

## 人 Tumstatin 在毕赤酵母中的表达和活性分析

# Expression of Human Tumstatin in *Pichia pastoris* and its Bioactivity

顾取良, 张添元, 罗进贤\*, 甘菁菁, 肖 凡

GU Qu-Liang, ZHANG Tian-Yuan, LUO Jin-Xian\*, GAN Jing-Jing and XIAO Fan

中山大学基因工程教育部重点实验室, 广州 510275

Key Laboratory of Gene Engineering of Ministry of Education, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, China

**摘 要** 利用 PCR 技术从重组质粒 pET-3c-tum 中扩增人 tumstatin 的 cDNA 片段, 连入 pPICZαA 酵母表达载体, 获得的重组质粒 pPICZα-tum 电激法转化毕赤酵母 GS115。经表型鉴定、诱导表达筛选, 得到可分泌表达人 tumstatin 的重组酵母转化子, 表达蛋白质的相对分子量约 30kD, 表达量约 25mg/L。表达上清经超滤浓缩和离子交换法初步纯化, 所得产物具有免疫活性, 能够抑制内皮细胞增殖, 诱导其发生细胞凋亡, 并能抑制鸡胚尿囊膜血管生成。

**关键词** tumstatin, 基因表达, 毕赤酵母, 活性分析

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)03-0451-06

**Abstract** Human tumstatin(hTumstatin)cDNA was amplified from recombinant plasmid pET-3c-tum, cloned in frame with the signal sequence in yeast vector pPICZαA and transformed into *Pichia pastoris* GS115 by electroporation. The expression of hTumstatin in GS115(pPICZα-tum) was then induced by methanol and secreted into the culture medium, with a yield of 25mg/L as shown by SDS-PAGE and Western blotting. The expressed hTumstatin was purified to more than 85% purity using a simple one-step SP-Sepharose cation exchange chromatography. The MTT and chick chorioallantoic membrane assay showed that the yeast produced hTumstatin could inhibit the proliferation of human umbilical vein endothelial cells and the neovascularization induced by bFGF. Hoechst 33258 fluorescent staining also demonstrated the apoptotic change in endothelial cellular nuclear morphology.

**Key words** tumstatin, gene expression, *Pichia pastoris*, bioactivity

1971 年 Folkman<sup>[1]</sup> 提出了肿瘤生长和转移依赖于血管生成的观点, 而肿瘤的抗血管生成疗法作为肿瘤治疗新策略现已被广泛接受。近年来, 许多具有抑制血管生成活性的内源性蛋白或水解片段被相继发现, 如内皮抑素 (endostatin)、restin、arrestin、canstatin 以及 tumstatin 等<sup>[2]</sup>。其中, 人 tumstatin<sup>[3-10]</sup> 是胶原蛋白 IV α3 链的 C 端包括非胶原区 (non-

collagenous domain, NC1) 在内约 28kD 大小的一个片段, 能专一性地促进内皮细胞凋亡, 抑制血管生成和肿瘤生长, 其抑瘤作用可能超过内皮细胞抑制素。目前, 国外研究者主要利用大肠杆菌 (*E. coli*) 和人胎肾 293 细胞表达 tumstatin 以研究其活性位点和作用机制等<sup>[4-7]</sup>, 国内关于 tumstatin 基因表达的研究仅限于其在 *E. coli* 中进行的初步工作<sup>[11]</sup>, 尚未见在

Received: November 16, 2005; Accepted: February 20, 2006.

This work was supported by the grant from the Key Project of Science and Technology Program of Guangdong Province (No. KM02502G).

