

# 人内皮抑素在毕赤酵母中的表达、纯化与生物功能研究

冯 怡\* 崔立斌<sup>2</sup> 刘传暄<sup>1</sup> 马清钧<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(北京生物工程研究所 北京 100850)

<sup>2</sup>(University of Maryland, Nutrition and food science department, College Park, Maryland 20742)

**摘 要** 内皮抑素(Endostatin)是近年来新发现的一种内源性新生血管生成(Angiogenesis)抑制因子,通过抑制新血管生成而抑制肿瘤的形成和转移且不会引起耐药性,具有极高的临床应用前景。巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)具有表达率高、产物可分泌、可对高等真核生物蛋白正确进行翻译后加工、遗传稳定、发酵工艺成熟等优点被用来进行重组人 Endostatin 的表达。本研究用 PCR 的方法从人胎肝 cDNA 文库中扩增出人 Endostatin 的 cDNA,测序正确后转入毕赤巴斯德甲醇酵母,并获得了高效可溶型表达,用肝素亲和层析的方法进行纯化,纯化后产物经 SDS-PAGE 薄层扫描分析纯度达 98.7% 以上,质谱测定分子量为 20.43kD 与理论值一致,蛋白质 N 端序列测定结果为 SPPAHTHRDFQVPLH 与天然序列一致。生物活性检测证明可抑制鸡胚尿囊绒毛膜(CAM)的新生血管生成(Angiogenesis),并可抑制血管内皮细胞的增殖。因此用酵母表达系统可以得到具有生物活性的内皮抑素,经纯化后可用于进一步的生物功能和作用机理试验。

**关键词** 内皮抑素,毕赤巴斯德酵母,新生血管生成

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)03-0278-05

新生血管生成(Angiogenesis)是指由已经形成的血管产生新的毛细血管的过程,它可受刺激因子诱导产生,又可受到自发产生的抑制因子阻断。新生血管生成与一些正常生理过程相关并受到严格调控<sup>[1]</sup>。而不正常的新生血管生成总是伴随着疾病状态<sup>[2]</sup>。特别是在肿瘤的形成与转移过程中新生血管生成起到了关键的作用<sup>[3]</sup>,因此可通过抑制新血管的形成来阻断转化细胞的营养供应,使得肿瘤无法形成,或饿死已形成的肿瘤、阻止肿瘤的转移<sup>[4-6]</sup>。

Endostatin 是 1997 年由哈佛大学的 O'Reilly 从小鼠血管内皮瘤 EOMA 细胞的培养上清中分离的<sup>[7]</sup>特异抑制新生血管生成过程的天然分子。经证实是胶原 XVIII NCI 结构域 C 末端 184 个氨基酸的小片段,分子量 22kD,具有肝素结合能力<sup>[7,8]</sup>,体外实验中可引起受 bFGF、VEGF 刺激的血管内皮细胞的凋亡<sup>[9,10]</sup>。抑制 CAM 实验中由 bFGF、VEGF 诱导的新生血管生成,抑制血管内皮细胞的移行。在小鼠肿瘤模型中可抑制肿瘤的形成、转移,使已形成的肿瘤缩小,并且反复施用无耐药性和毒性的产生<sup>[11-13]</sup>。很快人的 Endostatin 也被克隆表达,并证实具有同样的生物学活性<sup>[15-17]</sup>。迄今为止关于 En-

dostatin 的研究开展了很多,但其作用机理还远未揭开,而且 20mg/kg/d 的作用剂量<sup>[7]</sup>也限制了它的临床应用,为了获得高活性的 Endostatin 进一步研究其生物功能、作用机理,我们克隆了人 Endostatin 基因。

巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)是甲醇营养酵母,启动醇氧化酶(Alcoholoxidase AOX)表达的 AOX1 启动子具有强诱导性使其下游外源基因易于调控,并可获得极高的表达<sup>[14]</sup>。作为真核生物它还可对外源基因进行正确的翻译和翻译后加工,且其糖基化加工比酿酒酵母更接近高等真核生物。经人工构建带有信号肽的外源基因产物还可被分泌到胞外,使产物易于纯化。于是我们选择了巴斯德毕赤酵母表达系统进行重组人 Endostatin 的表达。

