

Evaluation of anticancer peptide VEGF111b secretion in HEK293 human cells

Sadeghi M^{1*}, Hojati Z²

1- Human Genetic Research Center, Baqiyatallah Medical Sciences University, Tehran, I. R. Iran.

2- Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, I. R. Iran.

Received March 14, 2016; Accepted November 21, 2016

Abstract:

Background: VEGF111b is a new isoform of vascular endothelial growth factor (VEGF) recently considered as a new anticancer drug. The aim of this study was to evaluate the VEGF111b secretion from HEK293 cell wall in order to commercial production of this recombinant factor.

Materials and Methods: After the design of VEGF111b sequence using OLIGO software and NCBI gene bank data, it was cloned into the pBUD.cE4.1 vector. The pBUD.VEGF111b recombinant vector was transfected into HEK293 cells using lipofectamine kit. Forty-eight hours after the transfection the production of VEGF111b was estimated by Western blotting and Human anti VEGF antibody. The VEGF111b secretion into cell culture and cell lysate extract was measured using ELISA.

Results: The correct cloning of VEGF111b into pBUD.cE4.1vector was confirmed using enzymatic digestion and gel electrophoresis. The observed production of recombinant peptide in HEK293 was confirmed with 12KDa band in cell lysate extract of Western blotting. The ELISA results at 450 nanometer absorbance for cell culture media and cell lysate extract were 19.20 ± 2.81 pg/ml and 32.87 ± 7.42 pg/ml, respectively. However, no VEGF111b expression was observed in negative controls.

Conclusion: The findings of this study indicate the powerful ability of transformation and secretion of VEGF111b from HEK293 cell wall to cell culture media with no breaking and proteolytic digestion. It seems that the commercial production and purification of this therapeutic peptide from HEK293 cell culture would be possible with high efficiency.

Keywords: Vascular Endothelial Growth Factor A, Secretion, HEK293

*** Corresponding Author.**

Email: ms.sadeghi@yahoo.com

Tel: 0098 212 640 3292

Fax: 0098 218 893 0684

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, April, 2017; Vol. 21, No 1, Pages 28-34

Please cite this article as: Sadeghi M, Hojati Z. Evaluation of anticancer peptide VEGF111b secretion in HEK293 human cells. *Feyz* 2017; 21(1): 28-34.

بررسی میزان ترشح خارج سلولی پپتید ضد سرطان VEGF111b در سلول‌های انسانی HEK-293

*^۱ مرتضی صادقی ، زهره حجتی

خلاصه:

سابقه و هدف: یک ایزوفرم جدید از فاکتورهای رشد اندوتیال عروقی (VEGF) است که اخیراً به عنوان یک داروی ضد سرطان مطرح شده است. هدف مطالعه حاضر بررسی میزان ترشح این پروتئین از دیواره سلول‌های HEK293 به منظور تولید تجاری این فاکتور نوتروکیب است.

مواد و روش‌ها: توالی VEGF111b توسط نرم‌افزار OLIGO و اطلاعات ژن بانک NCBI طراحی و داخل وکتور pBUD.cE4.1 کلون شد. وکتور نوتروکیب VEGF111b pBUD با استفاده از کیت لیپوفکتمین به داخل سلول‌های HEK293 ترانسفت کش شد. تولید VEGF111b ۴۸ ساعت بعد از ترانسفت کش در عصاره لیز سلولی توسط وسترن بلاستینگ و آنتی‌بادی Human anti-VEGF بررسی شد. میزان ترشح VEGF111b در عصاره لیز سلولی و محیط کشت سلولی به روش ELISA اندازه گیری گردید.

نتایج: کلونبینگ صحیح قطعه VEGF111b در وکتور pBUD.cE4.1 توسط هضم آنزیمی و ژل الکتروفورز تائید شد. مشاهده باند شارپ ۱۲ کیلو Dalton در نتایج وسترن بلاست عصاره لیز سلولی نشان‌گر تولید پپتید نوتروکیب VEGF111b در سلول‌های HEK293 بود.

