

## 靶向毒素 DT-VEGF 的构建、表达与活性分析

柴映爽 程 新 姚立红 陈爱珺 喻 宏 严馨蕊 贾润清\*\* 黄国锦 张智清\*

(中国疾病预防控制中心 病毒病预防控制所 病毒基因工程国家重点实验室 北京 100052)

**摘 要** 肿瘤的快速生长依赖于新生血管的形成。血管内皮生长因子(VEGF)是血管发生和形成过程中的主要介质,其特异性受体在正常组织和肿瘤组织的表达率存在数个数量级的差异,因此可以将毒素分子转运至增生的肿瘤上皮组织中抑制肿瘤血管增生,从而抑制肿瘤的生长。将白喉毒素的前 389 个氨基酸基因片段与 VEGF<sub>165</sub> 通过一短肽相连构建为融合蛋白基因,在大肠杆菌中表达,获得纯化蛋白。实验证实该融合蛋白对血管内皮细胞有特异性杀伤作用,并研究了其对鸡胚尿囊膜新生血管的抑制作用。

**关键词** 靶向毒素,血管内皮生长因子,白喉毒素,融合蛋白

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)02-0192-05

在肿瘤的治疗药物中,以 VEGF 受体为靶向的融合毒素正受到越来越多的关注。其生物学基础来自肿瘤组织与正常组织新生血管增生率的差异<sup>[1]</sup>。VEGF 在肿瘤生长和转移中是一种重要的介质,在血管的发生和形成过程中起主要调节作用。1993 年 Brown 等和 Plate 等运用原位杂交表明其特异性受体 flt-1 和 flk-1/KDR 在肿瘤血管表面高度表达,而相邻正常组织的血管上皮细胞中 VEGF 的受体几乎无法检测出,因此 VEGF 可以用来将毒素多肽转运至增生的肿瘤上皮组织中<sup>[2,3]</sup>。白喉毒素是靶向毒素常用的毒素分子,可阻断延伸因子 EF2 进入相应活性部位,从而不可逆地阻断蛋白质合成,其结构分为细胞毒性区、跨膜转运区和受体结合区<sup>[4]</sup>。本实验将白喉毒素前 389 个氨基酸通过一段连接肽与血管内皮生长因子 165 连接构建为靶向毒素 DT<sub>389</sub>-VEGF<sub>165</sub>,在原核表达系统中获得高效表达,并对表达产物进行了纯化与鉴定,研究了其对血管内皮细胞的抑制活性和抗血管生成作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 质粒** :pET3a/VEGF<sub>165</sub>,含血管内皮生长因子(VEGF)<sub>165</sub> 全长基因,本室保存。pUC18/DT<sub>389</sub>,含白喉毒素(DT)<sub>389</sub> 基因片段,本室保存。T-easy 载体购

自 Promega,质粒 pGEM-3ZF、pBV220、菌种 DH-5 $\alpha$  本室保存。

**1.1.2 细胞和鸡胚** :HUVEC 和 L929 细胞本室保存。三日龄鸡胚购自北京西郊养鸡场。

**1.1.3 工具酶与生化试剂** :核酸内切酶购自 TaKaRa, pfu DNA 聚合酶购自 Invitrogen, T4 DNA 连接酶购自 Promega,核酸分子量标准购自 TaKaRa,蛋白质分子量标准购自 Sigma 和 Gibco,兔抗人 VEGF 多抗购自 Santa Cruz 公司,马抗白喉毒素血清购自中国药品生物制品检定所,鼠抗人 VEGF 单抗本室保存,羊抗马、羊抗兔、羊抗鼠 IgG Fc 抗体购自中山公司,层析柱 Q-Sepharose Fast Flow、Sephacryl S-200 购自 Pharmacia,BCA 蛋白定量检测试剂盒购自 Pierce 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 重组靶向毒素克隆的构建:

分别设计上下游引物共 4 条以扩增 DT<sub>389</sub> 片段和 VEGF<sub>165</sub> 全长基因:

DT1 5'-CGGAATT CATATGGGCGCTGATGATGTTG-3'

