

山羊 *IGFBP-5* 基因克隆及特征分析

李 利, 李 秋, 王林杰, 张红平*
(四川农业大学 动物遗传育种研究所, 四川 雅安 625014)

摘要: 为探讨山羊 *IGFBP-5* 基因的特点, 进一步研究其在山羊上的表达及生长发育中的作用机制, 以初生南江黄羊肝脏组织为材料抽提 RNA 进行克隆测序, 并利用 ExPasy、NetPhos、NetOGlyc、SignalP 等生物软件分析 *IGFBP-5* 基因 CDS 区及其编码氨基酸的理化性质、结构特点。结果显示, 山羊 *IGFBP-5* 基因的 CDS 全长 819bp, 编码 272 个氨基酸残基, 相对分子量为 30.392kD, 理论等电点 $pI=8.56$, 开始 19 个氨基酸残基构成信号肽, 具有 2 个疏水区、5 个亲水区且总平均疏水性值为 -0.619 , 成熟肽定位于细胞外。二级结构以无规卷曲为主 (83.8%), α 螺旋和延伸片段分别为 13.6% 和 2.6%。N-端存在 *IGFBP* 信号, G-端有 I 型甲状腺球蛋白结构域, 发现 3 个 O-糖基化位点, 22 个磷酸化位点, 主要磷酸化方式有 CK II、PKA、PKC、MAPK 4 种。山羊与其他物种 *IGFBP-5* 基因 mRNA 及氨基酸序列一致性分别在 89% 和 94% 以上, 其 N-端在几个物种中完全一致。山羊和人 *IGFBP-5* 蛋白前体分别有特异性的氨基酸插入 (Ala102、Leu3)。山羊 *IGFBP-5* 蛋白是位于细胞外且具有信号肽的弱亲水性分泌蛋白, 磷酸化是调控其功能的主要因素。
关键词: 南江黄羊; *IGFBP-5* 基因; 克隆; 生物信息学分析
中图分类号: S827.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2011)06-0132-06

Molecular Cloning and Characterization of Goat *IGFBP-5* Gene

LI Li, LI Qiu, WANG Lin-jie, ZHANG Hong-ping*
(Institute of Animal Genetics and Breeding, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: In order to reveal the construction features of goat *IGFBP-5* and provide a basis for further study on its expression and physical function in goat growth and development, *IGFBP-5* CDS was cloned from liver of newborn Nanjiang Mongolian Gazelle, and analyzed using biology softwares, for instance: ExPasy, NetPhos, NetOGlyc, and SignalP. The whole length of *IGFBP-5* CDS was 819bp (GC 64.96%) and encoded 272 amino acid residues. The theory values of *IGFBP-5* pI and molecular weight were 8.56 and 30.392kD, respectively. Residues 1 to 19 at N-terminal formed signal peptide, and there were two hydrophilic regions and five hydrophobic regions in primary sequence of goat *IGFBP-5*, while the grand average of hydropathicity (GRAVY) was -0.619 , and sub-cellular localization was extracellular for mature peptide. Followed by alpha helix (13.6%) and extended strand (2.6%), random coil (83.8%) was most common. Insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) N-terminal domain signature and thyroglobulin type-1 repeat signature in G-terminal region were found. There were 3 O-glycosylation sites and 22 phospho-

收稿日期: 2011-03-15
基金项目: 四川省教育厅重点项目 (08ZA077); 四川省科技支撑计划项目 (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。
E-mail: lilyzh002@sohu.com

* 通讯作者: 张红平 (1970-), 男, 四川平昌人, 教授, 博士, 主要从事羊的遗传育种与繁殖学研究。
E-mail: zhp@sicau.edu.cn

phorylation sites, and the main modification included CK II, PKA, PKC, and MAPK. The homology of nucleotide and amino acid sequence of goat *IGFBP-5* gene with others was above 89% and 94%, respectively, in addition, the N-terminal sequences were same among species. There was one particular amino acid insertion in primary *IGFBP-5* of human (Leu3) and goat (Ala102). The results indicated that *IGFBP-5* of goat was a weakly hydrophilic secretory protein with signal peptide, and phosphorylation was the main factor to regulate its function.

