

黄颡鱼胰岛素样生长因子结合蛋白 1 基因的克隆及表达分析

梁宏伟^{1,2}, 李忠¹, 罗相忠¹, 邹桂伟^{1*}

(1.中国水产科学研究院长江水产研究所, 湖北 武汉 430223; 2.淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心, 湖北 武汉 430070)

摘要:为研究黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)胰岛素样生长因子结合蛋白 1 基因(*IGFBP1*)的特征,阐明 *IGFBP1* 基因在不同性别黄颡鱼组织中的表达特征和 *IGFBP1* 蛋白在雌、雄黄颡鱼肌肉中的表达差异,克隆 *IGFBP1* 基因的 cDNA 全长,并进行实时荧光定量 PCR 检测和 Western Blot 分析。结果表明:黄颡鱼 *IGFBP1* 基因 cDNA 全长为 1 259 bp,其开放阅读框长度为 714 bp,编码 237 个氨基酸,3 端和 5 端非翻译区分别为 407 bp 和 138 bp;黄颡鱼 *IGFBP1* 基因核苷酸序列与鲢形目斑点叉尾鲴的相似度(89%)较高,与鲢、鲤、鲫、草鱼和团头鲂等的差异较大;肝脏是黄颡鱼 *IGFBP1* 基因 mRNA 表达最丰富的组织,*IGFBP1* 基因在雄性个体心脏、肾脏、肌肉和肠组织中的表达量显著高于雌性的($P<0.05$);*IGFBP1* 蛋白在雌、雄黄颡鱼肌肉组织中都有表达,且在雄性个体中的表达量高于在雌性个体中的表达量。

关键词:黄颡鱼;胰岛素样生长因子结合蛋白 1 基因;心脏;肾脏;肌肉;肠

中图分类号: S917.4

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2017)03-0298-06

Expression and expression analysis of *IGFBP1* gene in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)

LIANG Hongwei^{1,2}, LI Zhong¹, LUO Xiangzhong¹, ZOU Guiwei^{1*}

(1.Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China; 2.Freshwater Aquaculture Collaborative Innovation Center of Hubei Province, Wuhan 430070, China)

Abstract: To analyze the characteristics of insulin-like growth factor-binding protein 1 (*IGFBP1*), and to reveal its expression pattern in different gender tissues and the expression difference of its protein between male and female muscles, the *IGFBP1* cDNA was cloned from the *Pelteobagrus fulvidraco*. The mRNA expression of *IGFBP1* was studied using florescent quantitative real-time PCR and the protein expression pattern of *IGFBP1* was detected using western blot method. The full-length of cDNA of *IGFBP1* is 1 259 bp which included a 138 bp complete 5' untranslated region (5' UTR), a 407 bp 3' UTR and a 714 bp open reading frame (ORF) region which encoded a 237 amino acid of peptides. The results indicated that nucleotide sequences of *IGFBP1* were obvious difference from other species (such as *Hypophthalmichthys molitrix*, *Cyprinus carpio*, *Carassius auratus*, *Ctenopharynodon idellus* and *Megalobrama amblycephala*, etc.) except for *Ictalurus punctatus*, which was identical to Siluriformes of *Pelteobagrus fulvidraco*. The highest abundance expression of *IGFBP1* transcript was detected in liver, and mRNA level of *IGFBP1* in heart, kidney, muscle and intestine from male was higher than that from female ($P<0.05$). The *IGFBP1* protein expression from male was higher than that from female. The results provided data support for further functional investigation on *IGFBP1* gene in *Pelteobagrus fulvidraco*.

