

Flt-1 胞外 III 区蛋白的可溶性表达、纯化及活性测定

谢印良¹, 谷岳¹, 黄蕊¹, 李雪霞¹, 杜雪², 王金宏¹, 熊冬生¹, 杨纯正¹, 许元富¹

1 中国医学科学院北京协和医学院血液学研究所血液病医院 实验血液学国家重点实验室, 天津 300020

2 天津医科大学总医院, 天津 300020

摘要: 本研究旨在克隆和表达人血管内皮生长因子受体-1 胞外 III 区蛋白, 并测定其生物学活性。应用 RT-PCR 法从人脐静脉内皮细胞中克隆 *Flt-1* 胞外 III 区基因片段, 经测序鉴定后再克隆到原核表达载体 pAYZ 中, 构建出的表达载体 pAYZ*flt-1* III 转化大肠杆菌 16C9 后, 用低磷培养基诱导表达目的蛋白; 采用 E-tag 亲和层析柱纯化目的蛋白; 用 SDS-PAGE、Western blotting 和 BCA 法对其进行定性、定量检测鉴定; 用 ELISA、损伤愈合试验和 Transwell 法检测靶蛋白生物学活性。克隆的 *Flt-1* 胞外 III 区基因经测序鉴定正确。所构建的 pA*flt-1* III 表达载体经低磷培养基诱导后高表达出可溶性 Flt-1 胞外 III 区蛋白, 产量约为 1.1 mg/L; ELISA 结果显示该蛋白可以结合 VEGF₁₆₅, 并表现为剂量依赖性, 其与配体结合的解离常数 K_d 为 1.180 pmol/L。损伤愈合试验和 Transwell 结果显示该蛋白可以抑制 VEGF₁₆₅(50 ng/ml) 和 bFGF(100 ng/mL) 诱导的脐静脉内皮细胞的迁移, 并呈剂量依赖性。这将为今后开展人 *flt-1* 基因 III 区的功能研究及其单抗研制奠定了实验基础。

关键词: 血管内皮生长因子受体 1, 血管新生, 血管内皮生长因子 165

Soluble expression, purification and activity analysis of extracellular domain III of Flt1

Yinliang Xie¹, Yue Gu¹, Rui Huang¹, Xuexia Li¹, Xue Du², Jinhong Wang¹, Dongsheng Xiong¹, Chunzheng Yang¹, and Yuanfu Xu¹

1 The State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China

2 Tianjin Medical university General Hospital, Tianjin 300020, China

Abstract: To prepare a soluble human extracellular III domain of Flt1 and analyze its biological activity. The gene encoding extracellular domain III of Flt-1 was cloned into the expression vector pAZY by RT-PCR from human umbilical vein endothelial cell (HUVEC), and induced to express in *Escherichia coli* by low phosphoric medium, the product was purified by E-tag affinity chromatography. SDS-PAGE and Western blotting analysis showed that Flt-1 gene domain III gene was expressed in *E. coli* and the yield of the soluble fusion protein was about 1.10 mg/L. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) revealed that the Flt-1 domain III was able to bind to VEGF₁₆₅ dose-dependently. Monolayer denudation assay and Transwell assay showed that the fusion protein could inhibit HUVECs migration induced by conditional medium with 50 ng/mL VEGF₁₆₅ and 100 ng/mL bFGF. In conclusion, Flt-1 gene domain III gene has been successfully cloned and expressed in *E. coli*, which will be useful in both the research on the function of Flt-1 gene domain III and preparation of anti-Flt-1 monoclonal antibody in the future.

Received: October 28, 2008; **Accepted:** January 21, 2009

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30400405), Natural Science Foundation of Tianjin (No. 05YFJZJC01200).

Corresponding author: Yuanfu Xu. Tel: +86-22-23909070; Fax: +86-22-27230740; E-mail: xu9669@yahoo.com.cn

国家自然科学基金(No. 30400405), 天津市自然科学基金(No. 05YFJZJC01200)资助。

Keywords: Flt-1, angiogenesis, VEGF₁₆₅

血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)受体 Flt-1 属于酪氨酸激酶受体家族第Ⅱ型,由 1338 个氨基酸残基组成,分为胞外区、跨膜区和胞内区 3 个部分^[1]。它不仅表达于血管内皮细胞、肾小球系膜细胞、胎盘滋养层、单核巨噬细胞,而且在许多实体瘤及血液肿瘤细胞中都有表达上调的现象。Flt-1 胞外区具有 7 个免疫球蛋白样结构域(Ig-like domain),负责与配体结合,近期的研究表明其与配体结合区位于氨基端前 3 个结构域内^[2,3],并且 I 区或/和 II 区结构域在结合过程中起关键作用^[4],但是单独的 Flt-1 胞外区是否能够结合 VEGF₁₆₅ 并影响其生物学功能还不是很清楚。因此,本研究开展了 Flt-1 胞外区基因的克隆和可溶性表达研究,并探讨了表达出的 Flt-1 胞外区蛋白生物学活性,为今后进一步开展相关研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

