

人神经菌毛素1 b结构域单克隆抗体的制备及其抑制血管生成作用

戴 华^{1,2*}, 戴长松¹, 张海霞^{1,2}, 沈 颖^{1,2}

¹扬州大学医学院, 江苏 扬州 225001; ²江苏省非编码RNA基础与临床转化重点实验室, 江苏 扬州 225001

[摘要] **目的:**制备抗人神经菌毛素1(human neuropilin 1, HuNRP1)b结构域单克隆抗体(monoclonal antibodies, mAb), 为靶向抑制肿瘤血管生成提供生物材料。**方法:**运用杂交瘤技术, 将HuNRP1 b结构域重组蛋白(TF-HuNRP1^b)免疫BALB/c鼠, 共免疫3次, 取免疫鼠的脾脏细胞与sp2/0细胞进行融合, 采用间接免疫荧光法(immunofluorescent assay, IFA)筛选稳定分泌抗HuNRP1^b mAb, 以Western blot、IFA、流式细胞术分析mAb的特异性。以MTT法及小室迁移实验分析mAb抑制血管生成的能力。**结果:**获得1株稳定分泌抗HuNRP1^b mAb的细胞株4F11。Western blot结果表明, 本研究所获得的mAb 4F11只与重组HuNRP1^b发生反应, 与对照蛋白不发生反应; IFA及流式细胞分析结果表明, 所获得的mAb能够识别肿瘤细胞MDA-MB-231、HepG2以及人脐静脉内皮细胞表达的天然HuNRP1蛋白; MTT法及小室迁移实验表明, 所获得的mAb 4F11具有抑制人脐静脉内皮细胞增殖、迁移的能力。**结论:**成功制备出抗HuNRP1^b的mAb, 该mAb的获得将为进一步研究HuNRP1的功能及靶向抑制肿瘤血管生成提供生物材料。

[关键词] 人神经菌毛素1 b结构域; 单克隆抗体; 血管生成

[中图分类号] R392.11

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)03-288-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20180302

Generation of monoclonal antibodies against human neuropilin 1 b domain and its inhibitory function on angiogenesis

Dai Hua^{1,2*}, Dai Changsong¹, Zhang Haixia^{1,2}, Shen Ying^{1,2}

¹Medical School, Yangzhou University, Yangzhou 225001; ²Jiangsu Key Laboratory of Experimental & Translational Non-coding RNA Research, Yangzhou 225001, China

[Abstract] **Objective:** To develop monoclonal antibodies (mAb) against human neuropilin 1 (HuNRP1) and provide useful materials to inhibit tumor angiogenesis by targeting HuNRP1. **Methods:** Using lymphocyte hybridoma technique, 8-week-old BALB/c mice were immunized with recombinant protein, b domain of human neuropilin 1 (TF-HuNRP1^b) derived from *E. Coli*, then splenocytes of the immunized mice were prepared and collected, with the addition of sp2/0 myeloma cells, all the mixed cells were fused. Positive hybridoma cells were screened by indirect immunofluorescent assay (IFA) established with native HuNRP1 expressed by breast tumor cell line MDA-MB-231. The specificity of mAb was identified by IFA, Western blot and flow cytometry (FCM). The inhibitory ability of mAbs against tumor angiogenesis was identified by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) and chamber migration test. **Results:** One hybridoma cell line producing mAb against TF-HuNRP1^b were obtained and named as 4F11. Western blot analysis showed that mAbs could recognize only recombinant HuNRP1^b not the other proteins produced in BL21 (DE3) (pCold-HuNRP1^b) and BL21 (DE3) (pCold). The results of IFA and FCM showed that mAb could recognize native HuNRP1 expressed on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), tumor cell line MDA-MB-231 and HepG2. The results of MTT assay and chamber migration test further showed that mAb 4F11 had strong inhibitory effect on migration and proliferation of HUVEC. **Conclusion:** mAb against HuNRP1^b was successfully obtained which will be useful in the functional study of HuNRP1 and provide good materials for the inhibition of tumor angiogenesis.

