

杀伤血管内皮生长因子受体 1 阳性细胞的靶向毒素

白向阳^{1,2)} 倪剑锋^{1,2)} 吕安国^{1)*} 吴文芳¹⁾ 牛瑞芳³⁾

(¹⁾中国科学院沈阳应用生态研究所, 沈阳 110016; ²⁾中国科学院研究生院, 北京 100016;

³⁾天津医科大学肿瘤医院, 天津 300060)

摘要 白喉毒素 (diphtheria toxin DT) 是棒状白喉杆菌被 β 噬菌体感染后分泌的一种外毒素. 它可以阻断真核细胞的蛋白质合成, 杀死细胞. 血管内皮生长因子 (VEGF) 的 R82A, K84A, H86A 突变体可以和肿瘤血管上高表达的 VEGF 受体 1 (VEGFR-1) 特异性结合. 首先从白喉杆菌中提取基因组 DNA, 扩增出白喉毒素 C 区、T 区基因. 并运用点突变技术, 制成 VEGF 的 R82A, K84A, H86A 突变体. 利用这个可以和肿瘤血管上特异性受体相结合的 VEGF 的突变体, 代替白喉毒素上的受体结合区, 制成了针对 VEGFR-1 的靶向融合毒素——DT391-mVEGF. 以去除了受体结合区的 DT391 为阴性对照, 细胞实验表明, 融合毒素对 VEGFR-1 阳性的肿瘤细胞有特异性杀伤作用.

关键词 白喉毒素, 血管内皮生长因子(VEGF), 血管内皮生长因子受体 1 (VEGFR-1), 融合蛋白

学科分类号 Q78

白喉毒素 (diphtheria toxin DT) 是棒状白喉杆菌被 β 噬菌体感染后分泌的一种外毒素. 它可以通过抑制延长因子 2, 阻断真核细胞的蛋白质合成. 白喉毒素由三部分组成. 它的第一部分是受体结合区 (receptor binding domain, R 区), 第二部分是穿膜区 (transmembrane domain, T 区), 第三部分是催化反应区 (catalytic domain, C 区). 如果把它的 R 区换成其他的受体结合蛋白, 则 DT 分子结合到表达新受体细胞的细胞膜表面, 并在穿膜区的作用下, 穿透细胞膜, 进入胞内, 进而对新的细胞产生毒性^[1].

肿瘤的生长可以分成无血管期和有血管期. 血管为肿瘤的旺盛生长提供养料, 并带走肿瘤细胞产生的代谢废物. 如果没有新生血管的支持, 肿瘤的直径不会超过 0.1 mm. 如果能够切断肿瘤细胞的血液供应, 则肿瘤的生长就失去了必要的支持^[2].

血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是参与血管增生的主要因子. 包括 VEGF A、VEGF B、VEGF C、VEGF D. 有一些病毒产生的 VEGF 类似物, 称为 VEGF E. 通过 mRNA 的不同剪切, VEGF A 产生 6 种不同的异构形式. 它们的长度分别是 121、145、165、183、189、206 个氨基酸. VEGF₁₆₅ 是体内最常见的形式^[3].

VEGF 受体 (vascular endothelial growth factor

receptor, VEGFR) 有 3 个, 分别称为 VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3. 除 VEGF 的特异性受体外, 神经纤毛蛋白 -1 (NRP-1) 也可以和 VEGF₁₆₅ 结合^[4].

以血管内皮生长因子做为靶向分子攻击肿瘤的血管最早见于 Olson 等^[5]. 他用化学方法将截短的 DT 和 VEGF₁₆₅ 连接起来. 嵌合毒素表现出了预期的杀伤 VEGFR⁺ 细胞和抑制鸡胚尿囊膜血管生长的效果. Arora 等^[6]把 VEGF 和 DT 分子的 T 区和 C 区编码基因制成融合基因, 并表达出了融合毒素. 其后柴映爽等^[7]也对此做了深入研究. 2001 年 Backer 等^[8]又用志贺样毒素连接在 VEGF₁₂₁ 的 N 端制成嵌合毒素. VEGF₁₂₁ 只结合 VEGFR-2 而不与其他 VEGFR 结合^[9]. 用 VEGF₁₂₁ 作为靶向分子制成的嵌合毒素只选择性地杀伤高表达 VEGFR-2 的细胞, 而低表达 VEGFR-2 细胞则不受到伤害.