表达载体 pAYZ 和感受态 *E. coli* 16C9 由本室保存。限制性内切酶,DL 2000 DNA marker 购自 TaKaRa 公司。DNA 片段快速胶回收试剂盒购自北京博大泰克生物基因技术公司。硝酸纤维素膜购于华美公司。PCR 引物序列为: P1, 5'-ACA AAC GCG TAC GCT AAT ACA ATC ATA GAT GTC-3' (*Mlu* I); P2, 5'-TTT GCC TGC GGC CGC TGC TTT ATC ATA TAT ATG CAC TGA GGT GTT-3' (*Not* I)。下划线是括号内的限制性酶切位点。引物由上海生工生物工程有限公司合成。辣根过氧化物酶(HRP)标记鼠抗 E-tag 抗体、抗 E-tag 亲和层析柱均购于 Amersham Pharmacia 公司;人重组 VEGF₁₆₅ 购于晶美生物工程有限公司;HRP 标记羊抗鼠 IgG、异硫氰酸荧光素(FITC)标记羊抗鼠 IgG、FITC 标记兔抗人 IgG 均购于北京中山生物技术有限公司;HUVECs 从新生胎儿脐带中原代分离、培养。

1.2 pAYZFlt-1III 表达载体的构建

从 GenBank 上查得 Flt-1 胞外区的核苷酸序列(GenBank Accession No. NM_002019),应用 DNASIS 计算机软件辅助设计,分别设计出 Flt-1 胞

外区基因的上游引物(P1)和下游引物(P2),Flt-1 胞外区基因共有 300 bp。从新生儿脐带中分离培养人脐静脉内皮细胞(Human umbilical vascular endothelial cells, HUVECs),提取 HUVECs 总 RNA,逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)扩增 Flt-1 胞外 III 区基因,引入 *Mlu* I 和 *Not* I 两个酶切位点用以将 Flt-1 胞外 III 区基因片段亚克隆入载体 pAYZ,然后转化 DH5 α 感受态细胞。用菌体 PCR 法和酶切法筛选克隆,将阳性克隆送至上海英骏生物技术有限公司进行测序鉴定,阳性质粒命名为 pAYZFlt-1。

1.3 人 Flt-1 胞外 III 区 cDNA 基因在大肠杆菌中的表达

试验方法依据 Jiang 等^[5]采取的方法进行。挑取阳性克隆的单菌落接种到含氨苄青霉素(0.1 g/L)的 2YT 培养基中(19 g/L 胰蛋白胨, 10 g/L 酵母提取物, 5 g/L NaCl), 37°C 振荡培养 8 h 后, OD_{600} 约为 1.0~1.3,按 1:2 的比例转接于含氨苄青霉素(0.1 g/L)的 Ap5 培养基中(0.6 g/L 酵母提取物, 11 g/L 酸水解酪蛋白, 1.5 g/L 葡萄糖, 1.2 g/L NaCl, 3.73 g/L KCl, 1.07 g/L NH₄Cl, 0.19 g/L MgSO₄, 0.12 mol/L 三乙醇胺, pH 7.4), 25°C 振荡培养 24 h, OD 约为 0.5~0.65, 4°C 离心收集菌体, -80°C 保存备用。

1.4 Flt-1 胞外 III 区蛋白的纯化

裂菌:冻融菌体,加入细菌外周质腔提取液(三羟甲基氨基甲烷 25 mmol/L, 乙二醇四乙酸 1 mmol/L, 苯甲基磺酰氟(PMSF) 0.1 mmol/L, 蔗糖 200 g/L(W/V), NaCl 200 mmol/L, pH 7.5), 4°C 搅拌裂解 1 h, 4°C、12 000 r/min, 离心 20 min, 收集上清即表达产物的粗提物。

样品准备:表达产物的粗提物用 PBS 于 4°C 透析 12 h, 然后再次 4°C、12 000 r/min, 离心 20 min, 上清即为待纯化的样品。

应用快速蛋白质液相层析(FPLC)法和表达标签(E-tag)的亲和层析柱纯化可溶蛋白用 15 mL 结合缓冲液(磷酸二氢钠 0.01 mol/L, 磷酸氢钠 0.01 mol/L, pH 7.0, 0.22 μ m 孔径的滤膜过滤)洗涤层析柱,待 pH 值 7.0 时开始上样。然后用 10 倍柱体积的结合缓冲液洗涤,再用洗脱缓冲液(甘氨酸 0.1 mol/L, pH 3.0, 0.22 μ m 孔径的滤膜过滤)洗脱, FPLC 在 UV=280 nm

检测下收集吸收峰,用中和缓冲液(Tris-base 1 mol/L,用 HCl 调 pH 值至 8.2)将收集的蛋白样品 pH 值调至 7.0。最后用 SDS-PAGE、Western blotting 分析检测(以上所有蛋白样品和缓冲液冰上放置)。

