

磷脂酰肌醇-3 激酶不直接调控 PC12 细胞的分泌*

刘媛媛** 赵平** 吴政星 瞿安连 徐涛***

(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)

摘要 磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3K)是磷脂酰肌醇代谢过程中一种重要的酶, 通过其代谢产物参与了对多种细胞生理活动的调节, 如囊泡运输、细胞骨架重组、细胞存活、吞噬作用、细胞凋亡等. 为研究其对细胞分泌功能的作用, 使用磷脂酰肌醇-3 激酶家族的特异性抑制剂渥曼青霉素(wortmannin)阻断磷脂酰肌醇-3 激酶的活性, 以 EGFP-2xFYVE 融合蛋白与磷脂酰肌醇-3-磷酸(PtdIns-3-P)的结合为指征, 使用荧光显微成像技术检测渥曼青霉素对磷脂酰肌醇-3 激酶的抑制作用, 采用膜片钳膜电容测量方法及光解钙离子释放技术检测渥曼青霉素对 PC12 细胞分泌功能的影响. 实验结果表明, wortmannin 阻断了磷脂酰肌醇-3 激酶的活性, 抑制了磷脂酰肌醇-3-磷酸(PtdIns-3-P)的产生, 并使 FYVE 与 PtdIns-3-P 解离, 但渥曼青霉素处理之前和处理 30 min 后的 PC12 细胞分泌反应的幅度、动力学特性和分泌的钙依赖性均无显著差异, 表明磷脂酰肌醇-3 激酶对 PC12 细胞的分泌无显著的直接影响.

关键词 磷酸酰肌醇-3 激酶, 渥曼青霉素, PC12 细胞, 分泌动力学, 钙依赖性, 钙离子光解释放技术, EGFP-2xFYVE 融合蛋白

学科分类号 Q27

神经元和内分泌细胞主要通过严格调控的囊泡胞吐完成神经递质和激素的释放^[1]. 在囊泡与细胞质膜融合以前, 必须经历一系列成熟(maturation)过程, 包括囊泡的募集(recruitment)、拴系(tethering)、锚定(docking)和激活(priming)等^[2]. 当受到分泌信号的触发后, 囊泡膜与细胞膜融合, 其内含物通过融合孔释放至细胞外. 其后, 通过细胞的胞吞活动, 囊泡被内吞并加以重新利用, 整个过程为囊泡的循环. 尽管对囊泡胞吐的分子机制和调控过程已有较广泛和深入的研究, 但仍有许多重要细节和调节过程不清楚. 囊泡胞吐是细胞物质跨膜转运的重要途径之一, 是神经元的神经递质释放、内分泌和外分泌细胞分泌活动等细胞生理功能的基础. 免疫防卫反应、卵细胞的受精过程、细胞的生长、细胞内外物质的交换、细胞膜蛋白的嵌入和循环等细胞生理活动都有囊泡胞吐和胞吞活动的参与. 细胞分泌活动的分子机制和调控的研究对于揭示神经信号传递、学习与记忆、细胞分泌活动、免疫细胞脱颗粒、细胞的生长和膜上功能蛋白的嵌入等重要生命过程有着极其重要的理论意义^[3].

渥曼青霉素(wortmannin)是磷脂酰肌醇-3 激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)家族的抑制剂, 非

常低的浓度(100 nmol/L)即能完全抑制磷脂酰肌醇-3 激酶的作用^[4]. 磷脂酰肌醇-3 激酶能使磷脂酰肌醇(phosphoinositide, PtdIns)的第三位羟基磷酸化, 从而生成一系列脂类信号分子如磷脂酰肌醇-3-磷酸(PtdIns-3-P)、磷脂酰肌醇-3,4-二磷酸(PtdIns-3,4-P₂)和磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸(PtdIns-3,4,5-P₃)等. 磷脂酰肌醇多磷酸(如 PtdIns-3,4-P₂、PtdIns-3,4,5-P₃)代谢产物分子在体外呈钙离子浓度依赖性地与囊泡分泌的钙感受器分子 synaptotagmin 结合^[5], PtdIns-3,4-P₂ 引导和加速 synaptotagmin 与细胞膜结合并插入细胞膜^[6], 破坏 synaptotagmin 的插膜活性而抑制 PC12 细胞中钙离子触发的分泌^[7]. 磷脂酰肌醇-3 激酶除了通过其代谢产物参与囊泡的胞吐过程外, 也可能通过与其他蛋白质的相互作用影响可释放囊泡的补充^[8]. 磷脂酰肌醇-3 激酶及其代谢产物是否调节囊泡的胞吐过程, 起何种作用及如何作

*国家自然科学基金资助项目(30470448, 30130230, 30270363).