本研究制成了可以和 VEGFR-1 特异性结合的血管内皮生长因子 (VEGF) 突变体 -DT 融合蛋白 DT391-mVEGF, 使其特异性地杀伤 VEGFR-1⁺ 细胞.

* 通讯联系人.

Tel: 024-83970383, E-mail: bxy31@yahoo.com

收稿日期: 2004-11-03, 接受日期: 2004-12-01

1 材料与方法

1.1 材料

白喉菌株 38002 购自中国生物制品检测中心. VEGF₁₆₅ cDNA 由荷兰科学家 Leenders 惠赠. 限制性内切酶, 高保真合成酶 pfu, 普通 Taq DNA 聚合酶均为 TaKaRa 公司产品. T4 DNA 连接酶为 Promega 公司产品. PCR 产物纯化试剂盒为 Invitrogen 公司产品. 凝胶纯化试剂盒购自 Qiangen 公司. pET28-b 载体、BL21-(DE3)表达菌株购自 Novagen 公司, JM109 感受态菌株购自天为科技公司. 鼠抗人 VEGF 抗体购自中山抗体公司, HRP 标记的兔抗鼠抗体购自 Diako 公司. 肝癌细胞 SMMC-7721 由牛瑞芳研究员惠赠. 结构预测由 Namur 大学的超级计算机用 ESyPred3D 软件进行. DT 扩增引物 dt F, dt R, PET-28b 质粒改造用单链脱氧核酸均由上海生物工程公司合成. 基因测序由宝生物工程有限公司进行. PCR 扩增仪、紫外分光光度计均为 Eppendorf 公司产品. 阴离子交换树脂和分子筛 Sephacryl S-200 为 Pharmacia 公司产品.

1.2 方法

dt F: AGTCCATGGGCGCTGATGATGTTGTG (下划线表示 *Nco* I 酶切位点); dt R: ATACATATGAAGAAATGGTTGCGTTTATG (下划线表示 *Nde* I 酶切位点); vegfF: TAGAATTCACATATGGCAGAAGGAGGAGG (前后两下划线分别表示 *Eco*R I 和 *Nde* I 酶切位点); vegf R: TAGAATTCACGCCTCGGCTTGTCATC (下划线表示 *Eco*R I 酶切位点). VEGF R82A, K84A, H86A 突变引物: Pm1, GCTATCGCTCTGCCCAAGGCCAGCAC; Pm2, AGCAGGAGCGATAGCCATTATCTGCATGG.

pET-28b 质粒改造用单链脱氧核酸. 下划线表示引入的终止密码子, 加粗部分表示将要引入的酶切位点. S-1: AATTCTAA TGAGCAGCAGATATCA; S-2: AGCTTGATATCTGCTGCTCA TTAG.

1.2.1 dt391 基因的扩增. 取购得的菌种冻干管, 80℃ 水浴灭活白喉杆菌. 以 1 ml pH 8.0 的 10 mmol/L Tris-HCl 溶解管中冻干物. 12 000 g 离心 5 min. 重悬沉淀, 洗涤、离心. 沉淀溶于 50 μl pH 8.0 的 10 mmol/L Tris-HCl, 50 μl 10% SDS 中, 60℃ 处理 10 min. 800 W 微波处理 2 次, 每次 1 min. 再加入 pH 8.0 的 10 mmol/L Tris-HCl 250 μl, 60 μl 3 mol/L NaAc(pH 5.2), 10 μl 浓度为

10 g/L 的 RNA 酶. 37℃ 反应 10 min. 加入 1 000 μl 乙醇, 离心. DNA 沉淀溶于 500 μl TE 中. 以 dt F dt R 引物扩增 dt391 基因. PCR 条件为: 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 40 s, 30 个循环, 72℃ 延伸 5 min. 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物. 该产物命名为 dt391.