DT2 5'-CGGGATCCTCCACCAGGTGCATGCATGCGTTTTAT-3'

VEGF1:

5'-GGGATCCGGTGGAGGGATCTGCACCCATGCCAGAAGGAGG-3'

VEGF2 5'-CCTGCAGTCACCGCCTCGGCTTGTAC-3'

引物 DT1 和 DT2 分别引入 EcoR I、Nde I 和 BamH I 酶切位点,以 pUC18/DT<sub>389</sub> 为模板,PCR 扩增出 DT<sub>389</sub> 片段,在 3'端引入连接肽的一部分序列;引

物 VEGF1 和 VEGF2 分别引入 *Bam*H I 和 *Pst* I 酶切位点,以 pET3a/VEGF<sub>165</sub> 为模板 PCR 扩增出 VEGF<sub>165</sub> 全长基因片段,在 5' 端引入连接肽的另一部分序列,在 3' 端引入终止密码子 TGA。

将 DT<sub>389</sub> 的 PCR 产物酶切后插入 pGEM-3ZF 载体,VEGF<sub>165</sub> 的 PCR 产物与 T-easy 载体相连接。各自测序正确后,分别以 *Bam*H I 和 *Pst* I 双酶切后连接,构建为 pGEM-3ZF/DT-VEGF。将融合蛋白基因插入 pBV220,构建为重组表达载体 pBV220/DT-VEGF,其中 DT<sub>389</sub> 与 VEGF<sub>165</sub> 部分以一段连接肽 GlyGlyGlySer GlyGlyGlySer 相连。

**1.2.2 重组蛋白在大肠杆菌中的表达**:将 pBV220/DT-VEGF 转化大肠杆菌 DH-5 $\alpha$ ,挑取阳性克隆接种含 Amp 的 LB 培养基,30 $^{\circ}$ C 培养过夜,1:100 转接种放大,*OD*<sub>600</sub> = 0.4 时,升温至 42 $^{\circ}$ C 诱导表达,SDS-PAGE 电泳检测表达水平。

**1.2.3 重组蛋白的纯化**:菌体沉淀以裂解液重悬,冰浴超声破碎,离心后收集包涵体沉淀,3mol/L 盐酸胍洗涤,以 8mol/L 尿素溶解包涵体,复性后以 20mmol/L TrisCl(pH = 8.0)透析过夜,上阴离子交换柱 Q-Sepharose Fast Flow 梯度洗脱,收集目的蛋白峰后,上 Sephacryl S-200 凝胶层析柱洗脱目的蛋白峰,Pierce 试剂盒测定蛋白浓度。

**1.2.4 重组蛋白的鉴定**:

**ELISA**:将蛋白从 250 $\mu$ g/mL 浓度起倍比稀释,包被后封闭过夜,以鼠抗人 VEGF<sub>165</sub> 单抗为一抗,辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 为二抗,显色后 490nm 比色测定。

**Western blot**:纯化蛋白经非还原 SDS-PAGE 电泳后转膜,脱脂奶封闭过夜,分别以马抗白喉毒素血清、兔抗人 VEGF<sub>165</sub> 多抗为一抗,辣根过氧化物酶标记的羊抗马和羊抗兔 IgG 为二抗,DAB 显色。

**1.2.5 细胞生物学检测**:MTT 检测对 EC 细胞的特异性细胞毒作用:将生长状态良好的 EC 细胞消化后用含 10% 血清的 1640 细胞培养液重悬,稀释为  $2 \times 10^5$  个/mL 浓度,接种 96 孔板培养 24h,镜下观察细胞已汇合后,依次加入不同浓度的重组蛋白,以 L929 细胞作为对照,72h 后每孔加入 10 $\mu$ L MTT,4h 后加入 10% SDS(pH = 4.5)终止反应。1h 后,570nm 波长下测定每孔的 *OD* 值。

肝素对重组蛋白特异性细胞毒作用的抑制作用检测:EC 细胞如上接种 96 孔板,培养 24h,镜下观察细胞已汇合后,加入浓度为 125 $\mu$ g/mL 的重组蛋白,

