

# 生长激素与胰岛素样生长因子- I 对马氏珠母贝壳生长形成相关基因表达的影响

张立娟<sup>1,2</sup>, 何毛贤<sup>1</sup>

1. 中国科学院南海海洋研究所, 中国科学院海洋生物资源可持续利用重点实验室, 广东 广州 510301;

2. 中国科学院研究生院, 北京 100049

**摘要:** 研究了外源生长激素与胰岛素样生长因子- I 处理对马氏珠母贝 *Pinctada fucata* Gould 胰岛素相关多肽受体基因(*irr*)和 5 种壳基质蛋白基因(*nacrein*、*efcbp*、*n19*、*aspein* 及 *accbp*)表达水平的影响。结果表明, 激素处理显著提高了 *irr* 基因的表达水平( $P<0.05$ ), 这与其在软体动物中作为胰岛素样生长因子受体的作用相一致。*nacrein* 基因的表达水平在激素处理组也有显著升高( $P<0.05$ ), 表明生长激素与胰岛素样生长因子- I 两种外源激素都增强了马氏珠母贝的生长代谢水平; 与对照组相比, *n19*、*aspein* 与 *accbp* 3 个基因的表达水平在激素处理组均下调( $P<0.05$ ), 说明这 3 个基因的表达受到激素调节通路的抑制作用。此外, 研究发现 *aspein* 与 *accbp* 两个基因的表达在各个实验样本中具有极高的相关性, 说明这两个基因在激素通路中可能受到同一个上游因子调控。*efcbp* 基因表达水平在激素处理组与对照组之间表达稳定, 各样本之间无显著性的变化( $P>0.05$ )。

**关键词:** 生长激素; 胰岛素样生长因子- I; 胰岛素相关多肽受体; 壳基质蛋白; 基因表达; 马氏珠母贝

中图分类号: Q959.215; Q786 文献标识码: A 文章编号: 1009-5470(2012)02-0096-06

## Effects of growth hormone and insulin-like growth factor- I on shell growth related gene expression in *Pinctada fucata* Gould

ZHANG Li-juan<sup>1,2</sup>, HE Mao-xian<sup>2</sup>

1. Key Laboratory of Marine Bio-resources Sustainable Utilization, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** This study investigated the expression levels of insulin-related peptide receptor gene (*irr*) and several shell matrix protein genes (*nacrein*, *efcbp*, *n19*, *aspein*, and *accbp*) in human recombinant growth hormone injection and insulin-like growth factor injection groups compared to the reference group in pearl oyster *Pinctada fucata* Gould. The expression level of *irr* was increased by hormone treatments ( $P<0.05$ ), which is consistent with its role as insulin-like growth factor receptor in mollusk. Higher transcripts of *nacrein* indicated higher growth metabolism levels in the pearl oysters of the experimental groups; compared to the reference group, the expression levels of *n19*, *aspein* and *accbp* decreased after growth hormone (GH) and insulin-like growth factor- I (IGF- I) treatments ( $P<0.05$ ), suggesting they were suppressed by the GH and IGF- I pathways. In addition, the expression levels of *aspein* and *accbp* were found to be highly correlated; we infer that these two genes may be regulated by a single upstream factor. The expression level of *efcbp* showed a relatively steady expression in all oysters, and no significant differences were found among these groups ( $P>0.05$ ).

**Key words:** growth hormone; insulin-like growth factor- I; insulin-related peptide receptor; shell matrix protein; gene expression; *Pinctada fucata* Gould

收稿日期: 2010-12-02; 修订日期: 2011-01-24。卢冰编辑; 林强校对

基金项目: 国家自然科学基金-广东联合基金重点项目(U0831001); 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KZCX2-EW-Q21); 广东省产学研项目(2010B090300075); 广东省科技计划项目(2008A020100004)

作者简介: 张立娟(1986—), 女, 黑龙江省绥化市人, 硕士研究生, 主要从事海洋生物研究。E-mail: zhanglijuan1986@gmail.com

