

文章编号: 1674-5566(2021)01-0001-10

DOI:10.12024/jsou.20200102904

缢蛏 *IGFALS* 基因的表达特征及 IGF 系统对生长的调控作用

熊 娅¹, 牛东红^{1,2,3}, 李 智¹, 彭茂潇¹, 李蓓蓓¹, 吴应晗¹, 李家乐^{1,2,3}

(1. 上海海洋大学 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心, 上海 201306; 3. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306)

摘要: 类胰岛素生长因子 (insulin-like growth factor, IGF) 信号通路在机体的发育、繁殖以及生长等过程中起着重要的调控作用。类胰岛素生长因子酸不稳定亚基 (IGF acid-labile subunit, IGFALS) 是 IGF 系统中的重要一员, 可通过延长 IGF 的半衰期参与 IGF 信号通路的调控。本研究首次在缢蛏转录组数据库中筛选鉴定了两个 *IGFALS* 基因, 包含完整的开放阅读框, 分别命名为 *IGFALSa* 和 *IGFALSb*。*IGFALSa* 基因的 cDNA 序列为 4 809 bp, 编码 996 个氨基酸; *IGFALSb* 基因的 cDNA 序列为 1 925 bp, 编码 546 个氨基酸。在缢蛏不同发育期的表达分析中发现, *IGFALSa* 和 *IGFALSb* 在幼虫的前期发育阶段均只有少量表达, 而随着幼虫的发育, 其表达量逐渐上升; 组织表达分析表明, *IGFALSa* 在外套膜和性腺中高表达, *IGFALSb* 则在水管中高表达。利用不同质量浓度胰岛素短期刺激缢蛏稚贝, 当质量浓度为 10 mg/L 时, 两个 *IGFALS* 基因表达量均显著上调, 其下游基因 *IRS*、*PDK1*、*MPK1* 的表达量也显著上调; 进一步利用 10 mg/L 胰岛素长期喂养缢蛏稚贝, 结果显示其壳长和壳宽的日生长率均显著提升。

关键词: 缢蛏; 胰岛素; 类胰岛素生长因子; 类胰岛素生长因子酸不稳定亚基; 生长; 调控
中图分类号: S 917 **文献标志码:** A

缢蛏 (*Sinonovacula constricta*) 俗称蛏子, 隶属于软体动物门 (Mollusca) 瓣鳃纲 (Lamellibranchia) 真瓣鳃目 (Eulamellibranchia) 竹蛏科 (Solenida) 缢蛏属 (*Sinonovacula*), 广泛分布在我国的福建、浙江、海南以及台湾等地, 是我国主要的经济养殖贝类之一^[1-2], 其养殖年产量可达 80 多万 t^[3]。贝类的生长性状是重要的经济性状, 研究生长性状的分子作用机理, 对加速贝类的分子选育具有重要作用。

类胰岛素生长因子 (insulin-like growth factor, IGF) 系统在胚胎的早期发育、生长以及繁殖方面起着调控作用^[4]。该系统主要包括 IGF、IGF 受体 (IGF receptor, IGF-R), 以及 IGF 结合蛋白 (IGF binding protein, IGF-BP) 和类胰岛素生长因子酸不稳定亚基 (IGF acid-labile subunit, IGFALS)^[5]。IGF 由靶细胞表面的特异性受体介导, 通过自分泌、旁分泌和内分泌的方式来实现

其生物学功能。研究表明, IGF 系统可以通过 MAPK 途径和 PI3K /Akt 参与调节下游转录因子, 进而调控机体的发育、生长以及繁殖等生理过程^[6]。在水产动物中, IGF 系统相关基因的研究主要集中在鱼类, 而在贝类中相对较少, 仅在虾夷扇贝 (*Mizuhopecten yessoensis*)^[7]、合浦珠母贝 (*Pinctada fucata*)^[8]、杂色鲍 (*Haliotis diversicolor* Reeve)^[9] 以及缢蛏^[10] 中有所报道。

IGFALS 作为 IGF 系统中重要的一员, 与 IGF 和 IGF-BP 结合形成异源三聚体后, IGF 的半衰期得到显著延长, 达到原来的 70 多倍^[11]。尽管早在 1992 年 IGFALS 就已在人的肝脏中被分离鉴定^[12], 但相对于 IGF 系统中的配体、受体以及结合蛋白, IGFALS 的研究依然只停留在 IGF 的半衰期方面^[13]。本实验在缢蛏中鉴定了两个 *IGFALS* 基因, 分析了该基因在不同发育阶段和不同组织中的表达规律, 并进一步探究了外源胰岛

收稿日期: 2020-01-11 修回日期: 2020-05-20

基金项目: 国家重点研发计划 (2019YFD0900700); 国家自然科学基金 (31472278)

作者简介: 熊 娅 (1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向为缢蛏 IGF 信号通路。E-mail: 1371514586@qq.com

通信作者: 牛东红, E-mail: dhniu@shou.edu.cn

素对缢蛏 IGF 系统相关基因表达以及稚贝生长的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验所用缢蛏采自浙江省三门县东航水产育苗有限公司生产基地。缢蛏早期发育个体用 300 目滤网收集,包括受精卵期、担轮幼虫期、D 型面盘幼虫期、壳顶幼虫期、匍匐幼虫期、单水管期和双水管期,共 7 个时期。将收集到的样本保存于 1.5 mL RNase-free 离心管中,加入足量 RNastore,4 °C 保存。低温运回实验室,-80 °C 保存备用。

将 1 龄缢蛏带回实验室,在室温 28 °C、盐度 15 的海水中暂养 1 周后,分别取血淋巴、水管、斧足、外套膜、肝胰腺、性腺和鳃等 7 个组织,放入 1.5 mL RNase-free 离心管中,用液氮快速预冷,-80 °C 保存备用。将稚贝带回实验室,用 12 目和 8 目的筛网进行筛选,筛选出大小规格一致的稚贝,在室温 28 °C、盐度 15 的海水中暂养以备后续生长实验使用。

