

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104083762 A

(43) 申请公布日 2014. 10. 08

(21) 申请号 201410301523. X

(22) 申请日 2014. 06. 27

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 阎锡蕴 涂滔 杨东玲 冯静
宋丽娜 晏慧文

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 王旭

(51) Int. Cl.

A61K 45/00 (2006. 01)

A61K 39/395 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书8页 附图3页

(54) 发明名称

用于阻断Netrin-1与CD146之间的相互作用的试剂及其肿瘤治疗用途

(57) 摘要

本发明公开了阻断Netrin-1与CD146之间的相互作用的试剂在制备用于抑制新生血管形成的药物中的用途以及在制备用于治疗肿瘤的药物中的用途。本发明还公开了通过阻断Netrin-1与CD146之间的相互作用来抑制新生血管形成和治疗肿瘤的方法。

1. 阻断 Netrin-1 与 CD146 之间的相互作用的试剂在制备用于治疗肿瘤的药物中的用途。
2. 根据权利要求 1 所述的用途,其中所述阻碍 Netrin-1 与 CD146 之间的相互作用的试剂是抗体。
3. 根据权利要求 2 所述的用途,其中所述抗体是针对 CD146 的单克隆抗体。
4. 根据权利要求 3 所述的用途,其中所述针对 CD146 的单克隆抗体是 AA98。
5. 根据权利要求 4 所述的用途,其中所述肿瘤选自平滑肌肉瘤、胰腺癌和肝癌。
6. 阻断 Netrin-1 与 CD146 之间的相互作用的试剂在制备用于抑制新生血管形成的药物中的用途。
7. 根据权利要求 6 所述的用途,其中所述阻碍 Netrin-1 与 CD146 之间的相互作用的试剂是抗体。
8. 根据权利要求 7 所述的用途,其中所述抗体是针对 CD146 的单克隆抗体。
9. 根据权利要求 8 所述的用途,其中所述针对 CD146 的单克隆抗体是 AA98。

用于阻断 Netrin-1 与 CD146 之间的相互作用的试剂及其肿瘤治疗用途

技术领域

[0001] 本发明涉及阻断 Netrin-1 与 CD146 之间的相互作用的试剂在制备用于抑制新生血管形成的药物中的用途以及在制备用于治疗肿瘤的药物中的用途。本发明还涉及通过阻断 Netrin-1 与 CD146 之间的相互作用来抑制新生血管形成和治疗肿瘤的方法。

背景技术

[0002] 癌症是当前危害人类生命健康的头号杀手。我国每年恶性肿瘤的发病人数约 312 万。全国每分钟有 6 人被诊断为癌症,死于癌症者占死亡总人数的 20% 以上,居城市居民死亡原因的第一位(根据 2012 年统计资料)。

[0003] 目前,在肿瘤三大常规(放疗、化疗和手术)治疗中,药物治疗是一个重要方面。影响肿瘤药物治疗效果的因素是多方面的,包括药物的特异性、运输方式、渗透性以及诱发肿瘤耐药性。其中药物的特异性和诱发肿瘤的耐药性是肿瘤治疗学亟需解决的关键问题。抗肿瘤血管治疗以其肿瘤特异性、广谱性、无或低耐药性等优势已成为肿瘤治疗中的一种重要手段。其理论依据主要是上世纪七十年代 Folkman 提出的肿瘤血管生成的概念,即新生血管为肿瘤提供营养和氧分供应,进而促进肿瘤的生长及转移。

[0004] 已有研究发现,神经突起生长导向因子 Netrin-1 能够促进血管内皮细胞的生长和迁移,进而促进血管生成。在发育过程中,神经细胞,上皮细胞,淋巴细胞等多种细胞分泌 Netrin-1,促进血管体系的发育和成型。在病理条件下,肿瘤细胞能合成并分泌大量 Netrin-1,促进肿瘤血管生成。然而 Netrin-1 促进血管生成的机制尚不清楚,其受体及下游信号未知,因此目前尚无针对 Netrin-1 的抗肿瘤血管生成药物。

[0005] 在过去的研究中,已发现免疫球蛋白超家族粘附分子 CD146 在肿瘤血管内皮细胞上上调表达,并促进肿瘤血管生成。靶向 CD146 的单克隆抗体 AA98 能有效的抑制平滑肌瘤,胰腺癌和肝癌中的血管生成,切断肿瘤的养分供应,从而抑制肿瘤的生长,迁移和恶化。

发明内容

[0006] 本发明人首次提出 Netrin-1 是 CD146 的功能性配体,而 CD146 是 Netrin-1 在血管内皮细胞上的受体。Netrin-1 通过结合到血管内皮细胞表面的 CD146 上来激活下游信号通路,促进内皮细胞的生长和迁移。抗 CD146 的单克隆抗体 AA98 能够阻碍 Netrin-1 与 CD146 的结合,因此能够在体内和体外水平上抑制 Netrin-1 引起的下游信号和血管生成过程。

[0007] 以 Netrin-1 作为潜在的治疗靶点在抗肿瘤治疗中的应用是基于以下重要的科学发现:(1)Netrin-1 和 CD146 直接相互作用,是 CD146 的功能性配体;(2)抗 CD146 的单克隆抗体 AA98 能够阻断 Netrin-1 与 CD146 之间的相互作用,进而阻断 Netrin-1 刺激引起的下游信号(p38 和 ERK/NF- κ B)的激活;(3)抗 CD146 单克隆抗体 AA98 能够抑制 Netrin-1 诱导引起的内皮细胞增殖,迁移和血管生成;(4)在小鼠动脉环和 Matrigel plug 模型中,

