

研究报告

人血管内皮生长因子受体 KDR 胞外 3 区的表达与配体结合活性的鉴定

张娟, 张艳丽, 李海鑫, 陈卫, 张弢, 王旻

中国药科大学生命科学与技术学院分子生物学教研室, 南京 210009

摘要: 血管内皮生长因子受体(VEGFR)是血管内皮生长因子的特异性受体, VEGFR-2 在介导 VEGF 刺激内皮细胞增殖及血管通透性等生物学活性中起重要作用。在大肠杆菌中实现可溶性的人血管内皮生长因子受体 KDR 胞外 3 区的表达, 并鉴定其与配体结合的活性。采用重叠 PCR 的方法合成人血管内皮生长因子受体 KDR 胞外 3 区基因, 将该基因与高效表达载体 pET-32a 重组, 转化大肠杆菌 Rosetta (DE3)中, 表达产物依次经过 CM 阳离子交换树脂和镍柱亲和层析纯化。利用 ELISA 法和体外抑制 VEGF 刺激的人脐静脉内皮细胞增殖实验检测表达产物与配体结合的活性。SDS-PAGE 显示, 目的蛋白主要以可溶性 Trx-KDR3 融合蛋白表达于胞质, 30°C 时 1 mmol/L IPTG 诱导细菌 5 h 融合蛋白表达量约占胞质可溶性总蛋白的 20%, 经 CM 阳离子交换树脂和镍柱亲和层析纯化得到纯度为 95%的产物, Western blotting 鉴定是目的蛋白。ELISA 和体外 HUVEC 细胞增殖实验显示, 表达产物具有特异性结合 hVEGF165 的活性, 且该作用呈一定的浓度依赖性。具有配体特异性结合活性的可溶性人血管内皮生长因子受体 KDR 胞外 3 区成功表达, 为靶向血管抗肿瘤治疗和相关抗体的研究奠定了基础。

关键词: 血管内皮生长因子, KDR, 蛋白表达与纯化

Expression and Function Identification of Extracellular Domain 3 of Human Vascular Endothelial Growth Factor Receptor KDR

Juan Zhang, Yanli Zhang, Haixin Li, Wei Chen, Tao Zhang, and Min Wang

Department of Molecular Biology, School of Life Science & Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2(VEGFR-2) plays an important role in stimulating the proliferation of endothelial cells and improving the permeability of blood vessel. We prepared recombinant extracellular domain 3 (KDR3) of human vascular endothelial growth factor receptor-2 in *Escherichia coli* and studied its specific binding activity with its ligand. The target DNA was synthesized by overlapping PCR, ligated with expression vector p-ET32a and transformed into *E. coli* Rosetta (DE3). The soluble fusion protein Trx-KDR3 was expressed in cytoplasm, which was up to 20% of total soluble protein in cytoplasm after having been induced by 1 mmol/L IPTG for 5 h at 30°C. It was characterized to be target protein by Western blotting. The product was purified by CM cation exchange resin and immobilized metal affinity chromatography(IMAC). Its VEGF-binding activity was determined by ELISA assay and its influence on the propagation of HUVEC induced by VEGF. The protein product showed high ligand binding activity in the ELISA and HUVEC propagation study compared to the control. Therefore, ligand binding active,

Received: March 31, 2008; **Accepted:** May 13, 2008

Corresponding author: Min Wang. Tel: +86-25-83271395; Fax: +86-25-83271395; E-mail: minwang@cpu.edu.cn

soluble recombinant extracellular domain 3 of VEGFR-2 KDR was successfully expressed and purified in *E. coli*, which would be applied to anti-angiogenesis anti-tumor therapy and anti-KDR antibody development.

