

doi: 103969/j.issn.0490-6756.2017.01.027

猪抑胃肽/葡萄糖依赖性促胰岛素释放肽 (GIP)基因的克隆与组织表达分析

程绍臣, 张剑南, 钟宇, 李娟, 王亚军

(四川大学生命科学学院生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610064)

摘要: 本研究采用 RT-PCR 方法, 克隆长白猪(Landrace) GIP 基因全长 cDNA 序列, 并对其在家猪组织中的表达情况进行分析. 结果显示: 长白猪 GIP (*pGIP*) cDNA 全长 435 bp, 编码 144 个氨基酸 GIP 的前体蛋白; 该前体蛋白含有信号肽序列, 经蛋白酶水解后产生 GIP 成熟肽. 与人、小鼠 GIP 表达图谱类似, *GIP* mRNA 也在长白猪小肠及肾脏中有较高水平表达.

关键词: 猪; GIP; 分子克隆; 结构分析; 组织表达

中图分类号: Q78; S828 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2017)01-0161-06

Cloning and tissue expression of gastric inhibitory polypeptide/glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) in pigs

CHENG Shao-Chen, ZHANG Jian-Nan, ZHONG Yu, LI Juan, WANG Ya-Jun

(Key Laboratory of Bio-resources and Eco-environment of Ministry of Education,
College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu, 610064, China)

Abstract: The gastric inhibitory polypeptide/glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) shows the inhibitory effect on gastric acid secretion and incretin action. The aim of this study is to analyze the cDNA sequence of the pig GIP (*pGIP*) gene and further examine its the tissue expression. Result showed that *pGIP* cDNA is 435 bp in length and encodes a 144-amino acid GIP precursor which contains a signal peptide and mature GIP peptide. RT-PCR assay showed that *pGIP* mRNA is highly expressed in kidney and gastrointestinal tract.

Keywords: Pig; GIP; Molecular cloning; Structure analysis; Tissue expression.

1 引言

肠促胰岛素效应(incretin effect)是指肠道分泌激素具有刺激胰腺分泌胰岛素的作用^[1]. 目前, 发现具此效应的肠道分泌激素有胰高血糖素样肽 1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1)和葡萄糖依赖性胰岛素释放肽(glucose-dependent insulinotropic

polypeptide, GIP)等^[2, 3].

GIP 最初从猪小肠中分离获得, 由 42 个氨基酸残基组成, 分子量为 5kD. 早期研究发现 GIP 具有抑制胃酸分泌的作用, 因此被称为抑胃肽 (gastric inhibitory polypeptide, GIP)^[4, 5]. 后来研究发现, GIP 抑制胃酸分泌的有效剂量处于药理水平, 而其肠促胰岛素效应的有效剂量处于生理水平. 因

收稿日期: 2015-05-05

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项 (2009zx08009-145B)

作者简介: 程绍臣(1988-)男, 辽宁大连人, 硕士研究生. E-mail: eric-cheng0417@163.com

通讯作者: 王亚军. E-mail: cdwyjhk@163.com

此, GIP 又被命名为葡萄糖依赖性促胰岛素释放肽以反映其生理活性^[3].

GIP 主要由小肠内分泌 K 细胞产生. 当摄入食物至小肠时, 可刺激机体小肠黏膜 K 细胞释放 GIP, 进入血液循环, 从而刺激胰岛素的释放. GIP 的特异性受体是 GIPR (glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor, GIPR), 隶属于 G 蛋白偶联受体 B1 超家族. GIP 与 GIPR 结合后可激活腺苷酸环化酶(adenylate cyclase, AC), 提高胞内 cAMP 浓度, 进而激活磷脂酶 A2、PI3K/PKB 以及 MAPK 等信号通路^[6, 7]. GIP 通过增加胰岛 β 细胞中 $[Ca^{2+}]$ 浓度, 调控胰岛素基因转录和胰岛素的释放. 另外, GIP 还可以调节胰岛 β 细胞的增殖和存活^[8, 9].

