

# 重组人纤溶酶原 Kringle1-5 的制备及其生物学活性

侯卫红, 柴玉荣, 王天云, 王建民, 贾岩龙, 薛乐勋

(郑州大学医学院细胞生物学研究室, 郑州 450052)

**摘要:**为了研究重组人纤溶酶原 Kringle1-5(K1-5)的抗血管生成活性及其对内皮细胞增殖的影响,通过 PCR 扩增人纤溶酶原 K1-5 cDNA,定向克隆于原核表达载体 pET30a(+ )中,构建重组表达载体 pET-K1-5,转化 *E. coli* BL21(DE3), IPTG 诱导表达, SDS-PAGE 和 Western 杂交检测 K1-5 的表达。鸡胚尿囊膜 (CAM) 实验和 MTT 实验分别检测重组人纤溶酶原 Kringle1-5 对鸡胚新生血管生成和内皮细胞的抑制作用。结果表明, IPTG 诱导原核表达载体 pET-K1-5 在 *E. coli* BL21(DE3) 中的表达量约占菌体总蛋白量的 32%, K1-5 主要以包涵体形式存在,包涵体经过洗涤、溶解、Ni-spin 亲和柱层析纯化以及蛋白质复性等步骤后,获得了纯度约为 96% 的重组 K1-5 蛋白。CAM 实验表明,原核表达的重组人 K1-5 能有效地按剂量依赖的方式抑制鸡胚新生血管的形成。MTT 实验结果显示,重组人 K1-5 特异地抑制内皮细胞的增殖,而对非内皮细胞无抑制作用。

**关键词:** Kringle1-5; 纤溶酶原; 肿瘤血管生成抑制剂; 血管抑素; 原核表达

中图分类号: R730.23

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2005)04-0617-06

## Preparation of Human Recombinant Kringle 1-5 and Its Bioactivity

HOU Wei-Hong, CHAI Yu-Rong, WANG Tian-Yun, WANG Jian-Min,

JIA Yan -Long, XUE Le-Xun

(Laboratory for Cell Biology, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

**Abstract:** To investigate antiangiogenesis activity and effects on endothelial cell proliferation of human recombinant K1-5 expressed in *E. coli* BL21, the cDNA of human K1-5 obtained from a cloning vector pUC57K1-5 by PCR, was inserted into an expression vector pET30(+ ) to construct a prokaryotic expression vector pET-K1-5. Recombinant K1-5 efficiently expressed in *E. coli* BL21 after IPTG induction was monitored by SDS-PAGE and Western blotting with an anti-angiostatin monoclonal antibody. The expressed K1-5 accounted for approximately 32% of the total bacterial proteins as estimated by densitometry, and existed mainly as inclusion bodies. The inclusion bodies were washed, lysed and purified to a purity of 96% by the nickel affinity chromatography. Refolded K1-5 protein was tested on chicken CAMs, and a large number of newly formed blood vessels were significantly regressed. In the present study, we demonstrated that bacterial-expressed K1-5 effectively inhibited angiogenesis of the chicken embryo in a dose-dependent manner through CAM assay. In addition, human recombinant K1-5 potently inhibited endothelial cell proliferation with no inhibition on non-endothelial cells. Taken together, these findings demonstrated that human recombinant K1-5 effectively inhibited angiogenesis of the chicken embryo in a dose-dependent manner and specially suppressed in vitro the proliferation of human umbilical vein endothelial cells.

收稿日期: 2004-11-19; 修回日期: 2004-12-08

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 30270031), 河南省重大科技攻关项目 (编号: 0122032500) [Supported by National Natural Science Foundation (No. 30270031), Major Programs of Science and Technique Foundation of Henan Province (No. 0122032500)]

作者简介: 侯卫红 (1966—), 女, 副教授, 博士, 研究方向: 肿瘤生物工程。Tel: 0371-66912870, E-mail: whhou@zzu.edu.cn

通讯作者: 薛乐勋 (1942—), 男, 博士生导师, 研究员, 研究方向: 肿瘤生物工程。Tel: 0371-66658332, E-mail: lxxue@public2.zz.ha.cn