[Key words] human neuropilin 1 b domain; monoclonal antibodies; angiogenesis

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(03):288-293]

[基金项目] 国家自然科学基金(81472815)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: daihua@yzu.edu.cn

人神经菌毛素(human neuropilin 1, HuNRP1)是一种不具有受体激酶结构域的单跨膜受体分子,由胞外区、跨膜区及胞内区3部分组成,其中胞外区是配体结合区,又包括3个结构域:CUB区、b区和C区^[1]。HuNRP1通过其b结构域(HuNRP1^b)与血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)等酪氨酸激酶受体相互作用,发挥共受体的功能,增强细胞对血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)等细胞因子的信号应答^[2-5]。HuNRP1有力促进了VEGF165与其受体VEGFR2的结合,在血管生成中发挥着重要作用。研究发现,多种肿瘤细胞具有自分泌VEGF165的功能,肿瘤组织内血供丰富,其血管内皮细胞及肿瘤细胞表达的NRP1与VEGF165结合后能显著促进肿瘤部位血管生成、肿瘤细胞迁移以及肿瘤生成,从而促进肿瘤发生发展^[6-9],而NRP1功能的丧失会导致血管重塑以及血管分支的缺陷^[10-11]。由于NRP1在肿瘤发生发展中起促进作用,逐渐成为肿瘤治疗的一个新靶标。

本研究采用淋巴细胞杂交瘤技术,将实验室前期制备的重组HuNRP1^b蛋白免疫8周龄BALB/c小鼠,将其脾脏淋巴细胞与骨髓瘤细胞sp2/0进行细胞融合,通过间接免疫荧光法(immunofluorescent assay, IFA)筛选稳定分泌抗HuNRP1^b的单克隆抗体(monoclonal antibodies, mAb)细胞株。mAb的获得将为深入研究HuNRP1的生物学功能及靶向肿瘤局部抑制肿瘤血管生成研究提供基础。

1 材料和方法

1.1 材料

8周龄BALB/c小鼠、8~10周龄ICR小鼠(扬州大学比较医学中心);骨髓瘤细胞系sp2/0由本实验室保存、乳腺癌细胞株MDA-MB-231、肝癌细胞株HepG2(中科院上海细胞库),人脐静脉内皮细胞株(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC, 上海澳塞尔斯生物技术有限公司);DMEM、L-15培养基(Gibco公司,美国),内皮细胞完全培养(南京凯基公司),进口胎牛血清(Hyclone公司,美国),PEG(MW 1500, 罗氏公司,美国),HRP-羊抗鼠IgG抗体、HRP-羊抗鼠IgM抗体、鼠源mAb亚类鉴定试剂盒、次黄嘌呤-胸腺嘧啶脱氧核苷(hy-

poxantin-thymidin, HT)贮存液、次黄嘌呤-胸腺嘧啶脱氧核苷-氨基蝶呤(hypoxanthin- aminopterin-thymidine, HAT)贮存液(Sigma公司,美国);Alexa Fluor R488标记的羊抗鼠IgG(H&L)(Abcam公司,美国),ECL化学发光液(Millipore公司,美国);其他均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 动物免疫

以实验室前期制备的重组HuNRP1^b融合蛋白(TF-HuNRP1^b)以及触发因子(trigger factor, TF)标签蛋白作为免疫原,分别免疫8周龄BALB/c小鼠,共免疫3次,间隔2周。首次免疫,融合蛋白TF-HuNRP1^b与等体积的弗氏完全佐剂充分乳化后,经腹部皮下多点注射免疫,100 μg/只;第2次免疫,TF-HuNRP1^b与等体积的弗氏不完全佐剂充分乳化后,进行小鼠腹部皮下多点注射,剂量相同;第3次免疫后7 d,取免疫鼠眼眶下静脉丛血,测定免疫鼠的血清抗体效价;第2次免疫2周后,取血清抗体滴度1:5 000以上的免疫鼠进行尾静脉加强免疫,仅免疫TF-HuNRP1^b,剂量相同,3 d后取脾脏细胞进行细胞融合。

1.2.2 细胞融合

加强免疫3 d后,无菌制备免疫鼠脾脏单细胞悬液,与骨髓瘤细胞sp2/0混匀后离心,DMEM洗涤1次,收集混合细胞沉淀并置掌心振匀;随后,向混合细胞内滴加37℃预热的PEG(MW1500),使混合细胞在PEG作用下于37℃水浴条件下进行细胞融合,静置10 min;DMEM终止融合反应;4℃1 000 r/min离心10 min;向细胞沉淀中加入适量含HAT的DMEM完全培养基吹打混匀,分装96孔板,置37℃、5% CO₂培养箱静置培养。5 d后对融合细胞进行半量换液,10 d后将培养基全部置换为HT培养基。定期观察、及时换液,收集各孔上清进行分析。