除调节胰岛素分泌外, GIP 还参与其它生理过程调节. 在脂肪细胞中, GIP 可以剂量依赖性调节脂蛋白脂酶活性, 促进脂肪酸合成和脂肪的储存^[10]; 在 GIP 与胰岛素共存的情况下, 可以明显提高脂肪组织的形成^[11]; 在中枢神经系统中, GIP 可以调节神经细胞的增殖和分化, 促进神经信号传递; 体外实验显示 GIP 可以通过激活 GIPR, 增强海马回中神经传递, 提高记忆力和认知能力^[12]. 此外, GIP 还可以促进骨细胞生长、骨形成及调节骨质代谢^[13, 14].

家猪是重要经济动物, 近年来对其生长发育调控的相关研究日益增多^[15, 16]. 鉴于 GIP 在调节脂代谢和胰岛素释放等生理过程的重要作用, 本文以长白猪(Landrace)为研究对象, 旨在克隆 GIP 基因, 分析其序列结构; 利用 RT-PCR 方法分析其组织表达图谱, 为探究 GIP 基因对猪生长、脂代谢、葡萄糖平衡等过程的调节奠定基础.

2 材料与方法

2.1 材料

宿主菌 *E. coli* DH5 α 由本实验室自行制备. 组织总 RNA 提取使用由 Molecular Research Center 生产的 RNazol 试剂盒, 使用 TaKaRa 公司的反转录 PCR 试剂盒(M-MLV kit)获得 cDNA. 克隆载体 pTA-2 连接反应试剂盒、高保真 PCR 反应试剂盒(KOD-Fx kit)购自 TOYOBO 公司, 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Easy Taq 酶购自 TAKARA 公司. PCR 引物合成、核酸测序由北京华大六和股份有限公司完成.

2.2 方法

2.2.1 总 RNA 提取 按试剂盒使用说明进行. 成年长白猪宰杀后, 取各组织于保存于液氮中. 提取组织总 RNA 时, 先取各组织适量在盛有液氮的研钵中充分研磨至粉末状, 转入 1.5 mL 的 EP 管内, 加入 600 μ L RNazol 后充分匀浆裂解. 继而加入焦碳酸二乙酯(DEPC)处理过的超纯水(DEPC-H₂O)240 μ L 涡旋混匀, 室温静置 15 min, 12000 g 离心 15 min. 取约 600 μ L 上至新 1.5 mL EP 管中, 加入 3 μ L 对溴苯甲醚溶液(4-bromoanisole, BAN), 涡旋混匀, 静置 5 min, 12000 g 离心 10 min. 取上清入新离心管, 等体积的异丙醇冰上沉淀 20 min, 之后 12000 g 离心 15 min. 75% 乙醇溶液清洗沉淀 2 次后, 晾干, 用 DEPC-H₂O 溶解沉淀后于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用. 使用 2% 琼脂糖凝胶电泳和 BioPhotometer 6131 型核酸蛋白定量仪检测组织总 RNA 溶液提取额的质量和浓度.

2.2.2 反转录 按 M-MLV 试剂盒使用说明进行. 取 2 μ g 组织总 RNA 和 1 μ L oligo-dT 配制 Mixture 1, 用 DEPC-H₂O 补足总体积至 5 μ L. 取 2 μ L 5 \times Buffer, 0.5 μ L 10mM dNTP, 0.5 μ L MMLV, 2 μ L DEPC-H₂O 配制 Mixture 2. 混匀 Mixture 1 后, 于 70 $^{\circ}$ C 反应 10 min 后冰上静置 2 min; 之后加入 Mixture 2, 混匀, 42 $^{\circ}$ C 反应 90 min, 之后 70 $^{\circ}$ C 加热 10min, 获得 cDNA. 反应结束后, 向反应液中加入 50 μ L MiliQ-H₂O 混匀, -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存.

2.2.3 猪 pGIP cDNA 克隆 本部分实验以家猪小肠组织 cDNA 为模板, 采用 PCR 扩增 pGIP 基因的全长 cDNA. PCR 扩增反应条件如下: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 62 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 68 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 最后延伸 10 min. 然后分别取 2 μ L 反应产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果.

