

鲤胰岛素样生长因子结合蛋白-2和-3基因 启动子克隆与序列分析

陈文波^{1,2}, 李文笙^{1*}, 林浩然^{1*}

(1. 中山大学有害生物控制与资源利用国家重点实验室,
水生经济动物研究所暨广东省水生经济动物良种繁育重点实验室, 广东 广州 510275;
2. 河南理工大学资源环境学院, 河南 焦作 454000)

摘要: 胰岛素样生长因子(insulin-like growth factors, IGFs)系统对鱼类的生长和繁殖有着重要的作用。利用PCR方法克隆获得了鲤胰岛素样生长因子结合蛋白(insulin-like growth factor binding protein, IGFBP)-2和-3基因的上游启动子部分序列,长度分别是1 142 bp和1 067 bp。*Igfbp-2*启动子区域没有TATA框和CAAT框。同时,*Igfbp-3*中只含有TATA框,但没有CAAT框。研究表明,二者启动子不具备典型的启动子特征,同时,在二者启动子上还发现了cAMP应答元件和肝细胞核因子结合位点,以及Pit-1、Oct-1、RXR和GR等结合位点。研究认为,鲤*Igfbp-2*和-3基因的表达受到潜在的多因子调控。

关键词: 鲤; 胰岛素样生长因子结合蛋白; 启动子; 序列分析

中图分类号: Q 785; S 917

文献标识码: A

胰岛素样生长因子结合蛋白(insulin-like growth factor binding proteins, IGFBPs)是胰岛素样生长因子(insulin-like growth factors, IGFs)系统的重要组成部分。在哺乳动物的循环系统和细胞外液中,大部分IGFs都高亲和地与IGFBPs家族成员结合,以免受降解并调节自身的生物学效应^[1-2]。目前,在哺乳动物和硬骨鱼类中,6个相互区别的IGFBPs已经被分离和克隆,分别命名为IGFBP-1到IGFBP-6,它们各自代表一个独立的基因产物^[1,3-5]。IGFBPs在结构上有很高的相似性,都含有相对保守的N端(含有12个半胱氨酸残基)、C端(含有6个半胱氨酸残基)结构域和变化较大的中间区域。IGFBPs与IGFs结合后,对IGFs的生物学效应既有增强作用又有抑制作用^[6-7]。

鲤(*Cyprinus carpio*)属于鲤形目(Cypriniformes),鲤科(Cyprinidae),鲤属(*Cyprinus*)。鲤几乎分布于北半球的所有淡水区域,特别是在我国、东南亚和非洲,其生长速度快,肉质细嫩肥美,

营养丰富,是淡水养殖鱼类中最常见的优良品种之一。因此,研究鲤的生长发育和繁殖调控机制对于提高鲤的养殖产量,获取更大的经济价值具有重要意义。截止到目前,我们已经克隆得到了鲤*Igfbp-2*和-3的基因,并对其表达模式进行了初步的探讨,结果显示其mRNA表达分布广泛但表达量存在很大的差异^[8]。如今,除了在模式动物斑马鱼(*Danio rerio*)中克隆得到了其*Igfbp-2*部分启动子序列外^[9],目前,还没有关于鱼类其它*Igfbps*启动子序列的报道。因此,本研究首先克隆了鲤*Igfbp-2*和-3基因的启动子序列,然后利用生物软件对其潜在的转录因子结合位点进行分析,以期了解潜在的基因表达调控机制,为进一步研究鲤的生长和繁殖机制提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用健康鲤,2龄,体重约800 g,购自广州

收稿日期:2010-05-08 修回日期:2010-08-01

资助项目:国家“九七三”重点基础研究计划(2004CB117402,2010CB126302);国家自然科学基金项目(30671626);广东省科技计划项目(2007B030300001)

