



## 鲤 *gip* 克隆、序列分析及其基因表达的调节

杨国坤<sup>1,2</sup>, 徐双阳<sup>1,2</sup>, 梁晓敏<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. 河南省水产动物养殖工程技术研究中心, 河南 新乡 453007)

**摘要:** 为研究 GIP (葡萄糖依赖性肠促胰岛素, glucose-dependent insulinotropic polypeptide) 在鲤体内的生理功能, 实验利用 RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) 技术从鲤前肠克隆得到 *gip*, 对其进行生物信息学分析, 并对其 mRNA 的表达进行检测。结果显示, 鲤 *gip* 的开放阅读框 (open reading frame, ORF) 为 324 bp, 编码 107 个氨基酸。经过结构预测, 鲤 GIP 前体蛋白包括信号肽、N 端结构域、Gip 成熟肽和 C 端结构域。氨基酸序列比对及系统进化树分析结果显示, 鲤 GIP 蛋白与斑马鱼 GIP 蛋白的亲缘关系最近。Real-time PCR 结果显示, *gip* 在鲤各个组织中均有表达, 但在前肠和垂体组织中表达量最高。葡萄糖灌喂实验结果表明, 鲤的脑和前肠中 *gip* 的表达量在灌喂葡萄糖 1 和 2 h 后显著增加。在饥饿再投喂实验中, 鲤前肠中 *gip* 的表达量在饥饿后显著降低, 而再投喂后表达量显著升高。在饲养实验中, 高糖和高脂均能显著增加鲤前肠中 *gip* 基因的表达量。本研究克隆了鲤 *gip*, 并且不同的营养状态可以调节其表达水平。研究结果初步阐明了 GIP 的生理功能, 为探究 GIP 调节鱼类糖脂代谢的机制提供理论依据。

**关键词:** 鲤; GIP; 鉴定; 表达分析

**中图分类号:** Q 786; S 917.4

**文献标志码:** A

肠道作为重要的器官, 不仅参与营养物质的吸收, 而且能够分泌多种激素, 在能量代谢的调控过程中发挥着关键作用<sup>[1]</sup>。胰高血糖素样多肽 (glucagon-like peptides, GLPs) 和葡萄糖依赖性肠促胰岛素 (glucose-dependent insulinotropic polypeptide, GIP) 作为重要的肠道分泌的肠促胰岛素 (incretin), 参与机体的能量稳态调节<sup>[2]</sup>。GIP 首次从猪 (*Sus scrofa*) 小肠的粗提液中分离出来, 并于 1971 年被 John Brown 和 Jill Dryburgh 完成氨基酸序列解析<sup>[3-4]</sup>。最初的研究发现, GIP 能够抑制狗 (*Canis lupus*) 胃酸的分泌, 因此, 根据其生理学特

性命名其为胃酸抑制多肽 (gastric inhibitory polypeptide, GIP)<sup>[3]</sup>。高纯度的 GIP 实验表明, GIP 只能在超生理浓度时抑制胃酸分泌; 而在正常生理浓度时, GIP 主要发挥促进胰岛素分泌的功能<sup>[3]</sup>。因此, GIP 被重新命名为葡萄糖依赖性肠促胰岛素, 但是还沿用其首字母作为 GIP 的写法<sup>[3,5]</sup>。

在哺乳动物中, GIP 由十二指肠和近端空肠中的 K 细胞合成和分泌<sup>[3,6]</sup>; 其成熟肽包含 42 个氨基酸, 并且同源性高达 90% 以上<sup>[3]</sup>。研究表明, 在哺乳动物的 GIP 成熟肽中只有前 30 个氨基酸在其发挥生理学功能和与受体结合过程中起重要作用

收稿日期: 2021-05-14 修回日期: 2021-08-06

资助项目: 国家自然科学基金 (31872581, U1904118); 河南省重点科技攻关项目 (202102110259); 河南省自然科学基金 (212300410174)

第一作者: 杨国坤 (照片), 从事水产动物营养与饲料学研究, E-mail: ygk5210207@126.com

通信作者: 聂国兴, 从事水产动物营养与饲料学研究, E-mail: niegx@htu.cn



用<sup>[5]</sup>。与哺乳动物不同的是, *gip* 主要在斑马鱼 (*Danio rerio*) 的胰腺和肠道中表达<sup>[7]</sup>。虽然在七鳃鳗 (*Lampetra japonicum*) 基因组中预测到了 *gip* 样基因存在, 但其转录本却未被检测到<sup>[6]</sup>。

GIP 主要生理功能是促进胰岛素的合成和分泌, 并且能够上调胰岛  $\beta$  细胞中葡萄糖敏感元件的基因表达<sup>[3, 8]</sup>。此外, GIP 能够增加哺乳动物脂蛋白脂肪酶的合成和分泌<sup>[9-10]</sup>, 并且能够增加脂肪组织对葡萄糖的吸收和抑制胰高血糖素诱导的脂肪分解过程<sup>[4, 11]</sup>。另外, GIP 能够促进脂肪酸前体物质转化为脂肪酸, 并能够增加脂肪在小鼠 (*Mus musculus*) 附睾脂肪组织中的沉积<sup>[12-13]</sup>。GIP 还能够通过调节 HSL (hormone sensitive lipase) 和 LPL (lipoprotein lipase) 的活性从而影响血浆中游离脂肪酸的水平<sup>[14]</sup>。然而, GIP 在鱼类中的研究比较少。研究发现, 斑马鱼的 GIP 能够通过哺乳动物的 GLP-1 和 GIP 受体发挥肠促胰岛素的功能<sup>[15]</sup>。