1.5 Flt-1 胞外 III 区蛋白的活性检测

Flt-1 胞外 III 区蛋白的配体结合分析: 试验方法依照 Novokhatny 等^[6]采取的方法进行。将 VEGF₁₆₅ 蛋白用 PBS 稀释成 3 $\mu\text{g/mL}$, 每孔加入 60 μL , 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜。5%胎牛血清室温封闭 2 h 后, 每孔加入 60 μL 不同浓度的 Flt-1 胞外 III 区蛋白, 每个浓度取 3 个平行孔, 室温孵育 2 h, 弃上清液。用 0.1% PBST(NaCl 8 g/L, KCl 0.2 g/L, Na₂HPO₄ 1.44 g/L, KH₂PO₄ 0.24 g/L, pH 7.4, Tween-20 1 mL/L)洗涤 5 次后, 每孔加入 60 μL 按效价稀释好的 HRP 标记抗 E-tag 抗体, 室温孵育 60 min。0.1% PBST 充分洗涤 6 次, OPD 避光显色 15 min, 加入 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 反应后的酶标板置酶标仪中测定 492 nm 吸光度值。将获得的数据代入方程 $A = \frac{A_{\max} \times L}{K_d + L}$ 即 $A = \frac{A_{\max}}{1 + \frac{K_d}{L}}$ (A 为试验组的光密度与对照组的之差, L 为加入 Flt-1 胞外 III 区蛋白的浓度), 计算 K_d 值。

Flt-1 胞外 III 区蛋白抑制 HUVEC 迁移实验: 采用损伤愈合实验对 Flt-1 胞外 III 区蛋白抑制 VEGF₁₆₅ 诱导的 HUVEC 细胞迁移。取生长状态良好的 HUVECs 细胞, 调整细胞浓度为 $2 \times 10^5/\text{mL}$, 接种于 24 孔细胞培养板中, 每孔接种 500 μL , 采用含 10% FCS M199 进行培养, 另外补加生长因子 VEGF₁₆₅ 25 ng/mL, bFGF 50 ng/mL。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 继续培养至 90%细胞汇合, 更换培养基为 2% FCS M199, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 孵箱中静止 12 h 后, 使用直径约为 525 μm 的 200 μL 微量移液器吸头划线, 造成细胞间的划痕。显微镜下观察, 利用目镜测微尺进行衡量, 保证划痕损伤宽度一致。用无菌 PBS 洗涤划线过程中脱落的内皮细胞 3 遍至无脱落细胞, 加入不同浓度的 Flt-1 胞外 III 区蛋白, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱预孵 2 h 后, 加入终浓度为 50 ng/mL 的 VEGF₁₆₅ 和 100 ng/mL 的 bFGF, 并设单独 VEGF₁₆₅ 和 bFGF 刺激组及单独培养基的对照组。24 h 后倒置相差显微镜下观察内皮细胞在各种处理因素下的损伤愈合程度。吸取培养液, 加入 0.5%结晶紫染色 15 min, 显微镜下观察并照相保存实验结果。随机选取划线损

伤部位面积为 20 mm² 视野内的内皮细胞进行计数作为最终的衡量指标, 采用单因素方差分析对实验数据进行统计分析。

Boyden chamber 法测量 Flt-1 胞外 III 区蛋白抑制 HUVECs 趋化性: Transwell 小室在 24 孔板中浸泡 1 h; 取生长状态良好的 HUVECs 细胞经胰酶消化, 用 2% FBS M199 培养基洗 2 次, 配成 1×10^6 细胞/mL 细胞悬液, 每个小室加入 100 μL ; 下腔室中加入含 50 ng/mL VEGF₁₆₅ 和 100 ng/mL bFGF 的 2% FBS M199 培养基 0.6 mL 和不同浓度的 Flt-1 胞外 III 区蛋白; 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中, 孵育 5 h; 用棉球擦去上表面细胞, 取出 Transwell 用 PBS 洗 3 遍, 台盼蓝染色, 显微镜下观察, 随机计数 5 个视野(100 \times)中的细胞数, 以实验组细胞数与对照组细胞数比值作为衡量指标, 采用单因素方差分析对实验数据进行统计分析。

2 结果

2.1 pAYZFlt-1III 表达载体的构建

从新生儿脐带中分离培养人脐静脉内皮细胞(Human umbilical vascular endothelial cells, HUVECs), 提取 HUVECs 总 RNA, 逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)扩增 Flt-1 胞外 III 区基因, 并引入 *Mlu* I 和 *Not* I 两个酶切位点, Flt-1 胞外 III 区基因和 pAYZ 经 *Mlu* I 和 *Not* I 酶切、连接, 将 Flt-1 胞外 III 区基因片段亚克隆入载体 pAYZ, 构建成 pAYZFlt-1 表达载体(图 1), 然后转化 DH5 α 感受态细胞。用菌体 PCR 法和酶切法筛选克隆(图 2), 将阳性克隆进行测序分析, 结果表明其编码序列正确。