Keywords: VEGF, KDR, protein expression and purification

血管内皮生长因子受体 (Vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR) 是血管内皮生长因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF) 的特异性受体, 通过与相应的 VEGF 结合刺激血管内皮细胞增殖、迁移、促进新生血管的生成, 与机体多种常见肿瘤的发病及肿瘤的转移有着密切的关系。抗 VEGF 及 VEGFR 的研究已成为肿瘤靶向治疗的热点之一^[1]。尤其随着 2004 年抗 VEGF 抗体贝伐单抗的上市和临床应用的良好反映, 极大的鼓舞了以 VEGF 和其受体为靶点的各类药物的研究与开发, 目前以 VEGF 受体为靶点的药物开发均处于临床或临床前阶段^[2]。

VEGF 有 3 种受体, 其中 VEGFR-1 对 VEGF 结合的亲和力是 VEGFR-2 的 10 倍, 但由于其所传递信息较弱, 并且它诱导体内单核细胞的迁移, 因此对 VEGFR-1 封闭的角度进行抗肿瘤药物的研究一直颇有争议, VEGFR-3 控制淋巴系统的生长发育。VEGFR-2 与 VEGF 具有较高的亲和力, 它在介导 VEGF 刺激内皮细胞增殖及血管通透性等生物学活性中起重要作用^[3]。人 VEGFR-2 称为 KDR (Kinase insert domain receptor), 1992 年由美国 Terman 等最早从人脐静脉内皮细胞 cDNA 库中扩增获得。其基因编码 1356 个氨基酸, 总分子量为 230 kD。KDR 属酪氨酸激酶受体第 III 亚型, 含有一单链跨膜区, 7 个胞外免疫球蛋白样区和胞内激酶区。研究显示: 在 VEGFR 的 7 个胞外配基结合区中, 2~3 区和 VEGF 的结合有关, 2 和 4 区主要影响其与 VEGF 的分离, 1 区主要负责调节受体与配体的结合, 4~7 区中可能存在抑制与 VEGF 结合的位点。其中 3 区 (含有 97 个氨基酸) 对 VEGF 的结合贡献最为突出^[4,5]。国外已有关于研制抗 KDR 胞外区域 1~3 和 5~7 抗体的报道。

本研究在大肠杆菌中进行重组 KDR3 的表达和纯化, 获得可溶性融合蛋白 KDR3, 在与配体 VEGF 结合活性 ELISA 实验和体外抑制外源性 VEGF 促进 HUVEC 细胞的增殖实验显示了较强的亲和力, 为靶向肿瘤内源性 VEGF 的可溶性受体的开发和抗 KDR 单克隆抗体的研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

菌株 *E. coli* DH5 α , *E. coli* Rosetta-gami(DE3), 质粒载体 pET-32a(+) 由本实验室保存; 限制性内切酶, T4 DNA 连接酶购自大连宝生物公司; Pfu DNA polymerase 购自上海生工公司; Taq DNA polymerase 购自 Promega 公司; 兔抗人 VEGFR-2 抗体购自 BIOSOURCE; HRP 偶联羊抗兔 IgG, HRP 偶联羊抗羊 IgG 购自联科生物技术公司; Ni Sepharose 6 Fast Flow 购自 Amasham-Pharmacia; hVEGF165 重组酵母菌由中国药科大学刘煜博士馈赠, 本实验室表达纯化; 羊抗 hVEGF165 抗体购自 R&D Systems; HUVEC 细胞系为南京中医药大学刘睿博士赠送, 其他试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 目的基因 KDR3 的获得

自 Swiss Prot 数据库获得人 VEGFR-2 HUMAN 即 KDR 的结构域分析, 结合 GenBank 核酸信息, 设计合成完全含有目的基因 (291 bp) 的 DNA 序列 314 bp。设计 4 对引物 K3_1—K3_4, 每条 50 nt 左右, 彼此前后有 15~20 个碱基互补, 这 8 条引物覆盖了 KDR3 的全部长度。再在 K3_5 的上游和 K3_6 的下游设计一对引物, 分别引入限制性内切酶 *Nco*I 和