同时分别加入浓度从 250 $\mu$ g/mL 起倍比稀释的肝素,培养 72h 后,进行 MTT 比色测定。

DT 多抗对重组蛋白特异性细胞毒作用的抑制作用测定:EC 细胞接种 96 孔板,培养 24h 后,加入浓度为 50 $\mu$ g/mL 的重组蛋白,同时分别加入浓度从 200 $\mu$ g/mL 其倍比稀释的白喉毒素多抗,72h 后 MTT 比色测定。

**1.2.6 抗血管生成作用检测**:选 3 日龄鸡胚 60 只,分为 PBS 对照组、10 $\mu$ g 组、5 $\mu$ g 组、2.5 $\mu$ g 组、1.25 $\mu$ g 组、625ng 组,每组 10 只。具体方法为照检后标出气室,在气室中央钻一小孔钻通壳膜,另在一侧的蛋壳造一卵窗,在卵窗处壳膜中央滴一滴灭菌生理盐水,用针尖在壳膜上划一小隙,再以橡皮乳头紧按气室小孔向外吸气造成负压,生理盐水即自裂隙渗入壳膜与尿囊膜之间使绒毛尿囊膜下陷,形成一人工气室。将 50~100 $\mu$ L 过滤除菌后的样品液滴入人工气室,以 PBS 为对照。轻轻旋转鸡胚使样品液均匀分布,用消毒胶布封卵窗,石蜡熔化封气室小孔,置 37 $^{\circ}$ C 温室培养,使人工气室朝上,72h 后收获鸡胚,保留心脏仍跳动的活鸡胚,观察尿囊膜血管的生成情况,对人工气室的样品液滴加部位拍照保存。

## 2 结 果

**2.1 重组靶向毒素克隆的构建与鉴定**:

pGEM-3ZF/DT-VEGF 酶切与测序结果表明,DT、VEGF 及连接肽的基因完全正确,与预期设计相符。

**2.2 DT-VEGF 在大肠杆菌中的表达**:将表达载体阳性克隆转化 *E. coli* 后诱导表达,离心后菌体沉淀和上清分别行 SDS-PAGE 电泳,在 *M<sub>r</sub>* 为 60 000 处可见浓集目的蛋白表达带,与预计分子质量相符,表达量可达 30%。超声后沉淀和上清电泳表明该蛋白的表达形式以包涵体为主(图 1)。

**2.3 DT-VEGF 的纯化**

变性后蛋白经透析复性后(另文刊出),上阴离子交换柱 Q-Sepharose Fast Flow 梯度洗脱,再经 Sephacryl S-200 分子筛分离,SDS-PAGE 电泳分析表明,最终纯度可达 95%(图 2)。

**2.4 DT-VEGF 纯化蛋白的鉴定**

**2.4.1 ELISA**:ELISA 表明,倍比稀释的 DT-VEGF 与 VEGF 单抗有特异性结合,且呈现线性关系(图 3)。

**2.4.2 Western blot 鉴定**:结果表明(图 4),对白喉毒素多克隆抗体及人 VEGF<sub>165</sub> 多抗均有免疫反应性,证明重组蛋白中 DT<sub>389</sub> 和 VEGF<sub>165</sub> 均能保持各自的免疫活性。

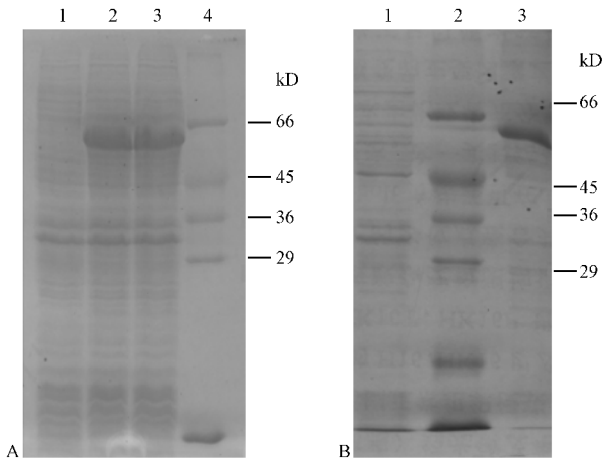


图 1 pBV220/DT-VEGF 在 *E. coli* 中的表达

Fig.1 Expression of pBV220/DT<sub>389</sub>-VEGF<sub>165</sub> in *E. coli*

A.1 pBV220 control 2 3 pBV220/DT<sub>389</sub>-VEGF<sub>165</sub> 4 : Protein marker  
B.1 :supernatant 2 :Protein marker 3 :precipitate

