

人 vasostatin 的克隆、表达、纯化及活性检测

李永红 王军志* 饶春明 张 翊

(中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

摘要 从成人肝脏 cDNA 文库中, PCR 扩增得到人 vasostatin 基因编码区序列, 将此序列插入原核表达载体 pQE30 进行表达, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 测定表明产物以包涵体形式存在, 表达量占菌体总蛋白量的 50% 以上. 包涵体洗涤后溶于 8 mol/L 尿素溶液, 在变性条件下通过镍-氨三乙酸 (Ni-NTA) 金属螯合亲和层析柱进行纯化后, 再经透析进行复性. N 端氨基酸序列、分子质量、等电点等理化指标的测定结果与理论值相符. 用内皮细胞增殖试验、内皮细胞迁移试验以及鸡胚尿囊膜血管生成试验等方法进行活性检测, 证实复性的表达产物具有抑制内皮细胞增殖和迁移、抑制鸡胚尿囊膜血管生成的功能.

关键词 vasostatin, 基因克隆, 表达, 生物学活性

学科分类号 Q812, R972

在肿瘤的药物治​​疗中, 抗癌药物对正常细胞产生的毒副作用及药物的抗性作用往往是难以克服的障碍, 利用血管生成抑制剂进行的肿瘤抗血管生成治疗, 可克服这些缺点, 并已引起了许多科学家的重视, 一些新的血管生成抑制剂已被发现, 如 thrombospondin 1、angiostatin、endostatin、vasostatin、canstatin 等^[1~5]. Vasostatin 是 1998 年 Pike 等^[5]从经 EB 病毒转化的 B 细胞系-VDS-O 的培养上清液中提纯出一种血管生成抑制因子, 经鉴定证实为人体一种多功能蛋白质 calreticulin 的 N 端结构域片段. 将 vasostatin 以 MBP 融合蛋白形式在大肠杆菌中表达并进行纯化, 经体外活性试验证实对内皮细胞 HUVEC 和 FBHE 的增殖有剂量依赖性的抑制作用; 在小鼠 Matrgel 试验中, vasostatin 在浓度为 5 ~ 10 mg/L 时可抑制碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 诱导的新生血管化; 在无胸腺小鼠肿瘤形成试验中, vasostatin 可明显减低人 Burkitt 淋巴瘤和人结肠癌的生长^[5~7]. 本研究对人 vasostatin 进行克隆、表达、纯化和活性检测, 以便为进一步的理论与应用研究打下基础.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株与细胞株: 表达载体 pQE-30 及其宿主菌 M15 为 QIAGEN 公司产品; BCE 细胞和 HHEC 细胞分别为牛肾上腺血管内皮细胞和人毛细血管内皮细胞, 由本室保存, 均用 DMEM +

10% 胎牛血清进行培养.

1.1.2 工具酶与试剂: pfu DNA 聚合酶、Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、RNase A、各种 DNA 限制性内切酶及 Wizard plus SV Minipreps DNA Purification System 试剂盒均为 Promega 公司产品, Ni-NTA Superflow 亲和介质为 QIAGEN 公司产品, 其他化学试剂皆为分析纯.

1.2 方法

1.2.1 目的基因的 PCR 扩增: Vasostatin 是 calreticulin 蛋白的 N 端片段, 根据 GenBank 中 calreticulin 的 DNA 序列设计两条引物, 在上游引物的 5' 端加入 EcoRI 酶切位点, 在下游引物的 5' 端加入 BamHI 酶切位点. 以成人肝脏 cDNA 文库为模板进行 PCR 扩增.

1.2.2 PCR 产物的克隆与克隆片段序列测定: PCR 产物的酶切、电泳回收、酶切产物与 pUC19 载体连接与转化等基因操作参照文献 [8] 的方法. 提取重组质粒 pUC19/vaso, 测定重组片段的核苷酸序列.

1.2.3 重组表达质粒构建: 按照目的基因 DNA 序列设计两条引物, 在上游引物的 5' 端加入 BamHI 酶切位点, 在下游引物的 5' 端加入 Pst I 酶切位点. 以重组质粒 pUC19/vaso 为模板进行 PCR 扩增. 扩增产物和 pQE30 质粒分别用 BamHI 和 Pst I 双酶切, 回收酶切片段. 回收产

* 通讯联系人.

