

学校编码: 10384
学号: 21720081152653

分类号__密级__
UDC__

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

受体 EphB1 在血管发育中功能的初步探索

Primary Study on EphB1 Function in Vascular Development

孟艳敏

指导教师姓名: 袁立

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2011 年 06 月

论文答辩时间: 2011 年 06 月

学位授予日期: 2011 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

年 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。

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。

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	II
1 前 言.....	1
2 实验材料与仪器设备	7
2.1 材料与试剂	7
2.2 主要仪器	9
2.3 试剂配方	9
2.4 载体图谱	12
3 实验方法	14
3.1 人与鸡 EphB1 基因的克隆.....	14
3.2 EphB1 表达载体与 RNAi 载体构建.....	17
3.3 病毒的包装、浓缩与滴定	23
3.4 Western blot.....	25
3.5 Real Time PCR 技术.....	27
3.6 原位杂交	28
3.7 内皮细胞成管、迁移与增殖实验	31
4 结果与分析	34
4.1 神经生长导向分子受体在鸡胚血管系统表达的系统研究.....	34
4.2 EphB1 在人血管内皮细胞的 Real Time PCR 定量分析.....	42
4.3 鸡和人的 EphB1 基因表达载体及干扰载体的构建	43
4.4 鸡 EphB1 干扰载体干扰效果检测.....	46
4.5 人 EphB1 干扰载体干扰效果的检测.....	48
4.6 EphB1 对人内皮细胞增殖、成管、迁移的影响	50
4.7 活体感染 RNAi 病毒后对血管发育的影响	60
5 讨论.....	65
参考文献	69
致 谢.....	73

CONTENTS

Abstract (Chinese)	I
Abstract (English)	II
1 Introduction	1
2 Materials and Equipment	7
2.1 Materials and Reagents	7
2.2 Equipment	9
2.3 Reagents Formula	9
2.4 Vector Map	12
3 Methods	14
3.1 Cloning of human and chicken EphB1 gene	14
3.2 Vector construction	17
3.3 Virus packaging、concentrating and titering.....	23
3.4 Western blot.....	25
3.5 Real Time PCR technology	27
3.6 Whole Mount In Situ Hybridization	28
3.7 Cell tube formation assay、migration assay and proliferation assay.....	31
4 Results and Analysis	34
4.1 The systemic expression studies of neural guidance receptors in chicken embryos	34
4.2 Real Time PCR results of EphB1 in human vascular endothelial cells ...	42
4.3 Construction of expression and silencing vectors of human and chicken EphB1 gene	43
4.4 Detection of cEphB1-RNAi efficiency	46
4.5 Detection of hEphB1-RNAi efficiency.....	48
4.6 The functions of EphB1 in tube formation、migration and proliferation in endothelial cells	50
4.7 The affects of in vivo RNAi to vascular development.....	60
5 Discussion	65
References	69
Acknowledgement	73

摘 要

自从神经导向因子 Netrin-1/Unc5b 调控系统参与血管生长的导向控制被证实以来,血管系统的生长发育存在与神经生长发育类似的导向控制分子机制成为新的认识。神经导向因子及其受体组成的分子系统主要包括: Netrin/Unc-DCC, Slit/Robo, Semaphorin/Plexin-Nrp 和 Ephrin/Eph 四种配体/受体系统。在这些系统的配体和受体家族中,目前仅有部分成员在参与血管发育的调节作用被发掘。对神经导向分子在血管系统中的作用,尚无全面系统的详实资料。

血管的生成是血管内皮细胞与其周围组织细胞相互作用的结果,血管生长的调节主要通过血管生长调节因子作用于血管内皮细胞上的相应受体进行。为了系统了解神经导向分子在血管系统中的作用,发掘新的血管生长控制机制,我们采用鸡胚作为模式动物对神经导向系统受体在内皮细胞中的表达情况进行分析。首先通过半定量 PCR 分析检测神经导向受体在鸡血管内皮及其前体细胞以及三日龄鸡胚全胚细胞中的表达情况,初步筛选出 8 种在血管内皮及其前体细胞中相对特异或高调表达的受体: Nrp2, EphB1, EphA5, EphA3, PlexinD1, A2B, Robo4, Unc5c。接着,我们采用原位杂交技术,研究了这些基因在发育鸡胚的活体动态表达情况。这些数据,为进一步研究神经导向分子在血管系统中的作用,提供了新的依据。

