

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 21620141152505

UDC _____

廈門大學

碩 士 學 位 論 文

鉴定能够抑制 Dll4-Notch 通路的 Dll4 单抗

Characterization of Dll4 Monoclonal Antibody which can

block the Dll4-Notch signaling pathway

徐哲妮

指导教师姓名: 李晓彤 教授

专 业 名 称: 细胞生物学

论文提交日期: 2017 年 4 月

论文答辩时间: 2017 年 5 月

学位授予日期: 2017 年 月

答辩委员会主席: _____

评阅人: _____

2017 年 05 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（ 李晓彤 ）
课题（组）的研究成果，获得（ 李晓彤 ）课题（组）
经费或实验室的资助，在（ 李晓彤 ）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 2027 年 12 月 31 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

目录

摘要.....	
Abstract.....	
缩略语对照表.....	
第一章 前言.....	1
1.1 Dll4-Notch 通路综述.....	1
1.1.1 Notch 信号通路简介.....	1
1.1.2 Dll4-Notch 信号通路.....	1
1.1.3 Notch 受体.....	2
1.1.4 Notch 配体.....	3
1.1.5 Dll4 蛋白的结构特征.....	4
1.1.6 Dll4 蛋白的生物学功能.....	5
1.1.7 Dll4 与肿瘤治疗.....	6
1.1.8 Hes1 蛋白.....	7
1.2 Dll4 在肿瘤靶向治疗中的应用.....	9
1.3 过表达 Dll4 对肿瘤细胞的影响.....	11
1.4 本课题的研究意义和内容.....	12
1.4.1 研究意义.....	12
1.4.2 研究内容.....	13
第二章 材料与方法.....	14
2.1 材料.....	14
2.1.1 细胞株与菌株.....	14
2.1.2 质粒.....	14
2.1.3 实验动物.....	14
2.1.4 主要试剂及耗材.....	14

2.1.5 主要仪器	16
2.1.6 常用缓冲液	17
2.2 实验方法	21
2.2.1 质粒构建	21
2.2.2 蛋白质相关实验方法	24
2.2.3 单克隆抗体的鉴定	27
第三章 结果	33
3.1 D114 蛋白的制备	33
3.1.1 质粒构建及 D114 表达载体的构建	33
3.1.2 D114 融合蛋白的表达纯化	34
3.2 D114 单克隆抗体的鉴定	35
3.2.1 抗 D114 的单克隆抗体的鉴定	35
3.3 D114 单抗可以阻断 D114-Notch 通路	41
3.3.1 过表达 D114 激活 D114-Notch 通路	41
3.3.2 D114 单抗可以影响细胞的增殖活性	43
3.3.3 D114 单抗可下调 Notch 通路靶基因的表达	45
第四章 分析与讨论	46
参考文献	50
致谢	53

Table of Content

Abstract in Chinese	
Abstract in English	
Abbreviation	
Chapter one Introduction	1
1.1 Summarize of Dll4-Notch signaling pathway	1
1.1.1 Introduction of Notch signaling pathway	1
1.1.2 Dll4-Notch signaling pathway	1
1.1.3 Notch receptor	2
1.1.4 Notch ligand	3
1.1.5 Structural features of Dll4 protein	4
1.1.6 Main biological function of Dll4 protein	5
1.1.7 Dll4 in cancer therapy	6
1.1.8 Hes1 protein	7
1.2 Dll4 in cancer targeted therapy	9
1.3 Overexpressed Dll4 in cancer cells	11
1.4 Significance and content of the research	12
1.4.1 Significance of the research	12
1.4.2 Content of the research	13
Chaptor two Material and Methods	14
2.1 Material	14
2.1.1 Cells and strains	14
2.1.2 Plasmids	14
2.1.3 Animals	14
2.1.4 Reagents and Consumables.....	14