## 1 材料与方 法

### 1.1 质粒、菌株与细胞株

pGEM-T 载体购自 Promega 公司,pPIC9 购自 Invitrogen 公司,人胎肝 cDNA 文库购自 Invitrogen 公司,大肠杆菌 DH5 $\alpha$  为本室保存,酵母宿主菌 GS115 为本室保存。HUVEC 由人脐静脉分离,人脐静脉内皮细胞系 ECV304 培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM

培养基中,人结肠癌细胞系 HT29 培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中。

## 1.2 工具酶与试剂

工具酶购自 NEW England BioLab 公司,各种试剂盒购自 Promega 公司, SepharoseCL6B-haperin 酵母培养用 Peptone 为 Invitrogen 公司产品, Yeast extract、YNBw/o 为 GIBCO 公司产品,细胞培养基 IMDM、DMEM(高糖)、胎牛血清、马血清均为 Hyclone 公司产品,明胶、胶原酶、胰蛋白酶、肝素钠购自 GIBCO 公司,人 bFGF 购自北京白鹫园生物工程公司,其他化学试剂均为国产或进口分析纯。

## 1.3 PCR 引物

根据人胶原 XVIII NC1 结构域 C 末端序列设计由上海生工生物工程公司合成。上游引物序列为 5'-CGCTCGAGAAAAGAAGCCACCCGCCACAGCCA-3'。为保证在酵母中分泌表达时信号肽正确切割加上了识别序列-CTC GAG AAA AGA-并带有 *Xho*I 位点; Leu Glu Lys Arg 下游引物序列为 5'-GTCAGGATCCTTACTTGGAGGCA GTCATGA-3'。编码 Endostatin C 末端序列带 *Bam*HI 酶切位点, AOX1 测序引物购自 Invitrogen 公司。

## 1.4 目的基因的扩增

以人胎肝 cDNA 文库(Invitrogen)为模板,加入上下游引物各 50pmol,甘油 10% Taq 酶 4u 含镁离子 Buffer 10 $\mu$ L dNTP 各 2.5mmol/mL 总体积 100 $\mu$ L 覆盖石蜡油。首先 94 $^{\circ}$ C 3min 期间加入 Taq 酶,PCR 循环参数为 94 $^{\circ}$ C 50s, 55 $^{\circ}$ C 50s, 72 $^{\circ}$ C 50s 共 30 个循环,然后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min 取 6 $\mu$ L PCR 产物用 1% 琼脂糖进行电泳检查。

## 1.5 目的基因的克隆

纯化后的 PCR 产物按说明书克隆于 pGEM-T 载体上(Promega 公司)本室 PE373A 自动测序仪测序。

## 1.6 酵母转化质粒的构建

pGEM-endo 质粒用 *Xho*I/*Not*I 双酶切,用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离载体片段与目的基因,切下的目的片段用 PCR 回收试剂盒回收,酵母转化质粒 pPIC9 也用 *Xho*I/*Not*I 双酶切,0.8% 琼脂糖电泳回收载体片段,用 T4DNA 连接酶连接目的基因和载体片段,连接产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  菌株,培养过夜挑取克隆,酶切鉴定后 PE373A 自动测序仪测序。

## 1.7 酵母宿主菌的转化及重组子的筛选

10 $\mu$ g pPIC9-endostatin 质粒,用 *Bgl*II 酶切,酵母菌 GS115 按 Invitrogen 公司说明书制成感受态菌。按说明书方法用 Bio-Rad 电转仪,在 10 $\mu$ F 400V 条件

下用酶切产物转化感受态的 GS115,转化产物涂布 MD 平板,30 $^{\circ}$ C 温箱培养至长出菌落。用牙签挑取菌体,用 Endostatin 扩增引物直接进行 PCR 鉴定,筛选出整合有 Endostatin 基因的重组子。

## 1.8 表达菌株的筛选

对 PCR 鉴定整合有目的基因的 GS115-endostatin 候选菌株进行表达筛选。按 Invitrogen 公司说明书先用 BMGY 培养基在 24h 后换 BMMY 培养基诱导表达,继续培养的过程中保持良好的通气,每 24h 取样 100 $\mu$ L,5000r/min 离心 5min 分别取上清和菌体,用 12% SDS-PAGE 电泳分析考马斯亮蓝 R250 染色检查。

