

Effects of Phloretin, Cytochalasin B, and D-Fructose on 2-deoxy-D-Glucose Transport of the Glucose Transport System Present in *Spodoptera frugiperda* Clone 21-AE Cells

Chong-Kee Lee[†]

Department of Immunology, School of Medicine Catholic University of Daegu, Daegu 705-718, Korea

The baculovirus expression system is a powerful method for producing large amounts of the human erythrocyte-type glucose transport protein, heterologously. Characterization of the expressed protein is expected to show its ability to transport sugars directly. To achieve this, it is a prerequisite to know the properties of the endogenous sugar transport system in *Spodoptera frugiperda* Clone 21 (Sf21) cells, which are commonly employed as a host permissive cell line to support the baculovirus replication. The Sf21 cells can grow well on TC-100 medium that contains 0.1% D-glucose as the major carbon source, strongly suggesting the presence of endogenous glucose transport system. However, unlike the human glucose transport protein that has a broad substrate and inhibitor specificity, very little is known about the nature of the endogenous sugar transport system in Sf21 cells. In order to characterize further the inhibitor recognition properties of the Sf21 cell transporter, the ability of phloretin, cytochalasin B and D-fructose to inhibit 2-deoxy-D-glucose (2dGlc) transport was examined by measuring inhibition constants (K_i). The K_i 's for reversible inhibitors were determined from plots of uptake versus inhibitor concentration. The 2dGlc transport in the Sf21 cells was very potently inhibited by phloretin, the aglucone of phlorizin with a K_i similar to the value of about 2 μ M reported for inhibition of glucose transport in human erythrocytes. However, the Sf21 cell transport system was found to differ from the human transport protein in being much less sensitive to inhibition by cytochalasin B (apparent K_i approximately 10 μ M). In contrast, It is reported that the inhibitor binds the human erythrocyte counterpart with a K_d of approximately 0.12 μ M. Interestingly, the Sf21 glucose transport system also appeared to have high affinity for D-fructose with a K_i of approximately 5 mM, contrasting the reported K_m of the human erythrocyte transport protein for the ketose of 1.5 M.

Key Words: Sf21 cells, 2dGlc transport, Hexose inhibition

서 론

세포막을 통한 다양한 분자들과 이온들의 선택적 수송은 살아있는 세포에 편재하는 특성 중 하나이다. 이러한 기능은 크게 세 가지 형태의 수송 체계 (transport system)에 의해 주도된다. 수동적 확산 (passive 또는 facilitated diffusion), 능동적 수송 (active transport), 동반 수송 (co-transport) 등이다. 이 중에서 수동적 확산 (facilitated diffusion system)은 거의 모든 포유동물 세포에서 일어나며, 특히 사람 적혈구의 포도당 (glucose) 수송 체계가 전형적인 일례이다. 반면에 당의 능동적 수송은 흡수적이며 재흡수성의 다세포성 진핵세포 (euk-

aryotes)의 상피세포에 특이적이며, 또한 효모와 원핵세포 (prokaryotes) 당수송의 일반적 특성이다 (Wheeler and Hinkle 1985; Stein, 1986; Henderson et al., 1992). 비록 당수송 체계의 복잡성은 수동에서 능동적 수송으로 갈수록 증가하지만, 수송의 근본 기전은 기질 결합 부위가 세포막의 바깥과 안쪽 면에 선택적으로 존재할 수 있게 해주는 수송 단백질에서 나타나는 형태적 변화 (conformational change)로 인한다는 alternating conformation model이 보편적으로 인정되고 있다 (Barnett et al., 1975; Gorga and Linehard, 1982; King et al., 1991) 아울러 최근 유전공학의 발달은 박테리아를 포함한 미생물과 포유동물의 세포막을 통한 당수송에는 염기서열의 상동성을 가진 일련의 단백질 (a family of homologous proteins)들이 관여하고 있음을 보여 주었다 (Mueckler et al., 1985; Baldwin and Henderson, 1989; James et al., 1989; Baldwin SA, 1993; Seatter and Gould, 1999; Joost and Thorens, 2001; Wood and Trayhurn, 2003). 또한 이러한 사실들은 당수송 단백질들이 공동의 조상으로부터 기원, 진화되었음을 암시하고 있어, 이