在我们筛选出的神经导向分子受体中,EphB1 在血管发育中的功能研究鲜有报道。我们成功构建了 EphB1 基因的慢病毒干扰载体,通过在人的脐带内皮细胞(HUVEC 及 HUAEC)和发育鸡胚中实施有效地 RNA 干扰,进一步对该基因在血管生成中的作用进行了研究。结果表明,EphB1 对血管内皮细胞的增殖无明显影响,但在内皮细胞的迁移和管状形成中发挥了一定的作用;在早龄鸡胚中对 EphB1 进行有效的 RNA 干扰,鸡胚卵黄膜血管发育受损。因此,我们揭示了 EphB1 在血管发育中发挥了一定的作用。

关键词: 血管发育; 基因表达; 基因功能; 神经导向分子; EphB1

ABSTRACT

With the *in vivo* demonstration that neural guidance factors named Netrin-1/Unc5b were involved in guiding control of vascular development, it became a conception that the mechanism of vascular development is similar to neural development. The neural guidance molecules include mainly 4 ligand-receptor systems: Netrin/Unc-DCC, Slit/Robo, Semaphorin/Plexin-Nrp and Ephrin/Eph. At present, only a minority of those molecules have been reported to participate in the regulation of vascular development, and the overall functions of those molecules in the vascular system remain largely unknown.

The formation of blood vessel results from the interactions between the vascular endothelial cells and the surrounding cells, and the regulation of blood vessel formation is mainly achieved via action of growth factors on their receptors located on the endothelial cells. To dissect further systematically the role of neural guidance factors in vascular development, we have chosen the chicken model for our studies. We first analyzed the expression of neural guidance receptors in chicken vascular endothelial precursor cells with semi-quantitative PCR. And screened out 8 receptors: Nrp2, EphB1, EphA5, EphA3, PlexinD1, A2B, Robo4 and Unc5c, which were relatively specific or upregulated. We subsequently applied whole-mount ISH (in situ hybridization) to confirm their expression in chicken embryos and obtained their *in vivo* dynamic expressions. These results provided new referable information on further studies on the roles of these molecules in vascular development.

Among the neural guidance receptors which we have screened out, EphB1 has barely been reported for its roles in the vascular development. We constructed RNAi lentiviral vectors against the EphB1 of both human and chicken genes, and applied it into the umbilical endothelial cells (HUVEC and HUAEC) and developmental chicken embryos for function studies. Our results showed that EphB1 has no evident influence on the proliferation of vascular endothelial cells; however, it played a certain role in

the migration and tube formation of endothelial cells. EphB1 RNAi in early chicken embryos impaired the vascular development in the yolk sac. Therefore, we revealed that the EphB1 has a role in vascular development.

Keywords: Vascular development; Gene expression; Gene function; Neural guidance molecules; EphB1

厦门大学博硕士论文摘要库

1 前 言

（一）血管发育及神经生长导向因子

血管系统是脊椎动物胚胎发育中第一个发育与执行功能的器官系统，整个胚胎的生长发育都依赖于血管系统的生长与功能活动^[1]。血管系统作为重要的提供生物有机体生长的氧和养分的器官系统，在生物体的生命维系中发挥至关重要的作用。血管的发育不全或过度生长，血管的损伤与功能障碍都会引发一系列疾病，异常的血管新生也是肿瘤发展与转移所必需的病理基础。所以，揭示血管生长控制的机制，生物学及临床意义重大，任何一项有效的血管生长控制技术的建立，都将给相关的临床治疗带来革命性的变化。

血管系统的形成始于胚胎中胚层形成过程中部分中胚层细胞分化为血管内皮前体细胞（angioblast），这些细胞进一步增殖、分化，并通过移行、聚集、极化形成一个最初始的血管网络，这一过程称为血管发生（vasculogenesis），形成仅由内皮细胞组成的胚体主动脉、主要静脉原基和与之相连的蜂窝状毛细血管网络。伴随胚胎的生长发育，这一初始血管网络通过现在被统称为血管新生（angiogenesis）的过程改建与生长，最终形成多级血管组成的功能血管系统。血管新生包括：从已存在的血管发芽（sprouting）、分支（splitting）形成新血管，初始的血管网络生长与重建（remodeling）形成相互连接的具有各级分支的成熟的血管网络^[2]。