## 1.9 Endostatin 的诱导表达

取筛选出的 GS115-endostatin 表达株接种于 BM-GY 液体培养基 10mL 中 30 $^{\circ}$ C 摇床 250r/min 培养 36h 至 OD > 6 后按 1% 接种于 3L 大瓶中的 500mL BMGY 液体培养基中 30 $^{\circ}$ C, 250r/min 培养 36h,无菌条件下 1000g/min 离心去掉 BMGY 培养基,加入 300mL BMMY 培养基继续培养每隔 24h 加入甲醇至终浓度 1% 并取样 1mL,12% SDS-PAGE 电泳检验找出最佳表达时间。

## 1.10 蛋白质的纯化

表达上清过滤除去菌体残渣,用终浓度 70% 的硫酸胺沉淀,10000r/min 离心 20min 收集沉淀的蛋白,用 0.1 体积的 PBS(10mmol)重悬,用 PBS(10mmol)透析 24h,期间换透析液 3 次。用 Sepharose CL6B 装填层析柱,用 5 倍柱床体积含 0.1mol/L NaCl,10mmol/L Tris-Cl pH7.4 的结合缓冲液以流速 20cm/h 平衡柱子,透析后的样品按 15cm/h 速度上样,用大量的结合缓冲液洗柱,至  $A_{280} < 0.01$  用含 0.3mol/L, 0.6mol/L, 1mol/L, 2 mol/L NaCl, Tris-Cl pH7.4 的洗脱液梯度洗脱。收集各个洗脱峰,用 12% SDS-PAGE 分析鉴定目的蛋白所在的峰。收集的目的蛋白用 PBS(10mmol)透析,吹干浓缩。蛋白浓度的测定用 BCA 法(Pierce),-20 $^{\circ}$ C 冻存用于分析鉴定及生物功能试验。纯化蛋白 SDS-PAGE 薄层扫描分析用本室光密度扫描仪完成。纯化产物的质谱分析由本院仪器检测中心质谱室完成。纯化产物 N 端 15 肽分析由北大蛋白测序组完成。

## 1.11 鸡胚绒毛尿囊膜血管生成实验

9 日龄的鸡胚在气室下方开 0.5cm<sup>2</sup> 的小洞露出尿囊膜,分别把沾有 0.2 $\mu$ g bFGF, 0.2 $\mu$ g bFGF + Endostatin 20 $\mu$ g 的无菌滤纸小块(4mm<sup>2</sup>)放于尿囊膜上,用无菌透明胶封口,于 37 $^{\circ}$ C 孵箱中继续培养 48h,打开鸡胚观察。

### 1.12 HUVEC 的分离培养

无菌条件下取新鲜人脐带,用含抗生素的 PBS 洗去脐静脉中的血细胞,用止血钳夹住一端,灌入 0.1% 胶原酶 II 37℃ 消化 20min 后 PBS 洗 2 遍,合并消化液和 PBS 加 15% 胎牛血清,900r/h 离心 10h,收集细胞,重悬于含 20% 胎牛血清的 IMDM 培养基中,记数  $10^5$  接种于明胶铺板的六孔培养板上。第 2 天除去悬浮细胞换完全培养基。含 20% 胎牛血清、0.9% 肝素、1% BSA 2ng/mL bFGF 的 IMDM 培养基,37℃ 5%  $CO_2$  培养至长满后 1:5 传代。第 3~8 代 HUVEC 被用来做生物活性实验。

### 1.13 内皮细胞增殖抑制实验(MTT 法)

96 孔细胞培养板中按每孔  $100\mu L$  约  $10^4$  个细胞接种, HUVEC 用 20% 胎牛血清的 IMDM 培养基, ECV304 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基。作参照的 HT29 细胞用 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,培养于 37℃ 5%  $CO_2$  孵箱中 24h 后换含 2% 血清的培养基,12h 后分别加 10ng/mL bFGF, 10ng/mL bFGF + endostatin 从  $10\mu g$ /孔起倍比稀释,以 PBS 为对照每样品重复 3 孔,加样后培养 32h,每孔加入  $20\mu L$  MTT 继续培养 4h,小心吸去培养基,每孔加入  $150\mu L$  DMSO 放置 15min,充分溶解后用 Bio-Rad 酶联免疫比色仪在波长 490 下比色,重复 3 次独立实验。

