

ATP调控大鼠胰腺 β 细胞胰岛素分泌的双重作用*

吴政星** 谢丽** 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 实验以大鼠胰腺 β 细胞为研究对象, 采用荧光测钙和全细胞膜片钳膜电容测量技术, 研究 ATP 对胞内钙离子信号和细胞分泌的影响, 并初步探讨了其作用机制. 实验表明: 胞外 ATP 刺激通过动员胞内 thapsigargin 敏感的钙库 Ca^{2+} 释放, 使大鼠胰腺 β 细胞内的游离钙离子浓度显著升高, 细胞外的 ATP 信号对 β 细胞胰岛素分泌有双向调节作用, 其一, 主要通过降低去极化引起的钙电流而对 β 细胞胰岛素分泌产生较弱的抑制作用, 其二, 细胞在静息状态下, ATP 通过动员胞内钙库的 Ca^{2+} 释放使胞浆中的钙离子浓度显著增加, 触发 β 细胞强烈分泌胰岛素. ATP 的这种双向调节可能对胰岛素分泌的精确调控具有重要的生理意义.

关键词 胞外 ATP, 胞内钙离子浓度, 膜电容, 胞吐, 胰岛素

学科分类号 Q27

在胰腺 β 细胞中, 胞内 ATP 对胰岛素分泌起着重要的调控作用^[1]. 当胞外葡萄糖浓度增加时, β 细胞胞浆中的葡萄糖浓度升高, 通过糖代谢增加胞内 ATP 浓度, 并使 ATP/ADP 比率升高, 导致 ATP 敏感的钾通道(K_{ATP})关闭, 从而引起 β 细胞去极化和电压依赖性的钙离子通道开放^[2], Ca^{2+} 通过钙离子通道流入胞内, 最终触发胰岛素分泌. 胰腺组织接受交感和副交感神经末梢的双重支配^[3]. 在胰腺 β 细胞的分泌囊泡中, ATP 与胰岛素共存并随胰岛素一起释放到细胞外, 反馈性调节自身的胰岛素分泌和邻近细胞的分泌活动^[4, 5], 显示出其对胰岛素分泌调节的自分泌和旁分泌调节作用.

细胞外 ATP 是一种重要的信号分子, 通过作用于细胞膜上的特异受体来调控细胞内的各种生理活动^[6, 7]. ATP 作用的细胞膜受体是 P2 嘌呤受体, 主要分为三种亚型: P2X、P2Y 和 P2Z^[8]. 其中 P2Y 是 G 蛋白偶联的嘌呤受体^[9], 而 P2X 可能是配体门控的无选择性阳离子通道^[10]. 在胰腺 β 细胞, 同时存在 P2X 和 P2Y 两种嘌呤受体^[11]. 胞外 ATP 对胰岛素分泌的调节是通过 P2Y 受体介导的^[7, 11]. P2Y 受体的信号传递机制是通过激活 PLC 信号系统, 产生第二信使物质 IP_3 , 激活 IP_3 受体, 从而动员胞内钙库释放, 使胞内 Ca^{2+} 浓度增加^[12, 13].

胞外 ATP 对胰岛素的分泌调控, 在不同种类的胰腺 β 细胞上存在争议. 有证据显示, 在小鼠(mouse)胰腺 β 细胞中, ATP 通过抑制钙通道活动^[14]或者通过三聚体 G 蛋白激活丝氨酸 / 苏氨酸蛋

白磷酸酶而抑制细胞分泌^[15], 在大鼠(rat)胰腺 β 细胞中, ATP 引起胞内 thapsigargin 敏感的钙库释放并通过钙诱导的钙通道失活而抑制动作电位^[16]. 尽管有上述关于 ATP 对分泌抑制作用的报道, 但也有 ATP 促进分泌的证据. 胞外 ATP 能够刺激大鼠胰腺的胰岛素分泌^[17], 在分泌胰岛素的 RINm5F 细胞中, ATP 通过胞内钙库的动员和刺激胞外 Ca^{2+} 内流两种途径促进 Ca^{2+} 依赖性的胰岛素分泌^[18], 还可以直接作用于分泌的分子构件, 引起 Ca^{2+} 不依赖的胰岛素分泌^[13].