随着对血管生成机制的研究进展，血管形成的分子控制的基本信号途径已经逐渐被揭示。1、血管内皮细胞生长因子（VEGF）在血管生成中发挥了主导作用。VEGF 及其受体的信号转导，在血管内皮细胞的增殖与分化以及装配成管的过程中都发挥着关键的作用^[3,4]。缺乏这一信号转导，血管生成不能发生。2、血小板衍生生长因子（PDGF）信号通路在血管壁细胞的募集中发挥了关键的作用。组成新生血管的内皮分泌的血小板衍生生长因子 PDGF，PDGF-BB 将表达其受体的间质细胞募集到血管并影响其增殖与分化，形成血管壁平滑肌细胞（VSMC）^[5]。3、血管生成素（Angiopoietin，简作 Ang）及其受体（Tie）控制着血管内皮细胞与血管壁细胞间的关系，决定新生血管的发展命运^[6,7]。募集到血管的血壁

细胞分泌的血管生成素 1 (Ang1) 作用于内皮细胞上的受体 Tie2, 使得血管内皮细胞与血壁细胞紧密关联, 新生血管得以稳定并发育成熟; 而血管生成素 2 (Ang2) 与 Tie1 结合则解除这种稳定, 导致新生的血管不能发育成熟, 或成熟血管解体, 其血管内皮细胞在 VEGF 的作用下, 进行新的血管生成。4、转化生长因子 β 1 (transforming growth factor β 1, TGF- β 1) 在血管成熟中发挥着重要作用^[8]。血管内皮细胞等分泌 TGF (主要是 TGF- β 1), 作用于募集到血管的血壁细胞, 在它们增殖与分化为 VSMC 过程中发挥作用, 随着 VSMC 的分化成熟和基质的形成, 血管发育成熟。此外, bFGF 和 Notch 信号通路在最初的血管内皮细胞分化中也发挥了重要作用, Notch 信号通路还在心脏内膜和动脉内皮细胞分化中发挥了重要作用^[9]。EphrinB2/EphB4 对动静脉内皮分化有标志性的作用^[10]。自从神经导向因子 Netrin-1/Unc5b 调控系统参与血管生长的导向控制在 2004 年被证实以来^[11], 血管系统生长发育存在与神经生长发育类似的导向控制机制成为新的认识, 这为血管发育的分子机制探讨提供了新的思路。积累的研究结果表明, 血管顶端存在特化内皮细胞, 即顶端内皮细胞 (endothelial tip cell), 它们在血管生成中起到类似于神经生长锥的作用, 引导血管生长的路经^[12]; 血管生长不但存在着与神经生长类似的导向控制机制, 它们还使用了同样的调控系统^[13]。神经生长导向调控主要通过 Netrin/Unc-DCC, Slit/Robo, Semaphorin/Plexin-Nrp 和 Ephrin/Eph 等配体/受体系统 (如表 1-1)。这些系统的配体和受体都有众多的家族成员, 虽然几乎对其所有的成员都有基因敲除的小鼠, 但这些小鼠敲除的研究, 主要聚焦在对神经系统生长发育的作用上, 它们在血管系统生长发育中的作用被忽视。近几年先后发现有其中的 Nrp1、2, EphrinB2/EphB4, Netrin-1/Unc5b, Sema3E/PlexinD1, Slit2/Robo4 等参与了对血管生长发育的调节, 但对其多数是否参与了对血管生长发育的调节尚不得而知^[14], 更没有全面系统的详实资料。

表 1-1 神经生长导向因子受体成员

Table1-1 Members of neural guidance receptor

Families	Receptors
Netrin受体	DCC, A2B Neogenin UNC5A,UNC5B,UNC5C,UNC5D
Slit受体	Robo1,Robo2,Robo3,Robo4
Semaphorin受体	PlexinA1,PlexinA2,PlexinA3,PlexinA4; PlexinB1,PlexinB2,PlexinB3; PlexinC1,PlexinD1,Nrp1,Nrp2
Eph受体	EphA1,EphA2,EphA3,EphA4, EphA5,EphA6,EphA7,EphA8; EphB1,EphB2,EphB3,EphB4,EphB6