1.2.2 DT391 表达质粒的构建. 取购自 Novagen 公司的 pET-28b 质粒用 *Eco*R I 和 *Hind* III 双酶切. 用凝胶纯化试剂盒纯化回收 6 000 bp 左右的酶切产物, 将委托合成的 S-1, S-2 单链 DNA 加入 Milli Q 水配成浓度为 15 μmol/L 的使用液. 配制如下退火体系. 10×PCR 缓冲液 1 μl, S-1 1 μl, S-2 1 μl, 补水至总体积 10 μl. 94℃ 加热 5 min, 待其自然冷却至室温. 取 S-1、S-2 退火产物 2 μl, pET-28b 酶切产物 6 μl, 连接酶缓冲液 2 μl, T4 DNA 连接酶 0.5 μl, 补水至总体积 20 μl. 22℃ 连接反应 2 h. 将连接产物转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 挑选重组子用 *Nde* I 和 *Nco* I 双酶切. 用凝胶纯化试剂盒纯化回收 5 500 bp 左右酶切产物. 用相同的酶处理 dt391, 通过 1% 琼脂糖凝胶, 纯化回收大小约为 1 200 bp 的 dt391 酶切片段. 以 1:3 的摩尔比确定载体和插入片段的用量. 配制 20 μl 反应体系, 以 T4 DNA 连接酶 22℃ 连接 2 h. 将连接产物转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 挑选重组子酶切鉴定. 所得质粒命名为 mp-dt391.

1.2.3 重叠 PCR 法引入 VEGF R82A, K84A, H86A 突变. 以 vegf F 和 Pm2 组成引物对, 以 vegf R 和 Pm1 组成引物对, 以 VEGF₁₆₅ cDNA 为底物进行 PCR 扩增引入突变, 再以两次扩增产物为底物, 以 vegf F 引物和 vegf R 引物组成的引物对进行重叠 PCR, 完成基因拼接. PCR 扩增过程中使用 Pfu 高保真 DNA 聚合酶以保证 PCR 的忠实性. 以单链构象多态性 (single strand conformation polymorphism) 进行初步鉴定. 以 DNA 测序检验是否引入 VEGF R82A, K84A, H86A 突变. 突变后的基因命名为 *mvegf*. 以 Taq 酶引入 A 尾, 连接到 T 载体上. 连接产物转化大肠杆菌 JM109 菌株, -70℃ 保存. 命名为 pGEM-T-*mvegf*.

1.2.4 DT391-mVEGF 表达质粒的构建. 取 1.2.2 中构建的 mp-dt391 和 1.2.3 中构建的 pGEM-T-*mvegf* 用 *Nde* I 和 *Eco*R I 双酶切. 1% 琼脂糖凝胶电泳纯化回收 6 500 bp mp-dt391 酶切产物和 500 bp *mvegf* 酶切产物. 以 1:3 的摩尔比确定载体和插入片段 *mvegf* 的用量. 连接产物转化大肠杆菌 DH5α 感受

态细胞, 挑选重组子酶切鉴定。

1.2.5 DT391-mVEGF 蛋白的表达和鉴定. 取 **1.2.4** 构建的 DT391-mVEGF 表达质粒转化表达菌株 BL21-(DE3), IPTG 诱导表达. 诱导后的菌体冷却到 4℃, 5 000 *g* 离心, 沉淀以生理盐水洗涤, 重悬于 1 mmol/L EDTA, 100 mmol/L 氯化钠, 25 mmol/L Tris·HCl, (pH 8.0) 溶液中, 以 45 s 间隔, 15 s 超声, 30 个循环破菌. 12 000 *g* 离心, 所得包涵体沉淀溶于含 2% SDS 的 0.05 mol/L Tris·HCl 溶液 (pH 8.0) 中, 再次超声处理, 条件同上. 12 000 *g* 离心, 取上清 10 μ l, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测, 考马斯亮蓝染色. 另取一块同样处理但未染色的胶置于电转仪上, 将电泳条带转移至 PVDF 膜上, 以脱脂奶粉封闭, 用鼠抗人 VEGF 抗体做一抗, HRP-兔抗鼠抗体做二抗, DAB 显色.

1.2.6 DT391-mVEGF 蛋白的纯化和复性. 包涵体以 4 mol/L 尿素、20 mmol/L Tris、2 mmol/L EDTA、1% Triton X-100 洗涤 3 次, 重悬于 6 mol/L 盐酸胍, 1 mmol/L EDTA, 50 mmol/L 氯化钠, 20 mmol/L pH 8.0 磷酸盐缓冲液中. 4℃ 缓慢摇动 1 h. 裂解物加入 100 倍的 pH 8.0 20 mmol/L Tris·HCl, 1 mmol/L DTT 溶液. 上阴离子交换柱, 以 1 mmol/L DTT, 400 mmol/L NaCl 溶液洗下目的蛋白. 走柱层析, 于 280 nm 检测流出峰, 收集不同流份, SDS-PAGE 电泳检测蛋白质纯化情况.