为了澄清 ATP 对胰岛素分泌的确切作用及其调控机制, 我们以原代大鼠胰腺 β 细胞为实验对象, 采用荧光测钙、全细胞钙电流和膜电容测量技术来检测胞外 ATP 对胞内 Ca^{2+} 浓度、钙电流和细胞膜电容的影响. 实验结果显示, 胞外 ATP 对胰岛素分泌起双重调节作用: 一方面, ATP 通过抑制钙电流, 对去极化引起的胰岛素分泌产生较弱的抑制作用; 另一方面, 在静息 β 细胞中, ATP 通过动员胞内钙库, 刺激 β 细胞产生强烈的胰岛素分泌. 表明胞外 ATP 对胰腺 β 细胞的胰岛素分泌有双向调节作用.

*国家自然科学基金资助项目(30025023, 3000062, 30130230, 30240003).

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: 2005-05-24, 接受日期: 2005-06-30

1 材料与方法

1.1 细胞培养和溶液

原代胰腺 β 细胞的制备和培养按以前所介绍的方法^[9]. 即, 雄性 wistar 大鼠断颈处死后, 迅速取出胰腺组织, 用胶原酶消化, 分离出胰岛, 胰岛再用 dispase II 消化, 游离出单细胞. 分散的 β 细胞贴附到用 poly-L-lysine 涂敷处理过的玻片上, 然后在 DMEM 培养液中, 置于含有 5% CO_2 + 95% 空气的 37°C 恒温培养箱中培养 3~5 天后供实验使用. 实验所使用的正常细胞外液为: 138 mmol/L NaCl、5.6 mmol/L KCl、1.2 mmol/L MgCl_2 、2.6 mmol/L CaCl_2 、5 mmol/L D-glucose 和 10 mmol/L HEPES, 用 NaOH 或 HCl 将 pH 值调至 7.4, 最终渗透压为 310 mOsm. 无 Ca^{2+} 外液, 去除掉 CaCl_2 并加入 2 mmol/L EGTA 外, 其他成分与标准细胞外液成分一致. 标准电极内液成分为: 125 mmol/L Cs-Glutamate, 2 mmol/L Mg-ATP, 0.3 mmol/L $\text{Na}_2\text{-GTP}$, 1 mmol/L MgCl_2 , 0.1 mmol/L EGTA 和 0.1 mmol/L fura-2 (用 CsOH 将 pH 值调至 7.2, 渗透压调至 300 mOsm). 除特别说明外, 实验所用试剂均为 Sigma 公司产品.

1.2 胞内钙离子浓度的测定

使用钙离子荧光染料 fura-2(Molecular Probes) 并用双波长 (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 Polychrome V (Till Photonics, Planegg, Germany) 产生. 胞内游离钙离子浓度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 用方程 $[\text{Ca}^{2+}]_i = K_{\text{eff}} (R - R_{\text{min}}) / (R_{\text{max}} - R)$ 计算, 其中 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 340 nm/380 nm 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. 实验使用 fura2-AM 孵育细胞或用 fura2- K_5 通过玻璃电极导入细胞, 以测量胞内游离钙离子浓度. 用 1 $\mu\text{mol/L}$ Fura2-AM 在 37°C 下孵育细胞 15 min, 用正常无染料的细胞外液清洗. 脂溶性的 Fura2-AM 可以穿透细胞膜进入胞内, 在细胞内水解为水溶性的 Fura-2 并累积至较高浓度.

1.3 全细胞膜片钳和膜电容测量

实验使用全细胞封接模式, 用 EPC9 膜片钳放大器 (Heka Electronics, Lambrecht, Germany) 记录 β 细胞的钙离子通道电流和膜电容. 膜电容的测量采用 Pulse 软件锁相放大器的 sine + DC 实验方案. 胰岛 β 细胞用 -70 mV 的保持电压钳制细胞的膜电

位, 正弦波命令电压的幅度为 20 mV, 频率为 1 kHz. 所用电极采用硅酮树脂涂敷以降低分布电容, 电阻为 3~5 M Ω , 形成全细胞封接后的串连电阻为 5~12 M Ω , 漏电流小于 50 pA. 去极化刺激采用双脉冲方式, 两次刺激脉冲均从 -70 mV 分别跳至 10 mV 和 15 mV, 持续时间均 100 ms, 刺激间隔时间为 100 ms.

1.4 数据处理

数据分析用 IGOR Pro 4.06 (WaveMetrics, Lake Oswego, OR, USA) 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 (用 * 表示), $P < 0.001$ 为极显著差异 (用 ** 表示).