1.2.3 间接免疫荧光法筛选阳性杂交瘤细胞株

人乳腺癌细胞株MDA-MB-231高表达HuNRP1^[12],取生长状态良好的MDA-MB-231细胞,经胰酶消化后,铺96孔细胞培养板,4×10⁴个/孔,置37℃、5% CO₂培养箱过夜培养。次日,用-20℃预冷的甲醇液固定,室温处理10 min;封闭液(含10%标准小牛血清的PBST)37℃封闭2 h;洗涤后加入杂交瘤细胞培养上清,37℃孵育1 h;最后,加入工作浓度的Alexa Fluor R488标记的羊抗鼠IgG(H&L)荧光二抗,PBS洗涤后,倒置荧光显微镜观察、拍照。同时设适量稀释的TF免疫鼠血清作为阴性对照,并设空白对照。

1.2.4 阳性杂交瘤细胞株的克隆化及腹水 mAb 的制备

采用有限稀释法,对筛选到的阳性杂交瘤细胞进行2次亚克隆。体内诱生腹水法制备腹水 mAb,选取10周龄健康的BALB/c雌性鼠,腹腔注射液体石蜡,500 μL /只;7 d后,腹腔接种生长至对数期的阳性杂交瘤细胞200 μL ,每只 5×10^5 个。5 d后观察腹水产生情况,及时采集腹水,间接ELISA测定腹水 mAb 效价。

1.2.5 ELISA 鉴定 mAb 的亚类

按鼠源 mAb 独特型鉴定试剂盒说明书,采用抗原介导的ELISA法鉴定 mAb 的亚类。用碳酸盐包被缓冲液适量稀释 TF-HuNRP1^b,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,包被ELISA微孔板;次日,分别加入各 mAb 进行孵育,洗涤后分别加入稀释的山羊抗鼠 IgA、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 和 IgM 亚类抗体进行孵育;经酶标二抗孵育、TMB 显色、2 mol/L H_2SO_4 终止反应,读取各孔的 $D(450 \text{ nm})$ 值,取 $D(450 \text{ nm})$ 吸光值明显高于其他组者即为 mAb 亚类。

1.2.6 mAb 的 Western blot 分析

按照参考文献[13],配制12%的分离胶以及5%的浓缩胶,对重组诱导菌 BL21 (DE3) (pCold-HuNRP1^b)、BL21 (DE3) (pCold) 进行 SDS-PAGE 分析,随后将该凝胶上的蛋白转印至 PVDF 膜;含5%脱脂奶粉的 PBST 封闭、洗膜后,与腹水 mAb 孵育(经封闭液1:100稀释),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;洗涤后,将 PVDF 膜与工作浓度的 HRP-羊抗鼠 IgG、HRP-羊抗鼠 IgM 二抗混合液共孵育,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴1 h;化学发光,凝胶成像系统拍照、分析。

1.2.7 间接免疫荧光法分析 mAb 识别天然 HuNRP1 的能力

取 MDA-MB-231、HepG2 以及 HUVEC 细胞,按照1.2.3方法处理后,分别以 4×10^4 、 1×10^4 、 1×10^4 个/孔接种至96孔板,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱过夜培养。经 mAb 孵育、Alexa Fluor488 标记的羊抗鼠 IgG (H&L) 二抗染色。荧光显微镜下观察、拍照。

1.2.8 流式细胞术分析 mAb 结合天然 HuNRP1 的能力

取 1×10^7 个 MDA-MB-231 细胞,加入适当稀释的 mAb,室温作用1 h,1 000 r/min 离心,PBS 洗涤3次,加入工作浓度的 Alexa FluorR 488 标记的羊抗鼠 IgG (H&L) 二抗,室温避光作用30 min,同上洗涤后,流式细胞仪分析。