\* Corresponding author. Tel: 86-20-84112397; E-mail: lsbr02@zsu.edu.cn, jinxianluo@yahoo.com

广东省重点科技项目 (No. KM02502G) 资助。

酵母中表达 tumstatin 的报道。本文采用毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 表达系统, 将 tumstatin cDNA 克隆至毕赤酵母表达载体 pPICZaA, 并通过同源重组整合到酵母染色体上, 实现了 tumstatin 的可溶性分泌表达, 并对表达产物进行了初步纯化和活性分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 质粒和菌株:** 毕赤酵母表达载体 pPICZaA 和 *Pichia pastoris* GS115 购自 Invitrogen 公司, 大肠杆菌 *E. coli* TOP10F' 为本室保存, 含人 tumstatin 基因的质粒 pET-3c-tum 为本室构建。

**1.1.2 主要试剂和培养基:** 各种限制性内切酶和修饰酶购自 New England Biolabs 和 GIBCO-BRL 公司, 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 购自北京鼎国生物技术有限责任公司, Zeocin™ 为 Invitrogen 公司的产品, 离子交换树脂 SP-Sepharose Fast Flow 为 Pharmacia 公司产品。MTT、Hoechst 33258 为 Sigma 公司产品。低盐 LB、YPD、MDH、MMH、BMGY、BMMY 等培养基均按 Invitrogen 公司操作手册配制。

### 1.2 方法

**1.2.1 引物设计、PCR 及酵母表达载体 pPICZa-tum 的构建:** 从本室构建的细菌表达质粒 pET-3c-tum 上, 针对人 tumstatin cDNA 基因 5' 端和 3' 端设计一对引物, 在上下游引物的两端均添加 Not I 酶切位点, 引物合成由上海博亚生物技术有限公司完成。序列如下: P1: 5'-AAC ATA TGC GGC CGC CCA GGT TTC AAA GGA AAA CGT G-3'; P2: 5'-CGG ATC CGCGGC CGC CTA GTG TCT TTT CTT CAT GC-3'。

用上述引物, 以含人 tumstatin cDNA 的质粒 pET-3c-tum 为模板, PCR 扩增 tumstatin 的 cDNA 片段。PCR 产物纯化后用 Not I 酶切, 与同样酶切处理并经去磷酸化的载体 pPICZaA 连接, 转化大肠杆菌菌株 *E. coli* TOP10F' 感受态细胞, 经质粒提取、限制性酶切鉴定和 DNA 序列分析, 筛选重组克隆。

**1.2.2 转化酵母细胞:** 将测序正确的重组质粒 pPICZa-tum 用 Sac I 进行酶切线性化, 用 Eppendorf 电激仪转化毕赤酵母 GS115, 电激参数为: 1.5kV, 25μF, 200Ω。电激后立即加入 1mL 冰冷的山梨醇, 经温育后取适量涂布于含抗生素 Zeocin™ 100μg/mL 的 YPDS 平板, 30℃ 培养 2~4d, 挑取生长速度较快的转化子进行下一步表达研究。

**1.2.3 重组毕赤酵母高表达转化子的筛选:** 将 YPDS 平板上的抗性克隆复制到 MDH 平板, 按

Invitrogen 公司操作手册鉴定每个菌落的甲醇利用表型。挑取甲醇利用快速型的单菌落接种于 5mL BMGY, 30℃, 250r/min 振荡培养至  $OD_{600} = 2 \sim 4$ , 离心收集细胞, 用约 20mL BMMY (甲醇浓度为 2%) 重悬使  $OD_{600}$  为 1, 继续培养, 并每 24 h 补加 1% 甲醇, 72 h 后离心收集上清进行 SDS-PAGE, 并使用 ImageMaster® VDS 软件 (Amersham Pharmacia Biotech) 进行凝胶光密度扫描分析以筛选表达量高的转化子。

**1.2.4 表达上清免疫学分析:** 将甲醇诱导表达上清进行 12% SDS-PAGE 分离后, 参照文献 [12], 采用本室制备的兔抗人 tumstatin 特异性抗血清, 1:500 稀释, 作为一抗进行 Western blot 鉴定, 测定表达蛋白的免疫反应性和相对分子量。