Keywords: *Pelteobagrus fulvidraco*; *IGFBP1*; gender differences; heart; kidney; muscle; intestine

胰岛素样生长因子(Insulin-like growth factors, IGFs)包括 IGF、IGF 受体(IGFR)、IGF 结合蛋白(IGF binding proteins, IGFBPs)和 IGFBP 水解酶等,在动物生长发育过程中发挥着重要的调控作用^[1]。IGF

收稿日期: 2016-09-01

修回日期: 2017-04-20

基金项目: “十二·五”农村领域国家科技计划项目(2011AA100401); 水产种质资源平台项目(2016DKA30470)

作者简介: 梁宏伟(1978—), 男, 副研究员, 博士, 主要从事水产动物遗传育种研究, lianghw@yfi.ac.cn; *通信作者, 邹桂伟, 研究员, zougw@yfi.ac.cn

系统包括一系列的多功能细胞增殖调控因子, IGFBP 与 IGF 结合后抑制 IGF 与其受体结合, 发挥调控作用^[2]。IGFBP 还可以通过延长 IGF 半衰期来调节 IGFs 的生物活性^[2-3]。动物体内存在的 6 种 IGFbps^[3]虽然在结构上高度同源, 但其各自发挥的功能和组织表达结构^[4]不同。IGFBP1 与其他几种结合蛋白有着明显的差异, 它通过运输和调节 IGF 与受体结合而参与机体的生长、发育和生殖等生理过程^[5]。关于鱼类 *IGFBP1* 基因的功能研究越来越受到重视, 草鱼^[6]、鲢^[7]、建鲤^[8]和花鲈^[9]等的 *IGFBP1* 基因已被克隆和研究。

黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)在中国广泛分布, 由于具有肌间刺少、肉质细嫩、营养丰富、经济价值较高等优点, 已成为中国重要的淡水经济养殖鱼类之一。不同性别黄颡鱼表现出明显的生长差异, 雄性比雌性生长快, 同龄性成熟黄颡鱼雄性的个体明显大于雌性的, 具有明显的雄性偏倚性。脊椎动物个体的差异主要由生长速率决定的, 而生长速率又受到下丘脑—垂体—性腺轴及其他组织分泌的生长激素或类胰岛素生长因子的调控^[10]。鉴于 *IGFBP1* 基因参与鱼类的生长和发育, 笔者分析黄颡鱼 *IGFBP1* 基因的序列特点和表达特征, 并分析 IGFBP1 蛋白在雌、雄个体肌肉组织中的表达, 旨在为研究 *IGFBP1* 基因在黄颡鱼生长中的作用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

黄颡鱼采自中国水产科学研究院长江水产研究所试验场。随机选取 18 月龄健康无伤的雌、雄性个体各 10 尾, 雌性个体体质量为(50±5) g, 全长为(14±2) cm; 雄性个体的体质量为(70±8) g, 全长为(18±3) cm。将试验鱼用 MS-222 麻醉后, 迅速采集其鳃、肌肉、心脏、脑、肝脏、脾脏、胃和肠等组织置于液氮中冷冻保存。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成

用 Trizol Reagent(Introvigen)进行不同组织总 RNA 的提取。以总 RNA 为模板, 按照 RNA PCR Kit(AMV) Ver3.0 (TaKaRa)试剂盒的方法合成 cDNA 第一链, -20 °C 保存备用。

1.2.2 *IGFBP1* 基因的克隆

通过 Clustalx 对从 GenBank 获得的已有鱼类 *IGFBP1* 基因 mRNA 序列进行比对。用 Primer 5.0 软件设计保守区域引物(IGFBP1F/IGFBP1R)。引物信息见表 1。

表 1 黄颡鱼 *IGFBP1* 基因克隆及表达分析的引物

Table 1 Primers used for pattern analysis on *IGFBP1* gene clone and expression

引物	引物序列 (5'-3')	用途
IGFBP1F	ACACATCAAGCCMTTCGACCC	扩增 <i>IGFBP1</i> 基因保守区
IGFBP1R	GTGGTATGGTCATGCAGTGTCT	
IGFBP1-R5	CTCAAGGGCTCTCTGCAACTCCACATG	扩增 <i>IGFBP1</i> 基因 3'端和 5'端序列
IGFBP1-R3	AGTGCTGGTGTGTGACGTCGTGGAA	
IGFBP1-RT1	TCAGCACGAGTTGGAGGT	<i>IGFBP1</i> 基因实时荧光定量表达
IGFBP1-RT2	TTGTTTATCACAGTTAGGCAGA	
β -actin1	TGAGAGGTTTCAGGTGCCAG	内参 β -actin 实时荧光定量表达
β -actin2	TGTCAGCAATGCCAGGTAC	