1.2.9 MTT 实验分析 mAb 对 HUVEC 增殖的影响

按文献[14]方法,将 HUVEC 按照 1×10^4 个/孔接

种至96孔板,置37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱,培养6 h;更换为无血清培养基,6 h后采用完全培养基培养。实验组分别加入 mAb,设低浓度、高浓度组(10 μg /孔、40 μg /孔),以及阴性(等体积 PBS)、阳性对照组(含3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 顺铂);继续培养48 h,每孔加入5 mg/mL MTT,20 μL /孔;培养4 h后,弃去培养基,加入 DMSO,250 μL /孔,摇床震荡10 min。待细胞中的蓝紫色结晶甲瓞完全溶解后,检测各孔的 $D(570 \text{ nm})$ 值。

1.2.10 Transwell 小室分析 mAb 抑制 HUVEC 迁移的能力

参考文献[15],将 HUVEC 细胞调至 2×10^5 个/mL 并接种至 Transwell 上室,200 μL /室,下室加入400 μL 培养基,置37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养4 h;随后,将培养基更换为等体积无血清内皮细胞培养液,培养6 h;在上室中加入含0.1% BSA 的 DMEM 培养基,200 μL /孔,同时加入 mAb 10 μg ,并设 PBS 对照;下室加入400 μL 内皮细胞完全培养基以及10 ng VEGF165。置37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱继续培养,分别在6、12、24 h后取出上层小室,PBS 洗3次,5 min/次;用棉签轻轻擦去 Transwell 上室中未迁移的细胞;同上洗涤后,采用4%多聚甲醛固定10 min;同上洗涤后,结晶紫染色10 min,洗涤并吹干。倒置显微镜观察细胞,随机取4个视野,计数迁移细胞数。

1.3 统计学方法

应用 SPSS 20.0 软件进行数据的统计学分析,各组间比较采用单因素方差分析,两两间比较选用 LSD-*t* 方法。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 间接免疫荧光法筛选阳性杂交瘤细胞株

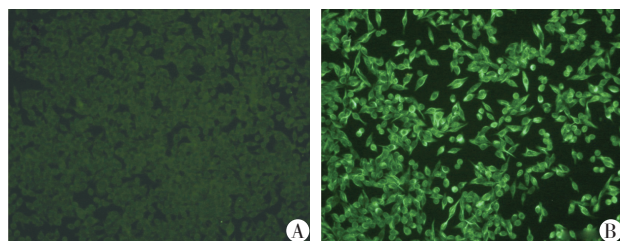
荧光显微镜下可观察到细胞表面及胞质内的绿色荧光(图1)。表明融合蛋白 TF-HuNRP1^b 免疫鼠可以产生针对 HuNRP1 蛋白的抗体,该抗体能够识别天然的 HuNRP1。

2.2 杂交瘤细胞株的建立

免疫鼠脾脏细胞与 sp2/0 细胞融合后,经 IFA 筛选,获得1株能够稳定分泌抗 HuNRP1^b mAb 的杂交瘤细胞株 4F11。其腹水 mAb 的效价分别为1:51 200,亚类为 IgM。

2.3 mAb 的特异性分析

采用 Western blot 分析 mAb 的特异性,发现 mAb 可以与重组诱导菌 BL21 (DE3, pCold-HuNRP1^b) 发生反应,在89 kDa 处出现特异性条带,而与空载体诱导菌 BL21 (DE3) (pCold) 不发生任何反应,表明



A: 抗TF多抗血清为一抗; B: 杂交瘤细胞培养上清为一抗。

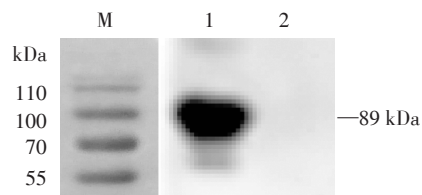
图1 间接免疫荧光法筛选阳性杂交瘤细胞株($\times 200$)

Figure 1 Establishment of indirect immunofluorescence for screening positive hybridoma cells($\times 200$)

mAb 仅识别重组 HuNRP1^b 而不与标签蛋白 TF 以及其他无关蛋白反应,说明本研究所获得的 mAb 是特异性针对 HuNRP1^b 的 mAb(图2)。

2.4 mAb 具有识别天然 HuNRP1 的能力

将 MDA-MB-231、HepG2、HUVEC 细胞株处理后,进行 IFA 实验。IFA 结果表明,mAb 4F11 均能够与 MDA-MB-231、HepG2 以及 HUVEC 细胞结合,在细胞表面及胞质中可观察到绿色荧光(图3),表明本研究获得的 mAb 具有识别天然 HuNRP1 的能力。