**Key words:** Kringle1-5; plasminogen; antiangiogenesis inhibitor; angiostatin; prokaryotic expression

恶性实体肿瘤的生长和转移依赖于周围新生血管的生成<sup>[1~3]</sup>。通过抑制肿瘤血管的生成,切断肿瘤细胞获得营养以及生长因子的途经,可达到抑制肿瘤生长和转移的目的。因此,这种抗肿瘤血管生成治疗的“休眠疗法”(dormancy therapy)已成为当今肿瘤治疗的热门研究领域之一<sup>[4,5]</sup>。

血管抑素(angiostatin)<sup>[6,7]</sup>是在1994年发现的第一个内源性的血管生成抑制因子,它是纤溶酶原水解后的产物,包含人纤溶酶原的前4个Kringle结构域(图1)。许多实验表明,纤溶酶原的不同结构域及其组合对内皮细胞生长的抑制作用各不相同<sup>[8~12]</sup>,它们的活性由高到低依此为K1-5、Kringle 5(K5)、angiostatin、Kringle 1(K1)、和Kringle 3(K3),Kringle 2(K2)活性不高,Kringle 4(K4)基本没有活性。因此,K1-5是一个很有潜力的血管生成抑制因子。到目前为止,对于K1-5在原核细胞中的表达及其生物学活性研究未见报道。

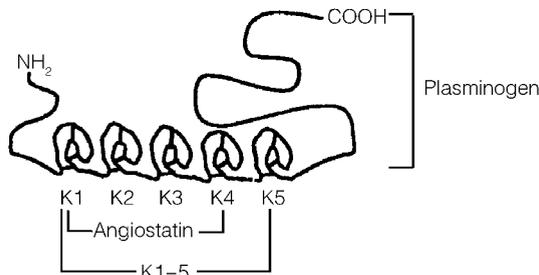


图1 人纤溶酶原的结构

血管抑素含有前4个Kringle结构域,K1-5含有所有5个Kringle结构域。

### Fig.1 Schematic structure of human plasminogen

Plasminogen consists of five triple-looped Kringles formed by disulfide bonds. Angiostatin, an internal fragment of plasminogen, is composed of the first four Kringles, and Kringles1-5 comprises all the five Kringles.

为了探索原核表达的K1-5的抗血管生成活性及其对内皮细胞增殖的影响,通过PCR扩增了K1-5 cDNA,构建重组表达载体pET-K1-5,并在*E. coli* BL21(DE3)中高效诱导表达。我们发现原核表达的K1-5对鸡胚新生血管生成和内皮细胞的增殖有明显的抑制作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料及主要试剂

#### 1.1.1 菌株、质粒

大肠杆菌(*E. coli*) JM109、DH5α和BL21由本室保存;pUC57K1-5由曹义海博士(Karolinska Institute, Stockholm, Sweden)惠赠;pET30a(+ )原核表达载体购至Invitrogen公司。

#### 1.1.2 工具酶及主要试剂

限制性内切酶 *Bam*H I、*Sac* I及Pyrobest™ DNA polymerase 购自TaKaRa公司;Ni-NTA spin columns 购至QIAGEN公司;引物由TaKaRa公司合成。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 构建原核表达载体 pET-K1-5

以pUC57K1-5为模板,设计扩增K1-5基因的特异引物P1和P2:P1:5'-CGGGATCC TTATTT-GAAAAGAAAGTGTATCTCTC-3';P2:5'-CCCGAGCTCAT-CAAATGAAGGGGCCGCACACTGAGG-3',P1和P2的5'端分别引入*Bam*H I和*Sac* I酶切位点,利用PCR扩增K1-5 cDNA。PCR反应体系为:模板1μL;10×反应缓冲液5μL;上、下游引物各1μL;dNTP 4μL;Pyrobest™ DNA polymerase 1μL;加双蒸水至总体积50μL。PCR反应条件:94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 1.5 min,共进行30次循环。1%琼脂糖凝胶电泳分析PCR扩增产物。

将带有*Bam*H I和*Sac* I酶切位点的K1-5 DNA双酶切,纯化回收酶切片段,同样对pET30a(+ )载体进行*Bam*H I和*Sac* I双酶切纯化回收后,T4连接酶连接,构建K1-5的原核表达载体pET-K1-5,转化大肠杆菌DH5α,挑选阳性菌落。少量提取质粒,用*Bam*H I和*Sac* I双酶切鉴定,并测序确定读码框正确。