1.2.7 DT391-mVEGF 蛋白的细胞活性检验. 将对数生长期的 SMMC-7721 肿瘤细胞加入 96 孔板中, 浓度为 4×10^8 个/L. 取融合蛋白 DT391-mVEGF 溶于含 10% 血清的 1640 培养基中, 使各孔的融合蛋白终浓度分别为 0、10、20、50、300 μ g/L. 另取 DT391 配制成相同浓度的溶液做为 DT391 蛋白对照孔. 每孔设 3 个重复. 同时取 200 μ l 不加任何蛋白质和细胞的 1640 培养基做为空白对照孔, 亦设 3 个复孔. 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养 48 h 后, 加入 MTT 溶液显色. 在酶标仪上以 570 nm 测定吸光度值(A_{570}). 做 3 次独立重复实验.

2 结 果

2.1 dt391 的扩增和 pGEM-T-dt 重组质粒的构建

通过微波裂解法得到白喉基因组 DNA, 用引物 dt F 和 dt R 扩增得到 dt 391 基因, 电泳结果如图 1, 可见大小约为 1 200 bp 的 dt 391 基因. DNA 测序结果表明, 所得序列即 DT391 编码基因 (基因

序列略).

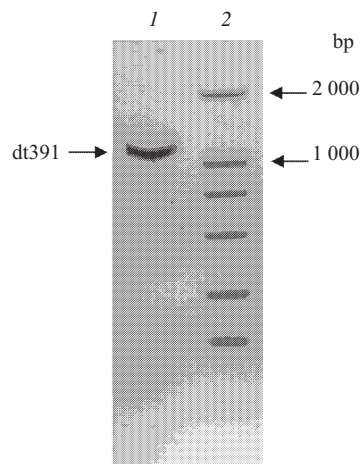


Fig.1 Amplification result of gene dt391

1: amplified dt391 gene; 2: marker DL 2000.

2.2 DT391 表达质粒的构建

测序结果表明, 在改造后的 pET-28b 原 *EcoR* I 酶切位点后面引入了终止密码子 (基因序列略). 用 *EcoR* V 酶切鉴定 **1.2.2** 构建的表达质粒 mp-dt391, 结果见图 2. 图 2 中大小约为 2 000 bp 的条带是 dt391 与载体上的一段序列. 大小约为 4 000 bp 的是 *EcoR* V 酶切后的载体残余片段.

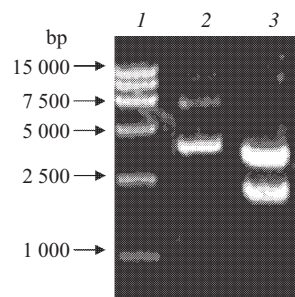


Fig.2 *EcoR* V digestion of DT391 expression plasmid

1: DL 15000 maker; 2: DT391 expression plasmid; 3: DT391 expression plasmid digested by *EcoR* V. To make sure there are no excessive amino acids appearing on the tail of recombinant protein, a terminal codon TAA was inserted into the expression plasmid pET-28b. An *EcoR* V restriction site was designed following the TAA codon to make it easier to test whether the terminal code TAA is inserted successfully. There is only one *EcoR* V cutting site in plasmid pET-26b. So if the TAA codon was inserted into the plasmid successfully, there will be two bands been observed. It can be seen that there are two light bands on the third line after cutting by *EcoR* V.

2.3 重叠 PCR 法引入 VEGF R82A, K84A, H86A 突变和 DT391-mVEGF 表达质粒的构建

1.2.2 中构建的 DT391-mVEGF 表达质粒——

mp-dt391 SSCP 电泳初步鉴定见图 3. 从图 3 中可以看出, 电泳迁移率最大的双链 DNA, 没有差别, 但是电泳图上方的两条单链 DNA 条带发生明显的迁移率改变. 由此证明已引入了突变. 测序结果表明, 已成功地引入 VEGF R82A, K84A, H86A 突变并把该基因用 *Nde* I 酶切位点连到 DT391 基因下游.