1.2 cDNA 模板链的合成

参照 RNAsimple 总 RNA 提取试剂盒(北京,天根)说明书提取各发育时期以及各组织的总 RNA,并用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性,用 NanoDrop 2000C 来检测 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 以及 RNA 质量浓度。参照 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 以及 PrimeScript® 1st Strand cDNA Synthesis Kit 的试剂盒(TaKaRa)操作要求进行总 RNA 的反转录,得到的 cDNA 模板-20 °C 保存备用。

1.3 IGFALSa/b 基因序列的验证

在缢蛏转录组文库中获得两个 IGFALS 基因片段序列,根据获得片段使用 Primer 5 分别设计上、下游引物,其中 ALSa F1R1、ALSa F2R2 和 ALSa F3R3 是 IGFALSa 基因片段验证所需引物对,ALSb F1R1 和 ALSb F2R2 则是 IGFALSb 基因片段验证所需引物对(表 1),扩增体系为 2 × Taq PCR Master Mix 12.5 μL,上下游引物各 1 μL (10 μmol/L),1.2 节中合成的 cDNA 模板 2 μL 和 RNase-free water 8.5 μL。反应条件为 94 °C 预变性 2 min,94 °C 30 s 变性,54 °C 30 s 复性,72 °C 1

min 延伸,40 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min,4 °C 保存。反应产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳验证后割胶回收,并参照 MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver. 4.0 试剂盒(TaKaRa)说明书进行纯化,将纯化后的 PCR 产物和 PGEM-T easy 载体用 T4 连接酶 16 °C 过夜(16 h)连接,连接产物通过 90 s 热激转化至 DH5α 大肠杆菌中,将菌液接种在不含抗生素的 LB 培养基中,在 37 °C、150 r/min 的摇床中扩培 3 h,取 200 μL 涂板,倒置过夜生长,挑选 5 个阳性克隆送到上海生物工程股份有限公司测序。

使用 DNAMAN 8 以及 NCBI 网站的 BLAST 工具(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)对测序得到的基因片段进行去载体以及序列拼接。开放阅读框和氨基酸预测通过 NCBI 网站的 ORF Finder 工具(<https://ncbiinsights.ncbi.nlm.nih.gov/tag/orffinder/>)获得。蛋白信号肽通过使用 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)进行预测。使用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)预测蛋白的理化性质。使用 TMpred 程序(http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)分析蛋白跨膜结构。使用工具 NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)获得 N 端糖基化位点。使用工具 InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/>)预测氨基酸结构域。

1.4 进化树分析

在 NCBI 网站下载 IGFALS 蛋白序列,使用软件 MEGA 5.0,以邻接法(NJ)构建了缢蛏 IGFALS 与其他物种的系统进化树。所用物种及登录号分别为文昌鱼(*Branchiostoma belcheri*) XP_019618313、牡蛎(*Crassostrea virginica*) XP_022332923、虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*) XP_021351711、海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*) XP_030845376、火鸡(*Meleagris gallopavo*) XP_010717629、小嘴树雀(*Camarhynchus parvulus*) XP_030813748、人(*Homo sapiens*) AAF06774、美洲鲎(*Limulus polyphemus*) XP_013781460、牛(*Bos taurus*) ABE01082、大鼠(*Rattus norvegicus*) NP_445781、猪(*Sus scrofa*) NP_001041651、狗(*Canis lupus familiaris*) XP_547189 和狒狒(*Papio hamadryas*)

AAN86722。

1.5 *IGFALS* a/b 基因在不同发育期和不同组织中的表达

用已验证的 cDNA 基因片段设计荧光定量所用引物,引物设计网站为 <https://www.genscript.com/tools/real-time-pcr-taqman-primer-design-tool>。将 cDNA 模板按梯度稀释(5^0 、 5^{-1} 、 5^{-2} 、 5^{-3} 、 5^{-4} 、 5^{-5} 、 5^{-6})绘制标准曲线,得到扩增效率为 95% ~ 105% 无非特异性扩增产物的引物对(表 1),并将 18S rRNA 作为内参基因。以稀释 5 倍的 cDNA 作为模板,参照 TB Green™ Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒(TaKaRa)操作说明进行基因各发育时期和组织的相对定量分析,反应条件为 95 °C 30 s, 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 40 个循环,在延伸阶段实时采集信号,并在扩增结束后收集熔解曲线荧光信号。

荧光定量数据由软件 Bio-Red CFX Manager V1.6 导出,目的基因和内参基因的相对定量结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。

1.6 不同胰岛素浓度对 IGF 系统相关基因的影响

将胰岛素粉末溶解于 1 mol/L 的 Tris-HCL (pH 6.8, 不含 EDTA) 中,缓缓加入 1 mol/L 的 HCL,直至胰岛素完全溶解,再缓缓加入 1 mol/L 的 NaOH 调节 pH 至 6.8,最终配制成 2.5 mg/mL 的母液,4 °C 保存备用。设置 6 个胰岛素质量浓度实验组,分别为 0、5、10、20、50 和 100 mg/L,每组将 10 只 2 月龄稚贝放入 30 mL 培养皿中,加入盐度 15 的藻液 20 mL,按照设置的实验组分别加入不同质量浓度的胰岛素,并在 24 h 后进行取样,取得样品用液氮快速预冷, -80 °C 保存。

将保存的样品用 1.2 节中的方法进行总 RNA 的提取以及反转录,并在转录组数据库中筛选获得 IGF 系统相关基因序列^[14],分别为类胰岛素受体底物-1 (insulin receptor substrate 1-like, IRS)、3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶-1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1, PDK1) 和丝裂原活化蛋白激酶结合蛋白-1 (Mitogen-activated protein kinase-binding protein-1, MPKP1),通过各基因序列设计荧光定量引物(表 1),采用 1.5 节中的方法检测各基因在不同胰岛素质量浓度下的相对表达量。

