

山羊 *IGFBP-1* 基因的克隆及其 mRNA 丰度在多种组织中的发育性变化

李利^{1,2}, 李秋¹, 王林杰¹, 张红平^{1*}, 杜立新^{2*}

(1. 四川农业大学动物遗传育种研究所, 雅安 625014; 2. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193)

摘要: 本研究旨在探讨胰岛素样生长因子结合蛋白 1 (Insulin-like growth factor-binding protein 1, *IGFBP-1*) 基因在山羊出生后不同组织的发育性表达模式。在出生后 0、15、30、60、90 和 120 d 共屠宰 36 只南江黄羊羔羊(公、母羔羊各 18 只), 取心脏、肝脏、脾脏、肺脏、背最长肌、半膜肌、臂三头肌和股二头肌样品以抽提 RNA, 进行克隆及荧光定量 PCR 分析。山羊 *IGFBP-1* 基因的 ORF (Open reading frame) 长 792 bp, 共编码 263 个氨基酸, 其核苷酸和氨基酸序列相似性在反刍动物(牛、绵羊)之间远大于其它物种。羔羊肝脏 *IGFBP-1* mRNA 表达量最高 ($P < 0.01$); 肺脏、脾脏、心脏表达水平中等; 肌肉中最低且在 4 种肌肉间表达差异不显著 ($P > 0.05$)。出生后尤其是 60 d 内羔羊 *IGFBP-1* mRNA 丰度变化很大, 且明显呈现持续下降(肝脏)、先升后降(心脏)以及下降-上升-下降(脾脏、肺脏和肌肉)3 种模式的变化。结果提示, *IGFBP-1* 基因 CDS 区在物种间保守性较强, 肝脏是山羊合成 *IGFBP-1* mRNA 的主要部位, *IGFBP-1* 基因在出生后羔羊的早期生长中发挥着重要的作用且其 mRNA 发育性表达模式具有组织器官特异性。

关键词: 山羊; *IGFBP-1* 基因; 分子克隆; 实时荧光定量 RT-PCR; 表达

中图分类号: S827.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2011)07-0899-06

Molecular Cloning and mRNA Developmental Expression of *IGFBP-1* Gene in Goat Different Tissues

LI Li^{1,2}, LI Qiu¹, WANG Lin-jie¹, ZHANG Hong-ping^{1*}, DU Li-xin^{2*}

(1. Institute of Animal Genetics and Breeding, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China; 2. Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: The objective of the present study was to investigate the developmental expression patterns of insulin-like growth factor-binding protein 1 (*IGFBP-1*) gene in different tissues of post-natal goat. The samples of heart, liver, spleen, lung, *longissimus dorsi*, *semimembranosus*, *m. triceps brachii* and biceps muscle of thigh were collected from a total of 36 (18 males and 18 females, respectively) Nanjiang Mongolian Gazelle at the ages of 0, 15, 30, 60, 90 and 120 days after birth. The CDS and ontogeny mRNA levels of *IGFBP-1* were obtained and analyzed by real-time fluorescence quantitative RT-PCR. The size of *IGFBP-1* ORF was 792 bp encoding 263 amino acid residues, and displayed higher nucleotide/amino acid sequence identities in ruminants compared to others. The *IGFBP-1* mRNA levels in liver were most abundant ($P < 0.01$), medium in lung, spleen and heart, and the lowest in the muscles and had no significant difference among themselves ($P > 0.05$). In addition, three expression patterns of *IGFBP-1* mRNA during postnatal growth from birth to day 60 were found: consistent down-expression (liver), fluctuating expression as up-down (heart) or as down-up-down (spleen, lung and muscles). These re-

收稿日期: 2011-04-14

基金项目: 四川省教育厅重点项目(08ZA077); 四川省科技创新产业链示范工程项目(2011NZ0003)

作者简介: 李利 (1972-), 女, 重庆北碚人, 副教授, 博士, 主要从事羊的遗传育种与繁殖学研究, Tel: 0835-2886080, E-mail: lilyzh002@sohu.com

* 通讯作者: 张红平, 教授, E-mail: zhp@sicau.edu.cn; 杜立新, 教授, E-mail: lxdu@163.com

sults indicate that *IGFBP-1* gene is highly conservative among species, and liver is the main expression site of goat *IGFBP-1* mRNA and *IGFBP-1* play an important role in early growth of postnatal goat, and it is expressed in a developmental-tissue-dependent manner.