نتایج الیزا در جذب نوری 450 nm برای VEGF111b در محیط کشت سلولی و عصاره لیز سلولی به ترتیب برابر با $19/20 \pm 2/81$ pg/ml و $7/42 \pm 3/2$ pg/ml بود. در نمونه‌های کنترل منفی بیان VEGF-111b مشاهده نشد.

نتیجه گیری: یافته‌های این مطالعه نشان‌گر قابلیت بالای انتقال و ترشح VEGF111b از دیواره سلول‌های HEK293 به محیط کشت سلولی بدون شکستگی و هضم پروتولوژیکی است. به نظر می‌رسد تولید تجاری این پپتید دارویی و تخلیص از محیط کشت سلولی HEK293 با بازدهی بالا امکان پذیر باشد.

واژگان کلیدی: فاکتور رشد اندوتیال عروقی A، ترشح، HEK293

دو ماهنامه علمی - پژوهشی فیض، دوره بیست و یکم، شماره ۱، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۶، صفحات ۲۸-۳۴

ایزوفرم‌های مختلف VEGF-A بر اساس اسپلایسینگ متفاوت در دو خانواده VEGF-xxx یا ایزوفرم‌های پیش‌رگزا و -VEGF-xxxb یا ایزوفرم‌های ضد رگزا تقسیم‌بندی می‌شوند. جایگاه پیرایش نزدیک در اگزون ۸ منجر به تولید ایزوفرم‌های با خاصیت رگزایی یا همان VEGFXXX می‌شود، درحالی‌که جایگاه پیرایش دور، باعث ایجاد ایزوفرم‌های ضدرگزایی VEGFXXXb می‌شود. در حالت طبیعی در سلول پیرایش متنابوب ژن A باعث تولید حداقل ۷ ایزوفرم مختلف با طول‌های ۱۶۵، ۱۲۱، ۱۸۹، ۲۰۶، ۱۸۳، ۱۴۵، ۱۱۱، و ۱۴۷ اسید آمینه می‌شود. ایجاد این ایزوفرم‌های مختلف از طریق پیرایش متنابوب در اگزون‌های ۷، ۶ و ۸ حاصل می‌شود و اگزون‌های ۱-۵ در تمام این ایزوفرم‌ها ثابت هستند. مهم‌ترین اعضاء گروه XXXb شامل VEGFA189b و VEGF121b و VEGFA183b، VEGFA165b، A145b هستند. در مقایسه با ایزوفرم‌های پیش‌رگزا، خانواده ایزوفرم‌های VEGF-xxxb از طریق انتخاب جایگاه پیرایش DSS ایجاد شده و اگزون ۸b در آنها اسید آمینه‌های SLTRKD را کد می‌کند و روی گیرنده‌های خاص غشاء سلولی با نام VEGF-A [۵،۴] عمل می‌کنند که جزء گیرنده‌های VEGF-R2 و VEGF-R1

مقدمه

رگزایی به فرایند شکل‌گیری عروق خونی جدید از عروق قدیمی اطلاق می‌گردد. این فرایند شامل تمایز سلول‌های اندوتیال از سلول‌های پیش‌ساز مژودرمی محل می‌شود. VEGF A نقش مهمی در فرآیندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک مرتبط با رگزایی بر عهده دارد. این فاکتور رگزایی بقا زیستی، تکثیر، مهاجرت و تمایز سلول‌های اندوتیال را تحريك می‌کند [۱]. VEGF در آنژیوژنر تومورها به صورت یک فاکتور کلیدی عمل نموده و رشد رگ‌های جدید از رگ‌های قبلی را تحريك می‌کند. بدین ترتیب مواد غذایی و اکسیژن مورد نیاز سلول‌های تومور فراهم می‌گردد و در نتیجه باعث رشد و متاستاز تومور می‌شود [۲، ۳].