表 1 本实验所需引物

Tab.1 Primers for the present study

引物名称 Primers name	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	用途 Purpose
ALSa F1	CGCTGGAAGATGGTAGTT	
ALSa R1	ATCGTTGTAGCGAGCCAG	
ALSa F2	ATGGCGGAAGACCCTAAC	<i>IGFALSa</i>
ALSa R2	GGGAAGTTGGATGAGTCG	序列验证
ALSa F3	CAGAAAAGCAGACGGGACAG	
ALSa R3	GGAGCGATGTACTGAAAACAGTAA	
ALSb F1	TTACGGGCGATGCCTTAC	
ALSb R1	AACCACGGATTGTCGCTG	<i>IGFALSb</i>
ALSb F2	ATTGCGGGAGTTACCAGTG	序列验证
ALSb R2	TAAGTCGTCGGGGAAGCCT	
18S F	TCGGTTCTATTGCGTTGGTTTT	荧光定量
18S R	CAGTTGGCATCGTTTATGCTCA	内参
RT ALSa F	GACAACGAAGCCCGTCTTAC	<i>IGFALSa</i>
RT ALSa R	TTGTTCTGCAGGGCCAGATA	荧光定量
RT ALSb F	CACTACCGACTTCCAATCGC	<i>IGFALSb</i>
RT ALSb R	AGCGTGTAATGGTGCAAGG	荧光定量
RT IRS F	AAGTGGCGAAATCTCCATGC	<i>IRS</i>
RT IRS R	CTCTGGGCCCTCTTCTATG	荧光定量
RT PDK1 F	GTCCTAGAGGTCACCTGGCT	<i>PDK1</i>
RT PDK1 R	ACACACTCCCAATCGAACCT	荧光定量
RT MPKP1 F	AATGGAGGGAGTTGGCATCA	<i>MPKP1</i>
RT MPKP1 R	AGATGGACAAGTGGGTGGAG	荧光定量

1.7 长期摄入胰岛素对于缢蛏日生长率的影响

根据 1.6 节中的实验结果,最终采用 10 mg/L 的胰岛素质量浓度作为长期生长实验的最终质量浓度。挑选大小规格一致且暂养 1 周的稚贝,通过随机抽样法,选择 100 只稚贝用游标卡尺分别测得其平均壳长为(0.338 2 ± 0.038 2) cm,平均壳宽为(0.163 0 ± 0.011 0) cm。设置 3 个组,分别为胰岛素组、Tris-HCL 组以及空白组,每组放置稚贝 150 只。每天定时换水,投喂藻液,并按设置的组别对各组进行相应处理,40 d 以后,用游标卡尺分别测量各组稚贝的壳长壳宽。缢蛏稚贝日生长率计算公式^[15]如下:

$$R_{SLG} = 100 \times (L_n - L_{n-1}) / T \quad (1)$$

$$R_{SWG} = 100 \times (W_n - W_{n-1}) / T \quad (2)$$

式中: R_{SLG} 为壳长日生长率,% ; R_{SWG} 为壳宽日生长率,% ; L_n 为正式实验 40 d 后的稚贝壳长,cm ; L_{n-1} 为正式实验前的稚贝壳长,cm ; W_n 为正式实验 40 d 后的稚贝壳宽,cm ; W_{n-1} 正式实验前的稚贝壳宽,cm ; T 表示实验天数,d。

1.8 统计分析

所有数据采用平均值 ± 标准差表示。使用软

件 SPSS 18.0, 通过单因素方差分析 (ANOVA) 计算各发育期、各组织和不同胰岛素浓度刺激之后的基因表达量差异, 及各实验组日生长率之间的差异, $P < 0.05$ 表示具有显著性差异, 使用 SigmaPlot 12.5 软件绘图。

2 结果

2.1 缢蛏 *IGFALSa/b* 基因序列分析特征

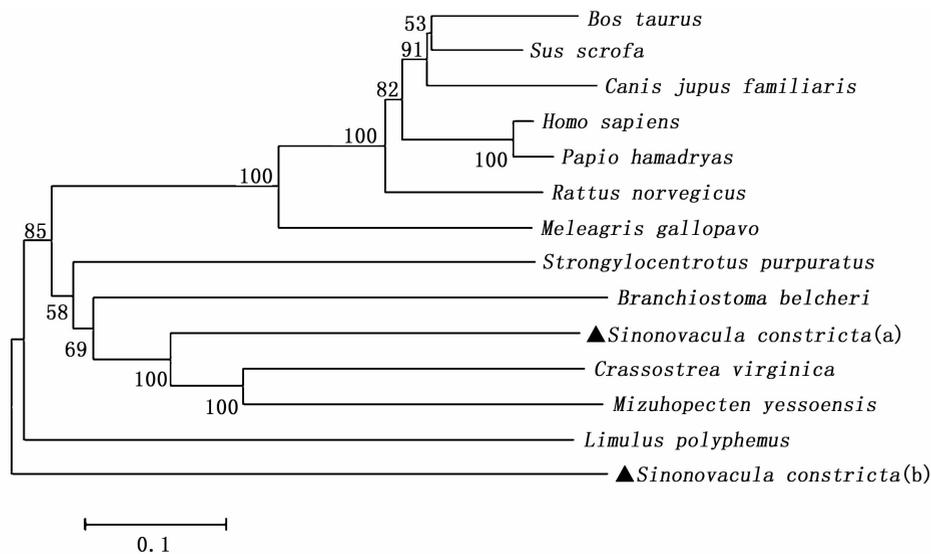
IGFALSa 基因的 cDNA 序列为 4 809 bp (NCBI 登录号: MN910104), 其中包括 5' 非编码区 469 bp, 3' 非编码区 1 349 bp, 包含 Poly A, 开放阅读框 (open reading frame, ORF) 2 991 bp, 共编码 996 个氨基酸。SignalP 预测结果显示, 蛋白 N 端 1~17 个氨基酸构成 *IGFALSa* 的信号肽。预测其蛋白分子量 (MW) 为 112.91 ku, 理论等电点 (pI) 为 8.99。TmPred 预测结果显示, *IGFALSa* 是非跨膜蛋白。糖基化预测结果显示 *IGFALSa* 具有 6 个 N 糖基化位点, 分别为第 22、191、298、346、389 以及 727 个氨基酸。InterPro 的蛋白结构预测显示, 第 179~661 个氨基酸为富含亮氨酸序列, 包括 19 个亮氨酸残基富集 (leucine-rich repeats, LRR) 结构域。其中, 第 18 个 LRR 结构域由 19 个氨基酸组成, 第 6、8、9、10、12、13 个 LRR 结构域由 22 个氨基酸组成, 第 19 个 LRR 结构域由 23 个氨基酸组成, 其余 LRR 结构域均由