1: 经 IPTG 诱导的 BL21(DE3)(pCold-HuNRP1^b) 菌; 2: 经 IPTG 诱导的 BL21(DE3)(pCold) 菌。

图2 单抗4F11的免疫印迹分析结果

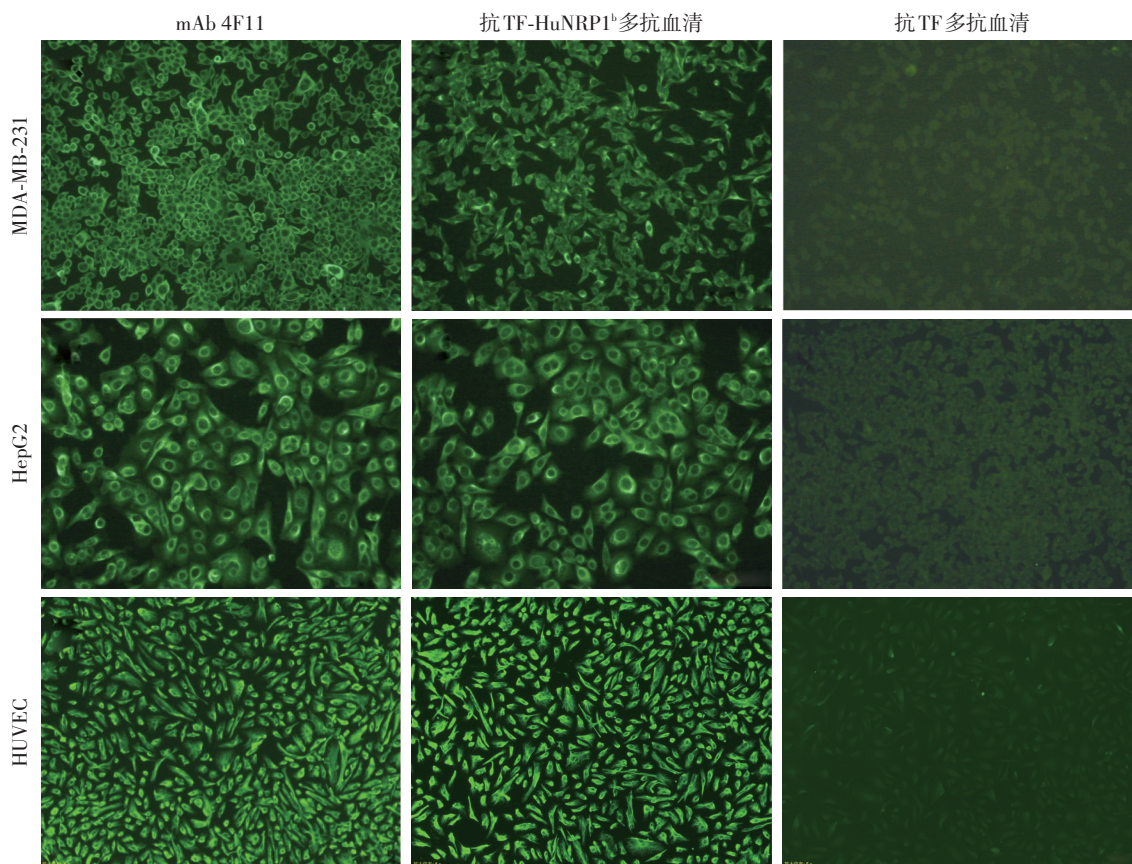
Figure 2 Immunoblotting analysis of mAb 4F11

2.5 流式细胞术分析 mAb 4F11 与天然 HuNRP1 的结合能力

MDA-MB-231 细胞消化、计数后,分别加入系列倍比稀释的 mAb 4F11 作为一抗,经荧光标记的二抗孵育后,流式检测结果显示,mAb 4F11 在 1:200、1:400、1:800 时均与 MDA-MB-231 细胞具有较好的结合能力(图4)。

