

对内皮细胞增殖的影响。rh Endostatin/MBP 不同片段的融合蛋白对经 bFGF 刺激引起的 BCE 细胞的快速增殖有不同程度的抑制作用。Endostatin 作用的活性片段位于 Endostatin 蛋白 N 端的第 55-96 氨基酸位置内。

关键词: Endostatin 血管生成 融合蛋白 内皮细胞 肿瘤

### 参 考 文 献

[1] Kandel J., Bossy-Wetzel E., Radvany F., et al., 1991, *Cell*, **66**, 1095-1104.

[2] O'Reilly M. S., Holmgren L., Shing Y., et al., 1994, *Cell*, **79**, 315-328.

[3] O'Reilly M. S., Boehm T., Shing Y., et al., 1997, *Cell*, **88**, 277-285.

[4] O'Reilly M. S., Holmgren L., Chen C., et al., 1996, *Nature med*, **2**, 689-692.

[5] 汪振诚, 刘新卷, 徐江英, 1998, 国外医学肿瘤学分册, **25**, 271-273.

[6] 徐根兴, 任敏东, 许琳, 1998, 《发明专利公告》, **14** (12): 45, CN//77005A.

[7] Ständker L., Schrader M., Kanse S. M., et al., 1997, *FEB Letters*, **420**, 129-133.

[8] Hohenester E., Sasaki T., Olsen BR., et al., 1998, *EMBO Journal*, **17**(6), 1656-1664.

## CONSTRUCTION OF RECOMBINANT HUMAN ENDOSTATIN/MBP FUSION PROTEIN AND ITS SEGMENTS AND THEIR INHIBITION ON ENDOTHELIA PROLIFERATION IN VITRO

LI Xi XU Gen Xing\* WANG Jian Jun

(Department of Biology, Nanjing University, 210093, Nanjing, PRC; \* Nanjing Military Medical College of the Second Military Medical University, 210049, Nanjing, PRC)

### ABSTRACT

In order to find the active segments of human endostatin gene, human endostatin gene were obtained by PCR technology from human liver cDNA library. Using restriction enzymes, five segments of endostatin were obtained and cloned to *E. coli* expression vector pMAL-c2. Recombinant vectors were transformed to *E. coli* DH<sub>5</sub> $\alpha$ . Six kinds of Endostatin/MBP fusion protein were purified by Amylose Resin beads, and were applied in experiments of inhibition of bovine adrenal capillary endothelial cell (BCE) proliferation in vitro. Each segment of Endostatin/MBP fusion protein can inhibit proliferation of the endothelial cell stimulated by bFGF in different level. The active segment of endostatin is located in the N terminal No. 55 to 96 amino acid.

Key words: Endostatin Angiogenesis Fusion protein Endothelial cell Tumor

## 肌动蛋白存在于车蝗精母细胞核和染色体中\*

赫 杰\*\* 孙野青

张传善 邢 苗

(哈尔滨工业大学生命科学与工程系 哈尔滨 150001) (东北师范大学遗传与细胞研究所 长春 130024)

肌动蛋白是一种重要的收缩蛋白。生化分析<sup>[1-5]</sup>(包括蛋白质电泳、亲和沉淀和免疫交叉反应等)和免疫细胞原位研究<sup>[6-14]</sup>(包括免疫荧光、免疫胶体金等)结果表明,肌动蛋白存在于真核生物有丝分裂细胞核和染色体中,并且有重要的功能。目前,关于减数分裂细胞核

和染色体中肌动蛋白的研究<sup>[2,5,9,15-18]</sup>主要是以动物卵母细胞为材料进行的,这方面的研究

本文 1999 年 10 月 20 日收到,2000 年 1 月 20 日接受。

\* 国家教委留学归国基金项目。

\*\* 通讯联系人。

报道还不多。确认肌动蛋白在减数分裂细胞核和染色体中的存在,对于进一步了解减数分裂过程中不同于有丝分裂的诸多变化(如同源染色体的联会、姊妹染色单体交换、分离等过程),具有重要的意义。本文以车蝗精母细胞为材料,以兔抗肌动蛋白抗体为探针,对减数分裂细胞核和染色体进行了识别肌动蛋白的免疫荧光实验。以期进一步证实肌动蛋白是减数分裂细胞核和染色体的组成成分。