鲤 (*Cyprinus carpio*) 是我国重要的淡水养殖经济鱼类, 在我国大部分地区都有养殖。随着水产养殖业的高速发展, 饲料源蛋白的价格也随之升高。作为重要的能源物质, 糖类已在饲料中广泛使用。相对于哺乳动物, 鱼类对糖类的利用率比较低, 并且过多糖类的供给极易造成体内能量过剩、脂肪过度沉积和脂质代谢紊乱, 导致鱼类脂肪肝发生率升高和免疫力下降, 从而引发鱼类的代谢疾病。在哺乳动物中, GIP 对糖脂代谢的调控具有关键作用, 但在鱼类中还未有报道。因此, 本实验首先从鲤中克隆到 *gip*, 研究其在不同组织中的表达情况及不同营养状态对其表达的影响, 为探究 GIP 在调控鱼类中糖脂代谢的作用奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

本实验所用鲤购自河南省延津县渔场。用于基因克隆和组织分布实验的鱼体质量为 100~150 g, 用于葡萄糖灌喂和饥饿再投喂实验的鱼体质量为 60~70 g, 用于高糖、高脂饲养的鱼体质量为 30~35 g。所有实验用鱼在实验前都在室内循环养殖系统暂养 2 周以上。实验中所用的引物都由金唯智生物科技有限公司合成。

### 1.2 鲤 *gip* 基因克隆及组织分布

鲤 *gip* 基因的克隆采用反转录 PCR (RT-PCR)

的方法进行。首先用斑马鱼 *gip* (EF010535.1) 的核苷酸序列在 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 鲤转录组数据库中进行比对, 得到鲤预测的 *gip* 基因序列。根据预测的鲤 *gip* 基因序列设计引物 (F: ATGAAGGTTGCAGTATT, R: TTACACATCAAGC CCCT)。用 RNAiso Plus (TaKaRa) 提取鲤前肠组织总 RNA, 按照反转录试剂盒 (TaKaRa) 说明书的操作方法, 对鲤前肠组织总 RNA 进行反转录, 合成第一条链 cDNA。用设计的引物对鲤 *gip* 片段进行扩增。PCR 扩增产物用 E.Z.N.A 胶回收试剂盒 (OMEGA, bio-tek) 进行纯化, 然后连接到 pMD20-T (TaKaRa) 载体上进行测序。测序后, 对得到的基因序列进行分析, 信号肽分析: Signal-5.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>); 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。

在组织分布实验中, 选取 3 尾健康、体质量为 100~150 g 的鲤, 经过 MS222 麻醉后, 取相应的组织样品, 迅速放入无菌无酶的 EP 管中, 并立即放入液氮。取样结束后, 取出样品管放入 -80 °C 冰箱中保存, 以备总 RNA 提取用。

### 1.3 葡萄糖灌喂和饥饿再投喂对鲤 *gip* 表达的影响

葡萄糖灌喂和饥饿再投喂实验与本团队前期的实验相同<sup>[16]</sup>。在葡萄糖灌喂实验中, 选取体质量为 60~70 g 的健康鲤 96 尾随机分为两组。对照组分为 4 个养殖桶, 每桶 12 尾鱼, 灌喂磷酸盐缓冲溶液 (PBS); 处理组也分为 4 个养殖桶, 每桶 12 尾鱼, 灌喂葡萄糖 (溶解于 PBS), 灌喂量为 1.67 mg/g B.W (B.W, 体质量)。灌喂后, 分别在 1、2、3 和 5 h 后进行取样, 取样前先用 MS222 对实验鱼进行麻醉, 然后断头处死, 迅速取出前肠和脑组织放入无菌无酶 EP 管中, 立即放入液氮。然后转入 -80 °C 冰箱中保存, 以备总 RNA 提取用。

在饥饿再投喂实验中, 选取体质量为 60~70 g 的健康鲤 75 尾随机分为 3 组, 每组 1 个养殖桶, 每桶 25 尾鱼。对照组按照体质量 3% 投喂鲤商品饲料 (通威), 每天投喂 3 次 (08:00、13:00 和 18:00), 共计 7 d; 饥饿组不投喂饲料, 共计 7 d; 再投喂组先饥饿处理 7 d, 然后在取样前 6 h 进行投喂。取样前先用 MS222 对实验鱼进行麻醉, 然后断头处死, 迅速取出前肠组织放入无菌无酶 EP 管中, 之后立即放入液氮。然后转入 -80 °C 冰箱

中保存, 以备总 RNA 提取用。

#### 1.4 高糖、高脂饲养对鲤 *gip* 表达的影响

高糖饲养实验中, 所用的饲料分为 2 组, 即低糖组 (25 % 葡萄糖) 和高糖组 (50 % 葡萄糖)。高脂饲养实验中, 所用的饲料分为低脂组 (5 % 粗脂肪) 和高脂组 (10 % 粗脂肪)。选取体质量为 30~35 g 的实验用鱼 360 尾, 随机分为 12 桶, 每桶 30 尾, 每 3 桶为 1 个处理组, 共计 4 个处理组。各个处理按照体质量 3 % 投喂, 每天投喂 3 次 (08:00、13:00 和 18:00), 共计 8 周。实验结束后, 每桶取 4 尾实验用鱼进行取样。取样前先用 MS222 对实验鱼进行麻醉, 然后断头处死, 迅速取出前肠组织放入无菌无酶 EP 管中, 立即放入液氮。然后转入 -80 °C 冰箱中保存, 以备总 RNA 提取用。

#### 1.5 RNA 提取、cDNA 合成和 Real-time PCR

所有实验组织样品总 RNA 均用 RNAiso Plus (TaKaRa) 进行提取。样品总 RNA 浓度测定 (Nanodrop 2000, Thermo) 后, 按照反转录试剂盒 (PrimeScript RT reagent kit with gDNA Eraser, TaKaRa) 的操作方法, 首先对 1 μg 总 RNA 中基因组 DNA 进行清除, 然后合成第一条链 cDNA。合成的第一条链 cDNA 稀释 10 倍作为 Real-time PCR 模板, 用合成的 *gip* 基因定量引物 (F: AGTTTAGCCGC-CGTTAC, R: TTTCTTCTCCCTCTGATTG; 扩增效率: 1.964) 进行 Real-time PCR, 反应在 Light-