以制备的 cDNA 第一链为模板进行 PCR 扩增。反应体系总体积为 50 μ L, 包括 1×Buffer 5 μ L, 10 μ mol/L 上、下游引物各 1 μ L, 10 μ mol/L 的 dNTPs 1 μ L, 5 U *Taq* DNA 聚合酶 0.3 μ L, 约 100 ng cDNA 模板。反应条件: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 1 min, 56 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 90 s, 共进行 32 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 并用 AxyPrep DNA 凝

胶回收试剂盒(Axygen)进行胶回收, 然后以 pMD-18T 为载体转化插入的大肠杆菌感受态细胞。将经鉴定为阳性的克隆送武汉擎科生物科技有限公司进行测序。基于获得的黄颡鱼 *IGFBP1* 基因的保守序列, 设计 3' RACE 和 5' RACE 特异性引物(表 1), 用 SMART RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒(Clontech)进行 3'末端和 5'末端的扩增, 并克隆测序。

黄颡鱼 *IGFBP1* 基因编码 237 个氨基酸, 由 20 种氨基酸组成, 其中亮氨酸(Leu)含量最高, 为 12.2%。蛋白质相对分子质量为 26 100, 等电点(pI)为 8.01。编码蛋白质信号肽序列的长度为 29 个氨基酸(AA), 切割位点位于 N 端 29 位 L(Leu)和 30 位 E(Glu)之间。蛋白质二级结构预测结果表明, 黄颡鱼 *IGFBP1* 基因编码的蛋白在 N 端和 C 端分别包含保守结构域 IGFBP 超家族(IGFBP superfamily)和超家族(TY superfamily)结构域。黄颡鱼 *IGFBP1* 编码氨基酸序列的同源性比对结果表明, 黄颡鱼与同为鲇形目的斑点叉尾鲴的相似性最高, 达 80%, 与草鱼和鲢的同源性为 59%, 与团头鲂和斑马鱼的同源性为 58%, 与其他鱼类的序列同源性也在 60%左

右。黄颡鱼 IGFBP-1 蛋白序列在不同鱼类中的差异较大。

2.2 黄颡鱼 *IGFBP1* 基因的进化分析

用黄颡鱼 *IGFBP1* 基因的氨基酸序列与 GenBank 中获得的其他 16 个物种的氨基酸序列构建 NJ 系统进化树(图 2)。结果显示, 17 个物种分为两大类群, 鱼类为单独一个类群, 与其进化地位一致, 黄颡鱼 *IGFBP1* 基因首先与同属鲇形目的斑点叉尾鲴聚为一支, 然后与鲤科的草鱼、鲢、团头鲂、鲫、鲤和斑马鱼聚为一支, 同属鲈形目的花鲈和黄金鲈聚在一起; 在另外一个大类群中, 人和小鼠聚为一支, 牛和猪聚为一支, 然后再与非洲爪蟾聚在一起。