通讯作者:李文笙,林浩然,E-mail:lsslws@mail.sysu.edu.cn

水产市场。冰上取其肝脏样品,液氮速冻,然后保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

1.2 药品与试剂

Universal GenomeWalker™ Kit 为 BD Biosciences 公司产品;基因组 DNA 提取试剂盒 E. Z. N. A® SQ tissue DNA Kit 为 Omega(USA)公司产品;限制性内切酶 *Dra* I、*Eco*RV 为 TOYOBO(Japan)公司产品, *Pvu* II、*Stu* I 为 TaKaRa(Japan)公司产品;胶回收试剂盒 E. Z. N. A® Gel Extraction Kit 和质粒提取试剂盒 E. Z. N. A® Plasmid Extraction Kit 为 Omega BioTek(USA)公司产品; Ins/Aclone™ PCR Product Cloning Kit 载体连接试剂盒和 *Taq* DNA Polymerase 购自 MBI Fermentas(USA)公司;其余为国产分析纯试剂。PCR 所用引物和 DNA 测序由上海英骏生物技术有限公司完成。

1.3 构建鲤 GenomeWalker 文库

基因组 DNA 提取 取 30 mg 鲤肝脏组织于 2.0 mL 灭菌的离心管内,加入 900 μL WTL Buffer 后用 1 mL 一次性注射器抽提混匀。然后加入 5 μL Protease K 溶液(20 mg/mL), $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 3 h,至肝组织完全消化,每隔半小时,旋转混匀一次。加入 20 μL RNase A(0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min。冷却至室温,加入 300 μL PCP Buffer,涡旋 30 s 混匀。冰上放置 20 min 后于室温下 $14\ 000\times g$ 离心 10 min。先用 900 μL 异丙醇沉淀,然后用 70% 酒精洗涤。空气中干燥大约 10 ~ 15 min 后,加入 50 μL ddH₂O, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 溶解

20 min 后, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置过夜。最后,稀释 100 倍后,紫外分光光度计测 OD 值,1% 琼脂糖凝胶电泳验证 DNA 质量, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

DNA 酶切和纯化 利用限制性内切酶 *Dra* I、*Eco*RV、*Pvu* II 和 *Stu* I 建立 4 个反应,分别酶切大约 3.5 μg 基因组 DNA。酶切完全后,用饱和苯酚和氯仿进行分层分离得到酶切后的 DNA,继而用冰溶的 95% 乙醇、3 mol/L 的 NaAc 和糖原沉淀 DNA。得到的 DNA 沉淀用 80% 乙醇洗涤两次。空气中干燥,双蒸水溶解后,1.5% 琼脂糖凝胶中电泳,测 OD 值, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

酶切产物加接头 分别用 4 种酶切产物建立以下反应体系:4 μL 10 \times Ligation Buffer, 1.25 μL Adaptor 1, 1.25 μL Adaptor 2, 1.25 μL T₄ DNA 连接酶,2 μg 酶切纯化 DNA,最后加水至终体积 20 μL 。 $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ 连接 3 h,然后 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min 失活连接酶。向每管加入 20 μL ddH₂O 进行稀释,低速涡旋 10 ~ 15 s, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.4 引物设计

用已获得的鲤 *Igfbp* -2 和 -3 cDNA 序列,与人和鼠等其它物种的 *Igfbps* 基因序列进行比对,预测鲤 *Igfbp* -2 和 -3 基因的外显子和内含子的大致位置,从而保证使扩增所用引物位于第一个外显子上。另外,引物设计的位置尽量使预计扩增得到的序列与之前克隆获得的 cDNA 序列大约有 100 bp 以上的重叠区域,以保证扩增得到的序列为所需要的序列,所用引物见表 1。

表 1 鲤 *Igfbp* -2 和 -3 基因启动子克隆所需引物
Tab.1 Primers for cloning of the promoters of common carp *Igfbp* -2 and -3 genes