2.2 pAYZFlt-1III 的诱导表达

pAYZFlt-1 表达载体受碱性磷酸酶(phoA)启动子的调控, 转化大肠杆菌 *E. coli* 16C9 后, 经低磷酸盐培养基诱导表达, 由信号肽 stII 引导, 分泌进入细菌外周质腔。此过程有利于蛋白质的正确折叠及二硫键的形成, 从而增加了蛋白质的可溶性^[7]。使用高渗溶液提取细菌外周质腔表达产物, 诱导的表达产物进行 15% SDS-PAGE 电泳, 由 SDS-PAGE 结果可以看出: 与转化空载体 pAYZ 的对照菌相比, 转化 pAYZFlt-1 的菌在 15 kD 处有明显的新生蛋白表达带出现(图 3, 箭头所示), 与预期分子量大小相符。

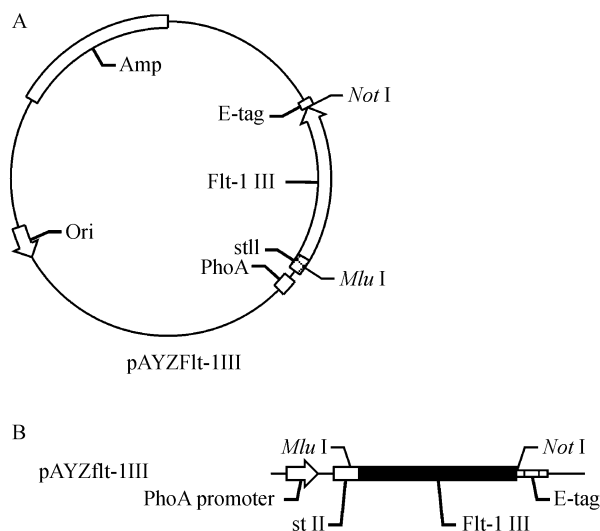


图 1 表达载体的构建 pAYZFlt-1 III

Fig. 1 Construction of the pAYZFlt-1 III. (A and B) Schematic diagrams showing the expression constructs for the soluble Flt-1 III. The drawing is not to scale.

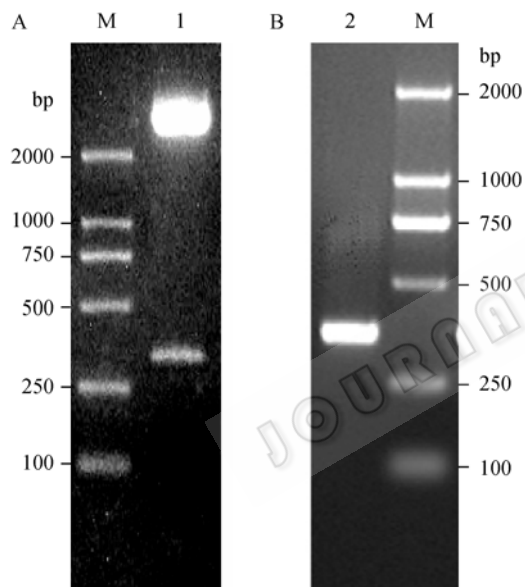


图 2 pAYZFlt-1 III 的酶切产物及 PCR 扩增产物鉴定电泳图

Fig. 2 Identification of restriction enzyme digestion products of recombinant plasmid (A) and the products of PCR (B) by electrophoresis. M: DNA marker; 1: pAYZFlt-1 III (digested with *Mlu* I and *Not* I) (320 bp); 2: PCR products (333 bp).

2.3 可溶性 Flt-1 胞外 III 区蛋白的纯化

在大肠杆菌 16C9 中诱导表达的 Flt-1 胞外 III 区蛋白主要以可溶形式存在。用 E-tag 亲和层析柱纯化, 收集 280 nm 吸收峰并进行 15% SDS-PAGE 电泳和 Western blotting 分析检测, Western blotting 检测结果在 15 kD 处出现一条特异条带, 与预期分子量大小相符(图 3)。纯化产物经 BCA 定量分析, 产量约为