AA98 能够在体内水平上抑制 Netrin-1 诱导的血管生成 ;(5) 在以往的研究报道中,已经证明抗 CD146 抗体 AA98 能够通过抑制肿瘤血管生成,从而抑制平滑肌肉瘤,胰腺癌和肝癌的生长和恶化。

[0008] 综上所述,Netrin-1 作为 CD146 的功能性配体,能够激活 CD146 的下游信号,进而促进血管生成。过去的研究证实 CD146 是肿瘤治疗中的靶点分子,抗 CD146 的单克隆抗体 AA98 能够有效的抑制肿瘤血管生成。因此,我们提出靶向 Netrin-1 分子能够有效的抑制血管生成,进而阻断肿瘤的养分供应,抑制肿瘤生长。

[0009] 具体的,本发明提供以下各项:

[0010] 1. 阻断 Netrin-1 与 CD146 之间的相互作用的试剂在制备用于治疗肿瘤的药物中的用途。

[0011] 2. 根据 1 所述的用途,其中所述阻碍 Netrin-1 与 CD146 之间的相互作用的试剂是抗体。

[0012] 3. 根据 2 所述的用途,其中所述抗体是针对 CD146 的单克隆抗体。

[0013] 4. 根据 3 所述的用途,其中所述针对 CD146 的单克隆抗体是 AA98。

[0014] 5. 根据 4 所述的用途,其中所述肿瘤选自平滑肌肉瘤、胰腺癌和肝癌。

[0015] 6. 阻断 Netrin-1 与 CD146 之间的相互作用的试剂在制备用于抑制新生血管形成的药物中的用途。

[0016] 7. 根据 6 所述的用途,其中所述阻碍 Netrin-1 与 CD146 之间的相互作用的试剂是抗体。

[0017] 8. 根据 7 所述的用途,其中所述抗体是针对 CD146 的单克隆抗体。

[0018] 9. 根据 8 所述的用途,其中所述针对 CD146 的单克隆抗体是 AA98。

[0019] 10. 治疗肿瘤的方法,所述方法包括阻断 Netrin-1 与 CD146 之间的相互作用。

[0020] 11. 根据 10 所述的方法,其中通过施用针对 CD146 的单克隆抗体来阻断 Netrin-1 与 CD146 之间的相互作用。

[0021] 12. 根据 11 所述的方法,其中所述针对 CD146 的单克隆抗体是 AA98。

[0022] 13. 根据 12 所述的方法,其中所述肿瘤选自平滑肌肉瘤、胰腺癌和肝癌。

[0023] 14. 抑制新生血管形成的方法,所述方法包括阻断 Netrin-1 与 CD146 之间的相互作用。

[0024] 15. 根据 14 所述的方法,其中通过施用针对 CD146 的单克隆抗体来阻断 Netrin-1 与 CD146 之间的相互作用。

[0025] 16. 根据 15 所述的方法,其中所述针对 CD146 的单克隆抗体是 AA98。

附图说明

[0026] 从下面结合附图的详细描述中,本发明的上述特征和优点将更明显,其中:

[0027] 图 1. Netrin-1 与 CD146 在分子水平相互作用。A,人胚胎肾上皮细胞 (HEK293) 中,转染质粒利用免疫共沉淀的方法发现 Netrin-1 和 CD146 相互作用 ;B,体外 pull-down 实验发现 Netrin-1 和 CD146 胞外区存在直接相互作用 ;C,体外 pull-down 实验发现抗 CD146 单克隆抗体 AA98 能阻断 Netrin-1 和 CD146 的相互作用 ;D,利用表面等离子共振 (SPR) 实验测定 Netrin-1 和 CD146 之间相互作用的亲和力常数。

[0028] 图 2, 在体外水平, Netrin-1 促进血管生成依赖于与血管内皮细胞表面的 CD146 结合。A-C, 利用 CD146 特异性的 siRNA 敲低人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 中的 CD146 后, Netrin-1 促进内皮细胞增殖, 迁移和血管生成的功能被抑制; D-F, 抗 CD146 的单克隆抗体 AA98 能够抑制 Netrin-1 诱导的 HUVEC 增殖, 迁移和血管生成。

[0029] 图 3, Netrin-1 激活下游血管生成信号依赖于与血管内皮细胞表面的 CD146 结合。A, 利用 CD146 特异性的 siRNA 敲低 HUVEC 中的 CD146 能抑制 Netrin-1 激活的下游信号; B, 抗 CD146 的单克隆抗体 AA98 能够抑制 Netrin-1 诱导的信号激活。

[0030] 图 4, 在小鼠血管生成模型中, Netrin-1 促进血管生成依赖于和 CD146 的结合。A-B, 在动脉环模型中, 使用 CD146 内皮特异性敲除小鼠或者 AA98 能够抑制 Netrin-1 引起的内皮细胞出芽; C-D, 在 Matrigel plug 模型中, 使用 CD146 内皮特异性敲除小鼠或者 AA98 能够抑制 Netrin-1 诱导的血管生成。