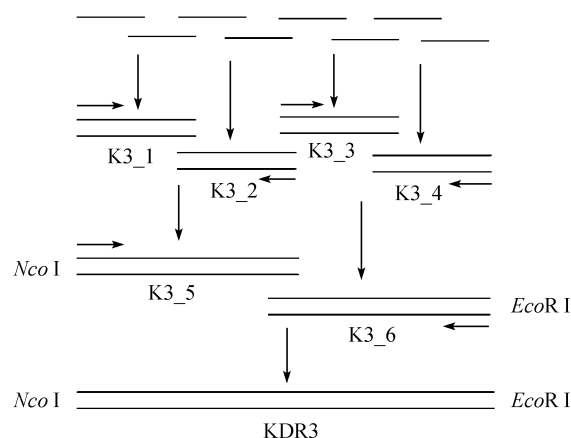


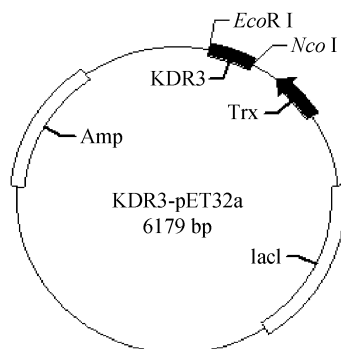
图 1 引入 *Nco*I 和 *Eco*R I 识别靶序列的 KDR3 基因合成的示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the synthesis of KDR3 with *Nco*I and *Eco*R I target sequence

EcoR I 识别靶序列。采用重叠 PCR 的方法经过 3 步 PCR 扩增得到含 *Nco* I 和 *EcoR* I 酶切位点的目的基因。PCR 中退火的温度根据每一轮 PCR 的引物来确定, 范围在 55°C 到 60°C 之间, 过程详见图 1。

1.2.2 重组载体 pET32a-KDR3 的构建与鉴定

将上述扩增后获得的 PCR 产物回收, 纯化, 用 *Nco* I 和 *EcoR* I 双酶切, 与经相同双酶切的载体 pET32a 进行连接成 pET32a-KDR3, 见图 2。连接子转入克隆菌 *E. coli* DH5 α , 氨苄青霉素抗性平板筛选阳性克隆, 通过 PCR、酶切和核酸测序鉴定阳性克隆。



YDVVLSPSHG IELSVGEKLVNCTARTELN
VGIDFNWEYPPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLT
IDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNST

图 2 重组 KDR3 质粒载体的构建

Fig. 2 Schematic diagram of recombinant KDR3 plasmid
The KDR3 gene was cloned into pET32a (+) at *Nco* I and *EcoR* I sites as described in materials and methods. Bottom is the amino acid sequence of KDR3

1.2.3 KDR3 的表达与 Western blotting 鉴定

重组载体 pET32a-KDR3 转化表达宿主 *E. coli* Rosetta-gami(DE3), 通过含 Tet、Kan、Cam、Amp 4 种抗生素的 LB 平板筛选阳性克隆。最佳 IPTG 浓度和最佳诱导时间分别得到优化, 不同浓度的 IPTG 浓度和不同的时间取样, 超声波裂解细胞, 15% SDS-PAGE 电泳检测目的蛋白的表达确定目的蛋白的表达方式和最佳诱导条件。

将 pET32a/Rosetta-gami(DE3)和 pET32a-KDR3/Rosetta-gami (DE3)诱导后的细胞超声波裂解上清进行 15% SDS-PAGE 电泳后转印到 PVDF 膜上。按常规法进行 Western blotting 鉴定。其中一抗为兔抗人 VEGFR-2 按 1:1000 比例稀释在 50 g/L 脱脂牛奶的 TBST, 二抗为 HRP 偶联的羊抗兔多克隆抗体按 1:10 000 倍稀释在 20 g/L 脱脂牛奶的 TBST。

