



## 草鱼 SGLT1/2 基因克隆及葡萄糖处理对其 mRNA 表达的影响

唐文或<sup>1,2</sup>, 杨国坤<sup>1,2</sup>, 赵文丽<sup>1,2</sup>, 秦超彬<sup>1,2</sup>,  
张艳敏<sup>1,2</sup>, 孟晓林<sup>1,2</sup>, 聂国兴<sup>1,2\*</sup>

(1. 河南师范大学水产学院, 河南 新乡 453007;

2. 河南师范大学, 河南省水产动物养殖工程技术研究中心, 河南 新乡 453007)

**摘要:** 作为重要的转运载体, SGLTs(钠依赖性葡萄糖协同转运蛋白, sodium-glucose co-transporters) 在物质的吸收过程中发挥着关键的作用。SGLT1 和 SGLT2 作为 SGLTs 家族的重要成员, 参与调节体内的葡萄糖吸收, 从而维持血糖的稳态。为研究 SGLT1 和 SGLT2 在草鱼葡萄糖吸收过程中的作用, 本实验利用 RT-PCR 技术从草鱼前肠和肾脏中分别克隆了基因 *sgl1* 和 *sgl2*, 对其进行生物信息学分析, 并利用荧光定量 PCR 技术检测其 mRNA 的表达。结果显示, 草鱼 *sgl1* 和 *sgl2* 的开放阅读框 (open reading frame, ORF) 分别为 1 977 和 1 989 bp, 并分别编码 658 和 662 个氨基酸。经过预测, 草鱼 SGLT1 和 SGLT2 蛋白均为 14 次跨膜结构。氨基酸序列比对及系统进化树分析结果显示, 草鱼 *sgl1* 和 *sgl2* 与金鱼、金线鲃中 *sgl1* 和 *sgl2* 的亲缘关系最近。荧光定量 PCR 结果显示, *sgl1* 在草鱼肠道和肾脏组织中表达量较高, 在其他组织中表达量较低; *sgl2* 在草鱼肾脏组织中表达量最高, 在其他组织中表达量较低。葡萄糖灌喂实验结果显示, 草鱼前肠中 *sgl1* 和肾脏中 *sgl2* 的表达量在灌喂 1 h 后显著增加。在离体实验中, 葡萄糖处理 CIK 细胞能够显著增加 *sgl1* 和 *sgl2* 的表达量。本研究为完善 SGLTs 在调控鱼类血糖稳态方面具有的功能提供了理论依据。

**关键词:** 草鱼; SGLT1; SGLT2; 基因克隆; 表达分析

**中图分类号:** Q 785; S 917.4

**文献标志码:** A

葡萄糖作为重要的能源物质, 在物质合成、能量代谢等生理过程中发挥关键作用, 体内葡萄糖稳态涉及多种调控过程, 包括葡萄糖吸收、糖异生、糖原合成与分解等<sup>[1]</sup>。肠道对膳食葡萄糖的跨上皮转运主要通过钠/葡萄糖共转运载体 (SGLT1) 和易化转运载体 (GLUT2) 的协同作用完成。钠/葡萄糖共转运载体 (SGLTs) 是一类继发性

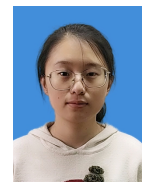
主动转运载体, 依赖细胞膜内外的电势差进行钠离子和葡萄糖的共转运, 而易化转运载体 (GLUTs) 属于被动转运载体, 主要通过易化的方式进行葡萄糖转运<sup>[2]</sup>。SGLTs 作为重要的糖转运载体, 在糖吸收及糖代谢研究中备受关注。SGLTs 由 *slc5* 基因编码, 包括 6 个成员, 分别为 SGLT1~SGLT6<sup>[3]</sup>。除 SGLT3 以外, 其他 SGLTs

收稿日期: 2020-07-30 修回日期: 2020-09-01

资助项目: 国家自然科学基金 (31872581, 31902384); 河南省重点科技攻关项目 (202102110259)

第一作者: 唐文或 (照片), 从事水产动物营养研究, E-mail: 1053087306@qq.com

通信作者: 聂国兴, E-mail: niegx@htu.cn



都是钠离子共转运蛋白<sup>[3]</sup>。研究表明, 不同的 SGLTs 在体内转运的底物和发挥的功能各不相同<sup>[4-5]</sup>。其中, SGLT1 和 SGLT2 是 SGLTs 家族中两个重要的成员, 主要参与体内葡萄糖的转运和重吸收<sup>[6]</sup>, SGLT3 主要作为葡萄糖感应器发挥作用<sup>[7-8]</sup>, SGLT4 和 SGLT5 是甘露糖的重要转运载体<sup>[4,9]</sup>, 而 SGLT6 是肌醇的重要转运载体<sup>[4,10]</sup>。

1987 年, Hediger 等<sup>[11]</sup> 最早从兔 (*Oryctolagus cuniculus*) 的肠道中克隆得到 *sglt1*, 这是 SGLTs 家族中的第一个成员。在人类 (*Homo sapiens*), SGLT1 由 *slc5A1* 基因编码产生, 分子量为 72 ku, 包含 14 个跨膜结构域<sup>[12]</sup>。在 SGLT1 的蛋白序列中, 存在许多潜在的蛋白激酶 A(PKA) 和蛋白激酶 C(PKC) 的磷酸化位点<sup>[13]</sup>。SGLT1 作为一个高亲和力、低容量的转运载体, 主要在成熟肠上皮细胞的刷状缘膜上表达, 对小肠中的葡萄糖和半乳糖进行吸收转运<sup>[6,14]</sup>。SGLT1 在肾近端直小管 (S2/S3 细胞) 中也有表达, 参与小管液中葡萄糖的重吸收<sup>[2,12]</sup>。除此之外, SGLT1 在大脑、心脏、肝脏、气管、前列腺等组织中也有表达, 但具体功能尚不明确<sup>[15-17]</sup>。

*sglt2* 是首次在人的肾脏中克隆出来的, 由 *slc5A2* 基因进行编码, 分子量为 73 ku, 与 SGLT1 蛋白同源率为 59%<sup>[15,18]</sup>。与 SGLT1 不同, SGLT2 是一个低亲和力、高容量的葡萄糖转运载体, 主要分布于肾脏近端小管顶端膜 (S1 细胞)<sup>[6]</sup>。另外, SGLT2 在大脑、肝脏、肌肉以及心脏等组织中也有表达<sup>[16,19]</sup>。肾小球滤液中 90% 的葡萄糖可以通过 SGLT2 完成重吸收, 从而避免了葡萄糖随着尿液流失<sup>[3,6]</sup>。抑制 SGLT2 活性, 可减少肾脏对糖的重吸收, 从而降低血糖。目前, SGLT2 已成为治疗糖尿病的潜在药物作用靶点<sup>[20]</sup>。2013 年以来, 联合国粮农组织 (FDA) 已经批准了 3 种 SGLT2 抑制剂 (Invokana、Forgixa 和 Jardiance) 作为治疗 II 型糖尿病的药物<sup>[12]</sup>。

关于 SGLTs 的功能研究主要集中在哺乳动物, 而关于鱼类 SGLTs 的研究相对较少。白斑角鲨 (*Squalus acanthias*) 和猾鳐 (*Leucoraja erinacea*) 的肾脏中存在 *sglt*, 主要参与肾脏葡萄糖的吸收作用<sup>[21-22]</sup>。在泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*) 中, *sglt1* 在前肠、中肠和肾脏中的表达量较高, 但不同的摄食状态并不能影响 *sglt1* 的表达<sup>[23]</sup>。*sglt1* 在鲤 (*Cyprinus carpio*) 肾脏和中肠的前段表达量最高, 而鲤疱疹病毒 3 (Cyprinid herpesvirus 3,

CyHV-3) 的感染能够降低其表达水平, 说明病毒的感染能影响鲤肠道葡萄糖的吸收<sup>[24]</sup>。此外, *sglt1* 在虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 的肠道、幽门盲囊和肾脏中表达水平较高, 当高糖摄食后肠道中 *sglt1* 的基因表达量显著增加<sup>[25-26]</sup>。以上结果表明, 鱼类的 SGLTs 在葡萄糖的吸收过程中发挥着关键作用。

草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 具有生长速率快、肉质鲜美等优点, 是我国淡水养殖产量最高的经济鱼类。糖类是自然界中分布最广泛的有机物, 也是饲料中一种重要的廉价能源物质。但研究表明, 鱼类对糖类的利用率比较低, 饲料中糖水平超过一定限度会引起鱼类抗病力低、生长缓慢和死亡率高等症状<sup>[27]</sup>。SGLTs 在葡萄糖的转运和吸收过程中发挥关键作用, 但 SGLTs 在草鱼中的研究未曾报道。因此, 本实验首先从草鱼中克隆到 *sglt1/2*, 探究其在不同组织中的表达情况以及葡萄糖对其基因表达的影响, 为探究 SGLTs 在鱼类葡萄糖吸收及稳态中的作用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验所用草鱼均购自于河南省延津县渔场。用于基因克隆、组织分布和原代肝细胞分离实验的草鱼体质量为 80~100 g, 用于葡萄糖灌喂实验的草鱼体质量为 40~50 g。所有的实验用鱼在实验之前都在室内循环系统暂养 2 周以上。实验中所用引物均由英潍捷基公司合成, 引物序列及名称见表 1。