具体实施方式

[0031] 本说明书中使用的抗体 AA98 (Yan, X 等 A novel anti-CD146 monoclonal antibody, AA98, inhibits angiogenesis and tumor growth. Blood. 2003; 102(1):184-191.)、AA1 (本实验室自主生产, 保藏机构: 中国普通微生物保藏中心; 保藏号: CGMCC No. 2310; 保藏日期: 2007. 12. 28) 等可分别根据中国专利申请号 99107586. 2 (CN1234405)、中国专利申请号 200810057260. 7 (CN101245101) 的描述获得。

[0032] 实施例 1: 细胞和体外水平, Netrin-1 和 CD146 相互作用

[0033] CD146 作为内皮细胞粘附分子在血管生成尤其是病理血管生成中起关键作用。Netrin-1 也被报道促进血管生成过程, 但其受体并不清楚。为了研究两者之间的关系, 我们在细胞和体外水平, 利用免疫共沉淀等方法证实 Netrin-1 与 CD146 存在直接相互作用。抗 CD146 的单克隆抗体能够阻断 Netrin-1 和 CD146 之间的相互作用。

[0034] 主要材料: 人胚胎肾上皮细胞 (HEK293) (ATCC, CRL-1573)。

[0035] 主要试剂: 细胞裂解液, PBS, HEPES。鼠源抗 CD146 单克隆抗体 AA1 (本实验室自主生产。保藏机构: 中国普通微生物保藏中心; 保藏号: CGMCC No. 2310; 保藏日期: 2007. 12. 28)。鼠源抗 CD146 单克隆抗体 AA98, 抗 Netrin-1 鼠单克隆抗体 (购自 Enzo Life Science 公司, 货号 ALX-804-838), 重组人 Netrin-1 蛋白 (购自 Enzo Life Science 公司, 货号 ALX-522-100), Fc-CD146 蛋白 (购自 Sino Biological Inc., 货号 10115-H02H), Fc 蛋白 (购自 Sino Biological Inc., 货号 10702-HNAH), His-CD146 蛋白 (购自 Sino Biological Inc., 货号 10115-H08H)。CD146 特异性 siRNA 和对照 siRNA (由 Invitrogen 公司合成, CD146 特异性 siRNA 序列如下)。

[0036] 正向: 5' -CCAGCUCGCGUCUACAAAAdTdT-3'

[0037] 反向: 5' -UUUGUAGACGCGGAGCUGGdTdT-3'

[0038] 主要方法: 免疫共沉淀, 体外 pull-down 及表面等离子共振实验, 具体方法如下:

[0039] 免疫共沉淀:

[0040] 1) 将经过瞬时转染 Netrin-1-pcDNA3.1/myc-his(-)b 质粒和 CD146-p3xFLAG-cmv-14 质粒 (10 μ g) 的 HEK293 细胞接种于 100mm 培养皿中, 当细胞密度达到 90% 后将细胞轻轻刮下, 4 $^{\circ}$ C 离心 5 分钟离心收集于 Ep 管中。

[0041] CD146-p3xFLAG-cmv-14 质粒的相关信息见文献 Zheng, C. 等 Endothelial CD146 is required for in vitro tumor-induced angiogenesis: the role of a disulfide bond in signaling and dimerization. The international journal of biochemistry & cell biology 41, 2163-2172, doi:10.1016/j.biocel.2009.03.014 (2009)。

[0042] Netrin-1-pEGFP-N1 质粒由本实验室构建。使用 pEGFP-N1 载体。人源 Netrin-1 的基因序列如下 (Gene ID: 9423)：

