

# 植物多肽 PA1b 打开胰腺 $\beta$ 细胞 L 型钙通道 促使钙内流和细胞分泌

胡志涛<sup>①†</sup> 顿新鹏<sup>①†</sup> 张 铭<sup>①†</sup> 朱洪亮<sup>①</sup> 谢 丽<sup>①</sup> 吴政星<sup>①</sup>  
陈正望<sup>①\*</sup> 徐 涛<sup>①②\*</sup>

(<sup>①</sup>华中科技大学生命科学与技术学院 生物物理与生物化学研究所, 武汉 430074; <sup>②</sup>中国科学院生物物理研究所 生物大分子国家重点实验室, 北京 100101)

**摘要** 利用海藻酸在 pH2.7 的条件下对小分子多肽的吸附作用, 从豌豆种子中分离并纯化出含 37 个氨基酸的小分子肽 PA1b (pea albumin 1b), 它的肽链内具有 6 个半胱氨酸并形成一胱氨酸结构模体. 采用荧光显微技术和膜片钳技术, 发现胞外施加 PA1b 在胞外钙离子存在的条件下使胰腺 $\beta$ 细胞内钙离子浓度增加, 该效应被特异性的 L 型钙通道的阻断剂尼莫地平(nimodipine)阻断, 在零钙外液中 PA1b 对胞内钙离子浓度无影响; 此外, PA1b 使 $\beta$ 细胞膜去极化并使膜电容增加. 因此推断 PA1b 使原代 $\beta$ 细胞上去极化细胞膜, 使 L 型钙离子通道开放, 细胞外钙离子内流并促发细胞分泌.

**关键词** 植物多肽 PA1b 胰腺 $\beta$ 细胞 细胞内钙离子浓度 L 型钙离子通道 分泌

多肽作为一种小分子活性物质在任何生命活动过程中都起着非常重要的作用. 自从 1902 年发现第一个小分子多肽胰泌素, 紧接着 1922 年发现胰岛素以来, 多肽作为一种调节生命活动的信号分子已广泛被人们认可. 现在已经有很多多肽分子在临床上被使用, 并且对多种重大疾病产生了很好的治疗作用 [1,2]. 很多研究报道, 豆类种子的某些活性成分能够刺激胰岛素分泌并对糖尿病患者起到治疗作用 [3], 进一步分离并鉴定这些活性组分有可能发现新的调节胰岛素分泌和糖代谢的活性物质. 豆类胰岛素, 一种从豆类种子中分离出的含 37 个氨基酸的小分子多肽, 不仅发现其具有促进植物细胞生长和分化的功能, 还发现其作用机制与胰岛素信号通路类似 [3]. 因

此, 从豆类种子中分离并鉴定能作用于 $\beta$ 细胞的活性多肽是一个既有基础理论研究意义, 又有实际应用价值的工作. 采用生物物理和生物化学的方法, 我们从豌豆种子中分离纯化并鉴定出含 37 个氨基酸的植物小分子肽 PA1b, 它和从大豆种子中发现的大豆胰岛素(leginsulin)在一级结构上具有 67% 的同源性, 并且 6 个半胱氨酸的位置 C3-C20, C7-C22, C15-C32 高度保守. 肽链内的 6 个半胱氨酸形成一个胱氨酸结构模体, 胱氨酸结构模体的形成对保持它们的生理活性起着重要的作用 [4,5]. 更有趣的是, 来自动物的胰岛素能够与大豆胰岛素的受体(命名为 7S Bg, 分子量为 43 kD 的蛋白)相结合, 其结合机制与胰岛素和胰岛素受体的结合类似 [6].

收稿日期: 2006-09-02; 接受日期: 2006-11-23

国家自然科学基金(批准号: 30370674, 30470448, 30470646)、中国科学院知识创新工程项目(批准号: KSCX2-SW-224)和国家 863 计划项目(批准号: 2012AA214066)资助

† 并列第一作者

\* 联系人, E-mail: xutao@ibp.ac.cn, zwchen21@hotmail.com

采用荧光显微技术和膜片钳技术, 我们发现植物多肽 PA1b 能够打开 $\beta$ 细胞电压依赖的 L 型钙离子通道, 促使细胞外钙离子内流, 并促发细胞分泌。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料与多肽提取