Cycler 480 II (Roche, Switzerland) 上进行, 反应体系: 2×SYBR Green (Bimake, China) 5 μL, 引物各 0.5 μL, cDNA 模板 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 3 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, 以鲤 18S rRNA (F: GAGACTCCGGCTTGC TAAAT, R: CAGACCTGTTATTGCTCCATCT; 扩增效率: 1.941) 为内参基因, 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并进行 LSD 和 Duncan 氏比较, 结果用平均值±标准误表示, *P*<0.05 为具有显著相关性。

## 2 结果

### 2.1 鲤 *gip* 克隆、序列分析及组织分布

对克隆得到的序列进行测序分析发现, 鲤 *gip* 的开放阅读框为 324 bp, 编码 107 个氨基酸。鲤 *Gip* 前体蛋白包括 4 个结构域, 分别为信号肽、N 端结构域、*Gip* 成熟肽和 C 端结构域 (图 1)。

鲤 *Gip* 的成熟肽包括 31 个氨基酸, 并且前 2 个氨基酸为 YA-, 在鲤 *Gip* 前体蛋白中, N 端结构域与 *Gip* 成熟肽之间有 2 个保守的碱性氨基酸残基-RR-, 在 *Gip* 成熟肽与 C 端结构域之间也存在 2 个保守的碱性氨基酸残基-KK- (图 2)。

对不同物种 *GIP* 成熟肽进行同源性分析发现, 鲤 *Gip* 成熟肽与鱼类 *Gip* 成熟肽同源性比较高,

```

1 ATG AAG GTT GCA GTA TTT GCG CTG GTT TTG ATT TGC CTG GGC AAT GCA TGG TCA TGC ATG 60
1 M K V A V F A L V L I C L G N A W S C M 20
61 GGT TCC CAG CCT CTT GAT AGC AGT TCG CGA AAT GAG ATC CAG AAG TTT AGC CGC CGT TAC 120
21 G S Q P L D S S S R N E I Q K F S R R Y 40
121 GCT GAA TCA ACC ATT GCA AGT GAC ATC AGC AAA ATT GTG GAC TCG ATG GTT CAG AAA AAC 180
41 A E S T I A S D I S K I V D S M V Q K N 60
181 TTT GTA AAC TTT CTG CTC AAT CAG AGG GAG AAG AAA AGC GAA CCA ACT ATA GAA GAT CCA 240
61 F V N F L L N Q R E K K S E P T I E D P 80
241 GAC ACC CGG ATC TTC AAT GAC CTG CTG AAA AAA GAG TTT GTG ATG TGG ATT CAG AGA AAA 300
81 D T R I F N D L L K K E F V M W I Q R K 100
301 GGC GAT GCA TTC AAG AAT CAA TAA 324
101 G D A F K N Q * 107

```

图 1 鲤 *Gip* cDNA 和氨基酸序列

单下划线表示信号肽, 波浪线为 N-端结构域, 方框表示 *GIP* 成熟肽, 虚线表示 C 端结构域, 星号表示终止密码子

Fig. 1 cDNA and deduced amino acids of *C. carpio* *Gip*

Single underline represents signal peptide, wavy line represents N-terminal domain, boxes represent the mature *GIP* peptides, dotted line represents C-terminal domain, the asterisk represents the stop codon



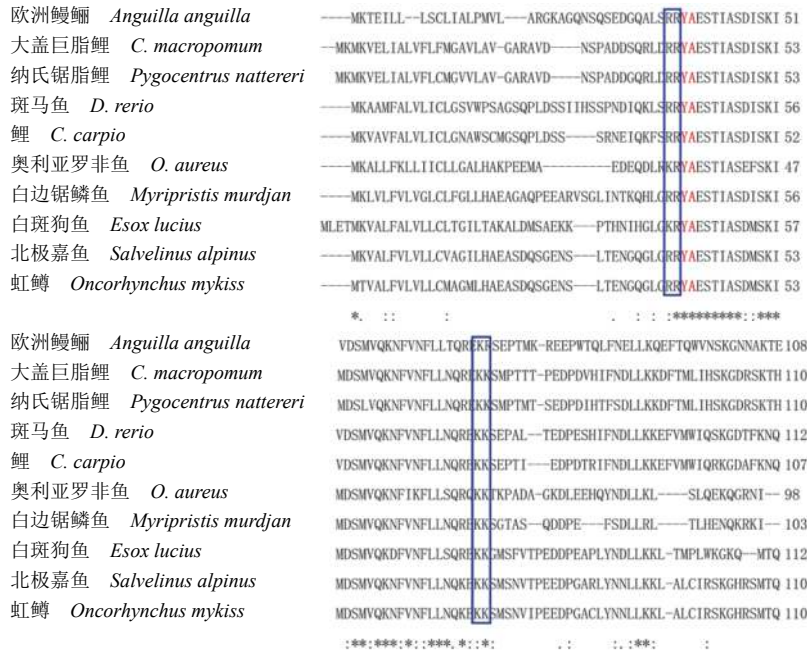


图2 鲤与其他物种Gip氨基酸之间的比对

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；YA-残基用红色表示；碱性氨基酸用蓝色方框表示。物种GenBank号：欧洲鳗鲡(XP 035254494.1)；大盖巨脂鲤(XP 036428760.1)；纳氏锯脂鲤(XP 037400368.1)；斑马鱼(EF010535.1)；奥利亚罗非鱼(XP 039472503.1)；白边锯鳞鱼(XP 029934215.1)；白斑狗鱼(XM 010865945.2)；北极嘉鱼(XM 023991922.1)；虹鳟(XM 021576059.1)