### 1.2 草鱼 *sglt1/2* 基因克隆

通过反转录 PCR (reverse transcription PCR, RT-PCR) 的方法对草鱼 *sglt1/2* 进行基因克隆。以鲤 *sglt1* (JN867793) 和斑马鱼 (*Danio rerio*) *sglt2* (BC067629.1) 的基因序列在 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 草鱼转录组数据库中进行比对, 得到草鱼 *sglt1* 和 *sglt2* 的预测基因序列。根据草鱼 *sglt1* 和 *sglt2* 的预测基因序列设计克隆引物。按照反转录试剂盒 (TaKaRa) 说明书操作方法, 以草鱼前肠和肾脏 RNA 为模板合成第一条链 cDNA。以设计的正反向引物 (表 1) 对草鱼 *sglt1* 和 *sglt2* 基因片段进行扩增。扩增得到的片段首先用 E.Z.N.A

表 1 引物序列信息

Tab. 1 Information of primer sequences

引物 primers	序列(5'—3') sequences(5'—3')	用途 usage	片段大小/bp product size	扩增效率 PCR efficiency
<i>sglt1</i> -ORF-F	ATGGGGGCAGATTATTT	<i>sglt1</i> ORF克隆	1 977	
<i>sglt1</i> -ORF-R	TTAACCAAAGAAACCATG	<i>sglt1</i> ORF cloning		
<i>sglt2</i> -ORF-F	ATGGAGAACACTACAGCG	<i>sglt2</i> ORF克隆	1 989	
<i>sglt2</i> -ORF-R	TCATGCATAGTACCCCA	<i>sglt2</i> ORF cloning		
<i>sglt1</i> -qRT-F	ACCCATTGACGACAAACATC	荧光定量PCR	139	2.01
<i>sglt1</i> -qRT-R	TTCTTCACGCACCTCTTCTG	Real-time PCR		
<i>sglt2</i> -qRT-F	ATCTCCATCGCCTTGCTTT	荧光定量PCR	238	1.99
<i>sglt2</i> -qRT-R	TCTGCCACTTCTCTCTGT	Real-time PCR		
18S-F	ATTTCGACACGGAGAGG	内参基因	90	1.94
18S-R	CATGGGTTTAGGATACGCTC	reference gene		

胶回收试剂盒 (OMEGA, bio-tek) 进行纯化, 然后连接到 pMD19-T (TaKaRa) 载体上进行测序, 对测序结果进行序列分析。跨膜结构域分析: TMHMM Server2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>); 磷酸化位点分析: NetPhos 2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>); 糖基化位点分析: NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>); 序列比对分析: ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>); 进化树构建: MEGA 6.0 软件。

### 1.3 组织分布及葡萄糖灌喂对 *sglt1/2* 基因表达的影响

在组织分布实验中, 选取 3 尾体质量为 80~100 g 的健康草鱼用 MS222 进行麻醉, 取相应的组织样品, 放到无菌无酶的 EP 管中, 并立即放入液氮。待样品取完后, 取出样品管放在 -80 °C 中保存, 用于 RNA 提取。

葡萄糖灌喂实验与本团队前期的实验相同<sup>[28]</sup>。选取 72 尾体质量为 40~50 g 的健康草鱼随机分为 2 组。处理组按照体质量灌喂葡萄糖 (溶解于 PBS) 溶液, 灌喂量为 1.67 mg/g 体质量; 对照组按照体质量不同灌喂 PBS。在灌喂后, 按照每缸 9 尾对草鱼进行暂养, 在灌喂 1、3、6 和 12 h 后, 分别用 MS222 对实验鱼进行麻醉, 取前肠和肾脏组织样品, 用于 RNA 提取。

### 1.4 CIK 细胞培养及处理

实验所用 CIK 细胞来自实验室保藏的细胞。

复苏后的 CIK 细胞接种到 24 孔细胞培养板中, 每孔中加入 1 mL 含有 10% FBS (fetal bovine serum) 的 M199 培养基 (Gibco), 培养基中含有 100 U/mL 的青霉素 (Sigma) 和 100 μg/mL 的链霉素 (Sigma), 细胞放在 28 °C, 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中进行培养。当细胞融合度达到 80% 时, 更换为新鲜 M199 培养基, 并对细胞进行处理。培养基中不添加葡萄糖的定为对照组 (葡萄糖含量为 5.55 mmol/L), 处理组在培养基中添加葡萄糖至终浓度分别为 10, 15 和 20 mmol/L, 对细胞分别处理 3 和 6 h。实验结束后收集细胞样品用于 RNA 提取。

### 1.5 RNA 提取、cDNA 合成和荧光定量 PCR

所有实验样品用 RNAiso Plus (TaKaRa) 进行 RNA 提取。RNA 样品浓度测定 (Nanodrop 2000, Thermo) 后, 取 1 μg 总 RNA, 用反转录试剂盒 (PrimeScript RT reagent kit with gDNA Eraser, TaKaRa) 按照试剂盒操作方法, 首先对总 RNA 中基因组 DNA 进行清除, 然后进行反转录反应, 合成第一条链 cDNA。反转录后的样品稀释 10 倍后作为荧光定量 PCR 模板, 以草鱼 18S *rRNA* 作为内参基因。荧光定量 PCR 反应在 LightCycler 480 II (Roche, Switzerland) 上进行, 反应体系: 2×SYBR Green (TOYOBO, Japan) 5 μL, 引物各 0.3 μL, cDNA 模板 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 3.4 μL。反应程序: 95 °C 预变性 3 min, 95 °C 15 s, 56 °C 15 s, 72 °C 30 s, 共计 40 个循环。每个样品 3 个技术重复, 目的基因相对表达量用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 方法计算, 用 SPSS 20.0 软



件对数据进行单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 草鱼 *splt1/2* 基因克隆及序列分析

经过测序分析发现, 草鱼 *splt1* 的开放阅读框为 1 977 bp, 编码 658 个氨基酸。在草鱼 SGLT1 蛋白序列中有 29 个磷酸化位点, 包括 10 个 PKA 磷酸化位点和 19 个 PKC 磷酸化位点, 并且在 SGLT1 蛋白序列中有 3 个预测的 N-连接糖基化位点 (图 1); 经预测其蛋白分子量为 72.8 ku, 等电点 (pI) 为 6.35。草鱼 *splt2* 的开放阅读框为 1 989 bp, 编码 662 个氨基酸。在草鱼 SGLT2 蛋白序列中有 31 个磷酸化位点, 包括 14 个 PKA 磷酸化位点和 17 个 PKC 磷酸化位点, 另外在 SGLT2 蛋白序列中有 3 个预测的 N-连接糖基化位点 (图 1); 经预测其蛋白分子量为 73.84 ku, 等电点 (pI) 为 6.04。经过预测, 草鱼 SGLT1 和 SGLT2 蛋白均为 14 次跨膜结构 (图 1, 图 2), 并且在第一个和第二个跨膜区存在 R-x-T-x (4)-F-L-A-G-x (4)-W-W-x (2)-G-A-S 的基序 (图 2)。对不同物种 SGLT1 和 SGLT2 蛋白序列进行同源性分析发现, 草鱼 SGLT1 和 SGLT2 与鱼类的 SGLT1 和 SGLT2 的同源性比较高, 与鲤科 (Cyprinidae) 鱼类的 SGLT1 和 SGLT2 的同源性分别达到 92% 和 91% 以上 (表 2)。另外草鱼 SGLT1 和 SGLT2 蛋白的同源性为 64.71% (图 2)。用 MEGA 6.0 软件中的邻接法 (Neighbor-Joining) 构建进化树, 进化树中 SGLT1 和 SGLT2 各自聚为一支, 其中草鱼 SGLT1 和 SGLT2 分别与鲤科鱼类的 SGLT1 和 SGLT2 聚为一小支 (图 3)。

### 2.2 草鱼 *splt1/2* 基因的组织分布特性及葡萄糖对其表达的影响

利用荧光定量 PCR 检测草鱼 *splt1* 和 *splt2* 在端脑、中脑等 17 个组织中的表达情况。*splt1* 在草鱼前肠中的表达量最高, 肾脏中表达量次之, 在其他组织中表达量较低; *splt2* 在草鱼的肾脏中表达量最高, 在其他组织中表达量较低 (图 4)。葡萄糖灌喂 1 h 后, 草鱼前肠中 *splt1* 的表达量显著增加, 而前肠中 *splt2* 的表达量没有发生变化 (图 5-a, b); 另外, 葡萄糖灌喂 1 h 后, 能够显著增加肾脏中 *splt2* 的表达量, 而对肾脏中 *splt1* 的表达量没有影响 (图 5-c, d)。而在灌喂实验的其他时间点, 前肠和肾脏中 *splt1* 和 *splt2* 的表达