**1.2.5 表达产物的纯化:** 取甲醇诱导表达上清用超滤法浓缩并更换缓冲体系后用离子交换法进一步纯化。用 5 倍柱床体积的缓冲液 A (20mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 6.0) 平衡 SP-Sepharose FF 阳离子交换柱, 样品以 0.5~1.0mL/min 的流速上样, 经 5 倍柱床体积缓冲液 A 以 1.0~2.0mL/min 的流速冲洗后, 用缓冲液 B (缓冲液 A + 1mol/L NaCl) 以 5 倍柱床体积进行 0~100% 梯度洗脱, 分部收集洗脱液进行 SDS-PAGE 分析。合并含目的蛋白的洗脱液, 对 PBS 透析过夜后用于下列活性实验。

**1.2.6 内皮细胞增殖抑制试验 (MTT 法)<sup>[13]</sup>:** 在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内, 用含 10% 小牛血清的 RPMI / 1640 培养液培养人脐静脉内皮细胞 ECV304 (购于中山大学实验动物中心)。按每孔  $5 \times 10^3$  个细胞、100μL 体积的量, 将对数生长期 ECV304 接种于 96 孔培养板 (空白对照孔不加细胞), 培养过夜后, 更换新鲜培养液 150μL, 实验组 (每组设 3 个重复孔) 每孔加入 50 μL 样品, 阴性对照孔加入等体积 PBS。在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 72h 后, 在培养板中每孔加入 20μL MTT 溶液 (5g/L), 继续培养 4~6h。弃上清, 每孔加 100μL DMSO, 至完全溶解后以 655nm 为参考波长, 测定  $A_{570}$ 。计算抑制率 (%) =  $(A_{\text{空白对照组}} - A_{\text{实验组}}) / A_{\text{空白对照组}} \times 100\%$ 。

**1.2.7 Hoechst 33258 染色检测细胞凋亡<sup>[14]</sup>:** 细胞收集后用甲醇/冰醋酸 (3:1) 室温固定 10min, PBS 洗涤 1 次, DNA 结合荧光染料 Hoechst 33258 室温染色 10min, 涂片后荧光显微镜对细胞核形态观察拍照, 以区分均质的正常细胞核及染色质浓缩的凋亡细胞核。

**1.2.8 鸡胚尿囊膜血管生成试验<sup>[15]</sup>:**海兰种蛋(由佛山鸡场提供)于 37℃ 孵育 6d, 消毒后在鸡蛋平钝端开出一个 1cm × 0.5cm 的小窗, 用灭菌透明胶带封贴。鸡胚稳定 1 ~ 2d 后将加有样品的载体置于窗口边缘 1/3 处, 远离已经形成的致密血管网。实验组 ( $n = 5$ ) 加 0.25μg bFGF 和 10μg 初步纯化的表达产物, 对照组 ( $n = 5$ ) 加 0.25μg bFGF 和等体积 PBS, 37℃ 继续培养 2d 后观察血管生长情况, 并照相记录。

## 2 结果

### 2.1 表达载体 pPICZα-tum 的构建

将 P1、P2 引物扩增所得目的基因 tumstatin cDNA 克隆至载体 pPICZαA 的 Not I 位点上, 构建酵母表达载体 pPICZα-tum (Fig. 1a)。由于人 tumstatin 基因和载体 pPICZαA 上各有一个 EcoR I 酶切位点, 所以重组质粒若含有单个拷贝 tumstatin 且插入方向正确, 则当用 EcoR I 酶切时产生的两个片段大小应分别为 598bp 和 3737bp。酶切鉴定结果与预期相符 (Fig. 1b)。

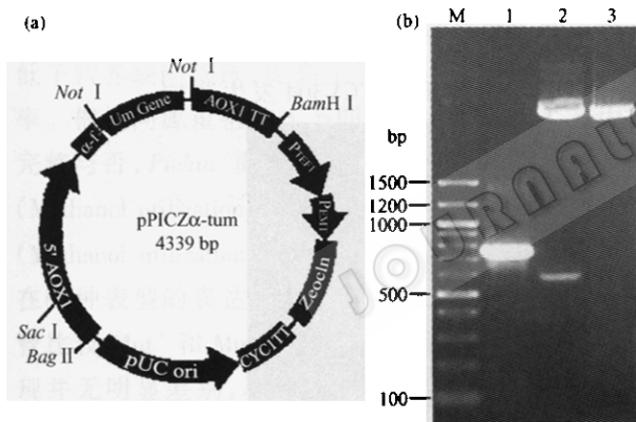


图 1 表达载体 pPICZα-tum 构建

Fig. 1 Schematic map (a) and restriction analysis (b) of recombinant plasmid pPICZα-tum