1.1 mg/L。

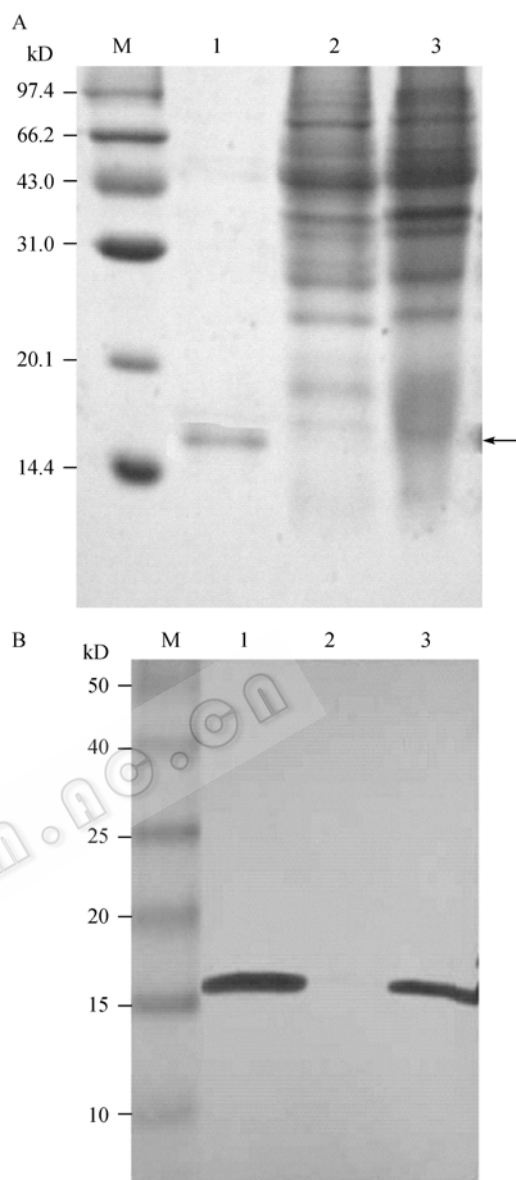


图 3 表达纯化的 Flt-1 胞外 III 区蛋白 SDS-PAGE 和 Western blotting 与分析

Fig. 3 Expression and purification of the Flt-1 domain III. The Flt-1 domain III was expressed in *E. coli*, purified by affinity chromatography, and analyzed by SDS-PAGE (A) and immunoblot analysis (B) with an anti-E-tag antibody. M: protein marker; 1: Flt-1 domain III eluted from the anti-E-tag column; 2: flow-through protein; 3: periplasmic extract from 16c9 cells transformed with pAYZFlt-1 III plasmid.

2.4 Flt-1 胞外 III 区蛋白结合 VEGF₁₆₅ 活性分析

用 3 μg/mL VEGF₁₆₅ 包被 96 孔板, 4°C 包被过夜, 封闭后将可溶性 Flt-1 胞外 III 区蛋白从 10.67 pmol/L 的浓度进行连续倍比稀释 11 个梯度后每孔分别加入 60 μL, 不同浓度设 3 个平行复孔。结果表明当 VEGF₁₆₅ 的量为一定量时, 随着 Flt-1 胞外 III 区蛋白

量的增加, VEGF₁₆₅ 和 Flt-1 胞外区蛋白的结合量在一定范围内也增加, 说明 Flt-1 胞外区蛋白具有和其配体 VEGF₁₆₅ 结合的活性, 其配体结合的解离常数 K_d 为 1.180 pmol/L。结果见图 4。

2.5 损伤愈合试验

采用内皮细胞损伤愈合试验, 检验 Flt-1 胞外区蛋白对 VEGF₁₆₅ 诱导 HUVECs 细胞迁移活性的影响(图 5)。实验结果表明, 与 PBS 阴性对照组相比, VEGF₁₆₅ 可明显促进 HUVEC 细胞迁移, 而实验组加入 Flt-1 胞外区蛋白后, 单层内皮细胞损伤愈合的速度明显较 VEGF₁₆₅ 阳性对照组慢($P < 0.01$)。表明 Flt-1 胞外区蛋白可显著抑制 VEGF₁₆₅ 诱导 HUVEC 细胞迁移。

2.6 Transwell 检测 Flt-1 胞外 III 区蛋白抑制 HUVECs 趋化性

采用 Transwell 实验方法检测 Flt-1 胞外区蛋白抑制 HUVECs 趋化性的影响(图 6)。实验结果表明, 与对照组相比, 实验组加入 Flt-1 胞外区蛋白后 HUVECs 迁移的细胞数随 Flt-1 胞外区蛋白浓度的升高而减少, 相比较没加 Flt-1 胞外区蛋白的对照组差异显著($P < 0.01$)。表明 Flt-1 胞外区蛋白可抑制 VEGF₁₆₅ 诱导 HUVECs 迁移。

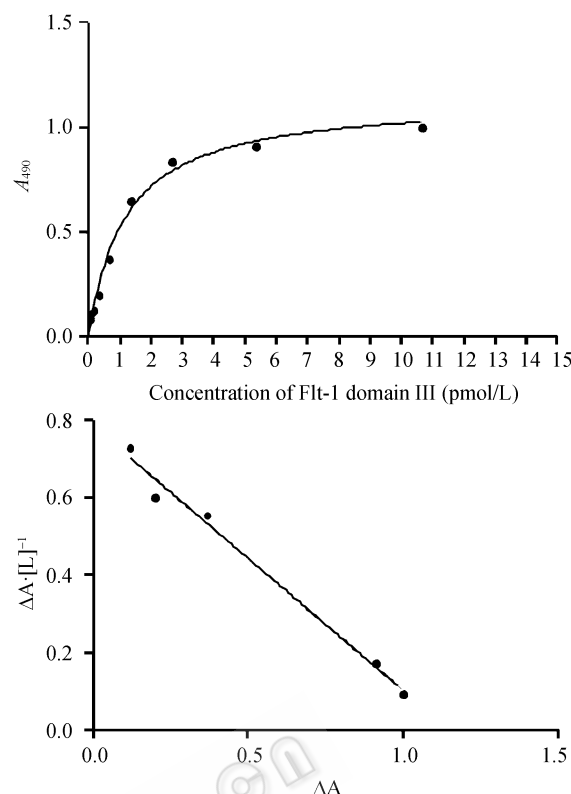


图 4 ELISA 检测可溶性 Flt-1 胞外 III 区蛋白与 VEGF₁₆₅ 的结合活性

Fig. 4 Ligand-binding activity of Flt-1 domain III by ELISA (Scatchard analysis for binding of Flt-1 domain III to VEGF₁₆₅).