[0043] ATGATGCGCGCAGTGTGGGAGGCGCTGGCGGCGCTGGCGGCGGTGGCGTGCCTGGTGGGCGGGTGGCGGGCGGCGCTCAGCATGTTTCGCGGGCCAGGCGGCGCAGCCCGATCCCTGCTCGGACGAGAACGGCCACCCGCGCCGCTGCATCCCGACTTTGTCAATGCGGCCTTCGGCAAGGACGTGCGCGTGTCCAGCACCTGCGGCCGGCCCCGGCGCGTACTGCGTGGTGAGCGAGCGCGGCGAGGAGCGGCTGCGCTCGTGCCACCTCTGCAACGCGTCCGACCCCAAGAAGGCGCACCCGCCCTTCCTCACCGACCTCAACAACCCGCACAACCTGACGTGCTGGCAGTCCGAGAACTACCTGCAGTTCGCGACAACGTCACGCTCACACTGTCCCTCGGCAAGAAGTTCGAAGTGACCTACGTGAGCCTGCAGTTCTGCTCGCCGCGGCCGAGTCCATGGCCATCTACAAGTCCATGGACTACGGGCGCACGTGGGTGCCCTTCCAGTTCTACTCCACGCGAGTCCGCAAGATGTACAACCGGCCGACCGCGCGCCATCACCAAGCAGAACGAGCAGGAGGCCGTGTGCACCGACTCGCACACCGACATGCGCCCGCTCTCGGGCGGCCTCATCGCCTTCAGCACGCTGGACGGGCGGCCCTCGGCGCAGACTTCGACAACTCGCCCGTGTGCAGGACTGGGTACGGCCACAGACATCCGCGTGGCCTTCCAGCCGCTGCACAGTTTCGGCGACGAGAACGAGGACGACTCGGAGCTGGCGCGGACTCGTACTTCTACGCGGTGTCCGACCTGCAAGGTGGGCGGCCGGTGCAAGTGCAACGGCCACGCGGCCGCTGCGTGCGCGACCGCGACGACGCTGGTGTGCGACTGCAGGCACAACACGGCCCGGCCGAGTGCGACCGCTGCAAGCCCTTCCACTACGACCGCCCTGGCAGCGCGCCACAGCCCGGAAGCCAACGAGTGCCTGGCCTGTAAGTCAACCTGCATGCCCCGCGCTGCCGCTTCAACATGGAGCTCTACAAGCTTTCGGGGCGCAAGAGCGGAGGTGTCTGCCTCAACTGTCGCCACAACACCGCCGGCCGCGCCACTGCCATTACTGCAAGGAGGGTACTACCGCGACATGGGCAAGCCATCACCCACCGGAAGGCCTGCAAAGCCTGTGATTGCCACCCTGTGGGTGCTGTGGCAAAAACCTGCAACAAAACCGGCCAGTGTCCCTGCAAGGACGGCGTGACGGGTATCACCTGCAACCGCTGCGCCAAAGGCTACCAGCAGAGCCGCTCTCCCATCGCCCCCTGCATAAAGATCCCTGTAGCGCCGCCGACGACTGCAGCCAGCAGCGTGGAGGAGCCTGAAGACTGCGATTCCCTACTGCAAGGCCTCCAAGGGGAAGCTGAAGATTAAATGAAAAAGTACTGCAAGAAGGACTATGCCGTCCAGATCCACATCCTGAAGGCGGACAAGGCGGGGGACTGGTGAAGTTCACGGTGAACATCATCTCCGTGTATAAGCAGGGCAGGCGCATCCGCCCGGTGACCAGAGCCTGTGGAATCCGCTCGCGGGACATCGCCTGCAAGTGTCCAAAAATCAAGCCCCTCAAGAAGTACCTGCTGCTGGGCAACGCGGAGGACTCTCCGGACCAGAGCGGCATCGTGGCCGATAAAAAGCAGCCTGGTGATCCAGTGGCGGGACACGTGGGCGCGGCGGCTGCGCAAGTTCAGCAGCGTGAGAAGAAGGGCAAGTGCAAGAAGGCCTAG

[0044] 插入位点：正向为限制性内切酶 Bgl II (AGATCT) 酶切位点，反向为 EcoR I (GAATTC) 酶切位点。

[0045] 2) 加入 600 μ l 裂解液 RIPA Buffer (50mM Tris-HCl, pH7.4, 1% NP-40, 0.25% Na-deoxycholate, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM Na₃VO₄, 1mM NaF, 1mM PMSF 和 1mM proteinase inhibitors cocktails (蛋白酶抑制剂, 购自 Roche 公司, 货号 04693116001)), 冰上裂解 30 分钟, 4 $^{\circ}$ C 离心 (12,000g) 15 分钟。

[0046] 3) 吸取上清为细胞裂解液, 经 Bradford 法测定蛋白浓度之后, 将总蛋白浓度稀释至 1mg/ml。

[0047] 4) 在裂解液中加入 20 μ l protein G-Agarose, 4 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时, 去除与 20 μ l

protein G-Agarose 非特异结合的蛋白质。

[0048] 5) 离心取上清,加入 2 μ g 的 CD146 单克隆抗体 AA1 或 Netrin-1 单克隆抗体,4 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时。

[0049] 6) 再次加入 30 μ l protein G-Agarose,4 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。

[0050] 7) 离心弃上清,沉淀的 agarose beads 用含蛋白酶抑制剂的 PBS 洗 3 次,每次 5 分钟后加入上样缓冲液 100 μ l 涡旋 2 分钟,100 $^{\circ}$ C 煮 10 分钟,离心取上清。

[0051] 8) 处理好的蛋白样品及全细胞裂解液留样一起用于 Western blot 检测。

[0052] 体外 pull-down 实验:

[0053] 1) 将 Fc-CD146 蛋白 200ng 或 Fc 蛋白 200ng 与 Netrin-1 蛋白 200ng 一起融于 500 μ l HEPES 的 EP 管中,或将 2 μ g 抗 CD146 单克隆抗体 AA1 或 AA98 与 His-CD146 蛋白 200ng 及 Netrin-1 蛋白 200ng 一起融于 500 μ l PBS 的 EP 管中,4 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。

[0054] 2) 加入 20 μ l protein G beads,4 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。

[0055] 3) 4 $^{\circ}$ C 离心 5 分钟,弃上清,沉淀的 agarose beads 用含蛋白酶抑制剂的 PBS 洗 3 次,每次 5 分钟后,加入上样缓冲液 50 μ l 涡旋 2 分钟,100 $^{\circ}$ C 煮 10 分钟。

[0056] 4) 处理好的蛋白样品用于 Western blot 检测。

[0057] 表面等离子共振实验:

[0058] 1) 将 1 μ g Fc-CD146 溶于 HEPES 溶液,固定在 CM5 传感芯片上,置于 BIACORE3000 仪器中。

[0059] 2) 将 Netrin-1 蛋白稀释成不同浓度 (18.75nM, 37.5nM, 75nM, 150nM and 300nM), 以 5 μ l/min 的流速流过 CM5 传感芯片。

[0060] 3) Netrin-1 与 Fc-CD146 的结合通过共振单元 (RU) 来测量,经过仪器计算,得到 Netrin-1 与 CD146 相互作用的亲和力常数。