Key words: Nanjiang Mongolian Gazelle; *IGFBP-5* gene; Cloning; Bioinformatics analysis

胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factors, IGFs) 参与糖、脂肪和蛋白质代谢, 与胚胎分化、个体发育密切相关^[1]。IGFs 结合蛋白 (insulin-like growth factor-binding proteins, IGFBPs) 是 IGFs 的重要组成部分之一, 血液中 99% 的 IGFs 与 IGFBPs 结合成复合物的形式, 调节血液中 IGFs 可利用度^[2]。目前已有 6 种 IGFBPs (IGFBP-1~IGFBP-6) 被鉴定和克隆出来, 虽然都能与 IGFs 结合, 但它们在组织器官的分布及生物学作用不尽相同^[2]。IGFBP-5 能增强 IGF-I 作用于平滑肌细胞、成纤维细胞或成骨细胞^[3]。肌肉中的 IGFBPs 以 IGFBP-5 为最多^[4]; IGFBP-5 能刺激成骨细胞的有丝分裂^[5-6]。Ning 等推测, IGFBP-5 可通过协同作用维持 IGF-I 对出生后老鼠生长发育的调控^[7]。IGFBP-5 还与人的头颈扁平上皮瘤以及头发生长关联^[8-9]。

IGFBP-5 最早是从成年大鼠血清中分离出来的, 小鼠的 *IGFBP-5* 基因长约 17kb, 位于 1 号染色体^[10], 人类的 *IGFBP-5* 基因长约 33kb, 位于 2 号染色体, 包括 4 个外显子和 3 个内含子^[11], 还有猪、斑马鱼等多个物种 *IGFBP-5* 基因的克隆、表达调控或蛋白的相关研究, 但对其功能尚未完全研究清楚, 而且在山羊上未见相关报道。本研究以南江黄羊作为试验材料, 克隆 *IGFBP-5* 基因 CDS 区序列, 利用生物信息学方法分析了测定序列及推导出的氨基酸序列, 为进一步研究该基因在山羊上的表达及其对生长发育的调控奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

随机选取刚出生的健康南江黄羊 (源自南江黄羊原种场) 羔羊 3 只, 屠宰后迅速取肝脏组织 100mg 左右, 速冻于液氮中带回实验室, 放置于 -80℃ 冰箱中保存。

1.2 RNA 的提取及反转录

将冻存的肝脏组织样分别迅速研磨成粉, 按照上海生工生物工程技术有限公司 Trizol 总

RNA 抽提试剂盒 (UNIQ-10 柱式) 说明抽提总 RNA, 将所得 RNA 利用 ReverTra Ace qPCR RT Kit (TOYOBO 公司) 进行反转录合成 cDNA。采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测结果。

1.3 克隆测序

根据绵羊和普通牛的 *IGFBP-5* 基因 mRNA 序列, 采用 Primer Premier 5.0 设计引物, 引物序列 (Fw: 5'-AGACTCGGAGAAGATGGTGCTG-3'; Rv: 5'-TGGGATGGGGTGAGGGAAAGA-3') 由宝生物工程 (大连) 有限公司合成。以合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。在 50μL 总反应体系中包含 2×Master Mix *Taq* 酶 25μL, cDNA (≤1ng) 4μL, 上下游引物 (10μmol/L) 各 2μL, ddH₂O 17μL。PCR 反应条件: 95℃ 5min; 94℃ 30s, 58℃ 45s, 72℃ 60s, 循环 35 次; 然后 72℃ 7min。PCR 产物采用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒纯化后, 与 pTA2 载体连接。挑取单个阳性菌落, 接种于含有 Amp 的 1.5mL LB 培养液中, 37℃、200r/min 振荡培养过夜, 然后将含有目的条带的菌液送往 Invitrogen 公司 (上海) 完成测序。

1.4 序列分析

利用 BioEdit 进行测序结果校对, 多序列比对用 MEGA 4.0 软件包中的 ClustalW 进行, 序列之间的一致性 (identity) 采用 BLAST 在线分析。序列的氨基酸组成、蛋白分子量、等电点、稳定性和总亲水性等利用 ExPasy (<http://www.expasy.org/tools/>) 中的 Protparam 和 ProtScale 推测; 采用 NetPhos 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 预测磷酸化位点, NetOGlyc 3.1 及 NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>) 预测糖基化位点, SignalP-3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测信号肽。跨膜结构预测利用 TMHMM 服务器 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), 模体 (motif) 识别、亚细胞定位采用 PredictProtein (<https://www.predictprotein.org/>) 进行; 利用 Phyre (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/servers/phyre/>) 进行二级结构预测。