#### 1.2.2 K1-5在大肠杆菌中的表达和分离纯化<sup>[10]</sup>

pET-K1-5质粒转化大肠杆菌表达菌株BL21,挑选阳性菌落接种于5 mL含卡那霉素抗性的LB培养基中,37℃振荡培养8~12 h,取1 mL接种于50 mL含卡那霉素抗性的LB培养基中剧烈振荡培养至A<sub>600</sub>为0.8左右,加入IPTG至1 mmol/L,继续培养数小时,取菌液1 mL,12 000×g离心1 min,

加入  $1 \times$  SDS 上样缓冲液  $20 \mu\text{L}$ , 用 SDS-PAGE 电泳对表达产物进行鉴定。

诱导表达的菌液离心收集菌体, 重悬于裂解缓冲液 ( $100 \text{ mmol/L NaCl}$ ,  $50 \text{ mmol/L Tris-HCl pH } 8.0$ ,  $1 \text{ mmol/L EDTA}$ ) 中, 超声破碎, 离心收集沉淀, 获得粗制包涵体。包涵体经洗涤、溶解后, 用亲和层析柱 (Ni-NTA spin column) 进行纯化 K1-5。将 K1-5 依此在透析液 I ( $20 \text{ mmol/L Tris-HCl}$ ,  $\text{pH } 8.5$ ) 和透析液 II ( $1 \text{ mmol/L GSH}$  /  $0.2 \text{ mmol/L GSSG}$ ,  $20 \text{ mmol/L Tris-HCl}$ ,  $\text{pH } 8.5$ ) 中透析复性。

### 1.2.3 Western 杂交

菌液用 PBS 洗涤,  $12\ 000 \times g$  离心  $1 \text{ min}$ , 加入  $1 \times$  SDS 上样缓冲液  $20 \mu\text{L}$ , 用  $12\%$  分离胶进行 SDS-PAGE 电泳, 转印至硝酸纤维素膜上, 用鼠抗人 angiostatin 的单克隆抗体进行免疫印迹分析。

### 1.2.4 CAM 实验

利用改良的鸡胚尿囊膜 (CAM) 实验<sup>[13]</sup> 检测重组 K1-5 的抗血管生成活性。将孵化  $6 \text{ d}$  的鸡胚去掉气室后, 以  $5 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$  的滤纸载样, 将不同浓度的 K1-5 加到 CAM 上, 继续孵育  $48 \sim 72 \text{ h}$ , 观察对 CAM 新生血管的影响。

### 1.2.5 MTT 实验

人脐静脉内皮细胞系 HUVEC、成纤维细胞系 NIH3T3、食管癌细胞系 Eca-109 和人肝癌细胞系 HepG2 用含  $15\%$  胎牛血清 (FCS)、 $100 \text{ U/mL}$  青霉素和  $100 \mu\text{g/mL}$  链霉素的 DEME 培养基培养。MTT 比色分析法检测重组人纤溶酶原 Kringle1-5 对内皮细胞的抑制作用。于  $96$  孔板中接种  $100 \mu\text{L}$  细胞悬液 (约  $3\ 000 \sim 5\ 000$  个细胞/孔), 置  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{ CO}_2$  培养箱中培养  $12 \text{ h}$ , 用  $150 \mu\text{L}$  含  $5\%$  FCS 的 DEME 培养基换液, 每孔加入  $50 \mu\text{L}$  不同浓度的重组蛋白, 培养  $72 \text{ h}$  后, 加入  $20 \mu\text{L}$  MTT 溶液, 继续培养  $4 \text{ h}$ , 弃上清, 加入  $150 \mu\text{L}$  DMSO, 振荡使结晶全部溶解, 在酶标仪上  $570 \text{ nm}$  处读取吸光度值  $A_{570}$ 。

## 2 结 果

### 2.1 原核表达载体 pET-K1-5 的构建

以含有 K1-5 基因的质粒 pUC57K1-5 为模板, PCR 扩增 K1-5 cDNA。将 K1-5 基因克隆入 pET30a (+) 中, 构建重组原核表达载体 pET-K1-5, 重组质粒经 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切鉴定, 获得  $1\ 462 \text{ bp}$