1 kg 豌豆(*Pisum sativum* L)种子室温下浸泡 12 h 后, 在 25℃ 下发芽 60 h. 发芽后先用 2 L 的 0.5 mol/L 醋酸溶液(含 0.1% 巯基乙醇, 预冷至 4℃)匀浆, 匀浆后再加入 10 L 的 0.5 mol/L 醋酸溶液于 4℃ 搅拌提取 10 h, 提取液于 3405×g 离心 25 min 得上清液<sup>[2]</sup>. 上清液用 4 mol/L 盐酸调至 pH 2.7 后加海藻酸, 搅拌吸附, 收集海藻酸, 再用 0.2 mol/L 的盐酸洗脱被吸附的多肽, 洗脱液用无水乙酸钠调 pH 3.5, 加饱和的氯化钠(320 g/L)盐析, 抽滤收集盐析物。

### 1.2 凝胶过滤层析

Sephadex G25 (Pharmacia) 凝胶柱(100 cm×1.6 cm)用 0.2 mol/L 的醋酸平衡后, 取盐析所得的蛋白质溶于 0.2 mol/L 的醋酸溶液中(0.1 g/mL), 4℃ 下 3405 × g 离心 25 min, 取上清液上柱进行层析, 于 280 nm 检测波长下按峰收集。

### 1.3 丙酮提取

将按峰收集的层析液冷冻干燥后, 根据膜片钳测定的不同组分对 $\beta$ 细胞钙离子浓度和胰岛素分泌的影响来确定活性组分. 活性部分用 250 mL 80% 的丙酮溶解后于 4℃ 提取 12 h, 然后 10000×g 离心 25 min, 上清液用旋转蒸发器浓缩后冻干。

### 1.4 反向高效液相色谱仪纯化

冻干后的活性部分溶于 0.1% 三氟乙酸 (50 mg/mL)后, 用半制备反向高效液相色谱仪进行纯化 (Agilent 1100 System), TSK ODS-120T 柱 (7.8 mm×300 mm, 10  $\mu$ m). 上样后用线性乙腈 (含 0.1% 三氟乙酸) 梯度进行洗脱, 50 min 从 10% 升至 60%, 检测波长 214 nm, 流速 1.0 mL/min.

### 1.5 化学鉴定

用基质辅助激光解吸离子化时间飞行质谱仪 (MALDI-TOF-MS, Applied Biosystems) 测定分子量, 加速电压为 20000 V. 氨基酸序列用 Applied Biosys-

tems 477A 气相氨基酸测序仪进行测定。

### 1.6 细胞制备与培养

原代培养制备单个 $\beta$ 细胞的基本方法参见文献 [8]. 将 Wistar 大鼠的胰腺组织取出, 使用 V 型胶原酶 (Collagenase V) 使胰岛散开, 再用 Dispase II 消化出单个的 $\beta$ 细胞, 贴壁, 加入培养基, 在 5% CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱中培养, 实验中选择直径为 12~14  $\mu$ m 的细胞为实验对象。

### 1.7 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 显微荧光测量

将培养 2~4 天的细胞转至相应的细胞外液中, 加入酯化的钙荧光探针 Fura-2/AM 至终浓度 3  $\mu$ mol/L, 在 37℃ 下孵育 30 min. 用 Zeiss Axiovert 100 荧光显微镜上配置的 TILL 测量系统进行单细胞的全细胞钙离子浓度测量, 激发光波长为 340 nm 和 380 nm, fura-2 在这两个波长下受激所发射荧光的强度比值 F340/F380 可反映胞内钙浓度 ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) 的相对变化, 计算公式为:  $[Ca^{2+}]_i = K_{eff} \times (R - R_{min}) / (R_{max} - R)$ , 其中  $K_{eff}$ ,  $R_{max}$  和  $R_{min}$  均为校准后得到的参数<sup>[9,10]</sup>. 采样频率为 1 Hz, 实验在 (30 ± 2)℃ 下进行。

### 1.8 膜电容和膜电位测量

膜电容测量采用 EPC-9 膜片钳放大器和 PULSE + LOCK-IN 软件 (Heka Electronics Lambrecht Germany), 使用传统的全细胞膜片钳记录模式记录和分析在静息和灌流 PA1b 后 $\beta$ 细胞的膜电容变化. 实验中所使用的电极电阻值为 3~5 M $\Omega$ , 细胞钳制电位为 -70 mV, 给予频率为 1024 Hz 振幅为 20 mV 的正弦波以记录细胞膜电容的变化, 所采集到的信号用 2.9 kHz 滤波, 采样频率为 15.6 kHz. 膜电位的测量采用全细胞穿孔电流钳记录模式. 采集到的信号用 2.9 kHz 滤波, 采样频率为 15.6 kHz. 膜电容和膜电位的数据用 IGOR Pro 5.03 (WaveMetrics, Lake Oswego, OR) 分析。