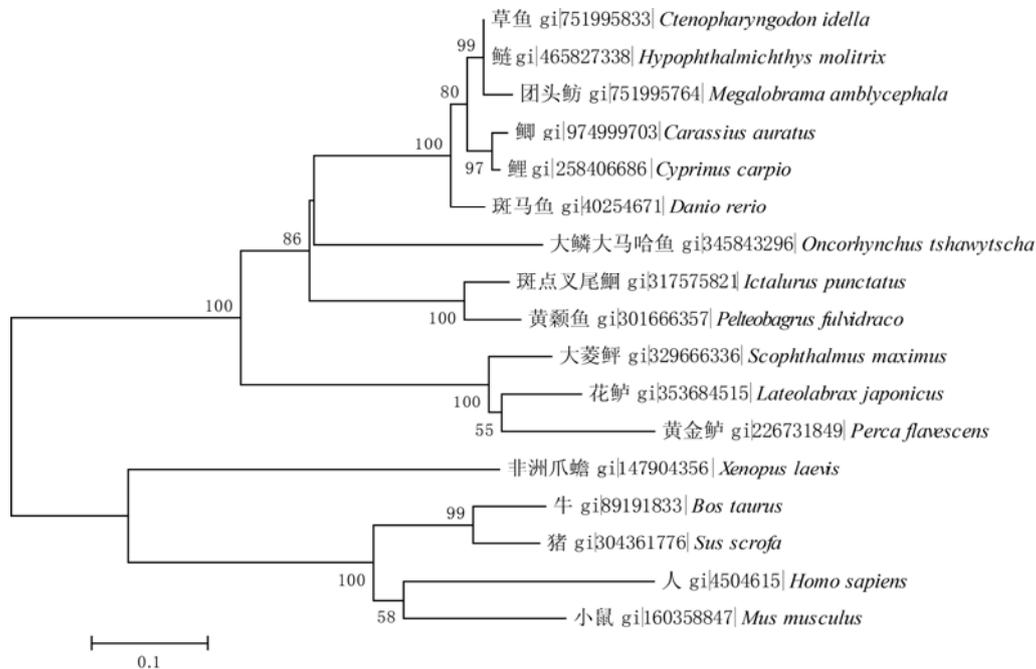


图 2 基于 *IGFBP1* 基因氨基酸序列的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree on different species based on *IGFBP1* AA sequences

2.3 黄颡鱼 *IGFBP1* 基因在雌、雄个体组织中的表达特征

实时荧光定量 PCR 分析结果(图 3)表明, 黄颡鱼 *IGFBP1* 基因 mRNA 在脑、鳃、心脏、肝脏、肾脏、胃、肠和肌肉组织中的表达量差异较大, 在肝脏组织的表达量最大, 其次是在肠道、肌肉和肾脏中的表达, 在心脏、脑和腮组织中的表达量相当。*IGFBP1* 基因在雌、雄黄颡鱼中的表达分析结果(图 3)表明, 雄性心脏、肾脏、肌肉和肠组织中的表达量显著高于雌性的($P < 0.05$), 而雌性鳃中的表达量显著大于雄性的($P < 0.05$); 在脑、肝脏和胃组织中

的表达雌、雄差异没统计学意义($P > 0.05$)。

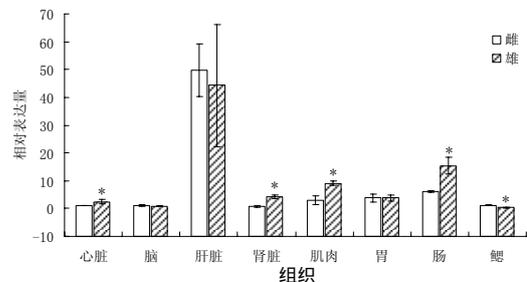


图 3 *IGFBP1* 基因 mRNA 在不同性别黄颡鱼组织中的表达

Fig.3 mRNA of *IGFBP1* expressed in different tissues and genders of *Pelteobagrus fulvidraco*

2.4 IGFBP1 蛋白在雌、雄黄颡鱼肌肉组织中的表达特征

以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)蛋白作为内参,检测 IGFBP1 蛋白在雌、雄黄颡鱼肌肉组织中的表达情况(图 4),结果表明,IGFBP1 蛋白在雌、雄黄颡鱼肌肉组织中均有表达,且在雄性中的表达高于在雌性中的。