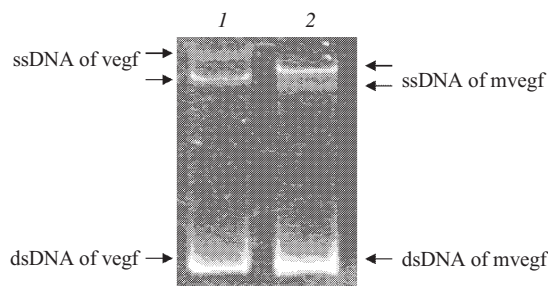


Fig.3 SSCP assay of mveg

1: wild VEGF165 DNA; 2: mveg.

2.4 DT391-mVEGF 蛋白的表达和鉴定

取经过酶切鉴定证明已成功构建的 DT391-mVEGF 和 DT391 表达质粒转化 BL21-(DE3)菌株, IPTG 诱导表达. SDS-PAGE 鉴定和蛋白质印迹鉴定结果见图 4、5 所示.

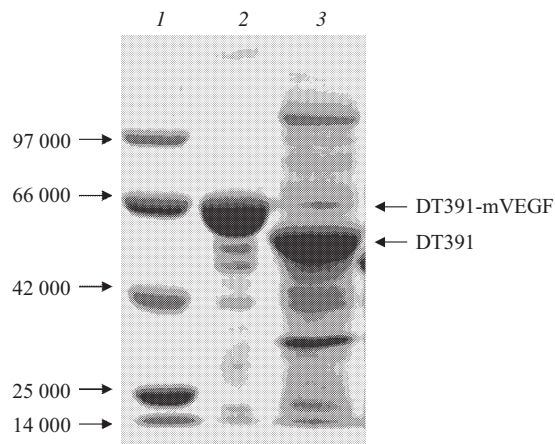


Fig.4 SDS-PAGE analysis of expressed DT391 and DT391-mVEGF

1: protein marker; 2: expressed DT391-mVEGF; 3: expressed DT391. The DT391 and DT391-mVEGF genes were subcloned into the reconstructed pET-28b plasmid. And then induced by IPTG. The expressed proteins were extracted and analyzed by electrophoresis.

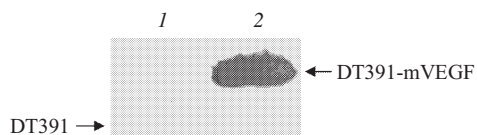


Fig.5 Western-blot analysis of expressed DT391 and DT391-mVEGF

1: expressed DT391; 2: expressed DT391-mVEGF.

2.5 DT391-mVEGF 蛋白的细胞活性检验

经纯化和复性后, 以 SMMC-7721 肝癌细胞做细胞实验, 按下式计算生长抑制率, 所得数据用单因素方差检验进行统计分析. 生长率(%)=[(实验组 A 值-空白对照组 A 值)/(DT391 蛋白组 A 值-空白对照组 A 值)] $\times$ 100%. 3 组重复取平均值.

细胞实验结果表明, 当剂量达到 300 μ g/L 时 DT391-mVEGF 对 SMMC-7721 细胞的生长有显著的抑制作用 ($0.01 < P < 0.05$), 见图 6. 而 DT391 组与只加 1640 的空白对照组无差异.

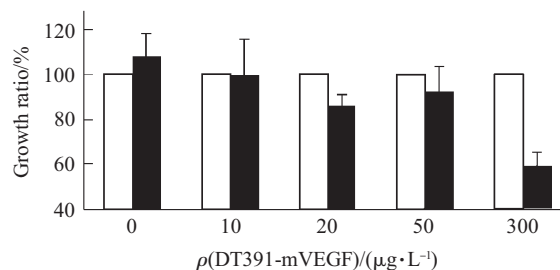


Fig.6 The growth ratio of SMMC-7721 cell under different levels of DT391-mVEGF

SMMC-7721 was cultured with DT391-mVEGF for 48 h on different dosage. The growth ratio was calculated as [(A value of DT391-mVEGF-blank control)/(A value of DT391-blank control)] $\times$ 100%. The blank columns show the control growth of SMMC-7721 under the same level of DT391.

3 讨 论

对细胞因子与其受体结合力的研究, 最初集中在如何增强其结合力以提高其细胞活性. 但是近年来的研究表明, 降低细胞因子与其受体的结合力有时也能取得意想不到的收获. 如对单核-巨噬细胞生长刺激因子的研究, 就表明了这一点. 本实验中在 VEGF 分子上引入突变位点, 降低其与不相关受体结合力, 从而提高其结合特异性, 并以这一分子做为融合毒素的受体结合区, 取得了特异性结合并杀伤 VEGFR-1⁺ 细胞的结果.