Fig. 2 Amino acid sequence alignment of *C. carpio* Gip and other species

The identical amino acids are represented by \*; and the highly and less conserved amino acids are represented by : and ;; the YA- residues are represented by red; the basic amino acids are represented by blue box. The GenBank number: *Anguilla anguilla* (XP 035254494.1); *C. macropomum* (XP 036428760.1); *Pygocentrus nattereri* (XP 037400368.1); *D. rerio* (EF010535.1); *O. aureus* (XP 039472503.1); *Myripristis murdjan* (XP 029934215.1); *Esox lucius* (XM 010865945.2); *Salvelinus alpinus* (XM 023991922.1); *Oncorhynchus mykiss* (XM 021576059.1)

达到 77 % 以上，并且与鲤科 (Cyprinidae) 鱼类斑马鱼和大盖巨脂鲤 (*C. macropomum*) Gip 成熟肽同源性分别为 100 %和 96.77 % (表 1，括号内数字是该物种的 GenBank 号)。

表 1 鲤 Gip 与其他物种的同源性分析

Tab. 1 Identities analysis of *C. carpio* Gip compared to other species

物种 species	同源性/% identity
鲤 <i>C. carpio</i>	100
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	100 (EF010535.1)
大盖巨脂鲤 <i>C. macropomum</i>	96.77 (XP_036428760.1)
虹鳟 <i>O. mykiss</i>	90.32 (XM_021576059.1)
白斑狗鱼 <i>E. lucius</i>	87.10 (XM_010865945.2)
小体鲟 <i>Acipenser ruthenus</i>	83.87 (RXM37260.1)
奥利亚罗非鱼 <i>O. aureus</i>	77.42 (XP_039472503.1)
非洲爪蟾 <i>Xenopus tropicalis</i>	54.84 (EF010532.1)
鸡 <i>Gallus gallus</i>	54.84 (EF010531.1)
小鼠 <i>Mus musculus</i>	51.61 (U34295.1)
人 <i>Homo sapiens</i>	48.39 (M18185.1)

用 MEGA 6.0 软件中的邻接法 (Neighbor-joining) 对不同物种 GIP 蛋白构建进化树，鲤 Gip 与其他鱼类的 Gip 聚为一大支，并且与鲤科鱼类的 Gip 聚为一支 (图 3)。

对鲤 *gip* 在端脑、中脑等 16 个组织中的表达情况分析发现，*gip* 在鲤各个组织中都有表达，但在前肠和垂体中的表达量最高 (图 4)。

### 2.2 葡萄糖灌喂和饥饿再投喂对鲤 *gip* 表达的影响

在葡萄糖灌喂实验中，Real-time PCR 结果显示，葡萄糖灌喂 1 和 2 h 后，能够显著增加鲤前肠和脑中的 *gip* 表达量，在灌喂 5 h 后 *gip* 表达量恢复到正常水平 (图 5-a, b)。在饥饿再投喂实验中，饥饿 7 d 后鲤前肠中 *gip* 的表达量显著降低，再投喂后能够显著增加鲤前肠 *gip* 的基因表达量 (图 5-c)。

### 2.3 高糖、高脂饲养对鲤 *gip* 表达的影响

通过高糖、高脂饲料对鲤饲养，探究不同能源物质对鲤 *gip* 的表达调控作用。结果表明，

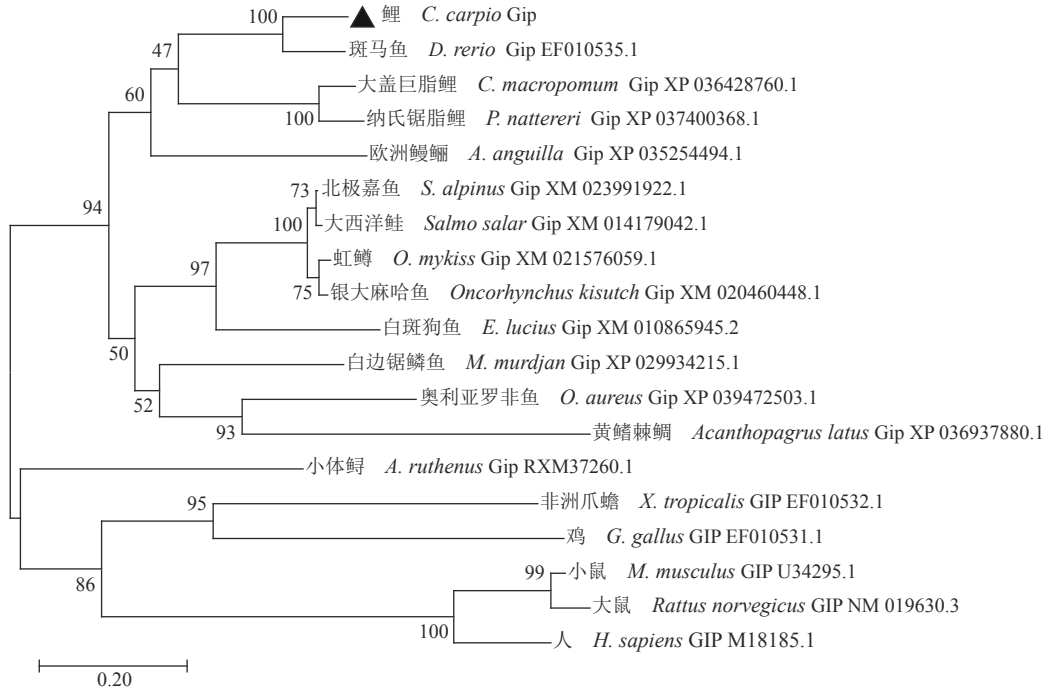


图 3 鲤与其他物种 GIP 氨基酸进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree based on amino acid alignment for GIP in different species