Key words: goat; *IGFBP-1* gene; molecular cloning; real-time fluorescence quantitative RT-PCR; expression

IGFBP-1 (Insulin-like growth factor-binding protein 1) 是 20 世纪 80 年代发现的人体内重要的内分泌激素之一, 由肝脏、子宫、肾脏等组织器官分泌, 对分泌细胞本身、邻近的组织细胞或通过血液循环对远处靶器官产生作用。IGFBP-1 主要通过运输和调节 IGF-I (Insulin-like growth factor I) 与受体结合而参与生长、发育、生殖及血糖等生理过程, 同时它还有独立于 IGF-I 之外的生物学作用^[1-2]。在低氧或饥饿、营养不良、糖尿病等不利条件下, 哺乳动物外周和肝脏中 *IGFBP-1* mRNA 水平显著增加^[3]。IGFBP-1 能抑制依靠于 IGF-I 的细胞生长和分化^[1], 而且 *IGFBP-1* 基因过表达鼠的出生体质量下降^[4], 具体机制可能是高水平的 *IGFBP-1* 使生物池中可用的 IGF-I 的量减少所导致^[5]。

1988 年人们第一次报道人的 *IGFBP-1* 全长 cDNA 大约为 5 kb, 包括 4 个外显子和 3 个内含子^[6]。目前已有鼠、牛、斑马鱼等多达 70 个物种 *IGFBP-1* 基因的克隆、表达调控或蛋白的相关研究, 但 *IGFBP-1* 基因的功能尚未完全清楚。鉴于 *IGFBP-1* 在动物的生长发育中具有重要作用, 而且山羊上未见这个基因序列及表达的相关报道, 本研究以我国著名的肉用山羊——南江黄羊作为试验材料, 克隆 *IGFBP-1* 基因 CDS 区序列, 并采用实时荧光定量方法检测该基因在出生后 6 个时期内脏和肌肉共 8 个组织的表达量, 探讨 *IGFBP-1* 基因的发育性表达模式, 为进一步研究该基因对山羊尤其是肉用山羊的生长发育调控机制提供理论依据。

表 1 基因的引物序列

Table 1 Information of primer sequence for the genes tested

| 序号 No. | 基因 Gene | 引物序列(5'-3') Primer sequence | 产物大小/bp Product size | 退火温度/°C Tm |
|--------|----------------|-------------------------------|----------------------|------------|
| 1 | <i>IGFBP-1</i> | FW: TGGCGATGCCCGAAGTCCT | 807 | 58.0 |
| | | RV: GCATCTGTTTTTCAGTTCTGTAAAG | | |
| 2 | <i>IGFBP-1</i> | FW: CACTTGATGACCGAGTCCAC | 129 | 61.9 |
| | | RV: TG TAGAGTTCTCGCTGGCAG | | |
| 3 | <i>GAPDH</i> | FW: TTGTGATGGGCGTGAAC | 127 | 55.0 |
| | | RV: CCCTCCACGATGCCAAA | | |

1 材料与方法

1.1 试验材料

利用同期发情和人工授精处理健康的南江黄羊 2~3 岁母羊 (源自南江黄羊原种场), 根据不同生理阶段的营养需求特点, 所有母羊及羔羊在相同的条件下饲养管理。在出生后 0、15、30、60、90 和 120 d 等 6 个时间点共屠宰 36 只羔羊 (每个阶段公、母羔羊各 3 只), 迅速取 8 个组织 (心脏、肝脏、脾脏、肺脏、背最长肌、半膜肌、臀三头肌和股二头肌) 样品各 100 mg 左右, 速冻于液氮中带回试验室, 放置于 -80 °C 冰箱中保存备用。

1.2 RNA 的提取及逆转录

将冻存的组织样迅速研磨成粉, 按照上海生工 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒 (UNIQ-10 柱式) 说明抽提总 RNA, 然后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。将所得 RNA 利用 ReverTra Ace qPCR RT Kit 反转录试剂盒 (TOYOBO 公司) 按说明进行反转录, 合成的 cDNA 于 -20 °C 保存备用。