[0061] 结果如图 1 显示,在 HEK293 细胞中,用抗 CD146 抗体 AA1 捕获 CD146 的同时可以检测到 Netrin-1,反之亦然,说明 CD146 与 Netrin-1 存在相互作用 (A)。在体外 pull-down 实验中,如 (B) 所示,CD146 与 Netrin-1 之间存在直接相互作用。另外,利用抗 CD146 单克隆抗体 AA98 或 AA1 捕获 CD146 时 (C),AA1 组能检测到 Netrin-1 蛋白而 AA98 组未检测到,说明 AA98 能够阻断 Netrin-1 和 CD146 的结合。利用表面等离子共振的方法,测定了 Netrin-1 和 CD146 的亲和力常数为 1.33nM (D)。以上结果说明 Netrin-1 与 CD146 直接相互作用,而抗 CD146 单克隆抗体 AA98 能够阻断两者之间的相互作用。

[0062] 实施例 2: Netrin-1 诱导的内皮细胞增殖,迁移和成血管依赖于 Netrin-1 与受体 CD146 的结合

[0063] 血管生成主要为肿瘤提供养分,并为肿瘤细胞转移的提供途径,因此对于肿瘤的生长起到至关重要的作用。抑制血管生成就能够很大程度的抑制肿瘤的生长。Netrin-1 通过与内皮细胞表面的受体 CD146 结合,促进内皮细胞的增殖,迁移和成血管,抗 CD146 的单克隆抗体通过阻断 Netrin-1 与 CD146 的结合来抑制 Netrin-1 诱导的内皮细胞功能。

[0064] 主要材料:人脐静脉内皮细胞系 (HUVEC, 购自 CellSystems Biotechnologie Vertrieb), 96 孔 transwell 板 (Corning HTS Transwell-96 Cell Migration Products)。

[0065] 主要试剂:重组人 Netrin-1 蛋白,CD146 特异性 siRNA (合成于 invitrogen 公司), 抗 CD146 的抗体 AA98, 鼠 IgG (mIgG, 购自 Sigma-Aldrich 公司, 货号 I5381), Matrigel (不

含生长因子, BD Biosciences, 货号 354234), CCK8 细胞增殖试剂盒。

[0066] 主要方法: 细胞增殖, 迁移实验, 内皮细胞成血管实验。具体方法如下:

[0067] 细胞增殖实验:

[0068] 1) 将瞬时转染 CD146 特异性 siRNA 或对照 siRNA 的 HUVEC 细胞以完全培养基悬浮, 制成单细胞悬液 (5×10^4 /ml)。

[0069] 2) 将细胞接种于 96 孔板中 (100 μ l/ 孔, 每种处理设三个平行孔)。

[0070] 3) 向细胞培养基中加入抗体 AA98 或对照 mIgG (50 μ g/ml) 与刺激剂 Netrin-1 蛋白 (50ng/ml), 在 37°C 二氧化碳培养箱中培养 48 小时。

[0071] 4) 使用 CCK8 细胞增殖试剂盒测定细胞密度。

[0072] 细胞迁移实验:

[0073] 1) 将瞬时转染 CD146 特异性 siRNA 或对照 siRNA 的 HUVEC 细胞以完全培养基重悬, 制成单细胞悬液 (1×10^5 /ml)。

[0074] 2) Transwell 下室加入含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基 (购自 Gibco, 货号 31800-022) (200 μ l/ 孔), 上室加入细胞悬液 (100 μ l/ 孔, 每种处理设三个平行孔),

[0075] 3) 向上室的细胞中加入抗体 AA98 或 AA1 (50 μ g/ml) 与刺激剂 Netrin-1 (50ng/ml)。在 37°C 二氧化碳培养箱中孵育过夜。

[0076] 4) 将膜上层的细胞用棉签擦掉, 用镊子将 96 孔 transwell 板的膜揭下, 膜下层朝上放于载玻片上。

[0077] 5) 下层细胞以 4% 多聚甲醛室温固定 15 分钟后, 用 1% 结晶紫染色 15 分钟, 镜检记录每个视野下的细胞数量。

[0078] 内皮细胞成血管实验是在 Nagata 等人建立的实验方法的基础上改进而来, 具体操作如下:

[0079] 1) HUVECs 细胞以完全培养基重悬, 制成单细胞悬液 (1×10^5 /ml)。

[0080] 2) 在 96 孔板中包被冰浴的 Matrigel (50 μ l/ 孔), 37°C 固化 30 分钟。

[0081] 3) 向每个孔中加入 100 μ l 细胞悬液, 同时相应地加入刺激剂 Netrin-1 (200ng/ml) 及抗体 AA98 或 mIgG (50 μ g/ml)。

[0082] 4) 37°C 培养箱中孵育过夜, 之后在倒置显微镜下观察, 拍照。

[0083] 实验结果如图 2(A-C) 所示, Netrin-1 能够增加内皮细胞的增殖, 迁移和成血管能力, 与对照组相比, 转染 CD146 特异性 siRNA 能明显降低 VEGF 刺激所引起的内皮细胞功能。同样的, 抗 CD146 单克隆抗体 AA98 能明显抑制 Netrin-1 刺激引起的内皮细胞增殖, 迁移和成血管 (D-F)。以上结果证实, 与 CD146 的结合对于 Netrin-1 所介导的血管生成过程是必须的。