24 个氨基酸组成。此外, 第 674~726 位氨基酸为富含亮氨酸的 C-端结构域, 第 748~956 位氨基酸为胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶结构域。

IGFALSb 基因的 cDNA 序列为 1 925 bp (NCBI 登录号: MN910105), 其中包括 5' 非编码区 266 bp, 部分 3' 非编码区 18 bp, ORF1 641 bp, 共编码 546 个氨基酸。信号肽结果预测显示, N 端 1~17 个氨基酸构成 *IGFALSb* 的信号肽。MW 为 62.48 ku, pI 为 8.87。TmPred 预测结果显示, *IGFALSb* 是非跨膜蛋白。糖基化预测结果显示, *IGFALSb* 具有 6 个 N 糖基化位点, 分别位于第 47、74、84、131、394 和 481 个氨基酸。氨基酸结构预测发现: 第 45~410 个氨基酸共有 7 个 LRR 结构域, 其中第 7 个 LRR 结构域由 20 个氨基酸组成, 第 4 和第 6 个 LRR 结构域由 22 个氨基酸组成, 第 1 和第 3 个结构域由 24 个氨基酸组成, 第 2 和第 5 个结构域分别由 26 和 33 个氨基酸组成。

2.2 缢蛏 *IGFALSa/b* 的系统进化树分析

利用 NJ 法构建 *IGFALS* 的系统进化树, 结果显示, 哺乳动物和鸟类聚为一支, 而鱼类以及软体动物的亲缘关系则比较接近。缢蛏 *IGFALSa* 与软体动物中的牡蛎和虾夷扇贝的亲缘关系较近, 聚为一支, 支持概率达到 100%。此外, 缢蛏的 *IGFALSb* 与美洲鲎的亲缘关系较近, 并在进化树中单独聚为一支 (图 1)。



节点上的数字表示重复 1 000 次的自举 (Bootstrap) 检验置信值; ▲表示缢蛏的 *IGFALSa/b*。

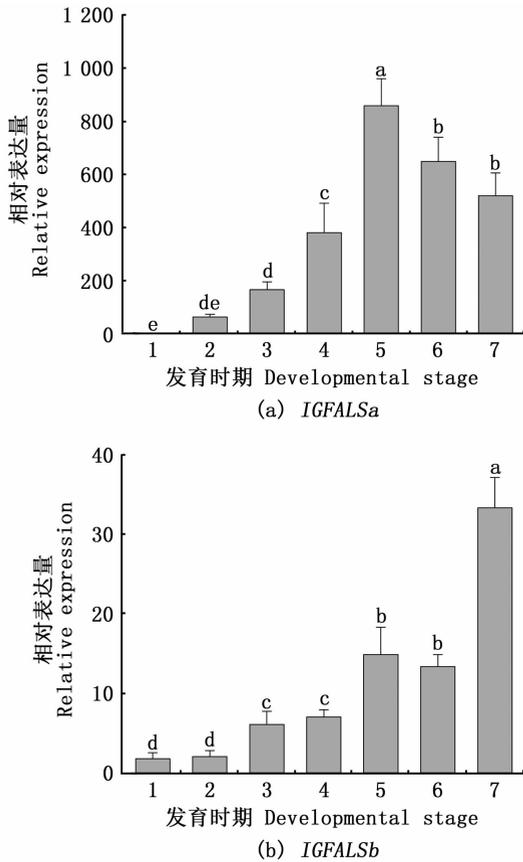
Using the neighbour-joining (NJ) method with 1 000 bootstrap repeats; *IGFALSa/b* of *Sinovacula constricta* are indicated by ▲.

图 1 基于 *IGFALSa/b* 氨基酸序列的系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic analysis based on amino acid sequences of *IGFALSa/b*

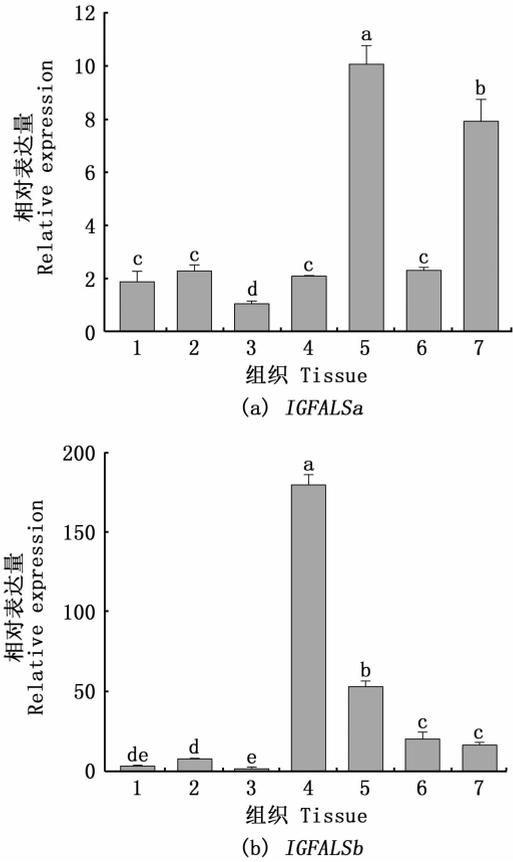
2.3 缢蛏 *IGFALSa/b* 基因在不同发育时期和不同组织中的表达分析

利用 qRT-PCR 技术检测了两个 *IGFALS* 基因在缢蛏的不同发育时期和不同组织中的相对表达情况(图 2,3),其中内参基因为 18S rRNA。结果显示,在缢蛏幼虫发育过程中,*IGFALSa* 主要在壳顶幼虫期、匍匐幼虫期、单水管期以及双水管期表达,在受精卵时期的表达量极低,之后表达量随着幼虫的发育逐渐上升。在不同组织中,*IGFALSa* 主要在外套膜和性腺中表达,在肝胰腺、鳃、血淋巴、水管和斧足中的表达量相对较低。



1. 胚胎期; 2. 担轮幼虫期; 3. D 型面盘幼虫期; 4. 壳顶幼虫期; 5. 匍匐幼虫期; 6. 单水管期; 7. 双水管期; 数据以平均值 ± 标准误 ($n=3$) 的形式呈现; 不同字母代表着显著性差异 ($P<0.05$)。
1. Embryogenesis; 2. Trochophore; 3. Veliger; 4. Umbo larvae; 5. Creeping larvae; 6. Single pipe juvenile; 7. Double pipe juvenile; bars represent the Mean ± SE ($n=3$); different letters represent significant differences ($P<0.05$).