### 1.9 溶液配置

标准细胞外液含有: NaCl 150 mmol/L, KCl 2.8 mmol/L, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 2 mmol/L, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 2.5 mmol/L, Glucose 3 mmol/L, HEPES 10 mmol/L. 标准无钙外液则在标准细胞外液的基础上去除 CaCl<sub>2</sub>, 加入 1 mmol/L EGTA. 2 种外液的 pH=7.4 (用 NaOH 调节), 渗透压为 310 mOsm. 测量膜电位的电极内液成

分包括:  $K_2SO_4$  82 mmol/L, NaCl 10 mmol/L, KCl 10 mmol/L,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  1 mmol/L, HEPES 10 mmol/L (pH 7.4, 用 KOH 调节, 渗透压为 300 mOsm), 穿孔电流钳记录实验之前在内液中加入 100  $\mu\text{g/mL}$  的制霉菌素. 胎牛血清, BSA, DMEM 为 Gibco 产品; Fura-2/AM 为 Molecular Probe 公司产品, 其他常用试剂均为 Sigma 公司产品.

### 1.10 数据统计分析

电生理数据均采用 IGOR Pro 5.03 软件分析. 最终结果用平均值 $\pm$ 标准误差的形式表示. 数据差异的显著性检验采用 SigmaStat 3.11 (Systat Software, Inc, Canal Blvd, Suite C Richmond, CA, USA) 软件分析, 根据数据的分布使用 Student's *t* test (正态分布数据) 或者 Mann-Whitney Rank Sum test (非正态分布) 进行检验.  $P < 0.01$  表示有极显著性差异.

## 2 结果

### 2.1 肽的制备

1 kg 豌豆种子进行提取和洗脱后可获得 40 g 盐析物. 盐析物溶于 400 mL 0.2 mol/L 醋酸并离心, 上清液经凝胶过滤层析可获得 2 个完全分离的层析峰 (图 1(a)). 冻干后经活性检测发现峰 2 (9.8 g) 具有明显的活性. 将峰 2 用丙酮提取并冻干得 5 g 蛋白质干粉, 最后经半制备反向高效液相色谱仪进行纯化后共收集到 50 mg 活性多肽, 半制备层析见图 1(b).

### 2.2 肽的鉴定

经质谱仪进行分子量测定表明, 纯化出的多肽分子量为 3742.3 Da (图 1(c)), 命名为 PA1b. 氨基酸序列测定表明, 纯化出的多肽为含 37 个氨基酸残基, 其一级结构为 ASCNG VCSPF EMPPC GSSAC RCI PV GLVVG YCRHP SG. 经计算理论分子量为 3743.4 Da, 这和质谱测定结果相符. 经比对表明 PA1b 和从大豆种子中发现的大豆胰岛素在一级结构具有 67% 的同源性, 并且 6 个半胱氨酸的位置高度保守 [5].

### 2.3 植物多肽 PA1b 通过打开 L 型钙通道引起细胞内钙升高

图 2(a) 给出了细胞外灌流不同浓度的 PA1b 所引起的细胞内钙离子浓度升高 ( $\Delta[Ca^{2+}]_i$ ) 的浓度依赖曲

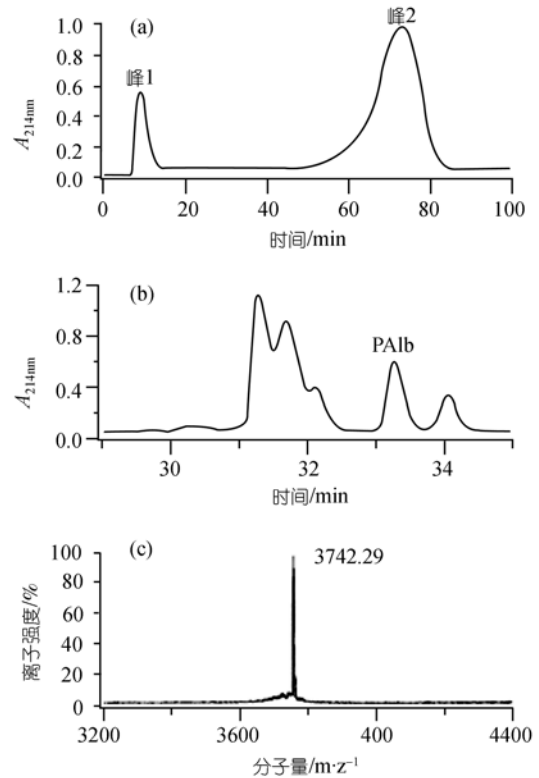


图 1 PA1b 的纯化和鉴定

(a) Sephadex G25 凝胶过滤层析, 峰 2 含活性成分. (b) 高效液相色谱纯化 PA1b, PA1b 对应的峰被标记. (c) 质谱测定 PA1b 的分子量, 10 mg/mL 基质 ( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid) 溶于 70% 的乙腈 (含 0.1% 三氟乙酸) 后, 再将 PA1b 溶于其中进行测定