1.2.4 目的蛋白的纯化

pET32a-KDR3 重组菌在 37°C 下 1 mol/L IPTG 诱导 5 h 后收集菌体, 超声法裂解细胞, 裂解液 6000 × g 离心 10 min, 取上清, 进行 CM 阳离子交换树脂纯化。CM 阳离子交换树脂先用 10 倍体积平衡缓冲液(8 mol/L 尿素, 25 mmol/L 醋酸钠, pH 4.0)平衡, 上样品后用 50 mL pH 4.0 平衡缓冲液洗涤未结合和非特异性结合蛋白, 收集前峰。再用 50 mL 的 pH 4.0 和 50 mL pH 6.0 的 2 种平衡液, 梯度混合第 2 次洗涤柱, 最后用 1 倍柱体积 pH 6.0 平衡液洗涤后用 1 倍柱体积 1 mol/L NaCl 洗脱, 收集洗脱液进行 15% SDS-PAGE 电泳检测后合并目的蛋白的收集管进行镍柱亲和层析(IMAC)纯化。镍柱先后用 10 mL NaAc 缓冲液 (25 mmol/L, 500 mmol/L NaCl, pH 4.0)和 10 mL 水洗涤, 后用 2 mL pH 7.8 的平衡液 (25 mmol/L Tris, 8 mol/L Urea, 150 mmol/L NaCl)平衡, 再用不含咪唑的洗脱缓冲液(8 mol/L Urea, 500 mmol/L NaCl, 25 mmol/L Tris)平衡柱, 上样品后分别用 5 mL 的 5 mmol/L、10 mmol/L、20 mmol/L、50 mmol/L、100 mmol/L、200 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液洗脱, 收集洗脱组分, 15% SDS-PAGE 电泳定性检测, 考马斯亮蓝 G250 蛋白定量试剂盒进行定量, 透析脱盐后冻干-20°C 保存。

1.2.5 KDR3 对 hVEGF165 的固相结合实验

将 KDR3 用包被液稀释至浓度为 400 pg/mL, 并在酶标板上倍比稀释, 每孔 100 μ L, 包被过夜, 用洗涤液洗 3 次, 37°C 封闭 1 h 后洗 3 次, 每孔加 hVEGF165 100 μ L(2 ng/mL), 37°C 孵育 2 h 后洗 3 次, 加 1:1000 羊抗人 hVEGF165 抗体 100 μ L, 37°C 孵育 1 h 后洗 3 次, 每孔加 100 μ L 1:5000 HRP 偶联羊抗羊 IgG, 37°C 孵育 1 h 后洗 5 次, 各孔加 100 μ L 底物液 TMB, 避光显色 20 min 后, 用 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应。ELISA 检测仪读取 A₄₅₀ 值吸光值。

1.2.6 KDR3 对 hVEGF165 诱导的脐静脉内皮细胞增殖的抑制

取对数生长的人脐静脉内皮细胞 HUVEC 消化并调整细胞, 浓度至 5 × 10⁴ 细胞/mL, 接种于 96 孔培养板, 100 μ L/孔, 培养 24 h 后换成 0.5%小牛血清培养基继续饥饿培养 24 h, 分别加入 VEGF165 (10 ng/mL)和 KDR3 (终浓度 50 ng/mL、25 ng/mL、12.5 ng/mL、6.25 ng/mL), 并设单独 hVEGF165 刺激组及空白对照组(n=4), 于 72 h 后 MTT 法测定细胞活性。

2 结果

2.1 目的基因合成的琼脂糖凝胶电泳鉴定

每一步 PCR 扩增反应后都进行 2.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 确定有目的条带后再进行下一步扩增。图 3 电泳显示: 条带亮度较高, 而且无杂带, 认为 PCR 扩增产物纯度较高, 获得 314 bp 目的 DNA。经过测序证明序列完全正确。

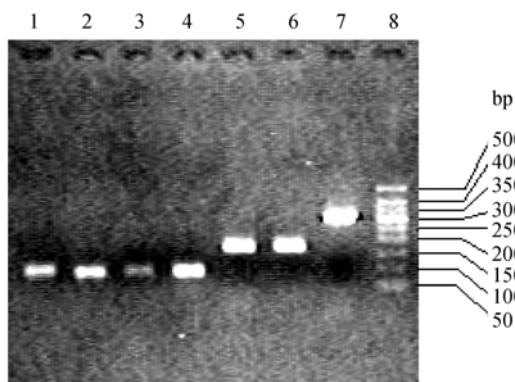


图 3 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳检测
Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of PCR overlapping products