Tel: 010-67017755-408, E-mail: wangjz@nicbp.org.cn

收稿日期: 2002-12-08, 接受日期: 2003-01-28

物采用 T4 DNA 连接酶连接, 产生重组质粒 pQE30/vaso, 连接产物转化感受态大肠杆菌 M15. 提取重组质粒 pQE30, 测定重组片段的核苷酸序列.

1.2.4 表达菌株的诱导表达: 阳性克隆接种 LB 固体培养基 (含氨苄青霉素 100 mg/L), 37℃ 培养过夜, 挑单菌落接种 LB 液体培养基 (含氨苄青霉素 100 mg/L), 37℃ 振荡培养 14~16 h, 然后按 1:100 比例接种同样培养基, 37℃ 振荡培养 2~4 h, A_{600} 达到 0.5~1.0 时, 加 IPTG 至终浓度为 1.0 mmol/L, 继续振荡培养 4~6 h 后收集菌体, 培养上清及菌体各留小样, 用还原型 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析.

1.2.5 重组蛋白的纯化: 参照 QIAGEN 公司 Ni-NTA superflow 亲和介质的说明书及文献 [9] 进行. 诱导表达后收集的菌体用适量 PBS 重悬, 经超声破碎后, 离心的沉淀即为包涵体. 用洗涤液 (1% TritonX-100, 1 mol/L 尿素, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0) 反复洗涤 3 次, 用变性液 (8 mol/L 尿素, 1 mol/L NaH_2PO_4 , 0.01 mol/L Tris, 0.01 mol/L 咪唑, pH 8.0) 溶解包涵体, 离心后将上清用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤. 用 5 倍柱床体积的缓冲液 A (8 mol/L 尿素, 0.1 mol/L NaH_2PO_4 , 0.01 mol/L Tris, 0.01 mol/L 咪唑, pH 8.0) 平衡 Ni-NTA 柱, 样品以 0.2 ml/min 的流速上样. 以 2 ml/min 的流速用缓冲液 A 洗柱, 直至记录笔回到基线. 以 2 ml/min 的流速用缓冲液 B (8 mol/L 尿素, 0.1 mol/L NaH_2PO_4 , 0.01 mol/L Tris, 0.02 mol/L 咪唑, pH 8.0) 进行洗涤以去除非特异结合的蛋白, 再用缓冲液 C (8 mol/L 的尿素, 0.1 mol/L NaH_2PO_4 , 0.01 mol/L Tris, 0.02 mol/L 咪唑 pH 4.5) 对目的蛋白进行洗脱并收集洗脱液. 收集的变性目的蛋白溶液用梯度透析 (尿素浓度从 8 mol/L $\rightarrow$ 2 mol/L $\rightarrow$ 0 mol/L 逐渐下降) 的方法进行复性.

1.2.6 重组蛋白的理化鉴定: N 端氨基酸序列经北京大学生命科学院测定. 分子质量分别用还原型 SDS-PAGE 和基质辅助的激光解析飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 法测定, 后者送军事医学科学院分析中心进行. 等电点采用等电聚焦电泳法测定.

1.2.7 内皮细胞增殖试验: 96 孔培养板每孔加 100 μl 含 2×10^3 BCE 细胞的培养液 (DMEM + 10% 胎牛血清), 置 37℃、5% CO_2 培养箱过夜.

弃去培养液, 每孔加 43 μl 测定液 (DMEM + 5% 胎牛血清), 37℃、5% CO_2 放置 30 min. 用测定液将样品按 4 倍系列稀释配成不同的浓度, 取出培养板, 每孔加入 50 μl 样品. 37℃、5% CO_2 中放置 30 min 后, 在培养板中每孔加入 7 μl bFGF (终浓度为 2 $\mu\text{g/L}$). 37℃、5% CO_2 条件下培养 72 h 后, 在培养板中每孔加入 20 μl MTT 溶液 (5 g/L), 继续培养 4~6 h. 弃上清, 每孔加 100 μl DMSO, 至完全溶解后用酶标仪检测, 测定波长为 570 nm. 计算抑制率 (%) = $(A_{\text{空白对照组}} - A_{\text{实验组}}) / A_{\text{空白对照组}} \times 100\%$ [10].