2.1.5 Instruments.....	16
2.1.6 Common buffer.....	17
2.2 Methods.....	21
2.2.1 Construction of plasmids.....	21
2.2.2 Protein expression.....	24
2.2.3 Monoclonal antibody characterization.....	27
Chapter three Result.....	33
3.1 Dll4 protein expression.....	33
3.1.1 Construction of Dll4 expression vectors.....	33
3.1.2 Expression and purification of Dll4 fusion protein.....	34
3.2 Characterization of Dll4 monoclonal antibody.....	35
3.2.1 Characterization of Dll4 monoclonal antibody.....	35
3.3 Dll4 monoclonal antibody can block Dll4-Notch signaling pathway.....	41
3.3.1 Overexpression of Dll4 activate Dll4-Notch signaling pathway.....	41
3.3.2 Dll4 monoclonal antibody can affect proliferation.....	43
3.3.3 Dll4 monoclonal antibody can down-regulate Notch target genes.....	45
Chapter four Analysis and discussion.....	46
References.....	50
Acknowledgement.....	53

摘要

1917年, Thomas Hunt Morgan 在果蝇中首次发现 Notch 基因, 1980年 Notch 基因首次被克隆出来。Notch 信号通路是一条保守而重要的信号转导通路, 它对细胞命运的影响非常大, 通过相邻细胞之间的相互作用调节细胞分化、增殖和凋亡, 在许多至关重要的生理、病理过程中都起着重要作用。Notch 信号通路由 Notch 受体、Notch 配体 (DSL 蛋白)、CSL (CBF-1, Suppressor of hairless, Lag 的合称) DNA 结合蛋白、其他的效应物和 Notch 的调节分子等组成。哺乳动物有 4 种 Notch 受体 (Notch1 - 4) 和 5 种 Notch 配体 (Delta-like 1, 3, 4, Jagged1 和 Jagged2), 其中, Dll4 就是 Notch 通路中的一种配体。已有的研究发现, 阻断 Dll4-Notch 信号通路可导致肿瘤生成过多的无效新生血管, 从而达到延缓和抑制肿瘤生长的目的。目前, Notch 信号通路的 Dll4, 被认为是调节血管发生的另一个重要机制, 它在完善肿瘤血管结构和功能中发挥重要的作用; 并且已经证实 Dll4 在多种肿瘤中如肾透明细胞癌、膀胱癌、胃癌、骨肉瘤等高表达, Dll4-Notch 信号通路有望成为针对肿瘤血管发生的又一新靶点, 可能为肿瘤治疗提供新的方向。

本文构建了 Dll4 的重组表达质粒。诱导表达了相关带标签的重组蛋白。利用重组的 Dll4 蛋白免疫小鼠, 通过细胞融合和筛选杂交瘤细胞获得了能稳定分泌 Dll4 的单克隆抗体细胞株。并对该单抗进行 Western blot、IP、流式细胞术、免疫荧光及免疫组化的鉴定。我们还在 K562 细胞系上建立了细胞模型: 通过过表达 Dll4 激活了 K562 细胞的 Dll4-Notch 通路, 并利用 Dll4 单抗作用于这个细胞模型, 通过 CCK-8 细胞增殖活性检测和 Q-PCR 检测, 证实我们筛选的 Dll4 抗体可以抑制该细胞模型中的 Dll4-Notch 通路。

关键词: Dll4; Dll4-Notch 通路; 阻断性抗体

Abstract

In 1917, Notch gene was first found by Thomas Hunt Morgan in fruit flies, and in 1980, the gene was first cloned. Notch signaling pathway is conservative and important, it regulates cell differentiation, proliferation and apoptosis via the interaction between adjacent cells, and plays an important role in a series of physiological and pathological process. Notch signaling pathway is formed by Notch receptors, Notch ligands (DSL), CSL DNA binding protein (CSL refers to CBF - 1, Suppressor of hairless and Lag), other effectors, and regulatory molecules of Notch. Mammals have 4 kinds of Notch receptor (Notch 1 - 4) and 5 kinds of Notch ligands (Delta - like 1, 3, 4, and Jagged 1 Jagged 2). Dll4 is one of the Notch ligands. Blocked Dll4 - Notch signaling pathway can promote nonfunctional vessels formation found in recent research, nonfunctional vessels make nutrients can't be transported to tumors, thus the tumor growth has been delayed and inhibited. At present, in the Notch signal pathway, Dll4 is considered to be another important mechanism of regulating angiogenesis, plays an important role in complete tumor vascular structure and function process. Overexpression of Dll4 and the activation of Notch signaling have been identified in several types of cancers, including clear cell carcinoma of kidney, bladder cancer, stomach cancer and osteosarcoma. Dll4 - Notch signaling pathway is supposed to be a new target of tumor angiogenesis, and may provide a new direction for tumor treatment.