图 2 *IGFALSa/b* 不同发育时期相对表达量
Fig. 2 Relative expression of *IGFALSa/b* at different developmental stages



1. 肝胰腺; 2. 鳃; 3. 血淋巴; 4. 水管; 5. 外套膜; 6. 斧足; 7. 性腺; 数据以平均值 ± 标准误 ($n=3$) 的形式呈现; 不同字母代表着显著性差异 ($P<0.05$)。
1. Liver; 2. Gill; 3. Hemolymph; 4. Siphon; 5. Mantle; 6. Foot; 7. Gonad; bars represent the Mean ± SE ($n=3$); different letters represent significant differences ($P<0.05$).

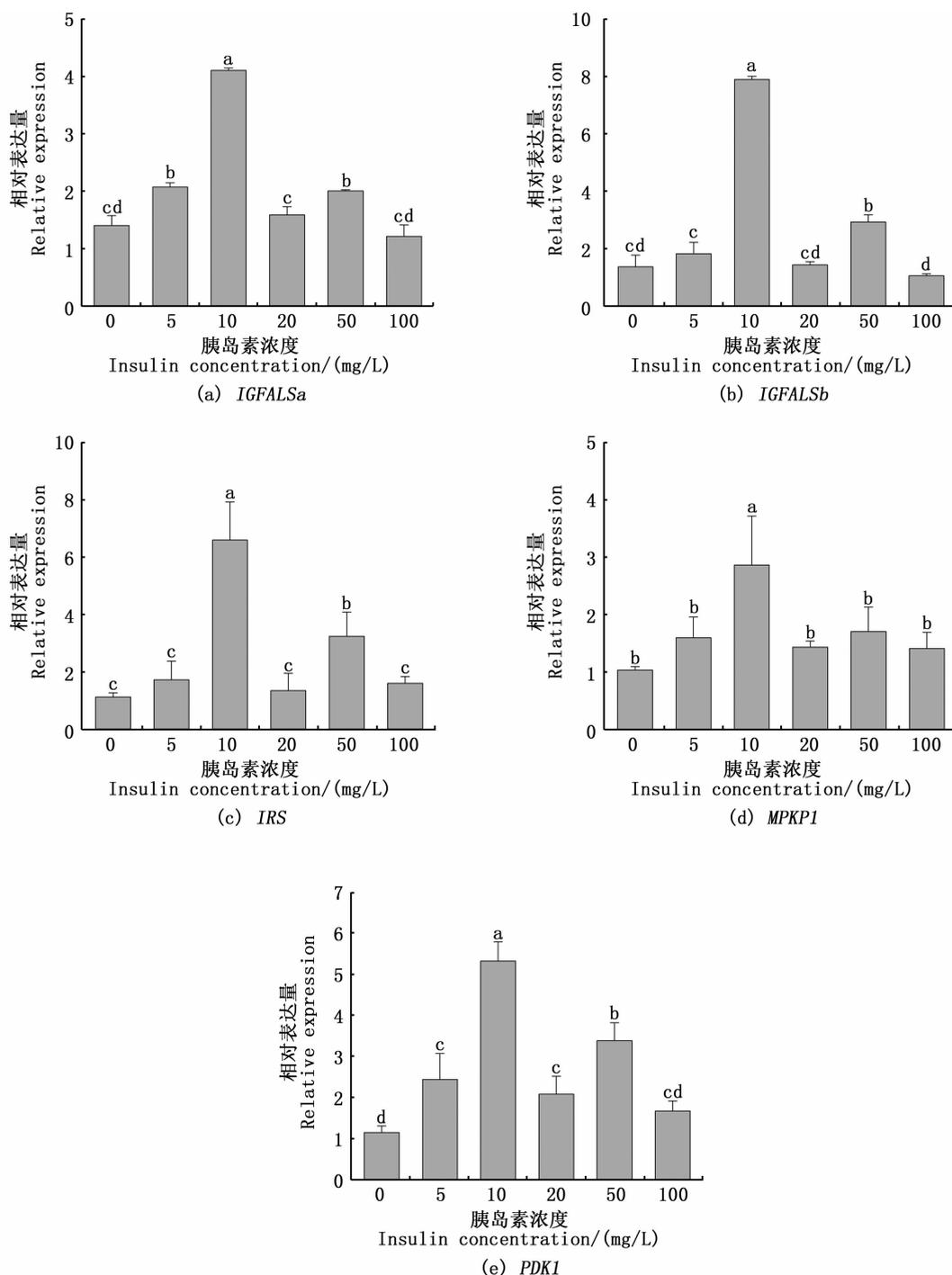
图 3 *IGFALSa/b* 不同组织相对表达量
Fig. 3 Relative expression of *IGFALSa/b* in different tissues

IGFALSb 基因在各个发育时期均有表达,其表达量随着幼虫的发育不断上升,并在双水管期表达量达到最高。在不同组织中,发现 *IGFALSb* 主要在水管、斧足、性腺和外套膜中表达,其中在水管的表达量最高,在肝胰腺、鳃和血淋巴中只有极少量表达。

2.4 胰岛素对缢蛏 IGF 系统基因的影响

利用不同浓度胰岛素对缢蛏稚贝进行喂食,并在 24 h 后检测 *IGFALSa*、*IGFALSb*、*IRS*、*PDK1* 和 *MPKPI* 5 个基因的相对表达情况(图 4)。

结果显示,当胰岛素质量浓度为 10 mg/L 时,*IGFALSa*、*IGFALSb*、*IRS*、*PDK1* 和 *MPKPI* 5 个基因表达量均有显著上升。



数据以平均值 \pm 标准误 ($n=3$) 的形式呈现; 不同字母代表着显著性差异 ($P < 0.05$)。

Bars represent the Mean \pm SE ($n=3$); different letters represent significant differences ($P < 0.05$).