## 材料与方 法

### 1. 实验材料

车蝗(*Oedaleus asiaticus*)雄性成虫:于8月末-9月中旬在吉林市左家采集。

### 2. 减数分裂细胞核和染色体载片标本的制备

取车蝗成体精巢于2.2%柠檬酸钠溶液中,游离出精细管,用45%醋酸压片在相差显微镜下检查,取分裂相多、染色体分散好的标本经液氮冰冻揭片后,放在4%多聚甲醛(0.01mol/L PB配制)中室温下固定10分钟,水洗后放于0.01mol/L PBS中备用。

### 3. 间接免疫荧光标记

标本用洗涤液(0.05% Triton X-100、0.25% 明胶、0.5mmol/L EDTA、0.01mol/L PBS)洗10min,抗体稀释液(0.3%小牛血清、0.005% Triton X-100、0.01mol/L PBS)封闭10min。抗肌动蛋白抗体(Sigma, No. 2668)用抗体稀释液按1:40的比例稀释。标本与稀释后的抗体室温下温育1h,然后4℃下过夜。取出标本后,用0.01mol/L PBS和洗涤液洗涤,再用抗体稀释液封闭10min。FITC偶联的抗IgG抗体用抗体稀释液按1:50的比例稀释,与标本37℃下温育1h。标本用0.01mol/L PBS和双蒸水洗数次,90%甘油封片,Nikon荧光显微镜观察并照相。对照组标本不与抗肌动蛋白抗体作用,而与抗体稀释液温育,其余各步骤均与实验组相同。从稀释二抗开始,各步骤均在暗处进行。

## 结 果

我们以兔抗肌动蛋白抗体为一抗,FITC偶联羊抗兔IgG为二抗进行了间接免疫荧光实验。结果显示,精母细胞游离的间期核呈圆形(图版图2和图3),发出明亮的黄绿色荧光。在有的核中存在着荧光强度较低的区域(图版

图2,箭头所示),该结构可能是核仁;但有的核中荧光强度较均匀(图版图3),存在此种差别的原因还不清楚。在游离核的周围存在一些散在的细胞质碎片,也发出明亮的黄绿色荧光。减数分裂I细线期时,荧光集中在纤维组成的网络结构(图版图4)或条索状结构(图版图5)上,纤维是正在集缩的细线期染色体。减数分裂I终变期时,荧光物质在染色体上呈较均匀的分布(图版图6),表现出典型的终变期染色体形态。减数分裂II中期时,整个染色体(包括着丝粒部位)为发出黄绿色荧光的棒状结构(图版图7),着丝粒与染色体的荧光融为一体,难以区分。对照组标本未用一抗标记,只与二抗作用,细胞核和染色体均无明亮荧光(图版图1)。上述原位观察的结果表明,本实验的免疫标记方法具有很强的特异性。在减数分裂过程,肌动蛋白存在于细胞核和染色体中。

## 讨 论

### 减数分裂细胞核和染色体中存在肌动蛋白

肌动蛋白是真核生物有丝分裂细胞核和染色体组成成分,已经得到广泛的承认<sup>[1-14]</sup>。研究者们为了进一步探讨肌动蛋白是否存在于减数分裂细胞核和染色体中进行一些实验<sup>[2,5,9,15-18]</sup>。Clark & Merriam<sup>[2]</sup>和Clark & Rosenbaum<sup>[15]</sup>的生化分析结果表明,两栖类卵母细胞核中有肌动蛋白存在。Rugger等<sup>[16]</sup>向爪蟾卵母细胞核内注射抗肌动蛋白抗体后,发现染色体集缩受到抑制,从而认为肌动蛋白存在于爪蟾卵母细胞核内,并参与染色体集缩过程。Scheer等<sup>[17]</sup>向蝶螈卵母细胞核内注射抗肌动蛋白抗体或肌动蛋白结合蛋白,引起灯刷染色体的侧环收缩,因此认为肌动蛋白存在于细胞核和灯刷染色体中,并参与转录过程。Gounon & Karsenti<sup>[5]</sup>采用间接免疫过氧化物酶法,电镜下观察到蝶螈卵母细胞核、核仁及灯刷染色体中都含有肌动蛋白。Parfenov等<sup>[9]</sup>应用免疫印迹和免疫胶体金电镜技术证明肌动蛋白存在于蛙卵母细胞核中,而且多聚集成束。