条带, 证明目的基因已经插入该载体中 (图 2)。

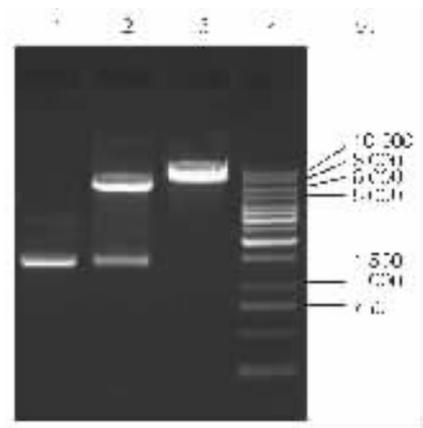


图 2 pET-K1-5 重组质粒的鉴定

1: pET-K1-5 重组质粒 PCR 扩增产物; 2: pET-K1-5 经 *Bam*H I / *Sac* I 双酶切; 3: pET-K1-5 经 *Bam*H I 单酶切; 4: DNA 分子量标准 (Gene ruler 1 000 bp ladder)。

### Fig.2 Restriction enzyme analysis of the prokaryotic expression vector pET-K1-5

1: PCR product; 2: pET-K1-5 digested by *Bam*H I and *Sac* I ; 3: pET-K1-5 digested by *Bam*H I ; 4: DNA marker (Gene ruler 1000 bp ladder) .

### 2.2 重组 K1-5 在 *E. coli* BL21 中的表达和分离纯化

将鉴定正确的 pET-K1-5 质粒转化大肠杆菌表达菌株 BL21(DE3), 在  $0.8 \text{ mmol/L IPTG}$  的诱导下进行表达。重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳鉴定, 其分子量约为  $68 \text{ kD}$ , 与推测的蛋白大小相近, 所表达的蛋白约占总菌体蛋白分别为  $32\%$  (图 3)。重组蛋白主要以包涵体形式存在, 包涵体经过洗涤、溶解、Ni-spin 亲和柱层析纯化和复性等步骤后, 获得的重组 K1-5 蛋白的纯度约为  $96\%$  (图 3)。

### 2.3 重组 K1-5 的鉴定

用鼠抗人 angiostatin 的单克隆抗体进行免疫印迹检测 K1-5 在 *E. coli* BL21 中的表达, 结果显示, 在分子量为  $68 \text{ kD}$  处有一条带 (图 4)。K1-5 与氨基末端的 6-组氨酸标签作为融合蛋白进行诱导表达, 因此, 重组 K1-5 的分子量比 K1-5 的裂解片段略大。

### 2.4 重组 K1-5 的抗血管生成活性

将孵化  $6 \text{ d}$  的鸡胚去掉气室后, 以  $5 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$  的滤纸为载体, 加入体积为  $10 \mu\text{L}$  的  $10 \mu\text{g}$ 、 $15 \mu\text{g}$ 、 $20 \mu\text{g}$ 、 $25 \mu\text{g}$  不同浓度的重组 K1-5 于 CAM 上, 同时

以 10μL 的 PBS 为阴性对照, 每组 6 个鸡胚。继续孵育 48~72 h, 观察对 CAM 新生血管的影响。结果

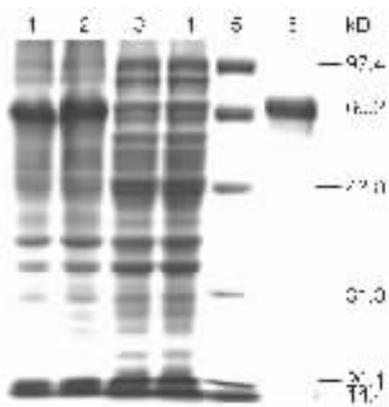


图 4 重组 K1-5 Western 杂交

1,2:原核表达的 K1-5。

Fig.4 Western blotting of human recombinant K1-5 from *E. coli* BL21

1 and 2: K1-5 from *E. coli* BL21.

图 3 pET-K1-5 在大肠杆菌 BL21 中的表达

1: pET-K1-5 诱导表达 3 h; 2: pET-K1-5 诱导表达 4 h; 3,4: pET-K1-5 诱导前;5:蛋白质分子量标准; 6: Ni-NTA spin column 纯化的 K1-5。

Fig.3 Expression and purification of human K1-5 in *E. coli* BL21

1 and 2: 3 h and 4 h after IPTG induction, respectively; 3 and 4: Before IPTG induction; 5: Protein molecular weigh marker;6: K1-5 by Ni-NTA purified by spin column.