^۱ استادیار، مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران

^۲ دانشیار، بخش ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشگاه اصفهان، اصفهان

***نشانی تهییله مسئول:**

تهران، میدان ونک، خیابان ملاصدرا، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، پژوهشگاه ژنتیک

تلفن: ۰۲۱ ۲۶۴۰۳۲۹۲، دوچرخه‌سواری: ۰۲۱ ۸۸۹۳۰۶۸۴

پست الکترونیک: ms.sadeghi@yahoo.com

تاریخ پذیرش نهایی: ۹۵/۹/۱۲/۲۴، تاریخ دریافت: ۹۵/۹/۱۲/۲۴

طراحی و کلونینگ ایزوفرم VEGF111b به طور طبیعی در سلول وجود ندارد و طراحی آن با استفاده از داده‌های موجود در ژن NCBI و نرم‌افزار 7 Oligo انجام شد. طراحی به‌گونه‌ای صورت گرفت که اگزون‌های ۱-۴-۵-۶-۷-۸ VEGF به توالی اگزون b متعلق شود؛ بدین ترتیب اگزون‌های ۵، ۶ و ۷ از توالی اصلی حذف شد و به جای اگزون ۸ اگزون 8b قرار داده شد. جایگاه طول نهایی توالی پس از برش توسط آنزیم‌های محدودگر برابر ۴۲۹ جفت باز در نظر گرفته شد. توالی توسط نماینده کمپانی فرماتاز در ایران سنتز شد (شکل شماره ۱، C). برای ترانسفورم قطعه نوترکیب 111b به داخل سلول‌ها از وکتور pBudCE4.1 استفاده شد. وکتور توسط آنزیم‌های محدودگر BglII و KpnI است. وکتور دستورالعمل شرکت سازنده برش داده شد و (Thermo) طبق دستورالعمل شرکت سازنده برش داده شد و (Ther-T4 DNA ligase) با استفاده از آنزیم vegf111b با این موتور EF-1 α وکتور الحاق شد (شکل شماره ۱، A).

ترانسفکشن سلول‌های HEK293

وکتور نوترکیب pBUD.VEGF111b حاوی ژن VEGF111b با استفاده از کیت لیوبکتامین (Invitrogen) به سلول‌های HEK293 منتقل شد. برای این منظور، ابتدا در حدود 350×10^3 سلول در هر پلیت کشت داده شد و پلیت حاوی سلول برای رسیدن به رشد معادل $50-80$ درصد در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و میزان 5 CO₂ درصد و رطوبت 95 درصد به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شد. سپس، به ازای هر خانه از پلیت 1mL محیط فاقد سرم و 500 ng از DNA پلاسمیدی باهم مخلوط شد و 1 mL از بافر PLUSTM Reagent به مخلوط DNA پلاسمیدی Lipo- و محیط فاقد سرم اضافه شد. به مخلوط فوق $1\mu\text{L}$ از $2/5\text{ }\mu\text{L}$ fectamine[®] LTX پلیت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و 5 CO₂ درصد با رطوبت 95 درصد نگهداری شد.

وسترن بلاستینگ:

برای انجام وسترن بلاست پس از ۴۸ ساعت از سلول‌های ترانسفکت شده با استفاده از بافر لیزکننده (Buffer RLT) و هموژنیزاسیون توسط سرنگ استریل عصاره لیز سلول‌های تهیه شد و از عصاره لیز سلول‌های ترانسفکت نشده به عنوان کنترل منفی استفاده شد. برای انجام وسترن بلاست 1mL از مارکر پروتئین و $10\text{ }\mu\text{L}$