We builded the recombinant expression vectors of Dll4. Induced expression of Dll4 recombinant protein. We used the Dll4 recombinant protein as antigen to immunize the mice, eventually we obtained a positive monoclonal hybridoma, and Charactered the monoclonal antibody by Western blot, IP, flow cytometry, immunofluorescence and immunohistochemistry. In this study, we also overexpressed Dll4 in K562 cells to activate the Dll4-Notch signaling pathway, then we found after antibody treatment, the Dll4-Notch signaling pathway had been blocked.

Key words: Dll4; Dll4-Notch signaling pathway; blocking antibody

厦门大学博硕士学位论文摘要库

缩略语对照表

缩略语	英文全称	中文全称
Dll4	Delta-like 4	
KD	Kilodalton	千道尔顿
HIS	Histidin	组氨酸
GST	Glutathione S-transferase	谷胱甘肽巯基转移酶
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基磺酸钠
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附实验
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
PBS	Phosphate Buffer Solution	磷酸盐缓冲液
FITC	Fluorescein isothiocyanate	异硫氰酸荧光素
EGF	Epidermal Growth Factor	表皮生长因子
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside	异丙基硫代- β -D-半乳糖苷
MAbs	Monoclonal antibodies	单克隆抗体
OD	Optical density	光密度

第一章 前言

1.1 Dll4-Notch 通路综述

1.1.1 Notch 信号通路简介

Notch 信号通路普遍存在于大多数多细胞生物中，是一个在进化上高度保守的信号传导机制，其调控范围非常广泛，所涉及的生物体分布从海胆到人体，通过相邻细胞间的相互作用调节细胞、组织、器官的分化和发育，其中对细胞的分化和发育过程影响非常大，具有掌控作用。Notch 信号通路是相邻细胞之间相互作用进而调控细胞发育的重要通路。

Notch 信号通路由 Notch 受体、Notch 配体（DSL 蛋白）、CSL（CBF-1, Suppressor of hairless, Lag 的合称）DNA 结合蛋白、其他的效应物和 Notch 的调节分子等组成。哺乳动物有 4 种 Notch 受体（Notch 1 - 4）和 5 种 Notch 配体（Delta-like 1, 3, 4, Jagged 1 和 Jagged 2）。Notch 信号的产生是通过相邻细胞的 Notch 配体与受体相互作用，Notch 蛋白经过三次剪切，将胞内段（NICD）释放入胞质，并进入细胞核与转录因子 CSL 结合，形成 NICD/CSL 转录激活复合体，从而激活 HES、HEY、HERP 等碱性-螺旋-环-螺旋 (basic helix-loop-helix, bHLH) 转录抑制因子家族的靶基因，发挥生物学作用。^{[1][1]}

1.1.2 Dll4-Notch 信号通路

目前研究较多的 Notch 信号通路是经典 Notch 通路，也叫做 CBF-1/RBP-JK 依赖途径，在该 Notch 通路活化过程中，Notch 要经过三次裂解，第一次裂解发生在高尔基体内，Notch 成熟期间经由 furin 样转化酶 (furin-like convertase) 作用发生裂解，分为胞外区（NEC）和跨膜片段（NTM）两个亚基，这两个亚基以二硫键相连，形成了异二聚体形式的 Notch 受体，定位于细胞膜表面。在 Notch 受体与 Notch 配体发生结合后，Notch 受体经由金属蛋白酶 (Metalloprotease) /肿瘤坏死因子- α 转换酶 (TNF- α converting enzyme) 的作用裂解为两个片段，其中胞外段被配体表达细胞吞噬，而胞内段在跨膜区被一个高分子量多蛋白复合体裂解，该复合体的主要成分为 γ 分泌酶 (γ -secretase)、突变型早老素 (presenilin) 及各种辅因子，Notch 受体在这第三次裂解后释放出了 Notch

蛋白的活化形式 NICD，NICD 进入细胞核后与 CSL 蛋白结合（CBF1、Su(H)、LAG1）并且募集核转录激活家族 MAML（mastermind-like），形成了一个三元络合复合物之后，Notch 的靶基因转录编码 HES（hairy/enhancer of split）、HEY（Hey—hairy/enhancer--of-split related with YRPW motif family members）等转录因子，进而促进下游基因的表达。其中，阻断 Notch 配体与 Notch 受体的结合是阻断该通路的一个有效手段。如图 1.1 所示：