线. 由图可知, PA1b 对  $\beta$  细胞作用的半效浓度值 ( $EC_{50}$ ) 约为 80 nmol/L, 最大效果时的浓度为 1  $\mu\text{mol/L}$ , 后续的实验均采用 1  $\mu\text{mol/L}$  的浓度. 图 2(b) 给出了对单个胰腺  $\beta$  细胞灌流 1  $\mu\text{mol/L}$  的 PA1b 时细胞内钙离子的变化结果. 可以明显看出 PA1b 的刺激明显增加了细胞内钙离子浓度, 停止加药, 换用正常外液洗脱, 则胞内钙离子浓度又可以较好地恢复到基线水平. 为了和胰岛素的效果进行对比, 我们换用 100 nmol/L 胰岛素进行灌流, 发现胞内钙离子出现瞬间快速地上升, 这和已报道的结果一致 [2,11]. 统计结果显示灌流 PA1b 前后细胞内钙离子浓度从  $(137.6 \pm 8.9)$  nmol/L 升高至  $(467.9 \pm 38.4)$  nmol/L, 差值为  $(330.3 \pm 26.9)$  nmol/L ( $P < 0.001$ ,  $n = 18$ ).

引起细胞内钙离子浓度升高的因素一般包括胞外钙离子的内流和胞内钙库的释放. 为了探明 PA1b 的作用方式, 我们首先将正常外液灌流换做零钙外液, 同时 PA1b 母液也用零钙外液稀释使用. 图 3 的结果显示在没有细胞外钙离子的情况下 PA1b 不能引

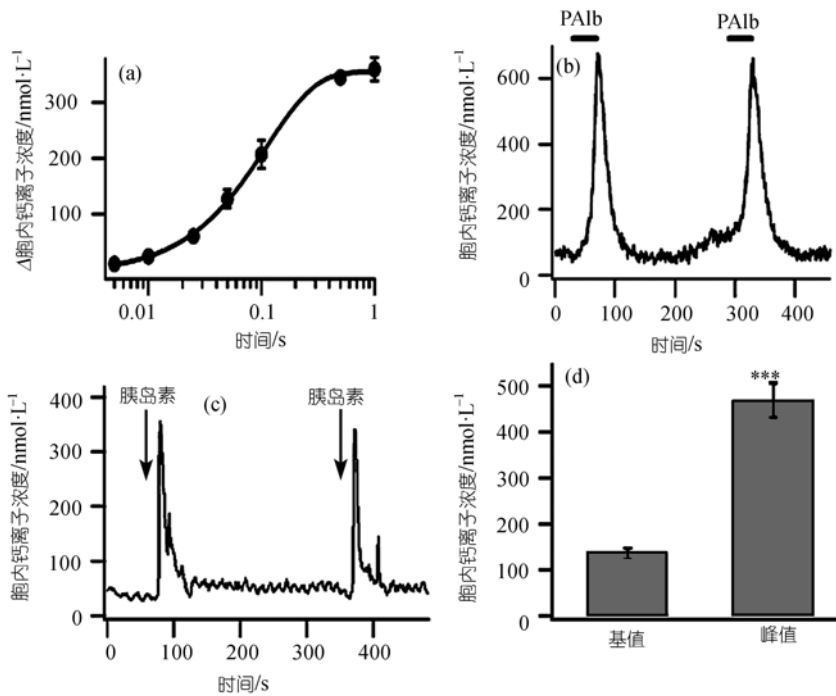


图 2 PA1b 引起胰腺β细胞胞内钙离子浓度升高

(a) 不同浓度的 PA1b 引起胞内钙离子浓度升高的浓度依赖曲线, 每个数据点都是 5~10 个细胞的测量平均值。PA1b 的最大效果浓度为 1 μmol/L。 (b) PA1b 引起单个β细胞胞内钙离子浓度升高。 (c) 100 nmol/L 胰岛素引起的单个β细胞胞内钙离子浓度升高。 (d) 1 μmol/L PA1b 引起的胞内钙离子浓度变化的平均统计分析。\*\*\*示  $P < 0.001$

