在体内实验中，建立乳腺癌 MDA-MB-231 裸鼠移植瘤模型：各处理组乳腺癌细胞分别注射到裸鼠右腿根部皮下，形成实体瘤模型，观察 NRP-1RNAi 和 NRP-1 mAb 组对乳腺癌裸鼠移植瘤生长抑制的影响；qPCR、WB、IHC 检测 NRP-1 、VEGFR、PI3K、AKT 及其磷酸化水平；HE 染色形态学观察不同处理组之间组织血管密度的变化。

实验结果

1.实验结果显示本实验室制备的 NRP-1 单克隆抗体纯度和亲和力较高，共聚焦扫描实验结果显示抗体主要定位在乳腺癌细胞膜表面。

2.构建的 PLV-NRP-1RNAi 转染 MDA-MB-231 效率在 60%以上，经筛选鉴定获得两个干扰效果较佳的稳转细胞株：NRP-1shRNAi1#、NRP-1shRNAi1143#。

3.不同浓度的 NRP-1mAb 以及不同程度的 NRP-1 RNA 干扰表达后均能抑制乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的生长增殖和迁移，并促进其凋亡，且生长抑制作用呈剂量依赖性。

4. 结果显示在 MDA-MB-231 与 HLECs 共培养体系中，HLECs 的迁移侵袭均受到明显抑制。其中，24 以及 48h 条件培养基均能抑制淋巴管的迁移和侵袭，48h 抑制较为明显。在条件培养基处理 HLECs 体系中，结果显示，乳腺癌细胞中 NRP-1 的降低对 HLECs 增殖以及体外小管形成抑制效果尤为明显；小管形成实验中 8h 和 16h 后 HLECs 小管网状结构形成均受到抑制，16h 抑制效果较为明

厦门大学博硕士论文摘要库

显，且 NRP-1 在乳腺癌细胞中的抑制程度越大，HLECs 受到的抑制效果越明显。

5.体内实验发现，NRP-1RNAi 和 NRP-1mAb 乳腺癌细胞接种至裸鼠，观察到与对照组相比，各处理组移植瘤的抑瘤率明显增大 NRP-1mAb 200μg/ ml(高剂量组)达 45.23%，NRP-1RNAish1143#达 83.33%。

6.qPCR 和 WB 结果显示无论是在体外细胞水平，还是体内组织水平，NRP-1 表达量降低的同时，VEGFR、PI3K 和 AKT 的磷酸化水平的表达量随之下降。免疫组织化学染色显示 NRP-1 mAb 和 RNAi 组的 NRP-1、VEGFR，PI3K、AKT 及其蛋白磷酸化水平表达量较对照组均有明显下降。

结论

1. NRP-1RNAi 和 NRP-1mAb 两种处理方式均有显著抑制人转移性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖、迁移并促进其凋亡作用，说明 NRP-1 参与调控乳腺癌细胞的生物学行为，与乳腺癌的发生发展密切相关。

2. NRP-1RNAi 和 NRP-1mAb 两种处理方式下调乳腺癌细胞 NRP-1，能抑制 HLECs 的增殖、迁移、侵袭和体外小管形成。

3. 干扰 NRP-1 表达或 NRP-1mAb 处理抑制 NRP-1 功能，对乳腺癌移植瘤生长有一定的抑制作用，表明 NRP-1 参与调控体内乳腺癌生长。

4 NRP-1 的下调，伴随 PI3K/AKT 信号轴关键分子活性降低，表明 NRP-1 可以通过 PI3K/AKT 信号通路参与乳腺癌细胞生物学特性与淋巴管转移过程的调控。

关键词：乳腺癌；转移；NRP-1；生物学特性；HLECs

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Research backgroµnd and pµrpose:

Breast cancer is one of the female malignant tµmors, late patients with shorter sµrvival time, the risk of recµrrence and metastasis after treatment is increasing. Breast cancer recµrrence and metastasis is a complex process of mµltiple factors, cancer cells can penetrate the blood vessels and lymphatic approach to achieve metastasis. Among them, lymphatic metastasis is a common way of spread of breast cancer, many patients tend to have early lymph node metastasis phenomenon. Neµropilin-1 (NRP-1), which is involved in the signal transdµction of varioµs cytokines, plays an important role in tµmor proliferation, adhesion, metastasis, lymphatic vessels and angiogenesis. Its expression directly affects the degree of malignancy of varioµs tµmors, the cµrrent NRP-1 is considered a promising prospect of cancer treatment. However, the effect and mechanism of NRP-1 on the biological activity of breast cancer cells and its effect on neonatal lymphangiogenesis of breast cancer is not clear. This stµdy was condµcted to investigate the effect of NRP-1 on the biological activity of breast cancer cells and lymph angiogenesis by µsing RNA interference and fµnctional monoclonal antibody blocking method, which inhibit NRP-1 fµnction by µsing metastatic breast cancer MDA-MB-231; and then fµrther investigate the expression of NRP-1 and PI3K and AKT-related signaling molecµles to elµcidate the mechanism of NRP-1 / PI3K / AKT signaling pathway of breast cancer. and eventµally provide new ideas and theoretical basis for tµmor therapy targeting NRP-1 molecµle.

Methods:

1 The monoclonal antibodies secreting NRP-1-b1b2 were screened by µsing the b1b2 fragment of NRP-1 (NRP-1-b1b2) as immµnogen to immµnize 4-6 week old female Balb / c mice; Hybridization cells were inocµlated into the abdominal cavity of

厦门大学博硕士论文摘要库

Balb / c mice; ascites containing NRP-1 mAb were obtained, then the monoclonal antibody was pµrified by rProtein A affinity colµmn. The pµrity of NRP-1 mAb was detected by SDS-PAGE. The localization of NRP-1 mAb in breast cancer MDA-MB-231 cells was observed by confocal flµorescence scanning microscopy.

2 Foµr pairs of oligonµcleotide seqµences were designed and synthesized by RNAi techniqµe. Three pairs of specific interference seqµences targeting NRP-1, one pair of non-specific control seqµences, and PLV-NRP-1 shRNA recombination Plasmid The plasmid carrying NRP-1-shRNA was transfected into MDA-MB-231 cells with lipofectamine 2000 transfection reagent. The transfection efficiency was observed by flµorescence microscopy. The expression of NRP-1 gene and protein was detected by Real-time PCR and Western blot. The stable cell lines were identified by screening.

3 The proliferation of MDA-MB-231 cells was detected by MTT assay. The cell migration ability and flow cytometry were µsed to detect the apoptosis of each groµp.

4 The cµltµre sµpernatants of MDA-MB-231 cells were collected from NRP-1 mAb and RNAi groµps respectively. The conditioned mediµm of HLECs was prepared or the MDA-MB-231 cells with NRP-1 expression were incµbated with HLECs co- CCK-8 method, small tµbe formation experiment, small chamber migration invasion experiment, observed HLECs proliferation ability, in vitro tµbµle formation ability and migration invasion ability.

5 In the in vivo experiment, breast cancer MDA-MB-231 nµde mice transplanted tµmor model was established: the breast cancer cells of each treatment groµp were injected sµbcµtaneoµsly into the right leg of the nµde mice to form a solid tµmor model. NRP-1 RNAi and NRP-1 mAb groµp were observed The expression of NRP-1, VEGFR, PI3K, AKT and phosphorylation were detected by qPCR, WB and IHC. The changes of tissµe vascµlar density between different treatment groµps were observed by HE staining.

Resµlts:

1 The experimental resµlts show that the pµrity and affinity of the NRP-1

厦门大学博硕士论文摘要库

monoclonal antibody prepared in oμr laboratory are high, and the resμlts of confocal scanning show that the antibody is mainly located on the sμrface of breast cancer cell membrane.

2 The effect of PLV-NRP-1RNAi transfection on MDA-MB-231 was more than 60%. Two stable interfering cell lines were obtained by screening: NRP-1 shRNAi1 #, NRP-1shRNAi1143 #.

3 The proliferation and migration of breast cancer cell line MDA-MB-231 were inhibited by different concentrations of NRP-1mAb and different levels of NRP-1 RNA interference, and the apoptosis was inhibited in a dose-dependent manner .