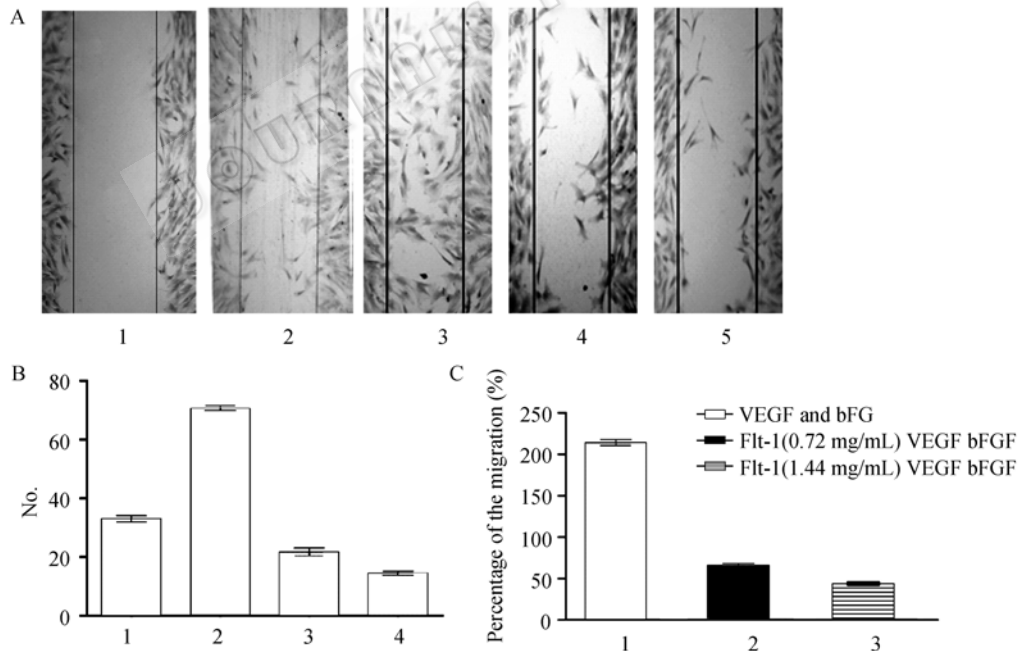


图 5 Flt-1 胞外 III 区蛋白抑制 VEGF₁₆₅ 诱导 HUVEC 迁移

Fig. 5 Flt-1 domain III inhibited VEGF-stimulated HUVECs in a chemokinetic assay. (A) Photomicrographs (10 magnification) showing confluent HUVECs wounded after and the migration of HUVEs into the scraped area after 24 h when treated with media alone (control, 24 h) or with Flt-1 domain III. 1: wounded control, 0 h; 2: media alone; 3: VEGF and bFGF; 4: Flt-1(0.72 μg/mL) VEGF and bFGF; 5: Flt-1(1.44 μg/mL) VEGF and bFGF. (B) The numbers of cells migrated into the scratched area (20mm² area in each line) were counted by random. (C) Data are expressed as a percentage of the migration in untreated endothelial cells (mean \pm SE).

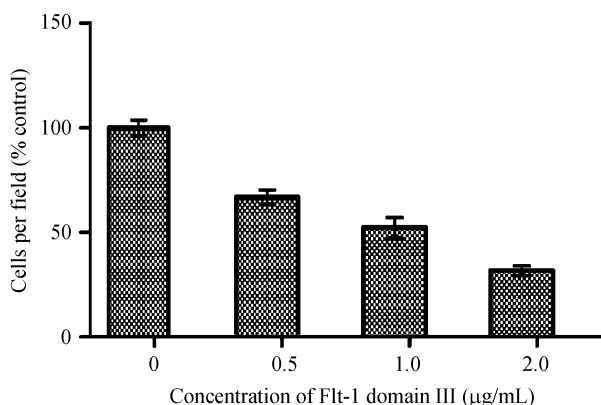


图 6 Transwell 检测 Flt-1 胞外 III 区蛋白抑制 HUVECs 趋化性

Fig. 6 Flt-1 domain III inhibited human endothelial cell migration in response to a chemotactic gradient. Inhibition of HUVEC chemotaxis by Flt-1 domain III was quantitated from 5 random low-power fields/inserts. Data are expressed as cells/field (mean±SE), as a percentage of VEGF and bFGF stimulated migration in the absence of Flt-1 domain III (percentage of control).