通信作者: 何毛贤。E-mail: hmx@scsio.ac.cn

生长激素(growth hormone, GH)是调节动物生长的重要内分泌激素之一, 胰岛素(insulin)和胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)是生长、发育和代谢的重要调控因子。GH 在体内的生理功能主要是通过胰岛素样生长因子, 特别是胰岛素样生长因子- (IGF- )作为媒介完成的<sup>[1-2]</sup>。在软体动物中, 已有研究表明, 牛和猪胰岛素能刺激蜗牛的生长, 胰岛素抗血清能显著抑制其生长<sup>[3-4]</sup>, 人重组 IGF- 能刺激牡蛎、扇贝等蛋白质的合成, 而且其促生长效率比胰岛素更高<sup>[5-6]</sup>。金启增等<sup>[7]</sup>利用珍珠生长激素处理马氏珠母贝外套膜小片, 发现可以显著提高育珠贝休养期的成活率、含珠率和珍珠质量并促进珍珠生长。这些生理作用被认为是通过类胰岛素多肽受体(insulin-like receptor)来调节的, 目前已经在贻贝、太平洋牡蛎等多种软体动物神经节分离出胰岛素相关多肽(insulin-related peptides)<sup>[8-9]</sup>, Gricourt 等<sup>[6]</sup>在太平洋牡蛎中也克隆到了胰岛素受体相关受体基因(insulin receptor-related receptor, CIR), 并对其表达进行了分析。本实验室也从马氏珠母贝外套膜中分离克隆到了同源的胰岛素相关多肽受体基因(insulin-related peptide receptor, *irr*)。

马氏珠母贝 *Pinctada fucata* Gould(又称合浦珠母贝)属于软体动物门双壳纲珍珠贝目珍珠贝科, 是重要的海水养殖贝类和生产珍珠的主要母贝, 其贝壳的生长形成是一个高度调控的生物矿化过程, 尽管基质蛋白占其总重量的不足 5%, 但在贝壳生物矿化过程中却发挥着非常重要的作用<sup>[10-11]</sup>。目前为止, 已经从贝壳中分离鉴定出几十种基质蛋白, Aspein<sup>[12]</sup>、Prismalin-14<sup>[13]</sup>、MSI31<sup>[14]</sup>、N16<sup>[15]</sup>、N19<sup>[16]</sup>、Nacrein<sup>[17]</sup>、EFCBP<sup>[18]</sup>、ACCBP<sup>[19]</sup>等。它们作为促进或抑制因子在贝壳形成过程中发挥作用, 并且影响碳酸钙晶体的表面晶型<sup>[20]</sup>。

马氏珠母贝的生长包括软体部与贝壳两部分的生长, 而贝壳主要包括外侧的棱柱层和内侧的珍珠层。壳基质蛋白在贝壳生长发育过程中发挥非常重要的作用。GH 和 IGF 是动物重要的生长发育代谢的调控因子, 但在珍珠贝研究中并没有发现相关的报道。本实验通过重组人生长激素(human recombinant growth hormone, HGH)及胰岛素样生长因子- (IGF- )处理, 研究它们对马氏珠母贝胰岛素相关多肽受体基因(*irr*)和几种壳基质蛋白基因(*nacrein*, *n19*, *aspein*, *accbp* 与 *efcbp*)表达的影响, 从而为阐释珍珠贝生长的分子机制奠定基础。

## 1 材料方法

### 1.1 注射用 HGH 与 IGF- 溶液配制

1% 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)溶液的配制: 0.2 mol·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5.3mL 加 0.2mol·L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4.7mL 至 10mL, 稀释一倍后加 0.1% 的牛血清白蛋白(BIOIND)配成 1% BSA 溶液。

HGH 注射液: 100μg 重组人生长激素(Biovision)溶解于 1mL 1% BSA 中, 以终浓度 100μg·mL<sup>-1</sup> 作为贮存液; 取 0.1mL 用 1% BSA 稀释至 1mL, 以终浓度 10μg·mL<sup>-1</sup> 作为注射液。

IGF- 注射液: 100μg 重组人胰岛素样生长因子(Recombinant Human IGF- )(Pepro Tech)溶解于 1mL 1% BSA 中, 以终浓度 100μg·mL<sup>-1</sup> 作为贮存液; 取 0.1mL 用 1% BSA 稀释至 1mL, 以终浓度 10μg·mL<sup>-1</sup> 作为注射液。