1.3 引物设计

首先根据绵羊 (*Ovis aries*, NM_001145177) 和普通牛 (*Bos Taurus*, NM_174554) *IGFBP-1* 基因序列设计引物进行克隆测序, 然后以获得的 *IGFBP-1* 基因序列为模板设计引物进行基因表达分析, 选用 *GAPDH* 作为看家基因。采用 Primer 5.0 进行引物设计, Oligo 6.0 和 Blast 用于验证引物及其物种的特异性。引物序列由大连宝生物公司合成。本试验设计的引物详见表 1。

1.4 克隆测序

以初生羔羊的第一条 cDNA 链为模板进行 PCR 扩增。在 50 μL 总反应体系中包含: $2\times$ Master Mix *Taq* 酶 25 μL , cDNA (≤ 1 ng) 4 μL , 上、下游引物(引物 1 为 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 各 2 μL , ddH₂O 17 μL 。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 循环 35 次; 然后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min; 16 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

PCR 产物采用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒(上海生工)纯化后与 pTA2 载体连接。挑取单个阳性菌落, 接种于含有 Amp 的 1.5 mL LB 培养液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养过夜, 然后据菌液 PCR 检测结果, 吸取含有目的条带的菌液 1 mL, 送往 Invitrogen 公司(上海)完成测序。

1.5 实时荧光定量 PCR

在 25 μL 扩增体系中包含: $2.5\times$ RealMaster Mix/20 \times SYBR solution 11.5 μL , 上、下游引物(引物 2 或 3 为 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 各 1 μL , cDNA 模板 2 μL , RNase-free H₂O 9.5 μL 。PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; 然后 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 引物特异 Tm 15 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 循环 40 次。熔解曲线分析: 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 然后以 0.5 $^{\circ}\text{C}/10$ s 的速率从 55 $^{\circ}\text{C}$ 缓慢递增至 95 $^{\circ}\text{C}$ 。反应在 Bio-Rad IQTM 5 荧光定量 PCR 仪上进行, 每次每一板上设置标准品、未知样品(各重复 3 次)和 1 个阴性对照。

1.6 统计分析

序列测定结果首先利用 BioEdit 校对, 然后采用 Blast 和 Clustal W 进行序列的相似性分析并确定编码序列。

基因的 mRNA 表达定量采用相对定量解析法, 根据 IQTM 5 Multi color Real-Time PCR Detection System(Bio-Rad)分析软件计算拷贝数, 以目的基因 mRNA 的拷贝数与内参基因 mRNA 的拷贝数的比值表示基因 mRNA 的相对表达量。运用 SAS V. 9. 1. 3 的 GLM 过程进行最小二乘分析, Duncan 法进行多重比较。

2 结果

2.1 *IGFBP-1* 基因 CDS 区序列分析

所测南江黄羊 *IGFBP-1* 基因的 cDNA 序列长度为 807 bp, 其开放阅读框(ORF)长 792 bp(6~797 bp), 有起始密码子 ATG 和终止密码子 TAG。A、G、C 和 T 4 种碱基分别占 21.2%、30.0%、29.7%

和 19.1%(图 1)。山羊 *IGFBP-1* 基因 CDS 区与绵羊和牛的序列相似性分别达到 99% 和 98%, 远大于马(81%)、猕猴(78%)和鼠(81%)等非反刍动物。

根据获得的 CDS 序列, 预测 *IGFBP-1* 基因开放阅读框共编码 263 个氨基酸, 由 16 种氨基酸组成, 其中 Leu(31 次)出现次数最多, 其次是 Ala(25 次)和 Pro(23 次), 而 Met(4 次)和 His(3 次)出现最少(图 1)。N 端含有 12 个半胱氨酸 C(Cys) 以及 1 个 GCGCCxxC (Gly-Cys-Gly-Cys-Cys-x-x-Cys) 基序, C 端含有 6 个保守的 C(Cys), 另外还有 QC (Gln-Cys)、CWCV (Cys,-Try-Cys-Val)、RGD (Arg-Gly-Asp) 和 Y(Tyr)/F(Phe) 保守残基。与物种间核苷酸序列的相似性结果类似, *IGFBP-1* 氨基酸序列相似性在山羊与马、小鼠、人、家犬、猕猴、原鸡等物种间分别为 78%、71%、69%、67%、71% 和 56%, 远低于绵羊(99%)和牛(98%)。