[0084] 实施例 3: CD146 特异性 siRNA 或抗 CD146 单克隆抗体 AA98 能够阻断 Netrin-1 刺激引起的信号通路的活化

[0085] 在内皮细胞中, Netrin-1 结合到受体 CD146 上, 能激活下游的 ERM, p38, ERK, NF- κ B 等信号分子。CD146 特异性的 siRNA 能够敲低内皮细胞上 CD146 的表达, 抑制 Netrin-1 诱导的下游信号通路。同样, 抗体 AA98 通过阻断 Netrin-1 与 CD146 的结合, 能抑制 Netrin-1 激活的下游信号。

[0086] 主要材料: 人脐静脉内皮细胞系。

[0087] 主要试剂:重组人 Netrin-1 蛋白, CD146 特异性 siRNA, 抗 CD146 的抗体 AA98, 鼠 IgG 等。

[0088] 主要方法:将转染过 CD146 特异性 siRNA 或对照 siRNA 的 HUVEC 细胞用 Netrin-1 (50ng/ml) 刺激后裂解细胞用于生化分析信号通路 (A)。或利用抗 CD146 单克隆抗体 AA98 或 mIgG (50 μ g/ml) 分别孵育 HUVEC 细胞, 37°C 1 小时后, 用细胞培养基清洗三遍后, 再用 Netrin-1 (50ng/ml) 刺激后裂解细胞用于生化分析信号通路。如图所示, Netrin-1 刺激能够引起下游信号分子 ERM, p38, ERK (10 分钟) 以及 NF- κ B (6 小时) 的活化。当使用转染过 CD146 特异性 siRNA 或抗 CD146 单克隆抗体 AA98, 能够阻断由 Netrin-1 引起的下游信号活化。说明 Netrin-1 通过结合到细胞表面的 CD146 上来激活下游信号通路。

[0089] 实施例 4:在小鼠动脉环和 Matrigel plug 模型中, 使用内皮细胞特异性敲除 CD146 的小鼠或 AA98 能够抑制 Netrin-1 刺激引起的血管生成

[0090] 在评估体内血管生成的实验中, 动脉环和 Matrigel plug 是常用的两个模型。动脉环实验通过离体培养小鼠胸总动脉环, 观察内皮细胞出芽的数量。Matrigel plug 实验通过小鼠皮下注射 Matrigel, 在一定天数后取出并切片, 观察血管生成的情况。动物实验证实, Netrin-1 在体内能促进血管生成, 并且这种促进作用依赖于受体 CD146。

[0091] 实验方法:

[0092] 动脉环实验:选取 8 周大小的野生型小鼠 (C57/BL6J, 购自维通利华) 和 CD146 内皮特异性敲除小鼠 (CD146^{EC-KO}, C57/BL6J 背景), 将小鼠断颈处死后取出胸总动脉, 切成厚度为 0.5-1 毫米的动脉环。将动脉环接种于由 Matrigel 胶包被的 96 孔板中, 每组 10 个动脉环。在细胞培养基中对应加入抗体 AA98 或对照 mIgG (100ug/ml), 以及刺激剂重组人 Netrin-1 蛋白 (200ng/ml)。于 37°C 培养箱培养 4-6 天后, 将动脉环置于光学显微镜下观察, 计算内皮细胞出芽数量。

[0093] Matrigel plug 实验:选取 8 周大小的野生型小鼠 (C57/BL6J, 购自维通利华) 和 CD146 内皮特异性敲除小鼠 (CD146^{EC-KO}, C57/BL6J 背景), 每组 5 只。分别在背部皮下注射 500ul Matrigel 胶。Matrigel 胶中分别混有抗体 AA98 或对照 mIgG (100ug/ml), 以及 Netrin-1 (200ng/ml)。注射 10 天后, 断颈处死小鼠。将 Matrigel 形成的结构取出, 拍照后用 4% PFA 固定 24 小时, 石蜡包埋, 切片, 免疫组化分析。以下为石蜡切片的免疫组化过程:

[0094] 1) 取出片子, 入二甲苯溶液 37°C 脱蜡两次, 每次 30 分钟;

[0095] 2) 入无水乙醇 $\times 2$ - 95% - 80% - 70% - 50% - 30% 和蒸馏水中水化, 室温每次 5 分钟;

[0096] 3) 0.3% 过氧化氢 / 甲醇溶液 37°C 避光处理 30 分钟, 消除内源性过氧化物酶的活性, PBS 洗三次;

[0097] 4) pH6.0 柠檬酸修复液 100°C 水浴 30 分钟抗原热修复, 自然冷却;

[0098] 5) 5% 的正常羊血清 (购自中杉金桥公司, 货号 ZLI-9021) 37°C 封闭 1 小时;

[0099] 6) 加入 PBS 稀释的一抗 (兔抗 CD31 多抗, 购自 Abcam 公司, 货号 ab28364 ; 1:50 稀释), 4°C 孵育过夜;

[0100] 7) PBS 洗三次; 山羊抗 - 兔 - 生物素 (购自中杉金桥公司, 货号 ZB-2010 ; 1:1000 稀释) 在 37°C 孵育 1 小时, PBS 洗三次;