### 1.2 样品采集及处理

2010 年 6 月, 在深圳市大亚湾海区养殖群体中采集马氏珠母贝样品, 取大小相近、总重 10g 左右的珍珠贝随机分为 HGH 处理组、IGF- 处理组与对照组。按照之前预实验所筛选的激素注射剂量(10μg·mL<sup>-1</sup>, 1μL·g<sup>-1</sup>), 每个实验组珍珠贝肌肉注射 10μL 浓度为 10μg·mL<sup>-1</sup> 的 HGH 或 IGF- 注射液, 对照组注射等体积 1% BSA。连续注射 3 天, 第 4 天解剖, 取左外套膜中间部位, 贮存于样品稳定剂(Sample Protector, TaKaRa)中, -80 °C 保存。

### 1.3 RNA 提取与 cDNA 的合成

RNA 的提取采用 Trizol 方法。取适量的外套膜组织放在 RNAiso Plus(TaKaRa)试剂中匀浆, 匀浆液于室温放置 5min; 12000r·min<sup>-1</sup> 冷冻离心 5min; 取上清加入 200μL 氯仿, 振荡混匀, 室温静置 5min 后 12000r·min<sup>-1</sup> 冷冻离心 15min; 将上清转移至新的离心管中, 加入与上清液等体积的异丙醇, 将离心管轻轻混匀后室温放置 10min; 12000 r·min<sup>-1</sup> 冷冻离心 10min; 之后用 75%的乙醇清洗沉淀, 离心; 室温放置 5—10min 蒸发乙醇后溶解于 35μL 的无 RNA 酶水中。1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 紫外分光光度计检测 RNA 的浓度和纯度。RNA 样品经 DNase (Fermentas)处理以消除 DNA 污染。

cDNA 模板利用 PrimeScript 反转录试剂盒(Perfect Real Time, TaKaRa)合成。10μL 反转录体系中包含 RNA 500ng, 5×PrimeScript Buffer(for Real Time)2μL, PrimeScript RT Enzyme Mix I 0.5μL, Oligo dT Primer (50μmol·L<sup>-1</sup>)0.5μL, Random 6 mers (100μmol·L<sup>-1</sup>)0.5μL, 无 RNA 酶水补至 10μL。反转

录后的 cDNA 模板按 1 : 4 稀释, 保存于-20 。

#### 1.4 引物设计

5 个壳基质蛋白基因(*aspein*, *n19*, *nacrein*, *efcbp* 与 *accbp*), 一个胰岛素相关多肽受体基因(*irr*)

与内参基因(*gapdh*)的引物利用 Primer Premier 5.0 软件设计, 利用 Blast 搜索特异性, 并由上海生工合成。相应基因的引物序列与扩增长度以及基因序列号见表 1。

表 1 实验中用到的引物

Tab. 1 Primers used in the study

| 基因             | 引物序列   | 基因序列号    | 扩增长度 |
|----------------|--|----------|------|
| <i>aspein</i>  | F CACCAAAATGAAGGGGATAGC<br>R CATCACTGGGCTCCGATACTA       | AB094512 | 149  |
| <i>n19</i>     | F TGGCAACAAAGCAGTCATAACCG<br>R GGCGTCGTTGTAGCATTGAAGG    | AB332326 | 124  |
| <i>nacrein</i> | F TGTTCATCTAACACCGGAGATG<br>R TGAAGAACCCTTCTTGACACCT     | D83523   | 150  |
| <i>efcbp</i>   | F GACAATGACGGGAAACTCTCA<br>R CTTACGTGACCATCACCGTCT       | DQ494416 | 110  |
| <i>accbp</i>   | F TAGCCAAATGTGATTATCCCGAAGC<br>R TCAAGGAGAAGCCCATAGAGACG | DQ473430 | 123  |
| <i>irr</i>     | F AGACGGAGACGGGAAAGAAG<br>R CCCCCAACAGACGTACAACA         | 未提交      | 140  |
| <i>gapdh</i>   | F TGGCATTGAGGAAGGTTTG<br>R GTGGAGGATGGTATGATGTTAGA       | AB205404 | 129  |