2.2 *IGFBP-1* 基因表达

2.2.1 *IGFBP-1* mRNA 水平的性别差异

除了 0 d 的脾脏和半膜肌, 15 d 时肝脏以及 30 d 时心脏、臂三头肌中的 *IGFBP-1* 基因 mRNA 表达量在公母羔羊之间存在显著性差异($P < 0.05$) 以外, 其余各时间点组织中基因表达量在性别之间差异均不显著($P > 0.05$)。总的来看, 在 0 d 公羔各组织 mRNA 丰度大于母羔(除脾脏外), 30 d 时则相反(除肝脏和臀股二头肌)。

2.2.2 *IGFBP-1* mRNA 表达的组织差异

在出生后各阶段, *IGFBP-1* 基因表达量基本上呈现肝脏最高, 其次是肺、脾、心脏 3 个内脏组织, 肌肉组织的表达量最低(图 2)。在肝脏中的表达总是极显著高于其他组织($P < 0.01$), 肺在 0、30、60 d 3 个阶段中的表达量均显著或极显著高于肌肉组织, 但与心脏的表达差异只在 0、60 d 时显著($P < 0.05$), 同时, 出生后 0 d 时脾脏以及出生后 30 d 心脏表达量显著的高于肌肉组织的表达量($P < 0.05$)。由于在各阶段肌肉组织间 *IGFBP-1* 基因 mRNA 表达量差异未达到显著水平($P > 0.05$), 因此在后续分析中利用 4 种肌肉中表达量的平均值。

2.2.3 *IGFBP-1* 基因表达的发育性变化

总的来看, 各组织(除心脏) *IGFBP-1* 基因 mRNA 表达丰度均在初生时较大, 随着羔羊年龄的增长而降低(图 2)。不同组织中的表达模式存在一定差异, 肝脏中 *IGFBP-1* 基因 mRNA 水平一直呈现缓慢下降; 心脏中表达量则逐渐上升, 到 30 d 时达到最大值

```

1      tggcgatgccccaagtcttctgtgtccgagcctggccgcttctgctatcgctggccgttcagctcggcgcg
      M P E V L A V R A W P L L L S L A V Q L G A
72    acggtcggcgctccccaacctggcgctgtgcgccttgctccgccgagaggctggcgctctgcccgccggtgccc
      T V G A P Q P W R C A P C S A E R I A L C P P V P
147   gcctcttgcgggaactaccgggtccgcgggctgcggctgctgcccgatgtgcgcctgcctctcggagctgca
      A S C P E L T R S A G C G C C P M C A L P L G A A
222   tgcggtgtggctactgctcgctgcgctcgcgggctcagctgccgcgccctcccggggagccgaggccctgcac
      C G V A T A R C A R G L S C R A L P G E P R P L H
297   gcctcaccgagggccaggcgctgcatgaccacgccagcagatgagggccacagatacaaaagacaccaccagc
      A L T R G Q G A C M T T P S D E A T D T K D T T S
372   ccagagaatgtgtcccggagagctcagagataactcaggagcagcttcttgacaatttcacttgatgaccgag
      P E N V S P E S S E I T Q E Q L L D N F H L M T E
447   tcagtgaggacctgccatcctctggaatgccatcagtaattatgagagcttgaaggctcttgagatcagtgac
      S S E D L P I L W N A I S N Y E S L K A L E I S D
522   gtcaagaagtgaaggagccctgccagcgagaactctacaagtgttgacagattagccagggaacagcagaag
      V K K W K E P C Q R E L Y K V L D R L A R E Q Q K
597   gcaggagacaaactttataaattttatctgccaaactgcaacaagaatggattctatcacgcaaacagtgtgag
      A G D K L Y K F Y L P N C N K N G F Y H S K Q C E
672   acgtcgctggaggagagcctgggctctgttggtgtgtctacccttgagtgaggagagatcttggggtctgtg
      T S L E G E P G L C W C V Y P W S G K R I L G S V
747   gccatcagaggggacccccaatgccaacaglattttaacttacagaactgaaaacagatgc 807
      A I R G D P Q C Q Q Y F N L Q N *
    
```

加下划线部分为基序
Motifs are underlined

图 1 山羊 *IGFBP-1* 基因的核苷酸序列以及推断出的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequence of the goat *IGFBP-1*