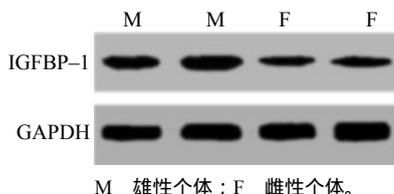


图 4 IGFBP1 在雌、雄黄颡鱼个体肌肉中的表达
Fig.4 Expression characterization of IGFBP1 in muscle of *Pelteobagrus fulvidraco*

3 结论与讨论

包括鱼类在内的脊椎动物的生长主要受胰岛素样生长因子(IGFs)信号通路的调控^[11]。IGFBP1 是 IGFs 通路中的一个重要组成蛋白。近年来,一些硬骨鱼类的 *IGFBP1* 基因全序列或部分序列被克隆和研究^[12-18]。本研究中成功克隆了黄颡鱼 *IGFBP1* 基因的 cDNA 全长序列,其核苷酸序列与同属鲇形目的斑点叉尾鲴的同源性较高,而与其他物种的同源性较低。*IGFBP1* 基因所编码的 AA 序列也呈现相似的特征,即在同目物种间相对保守,而与其他物种序列相比差异较大。

鱼类 *IGFBP1* 序列存在一些保守结构^[19]。在 IGFBP1 蛋白质结构中,N 端是与 IGF-1 结合的重要区域;中心区决定了 IGFBP 的特异性;C 端部分参与与 IGF-1 的结合,并与细胞粘附相关。IGFBP1 作为一个重要的结合蛋白,通过这些保守结构序列与其他蛋白结合,从而发挥 IGFBP1 的生物学作用。首先,动物 IGFBP1 氨基酸序列 N-端存在保守的 CGCCXXC 结构,该结构是 IGFBP1 与 IGFs 结合的重要序列结构^[20];其次,在 IGFBP1 的 C 端有一个 CWCV 保守区域结构,该结构在 LGFBPs 蛋白与 IGFs 以及与细胞外相关结构的结合中有重要作用^[9]。与其他物种的 IGFBP1 氨基酸结构相比,黄颡鱼的 N 端和 C 端同样存在这 2 种保守序列,其中黄颡鱼 IGFBP1 氨基酸序列 CGCCXXC 的结构为 CGCCLAC。此外,在多数物种 *IGFBP1* 基因的非编码区还含有 AT 富集区,存在多个 ATTTA 序列,

此序列可参与选择性的 mRNA 降解过程^[21]。花鲈 *IGFBP1* 序列包含 3 个 ATTTA 结构,1 个存在于 5' 端非翻译区,2 个存在于 3' 端非翻译区^[9]。黄颡鱼 *IGFBP1* 基因的 5' 端非翻译区有 2 个 ATTTA 序列,分别位于 90~94 nt 和 98~102 nt,3' 端非翻译区有 4 个 ATTTA 序列,分别位于 965~969、1 097~1 101、1 120~1 124、1 167~1 171 nt,表明黄颡鱼的 *IGFBP1* 更容易启动选择性的 mRNA 降解过程。

硬骨鱼肝脏是 IGFBP1 合成的主要场所^[22]。*IGFBP1* 基因在肝脏组织中的表达最丰富。在大菱鲆中,*IGFBP1* 基因在肝脏中的表达量最高,在脾脏中的表达量次之,而在心脏、胃、肾脏中的表达量较低,在肠中只有微量表达^[3]。*IGFBP1* mRNA 在花鲈肝脏中的表达量最高,在肌肉和脾脏中有较高表达,而在脑、垂体、肠、头肾中只有少量的表达,在其他组织中的表达量极少^[9]。本研究中,黄颡鱼 *IGFBP1* 基因在肝脏中的表达量最高,在肌肉、肾脏和肠中的表达量次之,在心脏、脑和鳃中的表达量较低。鱼类 *IGFBP1* 的 mRNA 除在肝脏中有丰富的表达外,在肌肉、肠和肾等组织中也有表达,但在不同物种间的表达特征不同。这可能与物种的生理状态、生活环境和生活习性等有关。黄颡鱼雄性个体的表达量高于雌性个体的。这与黄颡鱼雄性的生长比雌性快相一致。鱼类的生长受 GH/GHR/IGF 轴的调控^[23],IGFs 是生长轴中的关键因子。鱼类 IGFs 的基本功能是促生长。IGFBPs 家族成员与 IGFs 结合,调节 IGFs 的作用效率,并用其运送 IGFs 到靶组织,从而发挥 IGFs 的生物学效应^[24]。