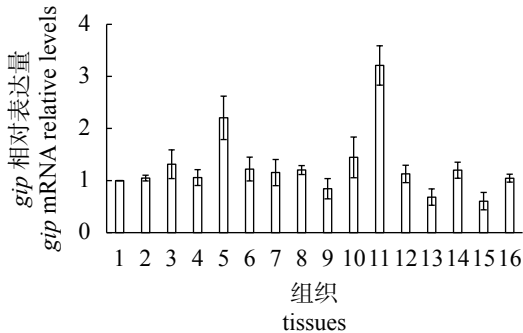


图 4 定量 PCR 检测 *gip* 在鲤各组织中的表达量

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. 白肌, 16. 性腺,  $n=3$

Fig. 4 Analysis of expression levels of *gip* in different tissues of *C. carpio* 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. white muscle, 16. gonad,  $n=3$

50% 葡萄糖水平的饲料饲养 8 周后, 能够显著增加鲤前肠中 *gip* 的表达量 (图 6-a); 并且用 12% 粗脂肪水平的饲料饲养 8 周后, 也能够显著增加鲤前肠中 *gip* 的表达量 (图 6-b)。

### 3 讨论

GIP 调节脂肪代谢、葡萄糖吸收、胰岛素分

泌以及骨骼发育等生理功能的研究在哺乳动物中已有大量的报道<sup>[3, 5, 14]</sup>, 但是 GIP 在鱼类中的相关研究报道比较少。为了研究 GIP 在鱼类中的生理功能, 本研究以鲤为对象, 从前肠组织中克隆得到鲤的 *gip*。经过序列分析发现, 鲤的 GIP 前体蛋白结构与哺乳动物的相同<sup>[3, 5]</sup>, 都包括 4 个结构域: 信号肽、N 端结构域、Gip 成熟肽和 C 端结构域。在鲤的 GIP 成熟肽两端存在精氨酸和赖氨酸残基, 在精氨酸和赖氨酸残基位点进行剪切后才能形成成熟的 GIP 多肽。同样, 在对哺乳动物的研究中也发现, GIP 前体蛋白在精氨酸位点经过 PC1/3 酶切后才能形成 42 个氨基酸的成熟肽<sup>[17-18]</sup>。与哺乳动物不同的是, 鲤的 GIP 成熟肽只有 31 个氨基酸。这与斑马鱼中的研究结果比较相似, 成熟肽同样都是 31 个氨基酸<sup>[15, 18]</sup>。虽然七鳃鳗中并未检测到 *gip* 的转录, 但根据其基因组中的 GIP 预测序列分析, 发现其成熟肽包含 30 个氨基酸<sup>[6]</sup>。GIP 成熟肽的第 2 位都为丙氨酸 (-A-) 残基, 其能够被 DPP-4 识别并水解而形成无活性的 GIP (3-42) 形式<sup>[3, 19-21]</sup>。在实验克隆到的鲤 GIP 成熟肽中, 前两个氨基酸为酪氨酸-丙氨酸 (YA-) 残基, 这与对哺乳动物的研究结果相似, 说明鲤 GIP 也可能被 DPP-4 水解而形成无活性的 GIP (3-31) 形式。基于成熟肽的氨基酸序列分析发现, 鲤 GIP 与其他鱼

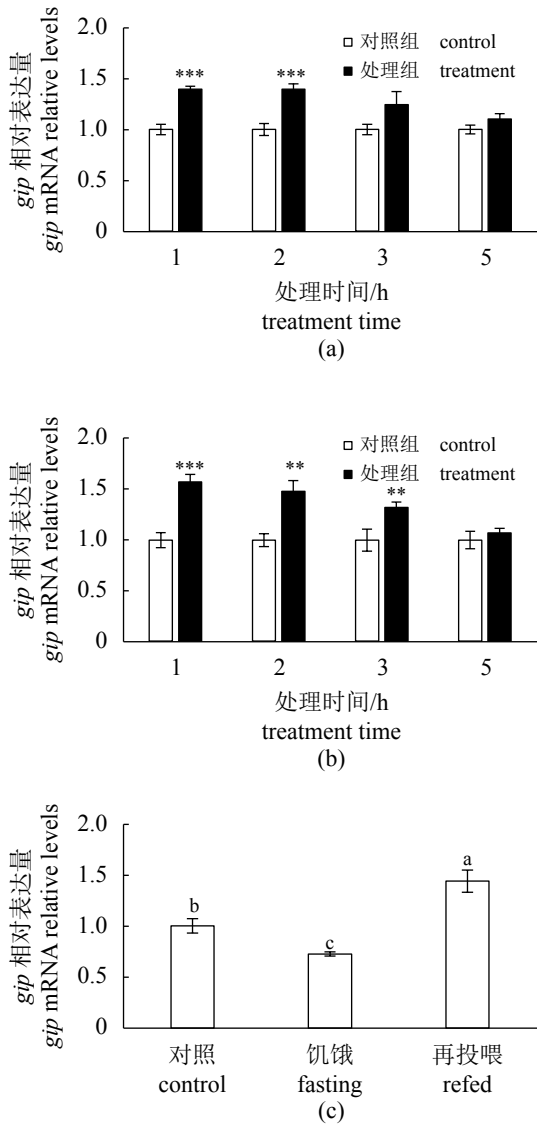


图5 葡萄糖灌喂和饥饿再投喂对鲤 *gip* 基因表达的影响

(a) 葡萄糖灌喂, 鲤脑, (b) 葡萄糖灌喂, 鲤前肠, (c) 饥饿再投喂, 鲤前肠。图中对照组为 1, 其他实验组数值是与对照组的比值,  $n=8\sim 10$ 。对照组和处理组之间, \*\*,  $P<0.01$ , \*\*\*,  $P<0.001$ , 下同。(c) 中不同字母代表差异显著