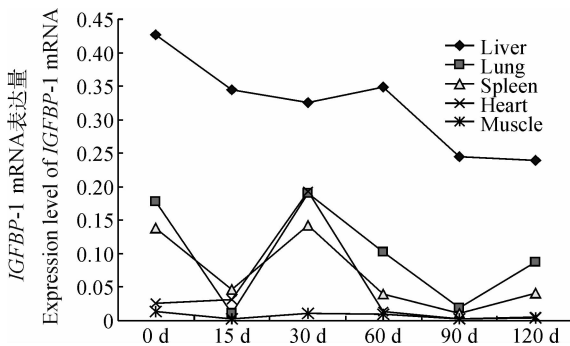


图 2 山羊 *IGFBP-1* 基因 mRNA 在各组织不同发育时期的表达丰度

Fig. 2 mRNA abundance of *IGFBP-1* in different tissues and stages of postnatal goat

(是初生的 7.4 倍), 然后一直处于下降状态。脾脏、肺脏和肌肉的 *IGFBP-1* mRNA 丰度呈现相似的规律即下降-上升-下降的波动变化。羔羊肺脏中 *IGFBP-1* mRNA 表达水平从出生到 30 d 期间经历了巨大的变化(出生后 15 d 内下降 16.4 倍, 15 到 30 d

期间上升 17.6 倍)。与 15 d 时相比, 羔羊在 30 d 时脾脏或肌肉的 *IGFBP-1* mRNA 水平分别上升了 3 倍, 到 60 d 肌肉组织中未改变而脾脏的表达丰度则回到 15 d 水平。其后各组织 *IGFBP-1* mRNA 水平处于下降状态, 在 90 与 120 d 期间除肝脏外其余组织开始缓慢上升, 其中脾脏和肺脏的上升幅度较大, 分别达到 3.7 和 4.5 倍。

3 讨论

3.1 *IGFBP-1* 基因具有很强的保守性

本试验克隆测定的山羊 *IGFBP-1* 核苷酸序列及其预测的氨基酸序列与其它物种比对, 序列相似性在 56%(鸡)以上。IGFBP-1 蛋白的 N 端和 C 端分别含有 12 和 6 个半胱氨酸残基, 这在其他物种甚至 IGFBP 家族中是非常保守的。保守的富半胱氨酸区段是与 IGF 最佳结合必需的^[7]。同时, 预测的氨基酸序列也存在和 IGFBPs 与 IGF1/2 具有高亲和力和有关的 IGFBP 家族 N 端和 C 端保守氨基酸残

基。虽然 Vivian 等提出 GCGCC_{xx}C 基序在 IGFBPs 中高度保守但并不只存在于这个家族中,而且其功能也有待进一步研究证实^[8]。同时,IGFBP-1 C 端包含的 RGD 序列可以与 $\alpha_5\beta_1$ 整合蛋白结合而影响细胞的黏附和转移,说明了 IGFBP-1 具有独立于 IGF 的作用^[9-10]。这些分析结果证实了克隆测定的 cDNA 序列为山羊 *IGFBP-1* 基因,物种间的高度保守性同时也说明 *IGFBP-1* 基因具有重要的生物学功能。

3.2 山羊 *IGFBP-1* mRNA 表达水平具有明显的组织特异性

在哺乳动物中的研究表明,*IGFBP-1* 基因的表达具有组织特异性,肝脏是合成 *IGFBP-1* 的主要器官^[7,11],而肾脏、卵巢中具有中等表达量^[7],本试验阶段山羊各组织中 *IGFBP-1* 基因 mRNA 表达量也呈现相似的规律,即肝脏高表达,心脏、肺脏、脾脏中等表达而肌肉低表达,这也与在绵羊中的研究结果^[12]相符。