1: K3-1 (84 bp); 2: K3-2 (87 bp); 3: K3-3 (86 bp); 4: K3-4 (84 bp); 5: K3-5 (165 bp); 6: K3-6 (167 bp); 7: KDR3 (314 bp); 8: 50 bp DNA ladder

2.2 重组质粒 pET32a-KDR3 的鉴定

图 4 电泳条带 2 显示重组质粒 KDR3-pET32a 用 *EcoR* I 单酶切后产生 6000 bp 多的大片段, 而用 *EcoR* I 和 *Nco* I 双酶切后得到一略小于前者的大片段 5865 bp 和 310 bp 左右的小片段, 即插入的目的基因序列。

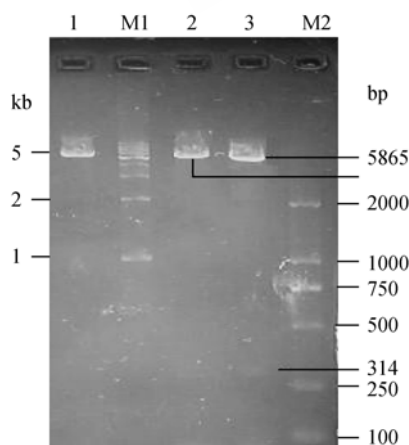


图 4 重组 pET32a-KDR3 酶切后的琼脂糖凝胶电泳鉴定
Fig. 4 Agarose gel electrophoresis analysis of pET32a-KDR3 digested with enzymes

1: pET32a-KDR3; 2: pET32a-KDR3 digested by *EcoR* I; 3: pET32a-KDR3 digested by *EcoR* I & *Nco* I; M1: 1 kb DNA ladder; M2: DNA marker D2000

以 T7 启动子引物作为测序引物, 对重组质粒进行正向序列测定, 测序结果与 GenBank 中人 VEGFR-2 的序列比对, 序列完全一致。

2.3 目的蛋白 KDR 的表达与鉴定

转化有空载体 pET32a 的 Rosetta-gami(DE3) 菌株诱导后产生与硫氧还蛋白(Trx)分子量大小(20.4 kD)接近的条带, 与诱导前相比, 转化有目的基因 KDR3 的重组载体 pET32a-KDR3 的 Rosetta-gami(DE3)菌株经过 30°C 下 1 mmol/L IPTG 诱导 5 h 后菌体裂解上清在约 28 kD 处有一清晰条带, 与目的蛋白的推算值相符。不同的诱导条件的菌体裂解液沉淀均有目的蛋白条带, 且条带随着培养时间增加而增加。菌体超声裂解后经蛋白凝胶扫描显示, 其含量约为上清总蛋白的 20%。经 Western blotting 进一步鉴定, 该条带为重组融合蛋白 Trx-KDR3, 见图 5。

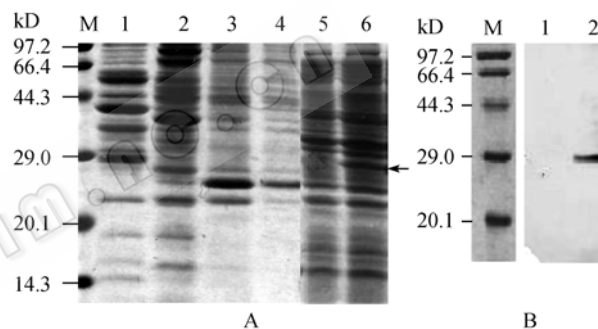


图 5 表达产物的 SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定

Fig. 5 Identification of recombinant KDR3 by SDS-PAGE electrophoresis and Western blotting