** 共同第一作者. *** 通讯联系人.

Tel/Fax: 027-87792024

E-mail: txu@mail.hust.edu.cn

收稿日期: 2005-03-11, 接受日期: 2005-04-30

用, 目前还不清楚. 我们采用膜片钳膜电容测量方法及光解钙离子释放技术, 检测了磷脂酰肌醇-3激酶对 PC12 细胞分泌动力学和分泌钙依赖性的影响.

1 材料与方法

1.1 材料

Wortmannin 从 ALEXIS 购得, 用 DMSO (Gibco) 配成 2.5 mmol/L 母液, -80°C 冻存. 使用前用正常细胞外液稀释至所需浓度, -20°C 保存. 质粒 pEGFP-N1-2xFYVE 由澳大利亚 Queensland 大学 Meunier 教授馈赠.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与转染. PC12 细胞 (嗜铬细胞细胞系) 从 ATCC 购得, 培养基为 85% DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco)、10% 马血清 (horse serum, Gibco) 和 5% 胎牛血清 (fetal bovine serum, Gibco), 细胞在 37°C 5% CO_2 培养箱中培养. 用于实验的细胞贴附到用 poly-L-lysine 涂敷处理过的载玻片上. 实验中使用的正常细胞外液为: 140 mmol/L NaCl、5 mmol/L KCl、1 mmol/L MgCl_2 、2.5 mmol/L CaCl_2 、11.5 mmol/L D-glucose 和 10 mmol/L HEPES, 用 NaOH 调至 $\text{pH}=7.4$, 最终渗透压为 310 mOsm. 除特别说明外, 实验中所用试剂均为 Sigma 公司产品.

细胞转染采用脂质体法, 使用 Qiagen 公司的 Effectene Transfection Reagent 脂质体转染试剂盒, 具体操作依照操作手册.

1.2.2 荧光成像. 荧光显微成像系统主要由 Olympus 公司的 IX-70 型倒置显微镜、数值孔径 NA 1.65 的 100 倍物镜、绿色荧光蛋白的滤光片组、单色荧光光源 Polychrome IV (T.I.L.L. Photonics GmbH, Germany)、CCD (PCO Co., Germany)、压电晶体 Z 轴步进控制器和 E-622 控制单元 (Physik Instrument, Waldbronn, Germany) 等组成. 绿色荧光蛋白由 488 nm 单色光激发. 荧光图像通过倒置显微镜的左侧出光口由 CCD 采集. 物镜和载玻片 ($n_{488}=1.8$ 、厚度 $=0.17$ mm, Olympus) 之间使用折射率 $n_{488}=1.81$ 的浸油 (Cargille Laboratories Inc., USA) 耦合, 用 TILL Vision 4.0 (T.I.L.L. Photonics) 控制成像系统采集图片^[9]. 根据细胞内表达的绿色荧光蛋白的荧光强度调节曝光时间, 通常在 100 ~ 500 ms 之间.

1.2.3 全细胞膜片钳和膜电容测量. 细胞分泌导致细胞膜表面积增加, 因膜电容与细胞膜表面积成正比, 所以可以通过记录细胞膜电容变化来反映细胞分泌事件. 实验使用传统的全细胞膜片钳膜电容测量方法记录细胞分泌过程的膜电容变化. 所用电极采用石蜡涂敷以降低分布电容, 阻值为 3~5 $\text{M}\Omega$. 形成全细胞封接后的串连电阻为 4~12 $\text{M}\Omega$. 膜电容测量采用 EPC-10 膜片钳放大器和 PULSE+LOCK-IN 软件 (HEKA Electronics, Lambrecht, Germany). 细胞钳制在 -70 mV, 给予频率为 1042 Hz, 峰-峰值为 20 mV 的正弦波刺激以记录细胞膜电容的变化, 采样频率为 15 kHz, 采集到的信号用贝塞尔 (Bessel) 低通滤波器滤波, 滤波频率为 2.9 kHz.