图 4 不同胰岛素浓度对 *IGFALSa/b*、*IRS*、*MPK1*、*PDK1* 表达量的影响

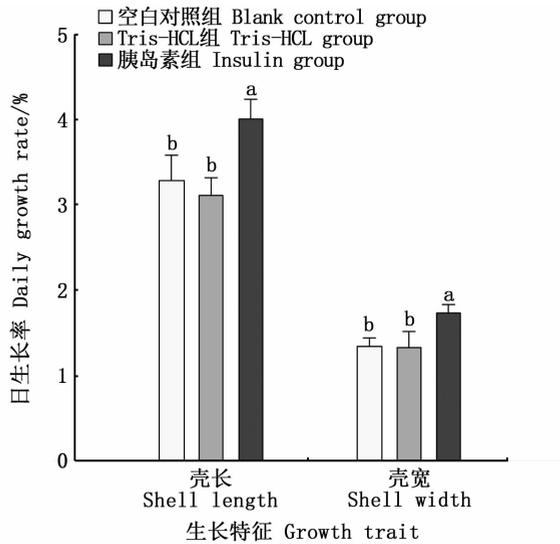
Fig. 4 Effect of different insulin concentrations on *IGFALSa/b*, *IRS*, *MPK1*, *PDK1* expression levels

2.5 长期摄入胰岛素对缢蛏日生长率的影响

为了探究 IGF 系统对缢蛏生长的影响, 在 2.4 节的基础上, 进一步测定长期摄入胰岛素对于缢蛏日生长率的影响 (图 5)。结果显示, 在加

入胰岛素喂养 40 d 后, 缢蛏壳长和壳宽的日生长率都明显高于空白组和 Tris-HCL 组。各组壳长的平均日生长率分别为胰岛素组 4%, 空白组 3.28%, Tris-HCL 组 3.11%。各组壳宽的平均日

生长率分别为胰岛素组 1.73%,空白组 1.34%, Tris-HCL 组 1.33%。



数据以平均值 \pm 标准误 ($n = 10$) 的形式呈现; 不同字母代表显著性差异 ($P < 0.05$)。

Bars represent the Mean \pm SE ($n = 10$); different letters represent significant differences ($P < 0.05$).

图5 长期摄入胰岛素对缢蛏稚贝日生长率的影响
Fig.5 Effect of long-term insulin intake on daily clam growth rate of juveniles

3 讨论

动物生长发育的调控机制一直是发育生物学以及基因表达调控所关注的热点问题。IGF 信号通路能够介导生长激素 (growth hormone, GH) 来调节机体的生理功能^[16]。在脊椎动物中,IGF1 和 IGF2 在细胞的凋亡与增殖分化过程中起着关键作用,IGFALS 则在确保 IGF 对靶组织的作用中扮演着重要角色。有研究表明,果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 中的 IGFALS 与其幼虫的生长和发育相关^[17-18]。

本研究首次在缢蛏转录组库中筛选鉴定了两个 *IGFALS* 基因。值得注意的是,目前在人^[12]、小鼠^[19]、牛^[20]以及果蝇^[17]的研究中,仅发现了一个 *IGFALS* 基因。在之前的研究中,首次在缢蛏的 IGF 系统中发现了两个类胰岛素受体 (insulin-like peptide receptor, ILPR)^[10]。推测在贝类中存在独特的 IGF 信号通路系统。通过结构预测分析,发现两个 *IGFALS* 蛋白都包含了多个 LRR 结构域,符合 *IGFALS* 氨基酸序列的主要特征。LRR 可折叠成弧形或马蹄形,参与蛋白质

间的作用。而 *IGFALS* 中的 LRR 结构域主要参与了 IGF 与 IGFBP 之间的结合^[12]。对比缢蛏的两个 *IGFALS* 蛋白结构,发现 *IGFALSa* 的 LRR 结构域更多,且具有富含亮氨酸的 C-端结构域和胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶结构域,推测 *IGFALSa* 在参与蛋白质的结合中起着更重要的作用。

在缢蛏不同发育期的表达分析中,两个 *IGFALS* 基因在幼虫发育前期的表达量都极低,而随着发育时间的延长,表达量逐渐升高。在绵羊和猪的胚胎细胞发育过程中,发育前期几乎检测不到 *IGFALS* 基因的表达,而随着发育时间的增加,*IGFALS* 基因的表达也会逐渐增加^[21-22]。此外,在绵羊出生后的早期发育过程中,*IGFALS* 的表达量与发育时间存在正相关^[21],这与其实验结果一致,表明缢蛏的 *IGFALS* 很可能参与了幼虫的变态发育。在 1 龄缢蛏成体的各组织中,发现 *IGFALSa* 在外套膜中的表达量最高,在性腺中的表达量也比较高,而 *IGFALSb* 则在水管中的表达量最高,其次是外套膜,揭示 *IGFALSa* 和 *IGFALSb* 在缢蛏成体的繁殖和生长中发挥着不同的功能。

在不同质量浓度胰岛素对 *IGFALS* 表达模式的影响中,当胰岛素刺激 24 h 后,*IGFALSa* 以及 *IGFALSb* 的表达量均在质量浓度为 10 mg/L 时有极显著的上升,而当质量浓度达到 20 mg/L 时,基因表达量基本恢复与 0 mg/L 一致,表明胰岛素刺激存在着浓度效应。有研究^[23]表明,在胰岛素的刺激下,大鼠肝脏细胞和 Kupffer 细胞中 *IGFALS* 以及 *IGFBP3* 的表达均有上升,且同样存在剂量依赖性。此外,在不同质量浓度胰岛素的刺激下,两个 *IGFALS* 基因的表达模式相似。在绵羊的胚胎研究中,发现 *IGFALS* 基因的表达会随着发育时间的增加而增加^[21],而在怀孕 10 d 的大鼠体内,*IGFALS* 的含量是未怀孕大鼠的 3 倍^[24]。结合 *IGFALS* 在缢蛏不同发育时期和不同组织中的表达模式,推测在缢蛏的早期生长发育阶段,两个 *IGFALS* 基因起着协同作用,而在其成体阶段,两个 *IGFALS* 基因分别在缢蛏的繁殖和生长中承担着不同的角色。