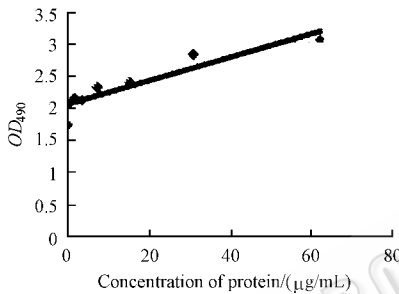


图 3 ELISA 检测与 VEGF<sub>165</sub> 单抗的结合

Fig.3 ELISA detection of DT-VEGF binding with VEGF<sub>165</sub> monoclonal antibody

### 2.5 细胞生物学检测

DT-VEGF 对表达 VEGF<sub>165</sub> 受体的 EC 细胞表现出杀伤作用,而不表达 VEGF 受体的 L929 细胞及仅加入 PBS 的 EC 细胞生长正常(图 5),表明特异性的 VEGF<sub>165</sub> 受体是靶向毒素发挥细胞毒作用的关键因素。MTT 染色表明,重组靶向毒素 DT-VEGF 从 125 μg/mL 倍比稀释至 390ng/mL,作用于细胞 72h 后,对细胞的生长抑制作用呈现出较明显的剂量反应关系(图 6)。VEGF<sub>165</sub> 具有肝素结合活性,MTT 染色检测表明,肝素对 DT-VEGF 的抑制作用呈现较明显的剂量反应关系(图未列出),进一步表明构建的靶向毒素保持了 VEGF<sub>165</sub> 部分的活性。此外,MTT 染色检测表明,DT 多抗对 DT-VEGF 的细胞毒作用表现出较明显的抑制作用,并呈现剂量效应关系(图未列出)。表明靶向毒素的细胞毒作用与其白喉毒素 389 部分有关,并进一步证实靶向毒素在构建过程

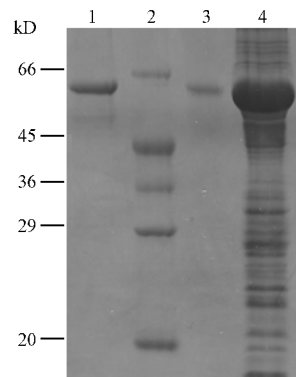


图 2 DT-VEGF 分步纯化产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of DT-VEGF purified by different chromatography

1 : Q-Sepharose Fast Flow ; 2 : Protein marker ; 3 : Sephacryl S-200 ; 4 : Inclusion body



图 4 表达产物的 Western blot 分析

Fig.4 Western blot analysis of DT-VEGF expressed in *E. coli*  
1 : anti-diphtheria toxin polyclonal antibodies ; 2 : anti-VEGF<sub>165</sub> polyclonal antibodies ; 3 : Protein marker

中 DT 和 VEGF 均保持了各自的生物学活性。

### 2.6 抗血管生成作用检测

对三日龄鸡胚的尿囊膜接种试验表明,重组靶向毒素 DT-VEGF 对鸡胚尿囊膜血管的生成有明显的抑制作用。从结果来看,在 625ng 的剂量时,即可表现出抑制作用。且随着毒素的剂量增加,血管的大小、分枝点呈现递减的趋势,表明抑制作用随毒素的增加而增强。各组内样本间血管抑制作用相差不大(图 7)。

## 3 讨 论

传统的肿瘤治疗药物多为直接杀伤肿瘤细胞本身。然而肿瘤细胞基因组不稳定,具有免疫逃逸等机制,在治疗中尤其是后期与正常细胞难以区分,常存在副作用大,易耐药,有效剂量高等缺点。由于肿瘤细胞可诱发肿瘤的血管化以维持肿瘤的生长,近