2 结 果

2.1 胞外 ATP 引起胞内游离钙离子浓度显著增加

胞外灌流 ATP (100 $\mu\text{mol/L}$) 能使浸浴在含有 2.6 mmol/L Ca^{2+} 的正常外液中的大鼠 β 细胞胞浆内总体平均钙离子浓度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 瞬时升高至很高水平 ((484 ± 37.9) nmol/L, $n = 8$), 并能在几秒钟内迅速恢复到静息水平 ((78.2 ± 40.2) nmol/L, $n = 8$, 图 1a),

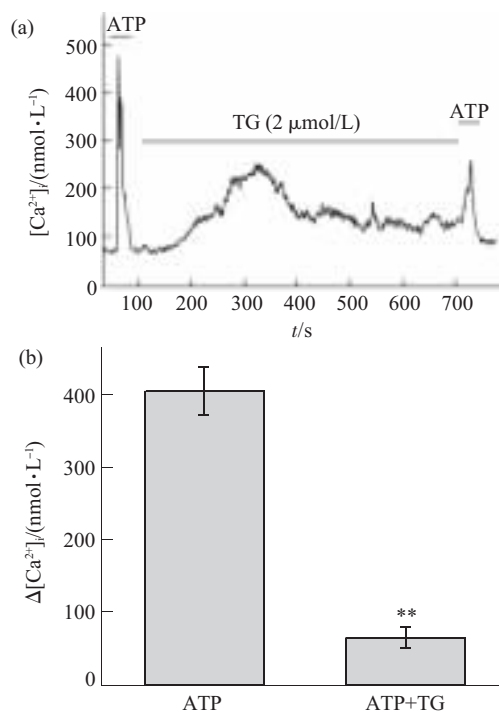


Fig. 1 ATP induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation in pancreatic β cells
(a) An example experiment showed the effect of ATP on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in rat pancreatic β cell immersed in bath solution contained 2.6 mmol/L free Ca^{2+} before and after treated by thapsigargin (TG, 2 $\mu\text{mol/L}$). (b) Summary of $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ evoked by ATP application before and after treatment of TG. More than 10 min treatment of TG mostly blocked the ATP-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation in rat pancreatic β cells (** $P < 0.001$). Data from 8 cells are presented as $\bar{x} \pm s$.

净增加值($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$)为(405.8 ± 33.6) nmol/L ($n = 8$). 内质网(ER)钙库为胞内最大的 Ca^{2+} 库, 对维持细胞内 Ca^{2+} 动态平衡起关键作用. 一般认为, ATP 引起的胞内 Ca^{2+} 信号主要来自于胞内 thapsigargin (TG)敏感的钙库^[15]. 因此实验使用 ER Ca^{2+} -ATPase (SERCA) 抑制剂——thapsigargin(TG, 2 $\mu\text{mol/L}$)排空 ER 钙库, 检测 ATP 对 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响. 在 10 min 的 TG 处理后, ATP 刺激的钙离子浓度增加值($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$)为(62.3 ± 14.4) nmol/L ($n = 8$), 结果显示, TG 能够大部分抑制 ATP 引起的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高, 但并没有完全阻断, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 仍有轻微升高(图 1b). 以上实验结果表明, ATP 引起的胞内 Ca^{2+} 浓度升高主要是通过动员胞内 TG 敏感钙库而引起的.

2.2 胞外 ATP 引起胞内 IP_3 敏感的钙库释放

在大多数哺乳动物细胞中, 内质网和高尔基复合体是主要的细胞内钙库. 在胰腺 β 细胞中, 至少存在 3 种钙库: IP_3 敏感钙库、NAADP 敏感钙库以及 cADPR / Ryanodine 敏感钙库^[20, 21]. 细胞膜上的 P2Y 受体通过 G 蛋白偶联受体激活 PLC 信号系统产生 IP_3 , 从而动员 IP_3 敏感的胞内钙库 Ca^{2+} 释放, 使胞浆中的游离钙离子浓度升高. 为了鉴别 ATP 作用的钙库类型, 实验使用零钙外液浸浴细胞, 以消

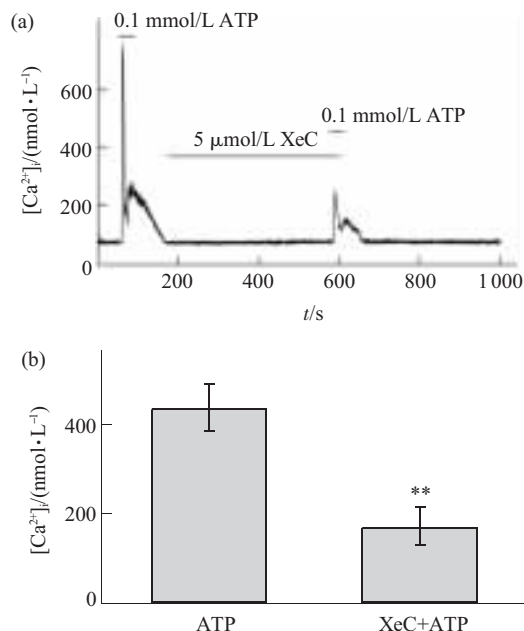


Fig. 2 IP_3 sensitive intracellular Ca^{2+} release evoked by extracellular ATP

(a) In Ca^{2+} -free external bath solution, application of 0.1 mmol/L extracellular ATP elicited intracellular Ca^{2+} transient increase that could be inhibited by subsequent application of Xestospongine C (XeC, 5 $\mu\text{mol/L}$). (b) Summary of $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ evoked by ATP application before and after treated by XeC ($n = 10$). XeC markedly suppressed the elevation of intracellular free calcium level induced by extracellular ATP.

** $P < 0.001$.

除胞外钙离子的影响. 胞外 ATP 能够使 β 细胞内总体游离钙离子浓度由基础浓度(80.2 ± 5.1) nmol/L, $n = 10$) 升高到 (517.4 ± 53) nmol/L, 净增加值($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$) 为 (437.1 ± 51.8) nmol/L ($n = 10$); 细胞经过 IP_3 受体的抑制剂——Xestospongine C (XeC, 5 $\mu\text{mol/L}$)处理 5 min 左右后, ATP 诱发的钙离子增加值($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$)降至 (171.4 ± 42.8) nmol/L ($n = 10$, 图 2). 实验结果表明 ATP 通过对 IP_3 敏感钙库的动员, 引起胞内钙游离钙离子浓度显著升高.

2.3 胞外 ATP 通过抑制钙内流而削弱了去极化引起的分泌

为了验证 ATP 对去极化引起的分泌的影响, 实验采用双脉冲 (dual-pulse) 来刺激胰岛素分泌和估计分泌幅度^[22]. 2 次去极化刺激脉冲 (图 3a) 持续时间和间隔时间均为 100 ms. 去极化造成 Ca^{2+} 内流, 使胞浆中的游离钙离子浓度升高, 触发细胞分泌, 引起细胞膜电容增加. 实验中, 第二次电脉冲

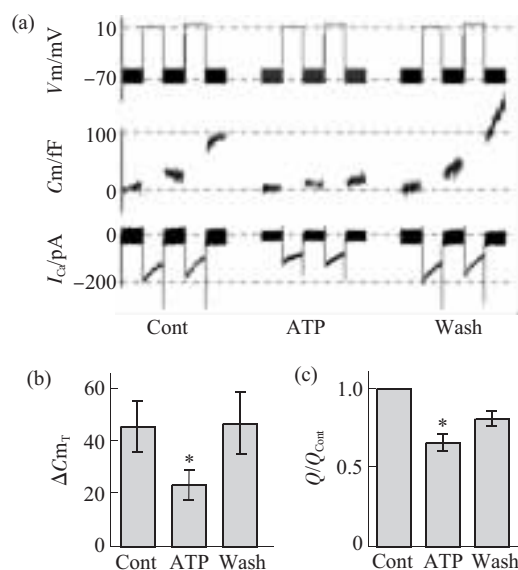


Fig. 3 Inhibition of depolarization-evoked exocytosis by extracellular ATP due to suppression of Ca^{2+} influx in rat β cell

(a) Illustration of the dual-pulse protocol for triggering of exocytosis and the effect of ATP on depolarization-evoked exocytosis. Two pulses as indicated of 100 ms duration were given 100 ms apart. The potentials of the two pulses were adjusted to give similar total amount of Ca^{2+} influx. The interval between dual-pulses stimuli was 2 min (top). An example experiment showed whole-cell Ca^{2+} currents (bottom, I_{Ca}) and the associated changes in cell membrane capacitance (middle, Cm) induced by successive depolarization from -70 mV to 10 mV and 15 mV. (b) Summary of the effect of ATP on total capacitance increment (ΔC_{mT}). In each dual pulse, the two Cm increments as showed in (a) were summated. ATP markedly ($P < 0.05$) decreased exocytosis induced by dual depolarization in β cell ($\bar{x} \pm s$, $n = 14$). (c) Normalized integrated Ca^{2+} current (Q/Q_{cont}) in the presence of ATP and after wash. A 35% reduction of Ca^{2+} current induced by ATP were observed ($n = 14$).