[0101] 8) 亲和素 - HRP (购自 Hyclone-pierce 公司, 货号 N100 ; 1:1000) 在 37°C 孵育 45

分钟；

[0102] 9) 现配的 DAB (购自中杉金桥公司, 货号 ZLI-9032 ;1:1000 稀释) 避光显色 2-7 分钟, 苏木素复染。

[0103] 10) 逐级脱水 :50 — 70 — 80 — 90 — 100 — 100%乙醇—二甲苯, 晾干, 中性树脂封片。

[0104] 11) 显微成像系统中拍片。

[0105] 结果显示, 在野生型小鼠中, Netrin-1 能够诱导小鼠内皮细胞的出芽以及血管生成。当使用 CD146 内皮特异性敲除小鼠, 或者使用抗体 AA98 阻断 Netrin-1 和 CD146 之间相互作用时, Netrin-1 促进血管生成的功能受到抑制。以上结果表明, Netrin-1 促进血管生成依赖于与其受体 CD146 的结合。

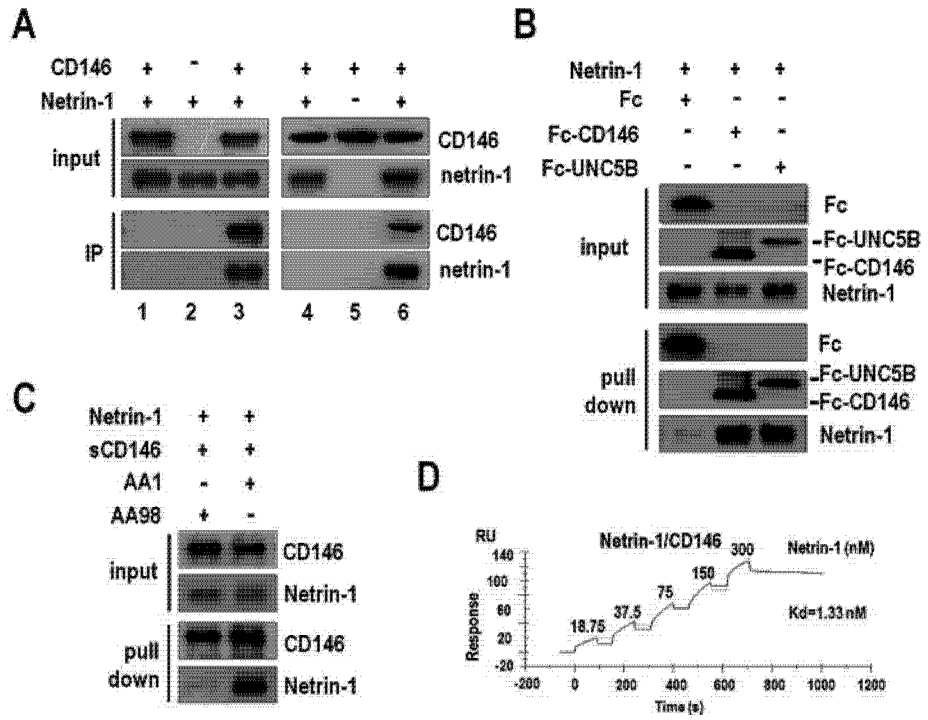


图 1

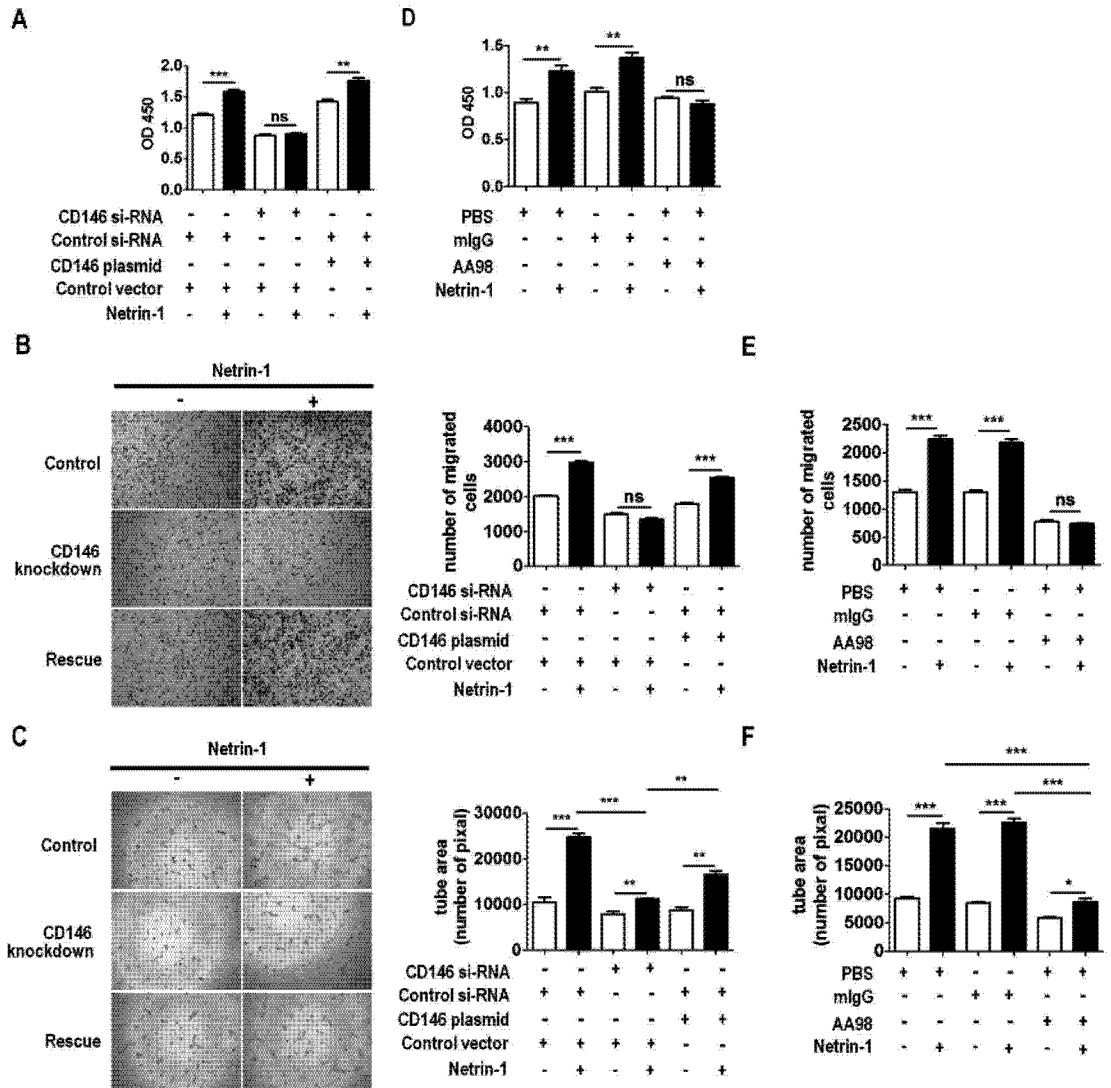


图 2

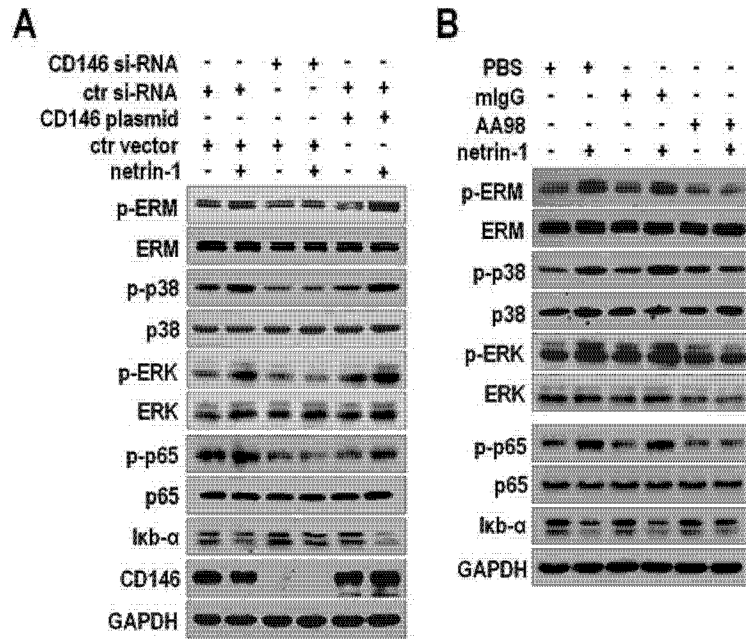


图 3

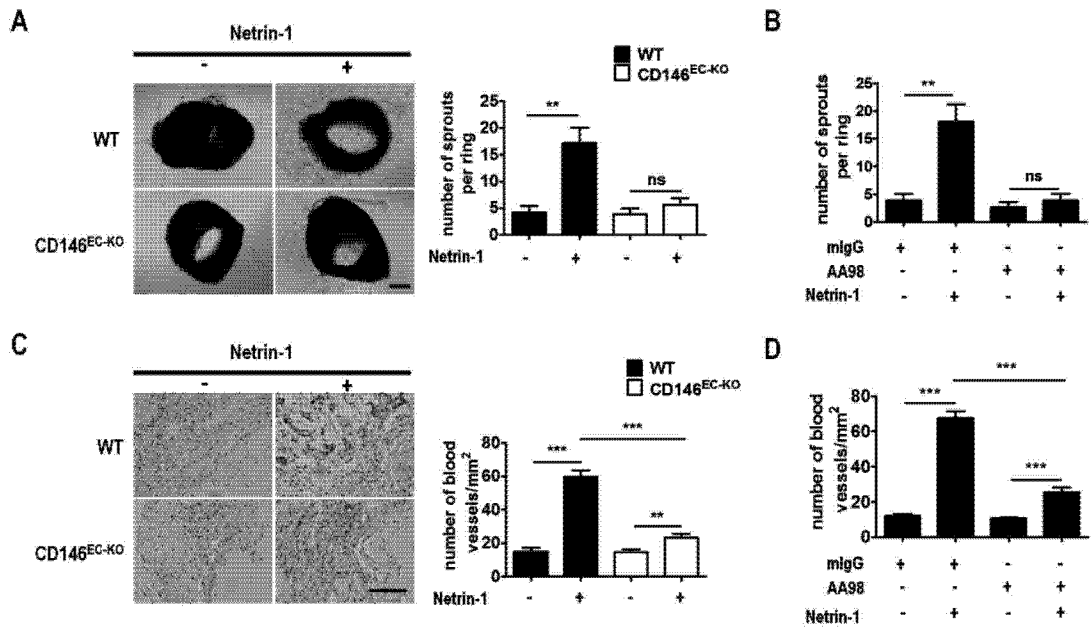


图 4