预测二硫键采用 DiANNA 1.1 (<http://clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA/>)。

2 结果与分析

2.1 IGFBP-5 基因 CDS 区序列

测序结果表明,IGFBP-5 基因 cDNA 的片段长 868 bp,其中开放阅读框(ORF)长 819 bp (14–

832 bp),有起始密码子 ATG 和终止密码子 TGA(图 1)。IGFBP-5 基因 CDS 区序列 A、T、C、G 4 种碱基组成分别是 19.90%、15.14%、32.48%、32.48%,GC 含量高达 64.96%。物种间比对发现,山羊与人的 ORF 长度相同(819 bp),其余几个物种 ORF 均为 816 bp。山羊与其他几个物种间 IGFBP-5 mRNA 序列一致性均在 89% 以上(表 1)。



阴影部分为引物序列,左边和右边的数字分别表示核苷酸和氨基酸的位置

图 1 测定出的山羊 IGFBP-5 基因序列及推测的氨基酸序列

表 1 山羊 IGFBP-5 基因 mRNA 以及推测的氨基酸序列与其他物种的序列一致性

物种	mRNA 索引号	蛋白索引号	CDS 一致性/ %	氨基酸序列一致性/ %
绵羊	NM_001129733.1	NP_001123205.1	98	99
牛	NM_001105327.1	NP_001098797.1	97	98
猪	HM439287.1	ADK27481.1	94	98
人	NM_000599.3	NP_000590.1	94	98
大鼠	NM_012817.1	NP_036949.1	90	94
小鼠	NM_010518.2	NP_034648.2	89	94

2.2 IGFBP-5 基因编码蛋白质的特性分析

2.2.1 IGFBP-5 蛋白氨基酸序列 山羊 IGFBP-5 蛋白前体蛋白由 272 个氨基酸残基构成,其中 Glu(E) 出现次数(27) 最多,其次是 Leu(L, 24 次)和 Arg(R, 22 次),Asn(N, 4 次)和 Trp(W, 1 次) 出现次数最少;带负电荷的氨基酸残基(Asp+ Glu, 36 个) 少于带正电荷的氨基酸残基(Arg+ Lys, 43 个)。该蛋白分子量 30.392 kD,理论等电点 pI= 8.56,不稳定指数和脂肪系数(aliphatic index)分别为 53.16、63.16,总平均疏水性值(− 0.619)为负,定位于动物细胞膜外,主要是由分泌途径产生。N 端 1– 19 位氨基酸残基构成 IGFBP-5 的信号肽,20– 102 残基为