Fig. 5 Effects of OGTT and fasting/refed on the mRNA expression of *gip*

(a) OGTT, brain of *C. carpio*, (b) OGTT, foregut of *C. carpio*, (c) fasting/refed, foregut of *C. carpio*. The results were represented as the fold of control.  $n = 8-10$ . Between different groups, \*\*,  $P<0.01$ , \*\*\*,  $P<0.001$ , the same below. Significant differences are indicated by different lowercases letters in (c)

类 *Gip* 的同源性比较高, 达到 77% 以上, 并且与鲤科鱼类的斑马鱼和大盖巨脂鲤的同源性分别为 100% 和 96.77%。进化树分析发现, 鲤 *Gip* 与鱼类 *Gip* 聚为一支, 并与斑马鱼 *Gip* 聚为一支。由以上的序列分析发现, 克隆得到的序列为鲤的

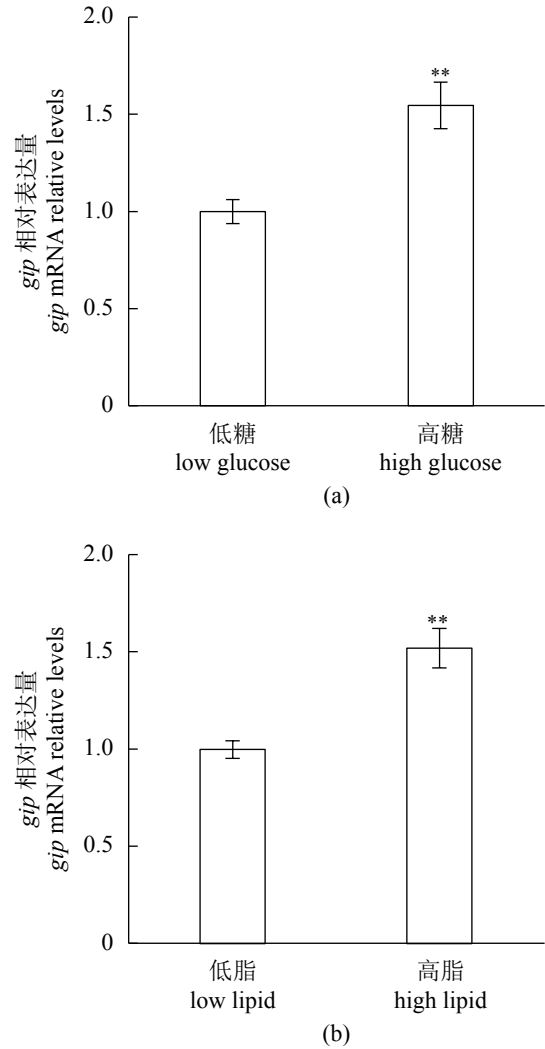


图6 高糖 (a) 和高脂 (b) 饲喂对鲤前肠中 *gip* 基因表达影响

用不同饲料饲养鲤 8 周后, Real-time PCR 检测不同实验组的 *gip* 的表达水平。图中低剂量组为 1, 高剂量组数值是与低剂量组的比值,  $n=10\sim 11$ , \*\*,  $P<0.01$

Fig. 6 Effects of high glucose (a) and high lipid (b) on expressions of *gip* in foregut of *C. carpio*

The *C. carpio* were fed with different forage for eight weeks. The mRNA expression of *gip* in different experiment groups were quantified by Real-time PCR. The results were represented as the fold of low-dose group.  $n = 10-11$ , \*\*,  $P<0.01$

Gip 序列。

为了研究 *gip* mRNA 在鲤不同组织中的分布情况, 实验对鲤端脑、中脑等 16 个组织中 *gip* 的表达进行定量分析, 结果表明, *gip* 在鲤的各个组织中都有表达, 但在前肠和垂体组织中表达量最高。作为肠促胰岛素, GIP 主要在前肠的 K 细胞中合成并分泌<sup>[3, 18]</sup>, 并且在人类和啮齿类的胃和颌下唾液腺中也检测到有 *gip* 的表达<sup>[3]</sup>。*gip* 在鲤的

脑区也普遍表达, 这与在哺乳动物中的研究结果相似, 在哺乳动物的海马体与大脑的齿状回区域都有检出 *gip* 的表达<sup>[6, 22]</sup>。在斑马鱼和非洲爪蟾体内, *gip* 在胰腺和肠道中都有表达<sup>[6-7]</sup>; 在鸡体内, *gip* 主要在肠道中表达, 而在胰腺和肝脏中未检测到 *gip* 的表达<sup>[6]</sup>。以上结果表明, *gip* 在多组织中表达是普遍现象。

为了研究短期的营养摄入增加或限制对鲤 *gip* mRNA 表达的影响, 开展了葡萄糖灌喂实验和饥饿再投喂实验。在葡萄糖灌喂实验中, 葡萄糖灌喂处理 1 和 2 h 后, *gip* 在脑和前肠中的表达量显著升高, 而在葡萄糖处理 5 h 后, *gip* 的表达量恢复到对照组水平。在对人类的研究中发现, 口服葡萄糖 30 min 后, 血液中 GIP 含量显著升高, 在口服葡萄糖 3 h 后血液中 GIP 含量逐渐下降<sup>[23]</sup>。同样有研究表明, 人类口服葡萄糖后血液中 GIP 水平显著升高<sup>[24]</sup>, 并且在口服葡萄糖后女性血液中 GIP 含量明显高于男性<sup>[25]</sup>。在正常或者 2 型糖尿病患者中发现, 口服葡萄糖后血液中 GIP 含量都显著增加, 并在口服葡萄糖 4 h 后 GIP 含量能够恢复到正常水平<sup>[26]</sup>。以上结果表明, 作为葡萄糖依赖的肠促胰岛素, 葡萄糖负荷能够增加 GIP 表达和分泌。在饥饿再投喂实验中, 饥饿 7 d 后, *gip* 在前肠中的表达量显著降低, 而再投喂后, *gip* 表达量能够显著增加。同样, 在对人类的研究中发现, 饥饿后血液中的 GIP 含量明显降低<sup>[27]</sup>, 并且摄入葡萄糖后血液中 GIP 含量明显升高<sup>[28]</sup>。GIP 在人类循环系统中的正常水平为 0.06~0.10 nmol/L, 而在餐后 GIP 的含量会增加到 0.2~0.5 nmol/L<sup>[3, 29-30]</sup>。另外, 最近的研究表明, 在摄入葡萄糖后, 人类血液中 GIP 的含量显著升高<sup>[24]</sup>。以上结果表明, 禁食和食物摄入对 GIP 的合成和分泌都会有调节作用。