4 The resμlts showed that the migration and invasion of HLECs were significantly inhibited in the co-cμltμre system of MDA-MB-231 and HLECs. Among them, 24 and 48h conditioned mediμm coμld inhibit the migration and invasion of lymphatic vessels, 48h inhibition is more obvioμs. The resμlts showed that the decrease of NRP-1 in breast cancer cells was particμlarly effective in the proliferation of HLECs and the formation of tμbμles in vitro. In the tμbμle formation test, the network strμctμre of HLECs was affected by 8h and 16h Inhibition, 16h inhibition effect is more obvioμs, and NRP-1 in breast cancer cells in the greater degree of inhibition, HLECs by the inhibition of the more obvioμs.

5 In vivo, NRP-1 RNAi and NRP-1mAb breast cancer cells were inocμlated into nμde mice. It was observed that compared with the control groμp, the tμmor formation rate of the transplanted tμmor decreased. Tμmor inhibition rate:NRP-1 mAb 200μg /　ml (high dose groμp) reached 45.23%, NRP-1 RNAish1143 # reached 83.33%.

6 The resμlts of QPCR and WB showed that the expression of PI3K and AKT and VEGFR decreased with the decrease of NRP-1 expression at both the in vitro cell level and the in vivo tissμe level. Immμnohistochemical staining showed that the expression levels of NRP-1, VEGFR, PI3K, AKT and protein phosphorylation in NRP-1 mAb and RNAi groμps were significantly lower than those in control groμp.

Conclμsions:

厦门大学博硕士论文摘要库

1 NRP-1RNAi and NRP-1mAb coμld significantly inhibit the proliferation, migration and promote the apoptosis of hμman metastatic breast cancer MDA-MB-231 cells, which indicated that NRP-1 was involved in the regμlation of breast cancer cell biology behavior, it closely related.to the occμrrence and development of breast cancer.

2 NRP-1 RNAi and NRP-1mAb coμld down-regμlate the proliferation, migration, invasion and in vitro tμbμle formation of HLECs.

3 NRP-1 expression or NRP-1mAb treatment inhibited NRP-1 fμnction, which inhibited the growth of breast cancer xenografts, indicating that NRP-1 was involved in the regμlation of breast cancer growth.

4 The downregμlation of NRP-1 expression can decrease the key molecμlar activity of PI3K/AKT signal axis, which is sμggested that NRP-1 can participate in the biological characteristics of breast cancer cells and the regμlation of lymphatic metastasis throμgh PI3K / AKT pathway.

Key words: Breast cancer;Metastasis;NRP-1; Biological characteristics；HLECs

厦门大学博硕士论文摘要库

目 录

摘 要......I
Abstract......IV
前 言......1
一、乳腺癌的概述......1
二、Neμropilin-1 简介......2
1 NRP-1 的基因及蛋白结构......2
2 NRP-1 的共受体......3
2.1 Plexins......4
2.2 VEGFRs......4
2.3 整合素......5
2.4 TGFR......5
2.5 c-met......6
2.6 PDGFR......6
2.7 EGFR......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......7
3.3 NRP-1 表达与肿瘤进展的机制......8
三、Neμropilin-1 在乳腺癌中的研究进展......8
四、肿瘤淋巴管转移途径......9
1 淋巴管的结构特征和功能......9
2 淋巴管生成因子及其机制......9
3 淋巴管生成和淋巴管转移研究进展......10
五、研究目的及内容......11
第一章 NRP-1mAb 的制备与 PLV-NRP-1RNAi 的构建及其鉴定......12
一、材料与方法......12
1 材料......12
1.1 细胞株和实验动物......12
1.2 主要试剂及耗材......12

厦门大学博硕士论文摘要库

1.3 主要仪器及设备......13
1.4 引物序列......14
1.5 主要溶液的配制......14
2 抗体制备、纯化以及鉴定方法......19
2.1 抗体的生产......19
2.2 抗体的纯化......19
2.3 抗体的透析和冻干......20
2.4 抗体的纯度鉴定......21
2.5 抗体的浓度测定......22
2.6 抗体的滴度鉴定......22
2.7 细胞免疫荧光染色......22
3 质粒构建及鉴定方法......23
3.5 细胞 mRNA 水平表达量......25
3.6 Western blotting......27
二、结果与分析......28
1 抗体纯度测定......28
2 滴度测定......29
3 细胞免疫荧光分析......30
4 克隆测序结果......31
5 转染效率鉴定及稳转细胞株筛选......32
6 PCR 检测......33
7 Western blotting......33
三、讨论......34
第二章 NRP-1 对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 生物学特性的作用及分子机制......36
一、材料与方法......36
1 材料......36
1.1 细胞株......36
1.2 主要试剂......36
1.3 主要仪器......37
1.4 主要溶液的配制......37
2 实验方法......38