1.2.8 内皮细胞迁移试验: HHEC 细胞用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液传代培养, 用含 0.2% 小牛血清的培养液进行迁移试验. 在迁移板的上下层槽中加入试验用培养液, 置 37℃、5% CO_2 培养箱中孵育 1 h 以上后使用. 将样品用其缓冲液从 1 g/L 浓度开始进行 10 倍系列稀释, 共 8 个稀释梯度, 每个梯度设两个复孔. 迁移板上槽中每孔加入总体积为 100 μl , 含有不同稀释度的样品以及 2 000 个细胞的培养液; 下槽加入总体积为 600 μl , 含相应浓度的待测样品及 2 $\mu\text{g/L}$ bFGF 的培养液. 经 37℃、5% CO_2 孵育 24 h 后将上层小槽取出, 倾去培养液, 用棉签擦去迁移膜上表面的细胞, 再用生理盐水轻轻洗涤. 迁移膜经 70% 乙醇固定后用 0.5% 伊红染色, 在显微镜下观察, 计数每个迁移膜 5 个视野中的迁移细胞数. 与空白对照组进行比较, 求出内皮抑素在各个剂量下对内皮细胞的迁移抑制率. 迁移抑制率 (%) = $(\text{空白对照组迁移的细胞数} - \text{试验组迁移的细胞数}) / \text{空白对照组迁移的细胞数} \times 100\%$ [11].

1.2.9 鸡胚尿囊膜血管形成试验: 选择表面清洁、大小均一的种蛋于普通培养箱 (37.8 $\pm$ 0.5)℃ 孵育 6~7 天, 用碘伏和酒精消毒蛋壳表面, 在距胚头前 1 cm、两条前卵黄静脉之间 1 cm $\times$ 1.5 cm 区域用锉刀或砂轮在蛋壳表面刻划出凹痕, 用尖针在蛋气室表面扎一小孔. 在凹痕处滴少量生理盐水, 用针轻揭凹陷处蛋皮, 轻轻撕掉内壳膜. 此时该处尿囊膜 (CAM) 下陷, 形成假气室 (区别于蛋自身的气室). 制备气室时切勿损伤 CAM. 用透明胶带封贴假气室, 形成透明观察窗, 可供观察和加药操作. 制备假气室后胚胎应稳定 1~2 天. 在鸡胚发育第九天时, 轻轻撕开透明胶带, 由此将载体 (甲基纤维素膜) 放置在尿囊膜上, 样品组在载体上加 5 μl 样品, 空白对照组加相同体积的样品缓冲液.

加样后孵育 72 h 观察尿囊膜血管生长情况, 并拍照保存结果^[12].

2 结 果

2.1 目的基因扩增、PCR 产物的克隆及序列分析

以成人肝 cDNA 为模板经 PCR 扩增出产物大小为 560 bp 左右, 与预期一致. 将 PCR 产物克隆至 pUC19 载体上, 经测序证明与 GenBank 中编码 calreculin N 端 180 个氨基酸的 cDNA 序列完全一致.

2.2 表达载体的构建与鉴定

以重组质粒 pUC19/vaso 为模板进行 PCR 扩增. 扩增产物和 pQE30 质粒分别用 *Bam*H I 和 *Pst* I 双酶切后进行连接并转化宿主菌, 挑取阳性克隆, 经 PCR 及酶切鉴定正确, 并用 DNA 自动测序仪测定证明序列及读码框正确, 表达质粒 pQE-30/vaso 构建成功.

2.3 重组人 vasostatin 的表达与纯化

含重组质粒 pQE-30/vaso 表达菌经 1 mmol/L IPTG 诱导培养 5 h, 菌体裂解物在 SDS-PAGE 图谱 22.5 ku 处出现明显的人 vasostatin 表达条带, 经扫描分析, 表达量占菌体总蛋白的 50% 以上, 表达菌超声裂解后收集的沉淀中存在该重组蛋白, 而上清中没有, 说明表达蛋白以包涵体形式存在 (图 1). 包涵体经洗涤、裂解后, 在变性条件下用 Ni-NTA 金属螯合亲和层析柱纯化, 再用梯度透析的方法进行复性, 得到的可溶性重组蛋白含量为复性前的 82.8%, 经 SDS-PAGE 分析, 纯度达 95% 以上 (图 2).