2.6 MTT 法分析 mAb 抑制 HUVEC 存活的能力

将 HUVEC 细胞饥饿培养 6 h 后,进行 MTT 实验,对活细胞进行检测,计算细胞存活率。结果表明,mAb 4F11 低剂量、高剂量组细胞存活率分别为



MDA-MB-231、HepG2、HUVEC 分别用 4F11、抗 TF-HuNRP1^b 多抗血清、抗 TF 多抗血清处理后的免疫荧光检测结果。

图3 间接免疫荧光法分析 mAb 识别天然 HuNRP1 的能力($\times 200$)

Figure 3 Analysis of the binding ability of mAb with native HuNRP1 by indirect immunofluorescent assay($\times 200$)

(75.73 ± 5.51)%、(61.87±8.35)%，与对照组差异显著，高剂量组抑制细胞存活的能力更强，表明 mAb

具有抑制 HUVEC 存活的能力，但较阳性对照组(顺铂)(49.20 ± 6.08)%低，存在显著性差异(图5)。

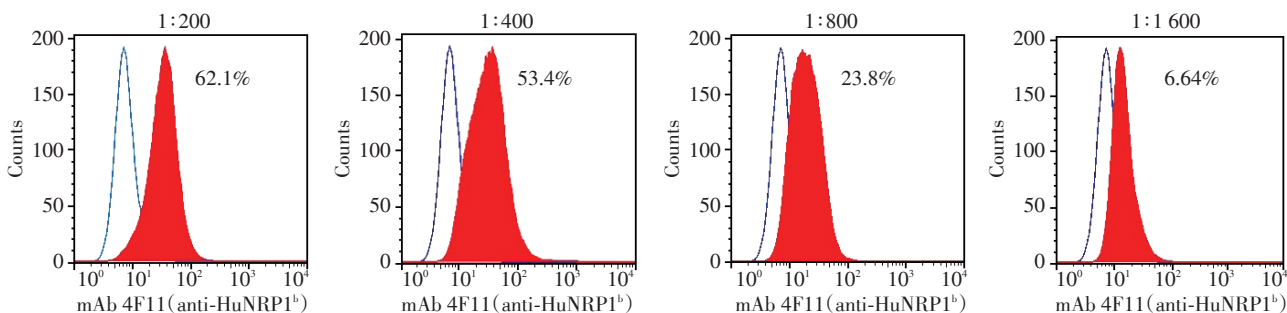


图4 流式分析 mAb 4F11 与 MDA-MB-231 细胞的结合能力

Figure 4 Flow cytometry analysis of the binding ability of 4F11 with native HuNRP1 expressed on MDA-MB-231 cell

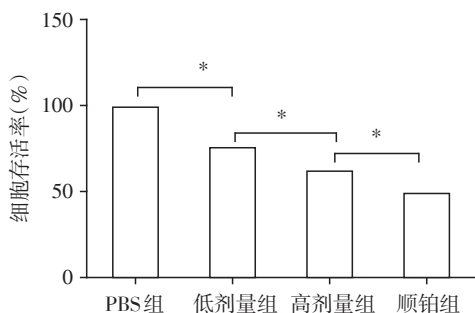


图5 MTT 法分析 mAb 4F11 对 HUVEC 存活的影响

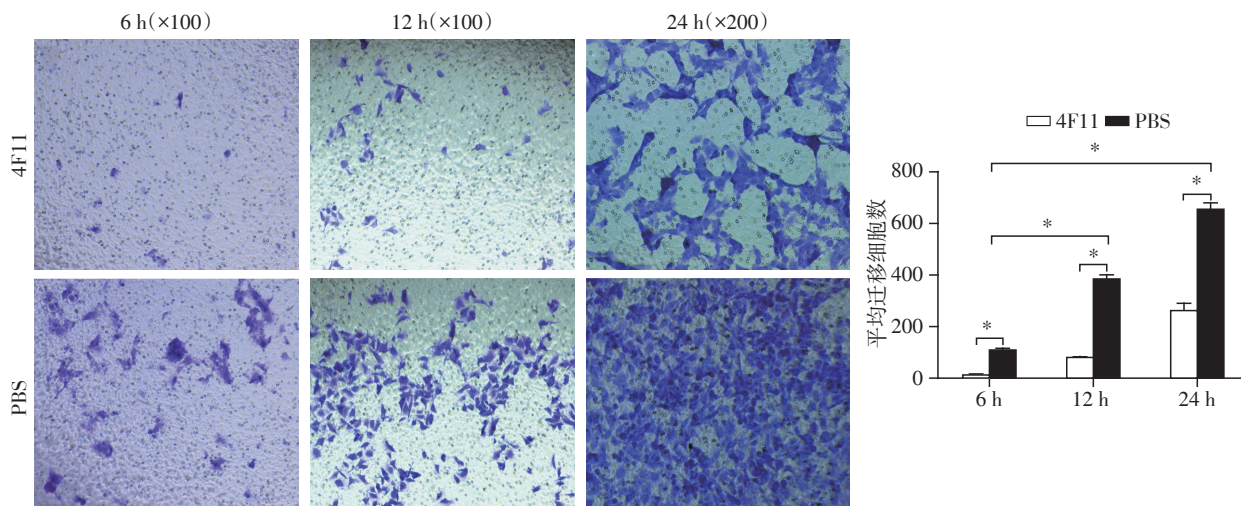
Figure 5 Analysis of mAb 4F11 on inhibiting the proliferation of HUVEC