1.2.4 钙离子光解释放和胞内钙离子浓度的测定. 使用荧光染料 fura-2 (Molecular Probes) 或 furaptra (Molecular Probes) 双波长 (340 nm/380 nm) 测量法测定细胞内游离钙离子浓度. 激发光由单色光源 (T.I.L.L. Photonics) 产生. 胞内钙离子浓度 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 用方程 $[\text{Ca}^{2+}]_i = K_{\text{eff}} * (R - R_{\text{min}}) / (R_{\text{max}} - R)$ 计算, $R = F_1 / F_2$. 其中 F_1 和 F_2 分别为 340 nm 和 380 nm 激发光激发测得的荧光强度, R_{min} 和 R_{max} 分别为零钙情况 (10 mmol/L EGTA) 下和高钙浓度 (10 mmol/L CaCl_2) 下的荧光比值, K_{eff} 为有效结合常数, 使用已知浓度的钙离子溶液测得 R 值代入上述公式中计算得到. 所使用的 fura-2 和 furaptra 的 R_{min} , R_{max} 和 K_{eff} 均用标准钙离子浓度溶液进行校准. 钙离子光解释放技术如文献[10]所述. 用快闪光钙释放系统 (Rapp Optoelektronik) 给细胞一个短暂的紫外光照射 (flash), 使钙离子与螯合剂解螯合, 从而迅速均一地提高细胞内的游离钙离子浓度以触发细胞的分泌反应. 实验中使用 DM-nitrophen EGTA (DMNP-EGTA) 作为钙离子的螯合剂, 细胞内液为: 110 mmol/L CsCl、5 mmol/L DMNP-EGTA、2 mmol/L NaCl、4.7 mmol/L CaCl_2 、2 mmol/L ATP、0.3 mmol/L GTP、0.2 mmol/L furaptra 和 35 mmol/L Hepes, 用 CsOH 或 HCl 调至 $\text{pH}=7.2$. 用 fura-2 测得细胞内液的游离钙浓度为 200 nmol/L 左右, 在此低钙离子浓度下, 细胞不分泌.

1.2.5 数据处理. 荧光成像图像处理采用 TILL Vision 4.0 和 Photoshop 7.0 软件进行采集和处理. 膜电容数据分析用 IGOR Pro4.02 (WaveMetrics, Lake Oswego, OR) 分析处理. 实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组与组间差异显著性用 t 检验, 认为 $P < 0.05$

时有显著性差异.

2 结 果

2.1 Wortmannin 对 PI3K 的抑制作用

Wortmannin 是 PI3K 的抑制剂, 能抑制细胞内源性 PI3K 的活性并直接阻断 PtdIns-3-P 的生成, 同时可抑制 PtdIns-3-P 与 EGFP-2xFYVE 的结合. PtdIns-3-P 存在于内涵体膜上, 在 PI3K 存在的情况下, 特异性地与结构域 FYVE(以最初发现含有 FYVE 结构域的蛋白 Fab1p, YOTB, Vac1p 和 EEA1 的第一个字母命名)结合^[1]. 因而, 可以采用 FYVE 结构域与内涵体的结合作为指标, 检测 wortmannin 对 PI3K 的抑制作用, 当 PI3K 活性受到抑制时, 内涵体膜中的 PtdIns-3-P 减少或消失, FYVE 结构域从内涵体上解离. 为了检测 wortmannin 对 PI3K 的抑制作用, 用脂质体转染法将 EGFP-2xFYVE 融合蛋白在 PC12 细胞中过量表达. 用 100 nmol/L wortmannin 孵育转染了 pEGFP-2xFYVE 的 PC12 细胞以抑制 PtdIns-3-P 的产生. 使用宽场荧光显微镜观察 EGFP-2xFYVE 融合蛋白在 PC12 细胞中的定位及荧光强度的变化. 如图 1 所示, 在宽场荧光显微镜下观察到 wortmannin 处理前细胞内的 EGFP-2xFYVE 标记的内涵体为小亮点, 加 wortmannin 处理 25 min 后, 亮点全部消失, 融合蛋白均匀地分布在整個胞浆中. 证明