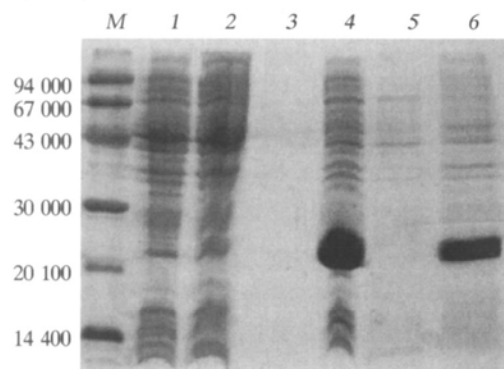


Fig. 1 Analysis of expression products of pQE-30/vaso by reduced SDS PAGE

M: protein molecular mass marker; 1: lysates of *E. coli* cells harboring pQE-30 4 hours after IPTG induction; 2: lysates of *E. coli* cells harboring pQE-30/vaso before IPTG induction; 3: culture supernatant of *E. coli* cells harboring pQE-30/vaso 4 hours after IPTG induction; 4: lysates of *E. coli* cells harboring pQE-30/vaso 4 hours after IPTG induction; 5: supernatant of pQE-30/vaso lysate; 6: precipitate of pQE-30/vaso lysate.

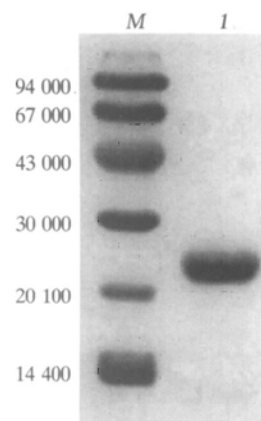


Fig. 2 SDS PAGE analysis purified vasostatin

M: protein molecular mass marker; 1: recombinant vasostatin protein.

2.4 重组人 vasostatin 部分理化性质的分析

重组人 vasostatin 的分子质量经质谱测定结果为 22.39 ku. 表观等电点测定结果为 6.0 (图 3). 蛋白质测序结果 N 端 15 个氨基酸与设计相一致.

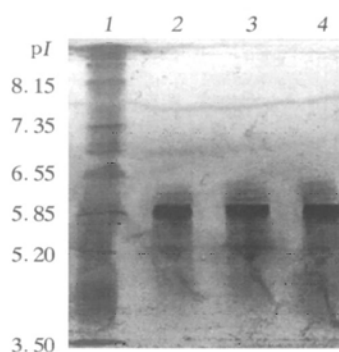


Fig. 3 Isoelectric point determination of the recombinant vasostatin protein by isoelectrofocusing

1: marker; 2~4: recombinant vasostatin protein.

2.5 重组人 vasostatin 对内皮细胞增殖的抑制作用

由图 4 可见, 2×10^3 个 BCE 内皮细胞与从

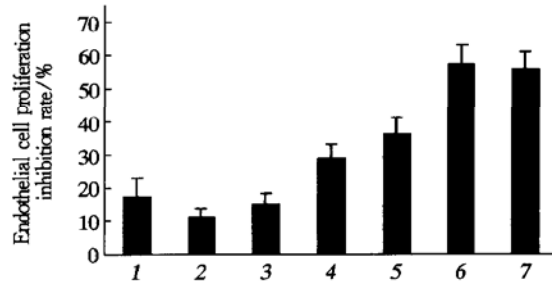


Fig. 4 Inhibition of recombinant human vasostatin on endothelial cell proliferation

1: 0.4 mg/L vasostatin; 2: 1.56 mg/L vasostatin; 3: 6.25 mg/L vasostatin; 4: 25 mg/L vasostatin; 5: 100 mg/L vasostatin; 6: 400 mg/L vasostatin; 7: 400 mg/L endostatin (positive control). $n = 3$.