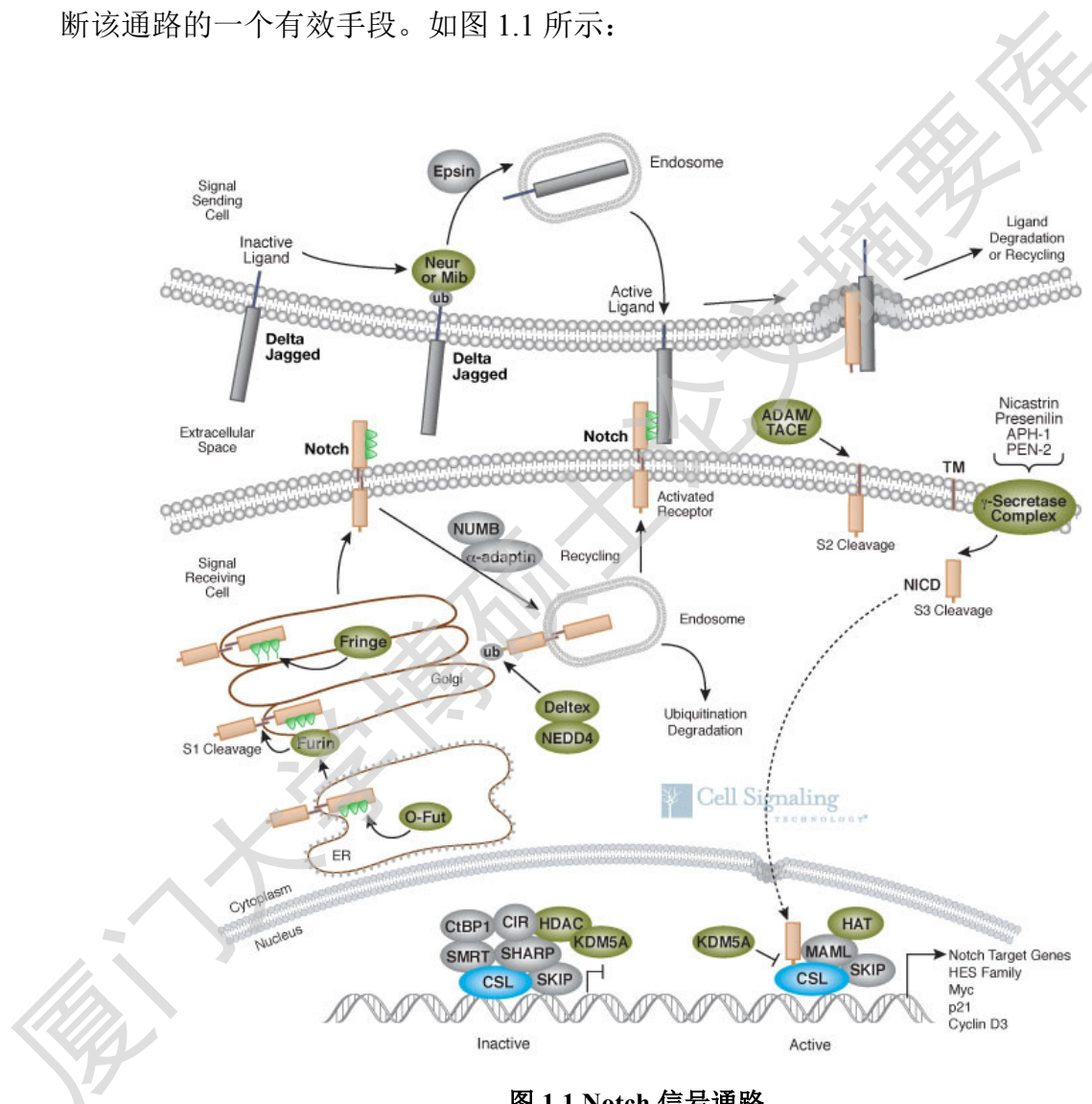


图 1.1 Notch 信号通路

Fig 1.1 Notch signaling pathway

1.1.3 Notch 受体

Notch 受体是由 Notch 基因编码的单次跨膜蛋白，大小约为 300 kD，它包括胞外区（NEC）、胞内区（NICD/ICN）、跨膜区（TM）。其中胞外区包含 36