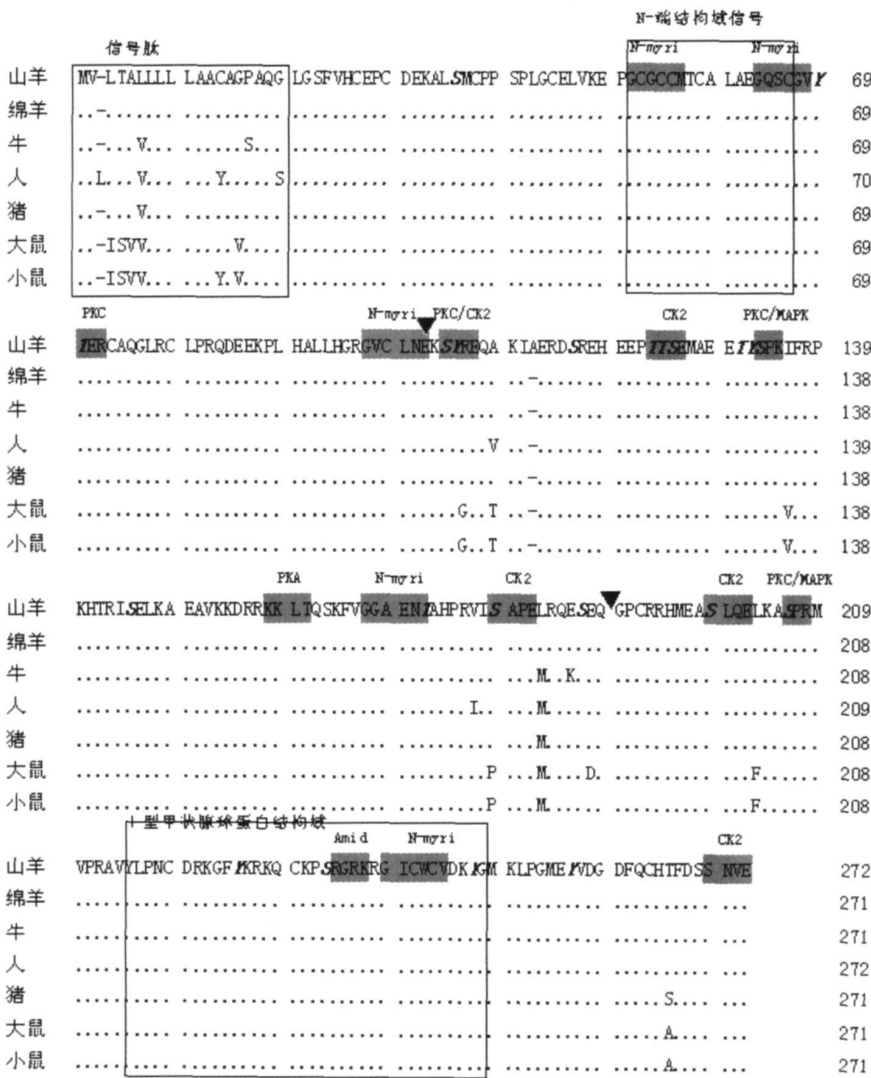
N-端保守区,190– 272 残基为 G-端保守区,中间为连接区。与其他物种比对(图 2),发现 N-端区在几个物种中完全一致;G-端区在山羊、绵羊、牛和人之间完全一致,与猪和鼠分别存在 1 个和 2 个氨基酸残基差异;中间连接区物种间有 9 个残基不同,但山羊 IGFBP-5 的 102 位插入 Ala(A) 残基;几个物种的信号肽长为 19 个氨基酸残基,但人类因 Leu3 的插入为 20 个,而且信号肽区域中变异较大。总的来看,山羊 IGFBP-5 与几个物种间序列一致性均高达 94% 以上(表 1),表明 IGFBP-5 蛋白高度保守。

2.2.2 IGFBP-5 二级结构与翻译后修饰 山羊

IGFBP-5 蛋白前体的 63 位 Gly 之前为疏水性而其后表现亲水, 但其中两肽段(5- 13 和 55- 59 残基) 具有明显的疏水性质, 而具有明显亲水性的肽段有 5 个(81- 88, 103- 123, 152- 161, 183- 193, 221- 238 残基)。跨膜分析结果发现, 只有 1- 20 位残基区域稍具有跨膜螺旋特征, 而且该蛋白不具有细胞核定位信号(nuclear localization signal)。二级结构中 α -螺旋占 13. 6%(2- 13, 31- 35, 55- 57, 89- 92, 147- 153, 191- 204 残基); 延伸片段只有 2. 6%(78- 79, 97- 98, 228- 230, 240- 244 残基), 其余 83. 8% 为无规卷曲。

IGFBP-5 的结构域及磷酸化修饰分析结果见图 2。N-端 IGF 结构域由 22- 102 位氨基酸残基构成, 其中 51- 66 位残基为该结构域的信号位点。C-端 189- 263 肽段构成 I 型甲状腺球蛋白结构域, 其中 215- 248 残基为重复信号。共预测有 22 个(11 个

Ser, 6 个 Tyr, 5 个 Thr) 磷酸化位点, 其中 CK II 磷酸化位点(104、123、179、199) 和 PKC 磷酸化位点(protein kinase C phosphorylation site)(70、104、133、206) 各 4 个, 2 个(133 和 206) 位于 MAPK 磷酸化位点(χ -[ST]-P- χ , the phospho-acceptor site), 而且 Ser104 和 Ser206 可发生 2 种磷酸化。此外, 还有 1 个 PKA 磷酸化位点(cAMP-and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site), 5 个 N-十四烷酰化位点(N-myristoylation site), 1 个酰胺化位点(amidation site)。只有 3 个 Thr(123、124、131) 残基为 O-糖基化位点, 没有发现 N-糖基化位点。成熟肽中 18 个 Cys 可形成 9 个二硫桥, 具体如下: Cys1-Cys2, Cys3-Cys10, Cys4-Cys11, Cys5-Cys9, Cys6-Cys13, Cys7-Cys8, Cys12-Cys15, Cys14-Cys16, Cys17-Cys18。