本研究结果表明,*IGFBP1* 基因在雌、雄黄颡鱼不同组织中的表达存在差异,无论是 mRNA 还是蛋白的表达,在肌肉组织中的表达均是雄性高于雌性。这与雄性个体的生长快于雌性个体的研究结果相一致,因此,*IGFBP1* 基因可能与不同性别个体的生长调控有关。关于 *IGFBP1* 基因对黄颡鱼生长的调控作用还有待研究。

参考文献:

- [1] HAKUNO F, FUKUSHIMA T, YONEYAMA Y, et al. Novel functions of high-molecular-mass complexes containing insulin receptor substrates in mediation and modulation of insulin-like activities: emerging concept of diverse functions by IRS-associated proteins[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2015, 6: 73. DOI: 10.3389/fendo.2015.00073.
- [2] KIM M S, LEE D Y. Insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF binding proteins axis in diabetes mellitus[J].

- Annals of Pediatric Endocrinology & Metabolism ,2015 , 20(2) : 69–73 . DOI : 10.6065/apem.2015.20.2.69.
- [3] 胡健,温海深,关键,等.大菱鲂 2 种类型胰岛素样生长因子结合蛋白基因的克隆及其在成鱼和早期发育期中的表达[J].海洋学报(中文版),2012,34(5):139–146.
- [4] GUPTA M B . The role and regulation of IGFBP-1 phosphorylation in fetal growth restriction[J]. J Cell Commun Signal , 2015 , 9(2) : 111–123 . DOI : 10.1007/s12079-015-0266-x.
- [5] UWAIFO G I , Parikh S J , Keil M , et al . Comparison of insulin sensitivity , clearance , and secretion estimates using euglycemic and hyperglycemic clamps in children[J]. J Clin Endocrinol Metab , 2002 , 87(6) : 2899–2905 . DOI : 10.1210/jcem.87.6.8578.
- [6] 陶洋,邹曙明.草鱼胰岛素样生长因子结合蛋白 IGFBP-1 基因的全长 cDNA 克隆及表达[J].上海海洋大学学报,2011,20(1):15–21.
- [7] 丁为群,梁宏伟,邹桂伟,等.鲢 IGFBP-1 基因全长 cDNA 的克隆及表达分析[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2013,41(5):1–8.
- [8] 魏可鹏,俞菊华,李红霞,等.建鲤 IGFBP1 基因的克隆及与增重相关的 SNP 位点分析[J].华北农学报,2012,27(3):75–80 . DOI : 10.3969/j.issn.1000-7091.2012.03.015.
- [9] 钱焜,温海深,迟美丽,等.海产花鲈 IGFBP-1、2 基因的克隆及表达分析[J].中国海洋大学学报(自然科学版),2014,44(9):37–45.
- [10] MEI J , GUI J F . Genetic basis and biotechnological manipulation of sexual dimorphism and sex determination in fish[J]. Sci China Life Sci , 2015 , 58(2) : 124–136 . DOI : 10.1007/s11427-014-4797-9.
- [11] ZOU S , KAMEI H , MODI Z , et al . Zebrafish IGF genes : gene duplication , conservation and divergence , and novel roles in midline and notochord development[J]. PLoS ONE , 2009 , 4(9) : e7026 . DOI : 10.1371/journal.pone.0007026.
- [12] GRACEY A Y , TROLL J V , SOMERO G N . Hypoxia-induced gene expression profiling in the euryoxic fish *Gillichthys mirabilis*[J]. Proc Natl Acad Sci USA , 2001 , 98(4) : 1993–1998 . DOI : 10.1073/pnas.98.4.1993.
- [13] MAURES T J , DUAN C . Structure , developmental expression , and physiological regulation of zebrafish IGF binding protein-1[J]. Endocrinology , 2002 , 143(7) : 2722–2731 . DOI : 10.1210/endo.143.7.8905.