量均没有显著变化 (图 5)。

### 2.3 葡萄糖对 CIK 细胞中 *splt1/2* 表达的影响

通过用不同浓度的葡萄糖对 CIK 细胞进行孵育, 探究其对 *splt1* 和 *splt2* 的调控作用。结果表明, 葡萄糖处理 CIK 细胞 3 h 后, 15 和 20 mmol/L 葡萄糖能够显著地上调 *splt1* 表达量; 而 *splt2* 表达量只在 20 mmol/L 葡萄糖处理组显著增加 (图 6-a)。在葡萄糖处理 6 h 后, 与对照组相比, 不同浓度的葡萄糖处理后均能显著地增加 *splt1* 和 *splt2* 的基因表达量 (图 6-b)。

## 3 讨论

1987 年, Hediger 等<sup>[11]</sup>首次从兔的肠道中克隆得到 *splt1*, 随后, 在多个物种中相继报道了 SGLTs 序列与功能<sup>[29]</sup>。其中, 研究较为深入的主要集中在哺乳动物<sup>[5, 12, 14]</sup>。然而, 关于 SGLTs 在鱼类中的研究相对较少, 特别是在草食性鱼类中未曾见报道。本实验从草鱼的前肠和肾脏中分别克隆得到 *splt1* 和 *splt2*, 并对其序列进行分析。结果显示, 草鱼的 SGLT1 和 SGLT2 均具有 14 次跨膜结构。这与 SGLTs 家族中其他成员的结构相同<sup>[12, 14, 16]</sup>。在草鱼的 SGLT1 和 SGLT2 蛋白序列中, 存在着多个预测的 PKA 和 PKC 磷酸化位点。与草鱼不同的是, 白斑角鲨的 SGLT2 蛋白序列中存在 PKC 磷酸化位点而没有 PKA 磷酸化位点<sup>[21]</sup>, 这可能与物种的特异性有关。另外已有研究报道, 蛋白激酶能够调控 SLC5 家族成员转运活性。研究表明, 蛋白激酶 (PKA 和 PKC) 能够通过调控 SGLT1 在细胞膜上的快速插入 (或解离) 而调节其转运能力<sup>[4, 30-31]</sup>。另外在对大鼠 (*Rattus norvegicus*) 肾皮质的磷酸化蛋白组学分析中发现, PKA 和 PKC 可以通过间接地磷酸化第 624 位丝氨酸 (S624) 调控 SGLT2 的活性<sup>[4, 32]</sup>。以上研究表明, 蛋白激酶 (PKA 和 PKC) 能够参与调节 SGLTs 的活性。

糖基化是蛋白质翻译后修饰的一个重要过程, 在草鱼 SGLT1 和 SGLT2 的蛋白中都存在着 3 个预测的 N-连接糖基化位点。在白斑角鲨中的研究发现, SGLT2 的第 6 和第 7 个跨膜区之间存在着 N-连接糖基化位点<sup>[21]</sup>; 同样在人 SGLT1 蛋白的第 6 和第 7 个跨膜区也存在 1 个 N-连接糖基化位点<sup>[18]</sup>。糖基化参与维持蛋白的结构和功能,

1	ATG GGG GCA GAT TAT TTT GGA TTC TCT TAT CTC CGC AAT GAG AAC AGA AGA AAT GTC ACC	60
1	M G A D Y F G F S Y L R N E N R R N V T	20
61	ATA TAT GTT AAC AAT CCA GCG GAC ATC TCT GTG ATT GTT ATA TAT TTT CTG GTG GTT CTG	120
21	I Y V N N P A D I S V I V I Y F L V V L	40
121	GCT GTG GGA GTA TGG GCA ATG GTA CCG ACC AAT CGA GCC ACA GTA GGA GGC TTT TTC CTG	180
41	A V G V W A M V R T N R A T V G G G F F L	60
181	GCT GGC AGA AGT ATG GTG TGG TGG CCG ATT GGA GCC TCT CTC TTT GCA AGT AAC ATT GGA	240
61	A G R S M V W W P I G A S L F A S N I G	80
241	AGT GGG CAT TTT GTG GGA ATA GCA GGA ACC GGA GCA GCT GCT GGT ATC GCC ACT GGA GGG	300
81	S G H F V G I A G T G A A A G I A T G G	100
301	TTT GAG TGG AAT GCT CTT GTT GTG ATT ATT CTA GGA TGG CTC TTC ATG CCC ATC TAC	360
101	F E W N A L V V V I I L G W L F V P I Y	120
361	ATA AAG GCT GGG GTC GTG ACG ATG CCG GAG TAC CTG AAG AAA CGC TTT GGT GGG CAG CGT	420
121	I K A G V V T M P E Y L K K R F G G Q R	140
421	ATC CGT ATC TAC CTC TCC GTG CTG TCC CTG TTT CTC TAC GTT TTC ACC AAA ATC TCT CGC	480
141	I R I Y L S V L S L F L Y V F T K I S	160
481	GAT ATG TTT GCA GGA GCC ATT TTC ATC AAT CAG GCT CTG GGA CTG AAC ATT TAC CTG GCC	540
161	D M F A G A I F I N Q A L G L N I Y L A	180
541	GTG ATT ATT CTG CTG ATG ATT ACA GCT CTT TAT ACA GTA ACA GGT GGT CTA GCT GCA GTC	600
181	V I I L L M I T A L Y T V T G G L A A V	200
601	ATC TAC ACA GAC ACC CTG CAG ACC ATC ATC ATG GTT GTG GGA TCA TTC ATT CTC ATG GGC	660
201	I Y T D T L Q T I I M V V G S F I L M G	220
661	TTT GCG TTC ACT GAG GTC GGA GGC TAT GAG AAC TTC AAG GAC CGC TAT ATG AAT GCG ATC	720
221	F A F T E V G G Y E N F K D R Y M N A I	240
721	CCG TCA GTG GTG GGT GTA AAC ATC AGT GAA TCG TGC TAC ACC CCT CGT GCA GAC TCA TTC	780
241	P S V V G V N I S E S C Y T P R A D S F	260
781	CAC ATT TTC AGA GAC CCC ATT ACC GGC GAT CTG CCC TGG CCC GGA CTG ATC TTT GGT CTT	840
261	H I F R D P I T G D L P W P G L I F G L	280
841	ACT ATC CAG GCT GGC TGG TAC TGG TGC ACT GAC CAG GTG ATT GTG CAG CGC TGC CTG TCT	900
281	T I Q A G W Y W C T D Q V I V Q R C L S	300
901	GCC AAG AGC CTG TCT CAT GTG AAA GCT GGC TGC ATC CTG TGT GGT TAT CTC AAA CTT CTG	960
301	A K S L S H V K A G C I L C G Y L K L L	320
961	CCC ATG TTC CTC ATG GTT TTC CCT GGC ATG ATC AGC AGA GTA CTG TAC ACA GAT GAG ATT	1 020
321	P M F L M V F P G M I S R V L Y T D E I	340
1 021	GCA TGT GTG GAT CCA AAA GAG TGT GAC GAC TAC TGT GGA GCC AGT GTG GGC TGC AGT AAT	1 080
341	A C V D P K E C D D Y C G A S V G C S N	360
1 081	ATT GCT TAT CCT AAA CTA GTG GTG GAC CTG ATG CCA AAC GGT CTC AGA GGC TTG ATG TTG	1 140
361	I A Y P K L V V D L C M P N G L R G L M L	380
1 141	TCC GTC ATG CTG GCC TCT CTG ATG AGT TCA CTC ACT TCC ATC TTT AAC AGC GCC AGC ACA	1 200
381	S V M L A S L M S S L T S I F N S A S T	400
1 201	CTC TTC ACC ATG GAC ATC TAC ACC AAG ATC CGT CCC AAA GCC AAA GAA AAG GAG CTC ATG	1 260
401	L F T M D I Y T K I R P K A K E K E L M	420
1 261	CTC GCT GGC AGG GTG TTC ATG CTG TTT CTG ATC GGT GTG AGT ATT GCA TGG ATC CCC ATC	1 320
421	L A G R V F M L F L I G V S I A W I P I	440
1 321	GTT CAG ACG GCT CAG AGC GGC CAG CTC TTC GAT TAC ATT CAG TCC ATC ACC AGT TAT CTG	1 380
441	V Q T A Q S G Q L F D Y I Q S I T S Y L	460
1 381	GCT CCG CCC ATT GCC GCT GTC TTC ACC CTC GCC ATT TTC TGC AAG CGA GTC AAT GAA CCA	1 440
461	A P P I A A V F T L A I F C K R V N E P	480
1 441	GGC GCT TTC TAC GGG TTG TGT ATT GGT CTG TTG GTG GGT CTG GCA CGT ATG ATA ACC GAG	1 500
481	G A F Y G L C I G L L V G L A R M I T E	500
1 501	TTT GCC TAT GGC ACG GGC AGC TGC GTG AGC CCC AGT AAC TGT CCC ACG ATC ATC TGC GGT	1 560
501	F A Y G T G S C V S P S N C P T I I C G	520
1 561	GTG CAC TAC CTC TAT TTT GCA ATC ATC CTC TAC ACC CTG TCC TGT GTA TTG ATA CTG GTC	1 620
521	V H Y L Y F A I I L Y T L S C V L I L V	540
1 621	ATC TCC CTC ATG ACC AAA CCC ATT GAC GAC AAA CAT CTG TAC AGA CTC TGC TGG AGT TTG	1 680
541	I S L M T K P I D D K H L Y R L C W S L	560
1 681	AGG AAC AGC ACT GAG GAG AGG ATA GAT CTG GAG TTA GAT GAC TGG ACT GAA GAA CAG GAT	1 740
561	R N S T E E R I D L E L D D W T E E Q D	580
1 741	TCC AGC TCT ATG GAA ACA GAA GAG GTG CGT GAA GAA CCA GGC TTT TGT AAG AAG GCC TAC	1 800
581	S S S M E T E E V R E E P G F C K K A Y	600
1 801	AAC TGG TTC TGC GGC TTT GAT CAA GGC AAT GCC CCA AAA CTG ACT AAA GAA CAG GAG GCA	1 860
601	N W F C G F D Q G N A P K L T K E Q E A	620
1 861	GAG ATG AAG CTG AAG CTC ACT GAC ACC ACT GAG AAA CCT CTA TGG AGA AAC GTG GTC AAC	1 920
621	E M K L K L T D T T E K P L W R N V V N	640
1 921	GCT AAT GCT ATT ATC CTC CTC ACT GTC TGC GTT TTT TTC CAT GGT TTC TTT GGT TAA	1 977
641	A N A I I L L T V C V F F H G F F G ※	

