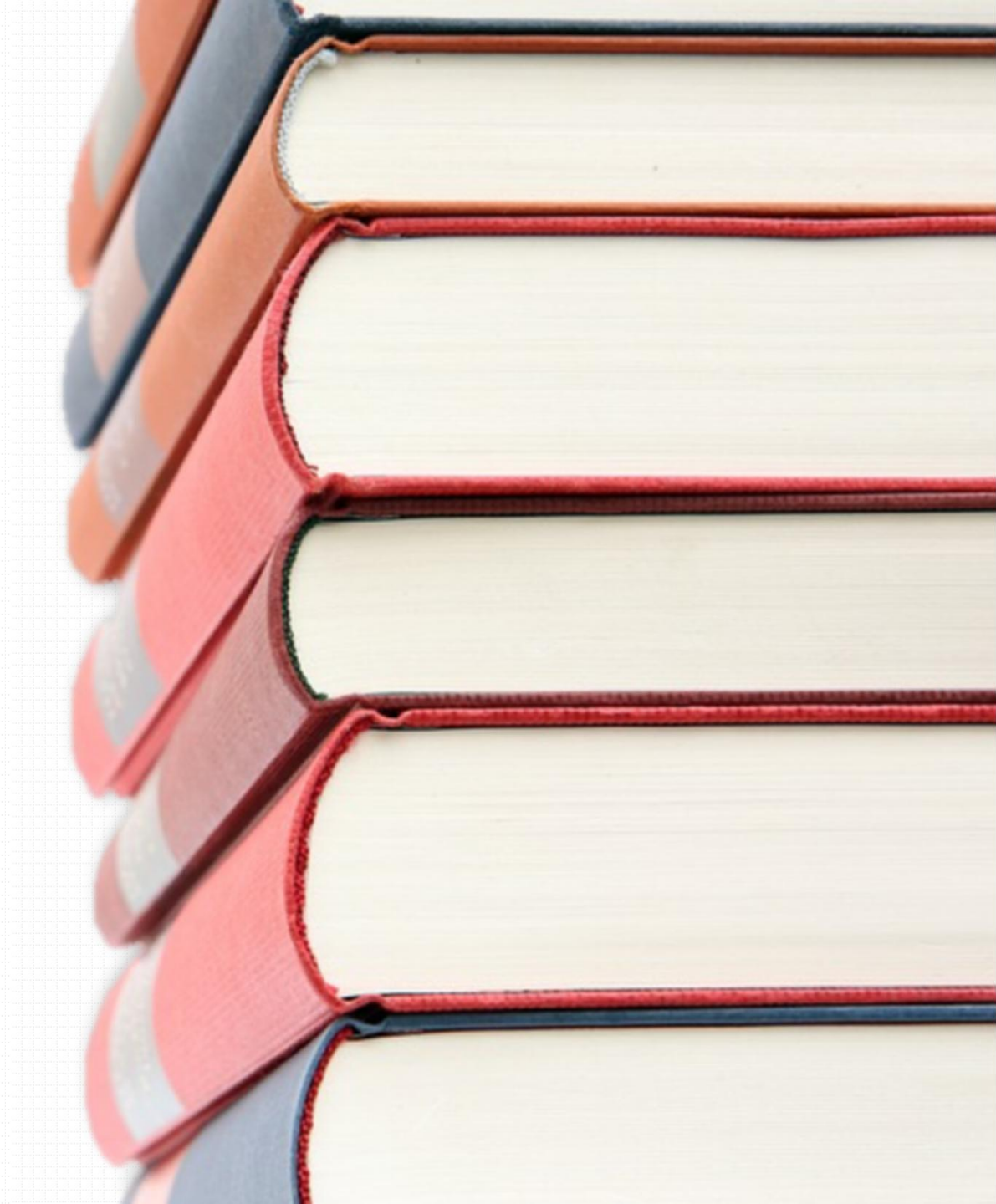



读书报告

- 汇报时间：2018年7月07日
- 汇报人：赵文丽



SCIENTIFIC REPORTS



IF=4.122

OPEN

Ghrelin Facilitates GLUT2-, SGLT1- and SGLT2-mediated Intestinal Glucose Transport in Goldfish (*Carassius auratus*)

Received: 30 September 2016

Accepted: 17 February 2017

Published: 24 March 2017

Ayelén Melisa Blanco^{1,2}, Juan Ignacio Bertucci^{2,3}, Naresh Ramesh², María Jesús Delgado¹, Ana Isabel Valenciano¹ & Suraj Unniappan²

Ghrelin促进金鱼体内GLUT2-, SGLT1-和SGLT2介导的肠道葡萄糖转运

目 录

CONTENTS

01 PART ONE 研究背景

02 PART TWO 材料和方法

03 PART THREE 结果与讨论

04 PART FOUR 学习与收获



01

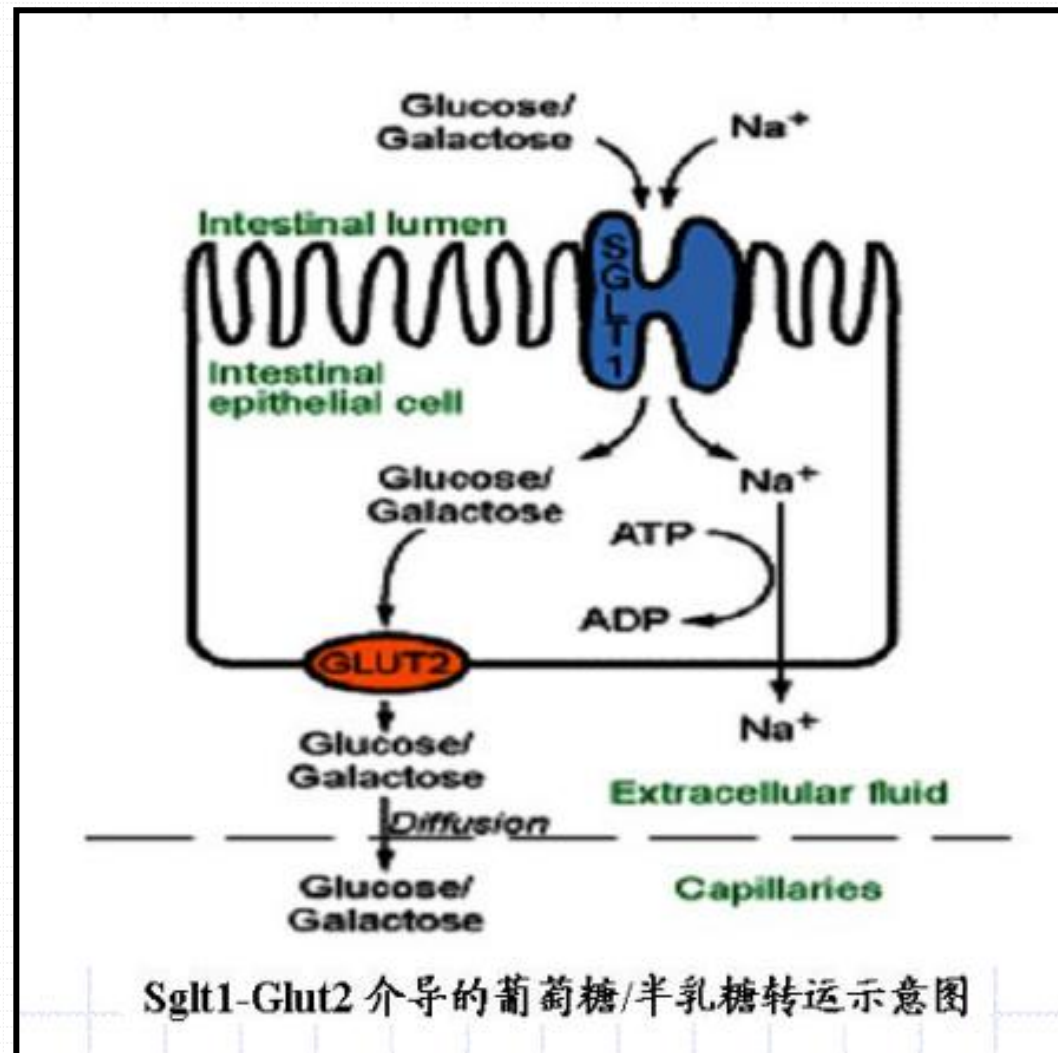
— • PART ONE • —

研究背景

PART ONE 研究背景



在鱼类中，肠道葡萄糖的吸收机制与哺乳动物非常相似。因此，葡萄糖进入鱼类肠细胞是由刷状缘膜上的SGLT1介导的，然后通过肠细胞基底膜上不依赖 Na^+ 的载体转运至血液中。



经典的葡萄糖调节激素包括：

- ◆ Insulin 胰腺来源的胰岛素
- ◆ Glucagon 胰腺来源的胰高血糖素
- ◆ GLP-1 肠胰高血糖素样肽1
- ◆ GIP 葡萄糖依赖性促胰岛素肽

还有一些其他发现的激素参与葡萄糖稳态的调节。 **Ghrelin**是其中之一，但在鱼类糖代谢中研究较少。

Ghrelin

Ghrelin是胃或前肠合成的一种肽类激素，它能够调节食欲、进食和身体构成。

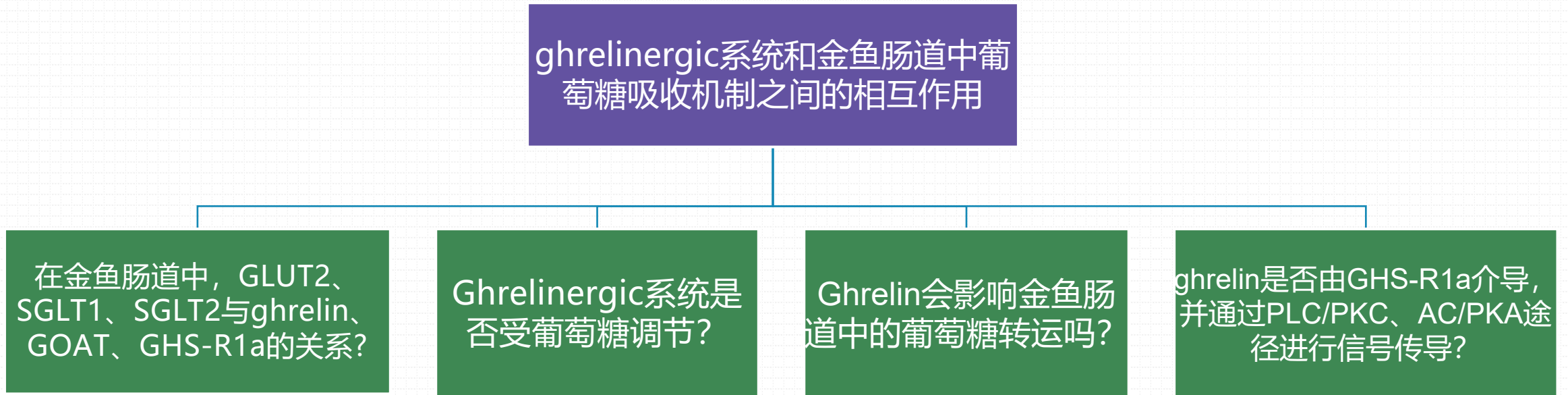
Ghrelin是唯一已知通过酰化修饰后的外周蛋白。这种激素活性的至关重要的修饰是由**Ghrelin O-酰基转移酶 (GOAT)**催化的。

此外，它是哺乳动物和鱼类中唯一对食物摄入有刺激作用的外周肽。

Ghrelin的作用是由生长激素促分泌素受体（GHS-R）介导的，该受体是一种G蛋白偶联受体。在哺乳动物和鱼类中有不同的ghrelin受体亚型，GHS-R1a是介导ghrelin大多数生理功能的一个受体。Ghrelin与该受体结合后主要由PLC/PKC 或AC/PKA细胞内途径介导。



研究内容和目的:





02

PART TWO

材料和方法

Ghrelin促进
金鱼肠道中
GLUT2,
SGLT1和
SGLT2介导
的肠道葡萄
糖转运

GLUT2、SGLT1、SGLT2在金鱼肠道中的定位

GLUT2、SGLT1、SGLT2与ghrelin、GOAT、GHS-R1a在
金鱼肠道中的共定位

葡萄糖对金鱼肠的ghrelinegic的调节

ghrelin 在体内和体外对金鱼肠中的GLUT2、SGLT1、SGLT2的调节

肠道离体培养下, GHS-R1a拮抗剂、PLC抑制剂、PKA抑制剂处理, 对
ghrelin诱导的葡萄糖转运蛋白的表达的影响

Ghrelin处理后, 金鱼原代肠细胞中葡萄糖转运蛋白的易位测定

材料:

- ◆ 金鱼 $5\pm 1\text{g}$ 用于免疫组化。
- ◆ 金鱼 $32\pm 8\text{g}$ 用于体内研究、体外器官研究和体外原代细胞培养研究。

养殖条件:

- ◆ 用于免疫组化和体外研究的金鱼, 300L的水族箱, $20\pm 2^\circ\text{C}$ 。
- ◆ 用于体内研究的金鱼, 10L的水族箱, $21\pm 2^\circ\text{C}$ 。
- ◆ 光暗比为12L:12D, 每天10:00定时按体重的1%投喂。





03

PART THREE

结果与讨论

PART THREE 结果与讨论——GLUT2、SGLT1、SGLT2在金鱼肠道中的定位

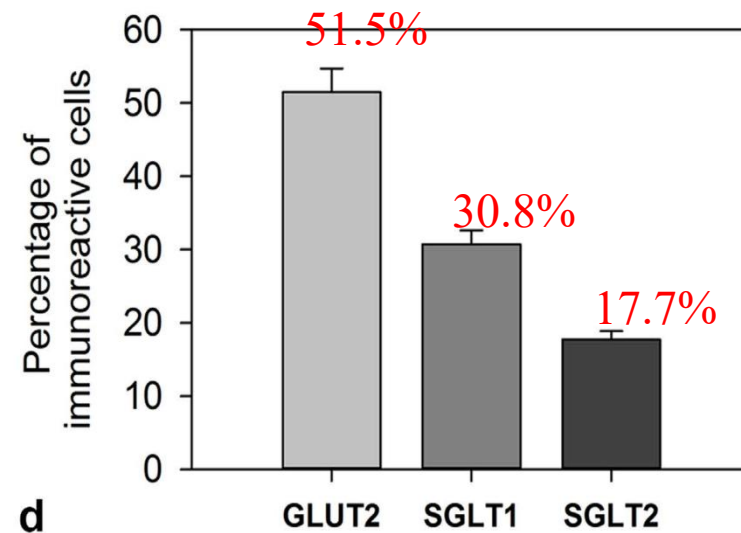
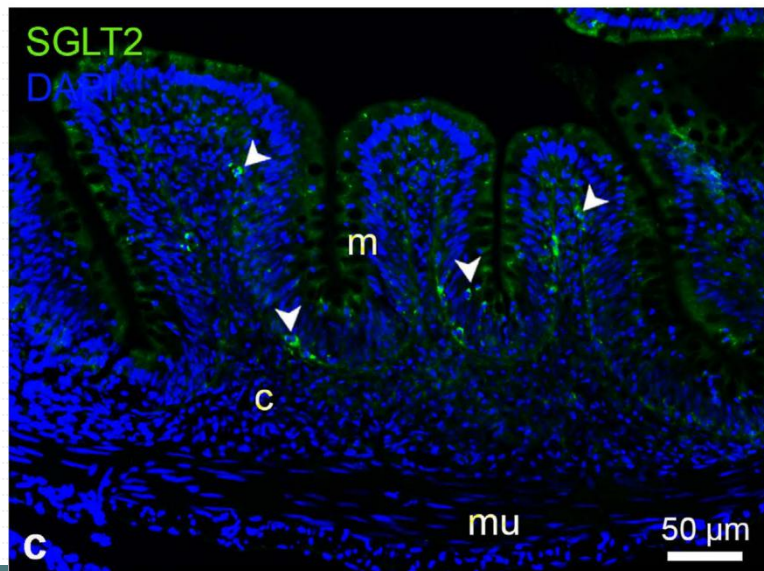
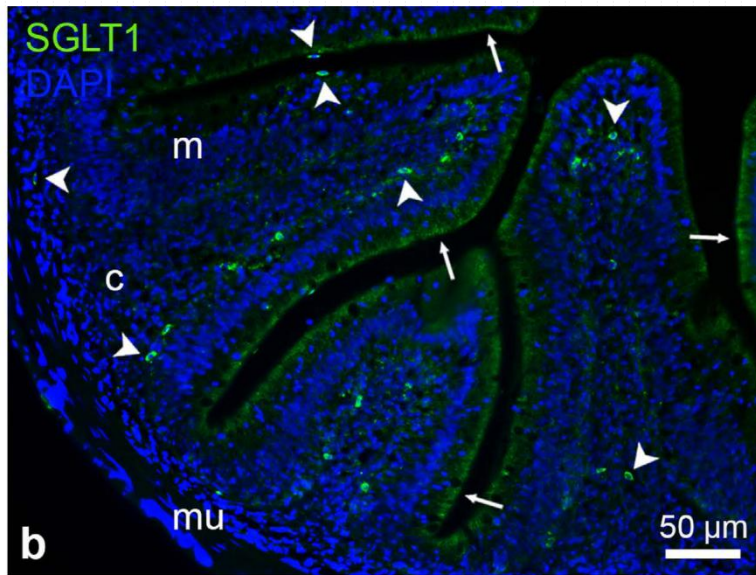
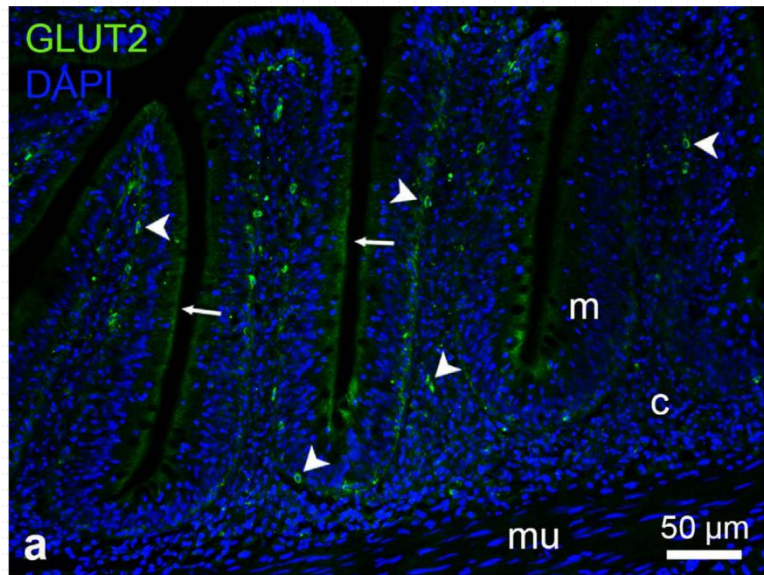


Figure 1. GLUT2-like, SGLT1-like and SGLT2-like immunoreactivity in goldfish intestine detected by immunohistochemistry.

► 免疫反应细胞

→ 顶端膜葡萄糖转运蛋白

c 结缔组织 (固有层+粘膜下层)

m 粘膜

mu 肌肉层

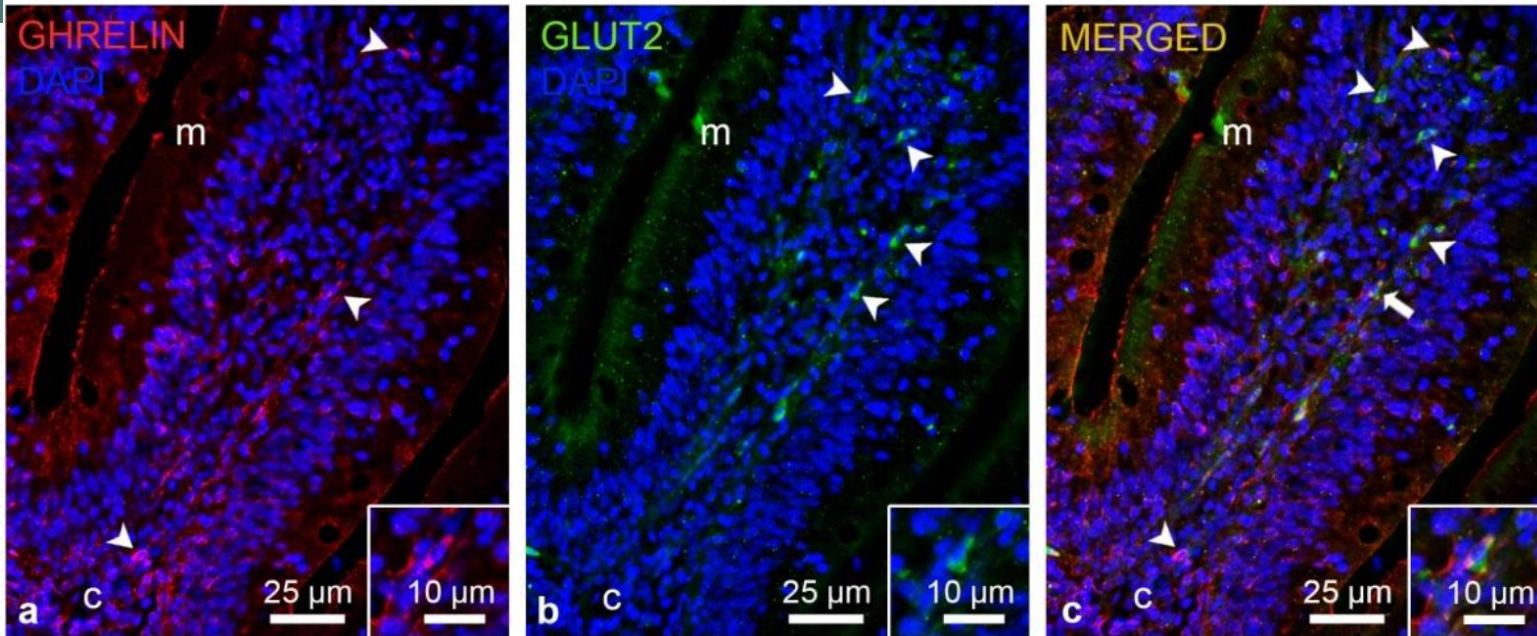
金鱼肠道中存在葡萄糖转运蛋白 GLUT2、SGLT1和 SGLT2。



小结:

- ◆ 金鱼肠道中存在葡萄糖转运蛋白 GLUT2、SGLT1和SGLT2。
- ◆ 每种转运蛋白免疫的阳性细胞绝大多数都沿粘膜边界，邻近固有层分布。
- ◆ 金鱼肠道中，三种葡萄糖转运蛋白的阳性细胞丰富度由高到低为：GLUT2样细胞（51.5%）>SGLT1样细胞（30.8%）>SGLT2样细胞（17.7%）。

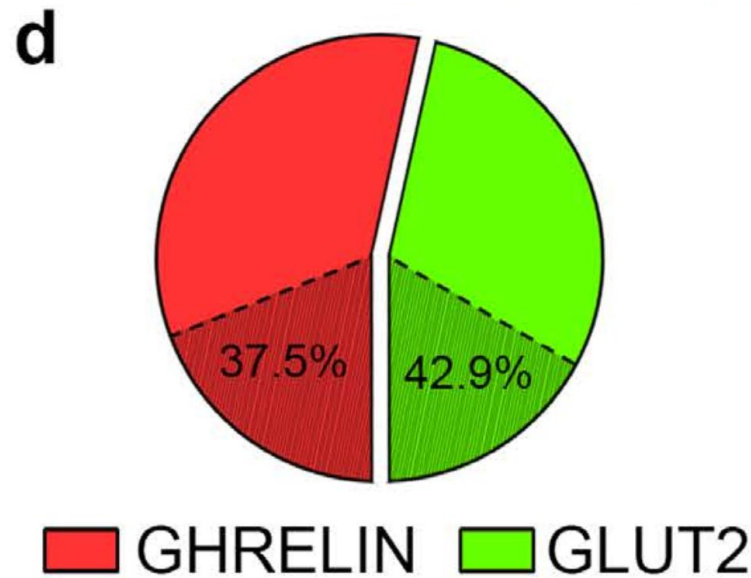
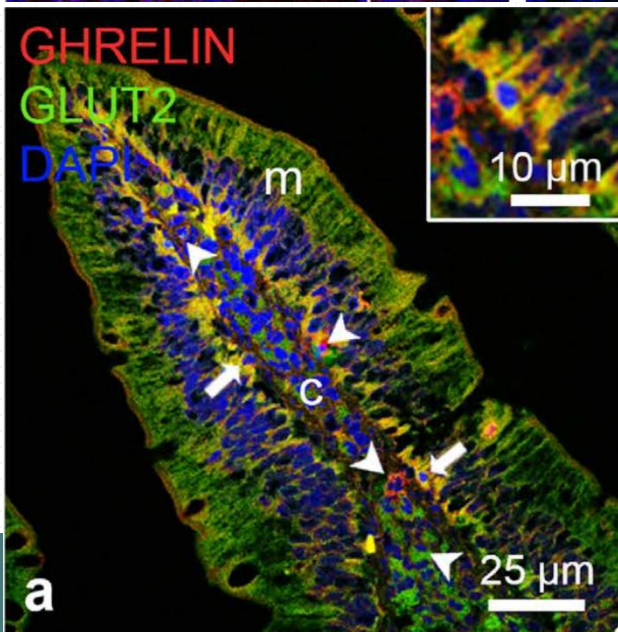
PART THREE 结果与讨论——葡萄糖转运蛋白与ghrelin、GOAT、GHS-R1a在金鱼肠道中的共定位



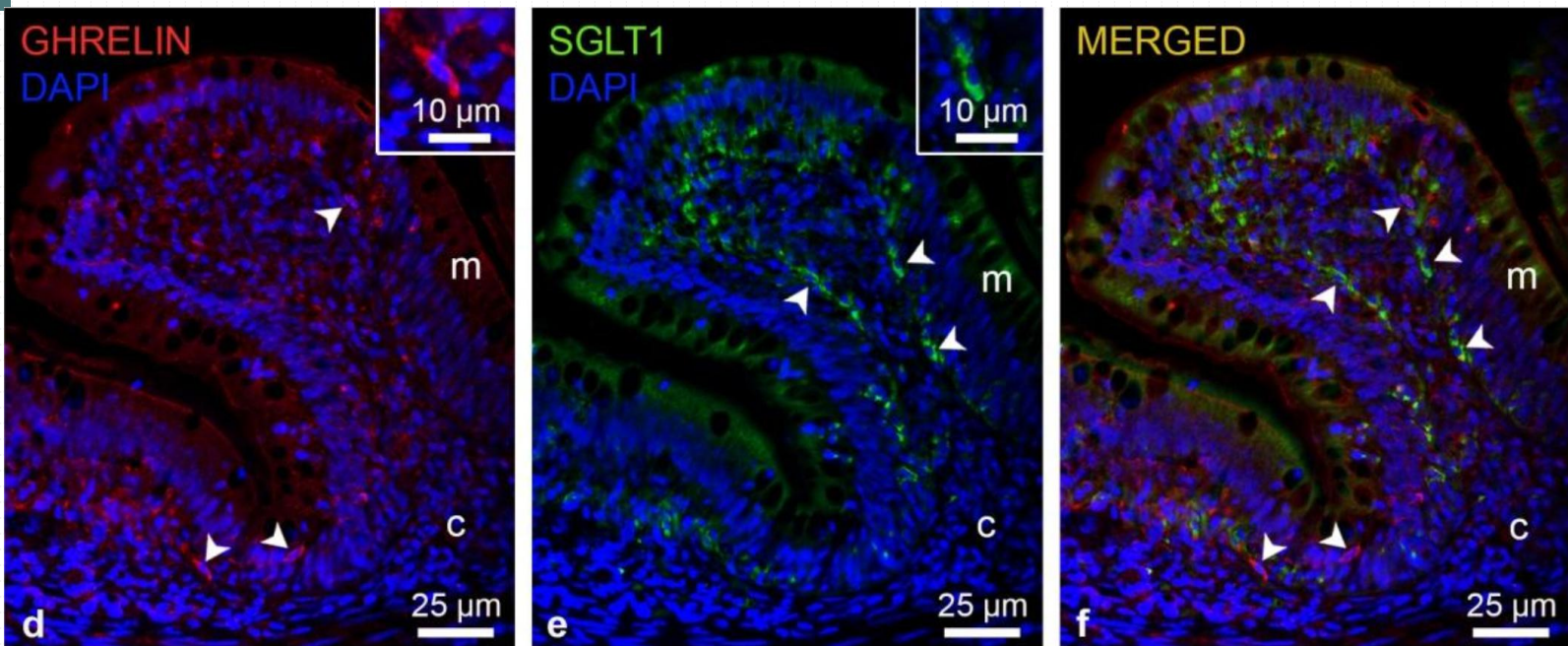
- ▶ ghrelin和GLUT2阳性细胞的定位
- ghrelin和GLUT2阳性细胞的共定位
- m 粘膜层
- c 固有层
- 代表阳性细胞的放大图

主要存在于黏膜下层，靠近固有层的部位。

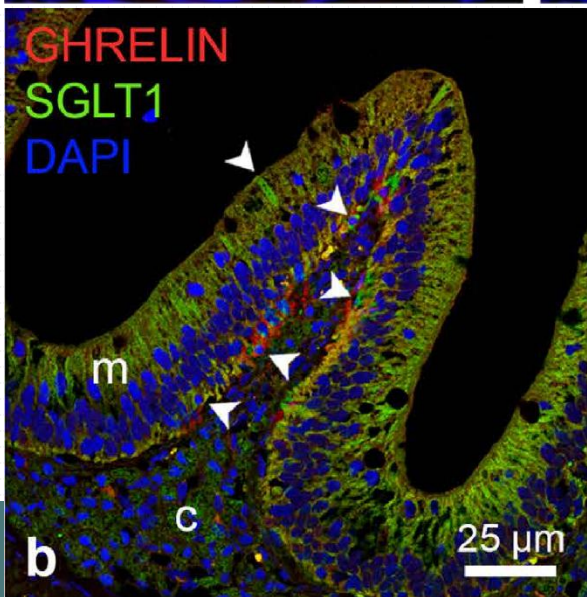
37.5%ghrelin样阳性细胞与42.9%的GLUT2阳性细胞在同一细胞中共表达。



PART THREE 结果与讨论——葡萄糖转运蛋白与ghrelin、GOAT、GHS-R1a在金鱼肠道中的共定位



- ▶ ghrelin和SGLT1阳性细胞的定位
- ghrelin和SGLT1阳性细胞的共定位
- m 粘膜层
- c 固有层
- 代表阳性细胞的放大图

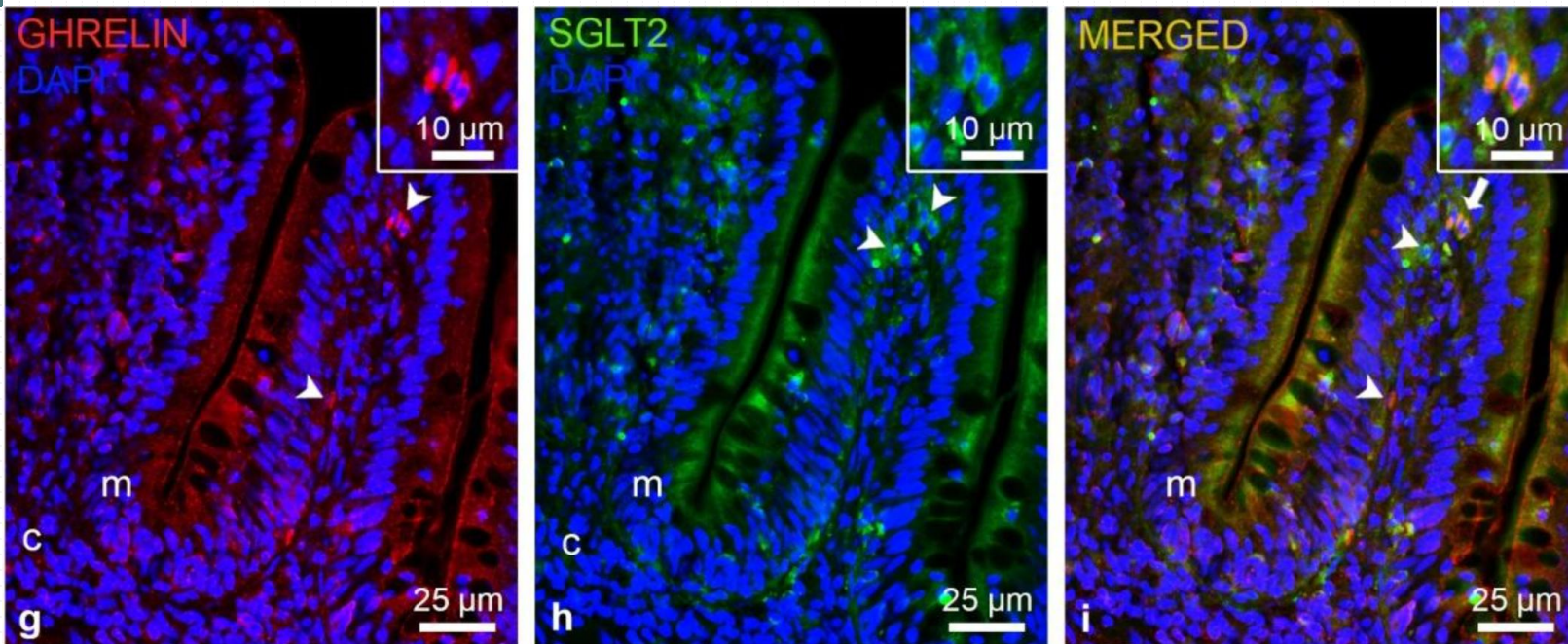


主要存在于黏膜下层，靠近固有层的部位。

未检测到共表达的ghrelin和SGLT1的免疫阳性细胞。



PART THREE 结果与讨论——葡萄糖转运蛋白与ghrelin、GOAT、GHS-R1a在金鱼肠道中的共定位



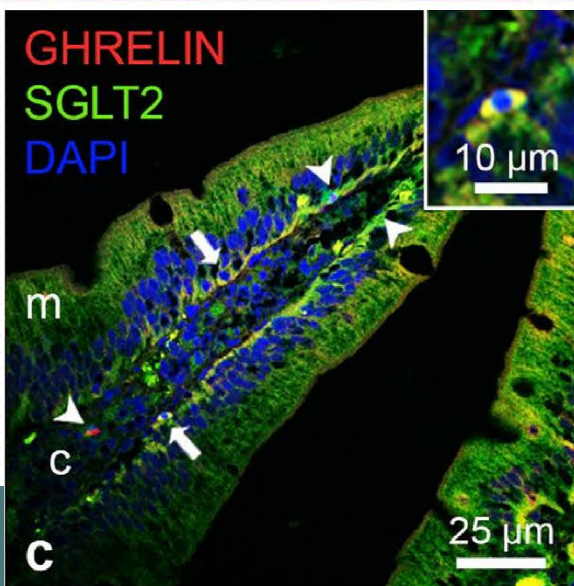
- ghrelin和SGLT2阳性细胞的定位
- ghrelin和SGLT2阳性细胞的共定位

m 粘膜层

c 固有层

□ 代表阳性细胞的放大图

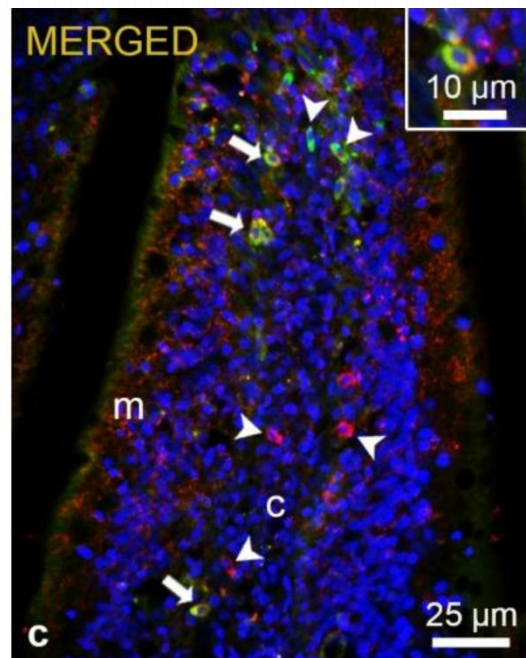
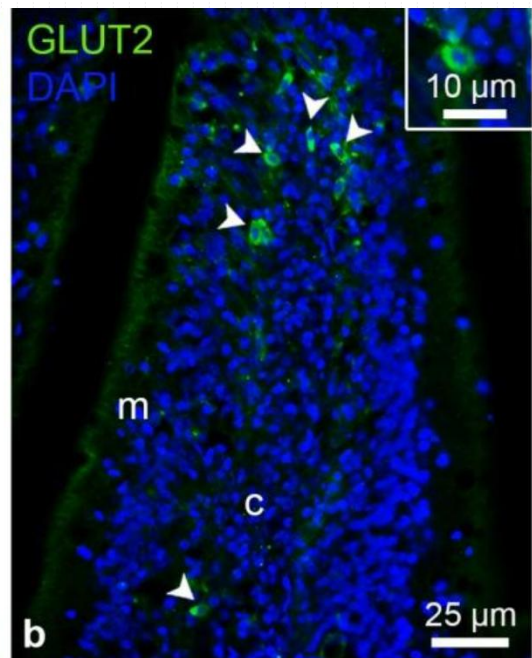
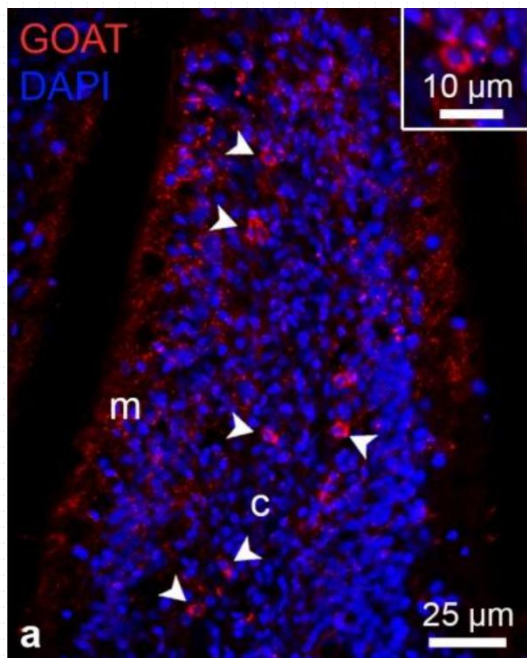
主要存在于黏膜下层，靠近固有层的部位。



GLUT2和SGLT2 (而不是SGLT1) 在同一细胞中与ghrelin共表达的事实表明，在金鱼肠道中可能对ghrelin GLUT2和SGLT2起作用。

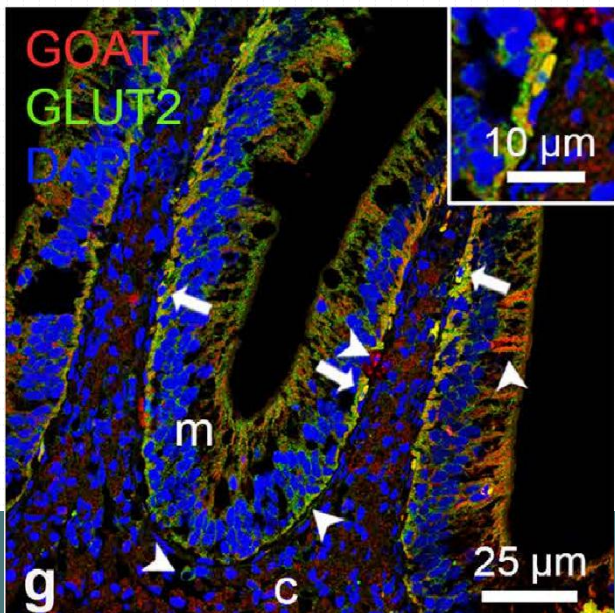


PART THREE 结果与讨论——葡萄糖转运蛋白与ghrelin、GOAT、GHS-R1a在金鱼肠道中的共定位



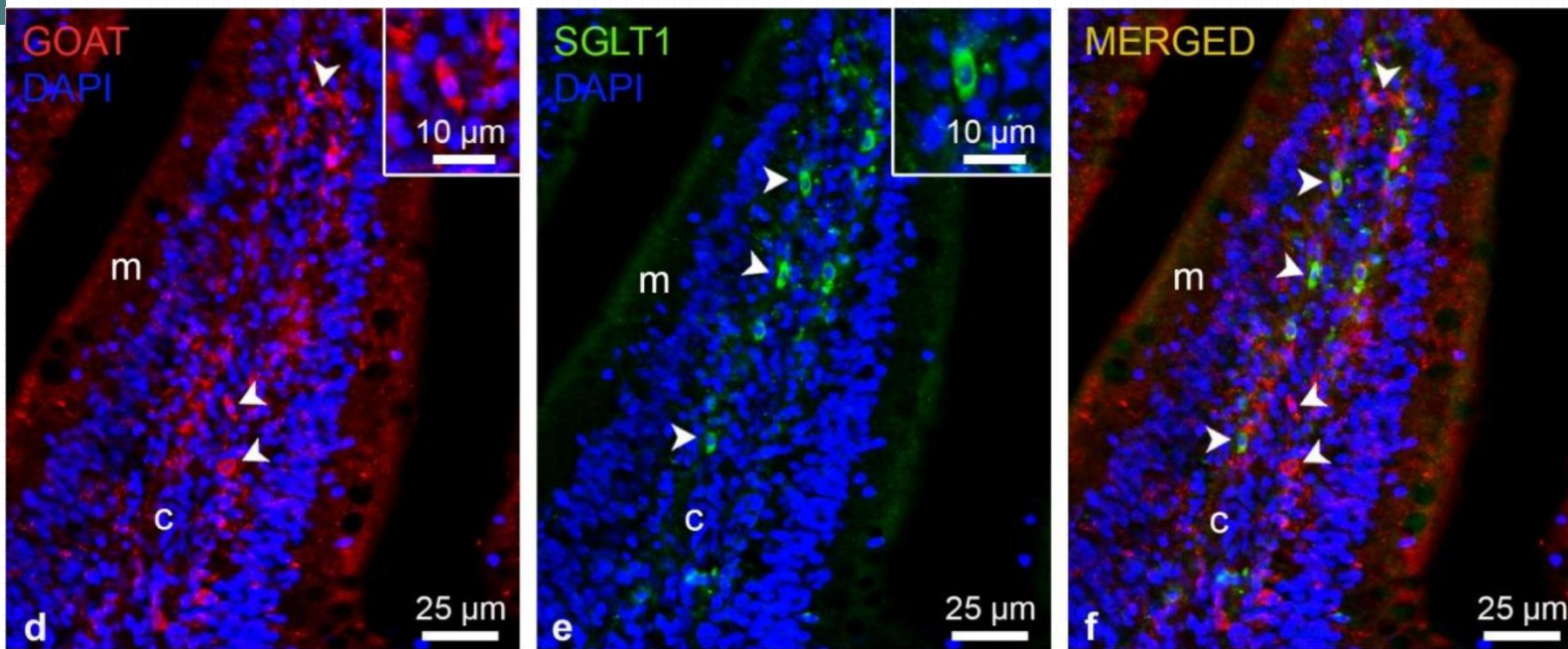
- ▶ GOAT和GLUT2阳性细胞的定位
- GOAT和GLUT2阳性细胞的共定位
- m 粘膜层
- c 固有层
- 代表阳性细胞的放大图

主要存在于黏膜下层，靠近固有层的部位。



28.6%GOAT样阳性细胞与44.4%的GLUT2阳性细胞在同一细胞中共表达。

PART THREE 结果与讨论——葡萄糖转运蛋白与ghrelin、GOAT、GHS-R1a在金鱼肠道中的共定位



- ▶ GOAT和SGLT1阳性细胞的定位
- GOAT和SGLT1阳性细胞的共定位

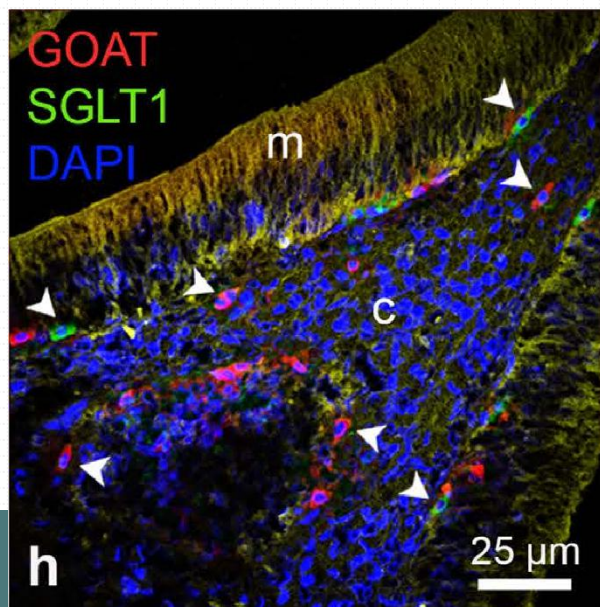
m 粘膜层

c 固有层

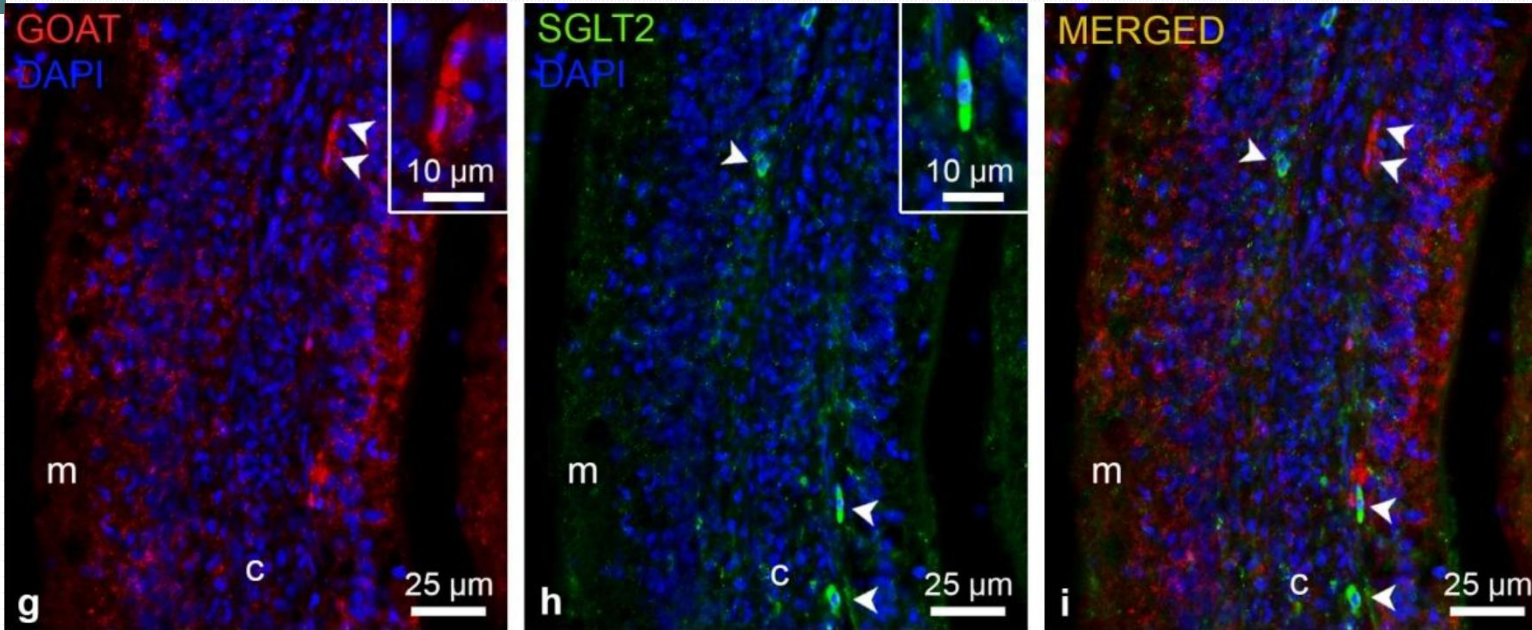
□ 代表阳性细胞的放大图

主要存在于黏膜下层，靠近固有层的部位。

未检测到共表达的GOAT和SGLT1的免疫阳性细胞。



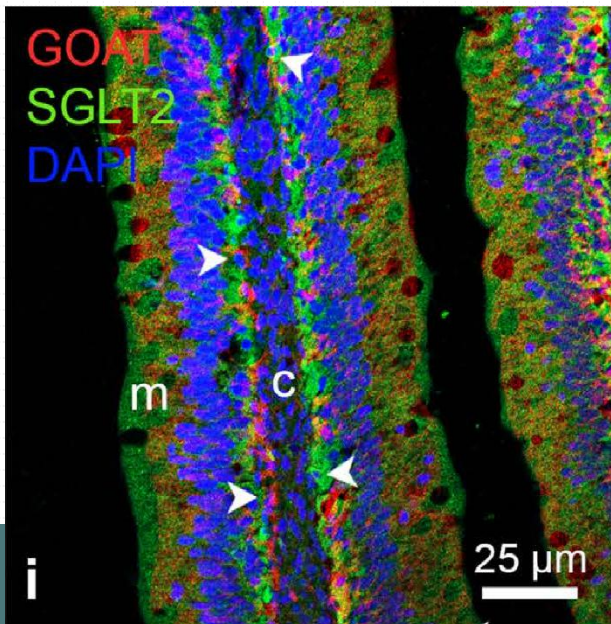
PART THREE 结果与讨论——葡萄糖转运蛋白与ghrelin、GOAT、GHS-R1a在金鱼肠道中的共定位



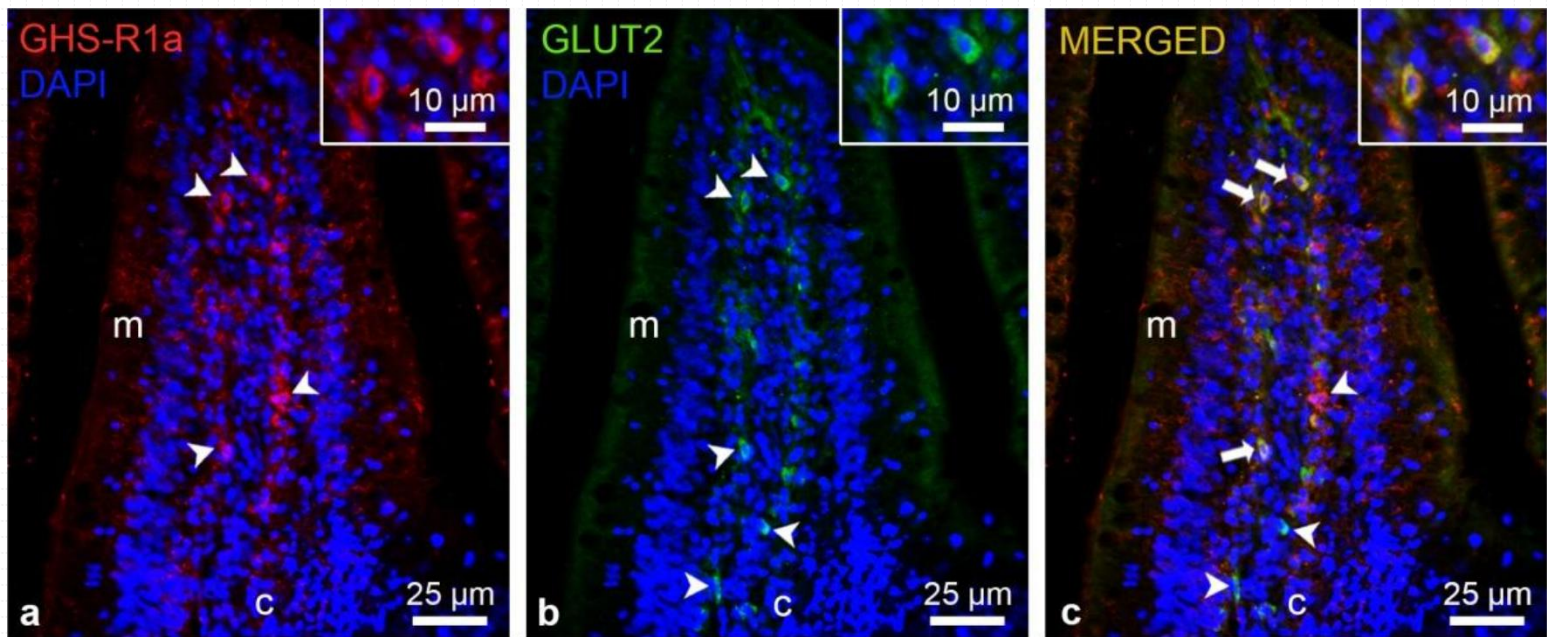
- ▶ GOAT和SGLT2阳性细胞的定位
- GOAT和SGLT2阳性细胞的共定位
- m 粘膜层
- c 固有层
- 代表阳性细胞的放大图

主要存在于黏膜下层，靠近固有层的部位。

未检测到共表达的GOAT和SGLT2的免疫阳性细胞。



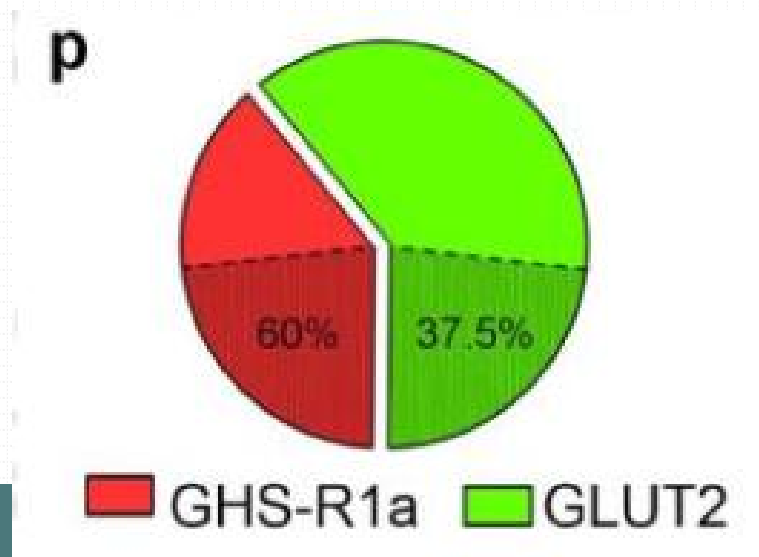
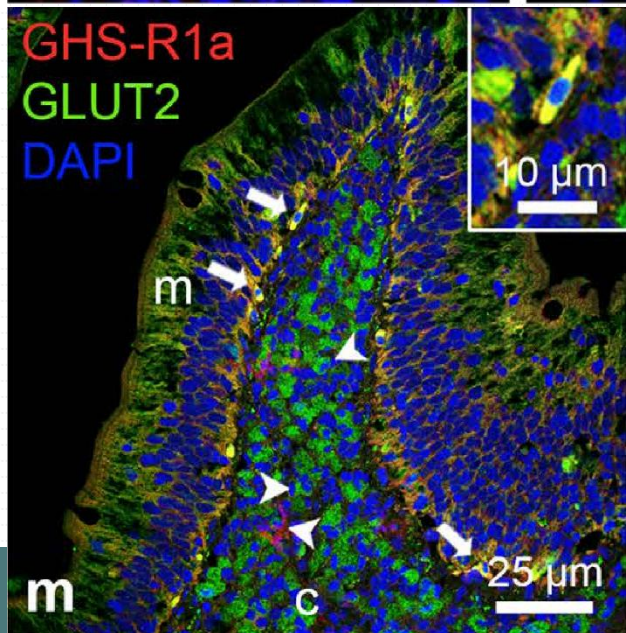
PART THREE 结果与讨论——葡萄糖转运蛋白与ghrelin、GOAT、GHS-R1a在金鱼肠道中的共定位



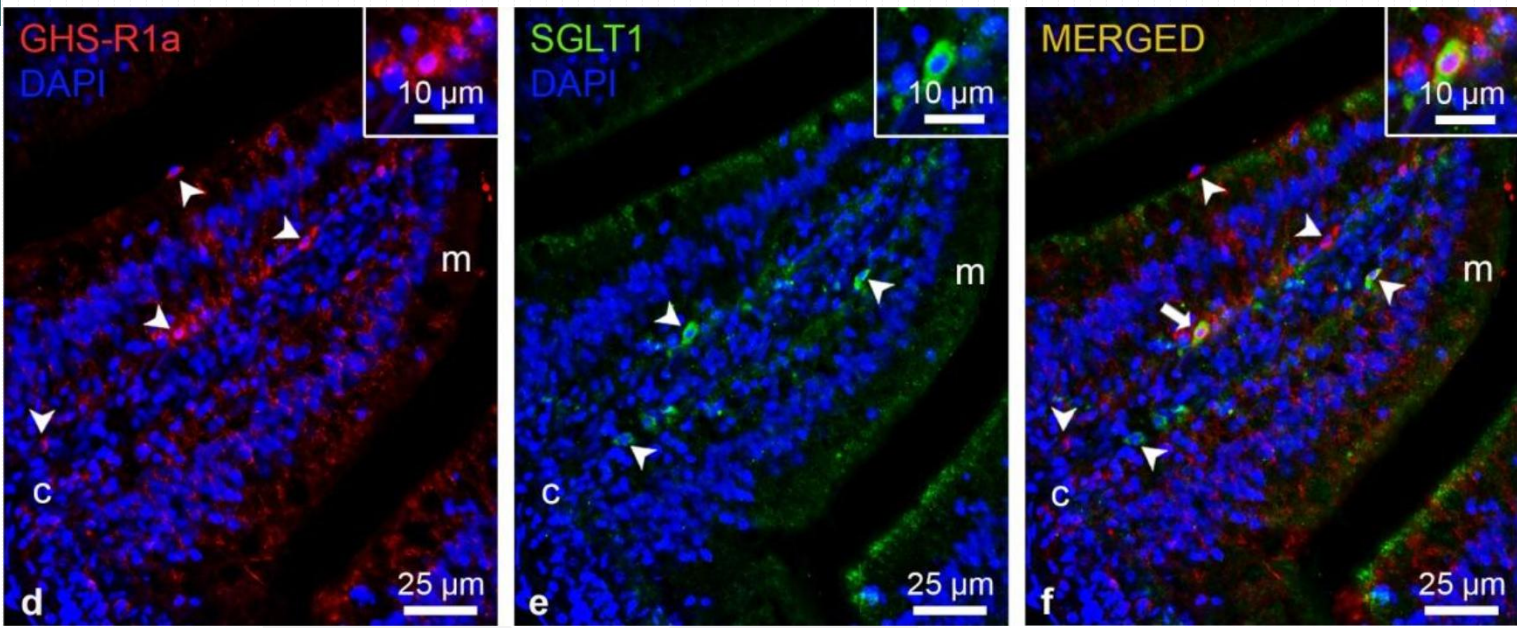
- ▶ GHS-R1a和GLUT2阳性细胞的定位
- GHS-R1a和GLUT2阳性细胞的共定位
- m 粘膜层
- c 固有层
- 代表阳性细胞的放大图

主要存在于黏膜下层，靠近固有层的部位。

60% GHS-R1a样阳性细胞与37.5%的GLUT2阳性细胞在同一细胞中共表达。



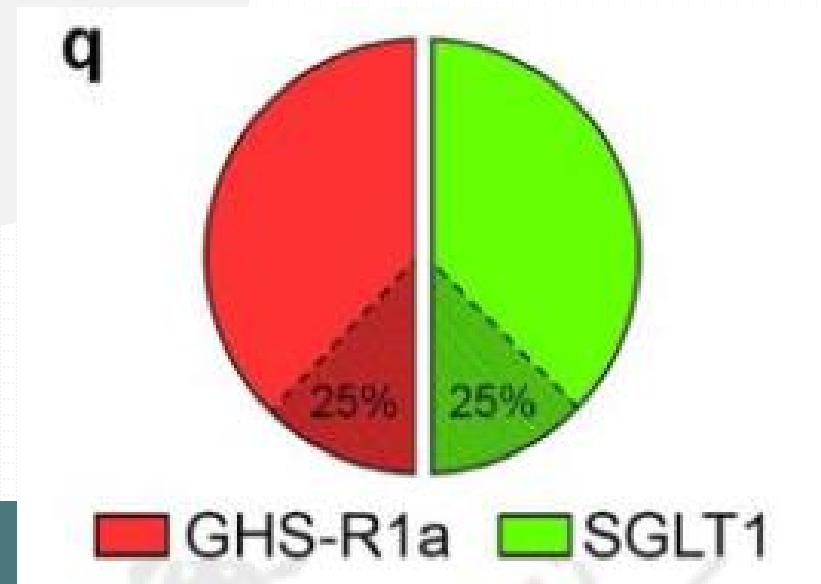
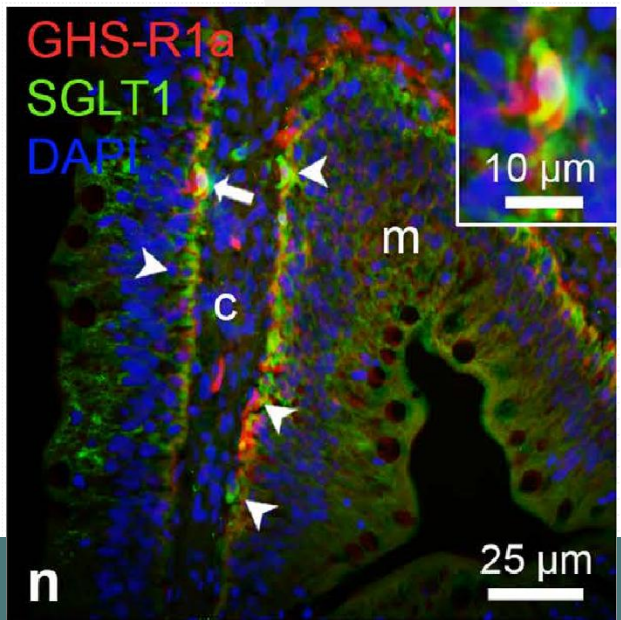
PART THREE 结果与讨论——葡萄糖转运蛋白与ghrelin、GOAT、GHS-R1a在金鱼肠道中的共定位



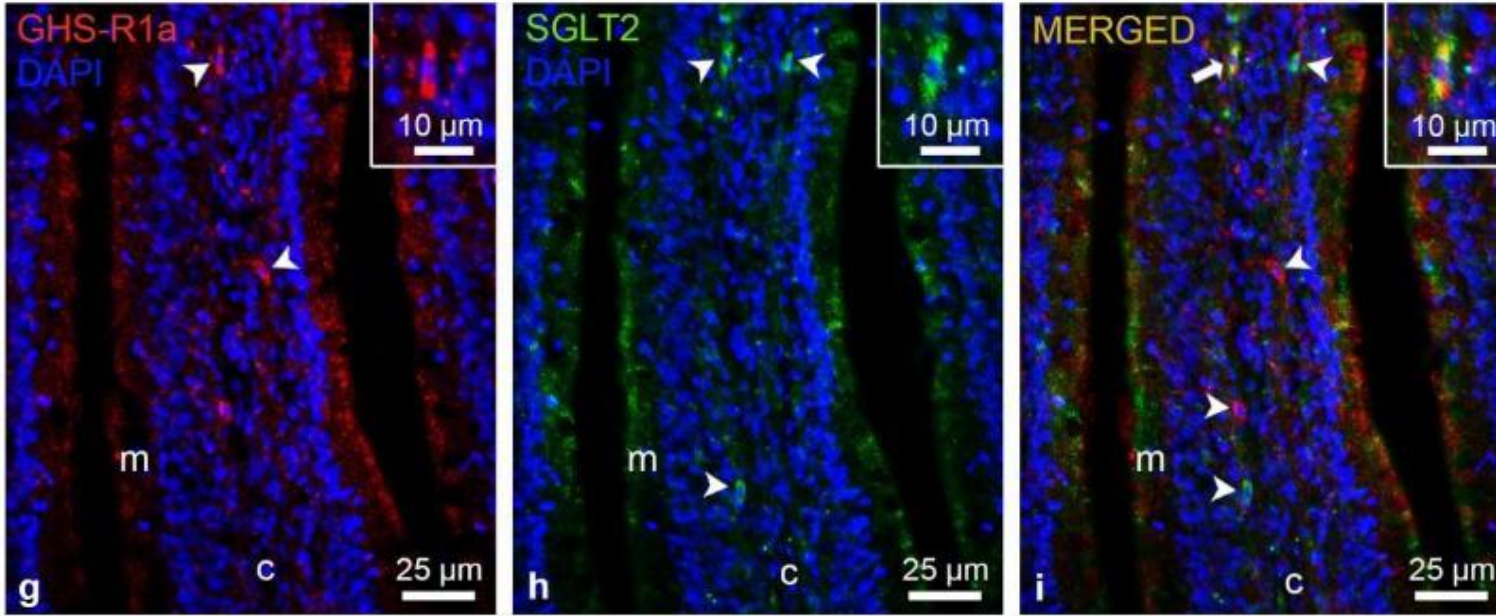
- ▶ GHS-R1a和SGLT1阳性细胞的定位
- GHS-R1a和SGLT1阳性细胞的共定位
- m 粘膜层
- c 固有层
- 代表阳性细胞的放大图

主要存在于黏膜下层，靠近固有层的部位。

25% GHS-R1a样阳性细胞与25%的SGLT1阳性细胞在同一细胞中共表达。



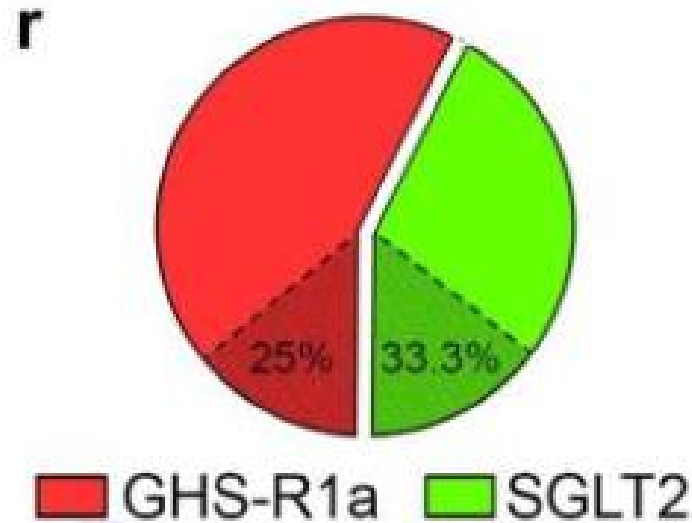
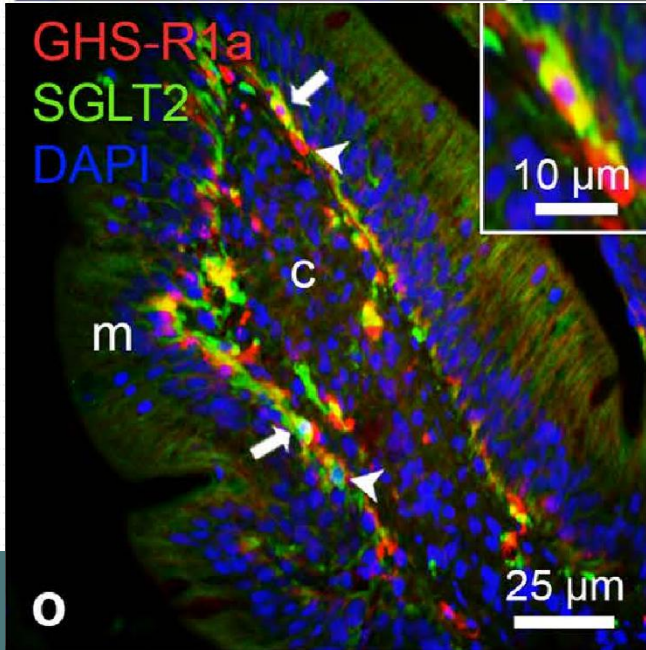
PART THREE 结果与讨论——葡萄糖转运蛋白与ghrelin、GOAT、GHS-R1a在金鱼肠道中的共定位



- ▶ GHS-R1a和SGLT2阳性细胞的定位
- GHS-R1a和SGLT2阳性细胞的共定位
- m 粘膜层
- c 固有层
- 代表阳性细胞的放大图

主要存在于黏膜下层，靠近固有层的部位。

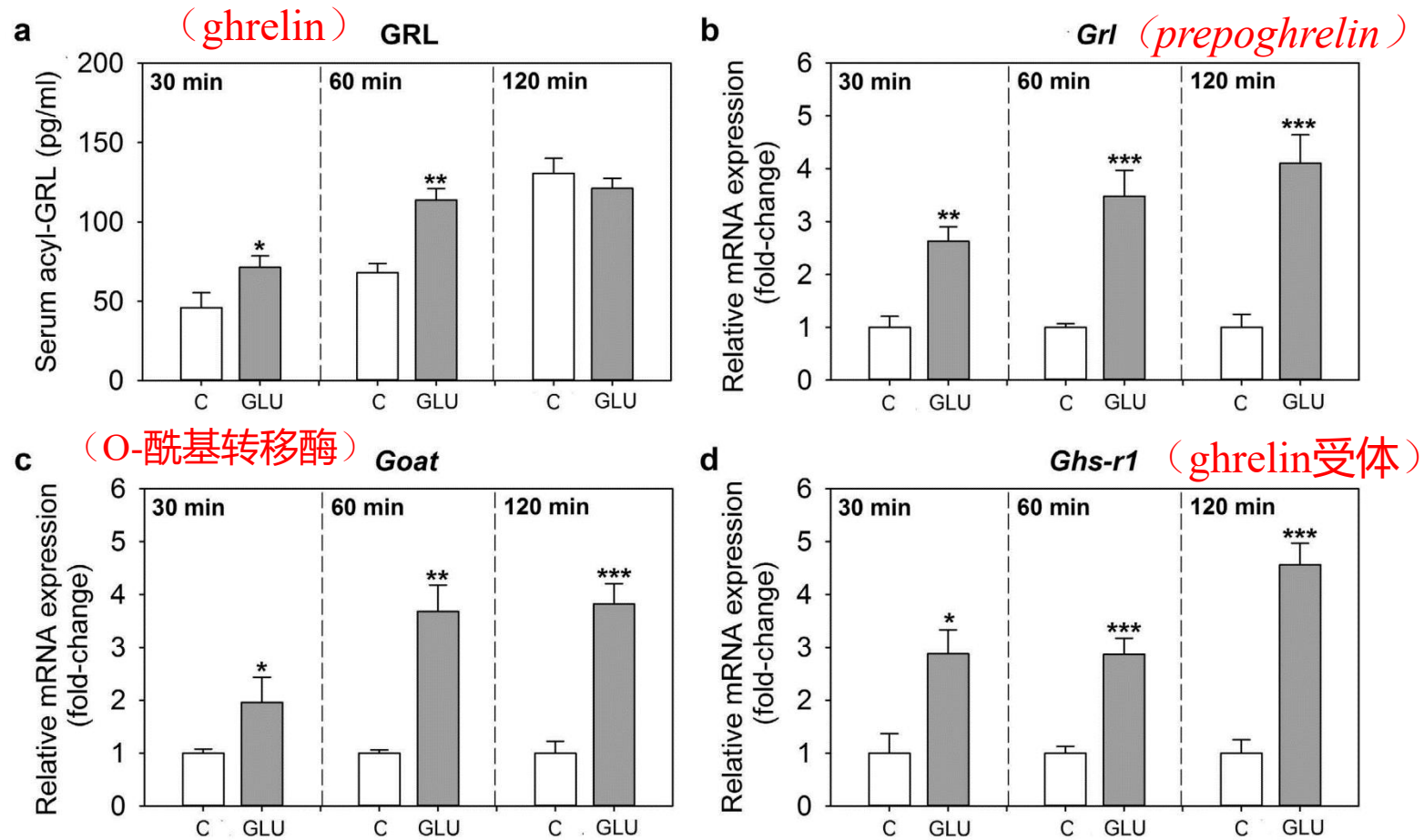
25% GHS-R1a样阳性细胞与33.3%的SGLT2阳性细胞在同一细胞中共表达。



小结:

- ◆ 42.9%的GLUT2和40%的SGLT2共表达于ghrelin的阳性细胞中，说明ghrelin从金鱼肠道内分泌细胞中释放，可能对GLUT2和SGLT2有作用。
- ◆ 37.5%的GLUT2、25%的SGLT1、33.3%的SGLT2共表达于GHS-R1a的阳性细胞中，说明这三种葡萄糖转运蛋白在金鱼的肠中易受ghrelin的调节。

PART THREE 结果与讨论——腹腔注射葡萄糖，对金鱼肠的ghrelinergic的调节



小结:

葡萄糖在体内，可以上调金

鱼肠中的ghrelinergic系统。

Figure 3. Effects of intraperitoneal administration of glucose (GLU) on circulating levels of acylated ghrelin(a) and on the expression of preproghrelin (b), goat (c) and ghs-r1 (d) mRNAs in goldfish intestine.

PART THREE 结果与讨论——ghrelin 在体内和体外对金鱼肠中的GLUT2、SGLT1、SGLT2的调节

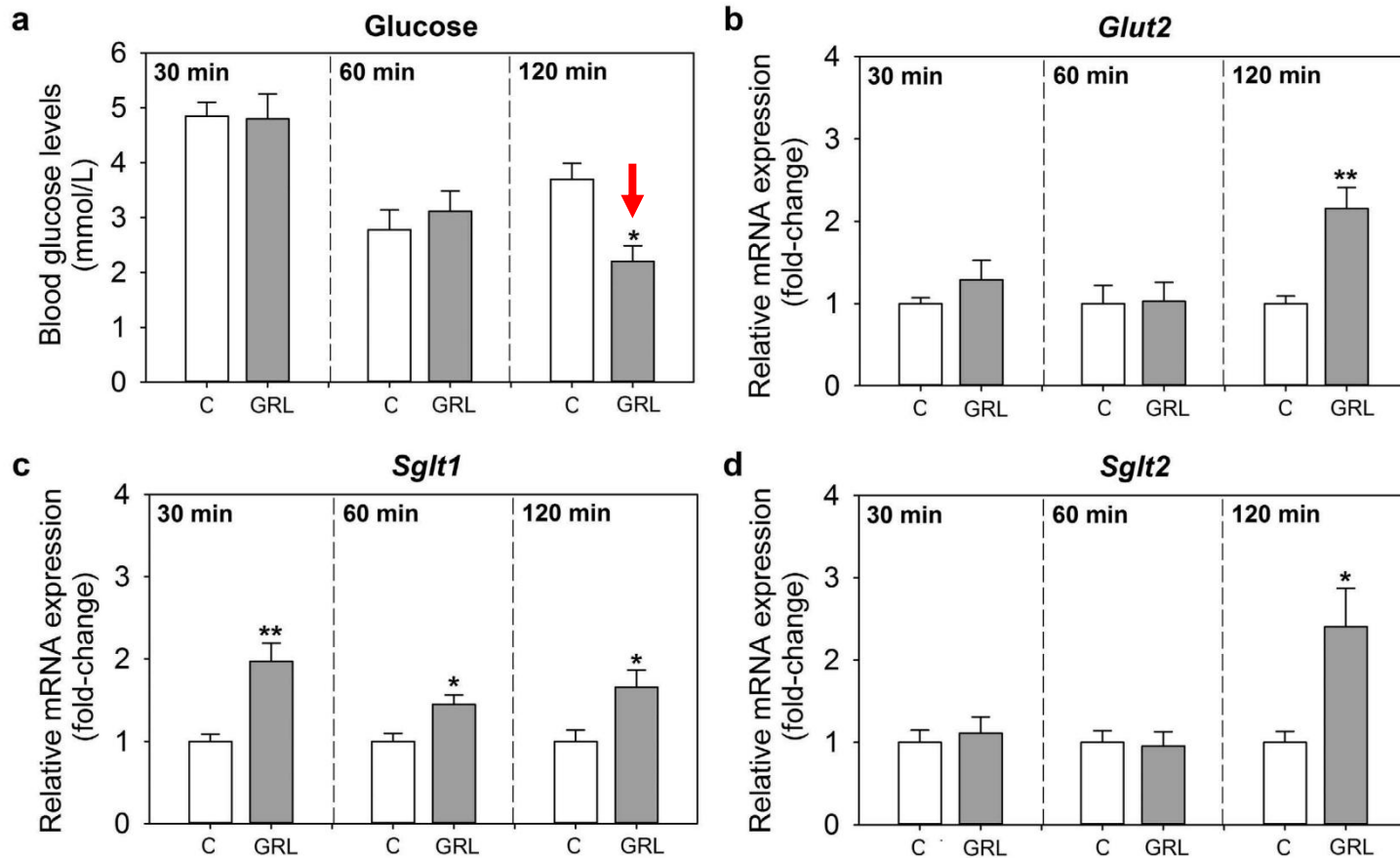


Figure 4. Effects of intraperitoneal administration of ghrelin (GRL) on blood glucose levels (a) and on the expression of *glut2* (b), *sglt1* (c) and *sglt2* (d) mRNAs in goldfish intestine.

Sglt1在30min开始升高，GLUT2和Sglt2在120min升高。这可能是Ghrelin处理后，首先促进肠道从肠腔吸收葡萄糖（其主要由SGLT1介导）并随后协助葡萄糖向血液中的转运。

血糖在120min降低，推测可能是Ghrelin对其他组织的葡萄糖转运蛋白也具有刺激作用，以促进葡萄糖进入该组织。

PART THREE 结果与讨论——ghrelin 在体内和体外对金鱼肠中的GLUT2、SGLT1、SGLT2的调节

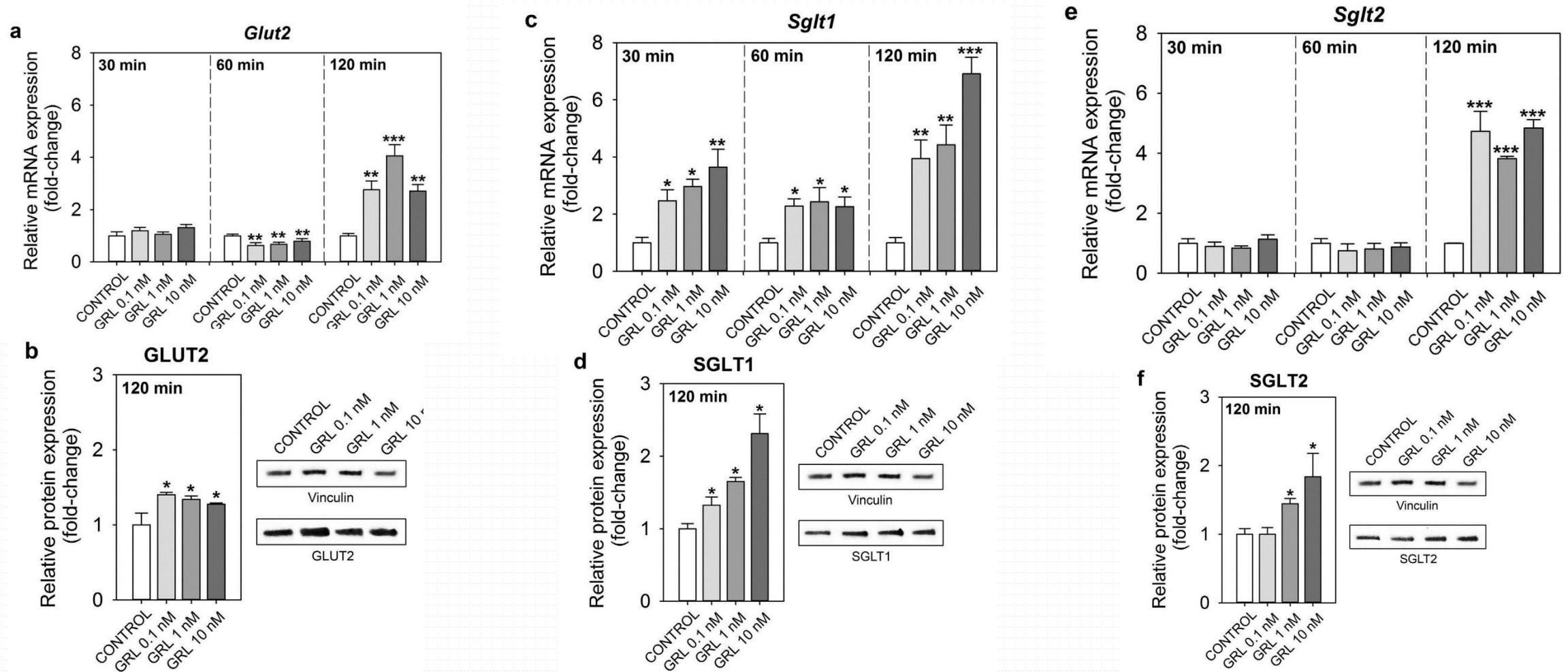
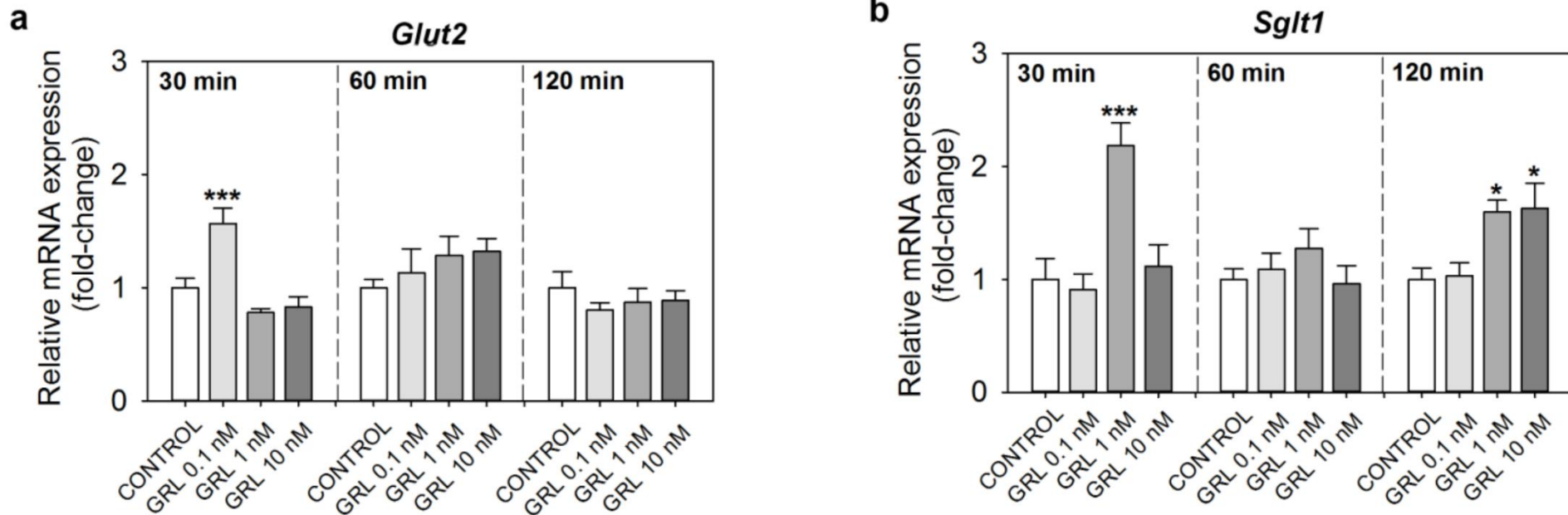


Figure 5. Effects of in vitro treatment with ghrelin (GRL) on the mRNA expression (lef panel) and protein levels (right panel) of GLUT2, SGLT1 and SGLT2 in goldfish cultured intestine. (a,c,e) Concentration and time-dependent effects of ghrelin on glucose transporters gene expression.

PART THREE 结果与讨论——ghrelin 在体内和体外对金鱼肠中的GLUT2、SGLT1、SGLT2的调节



Supplementary Figure S5. Concentration and time-dependent effects of in vitro treatment with ghrelin (GRL) on the mRNA expression of glut2 (a) and sglT1 (b) in goldfish cultured liver.

Ghrelin同时促进葡萄糖从肠腔转运到血液和葡萄糖从血液吸收到储存位置，从而降低高血糖。

小结:

- ◆ Ghrelin 在体内和体外都可以上调金鱼肠中的GLUT2、SGLT1、SGLT2的表达水平；并且Ghrelin可同时促进葡萄糖从肠腔转运到血液和从血液吸收到储存位置，从而降低高血糖。

PART THREE 结果与讨论——相关拮抗剂和抑制剂处理, 对ghrelin诱导的葡萄糖转运蛋白的表达的影响

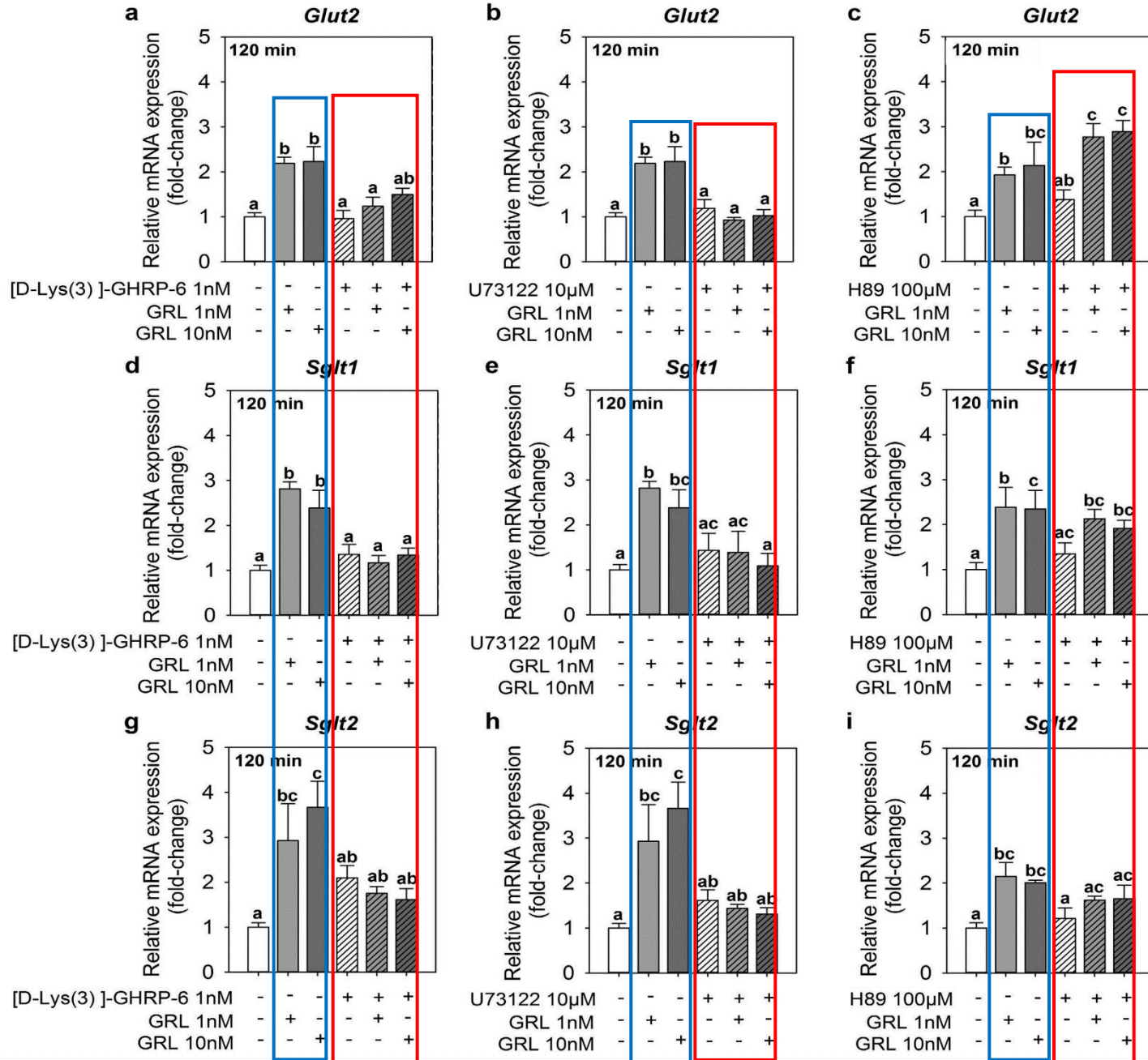


Figure 6. Relative expression of glut2 (a–c), sgl1 (d–f) and sgl2 (g–i) mRNAs in goldfish cultured intestine treated with ghrelin (GRL) and either the GHS-R1a antagonist [D-Lys3]-GHRP-6 (left panel), the PLC inhibitor U73122 (middle panel) or the PKA inhibitor H89 (right panel) at 120 min post-incubation.

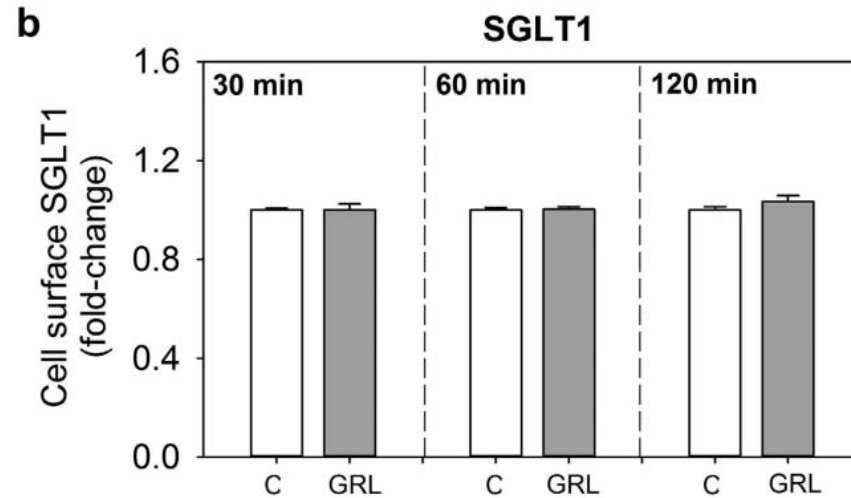
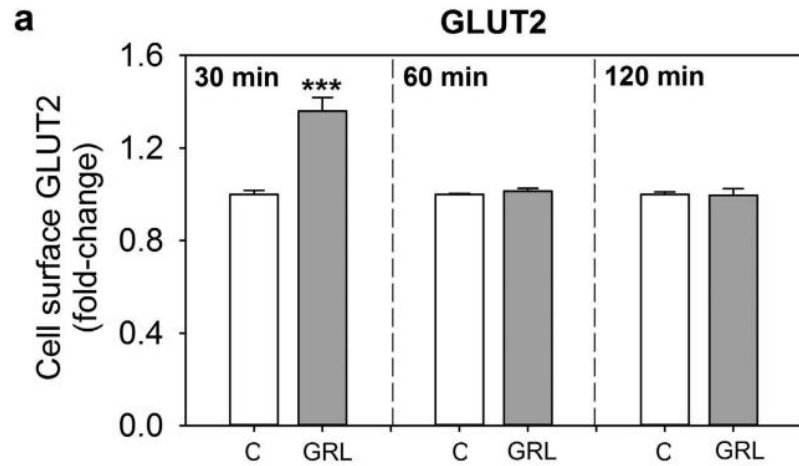
所有ghrelin引起的葡萄糖转运蛋白基因表达变化均被GHS-R1a拮抗剂、PLC抑制剂 (U73122) 阻断, 但不被PKA抑制剂 (H89) 阻断。



小结：

- ◆ Ghrelin对葡萄糖转运蛋白的影响都由其受体GHS-R1a介导。
- ◆ **表明PLC / PKC途径负责细胞内信号转导，调节ghrelin与GHS-R1a结合的葡萄糖转运蛋白的表达。**

PART THREE 结果与讨论——Ghrelin处理后，金鱼原代肠细胞中葡萄糖转运蛋白的易位测定



Ghrelin能够引起肠细胞中GLUT2的易位，可能导致这些细胞吸收葡萄糖的能力提高。

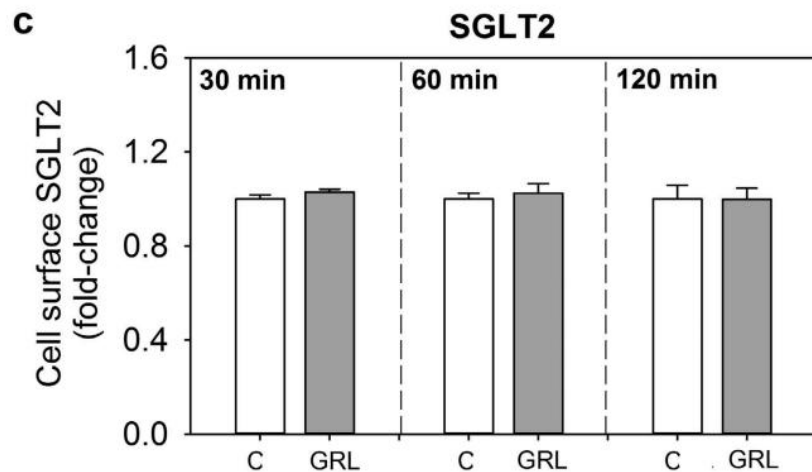


Figure 7. Levels of GLUT2 (a), SGLT1 (b) and SGLT2 (c) in the surface of goldfish intestinal cells treated with ghrelin (GRL) during 30, 60 and 120 min.

结论:

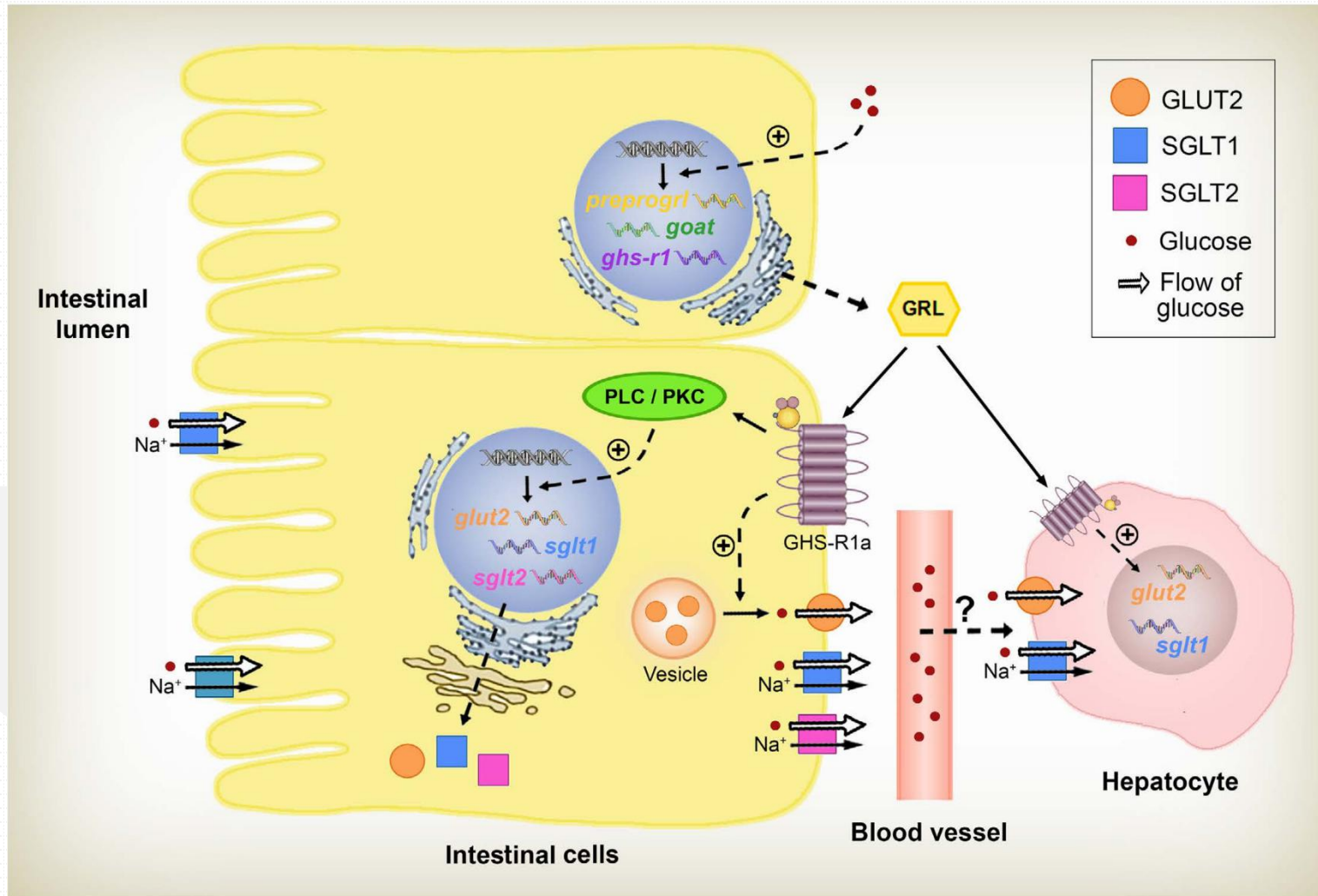


Figure 8. Schematic representation of the proposed ghrelinergic regulation of glucose transport machinery in the intestinal cells of goldfish.

结论:

- ◆ Ghrelin能够促进金鱼肠中的GLUT2、SGLT1、SGLT2介导的葡萄糖转运，在金鱼肠的葡萄糖转运中起到重要的作用，从而参与调节葡萄糖的稳态。
- ◆ 需要进一步研究Ghrelin对葡萄糖转运蛋白活性的影响，并确定Ghrelin是否也是其他关键器官中葡萄糖转运蛋白的调节剂。



04

PART FOUR

学习与收获

- ◆ 通过阅读这篇文献和查其他资料，学习了鱼类肠道结构，肠道中葡萄糖转运过程和 PLC/PKC、AC/PKA 的信号转导途径等的知识。
- ◆ 对免疫组化和免疫荧光的实验技术和原理，以及这两个技术有什么区别，有了一定的了解。
- ◆ 这篇文献从体内注射、体外器官、细胞培养三个层面设计实验，能够更全面更细致地论证作者的观点。并且对以后的实验可能也会有借鉴意义。
- ◆ 自己在糖代谢方面的知识仍然很少很少，还需要从各方面补充相关知识。尽快摆脱这种看啥啥不懂的时期。
- ◆ 针对自己看文献“坐不住”，“想不开”的问题，要提高信心，带着问题去看文献。



请各位老师同学 批评指正!

■ 汇报时间：2018年7月07日

■ 汇报人：赵文丽