#### 1.5 实时定量 PCR

实时定量 PCR 反应程序在 Rotor gene 3000 (Corbett Research)仪器上进行。20 $\mu$ L 反应体系包含 10 $\mu$ L 2  $\times$  SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> (TaKaRa), 0.4 $\mu$ L 上游引物(10mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup>), 0.4 $\mu$ L 下游引物(10mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup>), 1 $\mu$ L 稀释的 cDNA 模板, 8.2 $\mu$ L 双蒸水。反应条件为 95 预变性 1min; 95 变性 5s, 58 退火 15s, 72 延伸 30s, 40 个循环; 反应结束后, 产生一条溶解曲线(50—99 )以确保产物的特异性。所有的分析都基于各 PCR 产物的 Ct 值, 利用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 方法<sup>[21]</sup>来分析计算各基因的表达水平。

#### 1.6 数据分析

利用 PASW Statistics 18 的单因素方差分析 (ANOVA)处理实时定量所得数据, Tukey HSD 检验比较不同组间均值的差异。所有基因在对照组珍珠贝中的表达水平平均定义为 1, mRNA 的相对表达量用均值 $\pm$ 标准差(SD)表示, 以  $P < 0.05$  为统计学差异显著。

## 2 实验结果与分析

#### 2.1 胰岛素相关多肽受体基因(*irr*)表达变化

由图 1 可以看出, HGH 与 IGF- 处理后胰岛素相关多肽受体基因(*irr*)在外套膜中的表达水平分别为对照组的 1.35 与 1.69 倍( $P < 0.05$ ); 而 IGF- 处理的珍珠贝中 *irr* 基因表达的增量显著高于比 HGH 处理组( $P < 0.05$ )。

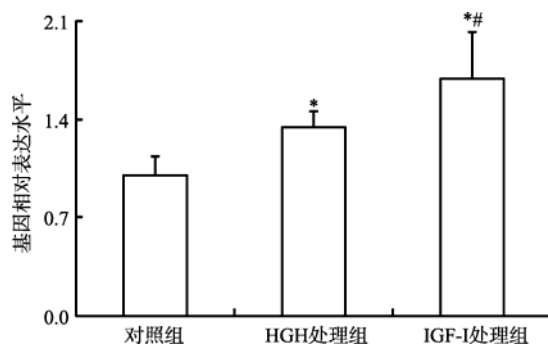


图 1 生长激素(HGH)与胰岛素样生长因子- (IGF- )处理后 *irr* 基因表达

\*:  $P < 0.05$ ; HGH 处理组或 IGF- 处理组与对照组有显著性差异;

#:  $P < 0.05$ ; IGF- 处理组与 HGH 处理组有显著性差异( $N=3$ )

Fig. 1 Study on *irr* gene expression in the human recombinant growth hormone (HGH) injection group, insulin-like growth factor- (IGF- ) injection group, and the reference (R) group.

#### 2.2 壳基质蛋白基因表达变化

在外源生长激素与胰岛素样生长因子- 的作用下, *nacrein* 基因表达量均显著增高(分别为对照组的 2.19 和 2.05 倍)( $P < 0.05$ ), 而在 HGH 与 IGF- 处理组中该基因的表达水平无显著性差异( $P > 0.05$ ); 另外几种基质蛋白基因(*n19*, *aspein*, *accbp*)的表达水平略有下降( $P < 0.05$ )。而 HGH 与 IGF- 对基质蛋白基因表达的抑制作用也不相同: 对于 *n19* 基因, 其表达量受 IGF- (0.33)抑制作用大于 HGH(0.74) ( $P < 0.05$ ); 而对于 *aspein* 和 *accbp* 基因表达, HGH 的抑制作用(0.49 与 0.39)明显大于 IGF- (0.67 与 0.61)( $P < 0.05$ ); *efcbp* 表达水平与对照组相比没有显