(a)

(图 1 Fig. 1)

```

1   ATG GAG AAC ACT ACA GCG AAA CAC GTA ACC ATC AAC AAT CCA GCT GAC ATC AGT GTG ATT 60
1   M E N T T A K H V T I N N P A D I S V I 20
61  ATT GGC TAC TTT TTG GTG GTT ATT GCA GTA GGA ATT TGG TCT ACA TTT AGG ACT AAT CGT 120
21  I G Y F L V V I A V G I W S T F R T N R 40
121 GGC ACC GTA GGC GGC TAC TTT CTT GCA GGT CGG ACC ATG GTG TGG TGG CCT GTG GGA ACG 180
41  G T V G G Y F L A G R T M V W W P V G T 60
181 TCT CTT TTT GCG AGC AAC ATT GGC AGC GGC CAT TTT GTT GGC CTC GCA GGA ACA GCA GCT 240
61  S L F A S N I G S G H F V G L A G T A A 80
241 GCG AGT GGA ATA GCC GTC GGG AGT TTT GAG TGG AAT GCA TTA TTT ATT GTT TTG TTG TTG 300
81  A S G I A V G S F E W N A L F I V L L L 100
301 GGC TGG GTG TTC GTC CCT GTT TAT TTA ACC GCA GGG GTG ATT ACA ATG CCA CAG TAC CTC 360
101 G W V F V P V Y L T A G V I T M P Q Y L 120
361 AAG AAA AGA TTT GGA GGG ACT AGA ATT AGC TTA TAT CTC TCT GTC GTT TCA CTT TTC CTT 420
121 K K R F G G T R I S L Y L S V V S L F L 140
421 TAC ATC TTC ACA AAG ATT TCT GTT GAC ATG TTC TCA GGA GCG GTT TTT ATA CAG CAA GCT 480
141 Y I F T K I S V D M F S G A V F I Q Q A 160
481 CTT GGC TGG AAT ATC TAT GTT GCA GTG ATT GCT CTG CTC TGC ATA ACA GCA CTC TAT ACT 540
161 L G W N I Y V A V I A L L C I T A L Y T 180
541 GTC ACA GGA GGA CTG GCT GCG CTG ATG TAT ACA GAT ACT GTC CAG ACC TTT GTT ATC ATT 600
181 V T G G L A A L M Y T D T V Q T F V I I 200
601 GCT GGA GCC TTC GTC CTC ATG GGA TTT TCC TTC TAT GAA GTT GGA GGT TAC AAT ACC TTA 660
201 A G A F V L M G F S F Y E V G G Y N T L 220
661 CTA GAG AAG TAT AGT TTA TCT TTA CCA ACT CAG AGG ATT TCC CTA GAC CCT CAG AGG TAT 720
221 L E K Y S L P T Q R I S L D P Q R Y 240
721 AAT ATC TCC GAA CAA TGT TAC ACT CCA CGA GAG GAT GCC TTT CAT TTG CTT AGG GAT CCC 780
241 N I S E Q C Y T P R E D A F H L L R D P 260
781 ACG ACT GGG GAC TTG CCA TGG CCG GGT GTG TTA TTT GGC ATC GCA ATT ATT GGT AGC TGG 840
261 T G D L P W P G V L F G I A I I G S W 280
841 TAC TGG TGT ACT GAT CAG GTA ATT GTG CAA CGC TGT TTG GCT GCC CGC AGT CTG ACG CAT 900
281 Y W C T D Q V I V Q R C L A A R S L T H 300
901 GTA AAG GCA GGA TGT ATA TTG TGT GGG TAC CTG AAA CTG CTC CCT ATG TTT CTC ATG GTG 960
301 V K A G C I L C G Y L K L L P M F L M V 320
961 TTT CCA GGC ATG ATC AGC AGA GTG CTT TAC CCT GAT GAA GTA GGT TGT GTG GAG CCA AGC 1 020
321 F P G M I S R V L Y P D E V G C V E P S 340
1021 ATC TGT AAC AAA GTC TGT GGC ACA GAG GTT GGC TGC TCT AAC ATT GCC TAC CCC AAA CTA 1 080
341 I C N K V C G T E V G C S N I A Y P K L 360
1 081 GTG GTT TCT GTA ATG CCA ACA GGT CTC AGA GGA TTG ATG CTG GCA GTT ATG TTA GCA GCT 1 140
361 V V S V M P T G L R G L M L A V M L A A 380
1 141 CTC ATG AGC TCA CTA GCA TCC ATC TTC AAC AGC AGT AGC ACC TTG TTC ACT ATG GAC ATT 1 200
381 L M S S L A S I F N S S S T L F T M D I 400
1 201 TGG ACT CGT ATC CCG CCT CAA GCT AGA GAT AAA GAG CTT ATG GTT GTT GGA AGG GTG TGG 1 260
401 W T R I R P Q A R D K E L M V V G R V W 420
1 261 ATA CTC TGC ATT GTC GCT ATT AGC ATT TGC TGG ATC CCA GTT GTC CAG GCA GCC CAG AGT 1 320
421 I L C I V A I S I C W I P V V Q A A Q S 440
1 321 GGT CAG CTG TTT GAT TAT ATT CAA TCT GTG ACT AGT TAC TTA GCT CCA CCT ATT GCA GCA 1 380
441 G Q L F D Y I Q S V T S Y L A P P I A A 460
1 381 GTC TTC TTC CTT GCC ATT TTT GTG AAG AGA GTC AAT GAG TCA GGG GCT TTC TGG GGC TTG 1 440
461 V F F L A I F V K R V N E S G A F W G L 480
1 441 ATG GGA GGA CTG GTT ATG GGT CTG TGT CGC ATG GTA CCC GAG TAT GCA TAT GGC TCA GGA 1 500
481 M G G L V M G L C R M V P E Y A Y G S G 500
1 501 AGC TGC CTC TTT CCA TCC ACC TGT CCA AAA CTT ATA TGT GGA GTT CAT TAC CTT TAT TTT 1 560
501 S C L F P S T C P K L I C G V H Y L Y F 520
1 561 GCA ATG CTG CTC TTC TTC TGC ACC ATT ATT CTA GTG CTG TTT GTA AGC TAC AAC ACC CCA 1 620
521 A M L L F F C T I I L V L F V S Y N T P 540
1 621 CCC ATA GAG GAC AAA CAT CTC CAT CGC CTT GTC TTT ACC TTA CGC CAT TCT AAA GAA GAA 1 680
541 P I E D K H L H R L V F T L R H S K E E 560
1 681 AGG GTC GAT CTG GAC CGG GAA GAG CAG GAA CAA GGA AGG CAA GCA CGA AGA GAC GCA GAT 1 740
561 R V D L D R E E Q E G R Q A R R D A D 580
1 741 GAA AAG GAG AAG GTC ATA ACT GAT GAG GAT CAA ATT GAA CAT GGT GAC CGA TCT ATA ATG 1 800
581 E K E K V I T D E D Q I E H G D R S I M 600
1 801 ATG AAG ATT ATT GGC TGG TTT TGT GGC ATA AGT GAT GCT CAG GCT CCA GAG CCT ACA GAG 1 860
601 M K I I G W F C G I S D A Q A P E P T E 620
1 861 GAG GAA GTG GCA GAA GCA TCA AAA CAA CTA CCT GAC ATA AGT GAA GAC CCA CTG TGG AAG 1 920
621 E E V A E A S K Q L P D I S E D P L W K 640
1 921 TAT TTA GTC AAT GCT AAT GCG CTA ATA ATG ATG TCT GTG GCT GTT TAT TTT GGG TAC 1 980
641 Y L V N A N A L I M M S V A V Y F W G Y 660
1 981 TAT GCA TGA 1 989
661 Y A ※