对 PCR 产物进行加 A 反应, 反应体系为: PCR 产物 4.5 μ L, 10 \times A-attachment Mix 0.5 μ L, 反应条件为 60 $^{\circ}$ C 加热 1 h. 将加 A 后的 PCR 产物进行 TA 连接, 反应体系为: 加 A 后反应液 1.5 μ L, 2 \times Ligation Buffer 2.5 μ L, pTA2 载体 0.5 μ L, T4 DNA 连接酶 0.5 μ L, 总反应液体积 5 μ L.

将 TA 连接产物转化宿主菌 *E. coli* DH5 α , 然后利用 pTA-2 载体通用引物和基因特异性引物(pGIP-U2/L2. 见表 1)进行菌落 PCR 筛选, 将筛选到的阳性克隆进行质粒提取, 最后选取阳性克隆

进行双向序列测定。

2.2.4 *pGIP* 的组织表达分析 以长白猪不同组织(大脑、小脑、下丘脑、心脏、肾脏、肝脏、肺、肌肉、卵巢、精巢、垂体、脾脏、脂肪及消化道)的 cDNA 为模版,根据 Ensembl 数据库中猪基因组序列及

前述克隆所得序列信息,设计 *pGIP* 的基因特异性引物(*pGIP-U2/L2*),扩增片段大小为 414 bp,检测 *pGIP* 在各组织中的表达情况,设计引物均位于不同外显子上以排除基因组 DNA 的干扰,并以 *GAPDH* 作为内参基因.引物详细信息见表 1.

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

引物名称 Primer name	引物序列 5' → 3' Primer sequence (5' to 3')
<i>pGIP-rU1</i>	5'- <u>CGGGTACCTA</u> ACCCCTGGAAGATGGT -3'
<i>pGIP-rL1</i>	5'- GCTCTAGAGGTTTGGTCGGGTGCACGG -3'
<i>pGIP-U2</i>	5'- ACCTTCTGTCTGCTGCTGGT -3'
<i>pGIP-L2</i>	5'- AAACCGGAGTCTGCAGAGCT -3'
<i>pGAPDH-U1</i>	5'- ACCACAGTCCATGCCATCAC -3'
<i>pGAPDH-L1</i>	5'- TCCACCACCCTGTGCTGTA-3'

注:下划线表示设计引物时添加的限制性内切酶切位点。

Note: The restriction enzyme sites added to primers are underlined

PCR 反应过程为:94℃ 预变性 2 min;94℃ 变性 30s,退火 30s(*pGIP*: 58℃; *GAPDH*: 58℃),72℃ 延伸(*pGIP*: 50 s; *pGAPDH*: 30 s),扩增 *pGIP* 循环数为 34,扩增 *pGAPDH* 为 26 个循环;循环结束后 72℃ 充分延伸 5 min.

2.2.5 序列比对及同源性分析 对测序结果采用 Lasergene 中的 SeqMan 和 EditSeq 软件对测序结果拼接.利用 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),Ensembl 基因组数据库(<http://www.ensembl.org/index.html>)和 DNAMAN v8.0 软件进行序列比对.通过 SignalP 4.1 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)分析信号肽序列.采用 MEGA5 软件(Neighbor-Joining)方法构建了系统进化树。

3 结 果

3.1 猪 GIP 基因序列扩增

以 *pGIP-rU1/pGIP-rL1* 为上下游引物,长白猪小肠组织 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增,获得预期大小为 440 bp 的条带(图 1).将该片段与 *pTA2* 载体连接后,转化到宿主菌 *E. coli*. DH5 α 中,之后选取阳性克隆,进行测序,获得家猪 *GIP* cDNA 序列。

通过与猪基因组进行比对,发现猪 *pGIP* 基因位于 12 号染色体上,*pGIP* 基因包含 6 个外显子和 5 个内含子,编码区 cDNA 序列长 435 bp,分布于 5 个外显子上,编码含有 144 个氨基酸残基的