著性变化( $P>0.05$ )(图 2)。

利用 SPSS 软件对基因表达水平做相关性分析

表明, 发现 *accbp* 与 *aspein* 基因表达具有极显著的相关性( $r=0.96$ )(图 3)。

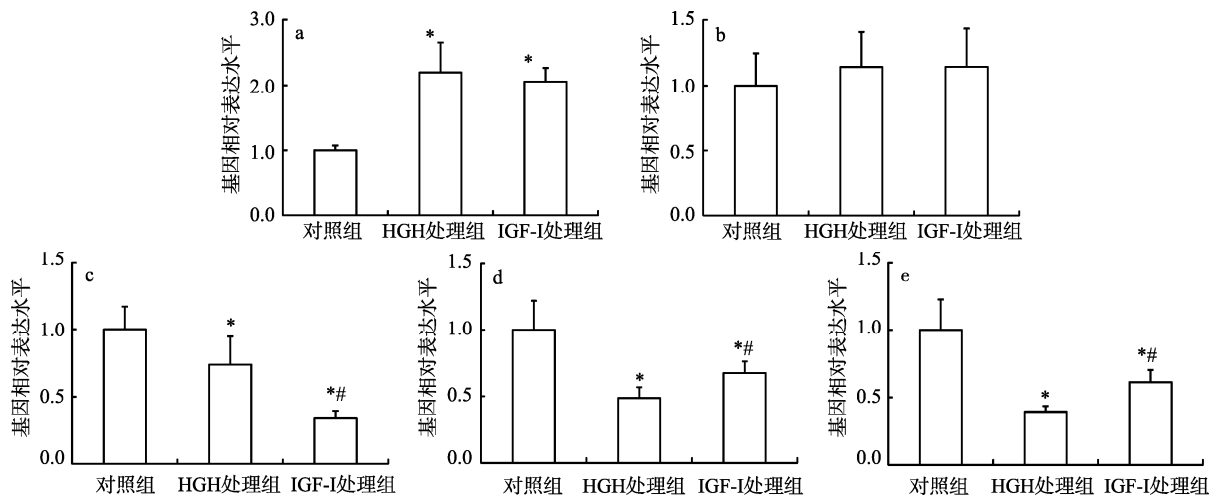


图 2 生长激素(HGH)和胰岛素样生长因子- (IGF- )处理后 5 种基质蛋白基因(*nacrein*, *efcbp*, *n19*, *aspein* 与 *accbp*)的表达

a: *nacrein* 基因; b: *efcbp* 基因; c: *n19* 基因; d: *aspein* 基因; e: *accbp* 基因; \*:  $P<0.05$ , GHG 处理组或 IGF- 处理组与对照组相比有显著性差异; #:  $P<0.05$ , IGF- 处理组与 GHG 处理组相比有显著性差异( $N=3$ )

Fig. 2 Study on shell matrix protein gene (*nacrein*, *efcbp*, *n19*, *aspein*, and *accbp*) expressions in the human recombinant growth hormone (HGH) injection group, insulin-like growth factor- (IGF- ) injection group, and the reference group

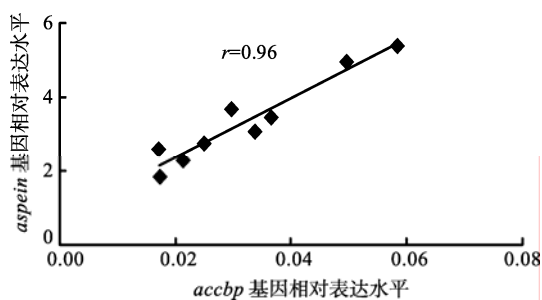


图 3 *aspein* 与 *accbp* 基因相对表达水平的相关性( $N=9$ )

Fig. 3 Correlation between *aspein* and *accbp* gene expressions ( $N=9$ )

### 3 讨论

#### 3.1 胰岛素相关多肽受体基因(*irr*)表达变化

外源性 GH 和 IGF- 都能够调节动物生长、发育等代谢过程。GH 在组织和细胞水平发挥作用的调节方式有两种: 一方面, GH 与靶细胞膜表面的生长激素受体(growth hormone receptor, GHR)结合, 由 GHR 介导将信号传入细胞内从而产生一系列的生理效应<sup>[22]</sup>。另一方面, GH 的生理作用主要由 IGF- 介导<sup>[23]</sup>, 进而通过 IGF 受体起作用<sup>[24]</sup>。胰岛素相关多肽及其受体基因在一些无脊椎动物中已被分离克隆到, 并证实其具有调控生长和发育的作用<sup>[8, 25-30]</sup>。Homano 等<sup>[9]</sup>构建了双壳类太平洋牡蛎内