VEGF 最早发现于 1989 年, 是调节血管内皮增生的主要因子. 1996 年 VEGF 被用于引导 DT 分子杀伤肿瘤增生的血管. 随着对其研究的深入, 不同亚类的 VEGF 异构体和 VEGF 的片段也被尝试着用于制做靶向毒素. Keyt 等^[10]发现 VEGF₁₆₅ 上 Arg82、Lys84、His86 是 VEGF 与 VEGFR-2 结合的关键位点. 突变这些点后 VEGF 只能与 VEGFR-1 结合, 而与 VEGFR-2 的结合力大大下降. 本文即基于此实验结果在构建新型靶向毒素上做了研究.

白喉杆菌细胞壁比较特殊,不易从中提取DNA^[1].利用其自身带的噬菌体裂解细菌又必须进行活菌培养.在本实验中将得到的菌种,加热灭活后,用微波裂解法裂解菌体,提取了白喉杆菌的DNA,解决了白喉杆菌细胞壁不易打碎,DNA不易提取的问题.另外由于采用了死菌体扩增法,所以也不会造成活体培养易泄漏的麻烦.

为使表达的蛋白质不带其他的多余氨基酸,以免对蛋白质的活性造成意外影响,这里使用了不经5'磷酸化的双单链核酸直接退火连接的办法改造了pET-28b载体,成功地在预计的基因克隆位点处添加了终止密码子.在PCR扩增之前,在引物上预先引入终止密码子是一个常见的手法.但是在这个实验中为了使PCR扩增更容易完成,也为了避免连续出现的稀有密码子对VEGF融合毒素原核表达的不良影响,在引物上引入了多个突变点.这种措施使后续实验可以轻而易举地完成,但是经过最优化设计的引物再也不能多加一个终止密码子.为此只好通过载体改造,在预计位点上引入终止密码子.常见的重叠PCR法和盒式突变联用改造载体的办法十分麻烦,而且成功率也低.这里使用了不经5'磷酸化的单链核酸退火的办法进行载体改造,不仅降低了引物成本,而且不用测算载体与插入片段比例,也不用做载体去磷酸化,实验一步成功,不但简便而且经济.

在两个分子中间的联接部位,我们使用了DT391 3'端的组氨酸编码基因CAT,和VEGF N端第二位的甲硫氨酸编码基因ATG构成的Nde I酶切位点,进行了直接的酶切连接.在制备融合蛋白的过程中,分子两部分之间连接肽的长短和刚性,对于蛋白质的正确折叠有很大影响^[2].在DT分子上其T9螺旋终止于378位,从379位到385位是无规则卷曲.386位到390位是R区的第一个 β 折叠区.379位到385位的长度对于DT的穿膜活性很重要.但在这个实验里已经完整地保留从379到391之间的区域,所以本实验没有再引入额外的连接肽.VEGF的6~110位是VEGF结合活性区,为了实验的可行性,在综合考虑PCR扩增条件和蛋白质活性的条件下只截取了VEGF的3~164位.事实也表明这样的设计不影响蛋白质的最终活性.

SMMC-7721是一种表达VEGFR-1,但不表达VEGFR-2的肝癌细胞^[3].实验结果表明,连接有mVEGF的DT391可以对VEGFR-1⁺细胞产生杀伤作用,进而使细胞的生长受到影响,而未加

mVEGF的DT391,不能对VEGFR-1阳性的SMMC-7721生长产生影响.由此可见,对SMMC-7721的杀伤作用是由mVEGF介导的.

总之,在这个实验里利用重叠PCR法引入了VEGF R82A, K84A, H86A突变,制成了和VEGFR-1特异性结合的VEGF分子.并将mVEGF基因通过Nde I酶切位点连到DT391基因的尾端,制成了融合毒素,用不带受体结合区的DT391作为对照,用表达特异性受体的肿瘤细胞代替血管内皮细胞做了细胞实验,验证了所设计蛋白质的生物活性.提示这可能是一个很有开发前途的肿瘤血管抑制蛋白.