个串联的表皮生长因子（EGF）序列及三个富含半胱氨酸的 Notch/LIN-12 重复序列（Notch/LIN-12 repeats），其中表皮生长因子序列与受体配体的相互作用过程有关，而 Notch/LIN-12 重复序列位于近膜区，调控胞外区和胞内区的相互作用。Notch 受体的胞内区包含 1 个 RAM（RBP2J kappa associated molecular）区，可与 DNA 结合蛋白（C2 promoter binding protein, CBF）结合、6 个串联的锚蛋白重复序列（ankyrin repeats）、一个富含脯氨酸、谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸的区域（PEST）、一个翻译启动区（TAD）、两个核定位信号（NLS）。哺乳动物中共有四种 Notch 受体，分别为 Notch 1–4，在动物模型检测中，所有 Notch 受体的突变总是会导致发育异常。^{[1][2]}

1.1.4 Notch 配体

Notch 配体为跨膜蛋白，分为两亚类，分别为 Delta 家族和 Serrate 家族，在哺乳动物中有五种 Notch 配体（DSL 蛋白），三种 Delta 家族：Delta-like（Dll1、Dll3、Dll4）和两种 Serrate 家族：Jagged（Jagged1、Jagged2）。Notch 配体是含有保守分子结构的跨膜蛋白，它的胞外段包含 DSL（Delta/Serrate/Lag2）结构域和几个表皮生长因子序列（EGF），与其和受体的结合过程有关。而通常只有 Serrate 家族的胞外端含有富含半胱氨酸的区域。Notch 配体的胞内域较短，仅 70 个左右氨基酸残基，功能尚未阐明。^{[1][2][1][3]}