(二) Eph/Ephrin

Eph 受体是在 20 世纪 80 年代末被鉴定的，是受体酪氨酸激酶家族中最大的亚族。它们的胞外域由配体结合区（含一个免疫球蛋白样重复序列）、半胱氨酸富集区及后面两个纤连蛋白重复区组成，通过单次跨膜结构域与胞内域连接，胞内域由近膜区、酪氨酸激酶区，SAM（sterile alpha motif）区和 PDZ 结合区组成^[15]（图 1-1）。Eph 受体与 Ephrin 配体结合，Eph 与 Ephrins 根据其结合特性及结构相似性分为 A，B 两个亚族，EphrinA 亚族通过 GPI 锚定在膜上，EphrinB 亚族包括一个跨膜域及相对较短的胞质尾端。EphA 受体优先结合 EphrinA 配体，EphB 受体结合 EphrinB 配体，但是也有一些例外：如 EphA4 结合两种类型的配体，EphrinA5 除了结合 EphA 受体之外还结合 EphB2 等^[16,17]。

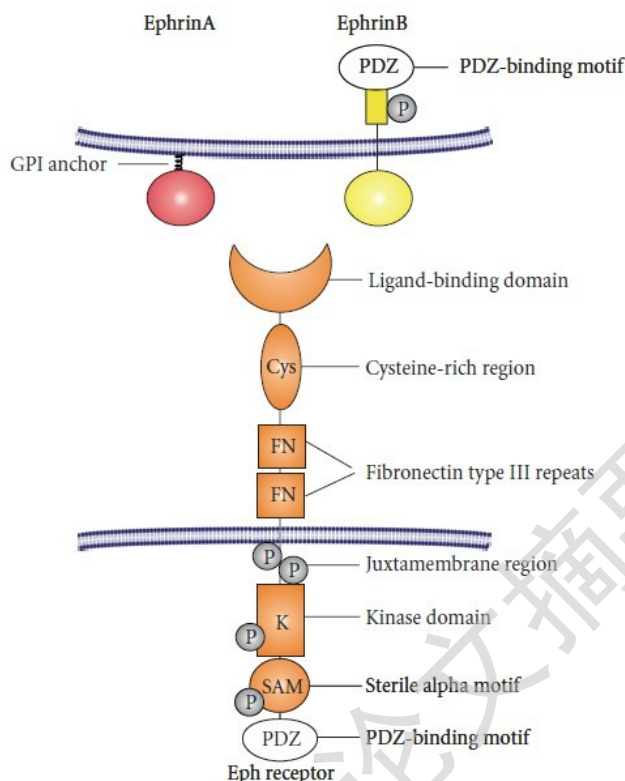


图 1-1 Eph 受体与 Ephrin 配体的结构

Fig 1-1 Structure of Eph receptors and Ephrin ligands

Ephrin/Eph 配受体种类复杂，形成复杂的细胞信号系统，杂乱的结合属性，双向信号转导，多聚体的形成及与其它信号途径的交叉等特点，注定它们功能的复杂多样性。Ephrin/Eph 广泛参与调节胚胎发育、神经系统的发育以及血管新生、肿瘤形成和肿瘤血管新生等过程^[18-20]。Ephrin/Eph 通过调节细胞骨架动力学影响细胞运动性与粘附^[18]，在多种形态发生过程中协调细胞的运动，影响细胞生存^[21]。

Ephrin/Eph 配受体与血管发育相关的研究进展如下：1、EphrinA1/EphA2 在血管形成过程中起着重要作用。EphrinA1 影响内皮细胞的行为，调节毛细血管的出芽，促进毛细管的形成^[22-24]。EphA2 影响 VEGF 诱导的内皮细胞的生存、迁移、出芽及角膜血管新生^[25,26]。2、EphrinB1/EphB1 在 bFGF 诱导的角膜血管新生过程中，起到促进血管生成的作用^[27]。体外研究表明 EphrinB1 有促血管生成的活性，在人的肾微血管内皮细胞中发现由 EphrinB1 激活的 EphB1 受体诱导了成管^[22]。EphrinB1 通过 C 末端蛋白转换正反信号传递，刺激整合素介导的细胞迁移、粘附与血管新生^[28]。3、EphB2、EphB3、EphB4 受体调节血管网络的形成，在心脏血管发育过程中的血管网络形成的调控中是必需的^[29]。4、EphrinB2/