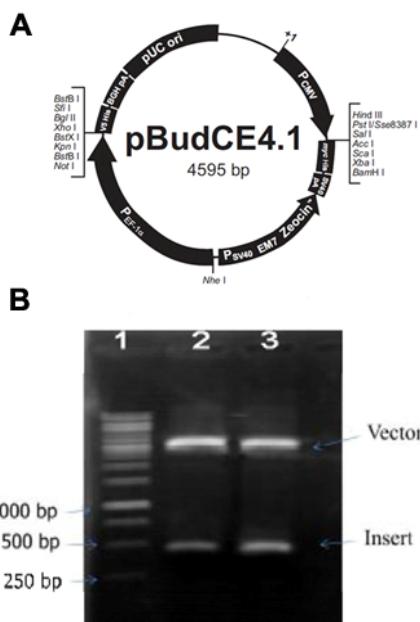
تیروزین کینازی هستند و با اتصال لیگاند به صورت دایمر درآمده و باعث فعال شدن مسیرهای پایین‌دستی انتقال پیام از جمله فعال سازی فسفولیپاز گاما (PLC γ) و فسفاتیدیل اینوزیتول تری‌کیناز و انتقال Ca²⁺ می‌شود [۷،۶]. اگرچه VEGF-A با گرایش بیشتر VEGF-R1 متصل می‌شود، ولی مطالعات نشان می‌دهد بیشتر تحریکات رگزائی VEGF-A توسط گیرنده دوم یعنی VEGF-R2 در تولید پروتئین‌های نوترکیب با حجم بالا ترشح پروتئین به محیط خارج سلولی یکی از الزامات امکان تولید و استخراج این محصولات از طریق سلول‌های یوکاریوتی است. از آنجائی که VEGF-A دارای توالی سیگنال است، انتظار می‌رود که هم‌زمان با ترجمه به شبکه رتیکولوم آندوپلاسمی منتقل شود و در آنجا پیتید نشانه آن جدا شده و سپس به غشاء سلول منتقل شود [۹-۱۱]. ایزوفرم‌های سلولی VEGF-A در خارج سلول با شبکه ماتریکس خارج سلولی و نورووفیرین متصل می‌شوند و در مجاورت غشاء سلول باقی می‌مانند و همین امر باعث کاهش ترشح آنها به خارج سلول می‌شود [۱۲-۱۴]. جایگاه اتصال به هپارین و ماتریکس خارج سلولی در اگزون‌های ۶ و ۷ قرار دارد. ایزوفرم نوترکیب VEGF111b به طور طبیعی در سلول وجود ندارد و برای اولین بار در سال ۲۰۱۴ کلون و بیان شد. این ایزوفرم دارای اگزون‌های ۱ تا ۴ و اگزون 8b از ژن VEGFA است. با حذف این اگزون‌های ۵ تا ۷ انتظار می‌رود این ایزوفرم به نورووفیرین، هپارین و ماتریکس خارج سلولی متصل نشود و به خوبی به خارج سلول ترشح شود [۱۵]. با توجه به پتانسیل بالای سلول‌های HEK- (Human Embryonic Kidney 293 cells) در تولید پروتئین‌های نوترکیب و اهمیت داروئی VEGF-293 در این مطالعه ما برای اولین بار در ایران به بررسی میزان بیان و ترشح این پروتئین در سلول‌های HEK293 پرداختیم.

مواد و روش‌ها

کشت سلول و وکتور:

برای انجام این مطالعه تجربی سلول‌های انسانی HEK293 از انتستیتو پاستور ایران تهیه شد و در محیط ۱۰% GlutaMAX DMEM، High Glucose، $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ FBS+P/S ۱% پتومایسین (P/S) ساخت فرماتاز، و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد، 5 CO₂ درصد و رطوبت 95 درصد کشت داده شد. در این مطالعه از وکتور بیانی pBUD.CE4.1 استفاده شد و قطعه ژنی VEGF111b با طول ۴۲۹ جفت باز تحت پرومتوور EF-1 α این وکتور کلون گردید.

پس زمینه واکنش و از سلول‌های HEK293 ترانسفکت نشده به عنوان کنترل منفی استفاده شد.



شکل شماره ۱- ساختار وکتور pBudCE4.1 و نتایج ژل الکتروفورز برای تائید وکتور نوترکیب: A: توالی وکتور pBudCE4.1 با دو سایت برش آنزیمی، جایگاه و جهت الحق قطعه VEGF111b در پائین دست پروموتور EF-1 (EF-1). (B): نتایج ژل الکتروفورز تائید کلونینگ صحیح قطعه 111b در وکتور، لاین ۱: مارکر ۱ کیلو بازی، لاین ۲ و ۳: وکتور نوترکیب برش یافته با آنزیم‌های BgIII و KpnI و طول ۴۵۹۰ جفت باز به همراه قطعه 111b (insert) با طول ۴۲۹ جفت باز.

پس از انجام کلیه مراحل و اضافه کردن Stop solution نتایج با استفاده از دستگاه اسپکتروفرنومتر بررسی شد. طبق نتایج به دست آمده از الایزا میزان VEGF111b در جذب نوری ۴۵۰ نانومتر در محیط کشت سلولی و عصاره لیز سلولی به ترتیب برابر با $19/20 \pm 2/81$ و $32/87 \pm 7/42$ pg/ml بود و در نمونه‌های کنترل منفی هیچ بیانی از VEGF-111b مشاهده نشد (شکل شماره ۲، B).