```

(b)

图 1 草鱼 SGLT1 (a) 和 SGLT2 (b) cDNA 和氨基酸序列

图中单下划线表示跨膜结构域; 虚线为 N-糖基化位点; 方框表示 PKC 磷酸化位点; 圆圈为 PKA 磷酸化位点; 星号表示终止密码子

Fig. 1 cDNA and deduced amino acids of *C. idella* SGLT1 (a) and SGLT2 (b)

Single underline represents transmembrane domains; dotted line represents glycosylation sites; boxes represent PKC phosphorylation sites; circles represent PKA phosphorylation sites; the asterisk represents the stop codon

表2 草鱼 SGLT1 和 SGLT2 与其他物种的同源性分析

Tab. 2 Identities analysis of *C. idella* SGLT1 and SGLT2 compared to other species

物种 species	SGLT1	SGLT2
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idella</i>	100%	100%
金线鲃 <i>Sinocyclocheilus graham</i>	94.68% XP_016374245.1	94.05% XP_016101295.1
鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	93.92% AEX13746.1	—
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	92.55% NP_956975.1	91.54% NP_998091.1
斑点叉尾鲷 <i>Ictalurus punctatus</i>	82.93% XP_017345155.1	84.85% XP_017346276.1
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	83.56% NP_001165258.1	82.15% NP_001133541.1
高体鲷 <i>Seriola dumerili</i>	83.61% XP_022617872.1	79.51% XP_022616161.1
尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	81.22% XP_019216676.1	77.86% XP_003449321.1
青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	82.47% XP_004074867.1	76.53% XP_004075508.1
变色蜥 <i>Anolis carolinensis</i>	—	70.39% XP_003227742.1
原鸡 <i>Gallus gallus</i>	48.45% NM_001293240.1	—
小鼠 <i>Mus musculus</i>	75.88% AF208031.1	70.11% AY033886.1
人 <i>Homo sapiens</i>	74.00% AH005284.2	57.05% AJ133127.1

注: —表示未找到序列

Notes: —represents that the sequences was not found

在 COS-7 的研究中发现, N-连接糖基化在调控 SGLT 的功能表达过程中发挥着重要的作用<sup>[33]</sup>;但是在人类的 SGLT1 研究中发现, N-连接糖基化位点并不影响其转运活性<sup>[29]</sup>。草鱼 SGLT1 和 SGLT2 蛋白中预测的 N-连接糖基化位点多于其他物种,可能是 N-连接糖基化位点在 SGLT1 和 SGLT2 中具有物种特异性,另外草鱼 SGLT1 和 SGLT2 蛋白中的 N-连接糖基化是否影响其转运活性还需要进一步研究。在 SGLTs 和钠-肌醇共转运载体 (SMITs) 的第 1 和第 2 跨膜域中存在 R-x-T-x (4)-F-L-A-G-x (4)-W-W-x (2)-G-A-S 基序<sup>[29]</sup>,另外在 SGLTs 的第 13 和第 14 跨膜域之间有一个大的亲水胞内环,此结构主要与转运底物的识别和特异性有关<sup>[29]</sup>。在草鱼 SGLT1 和 SGLT2 蛋白中也存在同样的基序和结构域,这些结构的存在可能参与草鱼 SGLT1 和 SGLT2 蛋白对转运底物的识别。同源性比对结果发现,实验中克隆得到的草鱼 SGLT1 和 SGLT2 与鲤科鱼类的 SGLT1

和 SGLT2 同源性达到 91% 以上。同样,系统进化树结果显示,草鱼 SGLT1 和 SGLT2 分别与鲤科鱼类的 SGLT1 和 SGLT2 聚为一支。以上蛋白结构和同源性分析可以证明,实验中克隆得到的序列为草鱼的 *sgl1* 和 *sgl2* 基因序列。

本实验结果表明, *sgl1* 在草鱼肠道和肾脏中的表达量较高,在其他组织中表达量较低。而草鱼的 *sgl2* 在肾脏中的表达量最高,在其他组织中表达量较低。研究表明, *sgl1* 在人类的肠和兔子的小肠、肾皮质等部位表达量最高<sup>[18]</sup>;另外在牛 (*Bos taurus*) 的研究中表明, *sgl1* 主要在肠道中表达,在肾脏中的表达量次之,而在肝脏、肺和乳腺等组织中的表达量最低<sup>[34]</sup>。本实验结果与哺乳动物中的研究结果相同, *sgl1* 在肠道中的高表达可能与其主要在肠道中进行葡萄糖转运的功能相关。在人类中的研究表明, *sgl2* 主要在肾脏中表达,而在其他组织中的表达量较低<sup>[35]</sup>;对白斑角鲨的研究表明, *sgl2* 在肾脏中表达量最高,在肠道中的表达量较低<sup>[21]</sup>。在对泥鳅的研究中发现, *sgl1* 在前肠中表达量最高,在肾脏和肝脏等组织中也表达<sup>[23]</sup>;另外,虹鳟的 *sgl1* 主要在幽门盲囊和近端小肠中表达,在其他组织中表达量较低<sup>[25]</sup>;同样,鲤 *sgl1* 在肠道中表达量最高,在肾脏中表达量也较高,而在肝脏中的表达量较低<sup>[24]</sup>;与其他物种不同的是,猾鳕的 *sgl1* 主要在肾脏的远曲小管近端表达<sup>[22]</sup>,这可能与 *sgl1* 在不同物种中的表达具有组织特异性有关。在美洲拟鲈 (*Pseudopleuronectes americanus*)、大西洋盲鳗 (*Myxine glutinosa*)、虹鳟、猾鳕、白斑角鲨和鲤的肠道和肾脏中都检测到 SGLT 的葡萄糖转运活性,并参与了葡萄糖的转运吸收<sup>[21,24]</sup>。以上研究结果表明, *sgl1* 和 *sgl2* 主要在肠道和肾脏中表达。肠道和肾脏作为重要的器官,在葡萄糖的转运和重吸收过程中发挥关键的作用, *sgl1* 和 *sgl2* 主要在肠道和肾脏中表达,可能与其参与肠道和肾脏的葡萄糖转运、吸收并维持血糖稳态有关。

本研究发现,葡萄糖灌喂草鱼 1 h 后,草鱼前肠中 *sgl1* 和肾脏中 *sgl2* 的表达量显著升高。另外在离体实验中,葡萄糖处理后能够显著地增加 CIK 细胞中 *sgl1* 和 *sgl2* 的表达水平。本研究结果与其他鱼类的结果相似,例如,对虹鳟进行葡萄糖灌喂后,中肠中 *sgl1* 的基因表达量

		TM1	
SGLT1	MGADYFGFSYLRNENRRNVTIYVNNPADISVIVIYFLVVLAVGVWAMVRTNRATVGGFFI		60
SGLT2	-----MENTAKHVTINNPADISVIIGYFLVVIIVGIVSTFRTRRGTVGGYFI		48
	** : :*****: *****:***: * . *****:***:**		
		TM2	TM3
SGLT1	AGRSMVWWPIGASLAFASNIGSGHFVGIAGTGAAAGIATGGFEWNALVVVILGWLFVPIY		120
SGLT2	AGRTMVWVPGTSLAFASNIGSGHFVGLAGTAAASGIAVGSFEWNALFIVLLLGWVFPVY		108
	***:*****:*****:***: *:*:* * . *****: * : :***:***:**		
		TM4	
SGLT1	IKAGVVTMPEYLKRRFGGRIRIYLSVLSLFLVYFTKISADMFAAIFINQALGLNIYLA		180
SGLT2	LTAGVITMPQYLKRRFGGRISLYLSVLSLFLYIFTKISVDMFSGAVFIQQALGWNIVVA		168
	: . ***:***:***** * * :*****:*****:***: *:*:*:***: * * : *		
		TM5	TM6
SGLT1	VIILLMITALYTVTGLAAVYTDLTQTIIMVVSFILMGFAFTEVGGYENFKDRYMNAI		240
SGLT2	VIALLCITALYTVTGLAALMYTDTVQTFVIIAGAFVLMGFSFYEVGGYNTLLEKYSLSL		228
	** * * *****:*****: * : : . * : * : * : * * : * : . : : * : *		
		TM7	
SGLT1	PSV-----VGVNISESCYTPRDSFHIFRDPITGDLWPGLIFGLTIQAGWYCTDQVI		294
SGLT2	PTQRISLDPQRYNISEQCYTPREDAFHLLRDPTGDLWPGLVFGIAIIGSWYCTDQVI		288
	* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *		
		TM8	
SGLT1	VQRCLSAKLSHVKAGCILCGYLKLLPMFLMVFPGMISRVLYTDEIACVDPKECDDYCGA		354
SGLT2	VQRCLAARSLTHVKAGCILCGYLKLLPMFLMVFPGMISRVLYPDEVGCVEPSICNKVCGT		348
	*****: * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *		
		TM9	
SGLT1	SVGCSNIAYPKLVVDLMPNGLRGLMLSVMLASLMSLTSIFNSASTLFTMDIYTKIRPKA		414
SGLT2	EVGCSNIAYPKLVVSMPTGLRGLMLAVMLAALMSLASFNSASTLFTMDIWRIRPQA		408
	. *****: * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *		
		TM10	TM11
SGLT1	KEKELMLAGRVFMLFLIGVSIWIPVQTAQSQQLFDYIQSITSYLAPPAAVFTLAIFC		474
SGLT2	RDKELMVVGRVWILCIVAISICWIPVQAAQSQQLFDYIQSVTSYLAPPAAVFFLAIFV		468
	: : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *		
		TM12	TM13
SGLT1	KRVNEPGAFYGLCIGLLVGLARMI TEFAYGTGSCVSPSNCPTIICGVHYLYFAIILYTLS		534
SGLT2	KRVNESGAFWGLMGGVLMGLCRMVPEYAYGSGSCLFPSTCPKLCGVHYLYFAMLLFCT		528
	***** * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *		
		TM14	
SGLT1	CVLILVISLMTKPIDDKHLRYLRCWLSLRNSTEERIDLELDDWTEEQDSSM-----		584
SGLT2	IILVLFVSYNTPPIEDKHLHRLVFTLRHSKEERVLDREEQEGRQARRDADEKEKVID		588
	: * : * : * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *		
		TM14	
SGLT1	ETEEVEEPGFCKKAYNWFCGFDQGNAPKLTKEQEAEMKLLTDTTEKPLWRNVVNANAI		644
SGLT2	EDQIEHGDRS IMMKIIGWFCGISDAQAPEPTEEEVAEASKQLPDISEDPLWKYLVNANAL		648
	* : : : : * . *****: * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *		
		Identity	
SGLT1	ILLTVCVFFHGFFG	658	100%
SGLT2	IMMSVAVYFWGYA	662	64.71%
	* : : * : * * : :		