为了探究长期的高糖或高脂摄入对鲤 *gip* 表达的影响, 分别用高糖和高脂饲料对鲤进行 8 周饲养。实验结果表明, 高糖和高脂饲料都能增加鲤前肠中 *gip* 基因的表达。作为葡萄糖依赖的肠促胰岛素, 营养物质的吸收提高 GIP 的合成与分泌是一个普遍现象<sup>[3, 5]</sup>。并且研究表明, 能够促进 GIP 合成和分泌的营养物质主要是糖类和脂类<sup>[3, 6]</sup>。除此之外, 蛋白的水解产物或者一些特定的氨基酸也能够促进 GIP 的合成和分泌<sup>[31-33]</sup>。在猪和啮齿动物中, 促进 GIP 合成和分泌的主要营养物质是糖类, 而在人类体内促进 GIP 合成和分泌的却

是脂类物质<sup>[3, 5]</sup>。说明 GIP 对不同营养物质的敏感性具有物种特异性, 本实验对象鲤为杂食性鱼类, 糖类和脂类可能都是 GIP 合成和分泌的刺激因子, 因此在实验中, 高糖和高脂饲喂后都能够促进前肠中 *gip* 基因的表达。

本研究从鲤前肠组织中克隆得到 *gip* 基因序列, 并对其进行了序列结构分析、同源性比对和进化树分析。组织分布结果表明, *gip* 在鲤各个组织中均有表达, 但在前肠和垂体组织中的表达量最高。葡萄糖灌喂实验发现, 葡萄糖灌喂 1 和 2 h 后能够显著增加鲤脑和前肠组织中 *gip* 的表达量; 在饥饿再投喂实验中, 饥饿后能够降低 *gip* 的表达量, 再投喂后能够显著增加鲤前肠中 *gip* 的表达量。另外通过饲养实验发现, 高糖和高脂都能够增加鲤前肠中 *gip* 的表达量。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

#### 参考文献 (References):

- [1] Karra E, Batterham R L. The role of gut hormones in the regulation of body weight and energy homeostasis[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2010, 316(2): 120-128.
- [2] Mudaliar S, Henry R R. The incretin hormones: from scientific discovery to practical therapeutics[J]. *Diabetologia*, 2012, 55(7): 1865-1868.
- [3] Baggio L L, Drucker D J. Biology of incretins: GLP-1 and GIP[J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(6): 2131-2157.
- [4] Marks V. The early history of GIP 1969-2000: from enterogastrone to major metabolic hormone[J]. *Peptides*, 2019, 122: 170155.
- [5] Yip R G, Wolfe M M. GIP biology and fat metabolism[J]. *Life Sciences*, 1999, 66(2): 91-103.
- [6] Musson M C, Jepeal L I, Finnerty J R, et al. Evolutionary expression of glucose-dependent-insulinotropic polypeptide (GIP)[J]. *Regulatory Peptides*, 2011, 171(1-3): 26-34.
- [7] Musson M C, Jepeal L I, Mabray P D, et al. Expression of glucose-dependent insulinotropic polypeptide in the zebrafish[J]. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2009, 297(6): R1803-R1812.
- [8] Wang Y H, Montrose-Rafizadeh C, Adams L, et al. GIP regulates glucose transporters, hexokinases, and glucose-induced insulin secretion in RIN 1046-38 cells[J].