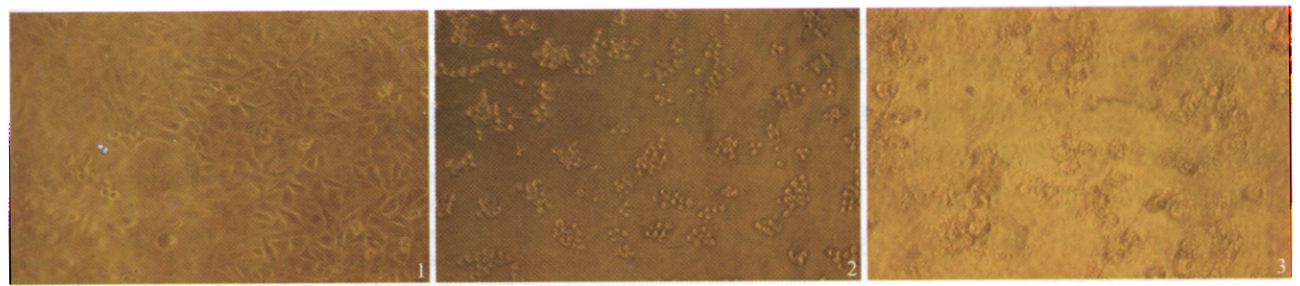


图5 DT-VEGF对EC细胞的特异性细胞毒作用

Fig.5 EC cells killed specifically by DT-VEGF

1: L929 control; 2: EC cells (24 h after DT-VEGF treatment); 3: EC cells (72 h after DT-VEGF treatment)

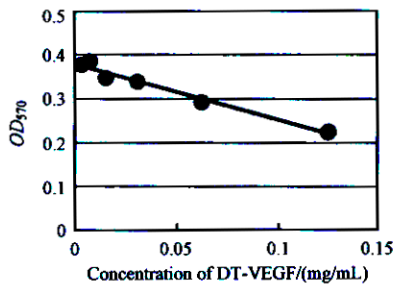


图6 MTT法测定DT-VEGF对EC细胞的特异性细胞毒作用

Fig.6 Dose-responsive analysis of DT-VEGF's cytotoxicity on EC cells by MTT

年来开始研究通过抑制其血管生成以达到治疗目的。这一途径的优点在于:1)可适用于各种实体瘤;2)作为靶细胞的血管内皮细胞在遗传性质上稳定不易变异;3)血管内皮细胞与血液邻接,药物易于到达<sup>[5]</sup>。因此,抗血管生成药物正在成为肿瘤药物的研发重点方向。

在抗血管生成的治疗药物方面,以 VEGF 受体为靶向的融合毒素能够破坏肿瘤的血管而避免对正常组织的损伤,是更有前景的治疗手段,同时在视网膜疾病、艾滋等方面亦有潜在的应用价值<sup>[6,7]</sup>。近年来 VEGF 靶向毒素的研发进展较快,2003 年美国已有制药公司计划开展相关药物的人体试验。