بحث

رگ‌زائی به فرایند شکل‌گیری عروق خونی جدید از عروق قدیمی اطلاق می‌گردد. این فرایند شامل تمایز سلول‌های اندوتیال از سلول‌های پیش‌ساز مژودرمی محل می‌شود [۱]. فرایند رگ‌زائی به فعل و افعالات وسیع میان سلول‌ها و مولکول‌های مختلف وابسته بوده و توسط فاکتورهای داخلی متعددی کنترل می‌شود. به منظور ایجاد عروق خونی جدید، آبشاری از قایع سلولی در سلول به وجود می‌پیوندد. مهم‌ترین عملکردهای رگ‌زائی

میکرولیتر از عصاره لیز سلولی روی ژل پلی‌اکریلامید حاوی استکینگ X ۱۰ و رانینگ X ۲ قرار گرفت و الکتروفورز انجام شد. سپس، تثیت باندها توسط متانول و اسید استیک انجام شد و رنگ آمیزی کماسی بلو روی ژل انجام شد. بعد از انتقال باندها روی کاغذ نیتروسلولز، بلاکینگ با استفاده از Skim milk + PBS ۱X دارای ۱۰ درصد انجام شد و شستشو توسط محلول PBS ۱X ۰/۰۵ درصد Tween ۲۰ انجام گرفت. ظهور باندها با استفاده از محلول آنتی‌بادی Human anti VEGF antibody و معرف HRP DAB صورت پذیرفت.

تکنیک الایزا:

الایزا با استفاده از کیت-*Boster Biological Tech*-*ELISA* (Boster Biological Tech, USA EK0539) انجام شد. در این کیت در وهله اول از آنتی‌بادی اولیه متصل به بیوتین برعلیه VEGF111b استفاده می‌شود و سپس از آبودین کانزروگه با آنزیم HRP استفاده می‌شود و تعیین غلظت نسبی VEGF-111b تولید شده با استفاده از سنجش تغییر رنگ نمونه مورد آزمایش قرار گرفته و نمونه استاندارد تخمین زده می‌شود.

نتایج

کلونینگ قطعه VEGF111b در جایگاه مورد نظر وکتور pBudCE4.1

بررسی هضم آنزیمی وکتور استخراج شده از باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک زئوین با دو آنزیم محدودگر BglIII و KpnI نشان‌گر دو باند با طول‌های ۴۲۹ و ۴۵۹ جفت باز است. طبق انتظار وجود توالی ۴۲۹ جفت بازی مربوط به قطعه VEGF111b و توالی ۴۵۹ جفت بازی مربوط به وکتور بریده شده pBudCE4.1 است (شکل شماره ۱، B).

وسترن بلاست:

وجود باند قوی ۱۲ کیلو Dalton در نتایج وسترن بلاست سلول‌های HEK293 ترانسفکت شده حاکی از اتصال آنتی‌بادی اختصاصی است و عدم وجود این باند در سلول‌های غیر ترانسفکت نشان‌گر و موید تولید موفق پروتئین نوترکیب-VEGF-111b در سلول‌های HEK293 است (شکل شماره ۲، A)

الایزا:

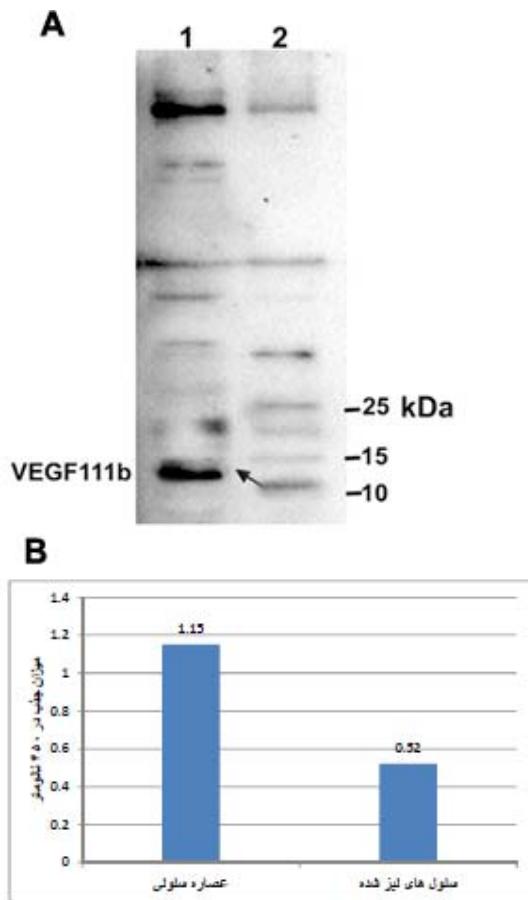
در این تکنیک سلول‌های ترانسفکت شده و لیز شده مورد آنالیز بیانی قرار گرفتند و از PBS به عنوان ماده

293 پرداختیم. طبق یافته‌های ما این پروتئین نوترکیب به خوبی در سلول‌های HEK293 بیان می‌شود و یافته‌های الایزا محیط کشت سلولی بیان‌گر ترشح خوب این پروتئین با غلظت $19/20\pm 2/81$ پیکوگرم در میلی‌لیتر به محیط کشت سلولی است. میزان ترشح VEGF در مرحله اول و در سطح میزان mRNA و پایداری mRNA توسط میزان هایپوکسی تنظیم می‌شود [۲۱-۲۳]. برای ترشح مناسب یک پروتئین از غشاء سلولی به محیط خارج سلولی موارد متعددی از جمله نوع وکتور و نوع سلول میزان و همچنین ساختار پروتئین مربوط اهمیت دارد. در مطالعات قبلی انجام شده روی ترشح VEGF گزارش شده است که مهار گلیکوزیلاسیون VEGF165b توسط Tunicamycin باعث افزایش ترشح خارج سلولی این پیتید شده و روی عملکرد مولکولی آن تاثیری ندارد [۲۴، ۲۵]. با توجه به اینکه جایگاه اصلی گلیکوزیلاسیون در VEGF‌ها توسط اگزونهای ۵ تا ۷ کد می‌شود و طراحی ایزوفرم VEGF111b طوری صورت گرفته که این اگزون از آن حذف شده است، بنابراین VEGF111b گلیکوزیله نمی‌شود. به نظر می‌رسد ترشح خوب VEGF111b به محیط خارج سلولی در درجه اول به علت طراحی مناسب این پیتید باشد. همچنین، در مطالعات قبلی گزارش شده است که ایزوفرم‌های سلولی VEGF قادر به اتصال به ماتریکس خارج سلولی (ECM) هستند و این امر باعث اتصال ایزوفرم‌ها به دیواره سلولی می‌شود [۲۶-۲۸]. البته جزئیات اینکه آیا VEGF از طریق ECM به دیواره سلول تولید کننده متصل می‌شود یا دیواره سلول پذیرنده، هنوز به روشنی مشخص نشده است، ولی عنوان شده است که یکی از دلایل کاهش ترشح VEGF‌های طبیعی می‌تواند اتصال به ECM باشد. البته در برخی مطالعات گزارش شده است که این حالت بیشتر در مورد ایزوفرم‌های بلند VEGF189 و VEGF206 مانند VEGF111b و VEGF189 اتفاق می‌افتد [۲۹]. در مورد ترشح VEGF‌ها از غشاء پلاسمائی از آنجایی که نواحی اتصال به هپارین در C ترمینال پیتید وجود دارد، به نظر می‌رسد یکی از دلایل کاهش ترشح در پیتیدهای بلندتر نسبت به ایزوفرم‌های کوتاه‌تر VEGF همین امر باشد [۳۰]. با توجه به VEGF111b حذف اگزونهای ۵، ۶ و ۷ از قسمت C ترمینال در VEGF111b به نظر می‌رسد ترشح خوب این پروتئین بدلیل طراحی خاص آن و حذف شدن نواحی اتصال به هپارین و ماتریکس خارج سلولی (اگزونهای ۶ و ۷) در این ایزوفرم باشد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه ما به بررسی میزان ترشح VEGF111b در سلول‌های HEK293 پرداختیم. طبق یافته‌های ما در تولید این

در فرایندهای فیزیولوژیکی مانند شکل‌گیری و تکامل جنبه، درمان زخم‌ها و سیکل‌های بازسازی در بدن افراد بالغ است [۱۶، ۱۷].