M: 100bp DNA ladder; 1: PCR amplified tumstatin cDNA; 2: pPICZα-tum/EcoR I; 3: pPICZαA/EcoR I.

### 2.2 hTumstatin 在毕赤酵母中的诱导表达

按 1.2.3 的方法选取在 MDH 和 MMH 平板上生长速度相当的转化子在摇瓶内进行甲醇诱导表达后, SDS-PAGE 分析表达上清。结果 (Fig. 2) 可见, 重组转化子 GS115 (pPICZα-tum) 的甲醇诱导表达上清在 30kD 附近出现一条新增的条带, 与预期的蛋白大小相符, 而空载体 pPICZαA 的转化子 GS115 (pPICZαA) 的分泌上清在相应位置没有新的条带, 表明目的蛋白获得了分泌表达。SDS-PAGE 结果还显

示, 48 h 表达上清中即明显可见目的条带, 72 h 表达量最高, 但杂蛋白也增多。经凝胶光密度扫描分析, 表达量达 25mg/L。

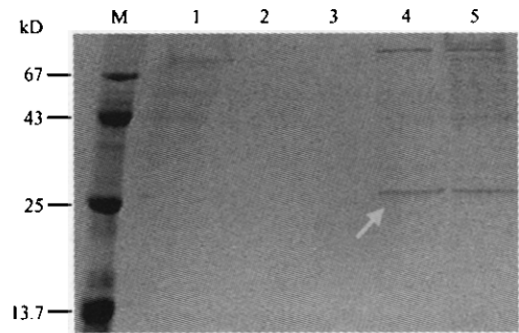


图 2 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the expressed hTumstatin in GS115(pPICZα-tum)

M: protein molecular weight marker; 1: GS115(pPICZαA) induced for 72h as control; 2 ~ 5: GS115(pPICZα-tum) induced for 0, 24, 48, 72h, respectively.

### 2.3 表达产物的 Western blotting 分析

采用兔抗大肠杆菌表达的人 tumstatin 抗血清为一抗对表达产物进行 Western blot 分析, 结果 (Fig. 3) 显示, 重组转化子 GS115 (pPICZα-tum) 的特异性表达条带能与兔抗人 tumstatin 抗血清特异性地反应, 表明该条带为 tumstatin 分泌表达产物, 并具有免疫反应活性。

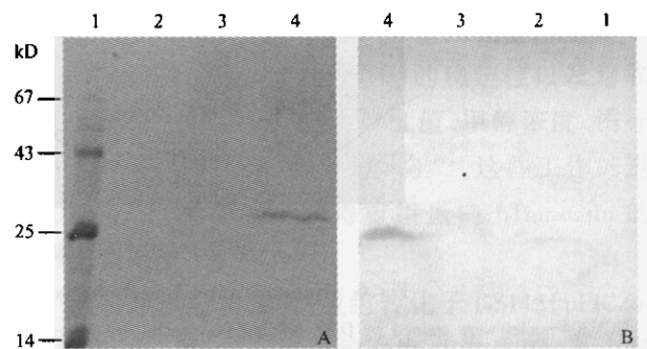


图 3 表达产物的 Western blot 分析

Fig. 3 Western blot analysis of recombinant protein expressed in *Pichia pastoris* GS115(pPICZα-tum)

(A) SDS-PAGE Coomassie Blue staining; (B) Western blot analysis using anti-tumstatin polyclonal antiserum as primary antibody with a dilution of 1:500. 1: protein molecular weight marker; 2: GS115 (pPICZαA) induced for 72h; 3: GS115(pPICZα-tum) induced for 24h; 4: GS115(pPICZα-tum) induced for 48h.