## 2 结果与讨论

### 2.1 扩增

以人胎肝 cDNA 为模板经 PCR 扩增出产物大小为 570bp 左右,与预期一致,见图 1。

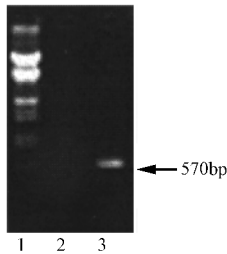


图 1 Endostatin PCR 产物 1% 琼脂糖电泳分析图

Fig.1 1% agarose gel electrophoresis analysis of amplified endostatin cDNA

1.  $\lambda$  DNA *Hind*III + *Eco*RI double digest marker
2. Negative control ; 3. PCR product of endostatin

### 2.2 PCR 产物的克隆及序列分析

按 Promega 公司 pGEM-T 载体说明书操作将 PCR 产物克隆至 pGEM-T 载体上,经测序证明与 GenBank 中编码胶原 XVIII NC1 结构域 C 末端 188Aa

的 cDNA 序列完全一致,比天然 Endostatin 序列多 4 个内源 Aa 与设计一致。

### 2.3 酵母转化载体的构建与鉴定

从 pGEM-endo 上用 *Xho*I/*Not*I 双酶切下 Endostatin 基因与 *Xho*I/*Not*I 双酶切的 pPIC9 载体连接后转化宿主菌,挑取 8 个克隆经 PCR 鉴定及酶切正确后选 1 个克隆用 DNA 自动测序仪测序,证明序列及读码框正确,酵母表达质粒 pPIC9-endo 构建成功。

### 2.4 酵母菌的电击法转化及表达菌株的筛选

按说明操作,转化后可在 MD 平板上生长的为整合有 His 基因的候选菌,挑菌体以 Endostatin 上下游引物进行 PCR 筛选出整合有 Endostatin 基因的候选菌,用 BMGY 培养, BMMY 诱导表达,用 12% SDS-PAGE 及 Western 印迹分析诱导表达后的上清和菌体(图 2),确定 GS115-endostatin 为分泌型表达,产物位于培养上清中,菌体中只有极少量的产物,同样整合有目的基因的不同重组子的表达量有差异这可能是插入拷贝数的不同引起的<sup>[14]</sup>。以 AOX1 上下游引物对筛选出的 1 个高表达菌株进行 PCR 鉴定发现 AOX1 基因未被破坏, Endostatin 基因是通过位点特异的单交换同源重组整合入 GS115 染色体的,与其在 MM 平板上表现的  $Mut^+$  (Methanol utilization) 表型一致。

### 2.5 Endostatin 的表达、纯化

将高表达菌扩大体积进行培养并诱导,经检测表达峰值出现在诱导后 48h,取 48h 表达上清硫酸胺沉淀后重溶并透析,产物用肝素亲和层析纯化,用不同浓度 NaCl 10mmol/L Tris-Cl pH7.4 梯度洗脱, SDS-PAGE 及 Western 印迹分析见图 2,纯品 Endostatin 大部分位于 0.3mol/L NaCl 脱峰中。与文献报道略有不同<sup>[15-17]</sup>,可能与其同肝素的亲和能力有关但并未影响其生物活性。纯化后蛋白用 12% SDS-PAGE 分析并用薄层扫描分析纯度达 98.7%(图 3)。

### 2.6 纯化后产物的理化性质分析

纯化后蛋白质质谱其分子量为 20.34kD,与根据 Aa 序列的计算值一致,蛋白测序结果 N 端 15 肽为 SPPAHTHRDFQPVLH 与设计一致,比天然 Endostatin 的序列 N 端增加了 SPPA 4 个内源氨基酸,是考虑到在毕赤酵母中表达时有可能发生 N 端降解设计的,而根据报道 N 端序列的增加不影响其生物活性<sup>[11]</sup>。