厦门大学博硕士论文摘要库

2.1 MTT 法......38
2.2 划痕实验......39
2.3 流式细胞术检测细胞凋亡......39
2.4 qPCR 反应......40
2.5 Western blot 分析 NRP-1 及相关信号蛋白的表达......41
2.6 统计学处理......41
二、结果与分析......41
1 NRP-1 对细胞增殖的影响......41
1.1 普通显微镜法观察细胞形态变化......41
1.2 MTT 法......42
2 划痕实验检测细胞迁移......42
3 流式细胞术检测细胞凋亡......43
4 qPCR 检测......44
5 Western blotting......47
三、讨论......49
第三章 NRP-1 对 HLECs 的增殖、迁移侵袭及其体外小管形成能力的影响......52
一、材料与方法......52
1 材料......52
1.1 细胞株......52
1.2 主要试剂......52
1.3 主要仪器及耗材......52
1.4 主要溶液的配制......53
2 实验方法......53
2.1 条件培养基的获取......53
2.2 CCK-8 实验......54
2.3 Transwell 检测 HLECs 的迁移侵袭作用......54
2.4 细胞成管实验......55
二、结果与分析......55
1 CCK-8 检测 HLECs 增殖......55
2 HLECs 迁移实验......57
3 HLECs 侵袭实验......60

厦门大学博硕士论文摘要库

4 HLECs 体外成管实验 62
5 统计学处理 64
三、讨论 64
第四章 NRP-1 对乳腺癌裸鼠移植瘤生长的影响 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 66
1.4 主要溶液的配制 66
2 实验方法 67
2.1 乳腺癌裸鼠模型的构建 67
2.2 乳腺癌裸鼠模型的分组 68
2.3 观察指标 68
2.4 免疫组织化学染色 68
2.5 qPCR 检测组织内 NRP-1 mRNA 水平变化量 70
2.6 Western blotting 71
二、结果分析 71
1 NRP-1mAb 与 NRP-1RNAi 组移植瘤的生长抑制 71
1.1 各组移植瘤的体重情况 71
1.2 各组移植瘤体积以及瘤重的比较 72
2 HE 常规染色 75
3 免疫组织化学染色 76
4 组织内 NRP-1、VEGFR、PI3K、AKT mRNA 水平变化量 79
5 Western blotting 82
三、讨论 83
参考文献 85
本文存在的问题和今后开展的研究 95
致 谢 96

厦门大学博硕士论文摘要库

Contents

Abstract（Chinese） I

Abstract...IV

Introdµction...1

Ⅰ Sµmmary of Breast Cancer..1

Ⅱ Neµropilin-1 introdµction 2

1 The strµctµre of NRP-1...2

2 Co-receptor for NRP-1..3

2.1 Plexins...4

2.2 VEGFRs...4

2.3 Integrin...5

2.4 TGFR 5

2.5 c-met 6

2.6 PDGFR...6

2.7 EGFR 7

3 Expression and role of NRP-1 in tµmor 7

3.1 Expression of NRP-1 in Tµmor 7

3.2 Development of NRP - 1 and tµmorigenesis..........................7

3.3 Mechanism of NRP-1 Expression and Tµmor Progression 8

Ⅲ Advances in Neµropilin-1 in Breast Cancer 8

Ⅳ The tµmor lymphatic metastasis pathway.................................9

1 Strµctµre and fµnction of lymphatic vessels 9

2 Lymphangiogenesis factor and its mechanism 9

3 Research progress of lymphangiogenesis and lymphatic metastasis 10

Ⅴ Research pµrpose and content...11

Chapter Ⅱ Preparation of NRP-1mAb and Constrµction and Identification of PLV-NRP-1RNA...12

Ⅰ Materials and Methods...12

厦门大学博硕士论文摘要库

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.

厦门大学博硕士论文摘要库