在果蝇和线虫的 IGF 信号通路中,配体与受体结合后,会直接与受体底物或者磷酸化的受体继续结合,进而激活相应的蛋白激酶,然后调控下游转录因子^[25-27]。在缢蛏转录组文库中找到了受体底物 IRS,以及 MAPK 途径和 PI3K/Akt 途

径中的两个蛋白激酶相关基因 *MPK1* 和 *PDK1*, 检测了不同胰岛素质量浓度对 *IRS*、*MPK1* 和 *PDK1* 表达模式的影响, 得到与两个缢蛏 *IGFALS* 基因相似的结果。*IRS*、*MPK1* 和 *PDK1* 这 3 个基因均在胰岛素质量浓度为 10 mg/L 时表达量显著上升, 表明缢蛏的 IGF 信号通路与 MAPK 途径和 PI3K/Akt 途径之间存在着调控机制, 这与之前的研究^[6]类似。在本实验中, 以质量浓度 10 mg/L 的胰岛素长期喂养缢蛏稚贝, 发现其壳壳宽的日生长率都高于对照组, 这与胰岛素质量浓度实验中各基因表达模式结果相符。同样, 在小鼠的胚胎中将 *IGFALS* 基因过表达后, 对其出生后的生长产生了显著影响^[28]。

综上所述, 本研究筛选鉴定了缢蛏两个 *IGFALS* 基因 (*IGFALSa* 和 *IGFALSb*), 这 2 个基因均在缢蛏幼虫发育前期痕量表达, 在发育后期表达量显著增加, 且 *IGFALSa* 在外套膜和性腺中高表达, 而 *IGFALSb* 则在水管中高表达。当受到质量浓度为 10 mg/L 的胰岛素刺激时, 两个 *IGFALS* 基因表达量显著上升, 且影响 IGF 信号通路下游基因 *IRS*、*MPK1* 和 *PDK1*, 并促进缢蛏稚贝的生长。研究结果为阐明 IGF 信号通路在贝类发育和生长方面的作用机制提供了参考。

参考文献:

- [1] 李浩, 薛宝宝, 李炼星, 等. 缢蛏快长选育系早期生长性状的遗传参数估计[J]. 海洋渔业, 2018, 40(3): 342-350.
- LI H, XUE B B, LI L X, et al. Heritability estimates for growth traits at the earlier stage of the fast-growth selected line of *Sinonovacula constricta*[J]. Marine Fisheries, 2018, 40(3): 342-350.
- [2] NIU D H, XIONG Y, PENG M X, et al. Hemolytic reactions in the hemolymph of bivalve *Sinonovacula constricta* show complement-like activity[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 79: 11-17.
- [3] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2019.
- Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, The China Society of Fisheries. China fishery statistical yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2019.
- [4] 谢淑娟, 牛东红, 阮海灯, 等. 缢蛏 *IGFBP* 基因结构及生长性状相关 SNP 筛选[J]. 水产学报, 2015, 39(6): 799-809.
- XIE S M, NIU D H, RUAN H D, et al. Molecular characterization of *IGFBP* and association analysis with growth traits in the razor clam *Sinonovacula constricta* [J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(6): 799-809.
- [5] 郑凯迪. 斑马鱼 *Igfals* 的表达、转录调控及功能研究[D]. 重庆: 西南大学, 2010.
- ZHENG K D. Expression, transcriptional regulation and function of insulin-like growth factor acid-labile subunit (*Igfals*) in zebrafish[D]. Chongqing: Southwest University, 2010.
- [6] KIDO Y, NAKAE J, ACCILI D. Clinical review 125: the insulin receptor and its cellular targets [J]. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2001, 86(3): 972-979.
- [7] 封利颖. 虾夷扇贝 *IGFBP5*、*IGF2BP2* 基因克隆、表达分析及与生长相关的 SNP 位点筛查[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.
- FENG L Y. *IGFBP5* and *IGF2BP2* genes in Yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*): molecular cloning, expression analysis and identification of SNPs associated with growth traits[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013.
- [8] ZHANG H, SHI Y, HE M X. Molecular identification of an insulin growth factor binding protein (*IGFBP*) and its potential role in an insulin-like peptide system of the pearl oyster, *Pinctada fucata* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2017, 214: 27-35.
- [9] 张龙辉. *IGFBP4*、*5,7* 和胰岛素样蛋白在杂色鲍幼虫附着变态过程中的作用研究[D]. 厦门: 集美大学, 2014.
- ZHANG L H. *IGFBP4*、*5,7* and insulin-related peptide roles larval settlement and metamorphosis in the small abalone *Haliotis diversicolor* [D]. Xiamen: Jimei University, 2014.
- [10] 谢淑娟. 缢蛏类胰岛素生长因子系统 3 个基因表达特征及功能初步分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2018.
- XIE S M. Expression characteristics and preliminary functional analysis of three genes in the insulin-like growth factor system of razor clam *Sinonovacula constricta* [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2018.
- [11] 李贵林, 牛丽莉, 刘海峰, 等. 哺乳动物胰岛素样生长因子酸不稳定亚基的结构与功能[J]. 遗传, 2015, 37(12): 1185-1193.
- LI G L, NIU L L, LIU H F, et al. Structure and function of insulin-like growth factor acid-labile subunits in mammalian homologues [J]. Hereditas (Beijing), 2015, 37(12): 1185-1193.
- [12] LEONG S R, BAXTER R C, CAMERATO T, et al. Structure and functional expression of the acid-labile subunit of the insulin-like growth factor-binding protein complex [J]. Molecular Endocrinology, 1992, 6(6): 870-876.
- [13] BOISCLAIR Y R, RHOADS R P, UEKI I, et al. The acid-labile subunit (ALS) of the 150 kDa IGF-binding protein complex: an important but forgotten component of the circulating IGF system [J]. Journal of Endocrinology, 2001,