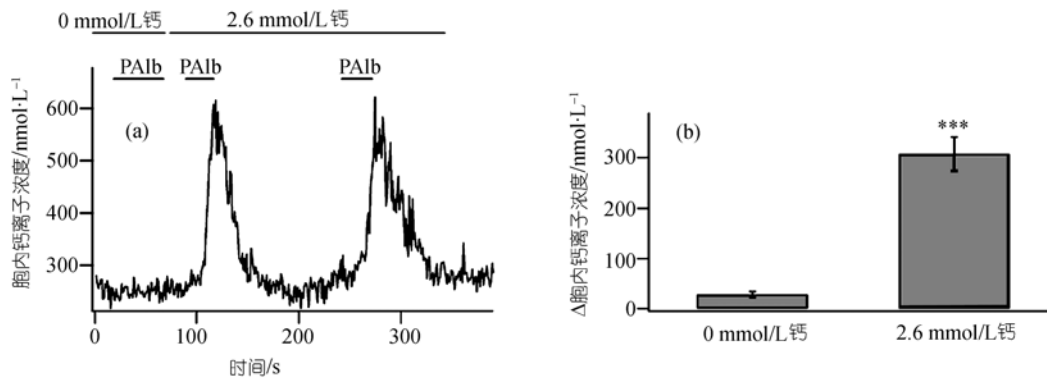


图 3 零钙外液环境中 PA1b 不能引起明显的钙离子浓度升高

(a) 零钙条件下, 灌流 PA1b, 胞内钙离子浓度没有任何变化, 继而置换成正常外液, PA1b 立刻引起胞内钙离子浓度的升高。 (b) 零钙和有钙离子条件下 PA1b 的效果对比分析。\*\*\*示  $P < 0.001$

起胞内钙离子浓度的升高(钙离子浓度的变化值为  $(28.4 \pm 5.7)$  nmol/L,  $n = 13$ ), 但是当把零钙外液置换为正常有钙离子外液的时候, PA1b 又可以马上引起胞内钙离子浓度升高(变化值为  $(307.3 \pm 37.0)$  nmol/L,  $n = 13$ ,  $P < 0.001$ )。我们的结果表明植物多肽 PA1b 引起的胞内钙离子浓度升高主要是细胞外钙离子内流所造成, 而并不是通过胞内钙库的释放这一途径促发的。

胞外钙离子内流的介导有很多种途径, 包括电

压门控的钙离子通道、非选择性的阳离子通道等等<sup>[12]</sup>。为了进一步研究 PA1b 引起的钙离子内流是通过何种途径进入到细胞内, 我们使用了一种 L 型钙离子通道的特异性阻断剂, 尼莫地平(nimodipine), 来看它对 PA1b 所引起的钙离子升高的影响。如图 4 所示, 10 μmol/L 的尼莫地平可以很显著地抑制 PA1b 所引起的钙离子升高, 当把尼莫地平用外液洗脱掉以后, PA1b 又可以明显地促发胞内钙离子的升高(由  $(40.7 \pm 18.3)$  nmol/L 升高至  $(511.7 \pm 118.6)$  nmol/L,  $n = 6$ ,  $P <$



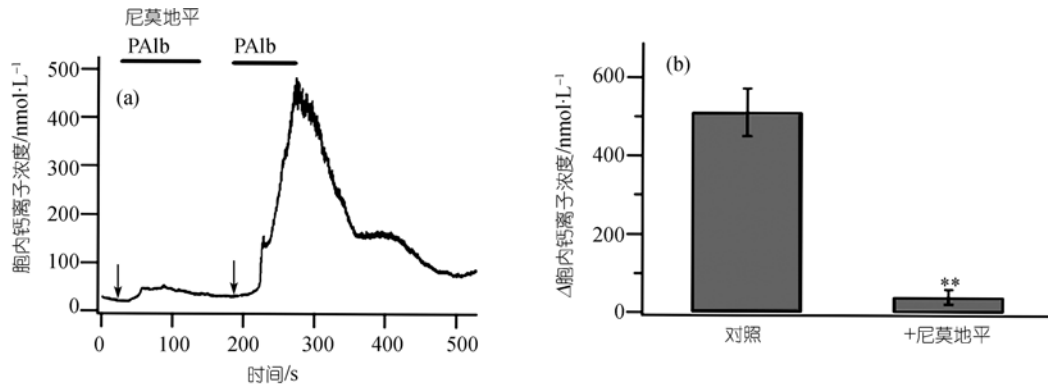


图4 L型钙通道特异性阻断剂尼莫地平抑制了PA1b的作用

(a) 在正常灌流  $1 \mu\text{mol/L}$  PA1b 的同时灌流  $10 \mu\text{mol/L}$  尼莫地平, 胞内钙离子浓度没有任何变化. 正常外液洗脱尼莫地平, 再单独灌流 PA1b, 则 PA1b 的效果又可以恢复. (b) 尼莫地平存在和洗脱两种情况下, PA1b 引起钙离子浓度升高的对比统计分析. \*\*示  $P < 0.001$

0.01). 这证明了多肽 PA1b 引起的胞外钙离子内流主要是通过 L 型钙离子通道来介导的, 而胞内钙离子库在这个过程中几乎不起任何作用.

#### 2.4 多肽 PA1b 使细胞膜去极化并且促发胰腺 $\beta$ 细胞分泌

上面的结果给我们启发, PA1b 是不是可以使细胞膜去极化进而造成电压依赖的 L 型钙离子通道开放. 为了验证该设想, 我们采用穿孔膜片钳的方法, 在全细胞电流钳的记录模式下, 测量 PA1b 对膜电位的影响. 首先在正常情况下测到的胰腺  $\beta$  细胞的静息膜电位是  $(-71 \pm 8.8) \text{ mV}$ , 与已经报道的结果相一致 [13]. 当灌流 PA1b 的时候可以明显发现细胞膜被去极化, 去极化后的膜电位平均值为  $(-9 \pm 1.5) \text{ mV}$  ( $n = 11, P < 0.01$ ), 如图 5(a) 所示.

为进一步验证 PA1b 是否会对  $\beta$  细胞的分泌活动产生影响, 我们采用传统的全细胞膜电容测量方法测量细胞的膜电容 ( $C_m$ ) 变化, 必用该指标来反映细胞分泌的变化情况. 细胞膜电容与细胞的膜表面积成正比, 囊泡分泌时囊泡膜与质膜融合, 细胞膜表面积变大. 所以可以用膜电容的变化来反应细胞的分泌变化情况 [14]. 对单个  $\beta$  细胞灌流  $1 \mu\text{mol/L}$  的 PA1b, 可以发现细胞膜电容会有显著的增加, 平均增加值为  $(412 \pm 37.4) \text{ fF}$  ( $n = 6, P < 0.001$ ), 如图 5(c) 所示. 对应的其他参量, 包括膜电导 ( $G_m$ ) 和串联电导 ( $G_s$ ) 并没有明显的变化.

### 3 讨论

使用生物物理与生物化学方法, 我们从豌豆种子中分离纯化并鉴定出含 37 个氨基酸的植物小分子

肽 PA1b, 它和从大豆种子中发现的大豆胰岛素在一级结构具有 67% 的同源性, 并且 6 个半胱氨酸的位置高度保守 [5]. 肽链内的 6 个半胱氨酸形成一个胱氨酸结构模体, 胱氨酸结构模体的形成对保持它们的生理活性起着重要的作用 [15]. 大豆胰岛素是一个从大豆种子胚根中分离出的含 37 个氨基酸的小分子多肽, 具有促进植物细胞生长和分化的功能 [16]. 它能与位于细胞壁的中层或原生质膜附近的受体 7S Bg 蛋白结合, 并向胞内传递调节信号 [11,17,18]. 研究表明, 大豆胰岛素和 7S Bg 蛋白的结合能显著提高 7S Bg 蛋白的蛋白激酶活性, 且 7S Bg 蛋白酪氨酸激酶活性大致相当于大鼠胰岛素受体的  $2/3$  [16]. 更有趣的是, 7S Bg 蛋白与动物胰岛素或胰岛素样生长因子 IGF- I 和 IGF- II 都具有较高的结合活性 [4,16], 这表明 Bg 蛋白和大豆胰岛素在植物体内发挥着类似胰岛素信号通路样的生理功能, 对植物生长发育起调控作用.

我们的实验证明从大豆中提取的植物多肽 PA1b 能够明显地引起大鼠胰腺  $\beta$  细胞胞内钙离子浓度的升高, 和胰岛素所引起的效果相似 (图 2(b), (c)). 有报道证明胰岛素引起的胞内钙离子浓度升高主要是通过胞内钙库释放的方式实现 [2,11]. 然而我们发现 PA1b 主要是细胞外钙离子通过 L 型钙离子通道的内流实现的, 这和胰岛素促发胞内钙离子浓度升高的机制是不同的. 这个结果说明 PA1b 和胰岛素在胰腺  $\beta$  细胞通过激活不同的信号通路实现胞内钙离子浓度的升高. 胰岛素受体介导的信号传导是一个复杂的过程, 包括蛋白激酶作用和自磷酸化作用.  $\beta$  细胞中胰岛素分泌的调节作用可能有很多通路介导 [19-21]. Roper 等人曾经报道胰岛素类似物 L-783, L-281 激活