400 mg/L 起进行 4 倍系列稀释的不同浓度 vasostatin 及 2 μ g/L bFGF 共同孵育 72 h 后, 经 MTT 显色测定波长 570 nm 处的吸光度值, 并通过与空白对照组比较计算内皮细胞增殖的抑制率, 结果表明随着 vasostatin 浓度的增加, 对内皮细胞增殖的抑制作用增大。

2.6 重组人 vasostatin 对内皮细胞迁移的抑制作用

HHEC 血管内皮细胞在 bFGF 的作用下, 从迁

移膜的上表面经迁移孔迁移至下表面, 用棉签擦去上表面的细胞, 染色后显微镜观察下表面的细胞 (即迁移的细胞), 可见到在 vasostatin 的作用下迁移的内皮细胞数显著减少 (图 5), 并且随着 vasostatin 浓度的增加, 迁移的内皮细胞数目随之减少而迁移抑制率增大 (图 6)。

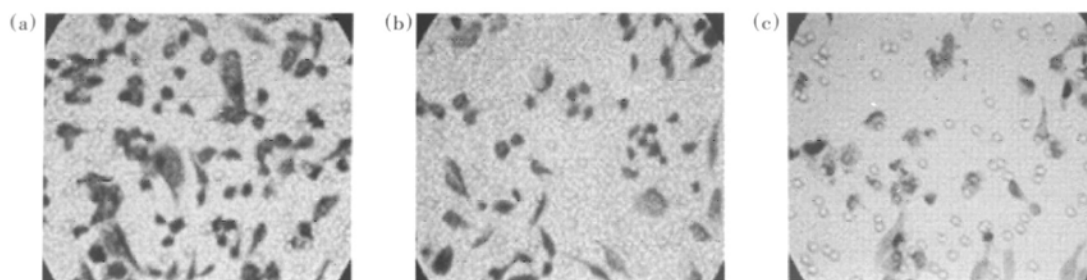


Fig. 5 Inhibition of endothelial migration by recombinant human vasostatin

(a) negative control; (b) 100 mg/L vasostatin; (c) 100 mg/L endostatin (positive control).

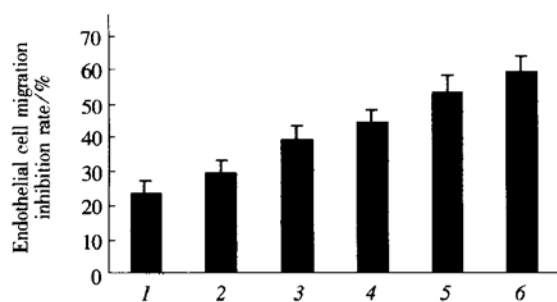


Fig. 6 Inhibition of recombinant human vasostatin on endothelial cell migration

1: 0.16 mg/L vasostatin; 2: 0.8 mg/L vasostatin; 3: 4 mg/L vasostatin; 4: 20 mg/L vasostatin; 5: 100 mg/L vasostatin; 6: 100 mg/L endostatin (positive control). $n = 4$.

在胚龄为 9 天的鸡胚尿囊膜上加入 10 μ g vasostatin, 继续孵育 72 h 后, 可观察到尿囊膜上与空白对照组相比, 血管数目减少, 或出现血管变细、断裂、扭曲、分布杂乱无章等现象 (图 7), 表明 vasostatin 对鸡胚尿囊膜血管形成有明显的抑制作用。

3 讨 论

本研究成功地利用大肠杆菌表达系统高效表达人 vasostatin, 经纯化、复性后得到可溶性蛋白, 并证实其具有抑制内皮细胞增殖和迁移, 以及抑制鸡胚尿囊膜血管生成的功能, 这对进一步研究其在肿瘤血管生成治疗方面的应用提供了依据。

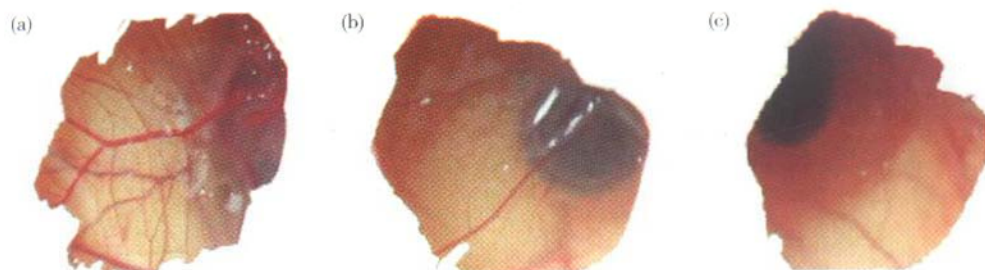


Fig. 7 Inhibition of angiogenesis in chick chorioallantoic membrane by recombinant human vasostatin

(a) negative control; (b) 10 μ g vasostatin; (c) 10 μ g endostatin (positive control).