2.7 Transwell 实验分析 mAb 抑制 HUVEC 迁移的能力
统计结果表明，mAb 4F11 在 6、12、24 h 均能显著抑制 HUVEC 迁移，与对照组比较，差异有统计学意义，其抑制率分别为 87.6%、78.6%、59.2%，说明 mAb 4F11 具有靶向抑制肿瘤部位的血管生成，抑制

肿瘤生长的可能(图6)。

3 讨论

NRP1 作为 VEGF 的共受体，具有刺激内皮细胞迁移、促进新生血管形成、促进肿瘤生长的能力。进一步研究发现，HuNRP1 主要作为 VEGF165 的共受体通过与 KDR/VEGFR2 形成复合物从而增强 VEGF165/KDR 介导的促血管生成作用，尤其是肿瘤部位的新生血管发育，从而使得肿瘤逃避抗血管生成靶向药物的治疗^[16-17]，其中，NRP1 的 b 结构域是 VEGF 结合其受体并发挥其促血管生成作用的关键部位。研究发现阻断由 NRP1 介导的 VEGF165 与 KDR 的结合能高效拮抗 VEGF165/KDR 的信号转导，抑制其促血管生成作用的发挥^[6, 16, 18]。对敲除 NRP1 的细胞及小鼠进行生物学研究，发现 NRP1 敲除后，体内、体外的血管内皮细胞成管以及肿瘤生长均发生



两组比较, $P < 0.001, n=3$ 。

图6 Transwell 小室法分析 mAb 4F11 抑制 HUVEC 迁移的能力

Figure 6 Ability of mAb 4F11 on inhibiting the migration of HUVEC by transwell chamber migration test

