

VEGF 受体 KDR 胞外区基因的克隆及其在昆虫细胞中的表达

曾革非 张智清* 张立国 陈爱君 姚立红 侯云德

(中国预防医学科学院病毒学研究所病毒基因工程国家重点实验室 北京 100052)

摘 要 VEGF(血管内皮细胞生长因子, Vascular Endothelial Growth Factor)是刺激内皮细胞增殖和新生血管形成的最重要因子,与多种实体瘤的生长和转移密切相关。应用其可溶性受体阻断它的病理作用是一个非常具有前景的课题。将 VEGF 受体 KDR 胞外区前三个 Loop 969 碱基对的 cDNA 片段克隆到杆状病毒表达载体 pFastBac1,与杆状病毒表达载体 Bacmid 同源重组后,转染昆虫细胞 SF-9,获得重组杆状病毒并证明了目的基因的高效表达。经 Western blot 证实表达产物的特异性。经 ELISA 和体外生物学活性检测表明表达产物可阻断 VEGF 的生物学活性,抑制鸡胚 CAM 血管的生长。

关键词 血管内皮细胞生长因子受体,克隆,杆状病毒表达

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)02-0140-05

VEGF(血管内皮细胞生长因子, Vascular Endothelial Growth Factor)是特异性刺激内皮细胞增殖的一种细胞因子^[1,2],在胚胎期血管发生和血管生成过程中发挥重要作用。VEGF 在成人正常组织中含量极低,但在病理状态下大量分泌,如伤口愈合、糖尿病视网膜病变、肿瘤等^[3,4,5]。VEGF 受体分布于内皮细胞表面,共有 3 种,Flt-1、KDR 和 Flt-4。它们具有酪氨酸激酶活性的共同特征,其中胞外区负责与其配体 VEGF 结合。研究表明 KDR 在肿瘤组织中分泌增高,推测其在促进肿瘤生长中起着更重要的作用。

KDR 由 1356 个氨基酸组成,分为胞外区、跨膜区和胞内段三个部分。其 N 端 753 个氨基酸为胞外区^[6]。KDR 受体胞外区具有与免疫球蛋白类似的结构,分为 7 个环状结构(Loop),研究结果表明配体结合域位于其 N 端 3 个环内^[7]。

近年来,对 VEGF 及其受体的结构与功能作了大量的研究,VEGF 及其受体的抗体治疗肿瘤取得了一定进展^[8~10],但用可溶性受体阻断 VEGF 的病理作用的实验尚未见报道^[11]。我们在昆虫细胞中表达了 KDR 胞外区前 3 个 Loop,对表达产物的免疫学和生物学活性作了鉴定。本文对进一步探讨用 VEGF 可溶性受体治疗血管生成相关疾病具有

重要的理论和实际意义,为新的肿瘤生物治疗产品提供了实验基础。

1 材料与方法

1.1 细菌和质粒

大肠杆菌 DH5 α 由本室保存。pGEM-T 载体购于 Promega 公司。SF9 细胞、人静脉内皮细胞(EC)由本室保存。含有 KDR 全长胞外区基因的质粒 pGEM-T/KDR 由本实验室克隆构建,其中 KDR 全长基因是通过 RT-PCR 在人胎盘静脉血管内皮细胞中获得的。抗 KDR 胞外区抗体由北京医科大学肿瘤研究所提供。感受态细胞 DH10BAC、昆虫细胞 SF-9、Grace 培养液、CellFectin 购自 Gibco BRL 公司。

1.2 酶及试剂

各种限制性酶及修饰酶购于 Biolab 和 Promega 公司。重组人 VEGF 由本室制备。鼠抗人 KDR(1~4 Loop)单克隆抗体由北京医科大学肿瘤研究所分子肿瘤室惠赠。

1.3 重组杆状病毒表达质粒 pFASTBAC1-KDR₃ 的构建

以含 KDR 全长胞外区基因的质粒 pGEM-T/KDR 为模板,用以下引物 PCR 扩增 KDR 前 3 个

收稿日期 2000-09-28 修回日期 2000-12-19。

基金项目 国家 863 高技术发展计划项目资助(102-08-01-03)。

* 通讯作者。Tel 86-10-63519655 Fax 86-10-63532053 E-mail zhangzq@public3.bta.net.cn

Loop 的基因 :

5'端引物 : 5' TAG GAT CCA TGA GCA AGG TGC TGC TG3'