在原核表达系统中, 常选用大肠杆菌作为表达宿主, 其优点是遗传背景清楚、转化和表达效率高、易发酵, 并且易于操作, 可以快速大量生产重组蛋白。由于 vasostatin 基因及氨基酸序列中, 未发现糖基化位点, 但有三个半胱氨酸, 形成一个二硫键, 这样的情况比较适于用原核表达系统来表达。我们选用 pQE-30 作为 vasostatin 的表达载体是基于以下考虑: a. 重组蛋白的纯化步骤可使用金属螯合亲和层析的方法, 从而使操作更为简便; b. vasostatin 在 pQE-30 中的表达量最高, 可达 50% 以上; c. pQE-30 载体在重组蛋白 N 端融合表达的 6 个组氨酸标签 ($6 \times \text{His tag}$) 由于是短肽, 免疫原性很弱, 一般也不影响蛋白质的结构和功能, 因此可不必用蛋白酶切割去除。

不溶性的包涵体经洗涤后直接在变性条件下经 Ni-NTA 亲和层析柱进行纯化后, 再采用透析的方法进行复性, 这样做有两点好处: a. 重组蛋白在变性条件下其肽链完全伸展, 有利于其中的 6 个 His 标签与 Ni-NTA 亲和介质相结合; b. 重组蛋白经纯化后再复性, 有利于提高复性率。

血管生成可见于胚胎发育、炎症过程、创伤愈合、侧枝循环建立以及肿瘤组织中。血管生成可划分为 5 个步骤^[13]: a. 内皮细胞分泌蛋白酶破坏基底膜; b. 内皮细胞迁移; c. 内皮细胞增生; d. 内皮细胞形成管样结构; e. 新基底膜形成及周围细胞覆盖。肿瘤的血管形成是肿瘤细胞和/或免疫细胞释放的血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF) 等血管生长因子刺激内皮细胞分裂增殖或促进内皮细胞迁移的结果。体外的内皮细胞增殖和迁移试验分别反映 vasostatin 对肿瘤血管生成中内皮细胞的增殖和迁移的抑制作用, 从而以不同角度反映了对血管生成的抑制作用。鸡胚尿囊膜血管生成试验则从总体上反映 vasostatin 对肿瘤血管生成的抑制作用。用 endostatin 作为阳性对照进行的实验显示, 我们表达的 vasostatin 对体外内皮细胞的增殖、迁移有抑制作用, 对鸡胚尿囊膜血管的生成有抑制作用, 这从不同方面证实了对肿瘤血管形成的抑制作用, 但是否能对肿瘤的形成和生长起到阻止的作用, 则有待于在动物的肿瘤模型上进行证实。在内皮细胞增殖试验中, 0.4 mg/L vasostatin 的抑制率结果高于 1.56 mg/L 和 6.25 mg/L vasostatin 的抑制率, 这