3 讨论

目前研究认为, Flt-1 在不同的生理或病理条件下的血管生成过程中具有双重作用, 在胚胎期有可能通过俘获 VEGF-A 从而起到抑制血管新生的负调节作用, 但在成人期病理情况下 Flt-1 与 VEGF 结合后, 则能够增加血管内皮细胞通透性, 使血管内的蛋白外渗, 形成内皮细胞迁移的支架和临时基质, 它还能通过与 PIGF 结合来刺激干细胞的募集和活性, 从而促进血管生成^[8-10]。由此可见, Flt-1 在血管生成过程中起着重要作用。Shapiro 等研究发现可溶性 Flt-1 和 VEGF 在败血病患者中表达上调, 并且认为可溶性 Flt-1 可作为严重败血病患者的一种新的标记^[11]。Pillozzi S 等研究还表明在急性髓性白血病细胞中 Flt-1 参与的信号通路有促进恶性细胞的迁移和侵袭, 从而增加肿瘤的恶性程度^[12]。另外, VEGF-Flt-1 信号通路在中枢神经系统损伤时星形胶质细胞形成疤痕的过程中^[13]以及神经胶质瘤的生长中也起重要的作用^[14]。所以, 对于 Flt-1 功能的进一步研究具有重要的临床意义。

本研究采用 RT-PCR 法成功进行了 Flt-1 胞外区基因的扩增, 并成功构建了 pAYZFlt-1 融合表达载体。经低磷酸盐培养基诱导表达, 利用 pAYZFlt-1 载体表达的 Flt-1 胞外区融合蛋白绝

大部分以可溶状态存在, 位于周质腔提取物上清中。融合蛋白经 E-tag 亲和层析柱纯化, 利用 BCA 方法对其定量分析, 结果表明 Flt-1 胞外区融合蛋白表达量约为 1.1 mg/L。

经 ELISA、细胞损伤愈合试验以及 Transwell 试验检测 Flt-1 胞外区蛋白的活性, 结果表明靶蛋白可结合配体 VEGF₁₆₅ 并能够抑制 VEGF₁₆₅ 诱导的 HUVECs 迁移。这有可能是由于 Flt-1 胞外区蛋白结合 VEGF₁₆₅ 从而抑制了 VEGF₁₆₅ 诱导的细胞迁移信号通路的结果。本实验表达的可溶性 Flt-1 胞外区蛋白具有生物学活性, 这也为今后进一步研究 Flt-1 在血管新生和血管生成中的作用, 以及制备高特异性的抗 Flt-1 单克隆抗体奠定了实验基础。

REFERENCES

- [1] Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, *et al.* Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene*, 1990, 5(4): 519-524.
- [2] Herley MT, Yu Y, Whitney RG, *et al.* Characterization of the VEGF binding site on the Flt-1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 262(3): 731-738.
- [3] Tanaka K, Yamaguchi S, Sawano A, *et al.* Characterization of the extracellular domain in vascular endothelial growth factor receptor-1 (Flt-1 tyrosine kinase). *Jpn J Cancer Res*, 1997, 88(9): 867-876.
- [4] Davis-Smyth T, Chen H, Park J, *et al.* The second immunoglobulin-like domain of the VEGF tyrosine kinase receptor Flt-1 determines ligand binding and may initiate a signal transduction cascade. *EMBO J*, 1996, 15(18): 4919-4927.
- [5] Jiang W, Xiong D, Liu F, *et al.* Study on the construction and expression of the human 4-1BBL extracellular domain/anti-CD20 Fab' fusion protein. *Chin J Biotech*, 2008, 24(3): 376-380.
姜文国, 熊冬生, 刘芳, 等. 人 4-1BBL 胞外区/抗 CD20Fab'融合蛋白的构建和表达. *生物工程学报*, 2008, 24(3): 376-380.
- [6] Novokhatny V, Medved L, Lijnen HR, *et al.* Tissue-type plasminogen activator (tPA) interacts with urokinase-type plasminogen activator (uPA) via tPA's lysine binding site. An explanation of the poor fibrin affinity of recombinant tPA/uPA chimeric molecules. *J Biol Chem*, 1995, 270(15): 8680-8685.
- [7] Xu YF, Xiong DS, Yang CZ, *et al.* The mutation of antibody (HIT3a) gene and its expression. *Chin J Hematol*, 2001, 22(5): 252-255.
许元富, 熊冬生, 杨纯正, 等. 抗 CD3 抗体(HIT3a)基因突变及其表达研究. *中华血液学杂志*, 2001, 22(5): 252-255.

- [8] Eriksson U, Alitalo K. VEGF receptor 1 stimulates stem-cell recruitment and new hope for angiogenesis therapies. *Nat Med*, 2002, **8**(8): 775-777.
- [9] Hattori K, Heissig B, Wu Y, *et al.* Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nat Med*, 2002, **8**(8): 841-849.
- [10] Kappas NC, Zeng G, Chappell JC, *et al.* The VEGF receptor Flt-1 spatially modulates Flk-1 signaling and blood vessel branching. *J Cell Biol*, 2008, **181**(5): 847-858.
- [11] Shapiro NI, Yano K, Okada H, *et al.* A prospective, observational study of soluble FLT-1 and vascular endothelial growth factor in sepsis. *Shock*, 2008, **29**(4): 452-457.
- [12] Pillozzi S, Brizzi MF, Bernabei PA, *et al.* VEGFR-1 (FLT-1), beta1 integrin, and hERG K⁺ channel for a macromolecular signaling complex in acute myeloid leukemia: role in cell migration and clinical outcome. *Blood*, 2007, **110**(4): 1238-1250.
- [13] Krum JM, Mani N, Rosenstein JM. Roles of the endogenous VEGF receptors flt-1 and flk-1 in astroglial and vascular remodeling after brain injury. *Exp Neurol*, 2008, **212**(1): 108-117.
- [14] Kerber M, Reiss Y, Wickersheim A, *et al.* Flt-1 signaling in macrophages promotes glioma growth *in vivo*. *Cancer Res*, 2008, **68**(18): 7342-7351.