### 2.7 生物活性测定

2.7.1 重组人 Endostatin 抑制 bFGF 刺激的鸡胚绒毛尿囊膜新生血管生成 实验结果表明, Endostatin

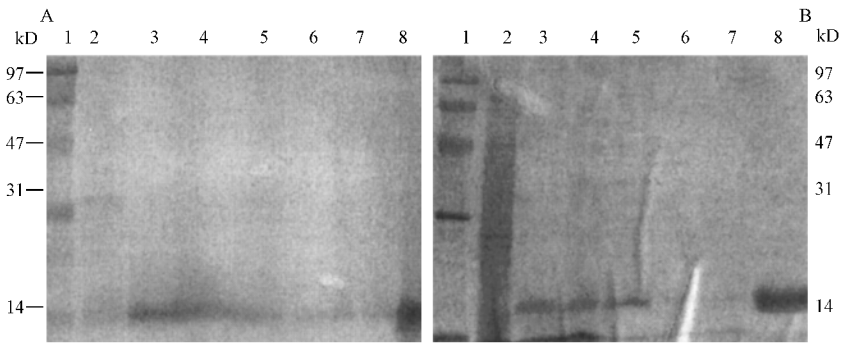


图 2 表达蛋白的 12% SDS-PAGE 分析和相应的蛋白印迹分析

Fig.2 12% SDS-PAGE analysis of expressed and purified endostatin and parallel result of Western blot

A. 12% SDS-PAGE analysis result B. Western blot result

- 1. Low molecular weight standard( D ); 2. Extracts from GS115-endostatin ; 3. 24h supernatant of GS115-endostatin conditioned medium 20 $\mu$ L ;
- 4. 48h supernatant of GS115 conditioned medium 20 $\mu$ L ; 5. Ammonium sulfate precipitation product 5. Supernatant of ammonium sulfate precipitation 20 $\mu$ L 7. Heparin-sepharose CL6B affinity chromatography 0.1mol/L NaCl fraction 20 $\mu$ L ; 8. Heparin-sepharose CL6B affinity chromatography 0.3mol/L NaCl fraction 5 $\mu$ L

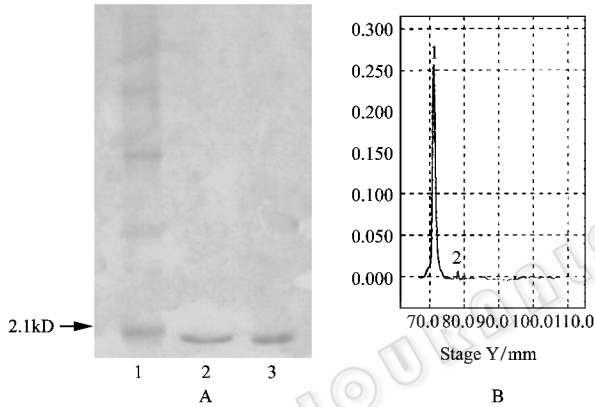


图 3 纯化后 12% SDS-PAGE 分析及薄层扫描分析

Fig.3 12% SDS-PAGE analysis and scanning analysis

- 1. Standard protein weight ; 2, 3. Purified endostatin

抑制血管的生成 ,但是对 bFGF 刺激的成纤维细胞的增殖没有影响 结果见图 4。

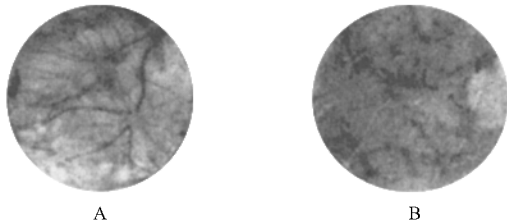


图 4 鸡尿囊绒毛膜血管生成实验

Fig.4 CAM angiogenesis assay

A. CAM treat with bFGF ; B. CAM treat with bFGF + endostatin

2.7.2 在内皮细胞增殖抑制实验中 Endostatin 可抑制 bFGF 刺激的内皮细胞 ECV304 和 HUVEC 的增殖 ,所得数据经统计学分析差异显著 ( P < 0.01 ) ( 见图 5 , 6 )。 Endostatin 抑制 ECV304 的增殖有剂量效