### 2.4 表达产物的纯化

表达上清经超滤、SP-Sepharose FF 阳离子交换初步纯化后, 目的蛋白在 SDS-PAGE 中呈现一条带,

凝胶扫描分析显示纯度达 85% 以上 (Fig. 4)。

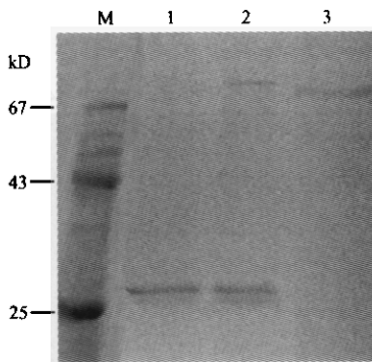


图 4 表达产物纯化过程 SDS-PAGE 分析  
Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the purification of expressed product

M: protein molecular weight marker; 1: fraction eluted from SP-Sepharose FF; 2: supernatant of GS115(pPICZa-tum); 3: supernatant of GS115(pPICZaA).

## 2.5 表达产物对内皮细胞增殖的抑制作用

由图 5 可见,表达产物在  $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$  即能显著抑制体外内皮细胞 ECV304 的增殖,抑制率达 50%,且不同浓度的 tumstatin 对内皮细胞增殖的抑制作用存在一定的量效关系,浓度为  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  时达试验中的最高抑制率 75%。

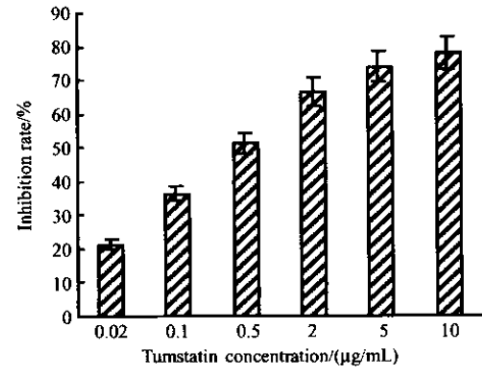


图 5 表达产物对内皮细胞增殖的抑制效应  
Fig. 5 Inhibition of endothelial cell proliferation by recombinant hTumstatin

## 2.6 表达产物对内皮细胞凋亡的诱导作用

凋亡细胞核变化的特点是核固缩或碎裂、边集,荧光染料 Hoechst 33258 常用于凋亡细胞核的确定。Hoechst 33258 染色结果显示,以终浓度为  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  的酵母表达纯化产物作用于 ECV304 细胞 24 h 后,细胞核产生凋亡细胞所特有的染色质浓缩或碎裂现象,呈现亮蓝色 (图 6 B),而对照组 (PBS) 的细胞核的着色形态呈圆形、淡蓝色 (图 6 A),表明表达产物能有效诱导内皮细胞 ECV304 发生凋亡。

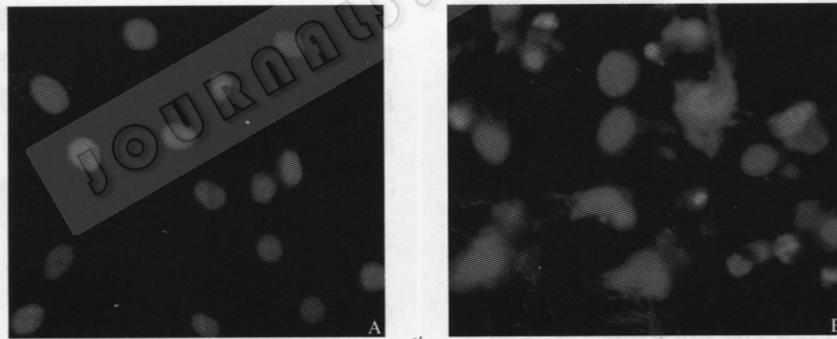


图 6 表达产物对内皮细胞凋亡的诱导效应 (Hoechst 33258 染色)

Fig. 6 Nuclear morphological changes of ECV304 cells induced by recombinant hTumstatin

ECV304 nuclei were stained by DNA binding fluorescence dye Hoechst 33258 and examined by Olympus fluorescence microscopy ( $400 \times$ ). (A) Normal nucleuses; (B) Apoptosis nucleuses induced by recombinant hTumstatin of  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  for 24 h.