3'端引物 : 3' TA GGA TCC TAT TAG ACA AAT GTG CTG 3'

将 PCR 产物克隆到 pGEM-T 载体中 , 构建成重组质粒 pGEM-T/KDR_{n3}。用 BamHI 从 pGEM-T/KDR_{n3} 上切下目的基因片段 , 回收纯化后 , 克隆于杆状病毒表达质粒 pF_{AST}B_{AC}I 的 BamHI 位点 , 挑取正向插入的克隆 , 得到重组杆状病毒表达质粒 pF_{AST}B_{AC}I/KDR_{n3}。

1.5 重组表达质粒的构建及转化

KDR_{n3} 片段与供体质粒 pF_{AST}B_{AC}I 连接。挑取正确插入质粒 , 转化含有杆状病毒表达载体 Bacmid 的感受态细胞 DH10BAC , 涂 AGTLB 平皿 (氨苄青霉素 50μg/mL 庆大霉素 50μg/mL 四环素 70μg/mL IPTG X-Gal) , 挑白斑 , 温和提取同源重组质粒 , 立即进行细胞转染。

1.6 细胞转染、病毒培养及表达产物分析

取同源重组质粒 5μL , 用 Cell FECTIN 将质粒转染生长状态良好的 SF-9 细胞。48~72h 后离心收获细胞。SDS-PAGE 电泳分析蛋白表达产物。

1.7 Western-blot

表达产物按常规方法进行 SDS-PAGE 电泳、转膜、封闭 , 依次加入抗 KDR 抗体和酶标二抗 , 最后用底物液显色。

1.8 间接 ELISA 检测表达产物与配体的结合活性

用间接 ELISA 方法检测表达产物与配体的结合活性。按常规方法做 ELISA 反应 , 表达产物以包被液做倍比稀释。1% BSA 封闭后 , 依次加入 VEGF 鼠抗 VEGF 单抗 , 羊抗鼠 IgG-HRP 二抗 , 及 OPD 底物显色液 , 490nm 波长下测定每孔的 OD 值。

1.9 细胞水平检测表达产物的生物学活性

采用³H 掺入法。在 96 孔细胞培养板上每孔加入 EC 细胞 500 个 , 37℃ 培养 24h , 吸去细胞上清 , 将样品用含 1% 血清的 1640 培养液在 96 孔细胞培养板上做倍比稀释 (每孔 50μL) , 每个稀释度平行做 3 孔 , 加入 10μL ³H-TdR (1μCi/孔) , 37℃ 培养 3h 后 , 用液闪及化学发光计数仪 (Packard 公司 , 型号 : TopCount^{NXT}) 测定放射性。

1.10 rFlt-1_{n3} 对鸡胚尿囊膜血管生成的抑制作用

取 5 日龄鸡胚 , 将待测样品滴到玻璃纤维素膜上 , 待干燥后放在绒毛尿囊膜上 , 封口后继续孵化

72h , 观察绒毛尿囊膜血管生成情况^[12]。

2 结果

2.1 KDR_{n3}cDNA 杆状病毒表达质粒的构建

用 BamHI 从 pGEM-T/KDR_{n3} 切下目的基因片段 , 回收纯化后 , 克隆于杆状病毒表达质粒 pF_{AST}B_{AC}I 的 BamHI 位点 , 挑取正向插入的克隆 , 得到重组杆状病毒表达质粒 pF_{AST}B_{AC}I/KDR_{n3} (图 1)。

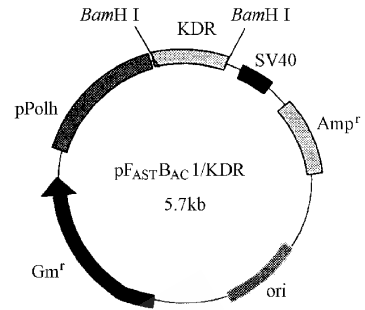


图 1 重组质粒 pF_{AST}B_{AC}I/kDR 结构图

Fig. 1 Map of recombinant plasmid pF_{AST}B_{AC}I/kDR

2.2 KDR_{n3} 在昆虫细胞中的表达

从 DH10BAC 中提取含有目的基因的重组 Bacmid 质粒 , 转染昆虫细胞后获得含有 KDR_{n3d} 基因的重组杆状病毒。重组病毒感染昆虫细胞 , 培养 72h 后收集细胞上清 , 加 TCA 沉淀后进行 SDS-PAGE 分析。与阴性对照相比 , 在预计大小 (37kD) 有一与受体分子量极为接近的条带 (图 2)。