GIP 前体蛋白。*pGIP* 与人 *hGIP* (NM_004123.2)、小鼠 *mGIP* (NM_008119.2)、大鼠 *rGIP* (NM_019630.3)、牛 *bGIP* (NM_001166605.1) 的序列一致性分别为 82.77%、76.23%、75.66%、89.10%。

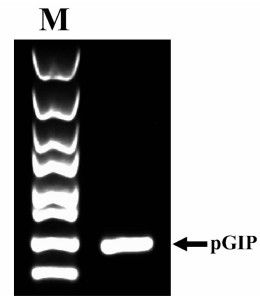


图 1 猪 *pGIP* 基因 cDNA 扩增
Fig. 1 Amplification of *pGIP* cDNA from small intestine

pGIP 基因由 6 个外显子构成,因此,本文将依序命名为 exon 1 (E1)、exon 2 (E2)、exon 3 (E3)、exon 4 (E4)、exon 5 (E5)、exon 6 (E6)。经比对发现,E1 为 *GIP* 基因 5' 端非编码区;翻译起始位点位于 E2 上,E2 主要负责编码信号肽序列及部分 N 端肽;E3 主要编码 *GIP* 成熟肽序列;翻译终止密码子位于 E6 上(图 2)。

3.2 *pGIP* 基因序列分析

家猪 *pGIP* 基因可编码一个含有 144 个氨基酸残基的前体蛋白。猪 *GIP* 前体蛋白和其他哺乳动物的 *GIP* 前体蛋白一级结构氨基酸序列中均含有信号肽序列(图 3);它与人 *hGIP* 前体蛋白(NP_

004114.1)、小鼠 mGIP 前体蛋白(NP_032145.2)、大鼠 rGIP 前体蛋白(NP_062604.1)、牛 bGIP 前体蛋白(NP_001160077.1)的氨基酸序列一致性分别为 60.42%、72.92%、72.22%、69.44%。猪 GIP

成熟肽与人、小鼠、大鼠以及牛的 GIP 成熟肽的氨基酸序列一致性分别为 95.24%、97.62%、95.24%、97.62%。

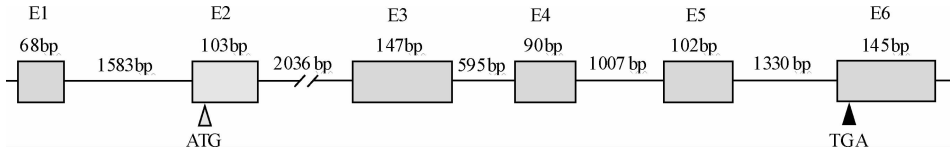


图 2 猪 GIP 基因结构

方框及数字代表外显子区及其编号;横线表示内含子区。

Fig. 2 Exon-intron organization of pig GIP gene

The box represents exon and is numbered accordingly; dash lines represents introns.