*논문 접수: 2006년 1월 27일

수정재접수: 2006년 2월 17일

[†]교신저자: 이종기 (우) 705-718, 대구광역시 남구 대명4동 3056-6, 대구가톨릭대학교 의과대학 면역학교실
Tel: 053-650-4477, Fax: 053-650-4477
e-mail: leeck@cu.ac.kr

들 중 어떤 수송체 단백질의 당수송 기전이나, 삼차원적 구조가 정확히 밝혀진다 하더라도 이는 당수송체 집단 모두에 관한 귀중한 연구 자료가 될 수 있으며 당뇨병 예방 및 치료를 위한 신약 개발에도 유용한 정보로 활용될 수 있을 것이다.

최근까지 인체 포도당의 세포내 영입에 관여하는 수동적 포도당 수송체 (passive glucose transport proteins)의 수는 7종 (GLUT 1-7)이 알려져 있다 (Wood and Trayhurn, 2003). 그중에서 적혈구형 수송체 (GLUT1)는 태반, 적혈구, 뇌의 미세혈관 (brain microvessels), 신장, 결장 (colon) 등을 포함하는 태아 조직들에서 가장 높은 수준으로 발현 된다 (Mueckler et al., 1985; Birnbaum et al., 1986; Flier et al., 1987; Fukumoto et al., 1988; Bell et al., 1993; Vannucci et al., 1997). 적혈구형 수송체의 삼차원적 구조 분석을 위해서는 단백질 결정화 (protein crystallization)와 같은 생물리학적 연구가 반드시 필요하며 또 구조와 기능의 상관관계를 위한 유전공학적 연구에도 비교적 많은 양의 단백질이 필요하다. 그러나 세포막내에 있는 이들 수송 단백질의 양은 이러한 형태의 연구를 위해서는 충분하지 않으며 또한 nucleoside transport 단백질과 같은 물질들로 오염되기 쉬워 (Jarvis and Young, 1981) 순수한 적혈구형 수송체만을 분리, 정제하기가 쉽지 않다. 이러한 까닭에 유전공학적 방법을 이용한 당수송체들의 대량 생산을 위한 노력들이 꾸준히 진행되고 있으며, 그 예로서 *E. coli* (Sarkar et al., 1988; Thorens et al., 1988), *Xenopus* oocytes (Gould and Lienhard, 1989; Keller et al., 1989), mammalian cells (Asano et al., 1989; Gould et al., 1989; Harrison et al., 1990), transgenic mice (Liu et al., 1992) 등을 이용한 이성질적 발현 노력들이 있었다. 그러나 이러한 노력에도 불구하고 당수송체와 같은 막 단백질 (membrane proteins)들이 갖는 특성으로 인해 단지, 소량의 기능성 있는 단백질 발현만을 보여주었을 뿐이다.

그럼에도 불구하고 최근 단백질의 이성질적 발현을 위해 개발된 여러 방법 중에서 baculovirus의 강력한 polyhedrin promoter를 이용한 baculovirus와 *Spodoptera* 세포를 이용한 사람 적혈구형 포도당 수송 단백질 발현 노력은 매우 고무적이었다 (Yi et al., 1992; Cope et al., 1994). 그러나 곤충세포에 발현된 적혈구형 당수송체가 포도당을 수송할 수 있다는 직접적인 증거를 보여 주지는 못하였다. 그 주된 원인은 baculovirus의 복제와 단백질 합성을 허용하는 숙주세포에 존재하는 당수송체의 왕성한 활동 때문이었다. 이러한 숙주세포의 일종으로 *Spodoptera frugiperda* clone 21 AE (Sf21)과 같은 세포가 이용되며, 세포 배양을 위해서는 TC-100과 같은 배양액을 사용하는데 이 배양액에는 0.1% D-glucose가 주 탄소 원료로 함유되어 있다 (Summers and Smith, 1987). 따라서 이와 같은 배지에서 Sf21 세포가 잘 자랄 수 있다는 사실은 Sf21 세포에도 포도당 수송체가 존재하고 있다는 사실을 암