脏神经节消减文库, 克隆分离了胰岛素相关多肽的 cDNA, 分析了该基因的季节性表达变化。胰岛素相关多肽受体基因也在该种克隆到, 该受体基因与酪氨酸激酶保守区有较高的同源性, 参与壳的形成, 并参与繁殖和发育<sup>[6, 31]</sup>。本实验室也在马氏珠母贝中克隆到了与 CIR 同源的胰岛素相关多肽受体基因(*irr*), 说明在马氏珠母贝中存在胰岛素相关多肽及其受体调控通路, 来调节激素作用下贝壳的生长和发育。本研究结果表明, 在注射 HGH 与 IGF- 的作用下, *irr* 基因在外套膜组织中的表达均有显著性的增加, 这与胰岛素相关多肽受体在调节通路中的作用相一致。

#### 3.2 壳基质蛋白基因表达研究

之前的预实验中, HGH 与 IGF- 用 1% BSA 配制成  $100\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的原液, 选用大小体重相近的马氏珠母贝, 使用浓度为  $10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 HGH 与 IGF- , 3 个剂量浓度  $0.5\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ ,  $1\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$  与  $2\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$  注射珍珠贝, 对照组注射 1% BSA 溶液。经 3 个月的养殖, 注射剂量为  $1\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$  组的壳高和体重显著大于其他组别 ( $P<0.05$ ), 其他组别间差异不明显, 表明外源生长激素对珍珠贝有一定的促生长作用, 同时也筛选了一个比较适宜的 HGH 与 IGF- 注射剂量, 分别为  $10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  和  $1\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

Nacrein 蛋白在两个矿化层形成过程中均发挥

作用<sup>[32]</sup>, 可以作为衡量生物矿化细胞代谢水平的标记物, 其高分泌水平对应珍珠贝的高生长速率<sup>[33]</sup>。实验结果显示, HGH 与 IGF- 处理下, *nacrein* 基因表达水平均有升高, 说明生长激素和胰岛素样生长因子- 都可以促进马氏珠母贝的生长代谢水平, 之前的研究也表明胰岛素相关多肽可以促进软体动物的生长, 并且还可以刺激扇贝和蜗牛等软体动物外套膜边缘细胞的蛋白质合成以及调节外套膜与壳的生长与再生<sup>[5,34]</sup>。N19 主要在珍珠层中起作用<sup>[16]</sup>, *Aspein* 直接负责贝壳棱柱层的形成过程<sup>[12]</sup>, *ACCBP* 被证明在两个矿化层中均有调节作用<sup>[19]</sup>。*n19*、*aspein* 与 *accbp3* 个基质基因的表达在 HGH 或 IGF- 处理后均下调, 说明这 3 个基因的表达受到激素调节通路的抑制。总体来说, 生长激素和胰岛素样生长因子- 可以通过胰岛素相关多肽受体通路调节基质蛋白的表达, 进一步调控马氏珠母贝贝壳的生长形成, 但是外源激素对某一特定矿化层生长的促进或抑制作用还需进一步研究。

本研究发现 IGF- 处理组 *irr* 基因表达的升高水平比 HGH 处理组大; 但是对于 *aspein* 和 *accbp* 基因的表达变化, HGH 处理后抑制作用却大于 IGF- 处理组。基于以上实验结果, 推测在生长激素作用下, *aspein* 与 *accbp* 受到类胰岛素相关多肽受体介导的调控之外, 还存在着其他的调节机制, 该机制使 *aspein* 和 *accbp* 基因表达水平变化强于 IGF- 处理组, 例如 GH 还可以通过 GHR 介导的调节通路来发挥其生物学功能<sup>[22]</sup>等, 但是由于目前在马氏珠母贝中尚未分离鉴定出 GHR 或类似的生长激素受体基

因, 所以还无法进行这方面的定论。此外, 本实验分析发现, *aspein* 与 *accbp* 的表达具有显著的相关性, 说明这两个基因在激素调节通路中可能受同一个上游因子的调控。

EFCBP 作为一种钙离子连接蛋白参与到马氏珠母贝两个矿化层的形成过程<sup>[18]</sup>, 在生长激素与胰岛素样生长因子- 处理组高生长代谢水平的珍珠贝中, 应该需要更多的钙离子来满足它们的快速生长, 但是相比对照组, *efcbp* 基因的表达水平并未升高, 因此, 激素处理组珍珠贝应该存在另外含量较高的基质蛋白提供钙离子, 例如 *Nacrein* 也具有钙离子连接功能<sup>[17]</sup>, 同时 *nacrein* 基因在激素处理组也具有较高的表达。激素处理组中 *efcbp* 基因表达水平与对照组相比未发生显著性变化, 推测该蛋白的表达可能不受生长激素和类胰岛素生长因子- 作用通路的调控。本实验室之前未发表的实验数据显示 *efcbp* 基因的表达水平在马氏珠母贝不同大小个体之间没有显著性差异, 说明该基因在珍珠贝个体生长发育过程中的表达比较稳定。然而, 在马氏珠母贝贝壳损伤后修复的加速生长过程中, *efcbp* 基因的表达量出现明显的上调<sup>[18]</sup>, 说明激素注射引发的快速生长与正常状态下的快速生长过程具有不同的基因调控机制。