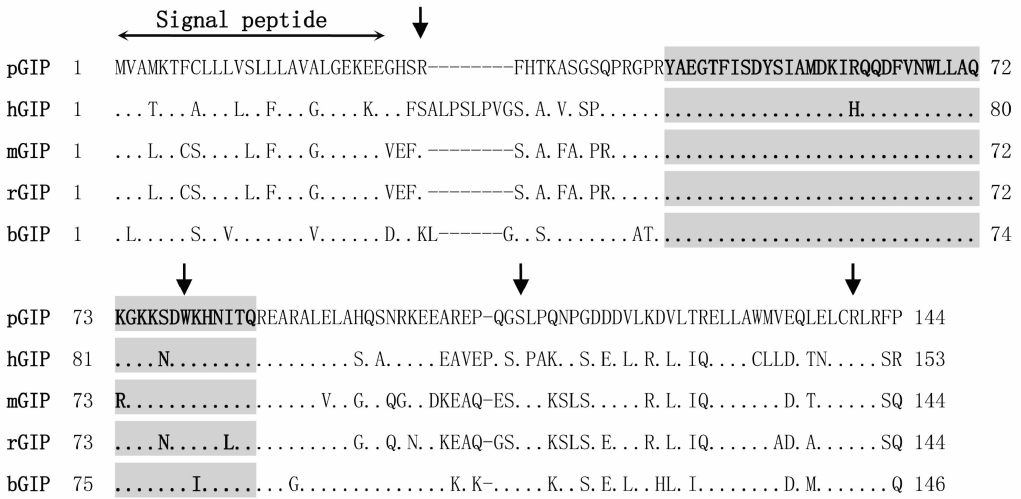


图 3 猪 GIP 前体蛋白序列比对分析

信号肽序列用双向箭头标示. 阴影示 GIP 成熟肽序列. pGIP 代表本文克隆到的猪 GIP 前体蛋白肽链序列; hGIP 代表人(Homo sapiens)的 GIP 前体蛋白; mGIP 代表小鼠(Mus musculus)的 GIP 前体蛋白; rGIP 代表大鼠(Rattus norvegicus)的 GIP 前体蛋白; bGIP 代表牛(Bos taurus)的 GIP 前体蛋白. 箭头标记出内含子插入位点。

Fig. 3 Amino acid sequence alignment of the GIP precursor proteins from different species

The signal peptide is annotated by an arrow; The mature GIP peptide is shaded; pGIP, pig GIP precursor protein. hGIP, human GIP precursor protein; mGIP, mouse GIP precursor protein; rGIP, rat GIP precursor protein; bGIP, bovine GIP precursor protein. Vertical arrows indicate the locations of introns.

利用 MEGA 5.0 软件中的邻接法(Neighbor-joining),初步构建了几种哺乳动物 GIP 的系统进化树(图 4)。结果显示,猪和牛的 GIP 基因之间具更近的进化关系,显示两物种 GIP 基因在起源、结构和功能上密切相关;这一结果也与两物种间具较近亲缘关系的结论一致。

3.3 pGIP 基因组织表达分析

通过设计特异性引物,采用 RT-PCR 方法,本研究检测了 GIP 基因在家猪组织中的表达情况。如图 5 所示,GIP 在猪肾脏中有较高表达;而在下丘脑、心脏、肺、肌肉、卵巢、精巢、垂体、脾脏、脂肪等组织中表达量相对较低;在消化道中,pGIP 在十二指肠、回肠中的 PCR 信号较强;而在消化道其余部分 PCR 信号较弱。此外,在直肠、脾脏等组织

中,也检测到与预期大小不一致的 PCR 扩增条带,暗示 pGIP 可能存在新的剪接变体形式。

4 讨论

GIP 是哺乳动物小肠黏膜内分泌 K 细胞产生的一种肠促胰岛素,具有抑制胃酸分泌、刺激释放胰岛素等功能。本研究成功克隆到猪 pGIP 的全长 cDNA 序列。序列分析发现,猪 GIP 基因由 6 个外显子和 5 个内含子组成。外显子 1 为非编码区,外显子 2~6 包含 CDS 区,可编码信号肽及 GIP 成熟肽区。该结果同其他哺乳类 GIP 基因的结构相同^[17, 18]。CDS 区编码 144 个氨基酸。与人、小鼠、大鼠和牛的 GIP 氨基酸序列比对结果显示,家猪 GIP 同其他哺乳动物 GIP 具有较高同源性,其中,

成熟肽区序列一致性高达 95%~98%。GIP 成熟肽通过 C 端与 GIPR 相结合, 引导 N 端与 GIPR 相互作用。猪 GIP 与其他哺乳类 GIP 序列高度一致性表明: GIP 在结构和功能上具保守性^[19]。

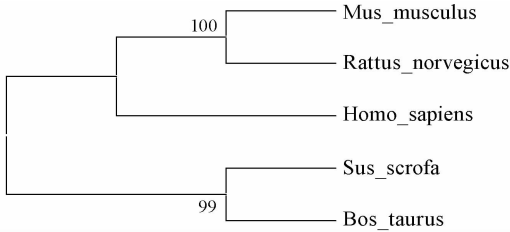


图 4 基于猪与其他几种哺乳物种 GIP 前体氨基酸序列构建的系统进化树

小鼠 (*Mus musculus*)、大鼠 (*Rattus norvegicus*)、人 (*Homo sapiens*)、家猪 (*Sus scrofa*) 及牛 (*Bos taurus*)。

Fig. 4 Phylogeny tree constructed by Neighbor-Joining method based on GIP sequences from several mammalian species

including pig (*Sus scrofa*), mouse (*Mus musculus*), rat (*Rattus norvegicus*), human (*Homo sapiens*) and cow (*Bos taurus*). Numbers at the nodes indicate bootstrap values in percentage.