시하고 있다. 그러나 포유동물의 당수송체들과는 달리 Sf21 세포에 존재하는 당수송체의 특성에 관해서는 별로 알려진 바가 없다 (Lee, 2005a; Lee, 2005b). 특히 사람 적혈구형 포도당 수송체의 기질에 관한 폭 넓은 특이성과 억제제에 관해서는 이미 잘 알려져 있으나 (LeFevre, 1961, Chen and Lo, 1988, King et al., 1991) Sf21 세포의 당수송체 기질과 억제제 특이성에 대해서는 거의 알려진 바가 없는 실정이다. 그러므로 사람 당수송체의 곤충세포에서의 효율적 발현을 위해서는 Sf21 세포를 포함하는 곤충세포들 당수송체 특성에 관한 보다 많은, 다양한 연구가 필요한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 사람 적혈구형 포도당 수송체의 강력한 억제제 알려진 phloretin과 cytochalasin B (LeFevre and Marshall, 1959; Zoccoli et al., 1978; Henderson et al., 1992) 등과 사람 적혈구형 포도당 수송체와는 affinity가 매우 낮은 것으로 알려진 과당 (D-fructose)을 이용하여 (LeFevre and Marshall, 1958) Sf21 세포의 2-deoxy-D-glucose transport에 대한 inhibition constants (K_i)를 측정함으로써 Sf21 세포의 억제제 인식 능력을 조사하였다.

재료 및 방법

1. Sf21 세포의 배양

Sf21 세포의 배양은 Summers와 Smith (1987)의 방법을 변형하여 배양하였다. Sf21 세포의 배양액으로는 TC-100 medium (Gibco)에 10% FCS, 1% 항생제 (penicillin 5,000 units/ml + streptomycin 5,000 µg/ml, Gibco-BRL)를 첨가하여 사용하였다. 세포 계대 배양은 monolayer 형식 시 이루어졌으며 주로 27~28°C에서 CO₂ 없이 배양하였다. 세포의 활성여부는 0.1 ml trypan blue (0.4% stock, pH 3.0)를 1 ml 세포에 첨가하여 현미경 아래서 관찰하여 이용하였다.

2. Sf21 세포의 membrane preparation

충분히 배양된 Sf21 세포로부터의 membrane 준비는 전에 알려진 방법을 이용하였다 (Lee, 2005a). 주로 배양 4~5일 후 수거하여 세 번을 세척액 (10 mM-sodium phosphate/150 mM-NaCl, pH 7.2)으로 씻은 후 protease inhibitors [(2 mM-iodoacetamide, 0.2 mM-phenylmethanesulphonyl fluoride, pepstatin A (10 µg/ml)]들을 함유하는 부양액 (10 mM-Tris/5 mM-MgCl₂, pH 7.4)으로 0°C에서, 1분간 sonication 하였다. 그 후에 1시간 동안 117,000 g_{av}로 원심 분리하여 soluble fraction 으로부터 membrane fraction을 분리하였다.

3. Sugar transport assay

D-glucose uptake를 측정하기 위한 transport assay는 전에 보고된 방법을 이용하였다 (Lee, 2005a). 간단히 요약하면,

Sf21 세포의 2-(1,2-³H)-deoxy-D-glucose (30.2 Ci/mmol, 2dGlc) uptake의 실제 측정에 앞서 Sf21 세포를 두 번 phosphate-buffered saline (PBS, 10 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.4)으로 곤충세포를 씻어, 배양액 속에 잔류된 포도당을 제거하고 필요할 때 까지 얼음에 보관하였다가 사용하였다. Transport는 1 ml의 세포 현탁액 (1×10⁶ cells/ml PBS)을 6,000 × g에서 15초 동안 원심 분리한 후에 세포를 150 μl의 PBS 용액에 다시 현탁 시킨 후 28°C에서 2분간 배양하였다. Transport는 최종 당 농도 1 mM 주기 위해 1 μCi tritiated sugar를 함유하는 2.5 mM 2dGlc 100 μl를 첨가하면서 시작되었고, 28°C에서 1분간 배양 후 얼음에 차게 한 1 ml stop solution을 첨가하고 2,000 × g에서 20초간 원심 분리하여 transport assay를 끝마쳤다. 세포들은 위와 같은 방법으로 두 번 더 세척한 후에 10% SDS 200 μl에 vortexing하여 용해하였다. 마지막으로 150 μl의 용해된 세포를 Microman pipette을 이용하여 4 ml의 scintillant 용액이 담긴 용기에 넣고 liquid scintillation counter (Beckman)를 이용하여 방사능을 측정하였다. 모든 결과들은 세 번 측정치의 (평균보다 10% 이하의 차이) 평균값으로 표시하였다.