图 2 草鱼 SGLT1 和 SGLT2 氨基酸之间的比对

相同氨基酸用星号表示; 高度保守氨基酸用“:”表示; 低度保守氨基酸用“.”表示; 跨膜区域用阴影表示; R-x-T-x (4)-F-L-A-G-x (4)-W-x (2)-G-A-S 基序用方框表示

Fig. 2 Amino acid sequence alignment of *C. idella* SGLT1 and SGLT2

The identical amino acids are represented by "\*"; and the highly and less conserved amino acids are represented by ":" and "."; the transmembrane regions are represented by shadow; the R-x-T-x (4)-F-L-A-G-x (4)-W-x (2)-G-A-S motif is represented by box



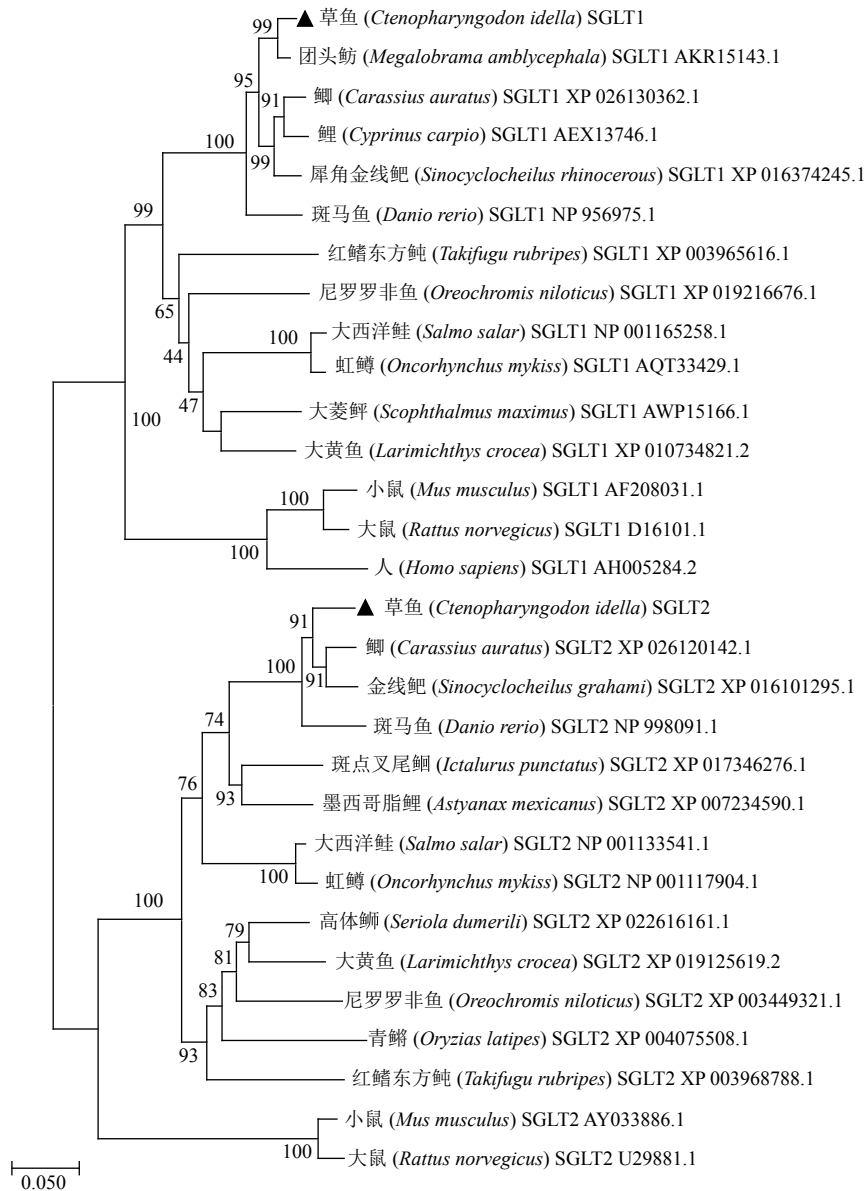


图 3 草鱼与其他物种 SGLT1 和 SGLT2 氨基酸进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree based on amino acid alignment for SGLT1 and SGLT2 with different species

显著增加<sup>[36]</sup>；并且当用葡萄糖对虹鳟的中肠进行孵育后，其 *sgl1* 基因表达量显著升高<sup>[36]</sup>。另外，在虹鳟幼鱼中的研究表明，相对于禁食组，高糖饲料组肠道中 *sgl1* 表达量显著升高<sup>[26]</sup>。用高糖饲料饲喂后，鲤肠道中 *sgl1* 基因表达和蛋白水平都显著升高<sup>[24]</sup>。在哺乳动物中也有相似的结果，在马 (*Equus caballus*) 中的研究发现，当饲料中可水解糖类增加时，肠道中的 *sgl1* 基因表达和蛋白水平都显著升高<sup>[37]</sup>；羊 (*Ovis aries*) 断奶后肠道刷状缘中的 SGLT1 的活性显著降低，用葡萄糖进行诱导后，SGLT1 的活性能够显著升高<sup>[4]</sup>。

有研究发现，对草鱼进行葡萄糖灌喂后，血糖水平在 1 h 后显著增加并在 3 h 达到最高<sup>[28]</sup>，这可能与葡萄糖灌喂后能够增加肠道和肾脏中 *sglts* 的表达从而增加葡萄糖的转运和重吸收有关。以上的结果表明，糖类摄入能够提高鱼类和哺乳动物转运蛋白的表达从而增加对葡萄糖的吸收。

本研究从草鱼前肠和肾脏中分别克隆得到 *sgl1* 和 *sgl2* 基因序列，并对其进行了序列分析。组织分布结果发现 *sgl1* 在草鱼的肠道和肾脏中表达量较高，在其他组织中表达量较低；*sgl2* 在草鱼肾脏中表达量最高，在其他组织中表达

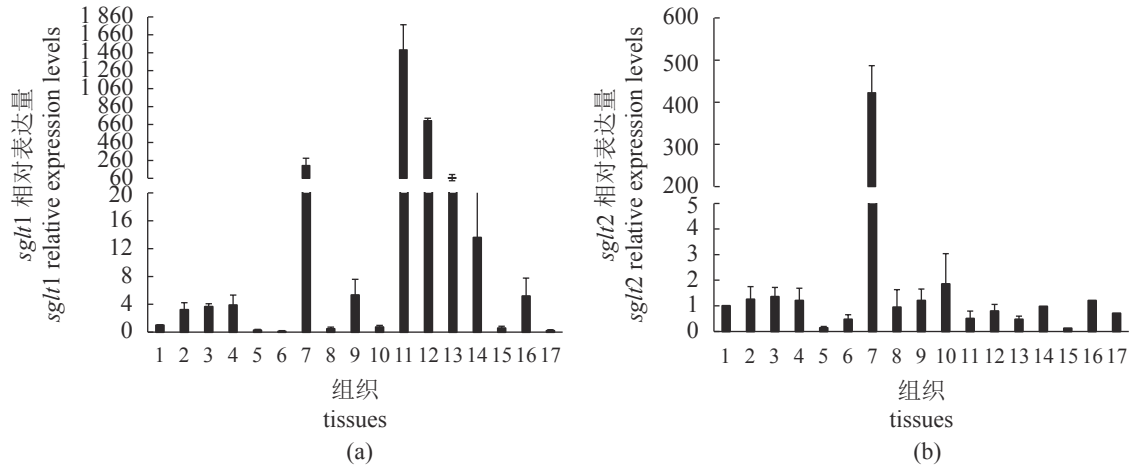


图 4 定量 PCR 检测 *sgl1* (a) 和 *sgl2* (b) 在草鱼各组织中的表达水平

1.端脑, 2.中脑, 3.后脑, 4.下丘脑, 5.垂体, 6.头肾, 7.肾脏, 8.心脏, 9.肝脏, 10.脾脏, 11.前肠, 12.中肠, 13.后肠, 14.脂肪, 15.肌肉, 16.性腺, 17.鳃。数据为平均值±标准误 (n=3)