A: SDS-PAGE electrophoresis assay of recombinant KDR3. M: sizes (kD) of molecular weight marker; 1, 2: supernatant of ultrasonic lysed pET32a-KDR3 *E. coli* induced/not induced; 3, 4: supernatant of ultrasonic lysed pET32a *E. coli* induced/not induced; 5, 6: precipitate of lysed pET32a-KDR3 *E. coli* induced/not induced; B: Western blotting analysis of the recombinant KDR3. M: sizes (kD) of molecular weight marker; 1: supernatant of lysed pET32a *E. coli* after induction; 2: supernatant of lysed pET32a-KDR3 *E. coli* after induction

2.4 目的蛋白的纯化

重组细菌经 30°C 时 1 mmol/L IPTG 诱导培养 5 h 后的细菌裂解液上清经过羧甲基纤维素钠(CM)阳离子交换法吸附并进行梯度 pH 洗脱, 其中目的蛋白含量达到 90% 以上, 经镍柱亲和层析进一步纯化, 收集 150 mmol/L 咪唑洗脱组分, 目的蛋白含量达到 95% 以上, SDS-PAGE 电泳结果见图 6。经定量测定目的蛋白的产量为 26 mg/L。纯化产物达到电泳纯, 可以进行体外生物学活性的测定。

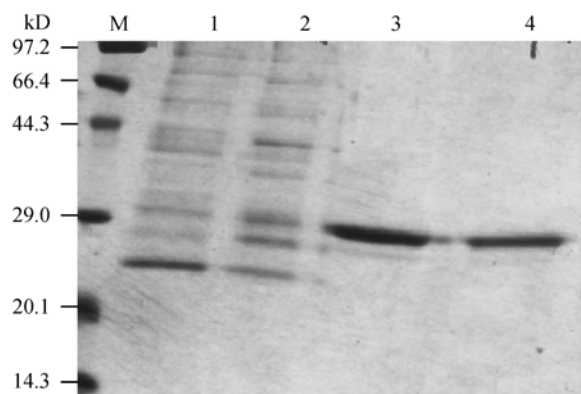


图 6 KDR3 经 CM 阳离子交换树脂和 IMAC 亲和层析纯化结果

Fig. 6 SDS-PAGE electrophoresis assay for the purification of KDR3 by CM cation exchange resin and IMAC
M: protein molecular weight marker; 1, 2: flow through by gradient pH elution; 3: KDR3 protein eluted from CM cation-exchange column; 4: KDR3 protein eluted from IMAC column

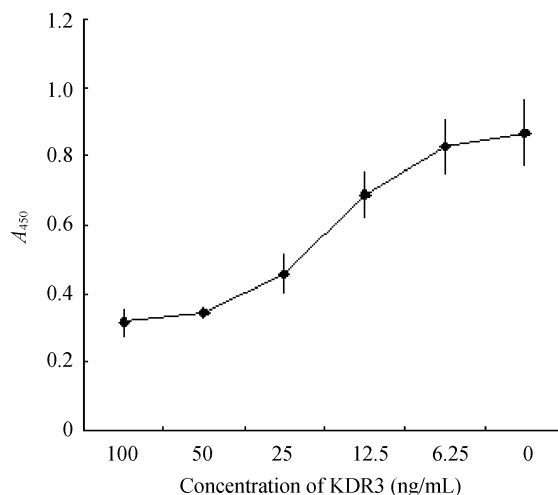


图 8 MTT 法分析 KDR3 对 VEGF 诱导的 HUVEC 细胞增殖的抑制

Fig. 8 MTT assay of KDR3 on the propagation of HUVEC induced by VEGF (mean \pm SD)

2.5 KDR3 与 VEGF 的 ELISA 间接检测法

图 7 显示, VEGF 与不同稀释度的 KDR3 之间均可发生结合反应, A_{490} 值大小与 KDR3 浓度呈正相关, 说明该研究所表达的 KDR3 融合蛋白具有与 VEGF 结合的能力。横坐标为不同浓度 KDR3 包被酶标板。