결과 및 고찰

Sf21 세포의 2dGlc uptake 실험은 1분간 측정하였으며 그 이유는 전에 보고한 바대로 100 μM의 낮은 농도에서나 10 mM의 높은 extracellular 농도에서도 2dGlc의 Sf21 세포내

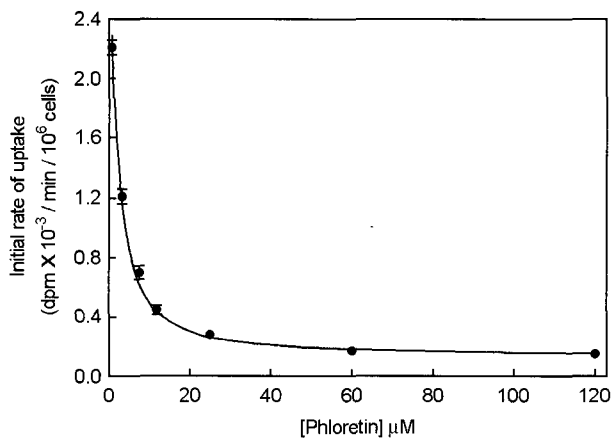


Fig. 1. Effect of phloretin on 2-deoxy-D-glucose transport in Sf21 cells. Transport assay was carried out essentially as described in *Materials and Methods*. Transport was initiated by the addition of 100 μl of PBS buffer containing [³H]2dGlc and an appropriate concentration of phloretin. After 1 min, the transport was terminated by addition of ice-cold stop solution. Cells were then solubilized and radioactivity was determined as described in *Materials and Methods*. The data were analyzed with the help of a non-linear regression program. The curve represents the best-fit of the data to equation (1). Each data point represents the mean of triplicates.

영입이 적어도 2분간은 linear 함을 보여주었기 때문이다 (Lee, 2005a). 따라서 1분간 측정된 2dGlc uptake 실험은 Sf21 세포의 육탄당 섭취의 진정한 initial rate를 반영할 수 있었다. 사람 적혈구형 포도당 수송체의 기질과 억제제 (inhibitor)에 대한 특성은 잘 알려져 있으나 (LeFevre, 1961) Sf21 세포에 내재하는 당수송체의 기질과 억제제의 특이성에 대해서는 별로 알려진 바가 없다. 그러므로 본 연구에서는 사람 적혈구형 포도당 수송체의 강력한 억제제인 phloretin과 cytochalasin B를 이용하여 이들 억제제가 Sf21 세포의 2dGlc transport에 미치는 영향을 inhibition constants (K_i)를 측정함

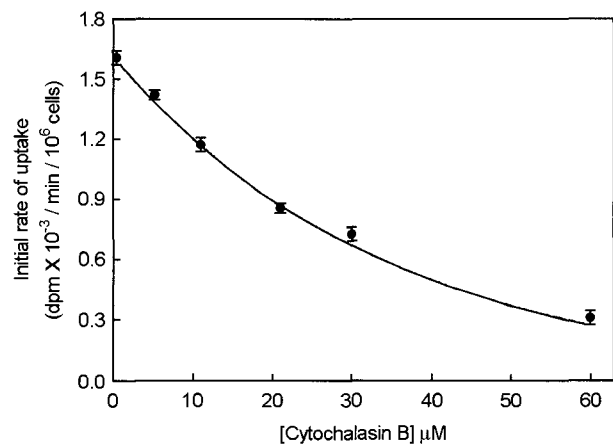


Fig. 2. Effect of cytochalasin B on 2-deoxy-D-glucose transport in Sf21 cells. Transport assay was carried out essentially as described in *Materials and Methods*. The ability of cytochalasin B to inhibit the uptake of 2dGlc was determined as described in the legend to Fig. 1. The curve represents the best fit of the data to equation (1). Each data point is the mean of triplicate estimations.