شکل شماره ۲- نتایج وسترن بلاط و الایزا پروتئین VEGF111b
A: تأیید بیان پروتئین نوترکیب VEGF111b در سلول‌های HEK293 با استفاده از وسترن بلاط. پروتئین نوترکیب با طول ۱۲ کیلودالتون در لاین ۱ مشخص شده است. B: نتایج تکنیک الایزا. میزان جذب نوری VEGF-111b در ۴۵۰ نانومتر در سلول‌های عصاره لیز شده و محیط کشت سلولی.

فاکتورهای رشد اندوتیال عروقی (VEGF) از فاکتورهای مولکولی اصلی تحریک کننده رگزایی در سلول‌های اندوتیال هستند [۱۸، ۱۹]. افزایش بیان VEGF در بسیاری از تومورهای انسانی گزارش شده است و با تکثیر سلول‌های توموری و متاستاز تومور در ارتباط است. همچنین، VEGF‌های خانواده B به لحاظ عملکرد آنتاگونیست در مقایسه با ایزوفرم‌های معمولی و جلوگیری از تشکیل عروق خونی جدید به عنوان فاکتورهای درمانی مهم در مهار رشد تومورها و درمان سرطان شناخته می‌شوند [۲۰]. با توجه به اهمیت دارویی این ایزوفرم‌ها در این مطالعه ما به بررسی میزان ترشح ایزوفرم جدید VEGF111b در سلول‌های انسانی-HEK

تشکر و قدردانی

از بخش تحصیلات تكمیلی و گروه ژنتیک دانشگاه اصفهان به خاطر همکاری در فراهم آوردن وسایل و مواد مورد نیاز این مطالعه تشکر می‌گردد.

References:

- [1] Makrilia N, Lappa T, Xyla V, Nikolaidis I, Syrigos K. The role of angiogenesis in solid tumors: an over-view. *Eur J Intern Med* 2009; 20(7): 663-71.
- [2] Dreys J. VEGF and angiogenesis: implications for breast cancer therapy. *EJC Supplements* 2008; 6: 7-13.
- [3] Shibuya M. Structure and dual function of vascular endothelial growth factor receptor-1 (Flt-1). *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33(4): 409-20.
- [4] Bates DO, Cui TG, Doughty JM, Winkler M, Sugino M, Shields JD, et al. VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2002; 62(14): 4123-31.
- [5] Bates DO, MacMillan PP, Manjaly JG, Qiu Y, Hudson SJ, Bevan HS, et al. The endogenous anti-angiogenic family of splice variants of VEGF, VEGFxxxb, are down-regulated in pre-eclamptic placentae at term. *Clin Sci (Lond)* 2006; 110(5): 575-85.
- [6] Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to the human chromosome 6p21.3. *Circulation* 1996; 93(8): 1493-5.
- [7] Koch S, Tugues S, Li X, Gualandi L, Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem J* 2011; 437(2): 169-83.
- [8] Eichmann A, Simons M. VEGF signaling inside vascular endothelial cells and beyond. *Curr Opin Cell Biol* 2012; 24(2): 188-93.
- [9] Carmeliet P, Ruiz de Almodovar C. VEGF ligands and receptors: implications in neurodevelopment and neurodegeneration. *Cell Mol Life Sci* 2013; 70(10): 1763-78.
- [10] Huez I, Bornes S, Bresson D, Creancier L, Prats H. New vascular endothelial growth factor isoform generated by internal ribosome entry site-driven CUG translation initiation. *Mol Endocrinol* 2001; 15(12): 2197-210.
- [11] Meiron M, Anunu R, Scheinman EJ, Hashmueli S, Levi BZ. New isoforms of VEGF are translated from alternative initiation CUG codons located in its 5'UTR. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 282(4): 1053-60.
- [12] Tee MK, Jaffe RB. A precursor form of vascular endothelial growth factor arises by initiation from an upstream in-frame CUG codon. *Biochem J* 2001; 359 (Pt 1): 219-26.
- [13] Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* 1992; 267(36): 26031-7.
- [14] Ruhrberg C, Gerhardt H, Golding M, Watson R, Ioannidou S, Fujisawa H, et al. Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. *Genes Dev* 2002; 16(20): 2684-98.
- [15] Gu F, Li X, Kong J, Pan B, Sun M, Zheng L, et al. VEGF111b, a new member of VEGFxxx isoforms and induced by mitomycin C, inhibits angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 441(1): 18-24.
- [16] Dvorak HF. VPF/VEGF and the angiogenic response. *Semin Perinatol* 2000; 24(1): 75-8.
- [17] Raab S, Plate KH. Different networks, common growth factors: shared growth factors and receptors of the vascular and nervous system. *Acta Neuropathol* 2007; 113(6): 607-26.
- [18] Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci* 2005; 109(3): 227-41.
- [19] Emamgholipour S, Bandehpour M, Shabani P, Maghen L, Yaghmaee B, Kazemi B. Mutagenesis in sequence encoding of human factor VII for gene therapy of hemophilia. *DARU* 2009; 17(4): 294-8.
- [20] Rennel E, Waine E, Guan H, Schüller Y, Leenders W, Woolard J, et al. The endogenous antiangiogenic VEGF isoform, VEGF165b inhibits human tumour growth in mice. *Br J Cancer* 2008; 98(7): 1250-7.
- [21] Stalmans I, Ng YS, Rohan R, Fruttiger M, Bouche A, Yuce A, et al. Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing VEGF isoforms. *J Clin Invest* 2002; 109(3): 327-36.
- [22] Gerhardt H. VEGF and endothelial guidance in angiogenic sprouting. *Organogenesis* 2008; 4(4): 241-6.
- [23] von Degenfeld G, Banfi A, Springer ML, Wagner RA, Jacobi J, Ozawa CR, et al. Microenvironmental VEGF distribution is critical for stable and functional vessel growth in ischemia. *FASEB J* 2006; 20(14): 2657-9.
- [24] Kerbel RS. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis* 2000; 21(3): 505-15.
- [25] Walter DH, Hink U, Asahara T, Van Belle E, Horowitz J, Tsurumi Y, et al. The in vivo bioactivity of vascular endothelial growth

فاکتور توسط سلول‌های HEK293 ترشح بالای خارج سلولی پپتید b111b بدون شکستگی و هضم پروتئولیتیکی حاصل می‌شود و به نظر می‌رسد تولید تجاری و استحصال این فاکتور از محیط کشت سلولی در حجم بالا امکان‌پذیر باشد.

- factor/vascular permeability factor is independent of N-linked glycosylation. *Lab Invest* 1996; 74(2): 546–56.
- [26] Chen E, Hermanson S, Ekker SC. Syndecan-2 is essential for angiogenic sprouting during zebrafish development. *Blood* 2004; 103(5): 1710–9.
- [27] Wijelath ES, Rahman S, Namekata M, Murray J, Nishimura T, Mostafavi-Pour Z, et al. Heparin-II domain of fibronectin is a vascular endothelial growth factor-binding domain: enhancement of VEGF biological activity by a singular growth factor/matrix protein synergism. *Circ Res* 2006; 99(8): 853–60.
- [28] Krilleke D, DeErkenez A, Schubert W, Giri I, Robinson GS, Ng YS, et al. Molecular mapping and functional characterization of the VEGF164 heparin-binding domain. *J Biol Chem* 2007; 282(38): 28045–56.
- [29] Ruiz de AC, Coulon C, Salin PA, Knevels E, Chounlamountri N, Poesen K. Matrix-binding vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms guide granule cell migration in the cerebellum via VEGF receptor Flk1. *J Neurosci* 2010; 30(45): 15052–66.
- [30] Chen S, Chakrabarti R, Keats EC, Chen M, Chakrabarti S, Khan ZA. Regulation of vascular endothelial growth factor expression by extra domain B segment of fibronectin in endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53(13): 8333–43.