Funaki 等<sup>[18]</sup>指出在大鼠卵母细胞核中有肌动蛋白的存在,而且肌动蛋白在核仁中含量较高,在减数分裂 I 中期染色体中含量也较高。可以看出,尽管在实验材料、研究方法以及实验结果的若干细节上有所不同,但是前人的研究结果表明肌动蛋白存在于两栖类和大鼠的卵母细胞核和染色体中。本文以车蝗精母细胞为材料进行的免疫荧光实验,进一步证实肌动蛋白在减数分裂细胞核和染色体中的存在。

### 摘 要

以免抗肌动蛋白抗体为一抗, FITC 偶联的羊抗兔 IgG 抗体为二抗进行间接免疫荧光实验,观察到车蝗 (*Oedaleus asiaticus*) 精母细胞核及减数分裂 I 细线期、终变期、减数分裂 II 中期染色体上均发出明亮的黄绿色荧光,说明其中含有肌动蛋白。本文结果证明肌动蛋白是车蝗减数分裂细胞核和染色体的组成成分。

关键词:车蝗 减数分裂 肌动蛋白 精母细胞

### 参 考 文 献

- [1] Douvas, A. S., Harrington, C. A., Bonner, J., 1975, *Proc. Natl. Sci., USA*, **72**:3902-3906.
- [2] Clark, T. G., Merriam, R. W., 1977, *Cell*, **12**:883-891.
- [3] Jockusch, B. M., Becker, M., Hindennach, I., et al., 1974, *Exp. Cell Res.*, **89**:241-246.
- [4] LeStourgeon, W. M., Forer, A., Yang, Y. Z., et al., 1975, *Biochem. Biophys. Acta.*, **379**:529-552.
- [5] Gounon, P., Karsenti, E., 1981, *J. Cell Biol.*, **88**:410-421.
- [6] Armbruster, B. L., Wunderli, H., Turner, B. M., et al., 1983, *J. Histochem. Cytochem.*, **31**:1385-1393.
- [7] Milankov, K., de Boni, U., 1993, *Exp. Cell Res.*, **209**:189-199.
- [8] Amankwah, K. S., de Boni, U., 1994, *Exp. Cell Res.*, **210**:315-325.
- [9] Parfenov, V. N., Davis, D. S., Pochukalina, G. N., et al., 1995, *Exp. Cell Res.*, **217**:385-394.
- [10] Sauman, I., Berry, S. J., 1994, *Eur. J. Cell Biol.*, **64**:348-356.
- [11] 万里红, 邢苗, 1997, *植物学报*, **39**(8):685-690.
- [12] 曾宪录, 焦明大, 王晓光, 郝水, 1997, *植物学报*, **39**(8):691-696.
- [13] 李桂英, 邢苗, 1998, *植物学报*, **40**(6):493-499.
- [14] 陶伟, 何孟元等, 1998, *西北植物学报*, **18**(1):30-35.
- [15] Clark, T. G., Rosenbaum, J. L., 1979, *Cell*, **18**:1101-1108.
- [16] Rungger, D., Rungger-Brandle, E., Chaponnier, C., Gabbiani, G., 1979, *Nature*, **282**:320-321.
- [17] Scheer, U., Hinssen, H., Franke, W. W., Jockusch, B. M., 1984, *Cell*, **39**:111-122.
- [18] Funaki, K., Katsumoto, T., Iino, A., 1995, *Biol. Cell*, **84**:139-146.

## ACTIN IS IMMUNOLocalIZED IN MEIOTIC NUCLEI AND CHROMOSOMES OF *OEDALEUS ASIATICUS* \*

HE Jie\*\* SUN Ye Qing

(Department of biotechnology, Harbin institute of technology, Harbin 150001)

ZHANG Chuan Shan XING Miao

(Institute of Genetics and Cytology, Northeast Normal University, Changchun 130024)

### ABSTRACT

Spermatocytes of *O. asiaticus* were labeled with rabbit anti-actin antibody and FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody and observed with fluorescence microscopy. Both the meiotic nuclei and chromosomes in the leptotema, diakinesis of meiosis I and the metaphase of meiosis II sent forth distinctive yellow-green fluorescence, indicating the presence of actin in them. The above results showed that actin is a constituent of the meiotic nuclei and chromosomes of *O. asiaticus*.

Key words: *Oedaleus asiaticus* Meiosis Actin Spermatocyte