## 2.7 表达产物对鸡胚尿囊膜新生血管的抑制作用

鸡胚尿囊膜 (CAM) 血管生成试验发现,在孵育 7~8d 的鸡胚尿囊膜上加入  $10 \mu\text{g}$  纯化重组蛋白,继续培养 2d,与对照组相比可观察到,尿囊膜上血管数目较少,几无新生血管形成 (Fig. 7),表明酵母表达产物能明显抑制 bFGF 诱导的鸡胚尿囊膜新生血管生成。

## 3 讨论

目前国内研究者有利用大肠杆菌表达系统表达

重组蛋白 hTumstatin 的报道<sup>[11]</sup>,国外则主要在大肠杆菌周质空间进行分泌表达,也曾利用哺乳动物细胞人胎肾 293 细胞株可溶性分泌表达 hTumstatin 用于进一步研究<sup>[4]</sup>,另有报道利用昆虫杆状病毒表达系统在双翅目黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) S2 细胞和鳞翅目粉蚊夜蛾 (*Trichoplusia ni*) Tn 5B1-4 细胞中进行可溶性分泌表达人 tumstatin<sup>[16, 17]</sup>。用以上系统表达 hTumstatin 存在着纯化困难、回收率低或表达量低、成本高等问题,而毕赤酵母表达系统是目前

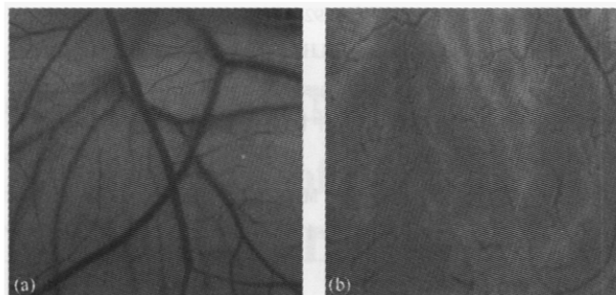


图 7 表达产物对鸡胚尿囊膜血管生成的抑制作用

Fig.7 Inhibition of bFGF-induced angiogenesis in chick chorioallantoic membrane by recombinant hTumstatin

Representative example of the CAMs in the presence of (a) bFGF + PBS; (b) bFGF + 10 µg tumstatin

发展较为成熟的真核高效表达系统,具有高效表达外源蛋白的能力和完善的分泌系统和翻译后加工机制,适合高密度发酵,表达产物易于纯化,成本远低于昆虫和哺乳动物表达系统<sup>[18]</sup>。因此本文尝试使用该系统进行 hTumstatin 的表达研究。

我们采用的 pPICZα 系列载体含 Zeocin™ 抗性基因 *Sh ble*,产生的抗性蛋白通过与抗生素结合而使其失活,因而用 Zeocin™ 抗生素筛选出现的假阳性率低于营养缺陷筛选,提高了重组酵母转化子筛选效率。根据同源重组方式不同所导致的 AOX1 基因的完整与否,*Pichia* 重组菌株可分为甲醇利用快速型 (Methanol utilization plus, Mut<sup>+</sup>) 和甲醇利用慢速型 (Methanol utilization slow, Mut<sup>-</sup>) 两种表型,外源蛋白在哪种表型的表达量更高,需要进一步验证。我们曾比较 Mut<sup>+</sup> 和 Mut<sup>-</sup> 型分泌表达 hTumstatin 的量,发现并无明显差别,不过由于 Mut<sup>-</sup> 型表达周期较长,诱导表达时培养基更换等操作不方便,因此我们选择 Mut<sup>-</sup> 型 GS115 (pPICZα-tum) 作为宿主。对所得的甲醇利用表型为 Mut<sup>-</sup> 的抗性转化子进行摇瓶表达筛选发现,目的蛋白在多数转化子中均有一定水平的表达,且表达上清中杂蛋白含量较少,目前所得转化子表达量较高的约为 25 mg/L,并经 Western blotting 进一步证实。尽管目前仍无足够的关于 tumstatin 基因工程方面的产量得率等可供比较的数据,但与罗以勤等<sup>[11]</sup>报道的 tumstatin 在 *E. coli* 中表达量占菌体总蛋白 20% 相比,以及与通常情况下在 *E. coli* 中以包涵体形式高表达 tumstatin 这类血管生成抑制因子后再经历变性复性纯化等的总回收率 (5% ~ 15%) 相比,以目前 25 mg/L 水平表达的产物经纯化后的总体得率 (文中约 60%,具体数据未显示) 和产量还是比较高的,而且在毕赤酵母中的表达