表明,重组 K1-5 在 10 μg 和 15 μg 剂量下能明显抑制 CAM 新生血管的形成,20 μg 和 25 μg 剂量下能强烈抑制 CAM 新生血管的形成,而 PBS 阴性对照组 CAM 血管生长茂盛(图 5)。

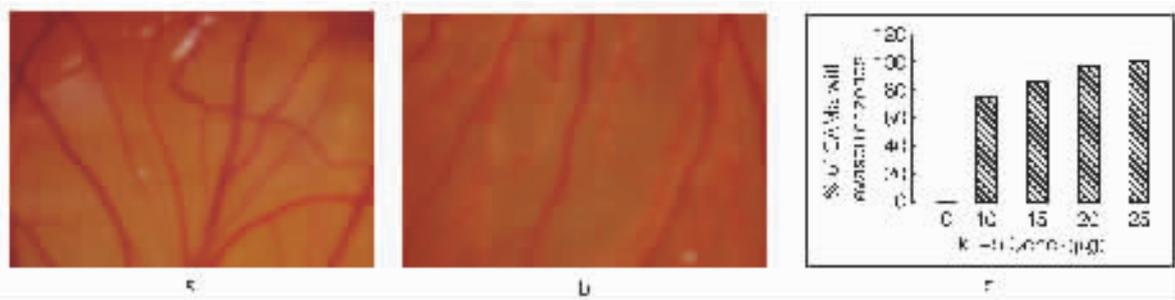


图 5 重组 K1-5 抑制 CAM 血管生成

a: PBS 对照;b: 20 μg 重组 K1-5/CAM;c:不同浓度重组 K1-5 的抑制率。

Fig.5 Inhibition of angiogenesis by K1-5 on the CAMs

a: Control CAM assay with filter paper soaked in PBS alone;b: CAM assay with filter paper containing 20 μg K1-5; c: The inhibition rate at different concentrations of K1-5, the data are shown as the percentage of CAM number with avascular zones. n = 6, n represents the CAM number of each tested group. P<0.005 compared with PBS alone.

### 2.5 重组 K1-5 对内皮细胞增殖的影响

将不同浓度的重组 K1-5 加入人脐静脉内皮细胞系 HUVEC、成纤维细胞系 NIH3T3、食管癌细胞系 Eca-109 和人肝癌细胞系 HepG2 中,MTT 比色分析法检测重组人纤溶酶原 Kringle1-5 对内皮细胞及非

内皮细胞增殖的影响,同时以 PBS 为阴性对照,每组 4 孔。结果表明,原核表达的重组人 K1-5 能特异地抑制内皮细胞的生长,而对非内皮细胞无抑制作用(图 6,图 7)。

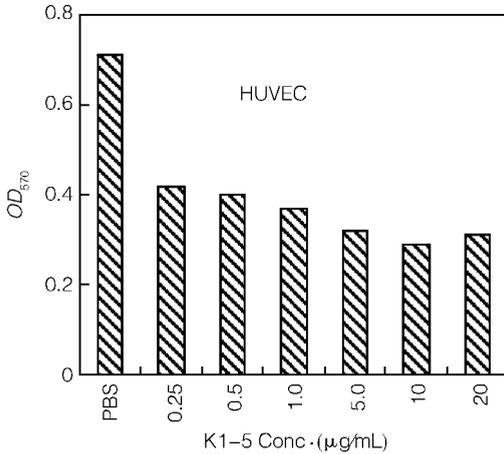


图6 重组 K1-5 对内皮细胞增殖的影响

Fig.6 Inhibitory effects of human recombinant K1-5 on the proliferation of endothelial cells

Values represent means of four determinations(N = 4) by MTT assay.

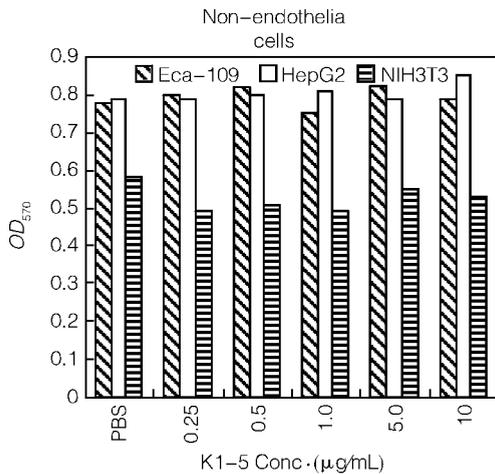


图7 重组 K1-5 对非内皮细胞增殖的影响

Fig.7 Effects of human recombinant K1-5 on the proliferation of non-endothelial cells

Values represent means of four determinations(N = 4) by MTT assay.