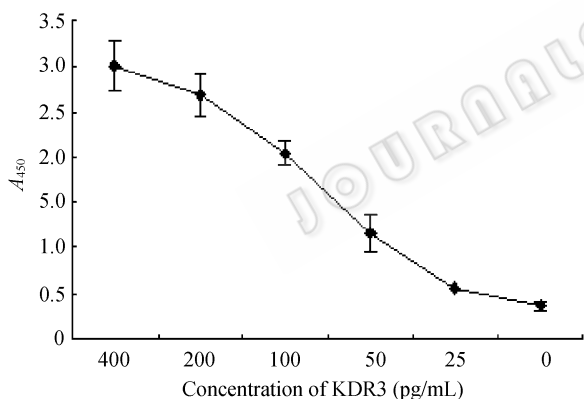


图 7 KDR3 与配体结合活性的 ELISA 分析

Fig. 7 ELISA assay of ligand binding activity for KDR3 (mean \pm SD)

2.6 KDR3 对 VEGF 诱导的 HUVEC 细胞增殖的抑制

在无 KDR3 存在下, VEGF 能够显著增加细胞的增殖。图 8 显示, 在外源性 VEGF 和 KDR3 同时存在时, KDR3 能显著抑制外源性 VEGF 诱导的 HUVEC 细胞增殖作用, 且呈一定的浓度依赖关系。证明所制备的 KDR3 具有与配体 VEGF 特异性结合的活性。

3 讨论

目前关于以 KDR 和 VEGF 为靶点阻断或抑制 VEGF 活性的研究主要集中于以下几个方面: 抗 VEGF 抗体、可溶性 VEGF 的受体、抗 KDR 的抗体和小分子 KDR 即蛋白酪氨酸抑制剂^[6,7]。除了抗 VEGF 的抗体于 2004 年在美国上市以外, 其他的研究均处于临床或临床前的阶段。以 KDR 为靶点进行抗体或可溶性受体片段的表达也有报道, 由于对 KDR 和 VEGF 的构效关系的研究显示了 KDR 胞外 7 个 IgG 结构域对配体和受体的作用不同, 国内外有研究报道分别针对胞外 1~3 区、5~7 区和 3 区的相关片段的表达, 均抑制 VEGF 的活性。我们选择构建表达 KDR 胞外受体 3 区, 一方面, 制备可溶性 VEGF 受体胞外功能片段, 进入体内与内源性 VEGF 结合, 从而封闭 VEGF, 阻断配体与细胞膜上各类受体 VEGFR-1、VEGFR-2 和 VEGFR-3 的结合而抑制 VEGF 所诱导的信号途径, 作用于肿瘤细胞, 则可以抑制肿瘤的增生; 另一方面, 以所制备的 KDR3 为靶点, 利用本实验室单链抗体的技术, 进行抗 KDR 单链抗体的制备, 从封闭 KDR 的角度进行抗体药物的研究与开发。

本研究克隆了人 VEGFR-2 基因 KDR3 区, 并在原核表达系统获得了稳定表达, 表达产物在胞质中折叠, 并以有活性的可溶状态存在。文献报道目的

基因可以从 HUVEC 细胞、或内皮细胞 cDNA 文库中直接经 RT-PCR 逆转录获得。该研究中采用重叠 PCR 法合成 KDR3, 不仅提高了效率, 更能保证目的基因的高保真度, 另外还有利于大肠杆菌偏爱密码子的突变设计, 提高表达效率。在 PCR 扩增中除了第 1 轮 PCR 产物可以直接稀释用来第 2 轮的 PCR 以外, 其他都必须从琼脂糖凝胶中回收作为下一轮 PCR 的模板。实验最初采用大肠杆菌 BL21(DE3) 作为表达宿主, 可溶性表达产物用 Western blotting 可以检测到目的蛋白, 但在 SDS-PAGE 电泳中几乎观察不到目的条带, 目的蛋白大多形成包涵体。分析可能由于 KDR3 序列中有数个稀有密码子, 在大肠杆菌中表达受限。改用 Rosetta-gami(DE3) 菌作为表达宿主菌则显著提高了可溶性蛋白的表达。Rosetta-gami (DE3) 是经过修饰的表达菌, 菌株能够由一种氯霉素抗性的、与 pET 相容的质粒提供稀有密码子的 tRNA, 能够明显改善大肠杆菌中由于稀有密码子造成的表达限制, 而 KDR3 序列中含有数个稀有密码子。可溶性表达避免了包涵体所进行变、复性中客观条件所造成的活性丧失。