引物 primers	引物序列 (5'-3') sequences(5'-3')
基因特异性引物 gene-specific primers	
ccBP2PR1	5' GGCTGGGATAACACCGCAGAC 3'
ccBP2PR2	5' GGGAAAAGTCACCAGTGCCAGC3'
ccBP3PR1	5' CTCGGTCAGCGGGCAAGTCAT 3'
ccBP3PR2	5' TACACTAAAGCCTGGGCTCTCA3'
基因组步移接头引物 genome walker adaptor primers	
AP1	5'GTAATACGACTCACTATAGGGC 3'
AP2	5'ACTATAGGGCACGCGTGGT 3'
Adaptor1	5'GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGTTCGACGGCCCGGCTGGT 3'
Adaptor2	5'H ₂ N-CCCACCA -PO ₄ 3'

1.5 鲤 *Igfbp* -2 和 -3 基因启动子的克隆

以基因组 DNA 酶切加尾后的产物为模板,

分别以 ccBP2PR1 和 ccBP3PR1 加上接头引物 AP1 为引物,进行第一轮 PCR 扩增,退火温度均

为 58 °C。然后以第一轮 PCR 扩增产物稀释 20 倍后作为第二轮 PCR 扩增的模板,分别以 ccBP2PR2 和 ccBP3PR2 加上接头引物 AP2 为引物,进行第二轮嵌套 PCR 扩增,退火温度分别为 58 °C 和 56 °C。

1.6 序列分析

通过 DNAssist 2.0 对启动子序列和 cDNA 序列重叠区域进行比对。同时,将所获得启动子序列经过网上启动子转录调控元件分析软件 TESS (<http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/teess/teess>) 以及其它在线分析软件进行分析,获得潜在的转录因子结合位点。

2 结果与分析

2.1 鲤基因组 DNA 的提取与酶切

分别用 1 μL 和 2 μL DNA 溶液进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,结果如图 1 所示。从图上可以看出,所得到的 DNA 大约位于 22 kb 处,条带较为清晰,整齐单一,没有出现拖尾和弥散现象,说明获得的基因组 DNA 质量较高,可以进行以下实验。核酸蛋白测定仪测得其 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.79,质量较纯。同时酶切结果显示基因组 DNA 被 4 种限制性内切酶完全酶切(图 2)。

2.2 鲤 *Igfbp-2* 基因启动子的克隆与序列分析

通过嵌套 PCR 方法,测序得到了 1 286 bp 的 *Igfbp-2* 序列,其中包含了之前克隆得到的 144 bp 的 cDNA 序列。通过对二者重叠区域的比较,结