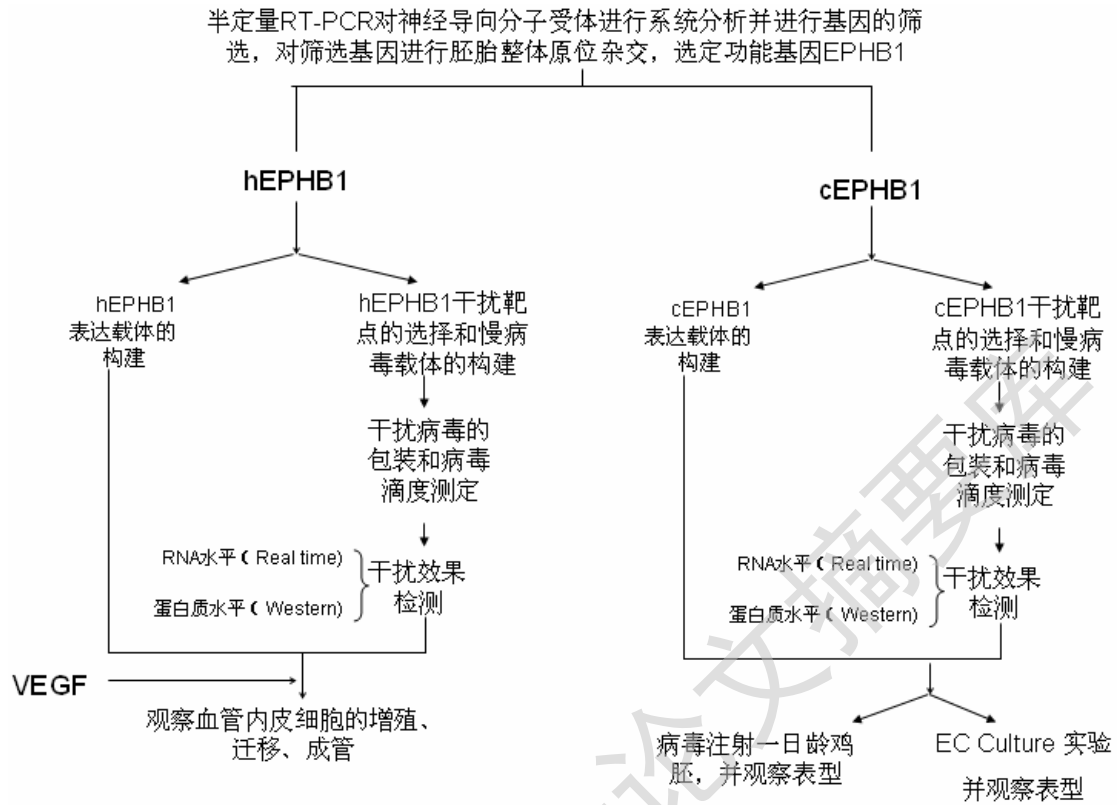
EphB4 对血管的发育是不可缺少的，在确定血管界限中起作用^[10,30]。用 EphrinB2-Fc 片段刺激 EphB4 受体导致 Akt 激酶的磷酸化，增加了内皮细胞的增殖和迁移能力^[31]。EphrinB2 基因敲除小鼠存在血管重塑缺陷^[32]。但对 EphB1 受体在血管形成中的作用机制以及在胚胎血管系统发育过程中的作用鲜有报道。

（三）技术路线及目标

目前对于神经导向系统在血管发育中的调控机制研究主要是通过对小鼠以及斑马鱼等模式动物的基因敲除而被揭示的。小鼠基因敲除周期长，耗费大，而且将影响血管发育的基因敲除后，往往导致胚胎终止于发育早期，小鼠胚胎体内发育的特点，给研究尤其是动态研究带来很大的困难。而斑马鱼毕竟在生物学上与人相距甚远，医学参考性远不如小鼠及鸡胚等更高等的动物。鸡胚经济易得，其体外发育的绒毛膜囊血管系统可以方便地在任何一个发育阶段进行处理和观察，将核酸干扰这一新技术与鸡胚这一优秀动物模型结合，对神经导向分子调控系统的成员，进行系统的功能性研究，将有助于进一步了解这些调控系统的成员在血管发育过程中的调控作用。