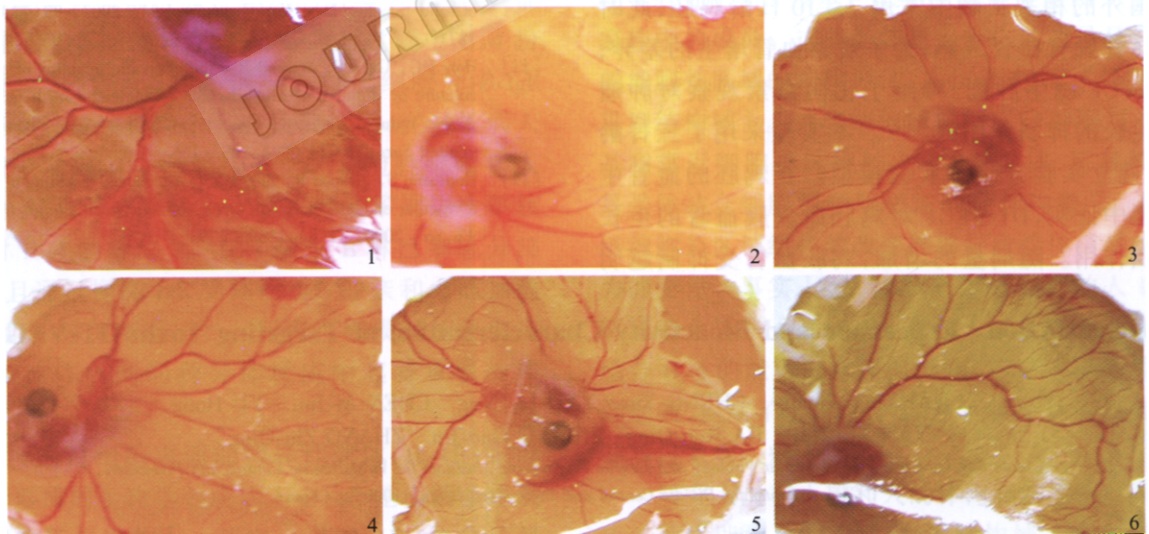


图7 DT-VEGF对鸡胚尿囊膜的血管抑制作用

Fig.7 Inhibition to the vessel formation on chick embryo chorioallantoic membrane of DT-VEGF

1: Control (PBS); 2: 10 $\mu$ g DT-VEGF; 3: 5 $\mu$ g DT-VEGF; 4: 2.5 $\mu$ g DT-VEGF; 5: 1.25 $\mu$ g DT-VEGF; 6: 0.625 $\mu$ g DT-VEGF

VEGF 的结构特征为以六个链内二硫键和两个链间二硫键维持的反向平行同型二聚体,受体结合区域位于单体的两极<sup>[8]</sup>。因 mRNA 前体不同拼接方式产生 5 种异构体,分别含 206, 189, 165, 145 和 121

个氨基酸。五种异构体中 VEGF<sub>121</sub> 和 VEGF<sub>165</sub> 最为丰富,其中 VEGF<sub>165</sub> 除可结合 flt-1 和 flk-1/KDR 受体外,近年来又发现它在内皮细胞和肿瘤细胞上还有特异性受体神经纤毛蛋白 (neuropilin)-1、2 受体,对

VEGF<sub>165</sub> 与 flk-1/KDR 受体的结合有促进作用<sup>[9]</sup>。本实验克隆了白喉毒素的前 389 个氨基酸的编码基因和 VEGF<sub>165</sub> 全长基因, 修饰后通过一段连接肽(Linker) 相连构建为靶向毒素融合基因。DT<sub>389</sub> 片段包括细胞毒性区和跨膜区, VEGF<sub>165</sub> 取代了位于白喉毒素 C 端的受体结合区。融合蛋白全长为 549 个氨基酸, 分子量为 60.5kD。

免疫学鉴定表明, 融合蛋白的两端的多肽均能保持天然构象, 反映 Linker 的设计保持了两端多肽在空间上的相互独立性。细胞生物学实验证实, 重组蛋白 DT<sub>389</sub>-VEGF<sub>165</sub> 对高度表达 VEGF<sub>165</sub> 受体的 HUVEC 细胞表现出特异性的杀伤作用, 呈现出剂量反应关系。肝素可以拮抗此种杀伤作用, 表明其作用是通过与 VEGF<sub>165</sub> 受体结合发挥的。白喉毒素多抗对此种细胞毒作用有拮抗作用, 表明此种作用与白喉毒素对细胞的杀伤作用相关。说明了靶向毒素在构建后保持了完整的 VEGF 的生物学活性。