本研究首次证明了外源生长激素与胰岛素样生长因子对马氏珠母贝贝壳生长形成相关基因的表达有影响, 说明在马氏珠母贝中存在激素调节通路, 调控其贝壳的生长和发育, 但这种调控作用的机制还有待进一步研究。

## 参考文献

- [1] BLUM W F, ALBERTSSON K W, ROSBERG S, et al. Serum levels of insulin-like growth factor I (IGF- ) and IGF binding protein 3 reflect spontaneous growth hormone secretion[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1993, 76(6): 1610-1616.
- [2] MANDEL S, MORELAND E, NICHOLS V, et al. Changes in insulin-like growth factor- (IGF- ), IGF-binding protein-3, growth hormone (GH)-binding protein, erythrocyte IGF- receptors, and growth rate during GH treatment[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1995, 80(1): 190-194.
- [3] GOMOT A, GOMOT L. Neurohormonal control of body and shell growth of the snail *Helix*[M]//ALLEMAND D, CUIF J. Monaco: Bull de l'Institut Oceanogr, 1995: 141-149.
- [4] SALEUDDIN A S M, KHAN H R, SEVALA M, et al. Hormonal control of confirmed shell growth in the snail *Helisoma duryi* (Mollusca: Gastropoda)[M]//SUGA S, NAKAHARA H. Mechanisms and phylogeny of mineralization in biological systems. Tokyo: Springer, 1991: 149-169.
- [5] GIARD W, LEBEL J M, BOUCAUD E C, et al. Effects of vertebrate growth factors on digestive gland cells from the mollusc *Pecten maximus* L.: An in vitro study[J]. J Comp Physiol B, 1998, 168(2): 81-86.
- [6] GRICOURT L, BONNEC G, BOUJARD D, et al. Insulin-like system and growth regulation in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: hrIGF-I effect on protein synthesis of mantle edge cells and expression of an homologous insulin receptor-related receptor[J]. Gen Comp Endocr, 2003, 134(1): 44-56.
- [7] 金启增, 黎辉, 何慧. 珍珠生长激素在合浦珠母贝育珠中