水平还有望进一步提高。

本文所得到的重组酵母 GS115 (pPICZα-tum) 经甲醇诱导表达,检测 YhTum 表达水平不够高,可能与筛选的工作量不够、筛选到的克隆中外源基因的拷贝数不高有关。pPICZα-tum 电激转化毕赤酵母 GS115,涂布含 Zeocin 的抗性板所产生的转化子大大少于利用 pPIC9k 载体构建的重组质粒转化毕赤酵母 GS115 在 MD 平板上产生的转化子 (结果未显示),因而可供表达筛选的转化子数目不多。转化效率低的原因可能是因为对于宿主菌 GS115 来说,100 µg/mL Zeocin 抗性浓度太高,Zeocin 作为诱变剂使宿主细胞产生了某些影响生长的不利突变,而这又可能导致发酵培养时表达产量降低。因此,要改善 hTumstatin 的表达状况,除可进一步调整抗性筛选浓度、继续筛选含多拷贝目的基因的转化子外,亦可考虑更换选择更合适的宿主菌。

由于基因本身 mRNA 5' 二级结构和 A/T 含量对外源蛋白在毕赤酵母中表达影响较大,所以还可从改造基因结构的角度来改善表达状况。序列分析发现,hTumstatin cDNA 序列中 A/T 平均含量达 54%,并存在某些富含 AT 的区段,因此,不排除发生转录提前终止的可能。这可能也是造成表达水平不够高的原因之一。通过重新设计合成 tumstatin 基因,将 A/T 含量控制在 30% ~ 55% 并适当选用毕赤酵母偏爱密码子有望进一步提高人 tumstatin 在毕赤酵母系统中的分泌表达量。另外,外源基因在重组酵母中的表达还受分泌信号、表达产物的稳定性以及培养条件如通气量、培养基、温度、pH 值、甲醇浓度、诱导前菌体浓度等多方面因素的影响<sup>[19]</sup>,这些工作的进一步研究,也将有利于获得重组蛋白 hTumstatin 的高效分泌表达。

软件预测分析表明,重组转化子 GS115 (pPICZα-tum) 表达的人肿瘤抑素理论等电点为 9.07,属于碱性蛋白,因而可用阳离子交换柱 SP-Sepharose FF 进行初步纯化。CAM 试验、内皮细胞增殖抑制实验以及对细胞的形态学观察表明,初步纯化的表达产物具有抑制体外培养的人脐静脉内皮细胞增殖、诱导其凋亡和抑制体内鸡胚尿囊膜血管生成的作用。这说明利用毕赤酵母表达系统能够得到具有生物学活性的 hTumstatin,通过进一步改善其在毕赤酵母中的表达情况以及提高产物纯度,可进行其他方面的活性测定,本文为 hTumstatin 功能、作用机制等的进一步研究以及应用打下了基础。