进行 KDR3 的纯化中 CM 阳离子交换树脂的洗涤条件的摸索中我们发现, 上样后在常规的 pH 缓冲液洗涤后增加一次 pH 4~6 梯度洗涤对杂带的去除起到关键的作用, 仅利用 CM 离子交换一种纯化手段达到 90% 的纯度, 显著提高了利用 Ni 柱亲和层析纯化对样品的回收率。该方法建立的目的蛋白回收率约为 10%, 最终目的蛋白的回收量为 26 mg/L, 可以用于单链抗体的制备和体外生物学活性的鉴定。

对实验室制备的 VEGF 的生物学活性的前期研究实验中显示: 在外源性 VEGF 的存在下, HUVEC 细胞的增殖明显提高, 并且这种提高具有浓度依赖性。10 ng/mL VEGF 作用于低血清培养的 HUVEC 细胞 24 h, 与非 VEGF 添加组相比细胞增殖有所增加, 到 48 h 增殖率达到 67%, 72 h 达到 50%。本实验中 KDR3 和 VEGF 共同作用 HUVEC 细胞 72 h, 所获得的 KDR3 融合蛋白与配体 VEGF 能特异性结合。细胞处于 0.5% 的血清中处于饥饿状态, 有利于观察

外源药物对细胞的影响, 实验中无 VEGF 且无 KDR3 的对照组几乎无细胞的增殖, 相同条件下 MTT 测得 A_{490} 均低于 0.2 ($n=4$), 而实验中同时加有 VEGF 和 KDR3 组 A_{490} 大于 0.3, 并且在 KDR3 100 ng/mL 和 50 ng/mL 时有一平台, 从而推测 VEGF 和 KDR3 的作用处于动态的平衡, 所以 VEGF 对细胞的生长促进作用还能存在。

在后续的研究工作中需要通过生物芯片的技术研究 KDR3 与 VEGF 结合的动力学特征, 单独应用该可溶性受体片段能否诱导肿瘤细胞的凋亡以及发酵条件的优化需要进一步研究。

本研究制备了具有生物学活性的可溶性受体 KDR3, 从抗血管生成方向进行抗肿瘤重组蛋白质类药物的研究, 并为抗 KDR3 靶点特异性的单链抗体的制备打下了基础。

REFERENCES

- [1] Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*, 1995, **1**: 27-31.
- [2] Ferrara N, Hillan KJ, Novotny W. Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **333**(2): 328-335.
- [3] Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, et al. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial growth factor. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, **187**(3): 1579-1586.
- [4] Lu D, Kussie P, Pytowski B, et al, et al. Identification of the residues in the extracellular region of KDR important for interaction with vascular endothelial growth factor and neutralizing anti-KDR antibodies. *J Biol Chem*, 2000, **275**: 14321-14330.
- [5] Fuh G, Li B, Crowley C, et al. Requirements for binding and signaling of the kinase domain receptor for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*, 1998, **273**: 11197-11204.
- [6] Lu D, Jimenez X, Zhang H, et al. Selection of high affinity human neutralizing antibodies to VEGFR2 from a large antibody phage display library for antiangiogenesis therapy. *Int J Cancer*, 2002, **97**(3): 393-399.
- [7] Witte L, Hicklin DJ, Zhu Z, et al. Monoclonal antibodies targeting the VEGF receptor-2 (Flk1/KDR) as an anti-angiogenic therapeutic strategy. *Cancer Metastasis Rev*, 1998, **17**: 155-161.