Fig. 4 Analysis of expression levels of *sgl1* (a) and *sgl2* (b) in different tissues of *C. idella* by real-time PCR

1. telencephalon, 2. mesencephalon, 3. cerebellum, 4. hypothalamus, 5. pituitary, 6. head kidney, 7. kidney, 8. heart, 9. liver, 10. spleen, 11. foregut, 12. midgut, 13. hindgut, 14. fat, 15. muscle, 16. gonad, 17. gill. The results showed the mean ± SE (n=3)

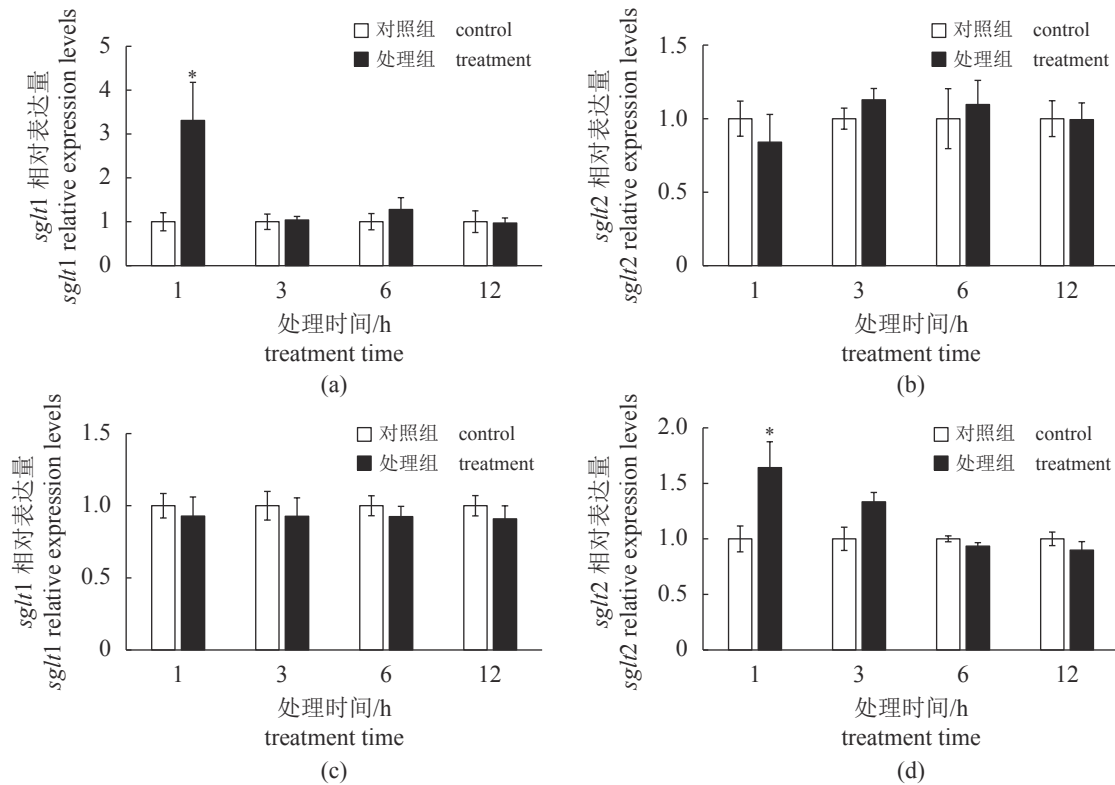


图 5 葡萄糖灌喂对草鱼前肠 (a、b) 和肾脏 (c、d) 中 *sgl1* 和 *sgl2* 的基因表达的影响

用荧光定量 PCR 检测不同实验组的 *sgl1* 和 *sgl2* 的表达水平。图中对照组为 1, 其他实验组数值是与对照组的比值, 数据用平均值±标准误差表示 (n=8-9)。图中\*代表显著性差异 (P<0.05)

Fig. 5 Effects of OGTT on the mRNA expressions of *sgl1* and *sgl2* in foregut (a, b) and kidney (c, d)

The mRNA expression of *sgl1* and *sgl2* in different experiment groups of grass carp were quantified by Real-time PCR. The results were represented as the ratio to control. All data are shown as mean ± SE (n = 8-9). Significant differences (P < 0.05) were indicated by asterisks

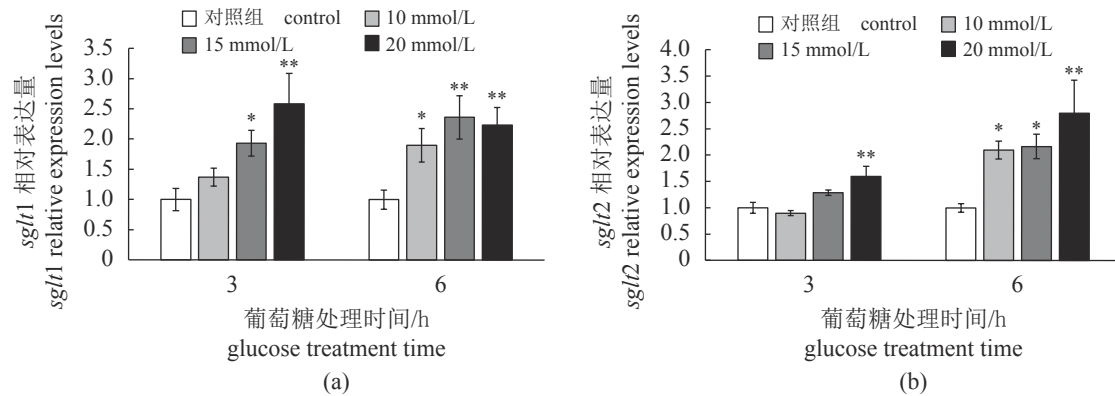


图 6 葡萄糖孵育对 CIK 细胞中 *sgl1* 和 *sgl2* 的基因表达的影响

用不同浓度 (10、15、20 mmol/L) 的葡萄糖处理 CIK 细胞 3 h (a) 和 6 h (b), 用荧光定量 PCR 检测不同实验组的 *sgl1* 和 *sgl2* 的表达水平。图中对照组为 1, 其他实验组数值是与对照组的比值, 数据用平均值±标准误差表示 ( $n=5-6$ )。图中星号表示显著性差异, \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$

Fig. 6 Effects of glucose incubation on the mRNA expressions of *sgl1* and *sgl2* in CIK cells

The CIK cells were incubation with different concentration glucose (10, 15 and 20 mmol/L) for 3 h (a) and 6 h (b). The mRNA expression of *sgl1* and *sgl2* in different experiment groups of CIK cells were quantified by Real-time PCR. The results were represented by the ratio to the control group. All datas are shown as mean ± SE ( $n = 5-6$ ). Asterisks indicate the significant differences. \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$

量较低。另外通过葡萄糖灌喂和离体细胞实验发现, 葡萄糖的增加能够提高草鱼肠道和肾脏中 *sgl1* 和 *sgl2* mRNA 的表达。本结果可为完善 SGLTs 在鱼类中调控血糖稳态的功能提供理论依据。