果表明所扩增得到的片段确为鲤 *Igfbp-2* 的启动子序列(图 3)。

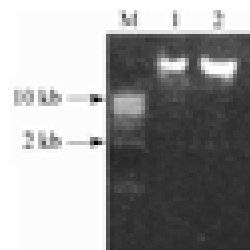


图 1 鲤基因组 DNA 电泳分析

M. 1 kb DNA 分子量标准; 1. 1 μL DNA 溶液; 2. 2 μL DNA 溶液。

Fig. 1 Agarose gel analysis of genomic DNA from the liver of common carp

M. 1 kb DNA ladder; 1. 1 μL DNA solution; 2. 2 μL DNA solution.

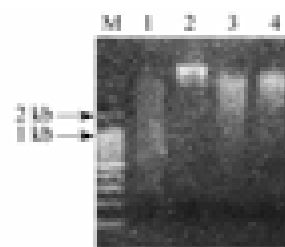


图 2 鲤基因组 DNA 酶切产物电泳分析

M. 100 bp plus DNA 分子量标准; 1. *Dra* I; 2. *Eco* R V; 3. *Pvu* II; 4. *Stu* I。

Fig. 2 Agarose gel analysis of genomic DNA digestion by restriction endonuclease

M. 100 bp plus DNA ladder; 1. *Dra* I; 2. *Eco* R V; 3. *Pvu* II; 4. *Stu* I.

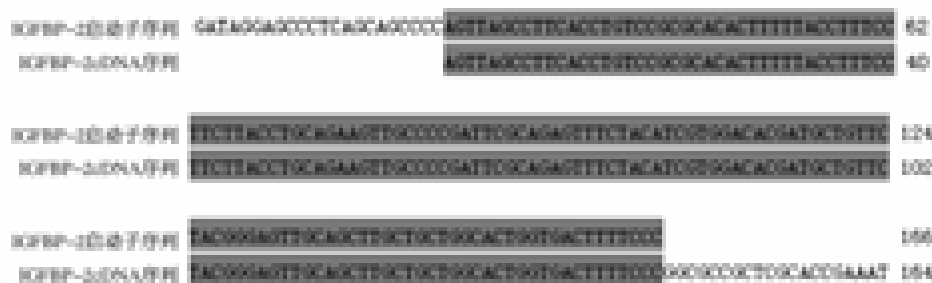


图 3 *Igfbp-2* 启动子与 cDNA 序列的比对

阴影表示重叠部分。

Fig. 3 Alignment of common carp *Igfbp-2* promoter and cDNA sequences

The overlap is in shade.

对 1 142 bp 的 *Igfbp-2* 启动子序列进行分析,结果显示,鲤 *Igfbp-2* 启动子没有 TATA 框和 CAAT 框的存在,不具备典型的启动子特征。但在此区域存在一个 SP1 结合位点和富含 G/C 的基簇。

在启动子下游区域存在 4 个潜在的 cAMP 应答元件——CREB。同时也存在 4 个肝细胞核因子 (hepatocyte nuclear factor, HNF) 的结合位点。另外,还存在着若干个 Pit-1、Oct-1、RXR 和 GR 的结合位

点(图4)。



图4 鲤 Igfbp-2 基因启动子序列及其分析

之前克隆所得到的 Igfbp-2 cDNA 序列用“□”表示;感兴趣的潜在转录因子结合位点均在序列中用下划线或阴影等标明。

Fig. 4 Nucleotide sequence and analysis of common carp Igfbp-2 promoter

The Igfbp-2 cDNA sequence cloned previously is denoted by □; Interested putative transcription binding sites are underlined or shaded.

2.3 鲤 Igfbp-3 基因启动子的克隆与序列分析
通过嵌套 PCR 方法,测序得到了 1 187 bp 的 Igfbp-3 序列,其中包含了之前克隆得到的

117 bp 的 cDNA 序列。通过对二者重叠区域的比较,结果表明所扩增得到的片段为鲤 Igfbp-3 的启动子序列(图 5)。



图5 Igfbp-3 启动子与 cDNA 序列的比对

阴影表示重叠部分。

Fig. 5 Alignment of common carp Igfbp-3 promoter and cDNA sequences

The overlap is in shade.

对 1 067 bp 的 *Igfbp-3* 启动子序列进行分析,结果显示,距离转录起始位点 22 bp 处存在一个 TATA 框。但是在其上游并没有发现 CAAT 框的存在,取而代之的是一个 SP1 结合位点(图 6)。与鲤 *Igfbp-2* 启动子一样,*Igfbp-3* 启动子上也发现 4 个肝细胞核因子 HNF 结合位点和若

干个 Pit-1、Oct-1、RXR 和 GR 的结合位点。不同的是,*Igfbp-3* 上只发现一个潜在的 cAMP 应答元件——CREB,而且,在 *Igfbp-3* 启动子上还存在一个潜在的信号转导子与激活子(STAT)的结合位点。



图 6 鲤 *Igfbp-3* 基因启动子序列及其分析

之前克隆所得到的 *Igfbp-3* cDNA 序列用“□”表示;潜在的转录起始位点用黑体表示;感兴趣的潜在转录因子结合位点均在序列中用下画线或阴影等标明。

Fig. 6 Nucleotide sequence and analysis of common carp *Igfbp-3* promoter

The *Igfbp-3* cDNA cloned previously is denoted by □; Putative transcription initiation site is shaded; Interested putative transcription binding sites are underlined or shaded.