快 讯

科学家发现培育干细胞更安全方法

英国和加拿大科学家3月1日在《自然》杂志网站上报告说,他们发现了一种可以安全将普通皮肤细胞转化为诱导多功能干细胞的方法,这种方法不但首次使得转化过程不需要借助病毒,而且有望使生物医学研究彻底告别使用胚胎干细胞。研究人员说,这标志着诱导多功能干细胞研究向临床应用迈出了重要一步。

据国外媒体报道,英国和加拿大研究人员找到一种把普通皮肤细胞转变成干细胞的更加安全的方法,这一发现最终或许能解除干细胞培养过程中对人类胚胎的依赖。这是科学家第一次在不利用滤过性病原体的情况下,把皮肤细胞转变成诱导多功能干细胞,又称iPS细胞。诱导多功能干细胞看起来以及作用都与胚胎细胞类似。有了这种新方法,以前为了促使细胞重组而植入基因的过程也可以省略掉。

干细胞是身体的基本细胞,它生成各种各样的身体组织和器官。胚胎是其中最具有影响力的一种,它具有生成任何类型的组织的潜能。然而很多人反对利用它们,因此,如果这种培育诱导多功能干细胞的方法更安全,这项新发现成为备受关注的选择性方法。

有段时间研究人员了解到,利用大量基因可以把普通皮肤细胞转变成诱导多功能干细胞。但是要把这些基因转变成细胞,他们必须使用滤过性病原体,而病原体把自身遗传材料与被它感染的细胞的遗传材料结合的过程可诱发癌症。英国和加拿大的两个科研组在《自然》杂志上详细介绍了这种新方法,该方法显然能避免上述具有破坏性的风险。这些研究人员利用少量被称作转位子的DNA传送4中基因。由于转位子可以在遗传密码里面四处移动,因此它有时又被称作“跳跃基因”。

他们利用的这种转位子又被称作“转座因子(Piggybac)”,研究人员曾利用它改变很多生物体。英国爱丁堡医学研究理事会(MRC)再生医学中心(Centre for Regenerative Medicine)的坪井将树(Keisuke Kaji)说:“这项最新发现向在医学中实际应用重组细胞迈进了一步。有了这种方法,科学家或许将不再利用人类胚胎培育干细胞。”他和来自加拿大多伦多大学的安德拉斯·纳吉通过老鼠和人类皮肤细胞验证这一方法,结果发现这种重组细胞的作用跟胚胎细胞一样。

爱丁堡医学研究理事会会长伊恩·威尔玛特是参与克隆首只哺乳动物——“多利”的一位科学家,他表示,虽然还需要一些时间,这种诱导多功能干细胞才能被应用到患者身上,但是该方法是干细胞技术向前发展的重要一步。他说:“将这种新方法与其他科学家在干细胞分化方面所取得的成果相结合后,再生医学将会取得重大突破。”医生希望有一天可以利用干细胞治疗帕金森病、糖尿病、癌症和脊髓损伤等疾病。

中新网3月2日电 据“中央社”报道,英国及加拿大的研究人员研发出不需使用病毒就可由皮肤细胞培育出人类万能细胞的方法,这种新法不易使基因癌化。可以说是再生医疗的一大突破。英国爱丁堡大学教授(木尾)圭介所组成的研究小组及加拿大的研究小组,首度研发出不使用病毒研制的人类万能细胞,与使用病毒研制的效率相较,前者效率高逾25倍。这项研发成果发表于本月1日的英国科学杂志“自然”电子版。

人类首度研发出的万能细胞是使用“反转录病毒”(retrovirus)将数千基因导入体细胞,但有科学家认为,为了将基因植入体细胞的染色体,反转录病毒容易使基因引发异常,导致癌化。为了制造出安全度更高的完能细胞,(木尾)圭介等研究人员是以“移转子”(transposon)将制造万能细胞所需的四个基因同时导入人类胎儿的纤维母细胞,成功地制造出万能细胞。

(木尾)圭介等研究小组初期采用的方法虽可去除被植入的基因,但会留下一些痕迹,安全上有影响。但在配合加拿大研究小组独立开发的技术后,成功地去除四个基因。染色体中的基因去除后,也具有分化成各种细胞的能力。研制出万能细胞的日本京都大学教授山中伸弥,去年没使用病毒研制出老鼠万能细胞,但他并未成功地制造出人类万能细胞。

摘自《新浪科技》
<http://tech.sina.com.cn>