血管的生成是血管内皮细胞与其周围组织细胞相互作用的结果，血管生长的调节主要通过血管生长调节因子作用于血管内皮细胞上的相应受体进行。对神经导向调控系统受体在内皮细胞中的表达情况进行系统分析，能为发掘这些系统在血管生长导向控制的功能指明方向。我们首先通过半定量 PCR 技术，对这些系统的所有已知受体（如表 1-1）在鸡的血管内皮及其前体细胞中的表达情况进行系统检测，筛查出相对特异或高调表达的受体，再通过原位杂交技术验证其在发育鸡胚血管系统的表达并研究它们的动态表达情况。在此基础上，我们再结合相关的研究进展，选定一种受体，研究其在血管生成中的功能作用，以期获得神经导向分子在血管系统中作用方面的新知识。在机制研究方面，我们首先构建针对人和鸡的 EphB1 基因的 RNAi 载体，再通过分别在人的脐带血管内皮细胞和活体鸡胚内实施对基因的 RNA 干扰，分析基因在血管发育中的功能与细胞机制。

具体的实验技术路线如下：



期望得到如下结果：

- 1 系统阐述神经导向分子受体在鸡的血管内皮及其前体细胞的表达情况；
- 2 阐述部分神经导向分子受体在发育鸡胚血管系统的动态表达情况；
- 3 新揭示一种神经导向分子受体在血管发育中的功能及其细胞机制。

2 实验材料与仪器设备

2.1 材料与试剂

- 1.质粒： pCMV-Tag2B来自Invitrogen公司； pMD18T sample Vector购自TaKaRa公司产品； pEASY-T1 simple购自Transgene公司
- 2.引物： 上海生工公司与广州英俊公司合成
- 3.限制性内切酶购： Fermentas与TaKaRa公司
- 4.Vent Polymerase： NEB公司
- 5.dNTP： TaKaRa公司
- 6.凝胶回收试剂盒： Omega公司
- 7.DMSO： Sigma公司
- 8.琼脂糖： Regular公司
- 9.DMEM基本培养基干粉： Hyclone公司
- 10.胎牛血清（FBS）： GIBCO公司产品
- 11.新生牛血清（NBS）： 杭州四季青公司
- 12.青霉素和链霉素双抗溶液： Hyclone公司
- 13.胰酶(1: 250)消化液： Hyclone公司
- 14.柠檬酸钠： Sigma公司
- 15.PEG： Ameresco公司
- 16.主要细胞： 293T（人胚胎肾细胞系, ATCC），HUVEC（人脐静脉内皮细胞），HUAEC（人脐动脉内皮细胞）,HDMEC（人皮下微血管内皮细胞）
- 17.HBSS： Hyclone公司
- 18.Polybrene (10mg/ml)： CHEMICO公司
- 19.Trizol： Invitrogen公司产品
- 20.反转录试剂盒： ToYoBo公司
- 21.Taq酶： TIANGEN与Fermentas产品
- 22.DEPC： Amresco公司

23. Tris缓冲盐: Solarbio与Sigma产品
24. 丙烯酰胺: Sigma产品
25. 甲叉双丙烯酰胺: Sigma产品
26. 甘氨酸: Sigma产品
27. 过硫酸铵(AP): Sigma产品
28. 氧化型谷胱甘肽: Sigma产品
29. SDS: Sigma产品
30. EDTA: Sigma产品
31. 星形孢菌素 (STS) : Enzo life sciences
32. hEphB1抗体: SantaCruz产品
33. EphB1-Fc: R&D公司
34. 化学发光底物: Thermo产品
35. SYBR Green: ToYoBo公司
36. 动物细胞蛋白提取蛋白酶抑制剂试剂盒: 上海生工公司
37. 质粒小量提取试剂盒: 东盛生物科技有限公司
38. BCA Protein Assay Kit: Thermo产品
39. RNaseA: 上海生工公司
40. DNA分子marker: TIANGEN
41. T4连接酶: Transgene产品
42. 4×蛋白上样缓冲液: Solarbio产品
43. 原位杂交用DIG探针合成试剂盒: Roche产品
44. Tris-平衡酚: Solarbio产品
45. 其它常用无机盐类及有机液体试剂: 中国国药集团化学试剂有限公司
46. 内皮细胞培养基: Clonetic公司
47. 多聚甲醛(PAF): Sigma产品
48. Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments: Roche产品
49. 梭华-Sofast 基因转染试剂: 太阳马生物工程有限公司
50. 预染蛋白分子marker: Fermentas
51. Trans Taq HiFi: Transgene产品

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