鸡胚尿囊膜(CAM)测定是常用的血管抑制测定方法。三日龄的鸡胚形体较小, 不易对尿囊膜的观察造成干扰。另外此时尿囊膜血管数亦较少, 观察新生血管生长情况的差别较为方便。但三日龄鸡胚较脆弱易死亡, 尿囊膜难以分离, 操作上颇为不便, 因此国外的相关文献中常用 7~10 日龄鸡胚, 此时鸡胚血管发育已较成熟, 为了观察血管增生的差异, 多用 bFGF 诱生肿瘤, 再给予靶向毒素观察对肿瘤血管生长的抑制作用<sup>[10, 11, 12]</sup>。本实验采用了三日龄鸡胚, 建立实验方法和实验模型。在鸡胚的血管生成模型中证实, DT-VEGF 对鸡胚尿囊膜血管的生长有抑制作用。随剂量的增加, 鸡胚血管受抑制越明

显。关于 DT-VEGF 进一步的应用研究需进行肿瘤治疗的动物实验, 目前该工作正有待进行。

## REFERENCES (参考文献)

- [1] Folkman J. The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin Cancer Biol*, 1992, **3**: 65 - 71
- [2] Brown LF, Berse B, Jackman RW *et al*. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Cancer Res*, 1993, **53**: 4727 - 4735
- [3] Plate KH, Breier G *et al*. Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its cognate receptors in a rat glioma model of tumor angiogenesis. *Cancer Res*, 1993, **53**: 5822 - 5827
- [4] Gill DM, AM Pappenheimer, Jr. Structure activity relationships in diphtheria toxin. *J Biol Chem*. 1971, **246**: 1492 - 1495
- [5] Veenendaal LM, Jin H, Ran S *et al*. *In vitro* and *in vivo* studies of a VEGF<sub>121</sub>/rGelolin chimeric fusion toxin targeting the neovasculature of solid tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(12): 7866 - 7871
- [6] Gordon MS. Vascular endothelial growth factor as a target for antiangiogenic therapy. *J Clin Oncol*, 2000, **18**(21 Suppl): 455 - 465
- [7] Vallera DA. Gene therapy with immunotoxins. *Methods Mol Biol*, 2001, **166**: 235 - 246
- [8] Keyt BA, Nguyen HV, Berleau LT *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**: 5638 - 5646
- [9] Soeker S, Takashima S, Miao HQ *et al*. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*, 1998, **92**: 735 - 745
- [10] Veenendaal LM, Jin H, Ran S *et al*. *In vitro* and *in vivo* studies of a VEGF<sub>121</sub>/rGelolin chimeric fusion toxin targeting the neovasculature of solid tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(12): 7866 - 7871
- [11] Hotz HG, Gill PS, Masood R *et al*. Specific targeting of tumor vasculature by diphtheria toxin-vascular endothelial growth factor fusion protein reduces angiogenesis and growth of pancreatic cancer. *J Gastrointest Surg*, 2002, **6**(2): 159 - 166
- [12] Hoffmann S, Masood R, Zhang Y *et al*. Selective killing of RPE with a vascular endothelial growth factor chimeric toxin. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, **41**(8): 2389 - 2393

## Construction, Expression and Bioactivity Characterization of Targeting Toxin DT-VEGF

CHAI Ying-Shuang CHENG Xin YAO Li-Hong CHEN Ai-Jun YU Hong

YAN Xin-Rui JIA Run-Qing HUANG Guo-Jin ZHANG Zhi-Qing\*

(State Key Laboratory for Molecular Virology and Genetic Engineering, Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052, China)

**Abstract** Tumor rapid growth depends on neovascularization. Vascular endothelial growth factor, the main mediator during the occurrence and formation of vascularization, has specific receptors whose expression rate shows difference of orders of magnitude between tumor and the normal tissue, so it can be used to transport toxin molecules to the proliferative tumor endothelial and kill cancer cells. In our experiment, we constructed fusion protein DT-VEGF by linking diphtheria toxin's forward 389 amino acids's gene and VEGF<sub>165</sub> via a linker. DT-VEGF is expressed in *E. coli* and purified. Our experiment proves in can kill vascular endothelial cells specifically, and the inhibition of neovascularization of chicken chorionic membrane is also confirmed.

**Key words** target toxin, vascular endothelial growth factor, diphtheria toxin, fusion toxin

Received: 07-20-2003

\* Corresponding author. Tel 86-10-63519655; Fax 86-10-63519655

E-mail: zhangzq@public3.bta.net.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn