

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2020.19225

草鱼 3 个 6-磷酸葡萄糖酶催化亚基的基因表达分析及高糖饲料对其表达的影响

徐晶, 梁旭方, 蔡文静, 高俊杰, 旷玉兰, 魏君冉, 何珊

华中农业大学水产学院, 华中农业大学鳊鱼研究中心/农业农村部鳊鱼育种创新基地, 农业农村部淡水生物繁育重点实验室, 湖北 武汉 430070

摘要: 为了探讨 6-磷酸葡萄糖酶催化亚基(glucose-6-phosphatase catalytic subunit, G6PC)在草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)糖代谢中的作用, 采用同源序列比对的方式, 在草鱼基因组中获取了 3 个 *g6pc* 基因的序列, 通过序列比对和进化树分析, 将其分别命名为 *g6pca*、*g6pcb1* 和 *g6pcb2*, 其编码的氨基酸序列与斑马鱼(*Danio rerio*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)和人(*Homo sapiens*)具有较高的同源性, 相似度分别为 85%~94%、64%~83%和 54%~66%。同线性分析表明 *g6pc* 在草鱼染色体上的分布与斑马鱼等高度相似, 表明草鱼 *g6pc* 基因在进化中具有较高的保守性。利用 RT-PCR 检测 3 个基因在鳃、脂肪、脑、心脏、肝、肾、前肠、中肠、后肠和肌肉 10 个组织中的表达, 结果显示, *g6pca* 在脑和肝中表达量较高, 脂肪组织次之; *g6pcb1* 在肝中表达量最高, 中肠次之; *g6pcb2* 在心脏表达量最高, 其次为脂肪组织。同时探讨了高糖饲料对草鱼不同 *g6pc* 亚型转录水平的影响, 以及不同浓度葡萄糖和胰岛素刺激草鱼肝细胞(L8824)后对 *g6pca* 转录水平的影响。结果显示, 饲喂高糖饲料(7 周)后, 与对照组相比, 草鱼肝脏 *g6pca* mRNA 水平显著升高, *g6pcb1* 和 *g6pcb2* mRNA 水平无显著变化。离体情况, 与 5 mmol/L 葡萄糖组相比, 15 mmol/L 葡萄糖显著增加了 L8824 的 *g6pca* mRNA 水平, 且 1 mol/L 胰岛素可以抑制这种作用; 30 mmol/L 葡萄糖对 L8824 *g6pca* mRNA 水平无显著性影响。本研究表明, 草鱼 *g6pc* 发生加倍后存在功能分化, 高糖可以诱导 *g6pca* mRNA 的表达, 而对 *g6pcb1* 和 *g6pcb2* 的转录水平无影响, 其具体功能还需进一步研究。

关键词: 草鱼; *g6pc*; 糖异生; 组织表达; 胰岛素

中图分类号: S963

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2020)01-0024-11

6-磷酸葡萄糖酶催化亚基(glucose-6-phosphatase catalytic subunit, G6PC)为 6-磷酸葡萄糖酶(glucose-6-phosphatase, G6Pase, EC 3.1.3.9)的组成成分^[1], 研究表明, G6PC 在生物体内催化 6-磷酸葡萄糖水解生成葡萄糖和磷酸, 为糖异生和糖原分解的最后一步反应。G6Pase 能够调节生物体内血糖水平, 是维持血糖平衡的关键酶之一^[2-3]。其中, 6-磷酸葡萄糖酶家族共有 3 个成员, 分别为 G6pase- α (*G6pc* 编码)、胰岛素特异性葡萄糖-6-磷酸相关蛋白

(IGRP) (*G6pc2* 编码)和 G6pase- β (*G6pc3* 编码)^[4]。值得关注的是, 一般哺乳动物中 *g6pc* 只有 1 个亚型, 而因为基因组加倍事件, 大部分鱼类存在多个亚型, 如斑马鱼(*Danio rerio*)存在 *g6pca*、*g6pcb1* 和 *g6pcb2*; 虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)存在 *g6pca*、*g6pcb1a*、*g6pcb1b*、*g6pcb2a* 和 *g6pcb2b*^[5-6]。鱼类 *g6pc* 的相关研究在金头鲷(*Sparus aurata*)^[7-8]和虹鳟^[9-12]中较多, 在鲈(*Lateolabrax japonicus*)^[13]、文昌鱼(*Branchiostoma japonicum*)^[14]和罗非鱼

收稿日期: 2019-08-05; 修订日期: 2019-09-09.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0900400); 国家现代农业产业技术体系项目(CARS-46); 国家自然科学基金面上项目(31772822).

作者简介: 徐晶(1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向为鱼类营养与生理. E-mail: 1006447125@qq.com

通信作者: 梁旭方, 教授. E-mail: xufang_liang@hotmail.com

(*Oreochromis niloticus*)^[15]等也有一些研究。与哺乳动物 *g6pc* 一样, 鱼类的 *g6pca* 和 *g6pcb1* 主要在肝脏中表达, 肠道和肾脏中也存在, 而 *g6pcb2* 主要在心脏中表达, 在脑中也有发现, 如斑点雀鳢 (*Lepisosteus oculatus*)、虹鳟等^[6]。

哺乳动物肝脏中 G6PC 水平受到体内营养素和激素的调节, 如饥饿和胰高血糖素可以增加大鼠肝脏 *g6pc* mRNA 的表达水平, 而饥饿后再投喂和胰岛素可以抑制其表达^[16-18]。目前, 营养素和激素对 G6PC 的调节作用仅在少数鱼类中报道, 比较复杂且存在物种特异性, 如长期饥饿能增加虹鳟^[19]和金头鲷^[7]肝脏 G6PC 的酶活性或表达水平, 而使黄金鲈 (*Perca flavescens*)^[20]肝脏中 G6PC 的酶活性降低。此外, 碳水化合物不影响金头鲷 *g6pc* 的表达^[7], 而投喂含糖饲料可以增加翘嘴红鲌 (*Erythroculter ilishaeform*) *g6pc* 的表达水平^[21], 短期投喂高糖饲料也可使斑马鱼幼鱼 *g6pc* mRNA 水平增加^[22]。胰岛素对鱼类 *g6pc* 表达的影响与哺乳动物一致, 如胰岛素可以抑制虹鳟^[23]和金头鲷^[8] *g6pc* 的表达。随着鱼类中 *g6pc* 发生基因加倍, 其不同亚型的功能也有相关研究, 虹鳟摄食高糖饲料后, 其肝脏中 *g6pca* 和 *g6pcb1* mRNA 水平显著降低, 而 *g6pcb2* mRNA 水平显著升高, 研究表明虹鳟中 *g6pc* 不同亚型之间存在功能分化^[5, 24]。

草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 属于“四大家鱼”之一, 其生长快、肉质好, 是中国特有的淡水草食性经济养殖鱼类。与其他鱼类相比, 草鱼能较好地利用碳水化合物, 目前关于草鱼 *g6pc* 的研究大多数关注于脂类对其转录水平的影响, 如脂肪水平为 107.9 g/kg 的饲料投喂草鱼后, 其 *g6pc* mRNA 的表达水平增加^[25-26], 有关碳水化合物对草鱼 *g6pc* 的影响研究较少。在本研究中, 以斑马鱼 *g6pc* 基因为参照序列, 应用多重比对方式在草鱼基因组中获取了 3 个 *g6pc* 基因序列, 并根据序列比对、系统进化树和同线性分析其序列的保守性。采用 RT-PCR 技术检测了 *g6pc* 基因的组织表达特异性。此外, 探讨了高糖饲料对草鱼肝脏中不同 *g6pc* 亚型转录水平的影响以及葡萄糖和胰岛素刺激草鱼肝细胞后对 *g6pca* 转录水平的影响, 为进一步研究草鱼不同 *g6pc* 亚型的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼和细胞

实验用草鱼购自武汉四汇水产科技有限公司 (中国, 武汉), 饲养在农业农村部鳊鱼育种创新基地。草鱼肝细胞系 (L8824) 购自中国典型培养中心, 细胞贴壁生长, 在含 5% CO₂ 的 28℃ 恒温培养箱内培养。

1.2 实验方法

1.2.1 草鱼 *g6pc* 基因识别、命名及基因结构分析

应用斑马鱼 *g6pca* (Ensembl; ENSDARG00000031616)、*g6pcb1* (Ensembl; ENSDARG000000013721) 和 *g6pcb2* 基因 (Ensembl; ENSDARG000000014967) 为参考序列, 使用本地 Blast 工具在草鱼基因组数据库 (<http://www.ncgr.ac.cn/grasscarp/>) 中进行比对, 采用双向 Blast 搜索对候选基因的准确性进行验证, 并将得到的 *g6pc* 序列在 NCBI 上比对, 确定其可靠性。最终, 根据比对的结果和 *g6pc* 系统进化树对草鱼 3 个 *g6pc* 基因进行命名。根据内含子以 GT 起始并以 AG 终止的原则, 分析获取的草鱼 *g6pc* 基因 cDNA 序列和基因组序列, 确定其编码序列的碱基组成。

1.2.2 草鱼 *g6pc* 的多重比对、系统进化树和同线性分析

利用 The Sequence Manipulation Suite (<http://www.bio-soft.net/sms/>) 预测 *g6pca*、*g6pcb1* 和 *g6pcb2* CDS 序列编码的氨基酸序列, 并使用在线软件 ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) 与其他物种进行氨基酸序列多重比对。系统进化树和同线性分析使用了人 (*Homo sapiens*)、鼠 (*Mus musculus*)、斑马鱼 (*Danio rerio*)、墨西哥脂鲤 (*Astyanax mexicanus*)、花鳉 (*Poecilia formosa*)、花斑剑尾鱼 (*Xiphophorus maculatus*)、三刺鱼 (*Gasterosteus aculeatus*)、红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*)、斑点雀鳢 (*Lepisosteus oculatus*) 和虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 10 个物种的 G6PC 氨基酸序列, 且均从 Ensembl 或 GenBank 数据库中获得。用 ClustalW2 对草鱼与上述 10 个物种的 G6PC 进行氨基酸序列多重比对后, 再用 MEGA 6.0 软件以邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建进化树 (bootstrap=1000)。此外, 从 Ensembl、GenBank 或草鱼基因组数据库中获取人、鼠、草鱼、斑马

鱼、墨西哥脂鲤和虹鳟 *g6pc* 上下游基因信息, 进行同线性分析。

1.2.3 RT-PCR 检测草鱼 *g6pc* 的组织表达 随机取同一养殖环境且大小均一的 3 尾草鱼, 用麻醉剂 MS222 (20 mg/L) (Sigma, 美国)麻醉, 并在无菌条件下取草鱼的鳃、脂、脑、心脏、肝、肾、前肠、中肠、后肠和肌肉 10 个组织, 用液氮快速冷冻, 保存于-80℃冰箱备用。使用 RNAiso Plus 法提取上述组织的总 RNA, 并用 HiScript II Q RT SuperMix for qPCR (诺唯赞, 南京)反转录试剂盒进行体外反转录合成 cDNA。利用 Primer 6 软件设计跨内含子定量引物(表 1), 并送生工生物工程股份有限公司(中国, 上海)合成。以草鱼转录延伸因子(*ef1a*)为内参, 用实时荧光定量 PCR (RT-PCR)检测草鱼 3 个 *g6pc* 基因的组织表达。RT-PCR 反应体系: ChamQ SYBR qPCR Master Mix (诺唯赞, 南京) 10 μL, 10 μmol 的上游引物和下游引物各 0.4 μL, 模板 cDNA 1 μL, 用 ddH₂O 将反应体系补足到 20 μL。反应程序为 95℃, 预变性 5 min; 95℃ 变性 15 s, *T_m* 值 58℃退火 15 s(不同引物 *T_m* 不同)(表 1); 72℃延伸 45 s, 40 个循环。最后, 草鱼 3 个 *g6pc* 基因在各组织中的相对表达量用 2^{-ΔΔC_t} 的方法分析^[27]。

表 1 荧光定量引物列表
Tab. 1 Primers for RT-PCR

基因 gene	引物 primer name	序列(5'-3') sequence (5'-3')	扩增长度/bp fragment length	退火温 度/℃ <i>T_m</i>
<i>ef1a</i>	<i>ef1a</i> -F	GCTGACTGTGCCGTG CTGAT	201	58
	<i>ef1a</i> -R	GCTGACTTCCTTGGT GATTTC		
<i>g6pca</i>	<i>g6pca</i> -F	CTACAACGCAAGTCT GAGAAAGT	147	55
	<i>g6pca</i> -R	CAGTCTGGATTGACG CACC		
<i>g6pcb1</i>	<i>g6pcb1</i> -F	TTGGGTGGCTGTGAT AGGAG	228	56
	<i>g6pcb1</i> -R	ATTATGGCGAGGATG GAGG		
<i>g6pcb2</i>	<i>g6pcb2</i> -F	AAGTCTTGATGGGT ATGGGATT	245	56
	<i>g6pcb2</i> -R	CCACCAATAAGGAC GCTCAC		

1.2.4 高糖饲料对草鱼肝脏 *g6pc* 表达的影响

正式实验之前, 用恒流曝气水将草鱼养在 2 m³ 的养殖缸内, 并配有空气泵充氧, 每天 8:00 和 17:00 分别投喂 1 次, 以适应养殖条件 2 周。之后, 随机将草鱼分为两组, 分别用碳水化合物含量不同的饲料投喂 7 周, 投喂碳水化合物含量为 25 g/kg 的饲料组为对照组(control), 含量为 42 g/kg 的饲料组为高糖组(HC), 饲料配方在实验室之前的研究中已经阐明^[28]。每组随机取 5 尾草鱼, 用 MS222 麻醉后, 取肝脏组织, 用液氮快速冷冻并于-80℃冰箱保存备用。用 RT-PCR 检测对照组和高糖组肝脏中 3 个 *g6pc* 基因的相对表达量。

1.2.5 葡萄糖和胰岛素对 L8824 中 *g6pca* 表达的影响 L8824 培养于 M199 完全培养基: M199 基础培养基(Gibco, 美国)中添加 10%的胎牛血清(Gibco, 美国)、1%的双抗(青霉素和链霉素各 10 万 U/L) (Gibco, 美国), 并在含 5% CO₂ 的 28℃恒温培养箱内培养。使用 6 孔板进行细胞实验, L8824 的细胞铺板量为 1.5×10⁶ 个细胞/孔, 每孔添加 2.5 mL M199 完全培养基, 待细胞贴壁达 70%~80%时, 弃掉培养基, 用 1 mL DPBS 洗涤后添加新的培养基。用葡萄糖测试盒(南京建成公司)检测出 M199 完全培养基的葡萄糖浓度为 5 mmol/L, 本实验分为 6 个组: 5 mmol/L 葡萄糖组(对照组) (M199 完全培养基), 15 mmol/L 葡萄糖组, 30 mmol/L 葡萄糖组, 5 mmol/L 葡萄糖+胰岛素组, 15 mmol/L 葡萄糖+胰岛素组以及 30 mmol/L 葡萄糖+胰岛素组, 其中培养基中胰岛素(Sigma, 美国)浓度均为 1 μmol/L。细胞换液后继续培养 48 h, 并提取细胞 RNA, 用 RT-PCR 检测对照组和实验组中 *g6pca* 的表达。

1.3 统计分析

用 SPSS Statistics 19.0 统计软件分析实验数据。单样本 *T* 检验(one sample *T*-test)用来检测数据分布的正态性; 独立样本 *T* 检验(independent-sample *T*-test)用来分析两个样本之间的差异; 单因素方差分析(one-way ANOVA)用来检验多个样本之间的差异性; 数据均以平均值±标准误($\bar{x} \pm SE$)表示, 差异显著度为 0.05。

2 结果与分析

2.1 草鱼 *g6pc* 基因的识别与命名

草鱼基因组数据库中识别到 3 个 *g6pc* 基因, 在数目上与斑马鱼一致。通过序列比对和系统进化树分析结果来命名草鱼 *g6pc* 基因, 分别命名为 *g6pca*、*g6pcb1* 和 *g6pcb2*。获得的 *g6pca* 基因长度为 6377 bp, CDS 序列长度为 1062 bp, 编码 353 个氨基酸; *g6pcb1* 基因的长度为 2825 bp, CDS 序列长度为 1068 bp, 编码 355 个氨基酸; *g6pcb2* 基因长度为 1856 bp, CDS 序列长度为 1062 bp, 编码 353 个氨基酸。

2.2 草鱼 *g6pc* 的多重比对、进化树及同线性分析

草鱼 *g6pca*、*g6pcb1* 和 *g6pcb2* CDS 序列预测得到的氨基酸序列(序列已上传至 NCBI, 登录号为 MN176655、MN176656 和 MN176657)与其他物种多重比对显示, 草鱼 *g6pca* 与斑马鱼和虹鳟 *g6pca* 同源性较高, 为 85% 和 73%, 与三刺鱼、红鳍东方鲀和墨西哥脂鲤等鱼类同源性较低, 为

67%、66% 和 65%, 而与人和鼠的同源性更低, 为 54%; *g6pcb1* 与斑马鱼、墨西哥脂鲤和花鲈等同源性较高, 分别为 94%、88% 和 81%, 与虹鳟 *g6pcb1a* 和 *g6pcb1b* 的同源性也较高, 分别为 83% 和 81%, 同样与人和鼠的同源性较低, 均为 64%; *g6pcb2* 与斑马鱼和墨西哥脂鲤同源性较高, 分别为 90% 和 71%, 与虹鳟 *g6pcb2a* 和 *g6pcb2b* 的同源性较低, 为 65% 和 64%, 而与人和鼠的同源性更低, 分别为 55% 和 53%。人、鼠、翘嘴红鲌和草鱼 G6PC 的氨基酸序列多重比对发现, 哺乳动物 G6PC 的 3 个结构域 KWILFGQRP、PSGH 和 SRIYLAHFPHQ 在草鱼中较保守, 第二个结构域氨基酸序列在几个物种中相同, 第一个结构域在 G6PCa、G6PCb1 和 G6PCb2 的氨基酸序列中分别为 KWVLFGERP、KWILFGERP 和 KWLMFGERP, 第三个结构域在 G6PCa、G6PCb1 和 G6PCb2 的氨基酸序列中分别为 SRVYLAHFPHQ、SRVFIAAHFPHQ 和 SRVFIAAHFPHQ(图 1)。

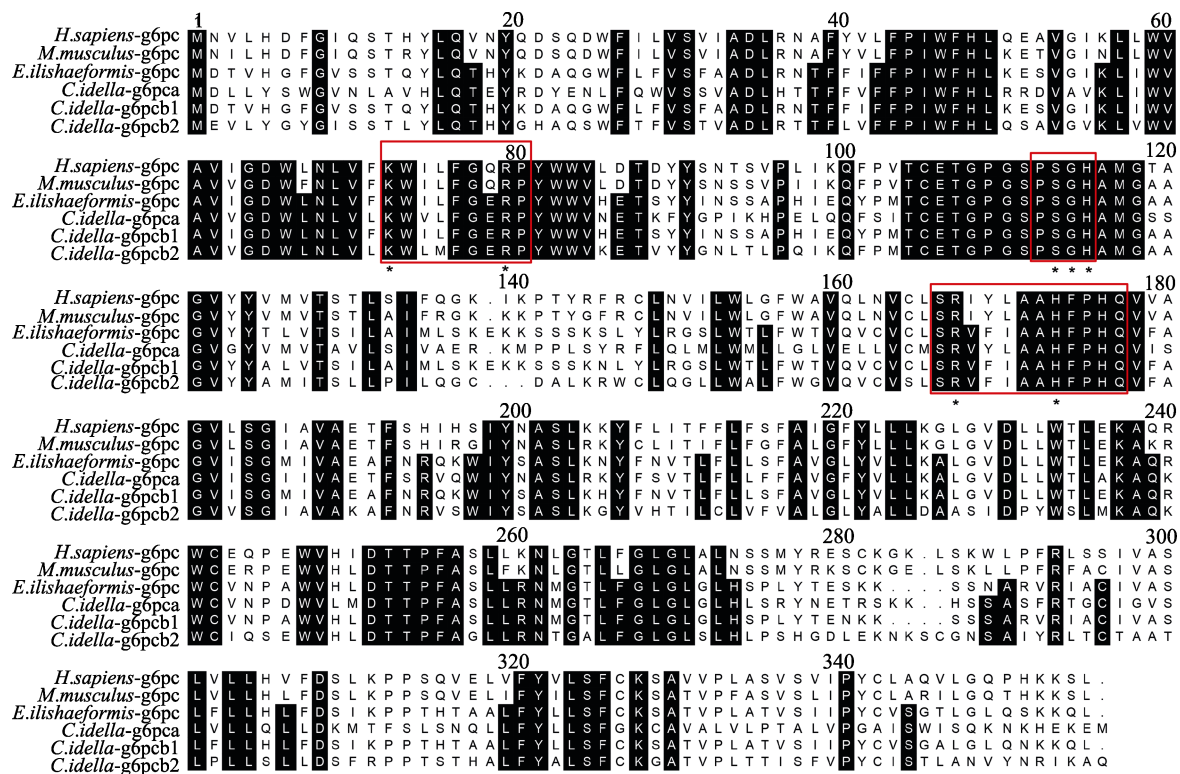


图 1 人、鼠、翘嘴红鲌和草鱼 G6PC 的氨基酸序列多重比对

Homo Sapiens: 人(Ensembl: ENSP00000253801); *Mus musculus*: 鼠 (Ensembl: ENSMUSP00000019469); *Erythroculter ilishaeform*: 翘嘴红鲌 (GenBank: ABC49921.1); 红色方框内是功能结构域, 标星号的是功能位点氨基酸。

Fig. 1 Amino acid sequences alignments of G6PC between human, mouse, *Erythroculter ilishaeform* and *Ctenopharyngodon idellus*. Red box indicate function domains. Amino acids marked with an asterisk are functional site amino acids of G6PC.

使用 MEGA 6.0 软件以邻接法构建草鱼与其他物种 *g6pc* 的系统进化树(图 2), 结果显示, 整个进化树被分为 3 簇, 即鱼类的 *g6pca* 为一簇, 位于进化树底端, 哺乳动物的 *g6pc* 形成一簇, 而鱼类的 *g6pcb1* 与 *g6pcb2* 形成另外一簇。草鱼 *g6pca*、*g6pcb1* 和 *g6pcb2* 与斑马鱼直系同源基因聚类关系最近, 其次为墨西哥脂鲤和虹鳟, 与哺乳动物的距离较远。另外, 分析草鱼 *g6pc* 基因结构发现, *g6pca*、*g6pcb1* 和 *g6pcb2* 的 CDS 序列由 5 个外显子组成, 被 4 个内含子隔开, 这样的结构与人类、鼠和斑马鱼相似, 且 5 个外显子的碱基数目在几个物种中十分接近, 只是它们内含子的长度差异较大(图 3)。

从 Ensembl、GenBank 和草鱼基因组数据库中获取了人、鼠、草鱼、斑马鱼、墨西哥脂鲤和虹鳟 *g6pc* 上下游基因信息, 发现鱼类的 *g6pca* 和 *g6pcb1* 在同一染色体上且相邻, 而 *g6pcb2* 在另一条染色体上。同线性分析发现草鱼 *g6pca* 和 *g6pcb1* 的上下游基因(*dlx4b*, *kat7b*, *ptges3l*, *aarsd1*

和 *sgsm1*)以及 *g6pcb2* 上下游基因(*kat7a*, *aoc2*, *nbr1b*)在斑马鱼和墨西哥脂鲤中高度保守, 而 *g6pca* 和 *g6pcb1* 邻近的 *aarsd1*、*ptges3l* 和 *nbr1* 基因在哺乳动物和几个鱼类中均保守(图 4)。

2.3 草鱼 *g6pca*、*g6pcb1* 和 *g6pcb2* 的组织表达特异性分析

以草鱼 *ef1a* 基因为内参, RT-PCR 检测到草鱼的 *g6pca* 在脑中表达量最高, 肝脏中的表达量是脑中的 57%($P<0.05$), 脂肪组织中的表达量是脑中的 2%($P<0.05$), 而在肾脏、鳃和中肠的表达量较低, 在心脏、前肠、后肠和肌肉中几乎不表达(图 5A)。*g6pcb1* 在肝脏中表达量最高, 中肠的表达量是肝脏中的 17%($P<0.05$), 肾脏中的表达量是肝脏的 9%($P<0.05$), 而在脂肪组织、前肠和后肠的表达量较低, 在鳃、脑、心脏和肌肉中不表达(图 5B)。*g6pcb2* 在心脏中表达量最高, 脂肪组织中的表达量是心脏的 9%($P<0.05$), 其他组织中的表达量都普遍较低(图 5C)。

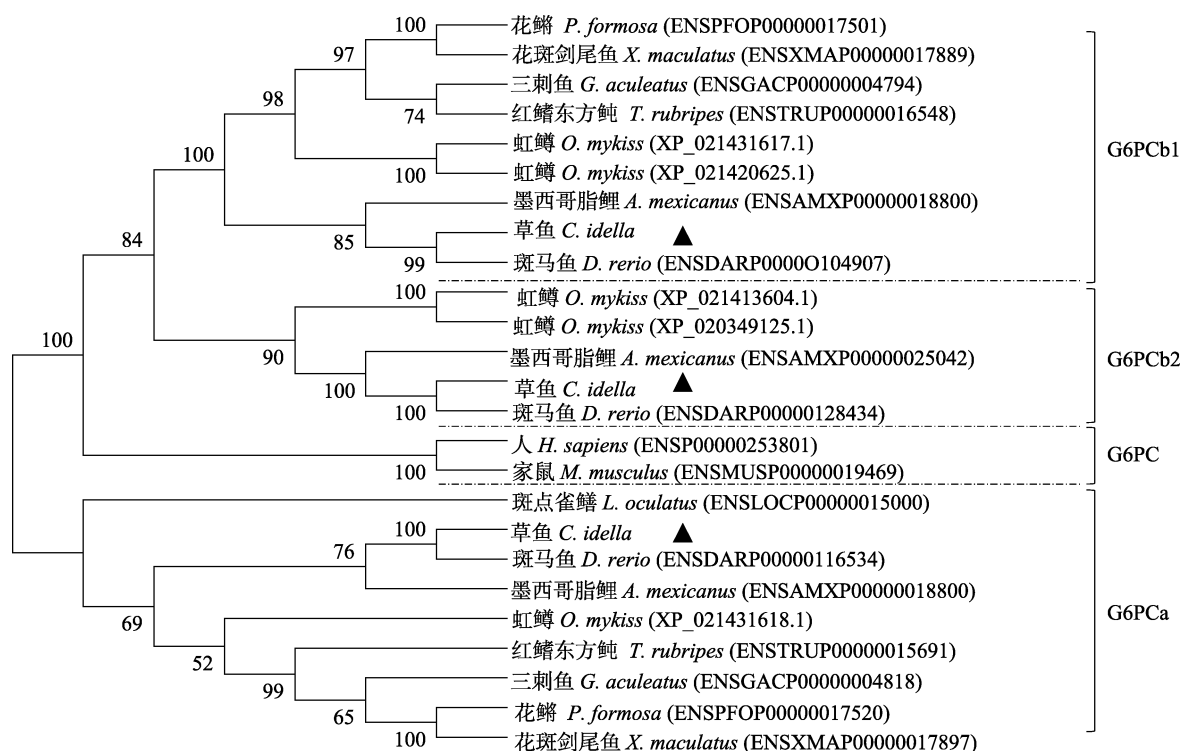


图 2 根据草鱼 3 个 G6PC 的氨基酸序列与其他物种的同源蛋白构建的系统进化树

基因在 Ensembl 或 NCBI 数据库中的编号在括号中给出。

Fig. 2 Phylogenetic tree derived from the amino acid sequences of three G6PCs in *Ctenopharyngodon idellus* and homologous proteins from various species

All accession numbers (from Ensembl, or NCBI databases) are specified in parentheses.

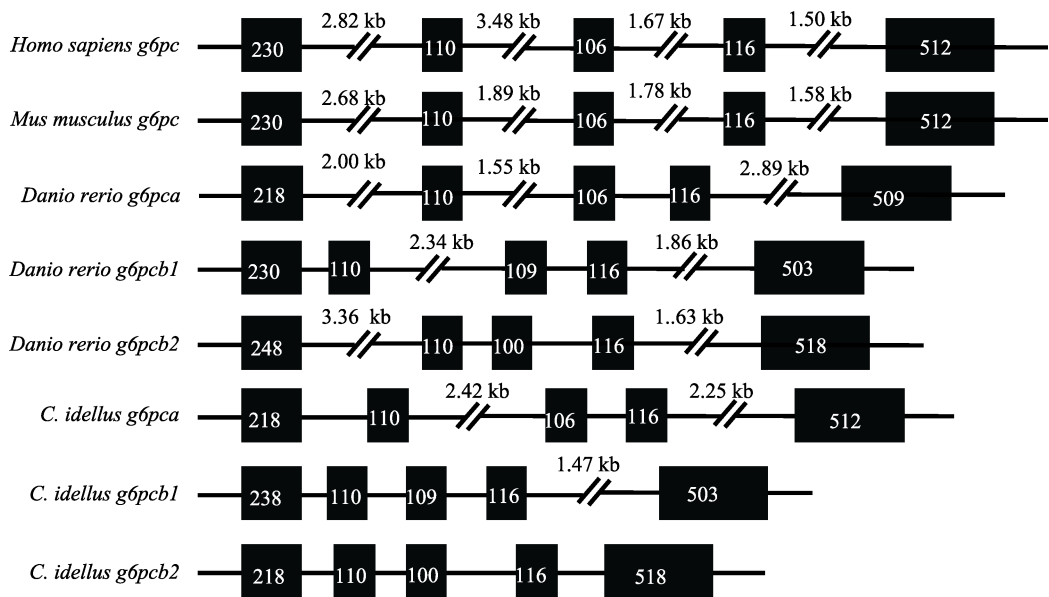


图 3 人、鼠、斑马鱼和草鱼 *g6pc* 编码序列的结构

Homo sapiens: 人(Ensembl: ENST00000253801); *Mus musculus*: 鼠(Ensembl: ENSMUST00000019469.2);
Danio rerio g6pca: 斑马鱼 *g6pca* (Ensembl: ENSDART00000139419.3), *Danio rerio g6pcb1* (Ensembl: ENSDART00000091868.6)
和 *Danio rerio g6pcb2* (Ensembl: ENSDART00000156149.2);
黑线表示内含子, 黑色方块表示外显子, 方框内数字表示编码序列长度(bp).

Fig. 3 The gene structures of coding sequence of *g6pc* genes in human, mouse, zebrafish and *Ctenopharyngodon idellus*
The black lines indicate introns, and the black boxes indicate exons. The number in the box indicates the length of the code sequence (bp).

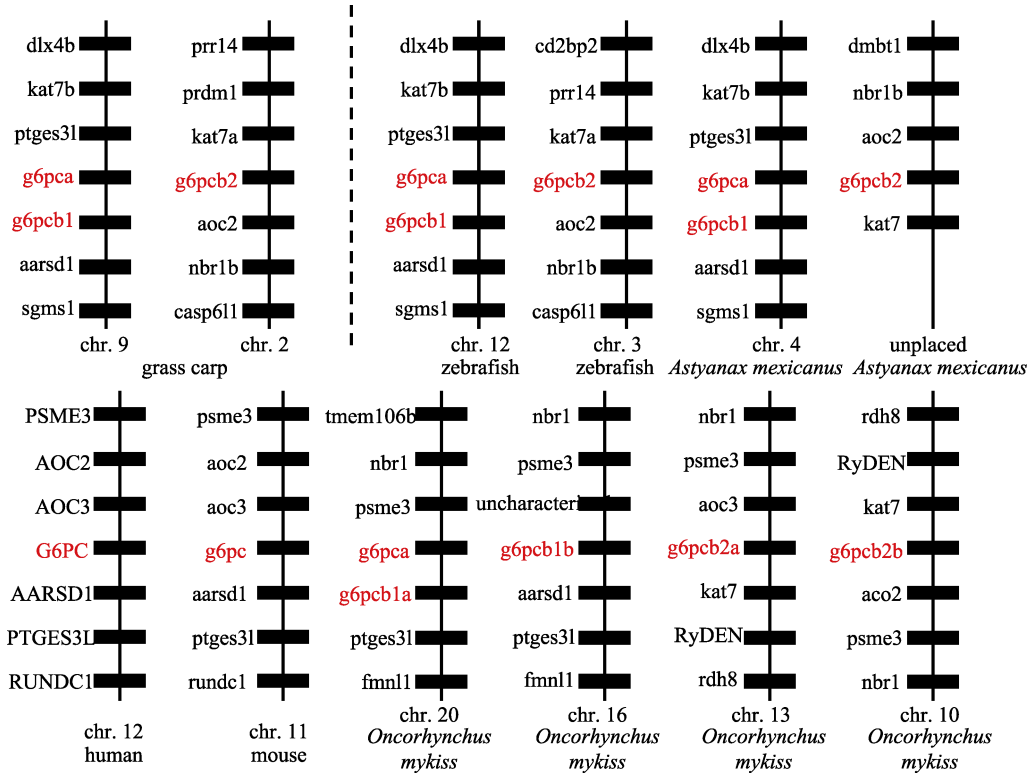


图 4 人、鼠、草鱼、斑马鱼、墨西哥脂鲤和虹鳟 *g6pc* 基因的同线性分析

Fig. 4 Synteny analyses of *g6pc* genes in human, mouse, *Ctenopharyngodon idellus*,
zebrafish, *Astyanax mexicanus* and *Oncorhynchus mykiss*

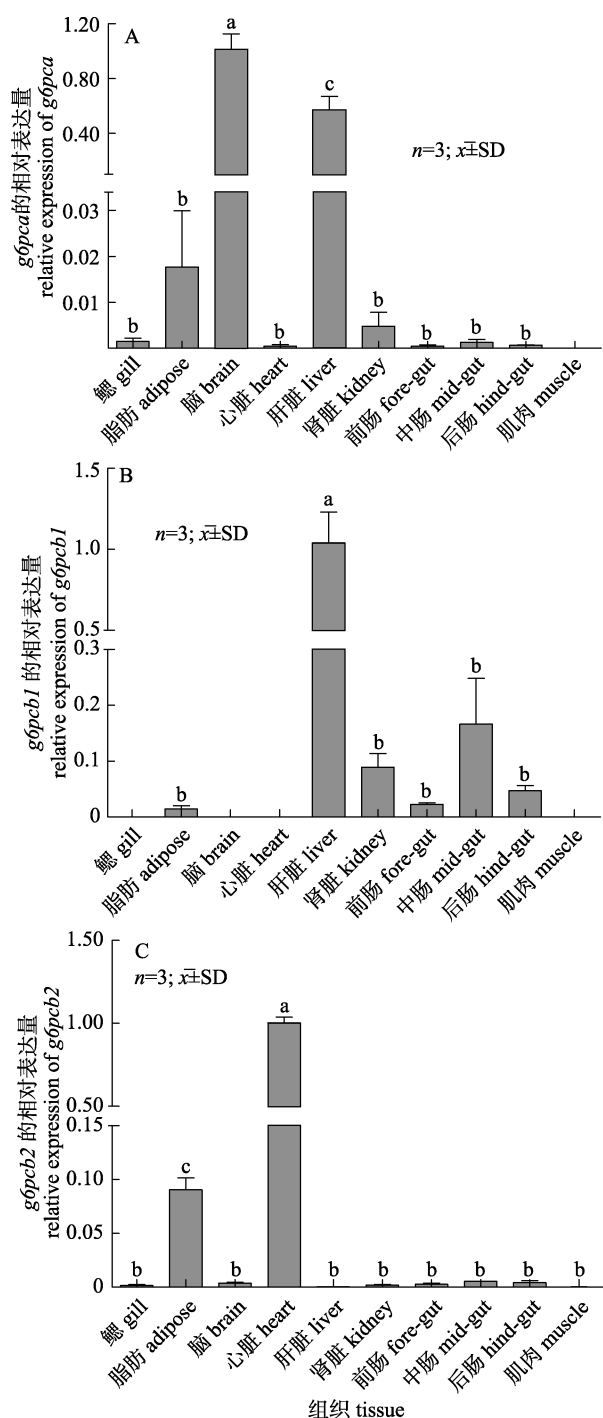


图 5 草鱼 *g6pca* (A)、*g6pcb1* (B) 和 *g6pcb2* (C) 在各组织中的相对表达量

标准差上方不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$).

Fig. 5 The relative expression of *g6pca* (A), *g6pcb1* (B) and *g6pcb2* (C) genes in different tissues of *Ctenopharyngodon idellus*. Different letters above the error bars indicate significant differences ($P < 0.05$).

2.4 高糖饲料对草鱼肝脏 *g6pca*、*g6pcb1* 和 *g6pcb2* mRNA 表达水平的影响

与对照组相比, 高糖组肝脏中 *g6pca* mRNA

水平显著上调 ($P < 0.05$) (图 6A), *g6pcb1* mRNA 水平有上调趋势, 但是无显著性差异 ($P > 0.05$, 图 6B), *g6pcb2* 也没有显著性差异 ($P > 0.05$, 图 6C)。

2.5 葡萄糖和胰岛素对 L8824 *g6pca* mRNA 表达水平的影响

与对照组 (5 mmol/L 葡萄糖组) 相比, 15 mmol/L 葡萄糖组的 *g6pca* mRNA 水平显著增加 ($P < 0.05$), 30 mmol/L 葡萄糖组 *g6pca* mRNA 水平无显著变化 ($P > 0.05$); 不同浓度葡萄糖培养基中均添加 1 μ mol/L 胰岛素后, *g6pca* mRNA 水平与无胰岛素时的 mRNA 水平相比都无显著性差异 ($P > 0.05$, 图 7)。

3 讨论

3.1 草鱼 3 个 *g6pc* 基因的保守性

研究发现, 斑马鱼和某些鱼类 *g6pc* 基因的初始注释是不正确的, 实际上, 硬骨鱼类的系统发育树分析表明, *g6pc* 基因第一次复制后生成 *g6pca* 和 *g6pcb*, 然后才是 *g6pcb* 第二次复制成 *g6pcb1* 和 *g6pcb2*^[6]。本研究支持该观点, 故将采用新的 *g6pc* 基因命名方式 (*g6pca.1* 改命名为 *g6pca*; *g6pca.2* 改命名为 *g6pcb1*; *g6pcb* 改命名为 *g6pcb2*)。草鱼 G6PCa、G6PCb1 和 G6PCb2 与其他鱼类 G6PC 的氨基酸序列同源性较高, 分别为 64%~85%、77%~94% 和 64%~90%, 而与哺乳动物 G6PC 的同源性低很多, 与人的同源性分别为 54%、64% 和 55%, 与鼠的同源性分别为 54%、64% 和 53%。但是, 草鱼 G6PC 与人、鼠和翘嘴红鲌 G6PC 多重比对发现, 几个物种均含有 PAP2 结构域的 3 个保守基序 (KXXXXXXRP, PSGH, SRX XXXXHXXXQ/D)^[21], PAP2 结构域为葡萄糖-6-磷酸酶亚家族 PAP2 类似蛋白结构域, 相关研究^[29-31]表明, 3 个基序的活化位点氨基酸在草鱼 G6PC 中分别为 Lys⁷²、Arg⁷⁹、Ser¹¹³、Gly¹¹⁴、His¹¹⁵、Arg¹⁶⁷ 和 His¹⁷³, 且与人、鼠和翘嘴红鲌高度保守, 表明草鱼的 G6PC 均具有正常的催化功能。系统进化树分析将鱼类 *g6pca* 分为一大支, 鱼类 *g6pcb1* 和 *g6pcb2* 分为另一支, 而哺乳动物的 *g6pc* 单独为一支, 其中草鱼 3 个 *g6pc* 基因均与其他物种的直系同源基因聚类。此外, 草鱼 *g6pca*、*g6pcb1* 和 *g6pcb2* 的 CDS 序列与人、鼠和斑马鱼类, 均具有 5 个外显子, 且每个外显子的碱基个数在几个物种

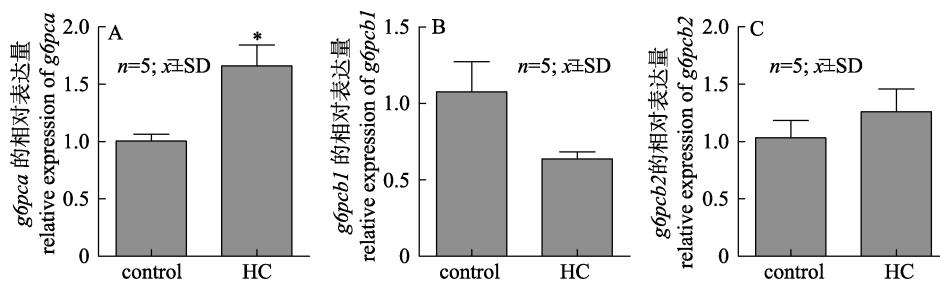


图 6 高糖饲料对草鱼肝脏 *g6pca* (A)、*g6pcb1* (B)和 *g6pcb2* (C) mRNA 水平的影响

标准差上方标的星号表示与对照相比差异显著($P<0.05$).

Fig. 6 Effects of high-carbohydrate diet on mRNA levels of *g6pca* (A), *g6pcb1* (B) and *g6pcb2* (C) in *Ctenopharyngodon idellus* liver

The asterisks above the error bars indicate significant differences compared with the control ($P<0.05$).

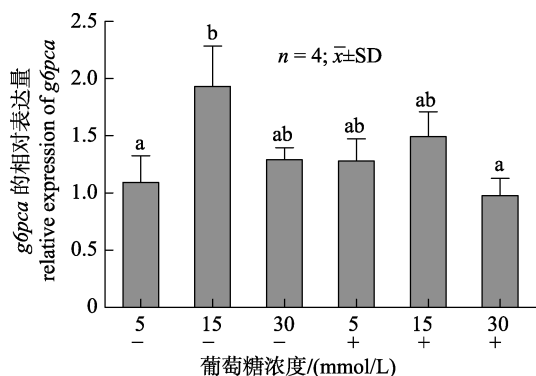


图 7 葡萄糖和胰岛素刺激 48 h 后对草鱼肝细胞系 L8824 *g6pca* mRNA 水平的影响

标准差上方不同字母表示差异显著($P<0.05$).

“-”表示未添加胰岛素,“+”表示添加 1 $\mu\text{mol/L}$ 胰岛素.

Fig. 7 Effects of glucose and insulin on *g6pca* mRNA of *Ctenopharyngodon idellus* cell line L8824 after 48 h stimulation
“-” indicates no insulin supplement, “+” indicates 1 $\mu\text{mol/L}$ insulin supplement.

Different letters above the error bars indicate significant differences ($P<0.05$).

中非常接近,这表明草鱼 *g6pc* 基因的 mRNA 剪接相对其他物种是保守的。而且草鱼与人、鼠、斑马鱼、墨西哥脂鲤和虹鳟 *g6pc* 同线性分析也显示,草鱼的 *g6pc* 在染色体上的分布在斑马鱼、墨西哥脂鲤和虹鳟等保守。这表明草鱼 *g6pc* 在进化过程中所受的选择压力较大,因此变异较小,保守性很高。

3.2 草鱼 *g6pca*、*g6pcb1* 和 *g6pcb2* 的组织表达特异性

一般哺乳动物中只有 1 个 *g6pc* 亚型,且其酶活性主要在肝脏和肾脏中较强,在脑和肠道等组织也存在活性^[32]。本研究用 RT-PCR 技术,检测草鱼 *g6pca*、*g6pcb1* 和 *g6pcb2* 基因在鳃、脂肪、脑、

心、肝、肾、前肠、中肠、后肠和肌肉 10 个组织的相对表达量。结果显示,草鱼 *g6pca* 在脑和肝脏中表达量较高,脂肪组织中也有少量表达;*g6pcb1* 在肝中表达量最高,其次为中肠组织,肾脏中有少量表达,这与青鳉^[6]中 *g6pcb1* 的组织表达特异性一致;而草鱼 *g6pcb2* 与虹鳟^[6]类似,在心脏中的表达量最高,其次为脂肪组织,在其他组织中的表达量普遍较低。从草鱼 *g6pc* 基因的组织表达特异性上看,*g6pca* 和 *g6pcb1* 在肝脏中表达量较高,这与 *g6pc* 的功能相吻合,即主要在糖异生作用的组织中表达,目前普遍认为鱼类进行糖异生的主要器官为肝脏^[33],该结果也与斑马鱼中 *g6pca* 和 *g6pcb1* 的表达特性一致^[6]。此外,*g6pca* 在脑中也有较高的表达量,表明 *g6pc* 基因在草鱼进化过程中,可能衍生出未知的新功能,但 *g6pcb2* 在心脏中的表达量最高,在肝脏中却几乎不表达,其在草鱼中的具体功能还需进一步研究。