### 3 讨论

20 世纪 70 年代初期,美国哈佛大学医学院 Folkman 提出了控制肿瘤生长的新思路——抗血管生成(angiogenesis)。之后,内源性的抗肿瘤血管生成抑制因子 angiostatin<sup>[6]</sup>, endostatin<sup>[14]</sup>, res-tin<sup>[15,16]</sup>, canstatin<sup>[17,18]</sup> 和 tumstatin<sup>[19,20]</sup> 等相继被发现,为该思路的具体实施提供了可能性。在已知的内源性血管生成抑制因子中,约有 50% 是蛋白质降

解片段,它们的前提蛋白质不抑制新生的血管生成。与传统的化疗药物相比,内源性血管生成抑制因子具有高效、特异、不易产生耐药和毒副作用小等优点。K1-5 是人纤溶酶原的裂解片段,包含纤溶酶原的 5 个 Kringle 结构域。已经证明,裂解片段 K1-5 能明显抑制血管内皮细胞的增殖并诱导凋亡。同时在移植瘤模型的体内实验中显示出对多种实体瘤生长的显著抑制作用。

我们将 K1-5 基因按正确的阅读框架次级定向克隆至原核表达载体 pET30a(+) 中,与氨基末端的 6-组氨酸标签作为融合蛋白进行诱导表达,因此,重组 K1-5 的分子量比 K1-5 的裂解片段大。重组 K1-5 蛋白能在大肠杆菌 BL21 中稳定高效表达,表达量约占菌体总蛋白的 32%,以包涵体形式存在。此外,pET30a(+) 表达载体具有的 6-组氨酸标记物序列编码的 6-组氨酸融合尾比通常所用的标记物分子量小,免疫原性低,亲合性极好,便于分离纯化。包涵体经过洗涤、溶解、Ni-spin column 亲和柱层析以及蛋白质的重折叠复性等步骤纯化后,获得了纯度约为 96% 的重组 K1-5 蛋白。CAM 和 MTT 实验表明,原核表达的重组人 K1-5 能有效地按剂量依赖的方式抑制鸡胚新生血管的形成,并且特异地抑制内皮细胞的生长,而对非内皮细胞无抑制作用。原核表达的重组人 K1-5 体内的抑制肿瘤生长实验及其作用机制等研究正在进行中。

### 参考文献(References):

- [1] Folkman J. Angiogenesis inhibitors generated by tumors. *Mol Med*, 1995, 1:120~122.
- [2] Folkman J, D'Amore P A. Blood vessel formation. What is its molecular basis? *Cell*, 1996, 87:1153~1155.
- [3] Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 1996, 86:353~354.
- [4] Folkman J. Fighting cancer by attacking its blood supply. *Science*, 1996, 275:150~154.
- [5] Colorado P C, Torre A, Kamphaus G, Maeshima Y, Hopfer H, Takahashi K, Volk R. Anti-angiogenic cues from vascular basement membrane collagen. *Cancer Res*, 2000, 70:2520~2526.
- [6] O'Reilly M S, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal R A, Moses M, Lane W S, Chao Y, Sage E H, Folkman J. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*, 1994, 79:315~328.
- [7] O'Reilly M S, Holmgren L, Chen C. Angiostatin induces and sus-