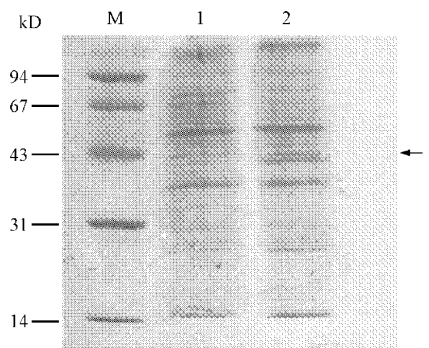


图 2 KDR_{n3} 在昆虫细胞中表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of KDR_{n3} expressed in insect cells

1. Supernatant of SF9 cells ;

2. Supernatant of SF9 cells expressing KDR_{n3}

2.3 Western-blot 检测

按常规方法对表达产物进行 Western-blot 分析。结果表明在对应于目的蛋白的位置有特异条带产生 (图 3) , 证实了表达产物的抗原特异性。

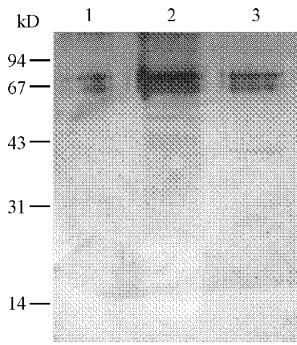


图 3 昆虫细胞表达的 KDR_{n3} 的 Western blot 分析

Fig. 3 Western-Blot analysis of KDR_{n3} expressed in insect cells

1. Supernatant of SF9 cells ; 2. Supernatant of SF9 cells infected with wild bacularvirus ; 3. Supernatant of SF9 cells infected with recombinant bacularvirus expressing KDR_{n3}

2.4 表达产物与 VEGF 的结合活性

用间接 ELISA 方法检测表达产物与 VEGF 的结合活性。结果如图 4 所示,昆虫细胞表达的 KDR_{n3} 具有与 VEGF₁₆₅ 特异结合的活性。

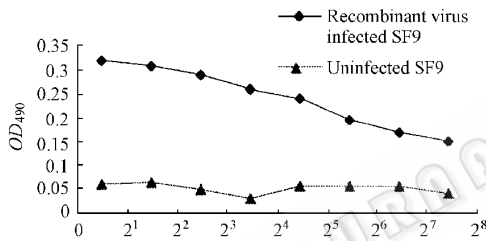


图 4 昆虫细胞表达的 KDR_{n3} 与 VEGF 的结合活性

Fig. 4 VEGF binding activity of KDR_{n3} expressed in insect cells

2.5 表达产物对 HUVEC 增殖的抑制作用

采用³H 掺入测活方法观察了不同稀释度的表达产物对 rhVEGF₁₆₅ 促 HUVEC 增殖作用的影响。结果显示 KDR 及 KDR-Fc 均能抑制血管内皮细胞的增殖(图 5)。

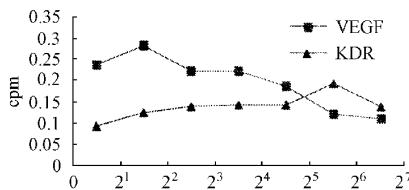


图 5 昆虫细胞表达的 KDR_{n3} 对 EC 细胞增殖的影响(³H 掺入法)

Fig. 5 Effect on proliferation of EC cells of KDR_{n3}

2.6 表达产物对血管生成的抑制作用

将表达 KDR_{n3} 的昆虫细胞上清和正常 Sf9 细胞上清分别加在玻璃纤维素膜上,将膜放在鸡胚绒毛

尿囊膜上,孵育 72h 后观察血管形成情况。结果如图 6 所示。从实验结果可见,与阴性对照相比较,昆虫细胞表达的可溶性受体可明显抑制鸡胚尿囊膜血管形成,从而直接证明了表达的可溶性受体对鸡胚尿囊膜血管形成的抑制作用。