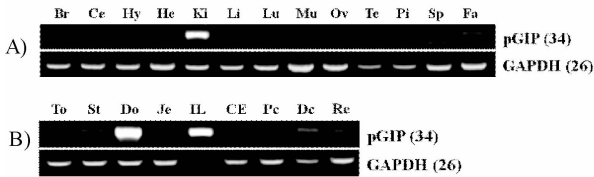


图 5 RT-PCR 检测 pGIP 在猪组织中的表达情况

A) pGIP 在猪组织中的表达分布。大脑 (Br)、小脑 (Ce)、下丘脑 (Hy)、心脏 (He)、肾脏 (Ki)、肝脏 (Li)、肺 (Lu)、肌肉 (Mu)、卵巢 (Ov)、精巢 (Te)、垂体 (Pi)、脾脏 (Sp) 及脂肪 (Fa);

B) pGIP 在消化道中的表达分布。舌 (To)、胃 (St)、十二指肠 (Do)、空肠 (Je)、回肠 (IL)、盲肠 (CE)、近端结肠 (Pc)、远端结肠 (Dc) 及直肠 (Re) 中的表达分布情况。括号中数字表示所用 PCR 循环数。以猪 GAPDH 基因的表达作为内参。

Fig. 5 RT-PCR detection of pGIP mRNA transcripts in adult pig tissues

A) RT-PCR detection of pGIP mRNA transcripts in adult pig tissues including brain (Br), cerebellum (Ce), hypothalamus (Hy), heart (He), kidney (Ki), liver (Li), lung (Lu), muscle (Mu), ovary (Ov), testis (Te), pituitary (Pi), spleen (Sp) and Fat (Fa);

B) RT-PCR detection of pGIP mRNA transcripts in adult pig GI track tissues including tongue (To), stomach (St), duodenum (Do), jejunum (Je), ileum (IL), cecum (CE), proximal colon (Pc), distal colon (Dc) and rectum (Re). Numbers in brackets indicate the PCR cycles used. pGAPDH was amplified as an internal control.

利用 RT-PCR 方法, 本研究亦对 GIP 在猪不同组织以及消化道中表达图谱进行检测。结果显示 GIP 在大脑、小脑、下丘脑、心脏、肝脏、肺、肌肉、卵巢、精巢、垂体、脾脏及脂肪中均有表达, 表明 GIP 在参与多种生理活动调节。GIP 在肾脏中的高表达, 提示其可参与肾脏功能调节。pGIP 在家猪大

脑、小脑和下丘脑中均有一定程度表达, 并且在小脑中可能存在不同形式剪接变体, 提示其在中枢神经系统中, 可能参与调控神经细胞的信号传递、增殖和凋亡等过程^[20]。在消化道各区域中, GIP 在十二指肠和回肠中的表达量较高, 结果与其他哺乳动物中的研究结果基本一致。此外, 在消化道其余各区域中, 也能检测到 GIP 的表达。有意思的是, 在脾脏和直肠中, 还可以观察到比目标条带略小的带, 表明 GIP 在这些组织中, 可能存在新的剪接变体, 但其潜在生理意义仍待阐明。通过对猪 GIP 基因的克隆、组织表达图谱研究, 为探究该基因对猪糖代谢、脂代谢等生理过程的调控奠定一些基础。

参考文献:

- [1] Moore B, Edie E S, Abram J H. On the treatment of Diabetes mellitus by acid extract of Duodenal Mucous Membrane[J]. *Biochemical Journal*, 1906, 1 (1): 28.
- [2] Rehfeld J F. Incretin physiology beyond glucagon-like peptide 1 and glucose-dependent insulinotropic polypeptide; cholecystokinin and gastrin peptides [J]. *Acta physiologica*, 2011, 201(4): 405.
- [3] Baggio L L, Drucker D J. Biology of incretins: GLP-1 and GIP [J]. *Gastroenterology*, 2007, 132 (6): 2131.
- [4] Brown J C, Dryburgh J R. A gastric inhibitory polypeptide II: The complete amino acid sequence [J]. *Canadian journal of biochemistry*, 1971, 49 (8): 867.
- [5] Brown J C, Pederson R A, Jorpes E, *et al.* Preparation of highly active enterogastrone [J]. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 1969, 47 (1): 113.
- [6] Ehse J A, Lee S S T, Pederson R A, *et al.* A New Pathway for Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide (GIP) Receptor Signaling evidence for the involvement of phospholipase A2 in gip-stimulated insulin secretion [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(26): 23667.
- [7] Kubota A, Yamada Y, Yasuda K, *et al.* Gastric inhibitory polypeptide activates MAP kinase through the wortmannin-sensitive and insensitive pathways [J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 1997, 235(1): 171.
- [8] Trümper A, Trümper K, Horsch D. Mechanisms of mitogenic and anti-apoptotic signaling by glucose-dependent insulinotropic polypeptide in beta (INS-

- 1)-cells[J]. *Journal of Endocrinology*, 2002, 174(2): 233.
- [9] Truümpfer A, Truümpfer K, Trusheim H, *et al.* Glucose-dependent insulinotropic polypeptide is a growth factor for β (INS-1) cells by pleiotropic signaling[J]. *Molecular Endocrinology*, 2001, 15(9): 1559.
- [10] Kim S J, Nian C, McIntosh C H S. Activation of Lipoprotein Lipase by Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide in Adipocytes: A role for a protein kinase b, LKB1, and amp-activated protein kinase cascade[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(12): 8557.
- [11] Marguet D, Baggio L, Kobayashi T, *et al.* Enhanced insulin secretion and improved glucose tolerance in mice lacking CD26[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, 97(12): 6874.
- [12] Nyberg J, Anderson M F, Meister B, *et al.* Glucose-dependent insulinotropic polypeptide is expressed in adult hippocampus and induces progenitor cell proliferation[J]. *The Journal of neuroscience*, 2005, 25(7): 1816.
- [13] Ding K H, Shi X M, Zhong Q, *et al.* Impact of glucose-dependent insulinotropic peptide on age - induced bone loss[J]. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2008, 23(4): 536.
- [14] Nissen A, Christensen M, Knop F K, *et al.* Glucose-dependent insulinotropic polypeptide inhibits bone resorption in humans[J]. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2014, 99(11): E2325.
- [15] 陈巧荣,李娟,王亚军. 猪 Smad7 和 Smad9 基因克隆、序列分析与组织表达图谱探究 [J]. *四川大学学报:自然科学版*, 2015, 52(1): 157.
- [16] 钟宇,王亚军,李娟. 猪 Akt1、Akt2 基因克隆与组织表达图谱分析 [J]. *四川大学学报:自然科学版*, 2014, 51(2): 365.
- [17] Higashimoto Y, Liddle R A. Isolation and characterization of the gene encoding rat glucose-dependent insulinotropic peptide[J]. *Biochemical and Biophysical research communications*, 1993, 193(1): 182.
- [18] Inagaki N, Seino Y, Takeda J, *et al.* Gastric inhibitory polypeptide: structure and chromosomal localization of the human gene[J]. *Molecular Endocrinology*, 1989, 3(6): 1014.
- [19] Ravn P, Madhurantakam C, Kunze S, *et al.* Structural and pharmacological characterization of novel potent and selective monoclonal antibody antagonists of glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(27): 19760.
- [20] Paratore S, Teresa Ciotti M, Basille M, *et al.* Gastric inhibitory polypeptide and its receptor are expressed in the central nervous system and support neuronal survival[J]. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry*, 2011, 11(3): 210.