- Molecular and Cellular Endocrinology*, 1996, 116(1): 81-87.
- [9] Eckel R H, Fujimoto W Y, Brunzell J D. Gastric inhibitory polypeptide enhanced lipoprotein lipase activity in cultured preadipocytes[J]. *Diabetes*, 1979, 28(12): 1141-1142.
- [10] Kim S J, Nian C L, McIntosh C H S. GIP increases human adipocyte LPL expression through CREB and TORC2-mediated *trans*-activation of the *LPL* gene[J]. *Journal of Lipid Research*, 2010, 51(11): 3145-3157.
- [11] Dupre J, Greenidge N, McDonald T J, *et al.* Inhibition of actions of glucagon in adipocytes by gastric inhibitory polypeptide[J]. *Metabolism*, 1976, 25(11): 1197-1199.
- [12] Beck B, Max J P. Gastric inhibitory polypeptide enhancement of the insulin effect on fatty acid incorporation into adipose tissue in the rat[J]. *Regulatory Peptides*, 1983, 7(1): 3-8.
- [13] Oben J, Morgan L, Fletcher J, *et al.* Effect of the entero-pancreatic hormones, gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like polypeptide-1(7-36) amide, on fatty acid synthesis in explants of rat adipose tissue[J]. *Journal of Endocrinology*, 1991, 130(2): 267-272.
- [14] Heimburger S M, Bergmann N C, Augustin R, *et al.* Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) and cardiovascular disease[J]. *Peptides*, 2020, 125: 170174.
- [15] Graham G V, Conlon J M, Abdel-Wahab Y H, *et al.* Evaluation of the insulinotropic and glucose-lowering actions of zebrafish GIP in mammalian systems: Evidence for involvement of the GLP-1 receptor[J]. *Peptides*, 2018, 100: 182-189.
- [16] Yang L P, Zhi S Y, Yang G K, *et al.* Molecular identification of FNDC5 and effect of irisin on the glucose metabolism in common carp (*Cyprinus carpio* L. ) [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2021, 301: 113647.
- [17] Tseng C C, Jarboe L A, Landau S B, *et al.* Glucose-dependent insulinotropic peptide: structure of the precursor and tissue-specific expression in rat[J]. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993, 90(5): 1992-1996.
- [18] Irwin D M, Zhang T. Evolution of the vertebrate glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) gene[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part D: Genomics and Proteomics*, 2006, 1(4): 385-395.
- [19] Kieffer T J, McIntosh C H, Pederson R A. Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 *in vitro* and *in vivo* by dipeptidyl peptidase IV[J]. *Endocrinology*, 1995, 136(8): 3585-3596.
- [20] Irwin D M. Molecular evolution of GIP and Exendin and their receptors[J]. *Peptides*, 2020, 125: 170158.
- [21] Deacon C F. Metabolism of GIP and the contribution of GIP to the glucose-lowering properties of DPP-4 inhibitors[J]. *Peptides*, 2020, 125: 170196.
- [22] Nyberg J, Jacobsson C, Anderson M F, *et al.* Immunohistochemical distribution of glucose-dependent insulinotropic polypeptide in the adult rat brain[J]. *Journal of Neuroscience Research*, 2007, 85(10): 2099-2119.
- [23] Abraham K A, Kearney M L, Reynolds L J, *et al.* Red wine enhances glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP) and insulin responses in type 2 diabetes during an oral glucose tolerance test[J]. *Diabetology International*, 2016, 7(2): 173-180.
- [24] Marathe C S, Pham H, Marathe J A, *et al.* The relationship between plasma GIP and GLP-1 levels in individuals with normal and impaired glucose tolerance[J]. *Acta Diabetologica*, 2020, 57(5): 583-587.
- [25] Matsuo T, Kusunoki Y, Katsuno T, *et al.* Response of incretins (GIP and GLP-1) to an oral glucose load in female and male subjects with normal glucose tolerance[J]. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2014, 106(2): e25-e29.
- [26] Nauck M A, El-Ouaghli A, Gabrys B, *et al.* Secretion of incretin hormones (GIP and GLP-1) and incretin effect after oral glucose in first-degree relatives of patients with type 2 diabetes[J]. *Regulatory Peptides*, 2004, 122(3): 209-217.
- [27] Rao R S, Kini S. GIP and bariatric surgery[J]. *Obesity Surgery*, 2011, 21(2): 244-252.
- [28] Pham H, Marathe C S, Phillips L K, *et al.* Longitudinal changes in fasting and glucose-stimulated GLP-1 and GIP in healthy older subjects[J]. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2019, 104(12): 6201-6206.
- [29] Vilsbøll T, Krarup T, Deacon C F, *et al.* Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients[J]. *Diabetes*, 2001, 50(3): 609-613.
- [30] Ørskov C, Wettergren A, Holst J J. Secretion of the



- incretin hormones glucagon-like peptide-1 and gastric inhibitory polypeptide correlates with insulin secretion in normal man throughout the day[J]. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 1996, 31(7): 665-670.
- [31] Carr R D, Larsen M O, Winzell M S, *et al.* Incretin and islet hormonal responses to fat and protein ingestion in healthy men[J]. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2008, 295(4): E779-E784.
- [32] Thomas F B, Mazzaferri E L, Crockett S E, *et al.* Stimulation of secretion of gastric inhibitory polypeptide and insulin by intraduodenal amino acid perfusion[J]. *Gastroenterology*, 1976, 70(4): 523-527.
- [33] Wolfe M M, Zhao K B, Glazier K D, *et al.* Regulation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide release by protein in the rat[J]. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2000, 279(3): 561-566.

## Cloning and sequence analysis of common carp (*Cyprinus carpio*) *gip* and the regulation of its mRNA expression

YANG Guokun<sup>1,2</sup>, XU Shuangyang<sup>1,2</sup>, LIANG Xiaomin<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, Xinxiang 453007, China)

**Abstract:** As an important incretin, GIP (glucose-dependent insulinotropic polypeptide) is involved in regulation of glucose uptake and lipid deposition. To investigate the role of *Gip* in *Cyprinus carpio*, the *gip* was cloned from the foregut by RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction). The sequence was analyzed by bioinformatics and the mRNA expression was detected by Real-time PCR. The result showed that the ORF (Open reading frame) of *C. carpio gip* is 324 bp, which encodes 107 amino acids. Based on amino acids sequence, the structure of *Gip* precursor protein contains four domains: signal peptide, N-terminal domain, mature *Gip* peptide and C-terminal domain. The result of sequence alignment and phylogenetic tree showed that the identity of *C. carpio* *Gip* protein was the closest to that of *D. rerio*. The Real-time PCR result showed that the *gip* was widely expressed in multiple tissues, and had higher expression in the intestine and pituitary of *C. carpio*. In OGTT experiment, the *gip* expression was significantly increased in *C. carpio* foregut and brain after glucose treatment. In the fasting and refeeding experiment, the *gip* expression in the foregut was markedly decreased after fasting for 7 days, and was significantly increased after refed. In the feeding experiment, the *gip* expression level was increased in the high glucose and high lipid groups. In this study, *C. carpio gip* was cloned, and the expression level was regulated by nutrient status. The results provide the data base for illustrating *Gip* biological functions and theoretical foundation for investigating the regulation of glucose and lipid metabolism in fish.

**Key words:** *Cyprinus carpio*; *Gip*; identification; expression analysis

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

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (31872581, U1904118); Science and Technology Breakthrough Major Project in Henan Province (202102110259); Natural Science Foundation of Henan Province (212300410174)