参考文献

- Bell C E, Eisenberg D. Crystal structure of nucleotide-free diphtheria toxin. *Biochemistry*, 1997, **36** (3): 481~488
- Carmeliet P, Jain R K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 2000, **407** (6801): 249~257
- Ogawa S, Oku A, Sawano A, *et al.* A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain. *J Biol Chem*, 1998, **273** (47): 31273~31282
- Yancopoulos G D, Davis S, Gale N W, *et al.* Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, 2000, **407**(6801): 242~248
- Olson T A, Mohanraj D, Roy S, *et al.* Targeting the tumor vasculature: inhibition of tumor growth by a vascular endothelial growth factor-toxin conjugate. *Int J Cancer*, 1997, **73** (6): 865~870
- Arora S, Masood R, Zheng T, *et al.* Vascular endothelial growth factor chimeric toxin is highly active against endothelial cells. *Cancer Res*, 1999, **59**: 183~188
- 柴映爽,程新,姚立红,等.靶向毒素DT-VEGF的构建表达与活性分析. *生物工程学报*, 2004, **20** (2): 192~196
Chai Y S, Cheng X, Yao L H, *et al.* *Chin J Biotechnology*, 2004, **20** (2): 192~196
- Backer M V, Budker V G, Backer J M. Shiga-like toxin-VEGF fusion proteins are selectively cytotoxic to endothelial cells overexpressing VEGFR-2. *J Control Release*, 2001, **74** (1~3): 349~355
- Whitaker G B, Limberg B J, Rosenbaum J S. Vascular endothelial growth factor receptor-2 and neuropilin-1 form a receptor complex that is responsible for the differential signaling potency of VEGF (165) and VEGF(121). *J Biol Chem*, 2001, **276** (27): 25520~25531
- Keyt B A, Nguyen H V, Berleau L T, *et al.* Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and Flt-1 receptors: generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*, 1996, **271** (10): 5638~5646
- Bolet C, Gevaudan M J, Lamballerie, *et al.* A simple method for the isolation of chromosomal DNA from Gram positive or acid-fast

- bacteria. Nucl Acid Res, 1991, **8** (19): 1955~1955
- 12 Takahashi T, Umata T, Mekada E. Extension of juxtamembrane domain of diphtheria toxin receptor arrests translocation of diphtheria toxin fragment A into cytosol. Biochem Biophys Res Commun, 2001, **281** (3): 690~696
- 13 王宏光, 李开宗, 窦科峰, 等. 血管内皮生长因子在肝癌细胞中的表达及意义. 细胞与分子免疫学杂志, 2001, **17** (4): 359~361
- Wang H G, Li K Z, Dou K F, *et al.* J Cell Mol Immunol, 2001, **17** (4): 359~361

A Fusion Protein Targeting The Vascular Endothelial Growth Factor Receptor I (VEGFR- 1)

BAI Xiang-Yang^{1,2)}, NI Jian-Feng^{1,2)}, LÜ An-Guo^{1)*}, WU Wen-Fang¹⁾, NIU Rui-Fang³⁾

⁽¹⁾Institute of Applied Ecology, The Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China;

⁽²⁾Graduate School of The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100016, China;

⁽³⁾Cancer Hospital Tianjin Medical University, Tianjin 300060, China)

Abstract Diphtheria toxin is an exotoxin secreted by *Corynebacterium diphtheriae* that has been lysogenized by β bacteriophage that carries the DT gene. It blocks protein synthesis and kills the target eukaryotic cell. The R82A, K84A, H86A mutant of vascular endothelial growth factor (VEGF) specially binds its receptor 1 (VEGFR-1) that is expressed highly on surface of tumor blood vessel. DT genomic DNA was extracted first and then the gene that coding the T domain and C domain of DT (DT391) were amplified. The R82A, K84A, H86A mutant were introduced to VEGF by site-directed mutagenesis. Then a VEGFR-1 targeting fusion protein, DT391-mVEGF, was constructed by substituting the receptor binding domain of DT with the VEGF mutant which shows high affinity to a receptor expressed on tumor vascular. With DT391, a protein without the mVEGF domain of DT391-mVEGF, as a negative control in cytotoxicity assay, the hybrid protein DT391-mVEGF showed an inhibition to the growth of VEGFR-1 positive tumor cell.

Key words diphtheria toxin, vascular endothelial growth factor (VEGF), vascular endothelial growth factor receptor-1, fusion protein

*Corresponding author . Tel: 86-24-83970383, E-mail: bxy31@yahoo.com

Received: November 3, 2004 Accepted: December 1, 2004