#### 参考文献 (References):

- [1] Blanco A M, Bertucci J I, Ramesh N, *et al.* Ghrelin facilitates GLUT2-, SGLT1- and SGLT2-mediated intestinal glucose transport in goldfish (*Carassius auratus*)[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 45024.
- [2] Wood I S, Trayhurn P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins[J]. *The British Journal of Nutrition*, 2003, 89(1): 3-9.
- [3] Szablewski L. Distribution of glucose transporters in renal diseases[J]. *Journal of Biomedical Science*, 2017, 24(1): 64.
- [4] Wright E M. Glucose transport families SLC5 and SLC50[J]. *Molecular Aspects of Medicine*, 2013, 34(2-3): 183-196.
- [5] Deng D, Yan N E. GLUT, SGLT, and SWEET: structural and mechanistic investigations of the glucose transporters[J]. *Protein Science*, 2016, 25(3): 546-558.
- [6] Kanwal A, Singh S P, Grover P, *et al.* Development of a cell-based nonradioactive glucose uptake assay system for SGLT1 and SGLT2[J]. *Analytical Biochemistry*, 2012, 429(1): 70-75.
- [7] Bianchi L, Diez-Sampedro A. A single amino acid change converts the sugar sensor SGLT3 into a sugar transporter[J]. *PLoS One*, 2010, 5(4): e10241.
- [8] Diez-Sampedro A, Hirayama B A, Osswald C, *et al.* A glucose sensor hiding in a family of transporters[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(20): 11753-11758.
- [9] Tazawa S, Yamato T, Fujikura H, *et al.* SLC5A9/SGLT4, a new Na<sup>+</sup>-dependent glucose transporter, is an essential transporter for mannose, 1,5-anhydro-D-glucitol, and fructose[J]. *Life Sciences*, 2005, 76(9): 1039-1050.
- [10] Tsai L J, Hsiao S H, Tsai L M, *et al.* The sodium-dependent glucose cotransporter SLC5A11 as an autoimmune modifier gene in SLE[J]. *Tissue Antigens*, 2008, 71(2): 114-126.
- [11] Hediger M A, Coady M J, Ikeda T S, *et al.* Expression cloning and cDNA sequencing of the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter[J]. *Nature*, 1987, 330(6146): 379-381.
- [12] Wright E M, Ghezzi C, Loo D D F. Novel and unexpected functions of SGLTs[J]. *Physiology (Bethesda)*, 2017, 32(6): 435-443.
- [13] Kennelly P J, Krebs E G. Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266(24): 15555-15558.

- [14] Wright E M, Loo D D F, Hirayama B A. Biology of human sodium glucose transporters[J]. *Physiological Reviews*, 2011, 91(2): 733-794.
- [15] Zhao F Q, Keating A F. Functional properties and genomics of glucose transporters[J]. *Current Genomics*, 2007, 8(2): 113-128.
- [16] Wright E M, Turk E. The sodium/glucose cotransport family SLC5[J]. *Pflügers Archiv*, 2004, 447(5): 510-518.
- [17] Yu A S, Hirayama B A, Timbol G, *et al.* Regional distribution of SGLT activity in rat brain *in vivo*[J]. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2013, 304(3): C240-247.
- [18] Wright E M. Renal Na<sup>+</sup>-glucose cotransporters[J]. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 2001, 280(1): 10-18.
- [19] Santer R, Calado J. Familial renal glucosuria and SGLT2: from a mendelian trait to a therapeutic target[J]. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 2010, 5(1): 133-141.
- [20] Pandey J, Tamrakar A K. SGLT2 inhibitors for the treatment of diabetes: a patent review (2013-2018)[J]. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 2019, 29(5): 369-384.
- [21] Althoff T, Hentschel H, Luig J, *et al.* Na<sup>+</sup>-D-glucose cotransporter in the kidney of *Squalus acanthias*: molecular identification and intrarenal distribution[J]. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2006, 290(4): R1094-R1104.
- [22] Althoff T, Hentschel H, Luig J, *et al.* Na<sup>+</sup>-D-glucose cotransporter in the kidney of *Leucoraja erinacea*: molecular identification and intrarenal distribution[J]. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2007, 292(6): R2391-R2399.
- [23] Gonçalves A F, Castro L F C, Pereira-Wilson C, *et al.* Is there a compromise between nutrient uptake and gas exchange in the gut of *Misgurnus anguillicaudatus*, an intestinal air-breathing fish?[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part D: Genomics and Proteomics*, 2007, 2(4): 345-355.
- [24] Syakuri H, Adamek M, Jung-Schroers V, *et al.* Glucose uptake in the intestine of the common carp *Cyprinus carpio*: indications for the involvement of the sodium-dependent glucose cotransporter 1 and its modulation under pathogen infection[J]. *Aquaculture*, 2019, 501: 169-177.
- [25] Sugiura S H, McDaniel N K, Ferraris R P. *In vivo* fractional P<sub>i</sub> absorption and NaP<sub>i</sub>-II mRNA expression in rainbow trout are upregulated by dietary P restriction[J]. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2003, 285(4): R770-R781.
- [26] Kirchner S, Panserat S, Lim P L, *et al.* The role of hepatic, renal and intestinal gluconeogenic enzymes in glucose homeostasis of juvenile rainbow trout[J]. *Journal of Comparative Physiology B*, 2008, 178(3): 429-438.
- [27] 谭肖英, 罗智, 刘永坚. 鱼类对饲料中糖的利用研究进展[J]. *中国饲料*, 2007(6): 19-23.
- Tan X Y, Luo Z, Liu Y J. Review of carbohydrate utilization in fish feed[J]. *China Feed*, 2007(6): 19-23(in Chinese).
- [28] Yang G K, Zhao W L, Qin C B, *et al.* Igfbp3 in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*): molecular identification and mRNA expression under glucose, insulin and glucagon[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2020, 242: 110394.
- [29] Liu T M. Structure/function studies of the high affinity Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter (SGLT1)[D]. Toronto: University of Toronto, 2009: 1-186.
- [30] Wright E M, Hirsch J R, Loo D D, *et al.* Regulation of Na<sup>+</sup>/glucose cotransporters[J]. *Journal of Experimental Biology*, 1997, 200(2): 287-293.
- [31] Hirsch J R, Loo D D F, Wright E M. Regulation of Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter expression by protein kinases in *Xenopus laevis* oocytes[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(25): 14740-14746.
- [32] Feric M, Zhao B Y, Hoffert J D, *et al.* Large-scale phosphoproteomic analysis of membrane proteins in renal proximal and distal tubule[J]. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2011, 300(4): C755-C770.
- [33] Birnir B, Lee H S, Hediger M A, *et al.* Expression and characterization of the intestinal Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter in COS-7 cells[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1990, 1048(1): 100-104.
- [34] Zhao F Q, Zheng Y C, Wall E H, *et al.* Cloning and



- expression of bovine sodium/glucose cotransporters[J]. *Journal of Dairy Science*, 2005, 88(1): 182-194.
- [35] Wells R G, Pajor A M, Kanai Y, *et al.* Cloning of a human kidney cDNA with similarity to the sodium-glucose cotransporter[J]. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 1992, 263(3): F459-F465.
- [36] Polakof S, Soengas J L. Evidence of sugar sensitive genes in the gut of a carnivorous fish species[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2013, 166(1): 58-64.
- [37] Dyer J, Al-Rammahi M, Waterfall L, *et al.* Adaptive response of equine intestinal Na<sup>+</sup>/glucose co-transporter (SGLT<sub>1</sub>) to an increase in dietary soluble carbohydrate[J]. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 2009, 458(2): 419-430.

## Cloning of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) SGLT1/2 genes and effect of glucose on its mRNA expression

TANG Wenyu<sup>1,2</sup>, YANG Guokun<sup>1,2</sup>, ZHAO Wenli<sup>1,2</sup>, QIN Chaobin<sup>1,2</sup>,  
ZHANG Yanmin<sup>1,2</sup>, MENG Xiaolin<sup>1,2</sup>, NIE Guoxing<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China;

2. Henan Research Center of Aquatic Animal Engineering Technology, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

**Abstract:** As the co-transporters, SGLTs (Sodium-glucose co-transporters) play a pivotal role in the absorption of the substances. As the important member of SGLTs, SGLT1 and SGLT2 are involved in keeping blood glucose homeostasis by regulation of glucose uptake. To investigate the role of SGLT1 and SGLT2 in the glucose uptake of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), a series of experiments were performed. In this study, the *C. idella sgl1* and *sglt2* were cloned in foregut and kidney by RT-PCR, and the sequences were analyzed by bioinformatics and the mRNA expressions were detected by real-time PCR. The results showed that the ORF of *C. idella sgl1* and *sglt2* were 1 977 and 1 989 bp, which encode 658 and 662 amino acids. Based on amino acids sequence, the structure of SGLT1 and SGLT2 protein were 14 transmembrane, and the results of sequence alignment and phylogenetic tree showed that the *C. idella* SGLT1 and SGLT2 proteins were closest to those of *Carassius auratus* and *Sinocyclocheilus grahami*. The real-time PCR results indicated that the higher expression of *sglt1* was in the intestine and kidney, and the low expression of *sglt1* was in other tissues of *C. idella*. The higher expression of *sglt2* was in the kidney, and the low expression of *sglt2* was in other tissues of *C. idella*. In OGTT experiment, the *sglt1* mRNA expression was significantly increased in *C. idella* foregut, and the *sglt2* mRNA expression was markedly increased in *C. idella* kidney by glucose treatment for 1 h. In in vitro experiment, the *sglt1* and *sglt2* mRNA expressions were markedly increased in the CIK cells by glucose treatment. In conclusion, the *C. idella sgl1/2* were cloned and played a role in glucose uptake. The results will provide the data basis for consummating SGLTs functions and theoretical foundation for investigating the regulation of glucose homeostasis in fish.

**Key words:** *Ctenopharyngodon idella*; SGLT1; SGLT2; gene clone; expression analysis

**Corresponding author:** NIE Guoxing. E-mail: niegx@htu.cn

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (31872581, 31902384); Science and Technology Breakthrough Major Project in Henan Province (202102110259)