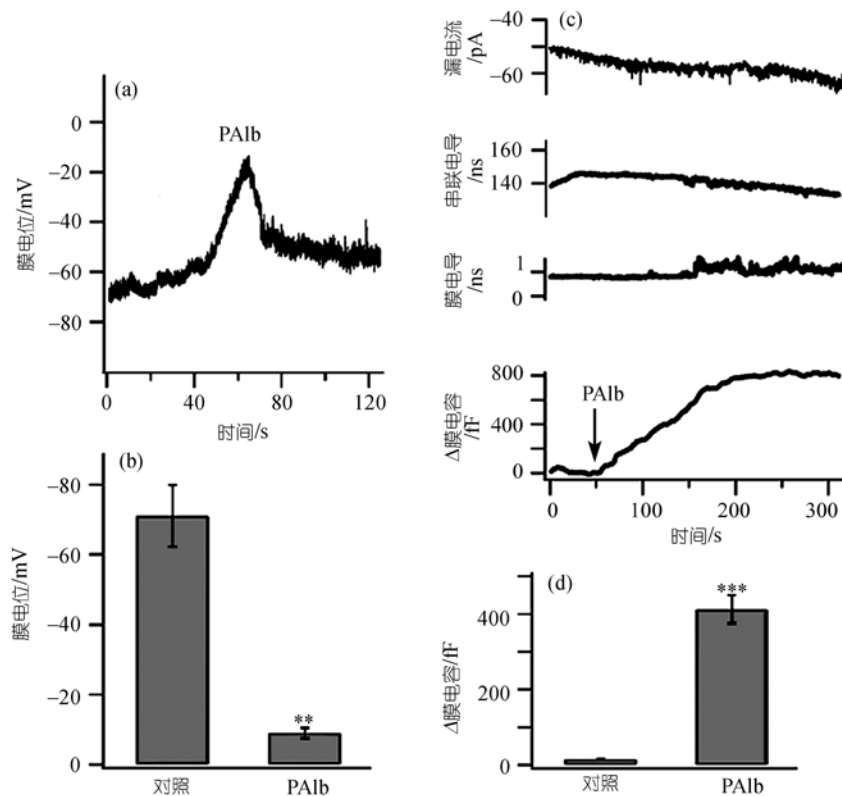


图5 PA1b 去极化细胞膜并促发分泌

(a) 灌流 PA1b 使得  $\beta$  细胞膜电位从正常膜电位 ( $-71 \pm 8.8$ ) mV 去极化至 ( $-9 \pm 1.5$ ) mV; (b) 膜电位变化的统计分析; (c) 施加 PA1b 促发细胞分泌, 膜电容增加, 其他参量包括漏电流、串联电阻和膜电导均没有明显变化; (d) 膜电容变化统计分析. \*\*示  $P < 0.01$ , \*\*\*示  $P < 0.001$

IRS-1/PI<sub>3</sub>-K 通路, 动员胞内钙库释放, 使得胞内钙离子浓度升高并且进一步促发分泌, 其中只有一部分能够被尼莫地平阻断 [22]. 在本研究中, 我们发现 PA1b 在零钙的环境中完全不能引起钙离子浓度升高, 并且有钙离子时的效果几乎可以被尼莫地平完全阻断掉. 进一步的实验发现 PA1b 可以明显地使胞膜去极化细和触发细胞分泌, 所以 PA1b 的作用模式可能为引起细胞膜去极化, L 型钙离子通道打开, 细胞外钙离子内流, 进而触发分泌. 这种方式和胰岛素调节的钙离子的自稳平衡和诱导的胰岛素分泌应该是两种不同的机制.

有报道认为缺乏胰岛素受体的大鼠  $\beta$  细胞对葡萄糖刺激引起胰岛素释放的敏感程度明显降低, 葡萄糖的耐受性也受到影响 [23]. 胰岛素受体在胰岛素分泌过程中起着重要的调节作用, 这也对胰岛素分泌受损和 II 型糖尿病的胰岛素抵抗之间的关联提供了潜在的证据. 值得注意的是, 大豆胰岛素这种植物多肽能够和胰岛素竞争结合同样的受体, 这种受体类似于植物蛋白 Bg [4,5]. PA1b 可以显著地增加胞内钙

浓度并且促发  $\beta$  细胞分泌的发生, 但是 PA1b 是否也能够竞争性的结合胰岛素受体还不为人所知, 这也是我们需要进一步研究的内容.

致谢 感谢许想平老师制备原代胰腺  $\beta$  细胞.