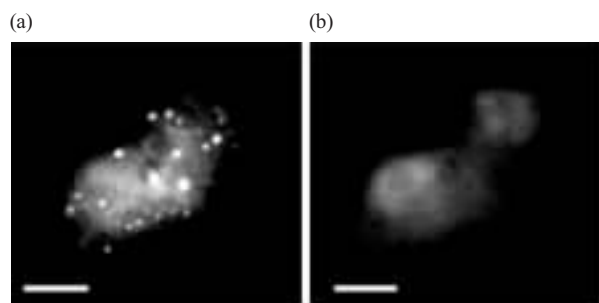


Fig.1 Wortmannin inhibits PI3K activity

PtdIns 3-kinase specific inhibitor wortmannin inhibits most of the PtdIns 3-kinase activity. Thus, direct generation of PtdIns-3-P is blocked. Wortmannin can also lead to loss of EGFP-2xFYVE fusion protein association to early endosome membrane. Localization of the fusion protein to early endosome is dependent upon PtdIns 3-kinase activity since the association can be completely abolished upon treatment by wortmannin. (a) Image of EGFP-2xFYVE expressing PC12 cell before treated by wortmannin. Early endosome appears as bright fluorescence spots. (b) Image taken at 25min after treatment of wortmannin. The bright fluorescence spots disappeared and diffused. Indicated PI3K activity was blocked. The scale bar represents 5 μm

wortmannin 阻断了 PI3K 的活性, 抑制了 PtdIns-3-P 的产生, 并使 FYVE 与 PtdIns-3-P 解离. 因为没有连续多次拍摄, 从而排除了光漂白作用的可能性.

2.2 Wortmannin 对 PC12 细胞分泌的作用

为了检测 wortmannin 对 PC12 细胞分泌功能的影响, 用 250 nmol/L wortmannin 孵育 PC12 细胞 30 min 以完全阻断磷脂酰肌醇-3 激酶的活性, 以未加 wortmannin 处理的细胞为对照组. 短暂的强紫外闪光 (flash) 刺激后, 实验组和对照组中细胞内游离钙离子浓度分别为: $(25.14 \pm 2.18) \mu\text{mol/L}$ 和 $(26.70 \pm 2.55) \mu\text{mol/L}$, t 检验 ($P = 0.33$) 表明无显著性差异. 两组细胞的膜电容增量平均曲线基本上重合, 无显著差异, 表明 wortmannin 对 PC12 细胞分泌无显著的影响(图 2).

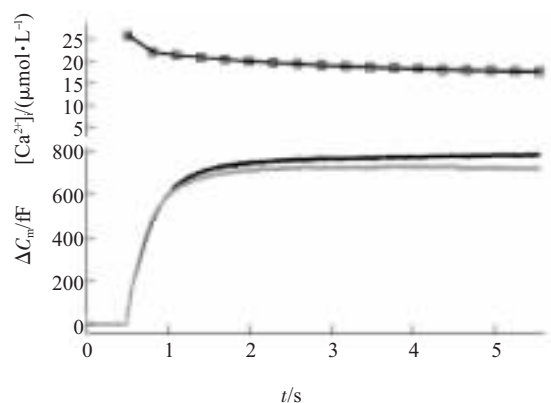


Fig.2 Wortmannin has no effect on the exocytosis responses to elevated $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in PC12 cells

Curves of average post-flash calcium level ($[\text{Ca}^{2+}]_i$, upper) and exocytosis responses (C_m , lower) in control cells (black, $n=12$) and wortmannin treated cells (grey, $n=12$) in response to flash stimuli. The average post-flash calcium level and averaged calcium capacitance change in control cells and wortmannin treated cells have no significant difference.

对细胞 flash 反应的膜电容曲线进行三指数拟合分析, 得到分泌快簇发相、慢簇发相和持续相三个成分. 其中快簇发相和慢簇发相分别代表了快速释放囊泡库(rapidly releasable pool, RRP)和慢速释放囊泡库(slowly releasable pool, SRP)与细胞膜的融合过程^[12], 而持续相代表未激活囊泡库(unprimed pool, UPP)向可释放囊泡库填充的过程, 反映了囊泡在高浓度游离钙离子条件下的激活速率^[13]. 各时相的幅度(A_i)和时间常数(τ_i)反映出了各分泌相的动力学特性. 所用的三指数函数为:

$$f(t) = A_0 + \sum_{i=1}^3 A_i (1 - \exp(-(t-t_0)/\tau_i)) \quad \text{for } t > t_0,$$

A_0 为细胞的初始膜电容, t_0 为施加闪光刺激的时间.