应。同时 Endostatin 对肿瘤细胞 HT29 的增殖没有抑制作用( 结果未列出 )。

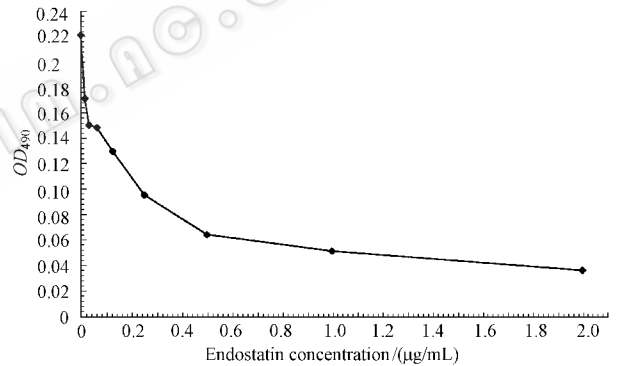


图 5 Endostatin 抑制 bFGF 刺激的 ECV304 增殖

Fig.5 Inhibition effect of endostatin on the proliferation of ECV304 ( P < 0.01 )

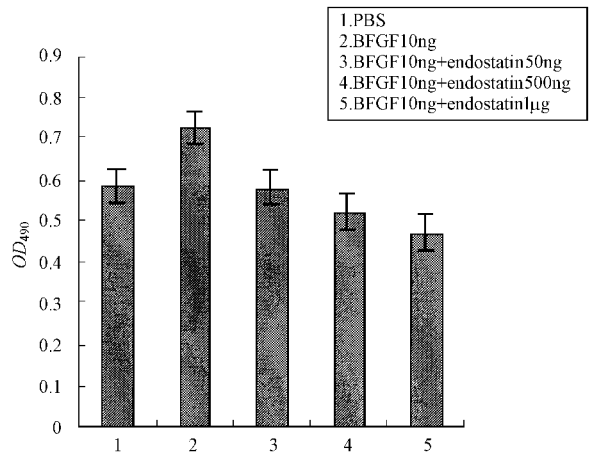


图 6 Endostatin 抑制 bFGF 刺激的 HUVEC 的增殖 ( P < 0.01 )

Fig.6 Endostatin inhibited proliferation of HUVEC

本研究用巴斯德毕赤酵母(*P. pastoris*)为宿主,以酵母表达质粒 pPIC9 为载体介导,从人胎肝 cDNA 文库中扩增出的 Endostatin cDNA 整合入 GS115 酵母菌株染色体 AOX1 启动子下游,构建成稳定的 GS115-endostatin 表达菌株,SDS-PAGE 初步分析实验室培养表达量达 40mg/L,并经肝素亲和层析得到纯度 98% 以上的蛋白,测定并证实了其在体外可抑制 bFGF 刺激的新生血管生成,和血管内皮细胞的增殖,说明用酵母表达系统可得到具有生物活性的 Endostatin,为进一步深入研究 Endostatin 的生物学活性和其作用机理打下了基础。实验中我们发现 endostatin 的抑制作用有剂量效应,推测在新生血管生成的过程中内皮细胞表面有特异的受体分子表达,不同的实验条件下细胞所处的状态有很大的差异,而体外实验中同一细胞群体的所有细胞不一定都处于对 Endostatin 敏感的状态,这可能是不同研究小组的实验结果出现差异的原因。最近 Dixelius J 等的研究证实了 Endostatin 被内皮细胞内吞消除,以及通过 Adapter 蛋白 SHb 影响某种受体 Tyr 激酶的信号转导途径而发挥生物功能<sup>[18]</sup>,虽然没有确定直接与 Endostatin 相互作用的受体分子,但使 Endostatin 作用机理的研究更加深入。我们也在进一步研究 Endostatin 的生物功能和作用机理。

## REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] Folkman J. How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? G. H. A. Clowes memorial award lecture. *Cancer Res*, 1986 **46**: 467 ~ 473
- [ 2 ] Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*, 1995 **1**: 27 ~ 31
- [ 3 ] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J*