3 讨论

基因启动子中 TATA 框决定基因转录起始位点的选择, RNA 聚合酶与 TATA 框牢固结合之后才能开始转录^[10]。CAAT 框的作用主要是控制转录的起始频率, 不影响转录起始位点的确定^[11]。当这段顺序被改变后, mRNA 的形成量会明显减少, 它是强启动子的必要元件。在本文中, 我们通过网上转录因子分析系统 TESS 及其它在线软件分析, 发现鲤 *Igfbp-3* 启动子中距离转录起始位点 22 bp 处存在 TATA 框, 但是在其上游并无 CAAT 框的存在, 取而代之的是一个 SP1 结合位点, 这与在猪^[12]中的研究结果一致, 在猪 *Igfbp-3* 启动子中 TATA 框上游也无 CAAT 框的存在, 而是包含了 4 个 SP1 的结合位点。已有研究表明, 在肝癌细胞中 SP1 可以激活 *Igfbp-3* 的启动子活性^[13], 预示着 SP1 在调节 *Igfbp-3* 基因转录方面发挥着重要作用。在 *Igfbp-2* 启动子中研究没有发现 TATA 框的存在, 在其紧挨的上游区域也没有 CAAT 框。已有研究表明, 在缺少 TATA 框的启动子中, 3 个 SP1 结合位点对于高效率的转录是必须的^[14], 和斑马鱼 *Igfbp-2* 启动子^[9]不同的是, 研究只发现一个潜在 SP1 结合位点。另外在此区域存在几个富含 G/C 的基簇, 说明 SP1 可能和其它转录因子结合共同调节鲤 *Igfbp-2* 的基因表达。

在鲤 *Igfbp-2* 和 *-3* 启动子序列中都存在 cAMP 应答元件——CREB, 这表明它们的基因表达受第二信使 cAMP 的调控。在大鼠 C6 Glioma 细胞中, cAMP 能以浓度依存的方式抑制 *Igfbp-3* mRNA 的表达^[15], 同时在共同培养的原代肝脏细胞和枯否氏细胞中 cAMP 也能以浓度依存的方式抑制 *Igfbp-3* mRNA 的表达^[16]。利用原代培养的鲤肝细胞, 我们也证实高浓度 cAMP 能显著性地刺激鲤 *Igfbp-2* mRNA 的表达。由此可以得出, 尽管都存在 CREB 元件, 但是 cAMP 对鲤 *Igfbp-2* 和 *-3* 基因表达的调节方式可能不同, 具体机制有待进一步深入研究。

肝细胞核因子是调节肝脏内基因特异性表达的一类转录因子, 在肝脏中表达量较高, 对肝脏的正常发育和代谢起着重要作用。HNF 家族主要包括 CCAAT/增强子结合蛋白 (C/EBP)、HNF-1、HNF-3、HNF-4、D 结合蛋白和 HNF-6 等六大

类^[17]。在鲤 *Igfbp-2* 和 *-3* 启动子序列中存在着若干个 HNF-1、HNF-3 和 C/EBP 的潜在结合位点, 这与 Chen^[8]组织表达中所做的结果相吻合。在组织表达中我们发现 *Igfbp-2* 和 *-3* mRNA 在肝脏组织中的表达量都较高, 这表明它们可能对 *Igfbp-2* 和 *-3* 的基因表达起正调控作用。同时, 研究发现在小鼠中 C/EBP 对卵泡的发育起重要作用^[18]。鲤 *Igfbp-2* 和 *-3* 启动子中均存在有 C/EBP 识别位点, 表明 IGFBP-2 和 *-3* 可能参与到了鱼类性腺的发育。