. 表示一致; - 表示插入缺失; 倒三角表示分区; 斜体字表示磷酸化位点; 阴影区表示修饰位点, 其上为修饰方式; 方框表示结构域

3 讨论

3.1 *IGFBP-5* 基因 cDNA 序列的分析

判断克隆所得的 cDNA 是否为新基因以及它与其他已发现的基因序列有何异同, 可通过相应的软件(如 BLAST、Fasta、PIMA、MAP 等)对多个 DNA 序列数据库(GenBank、EMBL 和 DDBJ 等)中已登录的序列进行搜索、比较, 了解序列间的相似程度^[12]。本试验采用 BLAST 序列比对的方法, 发现所得序列与绵羊 *IGFBP-5* 基因的 cDNA 序列一致性达到 98%, 推断出的氨基酸序列与多个物种的 *IGFBP-5* 的相似性也在 94% 以上, 氨基酸残基保守性强, 尤其是 N 端和 G 端在 7 个物种中变化很小。由此确定克隆所得序列为南江黄羊 *IGFBP-5* 基因 cDNA 序列, 而且该基因在物种中高度保守。

3.2 *IGFBP-5* 蛋白的结构域及修饰

山羊 *IGFBP-5* 蛋白是具有信号肽的分泌蛋白。成熟肽 N 端起始 39 个氨基酸残基没有参与与 IGF 的结合, Ala40- Ile92 多肽是唯一与 IGF 具有高亲和力的结合位点^[13], 其中 Lys68 Pro69-Leu70-Leu73-Leu74(K-P-L-L-L)起着至关重要的作用^[14]。*IGFBP-5* 蛋白 G 端具有肝素结合域(heparin binding domains), 以及与细胞表面、核转运蛋白-β、蛋白相互作用的氨基酸残基^[13]。Lys201- Arg218 (RKGFYKRKQCKPSRGRKR) 残基构成 G 端肝素结合域^[5], 也是传递信号到细胞膜内或核膜内必需的核定位序列(nuclear localization sequence, NLS)^[15]。Leu216- Cys263 肽段虽然在 *IGFBPs* 中保守^[16], 但只在 *IGFBP-3* 和 *IGFBP-5* 中与单层内皮细胞(endothelial cell monolayers)的结合中起着重要作用^[17]。Lys211-Arg214-Lys217-Arg218 (K-R-K-R) 是与酸不稳定亚基(acid labile subunit, ALS) 结合位点^[16]。*IGFBP-5* 中间区域中的 Val132- Leu140(VKKDRRRL)构成基本序列, 也许同 Lys201- Arg218 片段一样包含 ALS 位点^[18]。序列比对发现, 所有这些 *IGFBP-5* 结构域在 7 个物种中序列完全一致, 可能是因为它们在动物生长发育中的重要功能导致高度保守。

IGFBPs 与 IGFs 的亲合力主要由磷酸化、糖基化和特异的蛋白水解控制^[19]。现已发现 *IGFBP-5* 具有 5 个蛋白水解位点^[20-22]。本试验预测出的 3 个 O-糖基化位点与人的 *IGFBP-5* 研究结果吻合^[23], 各 PKA、PKC、CK II 磷酸化位点与人 *IGFBP-5* 也相对应^[16], 暗示 *IGFBP-5* 的磷

酸化而非糖基化是转录后调控其功能的重要方式, 但 Ser116 磷酸化只影响 *IGFBP-5* 与肝磷脂的结合而不影响与 IGFs 的结合^[24], 这与 *IGFBP-1* 磷酸化可提高与 IGF- I 的亲合力至少 5 倍^[25] 的结论不一致, 说明预测出的这些磷酸化、糖基化修饰的具体功能及其作用机制需要进一步研究。