为检验 wortmannin 对细胞分泌钙依赖性的影响, 用每个细胞膜电容变化曲线拟合得到的 RRP 和 SRP 的速率常数(rate constant, $1/\tau_i$)对钙离子浓度($15 \sim 50 \mu\text{mol/L}$)作双对数图(图 3), 可以检验细胞分泌反应对钙离子浓度依赖性^[1,14]. 对照组与实验组细胞的 RRP 和 SRP 速率常数对钙浓度的分布基本重叠, 表明 wortmannin 对 PC12 细胞分泌的快簇发相和慢簇发相的钙依赖性没有明显的影响.

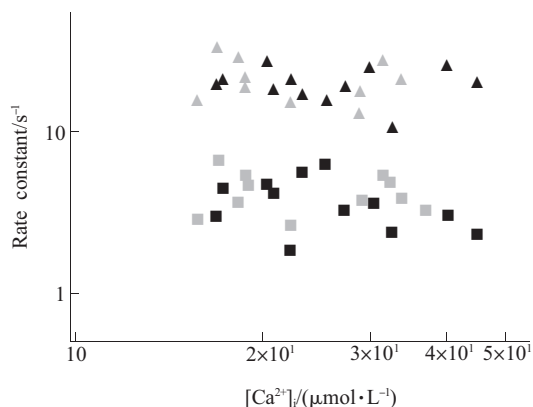


Fig.3 Wortmannin has no effect on the calcium dependence of secretion in PC12 cells

Rate constants of fast (triangle) and slow (square) burst obtained by exponential fitting in control cells (black) and cells treated by wortmannin (grey) are overlapped. So, Ca^{2+} dependence of secretion in PC12 cells is unchanged by wortmannin.

最后分析了 wortmannin 对分泌快簇发相成分, 慢簇发相成分和持续成分幅度大小的影响. 对照组细胞各个成分的幅度分别为: $(268.97 \pm$

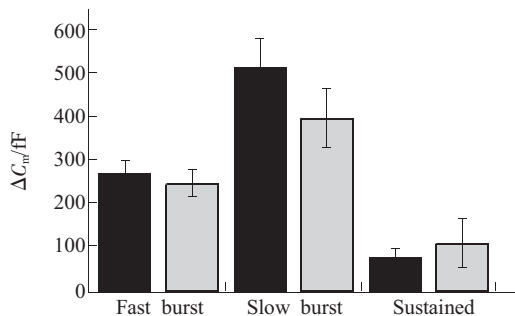


Fig.4 Wortmannin has no effect on the pool size of secretion in PC12 cells

The averaged amplitudes of fast burst, slow burst and the sustained components are similar in control cells (black) and cells treated by wortmannin (grey), obtained by exponential fitting.

■: control; □: wortmannin.

27.18) fF, (513.02 ± 63.75) fF 和 (73.76 ± 17.95) fF, 而 wortmannin 处理过的细胞各个成分的幅值分别为: (246.24 ± 29.43) fF, (396.17 ± 66.85) fF 和 (107.93 ± 55.52) fF (图 4). t 检验的 P 值分别为 0.28, 0.11, 0.28, 无显著性差异. 表明 wortmannin 对 PC12 细胞分泌各个成分的幅度没有明显的影响.

3 讨 论

PI3K 是参与细胞磷脂酰肌醇代谢过程一种重要的酶, 通过其代谢产物参与对细胞囊泡运输、细胞骨架重组、吞噬作用、细胞生长、分裂、生存和细胞凋亡等生理活动的调节^[15]. PI3K 以磷脂酰肌醇 (PtdIns)、磷脂酰肌醇 -4- 磷酸 (PtdIns-4-P) 和磷脂酰肌醇 -4,5- 二磷酸 (PtdIns-4,5-P₂) 为底物生成磷脂酰肌醇 -3- 磷酸 (PtdIns-3-P)、磷脂酰肌醇 -3,4- 二磷酸 (PtdIns-3,4-P₂) 和磷脂酰肌醇 -3,4,5- 三磷酸 (PtdIns-3,4,5-P₃). PtdIns-3-P 富集于早期内涵体膜上, 主要通过结合含有 FYVE 结构域的蛋白质参与内涵体的蛋白质分选和回收, 对细胞内蛋白质与膜转运起重要作用^[16]. PtdIns-3,4-P₂ 参与囊泡锚定和融合过程, PtdIns-3,4,5-P₃ 参与囊泡的胞吞过程^[17]. 阻断 PI3K 的活性能够妨碍肌动蛋白细胞骨架的重构, 抑制突触囊泡的循环^[18]. 目前有文献报道 PI3K 参与了对细胞分泌活动的调节^[19], 但不清楚是直接作用于分泌过程还是通过对囊泡胞吞和回收的调节而间接性地影响细胞分泌.