## 参 考 文 献

- 1 Aspinwall C A, Lakey J R, Kennedy R T. Insulin-stimulated insulin secretion in single pancreatic  $\beta$  cells. *J Biol Chem*, 1999, 274(10): 6360—6365 [DOI]
- 2 Aspinwall C A, Qian W J, Roper M G, et al. Roles of insulin receptor substrate-1, phosphatidylinositol 3-kinase, and release of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores in insulin-stimulated insulin secretion in  $\beta$ -cells. *J Biol Chem*, 2000, 275(29): 22331—22338 [DOI]
- 3 Lee S H, Park I S. Effects of soybean diet on the  $\beta$  cells in the streptozotocin treated rats for induction of diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*, 2000, 47(1): 1—13 [DOI]
- 4 Komatsu S, Hirano H. Plant basic 7 S globulin-like proteins have insulin and insulin-like growth factor binding activity. *FEBS Lett*, 1991, 294(3): 210—212 [DOI]
- 5 Watanabe Y, Barbashov S F, Komatsu S, et al. A peptide that stimulates phosphorylation of the plant insulin-binding protein. Isolation, primary structure and cDNA cloning. *Eur J Biochem*, 1994, 224(1): 167—172 [DOI]

- 6 Oliver S G. From DNA sequence to biological function. *Nature*, 1996, 379(6566): 597—600[DOI]
- 7 Chen Z W, Agerberth B, Gell K, et al. Isolation and characterization of porcine diazepam-binding inhibitor, a polypeptide not only of cerebral occurrence but also common in intestinal tissues and with effects on regulation of insulin release. *Eur J Biochem*, 1988, 174(2): 239—245[DOI]
- 8 Lou X L, Yu X, Chen X K, et al. Na<sup>+</sup> channel inactivation: a comparative study between pancreatic islet  $\beta$ -cells and adrenal chromaffin cells in rat. *J Physiol*, 2003, 548(Pt 1): 191—202[DOI]
- 9 Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien R Y. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, 1985, 260(6): 3440—3450
- 10 Xu T, Naraghi M, Kang H, et al. Kinetic studies of Ca<sup>2+</sup> binding and Ca<sup>2+</sup> clearance in the cytosol of adrenal chromaffin cells. *Biophys J*, 1997, 73(1): 532—545
- 11 Garcia M C, Hermans M P, Henquin J C. Glucose-, calcium- and concentration-dependence of acetylcholine stimulation of insulin release and ionic fluxes in mouse islets. *Biochem J*, 1988, 254(1): 211—218
- 12 Bezprozvanny I, Tsien R W. Voltage-dependent blockade of diverse types of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels expressed in *Xenopus* oocytes by the Ca<sup>2+</sup> channel antagonist mibefradil (Ro 40-5967). *Mol Pharmacol*, 1995, 48(3): 540—549
- 13 Rustenbeck I, Leupolt L, Kowalewski R, et al. Heterogeneous characteristics of imidazoline-induced insulin secretion. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1999, 359(3): 235—242[DOI]
- 14 Neher E, Marty A. Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79(21): 6712—6716[DOI]
- 15 Norton R S, Pallaghy P K. The cystine knot structure of ion channel toxins and related polypeptides. *Toxicon*, 1998, 36(11): 1573—1583[DOI]
- 16 Yamazaki T, Takaoka M, Katoh E, et al. A possible physiological function and the tertiary structure of a 4-kDa peptide in legumes. *Eur J Biochem*, 2003, 270(6): 1269—1276[DOI]
- 17 Hanada K, Nishiuchi Y, Hirano H. Amino acid residues on the surface of soybean 4-kDa peptide involved in the interaction with its binding protein. *Eur J Biochem*, 2003, 270(12): 2583—2592[DOI]
- 18 Hanada K, Hirano H. Interaction of a 43-kDa receptor-like protein with a 4-kDa hormone-like peptide in soybean. *Biochemistry*, 2004, 43(38): 12105—12112[DOI]
- 19 Chasserot-Golaz S, Hubert P, Thierse D, et al. Possible involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in regulated exocytosis: studies in chromaffin cells with inhibitor LY294002. *J Neurochem*, 1998, 70(6): 2347—2356
- 20 De Camilli P, Emr S D, McPherson P S, et al. Phosphoinositides as regulators in membrane traffic. *Science*, 1996, 271(5255): 1533—1539[DOI]
- 21 Schiavo G, Gu Q M, Prestwich G D, et al. Calcium-dependent switching of the specificity of phosphoinositide binding to synaptotagmin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(23): 13327—13332[DOI]
- 22 Roper M G, Qian W J, Zhang B B, et al. Effect of the insulin mimetic L-783,281 on intracellular Ca<sup>2+</sup> and insulin secretion from pancreatic  $\beta$ -cells. *Diabetes*, 2002, 51(Suppl 1): S43—49[DOI]
- 23 Kulkarni R N, Bruning J C, Winnay J N, et al. Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic  $\beta$  cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell*, 1999, 96(3): 329—339[DOI]