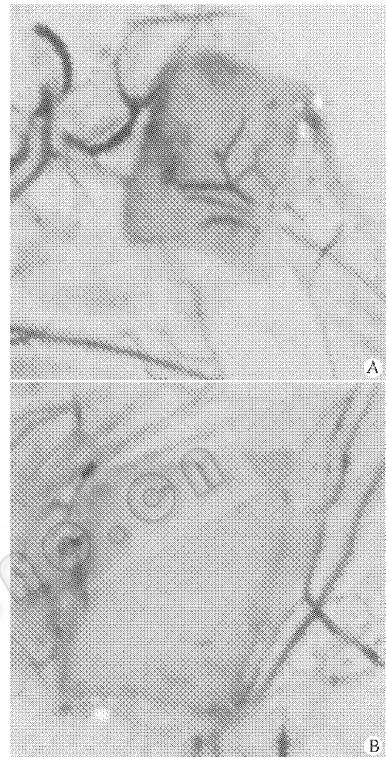


图 6 昆虫细胞表达的 KDR_{n3} 对鸡胚绒毛膜血管生成的抑制

Fig. 6 Anti-angiogenesis activity of KDR_{n3} on CAM of egg
A. sf9 supernatant ; B. Supernatant containing KDR_{n3}

3 讨论

许多生长因子包括酸性和碱性成纤维细胞生长因子、VEGF、PDGF 等都具有促进血管生成的作用,但只有 VEGF 是 EC 的特异性丝裂原。最近有实验报道,动脉内注入 VEGF 后,新生血管的生成过程中同时伴有血管平滑肌细胞(VSMC)的增殖。由于 VEGF 只对 EC 有分裂活性,因此 VSMC 的增殖不可能是 VEGF 直接作用的结果。推测 VEGF 可能介导某些生长因子如 PDGF 的表达和分泌,从而刺激 VSMC 分裂增殖。因此,VEGF 是一种强大的血管生成刺激因子。血管生成在其它众多病理状态下则起到加快组织破坏、促进疾病演进的作用。近年来血管生成已成为心血管领域和肿瘤学领域的一大研究热点,促进血管生成用于治疗组织缺血性疾病以及抗血管生成治疗恶性肿瘤等血管生成相关

疾病的治疗手段已步入临床,展现出良好的应用前景。

最初的研究表明,抑制 VEGF 的信号传导途径就能抑制许多肿瘤的生长^[13-15]。后来发现,抑制 VEGF 的功能还可抑制肿瘤的转移。在肿瘤组织中,VEGF 可能主要通过与其受体 KDR(VEGF R II)结合发挥作用。阻断这一过程就能阻断病理状况下的血管生成,从而达到治疗目的。这些研究结果促进了对以抗肿瘤生长为目的,抑制 VEGF 表达或抑制 VEGF 信号传导途径的药物的研究。

阻断 VEGF 及其受体作用的途径有多种,包括抗 VEGF 或受体的抗体、可溶性受体、反义 RNA 等。目前尚不能确定哪些途径或方法最终能发展成为有效抑制肿瘤血管生成的药物。但是,与其它方法相比,可溶性受体具有无免疫原性、特异性强、活性高、毒性低、适于长期治疗的特性。因而我们选择了用基因工程的方法表达 VEGF 的高亲和力受体 KDR,并对表达产物的生物学活性进行了研究。