生理激动或药物刺激时, 细胞内不同部位的囊泡所接受到的钙信号不同. 钙信号类型可以分为钙纳区 (nonadomain)、钙微区 (microdomain) 和径向扩散梯度 (radial gradients), 囊泡接受到的钙信号类型, 取决于囊泡与钙离子通道距离、胞浆内钙缓冲物质对钙离子的缓冲和细胞器对钙离子的摄取与释放^[20]. 给细胞一个短暂的 ($100 \sim 300 \mu\text{s}$) 紫外光照射后, 细胞内游离钙离子浓度迅速并均匀地升高, 使细胞分泌的分子构件中的钙离子感受分子饱和并触发囊泡胞吐, 克服了胞内局部钙信号的不均一性对囊泡胞吐活动的影响, 使得准确地研究分泌的钙依赖性及分泌动力学成为可能. 神经元、神经内分泌细胞和快反应的内分泌细胞, 对闪光释放的高钙反应可以详细地分为快簇发相 (fast burst component)、慢簇发相 (slow burst component) 和持续相 (sustained component) 三个成分.

Flash 实验结果表明, wortmannin 对 PC12 细

胞分泌反应的动力学特性和分泌的钙依赖性均无显著影响. Wortmannin 对蛙的运动神经元神经递质的释放没有直接的调节作用, 但抑制神经元对高强度重复性刺激的反应^[21], 其机制可能是通过抑制囊泡循环, 减少突触囊泡的补充, 继发性地引起分泌幅度的降低. PI3K 的产物 PtdIns-3-P 和 PtdIns-3,4-P₂ 分别位于早期和晚期内涵体膜中, 参与囊泡的胞吞反应; 另一产物 PtdIns-3,4,5-P₃ 位于细胞膜中, 调节笼形蛋白介导的囊泡胞吞^[17]. 参与囊泡锚定、激活和融合过程的 PtdIns-3,4-P₂ 的生成依赖于磷脂酰肌醇-4 激酶(phosphoinositide 4-kinase, PtdIns4K)和磷脂酰肌醇-5 激酶(phosphoinositide 5-kinase, PtdIns5K)的活性, 阻断 PI3K 并不能阻断磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸的生成, 从而不能直接影响细胞的分泌. 因此, 我们认为 PI3K 对细胞的分泌功能没有直接的调控作用, 但不排除它通过促进囊泡胞吞和循环过程而增强细胞对高强度重复刺激的反应和参与突触可塑性的调节.

致谢 澳大利亚 Queensland 大学 Meunier 教授提供了质粒, 在此表示衷心的感谢.