3.3 *IGFBP-5* 蛋白的二硫键结构

IGFBPs 控制着 IGFs 在细胞外的分布、功能和活动。二硫键连接对蛋白的正确折叠和维持三维构象十分重要, 如 Gly-Cys-Gly-Cys-Cys-x-x-Cys (GCGCCxxC) 是形成掌型结构的核心, 而 *IGFBP-4* 的 Cys6 至 Cys23(即 Cys1- Cys4 间 18 个氨基酸残基) 多肽链弯曲形成阶梯状以维持该掌型结构^[26], 具体为 Cys1-Cys5, Cys2-Cys6, Cys3-Cys7, Cys4-Cys8 4 个二硫桥^[27], 但与 *IGFBP-6* 中形成的 3 个二硫桥(Cys1-Cys2, Cys3-Cys4, Cys5-Cys6) 不一致, 在 *IGFBP-1*、3、5、6 中还存在 Cys9-Cys11 和 Cys10-Cys12 2 对二硫键^[28]。对 G 端的研究已发现, *IGFBP-4* 和 *IGFBP-1* 均形成如下的二硫键: Cys13-Cys14, Cys15-Cys16, Cys17-Cys18^[26]。这些 *IGFBPs* 二硫键均在 N 端和 G 端内部形成亚结构域。本试验结果表明, 只有 Cys1-Cys2 和 Cys17-Cys18 与前面研究结果吻合, 但预测出 N 端和 G 端交叉形成二硫键(Cys6-Cys13 和 Cys12-Cys15, 以成熟肽中第一个 Cys 为 1), 这与 Rechler 的结论不相符合^[29], 其原因可能是软件预测的结果不准确, 具体原因需要进一步进行研究。

4 结论

山羊 *IGFBP-5* CDS 区长 819bp, 编码 272 个氨基酸残基, 包含一个物种特异性插入残基 (Ala102)。信号肽由 N 端 19 个残基构成, 成熟肽具有亲水性且位于细胞外。具有 22 个潜在磷酸化位点而且磷酸化方式多种, 其中 O-糖基化位点 3 个, 预测 N 端和 G 端交叉形成 2 个二硫桥。无论 mRNA 还是蛋白水平, *IGFBP-5* 均高度保守。

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(2): 3-34.
[2] Rajaram S, Baylink D J, Mohan S. Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions [J]. *Endocr Rev*, 1997, 18(6): 801-831.