可能是因为 vasostatin 在低浓度时对内皮细胞的抑制作用小, 并且由于试验次数偏少 ($n = 3$), 造成此时的试验本身误差较大所致。

致谢 感谢清华大学生命科学院罗永章教授在活性检测上提供的帮助; 感谢深圳市华生元基因工程发展有限公司史永峰老师、李黄金博士在发酵、纯化上提供的帮助。

参 考 文 献

- Good D J, Polverini P J, Rastinejad F, *et al.* A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87** (17): 6624~ 6628
- O'Reilly M S, Holmgren L, Shing Y, *et al.* Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by Lewis lung carcinoma. *Cell*, 1994, **79** (2): 315~ 328
- O'Reilly M S, Boehm T, Shing Y, *et al.* Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, 1997, **88** (2): 277~ 289
- Kamphaus G D, Colorado P C, Panka D J, *et al.* Canstatin, a novel matrix-derived inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J Biol Chem*, 2000, **275** (2): 1209~ 1215
- Pike S E, Yao L, Jones K D, *et al.* Vasostatin, a calreticulin fragment, inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth. *J Exp Med*, 1998, **188** (12): 2349~ 2356
- Yao L, Pike S E, Setsuda J, *et al.* Effective targeting of tumor vasculature by the angiogenesis inhibitors vasostatin and interleukin-12. *Blood*, 2000, **96** (5): 1900~ 1905
- Pike S E, Yao L, Setsuda J, *et al.* Calreticulin and calreticulin fragments are endothelial cell inhibitors that suppress tumor growth. *Blood*, 1999, **94** (7): 2461~ 2468
- 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 分子克隆: 实验指南. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1992. 16~ 342
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis J, *et al.* Translated by Jin D Y, Li M F, *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd. Beijing: Sciences Press, 1992. 16~ 342
- 张 翊, 王军志, 吴勇杰. 重组人超氧化物歧化酶的基因克隆、表达及产物纯化研究. *生物工程学报*, 2000, **16** (5): 557~ 560
- Zhang Y, Wang J Z, Wu Y J. *Chin J Biotech*, 2000, **16** (5): 557~ 560
- Takano S, Gately S, Neville M E, *et al.* Suramin, an anticancer and angiostatic agent, inhibits endothelial cell binding of basic fibroblast growth factor, migration, proliferation, and induction of urokinase-type plasminogen activator. *Cancer Res*, 1994, **54** (10): 2654~ 2660
- 李永红, 王军志, 韩春梅, 等. 重组人内皮抑素的质控方法研究. *药理学报*, 2002, **37** (10): 807~ 811
- Li Y H, Wang J Z, Han C M, *et al.* *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2002, **37** (10): 807~ 811
- 付生法, 陆应麟, 张朝山, 等. 检测血管生长因子作用的鸡胚绒毛尿囊膜技术. *军事医学科学院院刊*, 1993, **17**: 294
- Fu S F, Lu Y L, Zhang C S, *et al.* *Bulletin of the Academy of Military Medical Sciences*, 1993, **17**: 294
- 盛琴慧, 周爱儒, 高 炜, 等. 多肽生长因子与血管生成. *中国介入心脏病学杂志*, 1999, **7** (2): 90~ 92
- Sheng Q H, Zhou A R, Gao W, *et al.* *Chin J Interventional Cardiology*, 1999, **7** (2): 90~ 92

Cloning, Expression, Purification and Bioassay of Human Vasostatin

LI Yong-Hong, Wang Jur-Zhi^{*}, Rao Chur-Ming, Zhang Yi

(The National Institute For The Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China)

Abstract Vasostatin gene was amplified from a human liver cDNA library by PCR method. The fragment was cloned into the pUC19 vector and sequenced. By inserting the vasostatin fragment into the pQE-30 vector, the recombinant pQE-30/vaso plasmid was constructed. After it was transformed into *E. coli* M15, the recombinant proteins were expressed successfully when induced with IPTG. The expressed recombinant protein accounted for more than 50% of total bacterial proteins. The expressed products formed inclusion body in *E. coli*. After extracted from bacterial cells and washed, it was dissolved in solution containing 8 mol/L urea and then purified by using immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) effectively with a purity of over 95%. Then the recombinant protein was renatured after the denaturants were removed gradually by dialysis. The protein was identified by the determination of its N-terminal amino acid sequence, molecular mass, isoelectric point etc. The results indicated that the primary structure of the expressed protein accorded with the theoretics. Endothelial cell proliferation assay, endothelial cell migration assay and chick chorioallantoic member assay, the bioactivity of vasostatin was investigated. It was proved that vasostatin can inhibit endothelial cell proliferation and migration, and inhibit angiogenesis of chick chorioallantoic member.

Key words vasostatin, angiogenesis inhibitor, gene clone, gene expression, bioassay

^{*} Corresponding author. Tel: 86-10-67017755-408, E-mail: wangjz@nicbp.org.cn

Received: July 7, 2002 Accepted: September 28, 2002