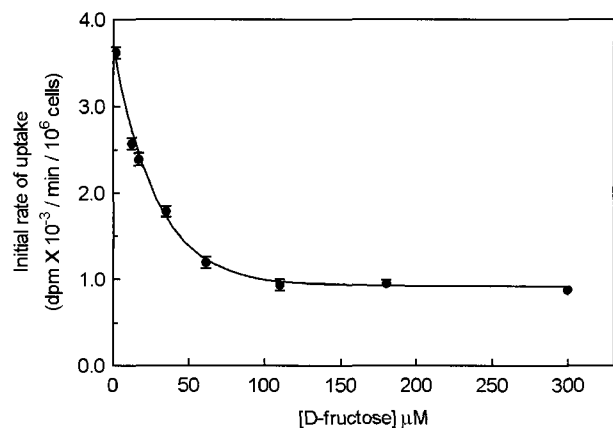


Fig. 3. Effect of D-fructose on 2-deoxy-D-glucose transport in Sf21 cells. Transport assay was carried out essentially as described in *Materials and Methods*. The ability of D-fructose to inhibit the uptake of 2dGlc was determined as described in the legend to Fig. 1. The curve represents the best fit of the data to equation (1). Each data point is the mean of triplicate estimations.

으로서 조사하였다 (Fig. 1 & 2).

Transport assay는 재료 및 방법에서 언급한대로 실행하였고 2dGlc uptake에 대한 경쟁적인 억제제의 효과는 다음 방정식에 의해 설명 되어질 수 있다.

$$V_i = \frac{V_{max} \cdot S}{K_m \cdot (1 + I/K_i) + S} + M \cdot S \quad (1)$$

V_i = inhibitor 존재 하에서 uptake 속도, V_{max} (the maximum velocity), S = 기질 농도, M = uptake process의 non-saturable component를 설명하는 상수, K_m (the half-saturation concentration), I = inhibitor 농도, K_i = inhibition 상수이며 transport에 대한 K_m 과 V_{max} 는 non-linear regression program을 사용하여 지난번 보고한 대로 평가하였다 (Lee, 2005a). 가역적 억제제 (reversible inhibitors)들의 K_i 는 uptake에 대한 억제제 농도의 plots에서 결정되었으며 Fig. 1과 Fig. 2는 각 억제제에 대한 데이터의 점들을 연결하는 방정식 (1)에 대한 최적의 그래프들이다. 이러한 접근 방법으로 시험해 보면 Sf21 세포에서의 2dGlc uptake는 phloretin에 의해 apparent K_i 가 $0.73 \pm 0.21 \mu\text{M}$ 로 매우 강력히 억제되었다 (Fig. 1). 이러한 수치는 사람 적혈구에서 포도당 수송 억제제 시 보고된 약 $2 \mu\text{M}$ 의 phloretin K_i 값과 비슷하였다 (LeFevre and Marshall, 1959). 반면에 Sf21 당수송체의 cytochalasin B에 대한 apparent affinity ($K_i = 9.5 \pm 3.2 \mu\text{M}$)는 diphenolic 복합물인 phloretin 보다는 억제 효능이 훨씬 낮았다 (Fig. 2). Cytochalasin B는 사람 적혈구형 당수송체에 K_d 약 $0.12 \mu\text{M}$ 로 결합하는 강력한 억제제이나 (Baldwin et al., 1982), Sf21 세포에서는 cytochalasin B에 의한 억제에 훨씬 덜 민감했다. 따라서 Sf21 세포 glucose transport system과 사람 적혈구형 당수송체의 cytochalasin B에 대한 친화성의 차이점은 Sf21 세포에 이성질적으로 발현될 사람 당수송체의 생물학적 활성을 측정하는데 매우 유용하게 활용될 수 있을 것이다. 최근 Sf21 세포 당수송체 연구에서 (Lee, 2003) Sf21 세포의 glucose transport system이 D-fructose에 대해 affinity가 있는 것으로 보고되었으나 Sf21 glucose transport system의 fructose에 대한 inhibition constant는 알려지지 않았으므로 D-fructose에 대한 K_i 도 본 연구에서 함께 조사하였다. 얻어진 apparent K_i 는 $4.17 \pm 0.8 \text{ mM}$ 이었다 (Fig. 3). 이는 전에 보고된 D-glucose에 대한 apparent K_i 와 (Lee, 2005b) 비교해 볼 때 단지 약 3배 정도 밖에는 차이가 나지 않는 affinity로 Sf21 세포의 glucose transport system은 D-fructose에 대해 매우 높은 affinity를 가지고 있음을 보여주고 있다. 이러한 사실로 볼 때 Sf21 세포 당수송체는 fructose를 실제 수송할 수도 있음을 암시하고 있다. 물론 Sf21 세포가 fructose를 수송한다는 직접적인 증거는 방사능 표지된 fructose를 사용한 실험을 통해서만 단정 지을 수 있

다. 참고로 사람 적혈구형 당수송체의 fructose에 대한 보고된 K_m 은 1.5 M 이다 (LeFevre and Marshall, 1958). 이러한 사실들을 고려해 보면 유전공학적으로 사람 적혈구형 당수송체를 Sf21 세포에 발현시킬 때 D-fructose는 Sf 세포에 내재하는 포도당 수송체의 활동을 차단할 수 있는 유용한 억제제로 사용될 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구의 수행에 도움이 된 영국 NERC의 연구지원에 감사드립니다.

REFERENCES

- Asano T, Shibasaki Y, Ohno S, Taira H, Lin JL, Kasuga M, Kanazawa Y, Akanuma Y, Takaku F, Oka Y. Rabbit brain glucose transporter responds to insulin when expressed in insulin-sensitive Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 1989. 264: 3416-3420.
- Baldwin SA. Mammalian passive glucose transporters: members of an ubiquitous family of active and passive transport proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1993. 1154: 17-49.
- Baldwin SA, Baldwin JM, Lienhard GE. Monosaccharide transporter of the human erythrocyte: Characterization of an improved preparation. *Biochemistry* 1982. 21: 3836-3842.
- Baldwin SA, Henderson PJF. Homologies between sugar transporters from eukaryotes and prokaryotes. *Annu Rev Physiol.* 1989. 51: 459-471.
- Barnett JEG, Holman GD, Chalkley RA, Munday KA. Evidence for two asymmetric conformational states in the human erythrocyte sugar-transport system. *Biochem J.* 1975. 145: 417-429.
- Bell GI, Burant CF, Takeda J, Gould GW. Structure and function of mammalian facilitative sugar transporters. *J Biol Chem.* 1993. 268: 19161-19164.
- Birnbaum MJ, Haspel HC, Rosen OM. Cloning and characterization of a cDNA encoding the rat brain glucose-transporter protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986. 83: 5784-5788.
- Chen SR, Lo TCY. Cytochalasin B as a probe for the two hexose-transport systems in rat L6 myoblasts. *Biochem J.* 1988. 251: 63-72.
- Cope DL, Holman GD, Baldwin SA, Wolstenholme AJ. Domain assembly of the GLUT1 glucose transporter. *Biochem J.* 1994. 300: 291-294.
- Flier J, Mueckler M, McCall A, Lodish HF. Distribution of glucose transporter messenger RNA transcripts in tissues of rat

- and man. *J Clin Invest.* 1987. 79: 657-661.
- Fukumoto H, Seino S, Imura H, Seino Y, Bell GI. Characterization and expression of human HepG2/erythrocyte glucose-transporter gene. *Diabetes* 1988. 37: 657-661.
- Gorga FR, Lienhard GE. Equilibria and kinetics of ligand binding to the human erythrocyte glucose transporter. Evidence for an alternating conformation model for transport. *Biochemistry* 1981. 20: 5108-5113.
- Gorga F, Lienhard GE. Changes in the intrinsic fluorescence of the human erythrocyte monosaccharide transporter upon ligand. *Biochemistry* 1982. 21: 1905-1908.
- Gould GW, Derechin V, James DE, Tordjiman K, Ahern S, Gibbs EM, Lienhard GE, Mueckler M. Insulin-stimulated translocation of the HepG2/erythrocyte-type glucose transporter expressed in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.* 1989. 264: 2180-2184.
- Gould GW, Lienhard GE. Expression of a functional glucose transporter in *Xenopus* oocytes. *Biochemistry* 1989. 28: 9447-9452.
- Harrison SA, Buxton JM, Clancy BM, Czech MP. Insulin regulation of hexose transport in mouse 3T3-L1 cells expressing the human HepG2 glucose transporter. *J Biol Chem.* 1990. 265: 20106-20116.
- Henderson PJF, Baldwin SA, Cairns MT, Charalambous BM, Dent HC, Gunn F, Liang WJ, Lucas VA, Martin GE, McDonald TP, McKeown BJ, Muir JAR, Petro KR, Roberts PE, Shatwell KP, Smith G, Tate CG. Sugar-cation symport systems in bacteria. *Int Rev Cytol.* 1992. 137A: 149-208.
- James DE, Strobe M, Mueckler M. Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter. *Nature* 1989. 338: 83-87.
- Jarvis SM, Young JD. Extraction and partial purification of the nucleoside-transport system from human erythrocytes based on the assay of nitrobenzylthioinosine-binding activity. *Biochem J.* 1981. 194: 331-339.
- Keller K, Strube M, Mueckler M. Functional expression of the human HepG2 and rat adipocyte glucose transporters in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem.* 1989. 32: 18884-18889.
- King APJ, Tai PKK, Carter-Su C. Cytochalasin B interferes with conformational changes of the human erythrocyte glucose transporter induced by internal and external sugar binding. *Biochemistry* 1991. 30: 11546-11553.
- Lée CK. The uptake of 2-deoxy-D-glucose by the endogenous sugar transporter(s) of *Spodoptera frugiperda* clone 21-AE cells and the inhibition of 2dGlc transport in the insect cells by fructose and cytochalasin B. *J Biomed Lab Sci.* 2003. 9: 177-181.
- Lee CK. Hexose Uptake and Kinetic Properties of the Endogenous Sugar Transporter(s) in *Spodoptera frugiperda* Clone 21-AE Cells. *J Exp Biomed Sci.* 2005a. 11: 327-332.
- Lee CK. A study on the inhibition of 2-deoxy-D-glucose transport of the endogenous glucose transporters in *Spodoptera frugiperda* Clone 21-AE Cells by using hexoses. *J Exp Biomed Sci.* 2005b. 11: 487-492.
- LeFevre PG. Sugar transport in the red blood cell: structure-activity relationships in substrates and antagonists. *Pharmacol Rev.* 1961. 13: 39-70.
- LeFevre PG, Marshall JK. Conformational specificity in a biological sugar transport system. *Am J Physiol.* 1958. 194: 222-337.
- LeFevre PG, Marshall JK. The attachment of phloretin and analogues to human erythrocyte in connection with inhibition of sugar transport. *J Biol Chem.* 1959. 234: 3022-3026.
- Liu ML, Olson AL, Moye-Rowley WS, Buse JB, Bell GI, Pessin JE. Expression and regulation of the human GLUT4/muscle-fat facilitative glucose transporter gene in transgenic mice. *J Biol Chem.* 1992. 267: 11673-11676.
- Mueckler M, Caruso C, Baldwin SA, Panico M, Blench I, Morris HR, Allard WJ, Lienhard GE, Lodish HF. Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* 1985. 229: 941-945.
- Sarker HK, Thorens B, Lodish HF, Kaback HR. Expression of the human erythrocyte glucose transporter in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988. 85: 5463-5467.
- Seatter MJ, Gould GW. The mammalian facilitative glucose transporter (GLUT) family. *Pharm Biotechnol.* 1999. 12: 201-28.
- Stein WD. Transport and diffusion across cell membranes. *New York Academy* 1986. pp. 231-305.
- Summers MD, Smith GE. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. *Tex Agric Exp Stn Bull.* 1987. No. 1555.
- Thorens B, Sarker HK, Kaback HR, Lodish HF. Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and β -pancreatic islet cells. *Cell* 1988. 55: 281-290.
- Vannucci SJ, Maher F, Simpson IA. Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia* 1997. 21: 2-21.
- Wheeler TJ, Hinkle PC. The glucose transporter of mammalian cells. *Annu Rev Physiol.* 1985. 47: 503-517.

Wood IS, Trayhurn P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): Expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr.* 2003. 89: 3-9.

Yi CK, Charalambous BM, Emery VC, Baldwin SA. Characterization of functional human erythrocyte-type glucose transporter expressed in insect cells using a recombinant baculo-

virus. *Biochem J.* 1992. 283: 643-646.

Zoccoli MA, Baldwin SA, Lienhard GE. The monosaccharide transport system of the human erythrocyte. Solubilization and characterization on the basis of cytochalasin B binding. *J Biol Chem.* 1978. 253: 6923-6930.