- 170(1): 63-70.
- [14] NIU D H, WANG F, XIE S M, et al. Developmental transcriptome analysis and identification of genes involved in larval metamorphosis of the razor clam, *Sinonovacula constricta* [J]. Marine Biotechnology, 2016, 18(2): 168-175.
- [15] PENG M X, YE B, LIU X J, et al. Effects of alkalinity and pH on survival, growth, and enzyme activities in juveniles of the razor clam, *Sinonovacula constricta* [J]. Frontiers in Physiology, 2018, 9: 552.
- [16] 鲍丽颖, 黄耕培. GH-IGF-I 轴与骨发育的研究进展[J]. 天津体育学院学报, 2002, 17(2): 60-62.
- BAO L Y, HUANG G P. The study progress of GH-IGF-I axis and bone development[J]. Journal of Tianjin Institute of Physical Education, 2002, 17(2): 60-62.
- [17] SWANSON L E, YU M, NELSON K S, et al. *Drosophila convoluted/dALS* is an essential gene required for tracheal tube morphogenesis and apical matrix organization [J]. Genetics, 2009, 181(4): 1281-1290.
- [18] ARQUIER N, GÉMINARD C, BOUROUIS M, et al. *Drosophila ALS* regulates growth and metabolism through functional interaction with insulin-like peptides [J]. Cell Metabolism, 2008, 7(4): 333-338.
- [19] BOISCLAIR Y R, SETO D, HSIEH S, et al. Organization and chromosomal localization of the gene encoding the mouse acid labile subunit of the insulin-like growth factor binding complex [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93(19): 10028-10033.
- [20] KIM J W, RHOADS R P, SEGOALE N, et al. Isolation of the cDNA encoding the acid labile subunit (ALS) of the 150 kDa IGF-binding protein complex in cattle and ALS regulation during the transition from pregnancy to lactation [J]. Journal of Endocrinology, 2006, 189(3): 583-593.
- [21] RHOADS R P, GREENWOOD P L, BELL A W, et al. Organization and regulation of the gene encoding the sheep acid-labile subunit of the 150-kilodalton insulin-like growth factor-binding protein complex [J]. Endocrinology, 2000, 141(4): 1425-1443.
- [22] LEE C Y, KWAK I, CHUNG C S, et al. Molecular cloning of the porcine acid-labile subunit (ALS) of the insulin-like growth factor-binding protein complex and detection of ALS gene expression in hepatic and non-hepatic tissues [J]. Journal of Molecular Endocrinology, 2001, 26(2): 135-144.
- [23] SCHARF J G, RAMADORI G, BRAULKE T, et al. Cellular localization and hormonal regulation of biosynthesis of insulin-like growth factor binding proteins and of the acid-labile subunit within rat liver [J]. Progress in Growth Factor Research, 1995, 6(2/4): 175-180.
- [24] HWANG D L, LEE P D K, COHEN P. Quantitative ontogeny of murine insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-binding protein-3 and the IGF-related acid-labile subunit [J]. Growth Hormone & IGF Research, 2008, 18(1): 65-74.
- [25] PARRELLA E, LONGO V D. Insulin/IGF-I and related signaling pathways regulate aging in nondividing cells: from yeast to the mammalian brain [J]. The Scientific World Journal, 2010, 10: 161-177.
- [26] KIMURA K D, TISSENBAUM H A, LIU Y X, et al. *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans* [J]. Science, 1997, 277(5328): 942-946.
- [27] CLANCY D J, GEMS D, HARSHMAN L G, et al. Extension of life-span by loss of *CHICO*, a *Drosophila* insulin receptor substrate protein [J]. Science, 2001, 292(5514): 104-106.
- [28] SILHA J V, GUI Y T, MODRIC T, et al. Overexpression of the acid-labile subunit of the IGF ternary complex in transgenic mice [J]. Endocrinology, 2001, 142(10): 4305-4313.

IGFALS* expression characteristics and regulation of IGF system on growth of *Sinonovacula constricta

XIONG Ya¹, NIU Donghong^{1,2,3}, LI Zhi¹, PENG Maoxiao¹, LI Beibei¹, WU Yinghan¹, LI Jiale^{1,2,3}

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shanghai Collaborative Innovation for Aquatic Animal Genetics and Breeding, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Insulin-like growth factor (IGF) signaling pathway plays an important regulatory role in the development, reproduction and growth of the organism. IGF acid-labile subunit (IGFALS) is an important member of the IGF system. After forming a trimer with IGF and IGFBP, IGFALS can extend the half-life of IGF and thus participate in the regulation of IGF system. In this study, two *IGFALS* genes were firstly screened and identified from the razor clam *Sinonovacula constricta* transcriptome, including complete ORF, named *IGFALSa* and *IGFALSb*. The length of *IGFALSa* cDNA sequence is 4 809 bp, encoding 996 amino acids; The length of cDNA sequence of *IGFALSb* gene is 1 925 bp, encoding 546 amino acids. During the developmental periods, *IGFALSa* and *IGFALSb* were only expressed in a small amount in the early developmental stages, and their expression gradually increased with the larval development. In different tissues, *IGFALSa* was highly expressed, specifically in mantle and gonads. *IGFALSb* is highly expressed, specifically in siphon. Short-term stimulation to juveniles was performed with different mass concentrations of insulin. When the mass concentration of insulin was 10 mg/L, both *IGFALS* genes were significantly up-regulated, and the expressions of the downstream genes *IRS*, *PDK1*, and *MPKPI* were also significantly up-regulated. Further feeding the juvenile with 10 mg/L of insulin for 40 days, the daily growth rates of shell length and shell width were significantly improved.

Key words: *Sinonovacula constricta*; insulin; insulin-like growth factor; IGFALS; growth; regulation