- 的作用[J]. 热带海洋, 1998, 17(4): 44-50.
- [8] KELLNER C K, MIALHE E, MATHIEU M. Identification of insulin-like peptides in cerebral ganglia neurosecretory cells of the mussel *Mythus edulis*[J]. Tissue Cell, 1994, 26(6): 891-899.
- [9] HAMANO K, AWAJI M, USUKI H. cDNA structure of an insulin-related peptide in the Pacific oyster and seasonal changes in the gene expression[J]. J Endocrinol, 2005, 187(1): 55-67.
- [10] WILT F H, KILLIAN C E, LIVINGSTON B T. Development of calcareous skeletal elements in invertebrates[J]. Differentiation, 2003, 71(4-5): 237-250.
- [11] MARIN F, LUQUET G, MARIE B, et al. Molluscan shell proteins: primary structure, origin, and evolution[J]. Curr Top Dev Biol, 2008, 80: 209-76.
- [12] TSUKAMOTO D, SARASHINA I, ENDO K. Structure and expression of an unusually acidic matrix protein of pearl oyster shells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 320(4): 1175-1180.
- [13] SUZUKI M, MURAYAMA E, INOUE H, et al. Characterization of Prismalin-14, a novel matrix protein from the prismatic layer of the Japanese pearl oyster (*Pinctada fucata*)[J]. Biochem J, 2004, 382(1): 205-213.
- [14] SUDO S, FUJIKAWA T, NAGAKURA T, et al. Structures of mollusc shell framework proteins[J]. Nature, 1997, 387: 563-564.
- [15] SAMATA T, HAYASHI N, KONO M, et al. A new matrix protein family related to the nacreous layer formation of *Pinctada fucata*[J]. FEBS Lett, 1999, 462(1-2): 225-229.
- [16] YANO M, NAGAI K, MORIMOTO K, et al. A novel nacre protein N19 in the pearl oyster *Pinctada fucata*[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 362(1): 158-163.
- [17] MIYAMOTO H, MIYASHITA T, OKUSHIMA M, et al. A carbonic anhydrase from the nacreous layer in oyster pearls[J]. Proc Natl Acad Sci, 1996, 93(18): 9657-9660.
- [18] HUANG J, ZHANG C, MA Z J, et al. A novel extracellular EF-hand protein involved in the shell formation of pearl oyster[J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1770(7): 1037-1044.
- [19] MA Z J, HUANG J, SUN J, et al. A novel extrapallial fluid protein controls the morphology of nacre lamellae in the pearl oyster, *Pinctada fucata*[J]. J Biol Chem, 2007, 282(32): 23253-23263.
- [20] ZHANG C, ZHANG R Q. Matrix proteins in the outer shells of molluscs[J]. Mar Biotechnol, 2006, 8(6): 572-586.
- [21] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [22] 邓利, 张为民, 林浩然. 生长激素受体的研究进展[J]. 动物学研究, 2001, 22(3): 226-230.
- [23] LIU J L, LEROITH D. Insulin-like growth factor I is essential for postnatal growth in response to growth hormone[J]. Endocrinology, 1999, 140(11): 5178-5184.
- [24] 许光武, 俞茂华. 胰岛素样生长因子[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2000, 16(1): 52-55.
- [25] LARDANS V, COPPIN J F, VICOONE J, et al. Characterization of an insulin receptor-related receptor in *Biomphalaria glabrata* embryonic cells[J]. Biochim Biophys Acta, 2001, 1510(1-2): 321-329.
- [26] NISHIDA Y, HATA M, NISHIZUKA Y, et al. Cloning of a drosophila cDNA encoding a polypeptide similar to the human insulin receptor precursor[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1986, 141(2): 474-481.
- [27] KIMURA K D, TISSENBAUM H A, LIU Y, et al. daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*[J]. Science, 1997, 227(5328): 942-946.
- [28] GOMOT A, GOMOT L, MARCHAND C-R et al. Immunocytochemical localization of insulin-related peptide(s) in the central nervous system of the snail *Helix aspersa* müller: involvement in growth control[J]. Cell Mol Neurobiol, 1992, 12(1): 21-32.
- [29] GRAF R, NEUENSCHWANDER S, BROWN M R, et al. Insulin-mediated secretion of ecdysteroids from mosquito ovaries and molecular cloning of the insulin receptor homologue from ovaries of bloodfed *Aedes aegypti*[J]. Insect Mol Biol, 1997, 6(2): 151-163.
- [30] SONETTI D, VAN HEUMEN W R A, ROUBOS E W. Light- and electron-microscopic immunocytochemistry of a molluscan insulin-related peptide in the central nervous system of *Planorbarius corneus*[J]. Cell Tissue Res, 1992, 267(3): 473-481.
- [31] GRICOURT L, MATHIEU M, KELLNER K. An insulin-like system involved in the control of Pacific oyster *Crassostrea gigas* reproduction: hrIGF-I effect on germinal cell proliferation and maturation associated with expression of an homologous insulin receptor-related receptor[J]. Aquaculture, 2006, 251(1): 85-98.
- [32] MIYAMOTO H, MIYOSHI F, KOHNO J. The carbonic anhydrase domain protein Nacrein is expressed in the epithelial cells of the mantle and acts as a negative regulator in the calcification in the mollusc *Pinctada fucata*[J]. Zool Sci, 2005, 22(3): 311-315.
- [33] GONG N P, LI Q, HUANG J, et al. Culture of outer epithelial cells from mantle tissue to study shell matrix protein secretion for biomineralization[J]. Cell Tissue Res, 2008, 333(3): 493-501.
- [34] ABDRAHA A M, Saleuddin A S. Protein synthesis in vitro by mantle tissue of the land snail *Otala lactea*: possible insulin-like peptide function [J]. Can J Zool, 2000, 78(9): 1527-1535.