显著抑制^[19-20],提示靶向抑制HuNRP1可以有效阻断肿瘤部位的血管发育,对肿瘤发展起到抑制作用。

本研究采用前期获得的重组蛋白TF-HuNRP1^b来免疫BALB/c鼠,以MDA-MB-231为细胞抗原,建立了有效筛选阳性杂交瘤细胞株的方法,获得1株抗HuNRP1^b的特异性mAb 4F11。Western blot结果表明,该株mAb特异性针对重组HuNRP1^b。IFA、流式细胞分析结果均表明,该株mAb对不同肿瘤细胞及血管内皮细胞表面表达的天然HuNRP1具有良好的识别和结合能力。表明原核表达膜蛋白胞外区的部分区域,并将该蛋白免疫小鼠后,完全可以获得有效识别该全长蛋白的特异性mAb。MTT实验以及Transwell小室迁移抑制实验表明,本研究所获得的4F11具有靶向抑制HUVEC增殖及迁移的能力,说明本研究所获得的mAb可用于分析HuNRP1的生物学功能,尤其是后续的应用研究,如抑制肿瘤部位血管生成或进一步拓展该抗体作为靶向治疗的候选抗体,为在动物模型上进行尝试奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Tymecka D, Lipiński PFJ, Fedorczyk B, et al. Structure-activity relationship study of tetrapeptide inhibitors of the vascular endothelial growth factor A binding to neuropilin-1[J]. *Peptides*, 2017, 94: 25-32
- [2] Erskine L, Franois U, Denti L, et al. VEGF-A and neuropilin 1 (NRP1) shape axon projections in the developing CNS via dual roles in neurons and blood vessels[J]. *Development*, 2017, 144(13): 2504-2516
- [3] Kim YJ, Jung K, Baek DS, et al. Co-targeting of EGF receptor and neuropilin-1 overcomes cetuximab resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma with integrin β 1-driven Src-Akt bypass signaling[J]. *Oncogene*, 2017, 36(18): 2543-2552
- [4] Zhu H, Jiang X, Zhou X, et al. Neuropilin-1 regulated by miR-320 contributes to the growth and metastasis of cholangiocarcinoma cells[J]. *Liver Int*, 2017, 38(1): 125-135
- [5] Muhl L, Folestad EB, Gladh H, et al. Neuropilin 1 binds PDGF-D and is a co-receptor in PDGF-D-PDGFR β signaling[J]. *J Cell Sci*, 2017, 130(8): 1365-1378
- [6] Holmes DI, Zachary IC. Vascular endothelial growth factor regulates stanniocalcin-1 expression via neuropilin-1-dependent regulation of KDR and synergism with fibroblast growth factor-2[J]. *Cell Signal*, 2008, 20(3): 569-579
- [7] Li L, Jiang X, Zhang Q, et al. Neuropilin-1 is associated with clinicopathology of gastric cancer and contributes to cell proliferation and migration as multifunctional co-receptors[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2016, 35: 16
- [8] Zhuang PY, Wang JD, Tang ZH, et al. Peritumoral neuropilin-1 and VEGF receptor-2 expression increases time to recurrence in hepatocellular carcinoma patients undergoing curative hepatectomy[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(22): 11121-11132
- [9] 戴长松,王美玲,戴 华. Neuropilin-1在肿瘤发生发展中的作用[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2015, 22(4): 536-540
- [10] Wu YY, Chen YL, Jao YC, et al. miR-320 regulates tumor angiogenesis driven by vascular endothelial cells in oral cancer by silencing neuropilin 1[J]. *Angiogenesis*, 2014, 17(1): 247-260
- [11] Yue B, Ma JF, Yao G, et al. Knockdown of neuropilin-1 suppresses invasion, angiogenesis, and increases the chemosensitivity to doxorubicin in osteosarcoma cells-an *in vitro* study[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2014, 18(12): 1735-1741
- [12] Glinka Y, Mohammed N, Subramaniam V, et al. Neuropilin-1 is expressed by breast cancer stem-like cells and is linked to NF- κ B activation and tumor sphere formation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 425(4): 775-780
- [13] J. 萨姆布鲁克, D.W.拉塞尔. 分子克隆实验指南(第3版)[M]. 北京:科学出版社, 2016: 1715-1726
- [14] 王 涛,王 波,温会燕,等. Toll样受体4活化增强乳腺癌细胞株MCF-7侵袭力的研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2016, 36(5): 533-538
- [15] 张 勇,吴 宁,马 永,等. 肝细胞核因子4 α 抑制大鼠肝癌细胞增殖、侵袭能力和新生血管生成相关基因表达[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2016, 36(4): 430-434
- [16] Al-Abd AM, Alamoudi AJ, Abdel-Naim AB, et al. Anti-angiogenic agents for the treatment of solid tumors: Potential pathways, therapy and current strategies- A review[J]. *J Adv Res*, 2017, 8(6): 591-605
- [17] Castro BA, Flanigan P, Jahangiri A, et al. Macrophage migration inhibitory factor downregulation: a novel mechanism of resistance to anti-angiogenic therapy[J]. *Oncogene*, 2017, 36(26): 3749-3759
- [18] Osada H, Tokunaga T, Nishi M, et al. Overexpression of the neuropilin 1 (NRP1) gene correlated with poor prognosis in human glioma[J]. *Anticancer Res*, 2004, 24(2B): 547-552
- [19] Raskopf E, Vogt A, Standop J, et al. Inhibition of neuropilin-1 by RNA-interference and its angiostatic potential in the treatment of hepatocellular carcinoma[J]. *Z Gastroenterol*, 2010, 48(1): 21-27
- [20] Pan Q, Chantry Y, Liang WC, et al. Blocking neuropilin-1 function has an additive effect with anti-VEGF to inhibit tumor growth[J]. *Cancer Cell*, 2007, 11(1): 53-67