近几年的研究表明, GH 主要是通过结合其受体激活相应的信号通路从而达到刺激细胞的增值、分化、阻止凋亡和调节代谢等功能, 其中 MAPK、PI3K 和 STAT 信号通路是 3 个主要的信号途径^[19-20]。同时, 研究发现 GH 激活 STAT 家族可以调节某些基因的表达, 如 *Igf-I*^[21]。Ono 等^[22]也证实了 STAT5b 可以介导 GH 抑制 *Igfbp-1* mRNA 的表达。尽管在 *Igfbp-3* 的启动子序列中我们也发现了一个 STAT 结合位点, 但是 GH 调控 *Igfbp-3* mRNA 的表达是不是也需要 STAT 介导还需要进一步研究。

Pit-1 转录因子在垂体特异表达, 并且指导 GH、PRL、TSH 等多种垂体特异性基因的表达。在鲤垂体中我们检测到大量 *Igfbp-2* 和 *-3* mRNA 表达^[8], 推测 Pit-1 可能是 *Igfbp-2* 和 *-3* 在垂体中的表达增强子。在鲤 *Igfbp-2* 和 *-3* 启动子序列中均发现大量糖皮质激素受体 (glucocorticoid receptor, GR)、雌激素受体 (estrogen receptor, ER)、孕激素受体 (progesterone receptor, PR) 和性别决定蛋白的结合位点。由肾上腺皮质细胞分泌的糖皮质激素与其受体结合形成配体-受体复合物再以二聚体的形式结合在 GRE 元件从而激活一系列参与糖异生和脂肪代谢过程的基因表达^[23]。已有研究表明, 可的松可以增加 *Igfbp-1* mRNA 的表达量^[24], 这些结果预示着 *Igfbp-2* 和 *-3* 的基因表达也可能受到糖皮质激素的调控, 且 IGFBP-2 和 *-3* 可能参与了鱼类糖类和脂肪代谢。ER 和 PR 可以与 *Igfbp-2* 和 *-3* DNA 调控区域结合, 表明 IGFBP-2 和 *-3* 的合成与分泌亦受到性类固醇激素的调控。SRY 结合位点的存在进一步表明了 IGFBPs 参与了鱼类性腺的分化和发育。

Kajimura 等^[25]研究发现, 斑马鱼 *Igfbp-1* 启

动子上存在着一个功能性的厌氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF)结合位点,在厌氧状态下刺激斑马鱼胚胎和成体肝脏中 *Igfbp-1* mRNA 的表达。同时,人 *Igfbp-1* 基因在厌氧状态下也被 HIF 直接调控,且为正调控^[26-27]。这些结果表明 IGFBP-1 与厌氧状态下细胞的生长和代谢有关。然而,本文在鲤 *Igfbp-2* 和 *-3* 启动子中没有发现潜在的 HIF 结合位点,这表明 IGFBP 尽管结构类似,但其基因表达可能受到不同的方式调控,从而发挥特异的功能。

本文克隆并分析了鲤 *Igfbp-2* 和 *-3* 基因上游启动子的序列,结果表明鲤 *Igfbp-2* 和 *-3* 基因可能存在基础和激素应答表达。尽管存在这些保守的应答元件,但具体功能还需要进一步的研究。

参考文献:

- [1] Jones J I, Clemmons D R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions [J]. *Endocr Rev*, 1995, 16(1): 3-34.
- [2] Duan C, Clemmons D R. Differential expression and biological effects of insulin-like growth factor-binding protein - 4 and - 5 in vascular smooth muscle cells [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273 (27): 16836-16842.
- [3] Firth S M, Baxter R C. Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins [J]. *Endocr Rev*, 2002, 23(6): 824-854.
- [4] Hwa V, Oh Y, Rosenfeld R G. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily [J]. *Endocr Rev*, 1999, 20(6): 761-787.
- [5] Duan C. Specifying the cellular responses to IGF signals: roles of IGF-binding proteins [J]. *J Endocrinol*, 2002, 175(1): 41-54.
- [6] Reinecke M, Collet C. The phylogeny of the insulin-like growth factors [J]. *Int Rev Cytol*, 1998, 183: 1-94.
- [7] Clemmons D R. Insulin-like growth factor binding proteins and their role in controlling IGF actions [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 1997, 8(1): 45-62.
- [8] Chen W B, Li W S, Lin H R. Common carp (*Cyprinus carpio*) insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2): Molecular cloning, expression profiles, and hormonal regulation in hepatocytes [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2009, 161(3): 390-399.
- [9] Chen J Y, Chou M J, Gong H Y, et al. Cloning and biological analysis of the zebrafish (*Danio rerio*) insulin-like growth factor binding protein - 2 proximal promoter region [J]. *DNA Cell Biol*, 2005, 24(3): 199-208.
- [10] 王镜岩, 朱对庚, 徐长法. 生物化学 [M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2003: 462.
- [11] 朱玉贤, 李毅. 现代分子生物学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1997: 187.
- [12] Onger E M, Zhu Q, Verderame M F, et al. Insulin-like growth factor-binding protein-3 in porcine ovarian granulosa cells: gene cloning, promoter mapping, and follicle-stimulating hormone regulation [J]. *Endocrinol*, 2004, 145(4): 1776-1785.
- [13] Choi H S, Lee J H, Park J G, et al. Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, activates the IGFBP-3 promoter by upregulating Sp1 activity in hepatoma cells: alteration of the Sp1/Sp3/HDAC1 multiprotein complex [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 296(4): 1005-1012.
- [14] Boisclair Y R, Brown A L, Casola S, et al. Three clustered Sp1 sites are required for efficient transcription of the TATA-less promoter of the gene for insulin-like growth factor-binding protein - 2 from the rat [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268 (33): 24892-24901.
- [15] Wang L, Ma X, Yeh L C, et al. Differential regulation of IGF-binding protein gene expression by cAMP in rat C6 glioma cells [J]. *Endocrinol*, 2001, 142(9): 3917-3925.
- [16] Scharf J G, Bräulke T, Hartmann H, et al. Regulation of the components of the 150 kDa IGF binding protein complex in cocultures of rat hepatocytes and Kupffer cells by 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate [J]. *J Cell Physiol*, 2001, 186 (3): 425-436.
- [17] 郑洁, 李进, 于树娜, 等. 肝细胞核因子的研究进展 [J]. *医学综述*, 2008, 14(4): 491-493.
- [18] Grange T, Roux J, Rigaud G, et al. Cell-type specific activity of two glucocorticoid responsive units of rat tyrosine aminotransferase gene is associated with multiple binding sites for C/EBP and a novel liver specific nuclear factor [J]. *Nucleic Acids Research*, 1991, 19(1): 131-139.
- [19] Shoba L N, Newman M, Liu W, et al. LY294002, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, inhibits GH-mediated expression of the IGF- I gene in rat hepatocytes [J]. *Endocrinol*, 2001, 142 (9): 3980-3986.