参 考 文 献

- 1 Yang H, Liu H, Hu Z, et al. PKC-induced sensitization of Ca²⁺-dependent exocytosis is mediated by reducing the Ca²⁺ cooperativity in pituitary gonadotropes. *J Gen Physiol*, 2005, **125** (3): 327~334
- 2 Sorensen J B. Formation, stabilisation and fusion of the readily releasable pool of secretory vesicles. *Pflugers Arch*, 2004, **448**(4): 347~362
- 3 Burgoyne R D, Morgan A. Secretory granule exocytosis. *Physiol Rev*, 2003, **83** (2): 581~632
- 4 Bondeva T, Pirola L, Bulgarelli-Leva G, et al. Bifurcation of lipid and protein kinase signals of PI3K to the protein kinases PKB and MAPK. *Science*, 1998, **282** (5387): 293~296
- 5 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
- 6 Bai J, Tucker W C, Chapman E R. PIP₂ increases the speed of response of synaptotagmin and steers its membrane-penetration activity toward the plasma membrane. *Nat Struct Mol Biol*, 2004, **11** (1): 36~44
- 7 Tucker W C, Edwardson J M, Bai J, et al. Identification of synaptotagmin effectors via acute inhibition of secretion from cracked PC12 cells. *J Cell Biol*, 2003, **162** (2): 199~209
- 8 Cousin M A, Malladi C S, Tan T C, et al. Synapsin I-associated phosphatidylinositol 3-kinase mediates synaptic vesicle delivery to the readily releasable pool. *J Biol Chem*, 2003, **278** (31): 29065~29071
- 9 Wu Z X, Xia S, Xu L, et al. Dynamic imaging of single secretory granule in cultured PC12 cells. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2003, **35** (4): 381~386
- 10 Xu T, Naraghi M, Kang H, et al. Kinetic studies of Ca²⁺ binding and Ca²⁺ clearance in the cytosol of adrenal chromaffin cells. *Biophys J*, 1997, **73** (1): 532~545
- 11 Gaullier J M, Simonsen A, D'Arrigo A, et al. FYVE finger proteins as effectors of phosphatidylinositol 3-phosphate. *Chem Phys Lipids*, 1999, **98** (1-2): 87~94
- 12 Xu T, Binz T, Niemann H, et al. Multiple kinetic components of exocytosis distinguished by neurotoxin sensitivity. *Nat Neurosci*, 1998, **1** (3): 192~200
- 13 Ashery U, Varoqueaux F, Voets T, et al. Munc13-1 acts as a priming factor for large dense-core vesicles in bovine chromaffin cells. *EMBO J*, 2000, **19** (14): 3586~3596
- 14 Wan Q F, Dong Y, Yang H, et al. Protein kinase activation increases insulin secretion by sensitizing the secretory machinery to Ca²⁺. *J Gen Physiol*, 2004, **124** (6): 653~662
- 15 Wymann M P, Zvelebil M, Laffargue M. Phosphoinositide 3-kinase signalling-which way to target?. *Trends Pharmacol Sci*, 2003, **24** (7): 366~376
- 16 Birkeland H C, Stenmark H. Protein targeting to endosomes and phagosomes via FYVE and PX domains. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2004, **282**: 89~115
- 17 Wenk M R, De C P. Protein-lipid interactions and phosphoinositide metabolism in membrane traffic: insights from vesicle recycling in nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101** (22): 8262~8269
- 18 Rizzoli S O, Betz W J. Effects of 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one on synaptic vesicle cycling at the frog neuromuscular junction. *J Neurosci*, 2002, **22**(24): 10680~10689
- 19 Collier J J, White S M, Dick G M, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors reveal a unique mechanism of enhancing insulin secretion in 832/13 rat insulinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **324** (3): 1018~1023
- 20 Augustine G J. How does calcium trigger neurotransmitter release?. *Curr Opin Neurobiol*, 2001, **11** (3): 320~326
- 21 Richards D A, Rizzoli S O, Betz W J. Effects of wortmannin and latrunculin A on slow endocytosis at the frog neuromuscular junction. *J Physiol*, 2004, **557** (Pt 1): 77~91

Phosphoinositide 3-kinase Has No Direct Effect on PC12 Cell Secretion Itself*

LIU Yuan-Yuan**, ZHAO Ping**, WU Zheng-Xing, QU An-Lian, XU Tao***

(Institute of Biophysics and Biochemistry, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) is involved in regulation of many kinds of physiological processes in cells, such as vesicle transportation, cytoskeleton reorganization, cell survival, phagocytosis, apoptosis, and so on. It is an important regulator of vesicle endocytosis. According to preview reports, PI3K seems to be one of regulators of cell secretion. To inspect this, the effect of PI3K on PC12 cell secretion was checked by using its specific inhibitor wortmannin. Wortmannin inhibited PI3K activity indicated by loss of EGFP-2xFYVE fusion protein binding to the PtdIns-3-P which is localized in early endosome, and did not change PC12 cell response to flash including its kinetics and calcium dependence. The result demonstrated that PI3K has no effect on PC12 cell secretion itself, but does not exclude the possibility that it enhances cell to response to repetitive strong stimuli by its accelerating effect on vesicle endocytosis which speeds up the refilling of releasable vesicle.

Key words phosphoinositide 3-kinase, wortmannin, PC12 cell, kinetics of secretion, calcium dependence, flash, EGFP-2xFYVE fusion protein

*This work was supported by a grant from The National Nature Science Foundation of China (30470448, 30130230, 30270363).

**These authors contribute equally to the work

***Corresponding author . Tel/Fax: 86-27-87792024, E-mail: txu@mail.hust.edu.cn

Received: March 11, 2005 Accepted: April 30, 2005