- [3] Bautista C M, Baylink D J, Mohan S. Isolation of a novel insulin-like growth factor (IGF) binding protein from human bone: a potential candidate for fixing IGF-II in human bone[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, 176: 756-763.
- [4] James P L, Jones S B, Busby W H J, *et al.* A highly conserved insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP-5) is expressed during myoblast differentiation [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268(30): 22305-22312.
- [5] Song H, Beattie J, Campbel I W, *et al.* Overlap of IGF- and heparin-binding sites in rat IGF-binding protein-5 [J]. *Mol Endocrinol*, 2000, 24(1): 43-51.
- [6] Schneider M R, Wolf E, Hoefflich A, *et al.* IGF-binding protein-5: flexible player in the IGF system and effector on its own[J]. *Endocrinology*, 2002, 172: 423-440.
- [7] Ning Y, Schuller A G P, Bradshaw S, *et al.* Diminished growth and enhanced glucose metabolism in triple knockout mice containing mutations of insulin-like growth factor binding protein-3, -4, and -5 [J]. *Mol Endocrinol*, 2006, 20(9): 2173-2186.
- [8] Niu J, Huang Y J, Wei S, *et al.* Association between a functional polymorphism (-1195T > C) in the IGFBP5 promoter and head and neck cancer risk [J]. *Head Neck*, 2011, 33(5): 650-660.
- [9] Sriwiranont P, Hachiya A, Pickens W L, *et al.* Effects of IGF-binding protein 5 in dysregulating the shape of human hair[J]. *J Invest Dermatol*, 2011, 131(2): 320-328.
- [10] Kou K, James P L, Clemmons D R, *et al.* Identification of two clusters of mouse insulin-like growth factor binding protein genes on chromosomes 1 and 11 [J]. *Genomics*, 1994, 21: 653-655.
- [11] Allander S V, Larsson C, Ehrenborg E, *et al.* Characterization of the chromosomal gene and promoter for human insulin-like growth factor binding protein-5 [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269: 10891-10898.
- [12] Fowler D, Albaiges G, Lees C, *et al.* The role of insulin-like growth factor binding protein-1 phosphoisoforms in pregnancies with impaired placental function identified by doppler ultrasound [J]. *Hum Reprod*, 1999, 11(14): 2881-2885.
- [13] Kalus W, Zweckstetter M, Renner C, *et al.* Structure of the IGF-binding domain of the insulin-like growth factor-binding protein-5 (IGFBP-5): implications for IGF and IGF-I receptor interactions [J]. *EMBO J*, 1998, 17: 6558-6572.
- [14] Imai Y, Morales A, Andag U, *et al.* Substitutions for hydrophobic amino acids in the N-terminal domains of IGFBP-3 and -5 markedly reduce IGF-I binding and alter their biologic actions [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 18188-18194.
- [15] Schedlich L J, Le Page S L, Firth S M, *et al.* Nuclear import of insulin-like growth factor-binding protein-3 and -5 is mediated by the importin subunit [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 23462-23470.
- [16] Firth S M, Clemmons D R, Baxter R C. Mutagenesis of basic amino acids in the carboxyl terminal region of insulin-like growth factor binding protein-5 affects acid-labile subunit binding [J]. *Endocrinology*, 2001, 142: 2147-2150.
- [17] Booth B A, Boes M, Andress D L, *et al.* IGFBP-3 and IGFBP-5 association with endothelial cells: role of G-terminal heparin binding domain [J]. *Growth Regul*, 1995, 5: 1-17.
- [18] Twigg S M, Kiefer M C, Zapf J, *et al.* A central domain binding site in insulin-like growth factor-binding protein 5 for the acid-labile subunit [J]. *Endocrinology*, 2000, 141: 454-457.
- [19] Conover C A. Insulin-like growth factor binding protein proteolysis in bone cell models [J]. *Prog Growth Factor Res*, 1995, 6: 301-309.
- [20] Imai Y, Busby W H, Smith C E, *et al.* Protease-resistant form of insulin-like growth factor-binding protein 5 is an inhibitor of insulin-like growth factor-1 actions on porcine smooth muscle cells in culture [J]. *J Clin Invest*, 1997, 100: 2596-2605.
- [21] Overgaard M T, Boldt H B, Laursen L S, *et al.* Pregnancy-associated plasma protein-A2 (PAPP-A2), a novel insulin-like growth factor-binding protein-5 protease [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 21849-21853.
- [22] Zheng B, Clarke J B, Busby W H, *et al.* Insulin-like growth factor-binding protein-5 is cleaved by physiological concentrations of thrombin [J]. *Endocrinology*, 1998, 139: 1708-1714.
- [23] Conover C A, Kiefer M C. Regulation and biological effect of endogenous insulin-like growth factor binding protein-5 in human osteoblastic cells [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1993, 76: 1153-1159.
- [24] Graham M, Firth D M, Robinson S M, *et al.* The *in vivo* phosphorylation and glycosylation of human insulin-like growth factor-binding protein-5 [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2007(8): 1392-1405.
- [25] Seferovic M D, Ali R, Kamei H, *et al.* Hypoxia and leucine deprivation induce human insulin-like growth factor binding protein-1 hyperphosphorylation and increase its biological activity [J]. *Endocrinology*, 2009, 150: 220-231.
- [26] Sitar T, Popowicz G M, Siwanowicz I, *et al.* Structural basis for the inhibition of insulin-like growth factors by insulin-like growth factor-binding proteins [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 29, 103(35): 13028-13033.
- [27] Siwanowicz I, Popowicz G M, Wisniewska M, *et al.* Structural basis for the regulation of insulin-like growth factors by IGF binding proteins [J]. *Structure*, 2005, 3(1): 155-167.
- [28] Neumann G M, Bach L A. The N-terminal disulfide linkages of human insulin-like growth factor-binding protein-6 (hIGFBP-6) and hIGFBP-1 are different as determined by mass spectrometry [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274: 14587-14594.
- [29] Rechler M M. Insulin-like growth factor binding proteins [J]. *Vitam Horm*, 1993, 47: 111-114.