## REFERENCES(参考文献)

- [1] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implication. *N Engl J Med*, 1971, **285** (21): 1182 - 1186
- [2] Ortegan N, Werb Z. New functional roles for non-collagenous domains of basement membrane collagens. *J Cell Sci*, 2002, **115** (Pt 22): 4201 - 4214
- [3] Petitclerc E, Boutaud A, Prestayko A *et al.* New functions for non-collagenous domains of human collagen type IV. Novel integrin ligands inhibiting angiogenesis and tumor growth *in vivo*. *J Biol Chem*, 2000, **275**(11): 8051 - 8061
- [4] Maeshima Y, Colorado PC, Torre A *et al.* Distinct antitumor properties of a type IV collagen domain derived from basement membrane. *J Biol Chem*, 2000, **275**(28): 21340 - 21348
- [5] Maeshima Y, Colorado PC, Torre A *et al.* Two RGD-independent  $\alpha\beta 3$  integrin binding sites on tumstatin regulate distinct anti-tumor properties. *J Biol Chem*, 2000, **275**(31): 23745 - 23750
- [6] Maeshima Y, Manfredi M, Reimer C *et al.* Identification of the anti-angiogenic site within vascular basement membrane-derived tumstatin. *J Biol Chem*, 2001, **276**(18): 15240 - 15248.
- [7] Maeshima Y, Yerramalla UL, Dhanabal M *et al.* Extracellular matrix-derived peptide binds  $\alpha\alpha\beta 3$  integrin and inhibits angiogenesis. *J Biol Chem*, 2001, **276**(34): 31959 - 31968.
- [8] Maeshima Y, Sudhakar A, Lively JC *et al.* Tumstatin, an endothelial cell-specific inhibitor of protein synthesis. *Science*, 2002, **295**(5552): 140 - 143.
- [9] Hamano Y, Zeisberg M, Sugimoto H *et al.* Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV  $\alpha 3$  chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis *via*  $\alpha\beta 3$  integrin. *Cancer Cell*, 2003, **3**(6): 589 - 601
- [10] Hamano Y, Kalluri R. Tumstatin, the NC1 domain of  $\alpha 3$  chain of type IV collagen, is an endogenous inhibitor of pathological angiogenesis and suppresses tumor growth. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **333**(2): 292 - 298
- [11] Luo YQ(罗以勤), Wang LH(王梁华), Qiu Y(球谊) *et al.* Cloning, expression and bioassay of human tumstatin in *E. coli*. *Chin J Biochem Mol Biol* (中国生物化学与分子生物学报), 2005, **21**(3): 304 - 308
- [12] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [13] Dinney CPN, Bielenberg DR, Perrotte P *et al.* Inhibition of basic fibroblast growth factor expression, angiogenesis, and growth of human bladder carcinoma in mice by systemic Interferon- $\alpha$  administration. *Cancer Res*, 1998, **58**(40): 808 - 814
- [14] Wang JH(王继红), Ren F(任凤), Wu Y(吴敏) *et al.* Cloning, expression and some biological functions of adinbitor, a disintegrin from *Aghistrodon halys brevicaudus stejneger*. *Chin J Biochem Mol Biol* (中国生物化学与分子生物学报), 2004, **20**(6): 745 - 749
- [15] Fu SF(付生法), Lu YL(陆应麟), Zhang CS(张朝山) *et al.* Angiogenesis effect detected by chick chorioallantoic membrane (CAM) technique. *Bull Acad Mil Med Sci* (军事医学科学院院刊), 1993, **17**(4): 294 - 297
- [16] Jeon HK, Chang KH, Kim KI *et al.* Functional expression of recombinant tumstatin in stably transformed *Drosophila melanogaster* S2 cells. *Biotechnol Lett*, 2003, **25**(3): 185 - 189
- [17] Chang KH, Lee JM, Jeon HK *et al.* Improved production of recombinant tumstatin in stably transformed *Trichoplusia ni* BTI Tn 5B1-4 cells. *Protein Expr Purif*, 2004, **35**(1): 69 - 75
- [18] Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev*, 2000, **24**(1): 45 - 66
- [19] Sreekrishna K, Brankamp RG, Kropp KE *et al.* Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, 1997, **190**(1): 55 - 62