- Med*, 1971 **18**( 285 ): 1182 ~ 1186
- [ 4 ] Kerbel R S. A cancer therapy resistant to resistance. *Nature*, 1997, **390**( 6658 ): 335 ~ 336
- [ 5 ] Hanahan D. A flanking attack on cancer. *Nat Med*, 1998 **4**( 1 ): 13 ~ 14
- [ 6 ] Timothy Browder, Bwterfield CE, Kraling BM *et al.* Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Res* 2000 **60**: 1878 ~ 1886
- [ 7 ] O'Reilly M S, Boehm T *et al.* Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, 1997 **88**( 2 ): 277 ~ 285
- [ 8 ] Sasaki T, Fkai N *et al.* Structure, function and tissue forms of the C-terminal globular domain of collagen XVIII containing the angiogenesis inhibitor endostatin. *EMBO J*, 1998 **17**( 15 ): 4249 ~ 4256
- [ 9 ] Dhanabal M, Ramchandran R, Waterman M J, Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *J Biol Chem*, 1999, **274**( 17 ): 11721 ~ 11726
- [ 10 ] Dhanabal m, Volk r, Ramchandran R. Cloning, expression, and *in vitro* activity of human endostatin. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999 **258**( 2 ): 345 ~ 352
- [ 11 ] Boehm T, Folkman J *et al.* Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature*, 1997 **390**( 6658 ): 404 ~ 407
- [ 12 ] Black W R, Agner R C. Tumour regression after endostatin therapy. *Nature*, 1998 **391**( 6666 ): 450
- [ 13 ] Berger A C, Feldman A L *et al.* The angiogenesis inhibitor, endostatin, does not affect murine cutaneous wound healing. *J Surg Res*, 2000 **91**( 1 ): 26 ~ 31
- [ 14 ] Gregg J M, Vedvick T S, Raschke W C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio/technology*, 1993, **11**( 8 ): 905 ~ 910
- [ 15 ] Taddei L, Chiarugi P, Brogelli L *et al.* Inhibitory effect of full-length human endostatin on *in vitro* angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999 **263**( 2 ): 340 ~ 345
- [ 16 ] Dhanabal M, Volk R, Ramchandran R *et al.* Cloning, expression, and *in vitro* activity of human endostatin. *Biochem biophys Res Commun*, 1999 **258**( 2 ): 345 ~ 352
- [ 17 ] Dhanabal M, Ramchandran R, Volk R *et al.* Endostatin: yeast production, mutants, and antitumor effect in renal cell carcinoma. *Cancer Res*, 1999 **59**( 1 ): 189 ~ 197
- [ 18 ] Dixelius J, Larsson H, Sasaki T *et al.* Endostatin-induced tyrosine kinase signaling through the Shb adaptor protein regulates endothelial cell apoptosis. *Blood*, 2000 **95**( 11 ): 3403 ~ 3411

## Inhibition Effect *in vitro* of Purified Endostatin Expressed in *Pichia pastoris*

FENG Yi<sup>1</sup> CUI Li-Bin<sup>2</sup> LIU Chuan-Xuan<sup>1</sup> MA Qing-Jun<sup>1</sup>

<sup>1</sup>( Beijing Institute of Biotechnology, Beijing, 100850, China )

<sup>2</sup>( University of Maryland, Nutrition and food science department, College Park, Maryland 20742 )

**Abstract** Endostatin is a newly found inhibitor of angiogenesis, which is identified as c-terminal 184 amino acid fragment of collagen XVIII NCI-domain. A 570bp cDNA fragment of endostatin has been amplified by PCR from a commercial human fetal liver cDNA library. After subcloned into the yeast vector pPIC9 and subsequenced to prove its correctness, *Pichia pastoris* was transformed with the recombinant pPIC9-endostatin. The expressed endostatin in *P. pastoris* was purified by heparin-sapherose affinity chromatography. It's purity identified by SDS-PAGE thin layer scanning analysis was up to 98.7% and its Mol. Weight measured by MS was 20.34kD. The expression level was up to 40mg/L. The first fifteen amino acid sequence of the N-terminal was completely identical with the inner sequence C-terminal fragment of collagen XVIII NCI domain as has been designed. Bio-assay indicated that the recombinant endostatin can inhibit angiogenesis stimulated by bFGF in CAM test and also the proliferation of both HUVEC and ECV304 in an *in vitro* test.

**Key words** endostatin, angiogenesis, *Pichia pastoris*

Received: October 12, 2000

\* Corresponding author. Tel 86-10-66931809; Fax 86-10-68215721; E-mail: feifeicat@mailcity.com