在本试验中还发现南江黄羊 4 种肌肉组织中均检测到 *IGFBP-1* 基因 mRNA 表达,虽然丰度很低。作为唯一一个能够准确调节 IGF-I 生物利用度 (Bioavailability) 的调节子 (Regulator)^[13],*IGFBP-1* 通过抑制 IGF 结合到细胞表面的受体从而抑制 IGF 介导的有丝分裂 DNA 合成作用^[9]和细胞代谢活动^[7]。IGFs 具有刺激成肌细胞增殖和分化的双重功能,在没有血清的环境中,IGFs 的作用主要由成肌细胞分泌的 IGFBPs 蛋白进行调控。如具有抑制作用的 *IGFBP-4* 和 *IGFBP-6* 由 L6A1 型成肌细胞分泌和表达,而在细胞分化过程中 *IGFBP-5* 的表达会急剧增加,其他成肌细胞也分泌 *IGFBP-2*^[14]。而且肌肉生长抑制素可能在细胞水平上间接通过 IGF 轴的系统作用来抑制横纹肌生长^[15]。Shimasaki 等提出大鼠和人肌肉组织中以 *IGFBP-3* 和 *IGFBP-5* 为主,没有 *IGFBP-1*^[16],而且斑马鱼在孵化后不久以及成年阶段除肝脏以外的组织没有 *IGFBP-1* mRNA 表达^[17]。鉴于 *IGFBP-1* 与 IGF 轴的密切关系,在绵羊^[12]、山羊(本试验)肌肉组织中检测到 *IGFBP-1* mRNA 表达应该是正常现象,但是山羊这几种肌肉组织中 *IGFBP-1* 的蛋白水平及其功能仍有待进一步研究。

3.2 山羊出生后组织 *IGFBP-1* mRNA 的发育性表达丰度具有波动性

从山羊 *IGFBP-1* mRNA 表达的发育性变化来

看,所研究的 8 个组织具有 3 种表达模式。本研究发现山羊肝脏 *IGFBP-1* mRNA 含量在初生时最高,随着日龄增加而减少,与在猪中的研究结果一致^[18]。绵羊^[12]和山羊肌肉组织 *IGFBP-1* mRNA 水平,虽然在具体升降的时间点存在差异但均呈现波动变化。在山羊早期生长阶段心脏 *IGFBP-1* mRNA 水平具有独特的表达模式。Lee 等认为 *IGFBP-1* 基因的组织表达特异性模式可能与肝脏核因子 1 (Hepatic nuclear factor 1, HNF1) 蛋白激发的 *IGFBP-1* 转录不同有关^[7]。

本研究还发现,除肝脏外的组织 *IGFBP-1* mRNA 含量在羔羊 2 月龄内处于剧烈的波动状态,而且部分组织的性别差异也主要在这个时间段发生。*IGFBP-1* 是其家族中代谢反应最灵敏的,如饥饿、营养不良以及糖尿病等可导致成年哺乳动物外周和心脏 *IGFBP-1* mRNA 水平显著升高^[7],而且在不同条件下,影响 *IGFBP-1* 表达的因素有差异^[19]。不同组织 *IGFBP-1* 的表达水平不但与繁殖^[20]以及发育相联系^[21],还与代谢综合征有关^[22-23]。由于试验羔羊在整个处理期内自由采食且没有疾病等外在因素的影响,说明在山羊 2 月龄内的正常生长中 *IGFBP-1* 基因发挥着重要的作用,而且作用模式存在细微的性别差异,但具体作用机制仍不明确。

4 结 论

本研究成功克隆出山羊 *IGFBP-1* 基因 ORF 区序列,该序列全长 792 bp,编码 263 个氨基酸。肝脏是山羊合成 *IGFBP-1* mRNA 的主要部位,*IGFBP-1* 在出生后羔羊的早期生长中发挥着重要的作用且其 mRNA 发育性表达模式具有组织器官特异性。

参考文献:

- [1] KELLEY K M, OH Y, GARGOSKY S E, et al. Insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs) and their regulatory dynamics [J]. *Cell Biol*, 1996, 28:619-637.
- [2] GOCKERMAN A, PREVETTE T, JONES J I. Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins inhibit the smooth muscle cell [J]. *J Endocrinol*, 1995, 136:4168-4173.
- [3] LEE P D, GIUDICE L C, CONOVER C A, et al. Insulin-like growth factor binding protein-1: recent findings and new directions [J]. *Proc Soc Exp Biol*