昆虫杆状病毒表达系统可以进行较好的转录后加工,具有糖基化、磷酸化、酰胺化、信号肽及蛋白切割等特点^[16]。昆虫细胞表达的外源蛋白在理化性质和生物学特性上与天然蛋白相似。另外还具有表达水平高、可以规模化生产等优势。GIBCO 公司的 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统,通过在大肠杆菌内的定向转座来将外源基因重组到杆状病毒基因组中,并且利用成熟的蓝白斑筛选系统来挑选重组子,从而不需要烦琐的噬斑纯化就可以得到单一的重组病毒,大大节省了时间。本文用这个系统表达了 KDR 前三个 Loop 的基因,昆虫细胞有效识别了外源基因的信号肽,表达的可溶性受体蛋白分泌到细胞上清。间接 ELISA 实验结果表明表达的可溶性受体能特异性地与 VEGF 结合,并证明杆状病毒表达的可溶性 KDR 能抑制鸡胚绒毛尿囊膜新生血管的形成。为进一步研制新型抗血管生成药物和表达产物的工业化生产奠定了基础。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Trends Cardiovasc Med*, 1993, **3** :244~250
- [2] Tischer E, Mitchell R, Hartman R *et al*. The human gene for vascular endothelial growth factor, Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem*. 1991, **266** :11947~11954
- [3] Brown L F, Yeo K T, Bers B *et al*. Expression of vascular permeability factor(vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. *J Exp Med*, 1992, **176** :1375~1379
- [4] Senger D R, Van De Water L, Brown L F *et al*. Vascular permeability factor(VPF, VEGF) in tumor biology *cancer Metastasis Rev*, 1993, **12** :303~324
- [5] Aiello L P, Avery R L, Arrigg P G *et al*. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other ocular disorders. *N Engl J Med*, 1994, **331**(22):1480~1487
- [6] Terman B, Carrion M, Kovacs E *et al*. Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene*, 1991, **6** :1677~1683
- [7] Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A *et al*. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4(VEGFR-3) and KDR(VEGFR-4) receptor tyrosine kinases. *EMBO J*. 1996, **15** :290~298
- [8] Fuh G, Li B, Crowley C *et al*. Requirements for binding and signaling of the kinase domain receptor for vascular endothelial growth factor. *J Bio Chem*. 1998, **273** :11197~11204
- [9] Kondo S, Asano M, Suzuki H *et al*. Significance of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor for solid tumor growth, and its inhibition by the antibody. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993, **197** :1234~1241
- [10] Asano M, Yukita A, Matsumoto T *et al*. Inhibition of tumor growth and metastasis by an immunoneutralizing monoclonal antibody to human vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor₁₂₁. *Cancer Res*. 1995, **55** :5296~5301
- [11] Asano M, Yukita A, Matsumoto T *et al*. An anti-human VEGF monoclonal antibody, MV833, that exhibits potent anti-tumor activity *in vivo*. *Hybridoma*, 1998, **17**(2):185~190
- [12] Gerhard Siemeister, Bernhard Schnurr, Katja Mohrs, *et al*. Expression of biologically active isoforms of the tumor angiogenesis factor VEGF in *Escherichia coli*. *B B R C*, 1996, **222** :249~255
- [13] Kim K J, Li B, Winer J *et al*. Inhibition of vascular endothelial growth factor induced angiogenesis suppresses tumour growth *in vivo*. *Nature(London)*. 1993, **362** :841~844
- [14] Millauer B, Shawver L K, Plate K H *et al*. Glioblastoma growth inhibited *in vivo* by a dominant-negative Flk-1 mutant. *Nature(London)*. 1994, **367** :576~579
- [15] Millauer B, Longhi M P, Plate K H *et al*. Dominant-negative inhibition of Flk-1 suppresses the growth of many tumor types *in vivo*. *Cancer Res*. 1996, **56** :1615~1620
- [16] Luchow VA, Summers M D. Trends in the development of baculovirus expression vectors. *Bio Technology*. 1998, **6** :47~55

Cloning of VEGF Receptor KDR and its Expression in Insect Cells

ZENG Ge-Fei ZHANG Zhi-Qing ZHANG Li-Guo CHEN Ai-Jun YAO Li-Hong HOU Yun-De

(*State Key Laboratory of Molecular Virology and Genetic Engineering, Beijing 100052, China*)

Abstract The cDNA fragment of the first 3 loops of VEGF receptor, KDR, was cloned by PCR and inserted into a baculovirus expression plasmid pF_{AST}B_{AC}I. The competent *E. coli* DH10BAC cell, which contain another plasmid with baculovirus genome in it, was transformed with pF_{AST}B_{AC}I-KDR_{n3}. Homologous recombination in the prokaryotic cells resulted in a recombinant plasmid containing KDR_{n3} in baculovirus genome. Transfection of the insect cell SF-9 with above plasmid genatated a recombinant baculorvirus contain target gene fragment. SDS-PAGE and Western blot analysis of the supernatant of the infected SF-9 cell showed that KDR_{n3} was secreted in the medium. The recombinant protein was verified with Western blot and tested for their binding activity with VEGF. Its anti-angiogenic activity was assayed on chori-
onic allantoic membran(CAM) of fertilized egg. The results showed that the recombinant protein could inhibit new ves-
sel formation on CAM of fertilized eggs.

Key words VEGF receptor, kDR, baculovirus

Received : September 28 2000

This work was supported by Grant from National 863 High Technology R&D Project of China(102-08-01-03).

* Corresponding author. Tel 86-10-63519655 ; Fax 86-10-63532053 ; E-mail zhangzq@public3.bta.net.cn