- [20] Lanning N J, Carter-Su C. Recent advances in growth hormone signaling [J]. *Rev Endocr Metab Disord*, 2006, 7(4): 225 – 235.
- [21] Eleswarapu S, Gu Z, Jiang H. Growth hormone regulation of insulin-like growth factor- I gene expression may be mediated by multiple distal signal transducer and activator of transcription 5 binding sites [J]. *Endocrinol*, 2008, 149(5): 2230 – 2240.
- [22] Ono M, Chia D J, Merino-Martinez R, *et al.* Signal transducer and activator of transcription (Stat) 5b-mediated inhibition of insulin-like growth factor binding protein-1 gene transcription; a mechanism for repression of gene expression by growth hormone [J]. *Mol Endocrinol*, 2007, 21(6): 1443 – 1457.
- [23] Lin C W, Nakane M, Stashko M, *et al.* Trans-Activation and repression properties of the novel nonsteroid glucocorticoid receptor ligand 2, 5-dihydro-9-hydroxy-10-methoxy-2, 2, 4-trimethyl-5-(1-methylcyclohexen-3-yl)-1H-[1]benzopyrano[3, 4-f]quinoline (A276575) and its four stereoisomers [J]. *Mol Pharmacol*, 2002, 62(2): 297 – 303.
- [24] Kelley K M, Haigwood J T, Perez M, *et al.* Serum insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) as markers for anabolic/catabolic condition in fishes [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2001, 129(2 – 3): 229 – 236.
- [25] 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.
- [26] Tazuke S I, Mazure N M, Sugawara J, *et al.* Hypoxia stimulates insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP-1) gene expression in HepG2 cells: a possible model for IGFBP-1 expression in fetal hypoxia [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(17): 10188 – 10193.
- [27] Popovici R M, Lu M, Bhatia S, *et al.* Hypoxia regulates insulin-like growth factor-binding protein 1 in human fetal hepatocytes in primary culture; suggestive molecular mechanisms for in utero fetal growth restriction caused by uteroplacental insufficiency [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86(6): 2653 – 2659.

Cloning and analysis of insulin-like growth factor binding protein -2 and -3 promoters in common carp (*Cyprinus carpio*)

CHEN Wen-bo^{1,2}, LI Wen-sheng^{1*}, LIN Hao-ran^{1*}

(1. State Key Laboratory of Biocontrol, Institute of Aquatic Economic Animals and Guangdong Provincial Key Laboratory for Aquatic Economic Animals, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

2. School of Resources and Environment, Henan Polytechnic University, Jiaozuo 454000, China)

Abstract: Insulin-like growth factors (IGFs) system, including IGFs and IGF-binding proteins, plays a central role in growth and reproduction of fish and higher vertebrates. In serum and extracellular fluids, most circulating IGFs are bound to specific high affinity IGF-binding proteins (IGFBPs) that can protect them from degradation and modulate their actions. Common carp (*Cyprinus carpio*) is one of the most economically important fish in China. To improve the yield of common carp and get more economic benefits, the study of mechanism of growth and reproduction is very important. In the previous study, the cDNAs of common carp *Igfbp*-2 and -3 had been cloned, and the expression profiles and hormonal regulation were studied. The results showed that common carp *Igfbp*-2 and -3 mRNAs were expressed in many various tissues and different embryonic developmental stages, but the abundances were different significantly. To further understand the regulation mechanism of *Igfbp*-2 and -3, the study of their promoters is necessary. So, in this paper, the sequences of *Igfbp*-2 and -3 promoters were firstly cloned, and then the putative transcription binding sites were analyzed. The length of *Igfbp*-2 and -3 promoters we obtained was 1 142 bp and 1 067 bp, respectively. There was a consensus TATA box 22 bp 5' to the start site of transcription in *Igfbp*-3 promoter, while in the upstream there was a SP1 binding site instead of CAAT box. Neither TATA box nor CAAT box was found in the promoter of *Igfbp*-2, only a SP1 binding site and rich G/C motif in this region. These results showed that the promoters of common carp *Igfbp*-2 and -3 did not contain the characteristics of classic promoter. Furthermore, some other transcription binding sites were observed in the two promoters, such as CREB, HNF, Pit-1, Oct-1, RXR, GR, ER, PR, SRY and so on, while the STAT (signal transducer and activator of transcription) was only found in *Igfbp*-3. These results suggested that there were basic and hormone-inducible expression patterns of *Igfbp*-2 and -3 genes. However, the regulation mechanisms were not consistent between the two genes.

Key words: *Cyprinus carpio*; insulin-like growth factor binding proteins; promoter; sequence analysis

Corresponding author: LI Wen-sheng, LIN Hao-ran. E-mail: lsslws@mail.sysu.edu.cn