- Med, 1997, 216: 319-357.
- [4] RAJKUMAR K, DHEEN T, KRSEK M, et al. Impaired estrogen action in the uterus of insulin-like growth factor binding protein-1 transgenic mice [J]. *Endocrinology*, 1996, 137: 1258-1264.
- [5] SILHA J V, MURPHY L J. Insights from insulin-like growth factor binding protein transgenic mice [J]. *Endocrinology*, 2002, 143: 3711-3714.
- [6] LEE Y L, HINTZ R L, JAMES P M, et al. Insulin-like growth factor (IGF) binding protein complementary deoxyribonucleic acid from human HEP G2 hepatoma cells; predicted sequence suggests an IGF binding domain different from those of the IGF-I and IGF-II receptors [J]. *Mol Endocrinol*, 1988, 2: 404-411.
- [7] LEE P D, CONOVER C A, POWELL D R. Regulation and function of insulin-like growth factor-binding protein-1 [J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1993, 204(1): 4-29.
- [8] VIVIAN H, OH Y, ROSENFELD R G. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily [J]. *Endocr Rev*, 1999, 20: 761-787.
- [9] JAMES P L, JONES S B, BUSBY W H, et al. A highly conserved insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP-5) is expressed during myoblast differentiation [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268: 22305-22312.
- [10] 李有朝, 来茂德. 胰岛素样生长因子结合蛋白的结构与功能研究概况 [J]. *生物物理学报*, 2010, 26(5): 347-357.
- [11] BRISMAR K, FERNQVIST-FORBES E, WAHREN J, et al. Effect of insulin on the hepatic production of insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1), IGFBP-3, and IGF-I in insulin-dependent diabetes [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1994, 79: 872-878.
- [12] 周明亮. 绵羊 IGFBP 家族基因克隆和 IGF 系统基因的时空表达谱及 IGF-I 与体重性状的相关分析研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2009.
- [13] KAAAY D, DEAL C, KORT S, et al. Insulin-like growth factor-binding protein-1: serum levels, promoter polymorphism, and associations with components of the metabolic syndrome in short subjects born small for gestational age [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009, 94(4): 1386-1392.
- [14] FLORINI J R, EWTON D Z, COOLICAN S A. Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis [J]. *Endocrinol Rev*, 1996, 17(5): 481-517.
- [15] WILLIAMS N G, INTERLICHIA J P, JACKSON M F, et al. Endocrine actions of myostatin: systemic regulation of the IGF and IGF binding protein axis [J]. *J Endocrinol*, 2011, 152(1): 172-180.
- [16] SHIMASAKI S, LING N. Identification and molecular characterization of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP-1, -2, -3, -4, -5 and -6) [J]. *Progr Growth Factor Res*, 1991, 3(4): 243-266.
- [17] MAURES T J, DUAN C M. Structure, developmental expression, and physiological regulation of zebrafish IGF binding protein-1 [J]. *J Endocrinol*, 2002, 143: 2722-2731.
- [18] PENG M, PELLETIER G, PALIN M F, et al. Ontogeny of IGFs and IGFBPs mRNA levels and tissue concentrations in liver, kidney and skeletal muscle of pig [J]. *Growth Dev Aging*, 2000, 60(34): 171-187.
- [19] LIEW C F, WISE S D, YEO K P, et al. Insulin-Like growth factor binding protein-1 is independently affected by ethnicity, insulin sensitivity, and leptin in healthy, glucose-tolerant young men [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90(3): 1483-1488.
- [20] GAY E, SEURIN D, BABAJKO S, et al. Liver-specific expression of human insulin-like growth factor binding protein-1 in transgenic mice: repercussions on reproduction, ante- and perinatal mortality and postnatal growth [J]. *J Endocrinol*, 1997, 138(7): 2937-2947.
- [21] BUNN R C, KING W D, WINKLER M K, et al. Early developmental changes in IGF-I, IGF-II, IGF binding protein-1, and IGF binding protein-3 concentration in the cerebrospinal fluid of children [J]. *Pediatr Res*, 2005, 58(1): 89-93.
- [22] YEAP B B, CHUBB S A, KEN K Y, et al. IGF1 and its binding proteins 3 and 1 are differentially associated with metabolic syndrome in older men [J]. *Eur J Endocrinol*, 2010, 162: 249-257.
- [23] LEWITT M S, HILDING A, BRISMAR K, et al. IGF-binding protein 1 and abdominal obesity in the development of type 2 diabetes in women [J]. *Eur J Endocrinol*, 2010, 163: 233-242.