- [14] KAJIMURA S , AIDA K , DUAN C . Understanding hypoxia-induced gene expression in early development : *in vitro* and *in vivo* analysis of hypoxia-inducible factor 1-regulated zebra fish insulin-like growth factor binding protein 1 gene expression[J]. Mol Cell Biol , 2006 , 26(3) : 1142–1155 . DOI : 10.1128/MCB.26.3.1142-1155.2006.
- [15] KAMEI H , LU L , JIAO S , et al . Duplication and diversification of the hypoxia-inducible IGFBP-1 gene in zebrafish[J]. PLoS ONE , 2008 , 3(8) : e3091 . DOI : 10.1371/journal.pone.0003091.
- [16] RAHMAN M S , THOMAS P . Characterization of three IGFBP mRNAs in Atlantic croaker and their regulation during hypoxic stress : potential mechanisms of their upregulation by hypoxia[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab , 2011 , 301(4) : E637–E648 . DOI : 10.1152/ajpendo.00168.2011.
- [17] SUN C F , TAO Y , JIANG X Y , et al . IGF binding protein 1 is correlated with hypoxia-induced growth reduce and developmental defects in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) embryos[J]. Gen Comp Endocrinol , 2011 , 172(3) : 409–415 . DOI : 10.1016/j.ygcen.2011.04.005.
- [18] ZHAI W , ZHANG J , SHI Z , et al . Identification and expression analysis of IGFBP-1 gene from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Comp Biochem Physiol B , Biochem Mol Biol , 2012 , 161(4) : 413–420 . DOI : 10.1016/j.cbpb.2012.01.007.
- [19] CHEN W , ZHANG Z , DONG H , et al . Insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1) in goldfish , *Carassius auratus* : molecular cloning , tissue expression , and mRNA expression responses to periprandial changes and cadmium exposure[J]. Fish Physiol Biochem , 2016 , 42(3) : 1043–1052 . DOI : 10.1007/s10695-015-0195-x.
- [20] DUAN C . Specifying the cellular responses to IGF signals : roles of IGF-binding proteins[J]. J Endocrinol , 2002 , 175(1) : 41–54 . DOI : 10.1677/joe.0.1750041.
- [21] SHAW G , KAMEN R . A conserved A U sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation[J]. Cell , 1986 , 46(5) : 659–667 . DOI : 10.1016/0092-8674(86)90341-7.
- [22] PEDROSO F L , FUKADA H , MASUMOTO T . Molecular characterization , tissue distribution patterns and nutritional regulation of IGFBP-1 , -2 , -3 and -5 in yellowtail , *Seriola quinqueradiata*[J]. Gen Comp Endocrinol , 2009 , 161(3) : 344–353 . DOI : 10.1016/j.ygcen.2009.01.010.
- [23] REINECKE M . Influences of the environment on the endocrine and paracrine fish growth hormone-insulin-like growth factor-I system[J]. J Fish Biol , 2010 , 76(6) : 1233–1254 . DOI : 10.1111/j.1095-8649.2010.02605.x.
- [24] 杨慧荣,赵会宏,陈彦珍.胰岛素样生长因子 IGF 系统与鱼类性腺的研究进展[J].动物学杂志,2013,48(2):306–313.

责任编辑:王赛群

英文编辑:王 库