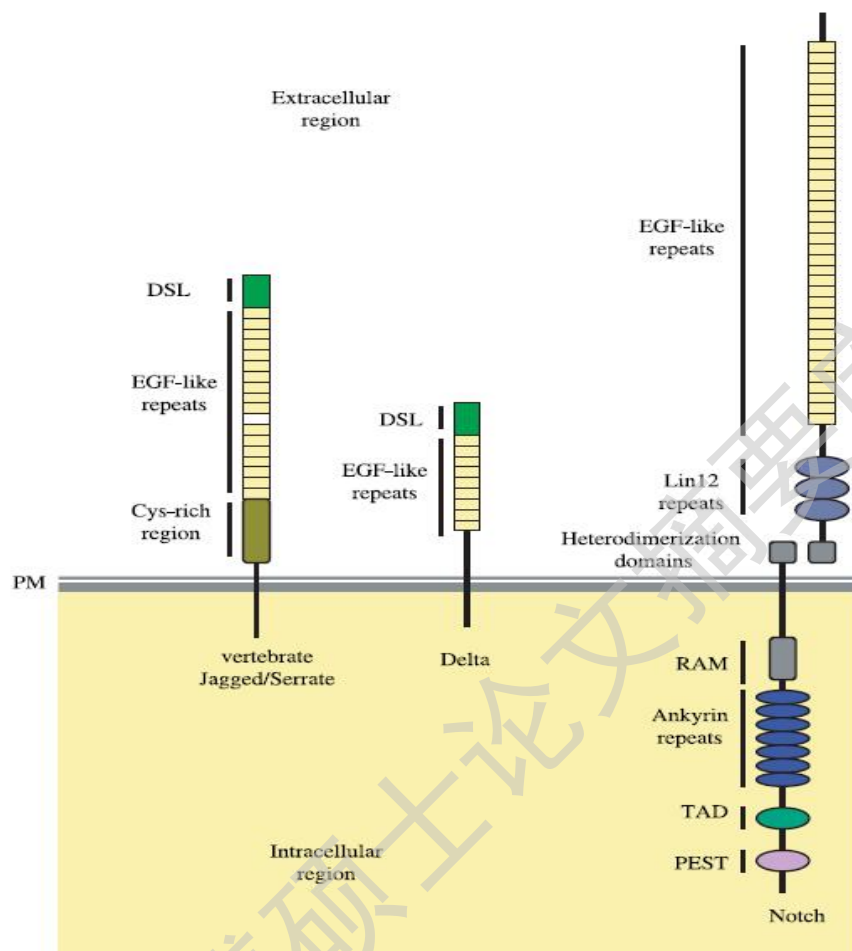
图 1.2 Notch 受体与 Notch 配体的结构^{[1],[2]}

Fig 1.2 The construction of Notch receptors and Notch ligands

1.1.5 Dll4 蛋白的结构特征

Dll4 蛋白是 Notch 配体 Delta 家族的成员，于 2000 年首次被 Stark 实验组报道，Dll4 主要表达于脉管系统，在胚胎发育早期主要局限于大动脉内皮细胞，在胚胎发育晚期 Dll4 主要表达于小动脉和微血管内细胞，且目前已经证实 Dll4 在多种肿瘤中如肾透明细胞癌、膀胱癌，胃癌、骨肉瘤等高表达，在肿瘤血管的发生中发挥着非常重要的作用。Dll4 是一个由 685 个氨基酸组成的单次跨膜蛋白，它包括一个跨膜区和一个胞内区以及一个胞外区，其中胞外区包含 8 个表皮生长因子序列（EGF）和一个在所有 Notch 配体中都保守存在的 DSL 区。Dll4 蛋白可以激活 Notch1 和 Notch4 从而发挥生物学功能。^{[1],[3]}

1.1.6 Dll4 蛋白的生物学功能

研究发现, Dll4 存在于新生血管的内皮细胞、神经管、脑、胸腺、视网膜和造血组织中,^{[1].[3]}在动脉的内皮细胞群和血管前方的内皮顶端细胞都有表达,但不存在于静脉内皮细胞。^{[1].[4]}研究发现当 Dll4 被抑制时,非功能性的血管生成增加,这表明 Dll4 可能在诱导血管生成并诱导血管成熟分化的过程中起着关键的作用。^{[1].[5]}血管生成 (Angiogenesis) 是一个从已有的毛细血管形成新的血管进而重建形成新的血管网的过程,是一个促血管形成因子和抑制因子协调作用的复杂过程。血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是血管内皮细胞特异性的肝素结合生长因子,可在体内诱导血管新生,它是促进血管生成的主要生长因子。研究表明, Dll4 蛋白是抑制血管生成因子,它是血管内皮生长因子的下游基因,对血管内皮生长因子有负反馈作用,从而抑制血管的新生。^{[1].[6]}而在新生的血管中,控制血管出芽、萌发新生血管分支的细胞为尖端细胞 (tip cells), 完成新生血管的延伸的细胞为柄细胞 (stalk cells), 这两种细胞在血管生成中起着重要的作用, 它们的比例影响到整个血管形成的过程。^{[1].[7]}研究表明, 当 Dll4-Notch 通路被抑制、Dll4 表达减少或者 Notch1 表达被抑制都会导致尖端细胞的增加;而当 Dll4-Notch 通路被激活就能使新生血管的分支数量减少。这说明, Dll4-Notch 通路可以通过调控尖端细胞和柄细胞的比例从而来调控正确的新生血管萌芽和分支模式。^{[1].[8]}而在人脐静脉内皮细胞中, Dll4-Notch 通路可以调控不同类型的血管内皮生长因子受体、胎盘生长因子 (PlGF) 等蛋白的表达量, 从而调控血管从增长期进入成熟期和稳定期。^{[1].[9]}并且 Dll4-Notch 通路也可以增加促血管生成因子的分泌, 从而增加动脉的直径并增强其稳定性。^{[1].[10]}种种研究结果都表明 Dll4-Notch 通路在血管生成过程中都扮演着至关重要的角色。

但是 Dll4-Notch 通路的生物学功能并不仅仅止于血管生成, 它还与许多生理过程有关。近期研究表明, Notch 信号通路可与表皮生长因子受体 (EGFR) 协同作用于神经细胞的生成。^{[1].[11]}并且 Dll4-Notch 通路还可以与 VEGF 共同作用, 调节血管的分化, 研究表明, 当 Dll4-Notch 上调时, 内皮细胞中动脉血管标志物 Ephrin B2 的表达量上升, 而静脉标志物 COUP-TF II、Eph B4 的表达量会降低。研究发现, 当 VEGF 浓度高时, 内皮细胞中 Ephrin B2 的表达量占主要比例, 而

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