3.3 碳水化合物和胰岛素对草鱼 *g6pc* 基因表达的影响

哺乳动物的相关研究表明,肝脏中 *g6pc* 的表达水平受到营养素的调节,如饥饿可以增加大鼠肝脏中 *g6pc* 的 mRNA 水平,而饥饿后再投喂可以抑制其表达^[16, 18]。然而,鱼类中营养素对 *g6pc* 表达的影响存在物种特异性,如长期饥饿能增加虹鳟^[19]和金头鲷^[7]肝脏中 G6PC 的酶活性或表达水平,而使黄鲈^[20]肝脏中 G6PC 的酶活性降低。鲤摄食含糖饲料后其 G6PC 酶活性受到明显抑制^[34],但用碳水化合物含量分别为 13.1%、26%和 31.6%的饲料投喂金头鲷后,其肝脏中 *g6pc* 的表达水平

在各组之间无显著性差异^[7]。本研究结果表明, 投喂草鱼高糖饲料 7 周后, 可以显著上调其肝脏 *g6pca* mRNA 的表达水平, 而对 *g6pcb1* 和 *g6pcb2* 无显著影响, 且葡萄糖刺激草鱼肝细胞 48 h 后对 *g6pca* 表达的影响与活体水平一致, 即与对照组相比, 15 mmol/L 葡萄糖显著增加 L8824 的 *g6pca* mRNA 水平。在哺乳动物和鱼类中也存在类似的结果, 如 20 mmol/L 葡萄糖刺激大鼠肝细胞后, 其 *g6pc* mRNA 水平显著增加^[35]; 用可消化糖量为 23.98% 的饲料投喂翘嘴红鲌后, 其肝脏 *g6pc* 的表达量也增加^[21]; 虹鳟摄食高糖饲料(碳水化合物含量为 30%)后, 肝脏中 *g6pca* 和 *g6pcb1b* 的 mRNA 水平显著降低, *g6pcb1a* 的表达无显著性变化, 而 *g6pcb2* 的 mRNA 水平显著升高^[5-6]。另外, 激素也会影响哺乳动物和鱼类 *g6pc* 的表达水平, 如胰高血糖素可以增加大鼠肝脏中 *g6pc* 的 mRNA 水平, 而胰岛素可以抑制其表达^[16-17]。虹鳟^[23]和金头鲷^[8] *g6pc* 的表达水平也能够被胰岛素抑制。葡萄糖和胰岛素刺激草鱼肝细胞结果表明, 15 mmol/L 葡萄糖和 1 μ mol/L 胰岛素共同刺激 L8824 后, 其对 *g6pca* 的刺激作用被胰岛素抑制。但是 30 mmol/L 葡萄糖对 L8824 的 *g6pca* mRNA 水平无显著性影响, 且胰岛素也无法抑制肝细胞 *g6pca* 的表达, 可能是因为培养基中葡萄糖浓度过高导致草鱼肝细胞出现胰岛素抵抗。Ding 等^[36]也曾用 30 mmol/L 葡萄糖刺激人肝癌细胞 HepG2 来构建胰岛素抵抗模型, 发现 30 mmol/L 葡萄糖能显著降低 HepG2 的胰岛素信号。

应用多重对比的方法从草鱼基因组数据库中获取了 3 个 *g6pc* 基因的序列, 通过序列比对和系统进化树分析结果, 分别命名为 *g6pca*、*g6pcb1* 和 *g6pcb2*, 且发现 3 个亚型具有不同的组织表达特异性。此外, 高糖饲料可以使草鱼肝脏 *g6pca* mRNA 的表达量升高, 而不影响 *g6pcb1* 及 *g6pcb2* 的表达水平, 15 mmol/L 葡萄糖能够增加 L8824 *g6pca* 的表达量, 且 1 μ mol/L 胰岛素可以抑制这种作用。本研究结果表明, 草鱼 *g6pc* 发生基因加倍后, 不同亚型之间存在功能差异, 且其在糖代谢中的作用是否与其他鱼类或哺乳动物类似, 还需进一步研究。

参考文献:

- [1] Foster J D, Pederson B A, Nordlie R C. Glucose-6-phosphatase structure, regulation and function: An update[J]. *Experimental Biology and Medicine*, 1997, 215(4): 314-332.
- [2] van de Werve G, Lange A, Newgard C, et al. New lessons in the regulation of glucose metabolism taught by the glucose 6-phosphatase system[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2000, 267(6): 1533-1549.
- [3] Nordlie R C, Foster J D, Lange A J. Regulation of glucose production by the liver[J]. *Annual Review of Nutrition*, 1999, 19: 379-406.
- [4] Shieh J J, Pan C J, Mansfield B C, et al. In islet-specific glucose-6-phosphatase-related protein, the beta cell antigenic sequence that is targeted in diabetes is not responsible for the loss of phosphohydrolase activity[J]. *Diabetologia*, 2005, 48(9): 1851-1859.
- [5] Marandel L, Seiliez I, Véron V, et al. New insights into the nutritional regulation of gluconeogenesis in carnivorous rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): A gene duplication trail[J]. *Physiological Genomics*, 2015, 47(7): 253-263.
- [6] Marandel L, Panserat S, Plagnes-Juan E, et al. Evolutionary history of glucose-6-phosphatase encoding genes in vertebrate lineages: towards a better understanding of the functions of multiple duplicates[J]. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 342.
- [7] Caseras A, Metón I, Vives C, et al. Nutritional regulation of glucose-6-phosphatase gene expression in liver of the gilt-head sea bream (*Sparus aurata*)[J]. *British Journal of Nutrition*, 2002, 88(6): 607-614.
- [8] Metón I, Caseras A, Fernández F, et al. Molecular cloning of hepatic glucose-6-phosphatase catalytic subunit from gilt-head sea bream (*Sparus aurata*): Response of its mRNA levels and glucokinase expression to refeeding and diet composition[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 2004, 138(2): 145-153.
- [9] Panserat S, Perrin A, Kaushik S. High dietary lipids induce liver glucose-6-phosphatase expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *The Journal of Nutrition*, 2002, 132(2): 137-141.
- [10] Panserat S, Médale F, Brèque J, et al. Lack of significant long-term effect of dietary carbohydrates on hepatic glucose-6-phosphatase expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2000, 11(1): 22-29.
- [11] Polakof S, Moon T W, Aguirre P, et al. Glucose homeostasis in rainbow trout fed a high-carbohydrate diet: Metformin and insulin interact in a tissue-dependent manner[J]. *American*

- Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2011, 300(1): R166-R174.
- [12] Song X R, Marandel L, Dupont-Nivet M, et al. Hepatic glucose metabolic responses to digestible dietary carbohydrates in two isogenic lines of rainbow trout[J]. Biology Open, 2018, 7(6): bio032896.
- [13] Qian Y X, Zheng W X, Song J J. Cloning and sequence analysis of *Lateolabrax japonicus* glucose-6-phosphatase catalytic subunit (G6PC) cDNA and its 5'-flanking region[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2011, 19(4): 606-615. [钱云霞, 郑伟贤, 宋娟娟. 鲈鱼 6-磷酸葡萄糖酶催化亚基 (G6PC) cDNA 和 5'侧翼序列的克隆及分析[J]. 农业生物技术学报, 2011, 19(4): 606-615.]
- [14] Wang Y, Wang H, Li M Y, et al. Identification, expression and regulation of amphioxus G6Pase gene with an emphasis on origin of liver[J]. General and Comparative Endocrinology, 2015, 214: 9-16.
- [15] Chen Y J, Zhang T Y, Chen H Y, et al. An evaluation of hepatic glucose metabolism at the transcription level for the omnivorous GIFT tilapia, *Oreochromis niloticus* during postprandial nutritional status transition from anabolism to catabolism[J]. Aquaculture, 2017, 473: 375-382.
- [16] Argaud D, Zhang Q, Pan W, et al. Regulation of rat liver glucose-6-phosphatase gene expression in different nutritional and hormonal states: Gene structure and 5'-flanking sequence[J]. Diabetes, 1996, 45(11): 1563-1571.
- [17] Dickens M, Svitek C A, Culbert A A, et al. Central role for phosphatidylinositol 3-kinase in the repression of glucose-6-phosphatase gene transcription by insulin[J]. Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(32): 20144-20149.
- [18] Minassian C, Montano S, Mithieux G. Regulatory role of glucose-6-phosphatase in the repletion of liver glycogen during refeeding in fasted rats[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 1999, 1452(2): 172-178.
- [19] Morata P, Vargas A M, Sánchez-Medina F, et al. Evolution of gluconeogenic enzyme activities during starvation in liver and kidney of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Comparative Biochemistry, 1982, 71(1): 65-70.
- [20] Foster G D, Moon T W. Hypometabolism with fasting in the yellow perch (*Perca flavescens*): A study of enzymes, hepatocyte metabolism, and tissue size[J]. Physiological Zoology, 1991, 64(1): 259-275.
- [21] Tang Y K, Yu J H, Liu B, et al. Molecular cloning of hepatic glucose-6-phosphatase catalytic subunit from *Erythroculter ilishaeformis*: Response of its expression to refeeding and carbohydrate in diet[J]. Journal of Fisheries of China, 2007, 31(1): 45-53. [唐永凯, 俞菊华, 刘波, 等. 翘嘴红鲌肝脏 G6Pase 催化亚基的克隆以及摄食和饲料中碳水化合物对其表达的影响[J]. 水产学报, 2007, 31(1): 46-53]
- [22] Fang L, Liang X F, Zhou Y, et al. Programming effects of high-carbohydrate feeding of larvae on adult glucose metabolism in zebrafish, *Danio rerio*[J]. British Journal of Nutrition, 2014, 111(5): 808-818.
- [23] Lucie M, Dai W W, Stéphane P, et al. The five glucose-6-phosphatase paralogous genes are differentially regulated by insulin alone or combined with high level of amino acids and/or glucose in trout hepatocytes[J]. Molecular Biology Reports, 2016, 43(4): 207-211.
- [24] Marandel L, Véron V, Surget A, et al. Glucose metabolism ontogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the light of the recently sequenced genome: New tools for intermediary metabolism programming[J]. The Journal of Experimental Biology, 2016, 219(5): 734-743.
- [25] Li A X, Yuan X C, Liang X F, et al. Adaptations of lipid metabolism and food intake in response to low and high fat diets in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. Aquaculture, 2016, 457: 43-49.
- [26] Li J, Liu L W, Liang X F, et al. Modulation of appetite, lipid and glucose metabolism of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) by different dietary protein levels[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2017, 43(2): 297-307.
- [27] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [28] Cai W J, Liang X F, Yuan X C, et al. Genomic organization and expression of insulin receptors in grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology, 2016, 194-195: 51-57.
- [29] Littlechild J, Garcia-Rodriguez E, Dalby A, et al. Structural and functional comparisons between vanadium haloperoxidase and acid phosphatase enzymes[J]. Journal of Molecular Recognition, 2002, 15(5): 291-296.
- [30] Ishikawa K, Mihara Y, Gondoh K, et al. X-ray structures of a novel acid phosphatase from *Escherichia blattae* and its complex with the transition-state analog molybdate[J]. The EMBO Journal, 2000, 19(11): 2412-2423.
- [31] Ghosh A, Shieh J J, Pan C J, et al. The catalytic center of glucose-6-phosphatase. HIS176 is the nucleophile forming the phosphohistidine-enzyme intermediate during catalysis[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(36): 32837-32842.
- [32] van Schaftingen E, Gerin I. The glucose-6-phosphatase sys-

- tem[J]. *Biochemical Journal*, 2002, 362(3): 513-532.
- [33] Cherrington A D. Banting lecture 1997. Control of glucose uptake and release by the liver *in vivo*[J]. *Diabetes*, 1999, 48(5): 1198-1214.
- [34] Shikata T, Iwanaga S, Shimeno S. Effects of dietary glucose, fructose, and galactose on hepatopancreatic enzyme activities and body composition in carp[J]. *Fisheries Science*, 1994, 60(5): 613-617.
- [35] Massillon D. Regulation of the glucose-6-phosphatase gene by glucose occurs by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. Differential effect of glucose and xylitol[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(6): 4055-4062.
- [36] Ding X Q, Jian T Y, Wu Y X, et al. Ellagic acid ameliorates oxidative stress and insulin resistance in high glucose-treated HepG2 cells via miR-223/keap1-Nrf2 pathway[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, 110: 85-94.

Gene expression analysis of three 6-phosphoglucose catalytic subunits in grass carp and the effects of a high carbohydrate diet on gene expression

XU Jing, LIANG Xufang, CAI Wenjing, GAO Junjie, KUANG Yulan, WEI Junran, HE Shan

College of Fisheries, Huazhong Agricultural University; Chinese Perch Research Center of Huazhong Agricultural University, Innovation Base for Chinese Perch Breeding of Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Key Laboratory of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Wuhan 430070, China

Abstract: The glucose-6-phosphatase catalytic subunit (G6PC) is an important component of the glucose-6-phosphatase (G6Pase) system, which controls glucose production from glycogenolysis and gluconeogenesis, and plays a key role in blood glucose homeostasis. G6pc can catalyze the hydrolysis of glucose-6-phosphate to glucose and inorganic phosphate in the living body. Despite its importance, little is known about the function of different *g6pc* subtypes in the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). We obtained three *g6pc* gene sequences from the grass carp genome using homologous sequence alignment, which were named *g6pca*, *g6pcb1*, and *g6pcb2* through sequence alignment and a phylogenetic tree. Deduced amino acid sequences of *g6pc* cDNA sequences in grass carp shared similarities of 85%–94%, 64%–83%, and 54%–66% with zebrafish (*Danio rerio*), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), and human (*Homo sapiens*), respectively. In addition, synteny analyses of *g6pc* genes revealed that adjacent genes of grass carp *g6pc* were identical with that of zebrafish. This indicates that *g6pc* genes of grass carp were highly conserved in evolution. Grass carp *g6pc* mRNA expression was detected in different tissues. The results showed that the mRNA expression level of *g6pca* was highest in the brain, followed by the liver and adipose tissue. Expression of *g6pcb1* was most strongly observed in the liver, and weakly observed in the midgut and kidney. The *g6pcb2* mRNA level was highest in the heart, followed by adipose tissue. To explore the role of different *g6pc* subtypes in the glucose metabolism of grass carp, we compared the *g6pc* mRNA levels in carps with different diets with normal or high level of carbohydrates. The results revealed that a high carbohydrate diet significantly increased the mRNA expression level of *g6pca* in the liver, while it had no effect on the *g6pcb1* and *g6pcb2* mRNA levels. Compared with the control group, 15 mmol/L glucose obviously increased the expression of *g6pca* mRNA in L8824, while 30 mmol/L glucose had no remarkable influence, and insulin at a concentration of 1 μ mol/L could overcome the stimulatory effect of 15 mmol/L glucose. Our results suggest that the *g6pc* genes of grass carp might have functional differentiation after gene duplication events. In addition, high glucose levels induced the expression of *g6pca* mRNA, but had no significant effect on the transcription levels of *g6pcb1* and *g6pcb2*, the specific functions of which require further study.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; *g6pc*; gluconeogenesis; tissue expression; insulin

Corresponding author: LIANG Xufang. E-mail: xufang_liang@hotmail.com