- tains dormancy of human primary tumors in mice. *Nat Med*, 1996, 2:689~692.
- [8] Cao Y, Ji R W, Davidson D, Schaller J, Marti D, Sohndel S, McCance S G, O' Reilly M, Llinas M, Folkman J. Kringle domains of human angiostatin. Characterization of the anti-proliferative activity on endothelial cells. *J Biol Chem*, 1996, 271: 29461~29467.
- [9] Cao Y, Chen A, An S S, Ji R W, Davidson D, Llinas M. Kringle 5 of plasminogen is a novel inhibitor of endothelial cell growth. *J Biol Chem*, 1997, 272:22924~22928.
- [10] Cao R, Wu H L. Suppression of angiogenesis and tumor growth by the inhibitor K1-5 generated by plasmin-mediated proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96:5728~5733.
- [11] Li F, Yang J, He P, Ji S, Wang J, Han J. Human glioma cell BT325 expresses a proteinase that converts human plasminogen to kringle 1-5-containing fragments. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 278:821~825.
- [12] Percy F, Cao Y, Wu H, Feldman M, Paleolog E M. The angiogenesis inhibitor protease-activated kringle 1-5 reduces the severity of murine collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther*, 2003, 5:R32~R39.
- [13] HE Guo-An, LUO Jin-Xian, ZHANG Tian-Yuan, CHEN Hong, SUN Ci-Huang. Improved chick chorioallantoic membrane technique. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2003, 42(2):126~128.  
贺国安, 罗进贤, 张添元, 陈宏, 孙慈煌. 改进的鸡胚绒毛尿囊膜技术. *中山大学学报(自然科学版)*. 2003, 42(2):126~128.
- [14] O'Reilly M S, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasois G, Lane W S, Flynn E, Birkhead J R, Olsen B R, Folkman J. Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, 1997, 88:277~285.
- [15] Ramchandran R, Dhanabal M, Volk R, Waterman M J, Segal M, Lu H, Knebelmann B, Sukhatme V P. Antiangiogenic activity of restin, NCI domain of human collagen XV: Comparison to endostatin. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 255:735~739.
- [16] XU Ren, XIN Li, ZHANG Jin-Mei, LI Zai-Ping, GAN Ren-Bao. Restin expressed *in vivo* suppresses the growth of tumors in nude mice. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2002, 34(5):571~575.  
徐韧, 辛利, 张金梅, 李载平, 甘人宝. 体内表达的休眠蛋白抑制裸鼠肿瘤的生长. *生物化学与生物物理学报*, 2002, 34(5):571~575.
- [17] Kamphaus G D, Colorado P C, Panka D J, Hopfer H, Ramchandran R, Torre A, Maeshima Y, Mier J W, Sukhatme V P, Kalluri R. Canstatin, a novel matrix-derived inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J Biol Chem*, 2000, 275:1209~1215.
- [18] HOU Wei-Hong, YUAN Bao-Mei, WANG Tian-Yun, CHAI Yu-Rong, HOU Gui-Qin, WANG Jian-Min, XUE Le-Xun. Construction of prokaryotic expression vector for human canstatin and its expression. *J Zhengzhou Uni (Med Sci)*, 2004, 39(1):51~54.  
侯卫红, 袁保梅, 王天云, 柴玉荣, 侯桂琴, 王建民, 薛乐勋. 人血管生成抑制因子 canstatin 原核表达载体的构建及表达. *郑州大学学报(医学版)*, 2004, 39(1):51~54.
- [19] Maeshima Y, Sudhakar A, Lively J C, Ueki K, Kharbanda S, Kahn C R, Sonenberg N, Hynes R O, Kalluri R. Tumstatin, an endothelial cell-specific inhibitor of protein synthesis. *Science*, 2002, 295:140~143.
- [20] Maeshima Y, Colorado P C, Kalluri R. Two RGD-independent integrin binding sites on tumstatin regulate distinct anti-tumor properties. *J Biol Chem*, 2000, 275:23745~23750.

## 欢迎订阅《大豆科学》

《大豆科学》是由黑龙江省农科院主办的学术性期刊。国内外公开发刊,季刊,16开本,每期12万字左右。国内每期订价:10.00元,全年40.00元,邮发代号:14-95。国外每期订价:10.00美元(包括邮资),全年40美元。国外总发行由中国国际图书贸易总公司,北京399信箱。国外代号:Q5587。

《大豆科学》是中国自然科学核心期刊,农学农作物类中文核心期刊,中国科学引文数据库来源期刊,中国科技论文统计期刊源期刊。主要刊登有关大豆的遗传育种,品种资源,生理生态,耕作栽培,病、虫、杂草防治,营养施肥,生物技术及食品加工等方面的科研报告,学术论文,国内、外研究进展评述,研究简报,学术活动简讯、新品种介绍等。

《大豆科学》主要面向从事大豆科学研究的科技工作者,农业院校师生、国营农场及各级农业技术推广部门的技术人员。

本刊热忱欢迎广大科研单位及有关企业在我刊刊登广告,广告经营许可证号:2301004010071。

订阅办法:全国各地邮局,如在邮局漏订,可到编辑部补订。通过邮局汇款至哈尔滨市学府路368号《大豆科学》编辑部。邮政编码:150086。联系电话:0451-86668735。

网址:<http://ddkx.chinajournal.net.cn> E-mail:[dadoukx@sina.com](mailto:dadoukx@sina.com)