引起的分泌幅度通常比第一次的大(图 3a), 可能是由于第一次电刺激造成的钙离子残留激活更多囊泡, 使可释放囊泡库变大. 因此, 我们用 2 次 C_m 的增加值相加 (ΔC_{mT}) 来量化分泌大小. 结果显示, 在未施加 ATP 的对照条件下, ΔC_{mT} 为 (45.6 ± 9.7) fF ($n=14$), 2 min 后, 在同一个细胞和相同的刺激条件下, ATP ($100 \mu\text{mol/L}$) 使双脉冲去极化引起的分泌 (ΔC_{mT}) 降到 (32.3 ± 5.9) fF ($n=14$). 经过正常外液冲洗 2 min 后, ΔC_{mT} 又恢复到 (47.0 ± 11.7) fF (图 3b). 将 Ca^{2+} 电流变化换算成电量 (Q) 并经过归一化处理 (Q/Q_{cont}), 数据分析显示 ATP 使钙离子电量降低了 35%. 实验结果表明, ATP 通过抑制 Ca^{2+} 电流而使去极化引起的分泌幅度显著降低.

2.4 ATP 通过引起胞内钙库释放而触发分泌

β 细胞胞浆中游离钙离子浓度的升高与分泌活动相偶联, 即钙离子信号触发 β 细胞分泌胰岛素^[23]. 为了验证 ATP 引起的胞内钙离子浓度增加对大鼠 β 细胞胰岛素分泌的影响, 实验采用全细胞

膜片钳膜电容测量和荧光测钙联合检测技术, 同时检测胞外 ATP 对膜电容和胞内钙离子浓度的影响. 用电极将 fura2- K^+ 盐导入细胞, 通常当全细胞封接串连电阻为 $5 \sim 12 \text{ M}\Omega$ 时, 细胞内 fura2- K^+ 盐在 1 min 左右的时间内与电极内液达到扩散平衡. 实验在形成全细胞封接 3 min 后, 开始用 X-Chart 长时程记录模式实时记录膜电容和胞浆游离钙离子浓度. 细胞浸浴于无 Ca^{2+} 外液中并钳制在 -70 mV 的静息状态, ATP ($100 \mu\text{mol/L}$) 引起胞内 Ca^{2+} 浓度增加的同时, 也引起细胞膜电容的显著增加 (图 4a), 其增加量 (ΔC_m) 为 (338.3 ± 16.5) fF ($n=12$, 图 4b). 纪录过程中的串联电导 (G_s) 和膜电流 (I) 没有明显变化, 说明检测到的 C_m 变化是真实可信的 (图 4a). 由于细胞钳制在 -70 mV 的静息状态并浸浴于无 Ca^{2+} 外液中, 因此可以排除胞外 Ca^{2+} 的影响. 我们也在 2.6 mmol/L Ca^{2+} 外液中做了对照实验, 统计结果显示, ATP 诱发的分泌反应 ((350.1 ± 38.0) fF, $n=8$, 图 4b) 与无 Ca^{2+} 外液中的反应没有显著差异. 进一步说明 ATP 通过动员胞内钙库的钙离子释放而触发细胞分泌.

3 讨 论

在胰腺 β 细胞的分泌囊泡中, ATP 与胰岛素共存并随胰岛素一起释放到细胞外^[4,5]. ATP 在调节胰岛素的分泌过程中起到自分泌和旁分泌调节作用. 有证据显示, 在小鼠胰腺 β 细胞中, ATP 通过降低钙通道活动^[14] 或者通过三聚体 G 蛋白激活丝氨酸 / 苏氨酸蛋白磷酸酶而抑制细胞分泌^[15]. 而在大鼠 β 细胞^[17] 和人^[24] 的胰岛, ATP 通过作用于 P2 受体促进胰岛素分泌. 最近有研究认为, ATP 与胰岛素一同释放, 通过在胰岛内部或胰岛之间的扩散, 使 β 细胞产生同步的 Ca^{2+} 振荡^[25].

当前的研究主要是为了揭示 ATP 促进胰岛素分泌的确切作用以及调节分泌的内在机制. 在大鼠 β 细胞, 胞外 ATP 抑制了 Ca^{2+} 电流; 而细胞在静息状态下, ATP 引起胞浆中的游离钙离子浓度显著增加, 其作用受 IP_3 受体的抑制剂——Xestospongins C 的强烈但不完全抑制, 表明胞外 ATP 可能主要通过 G 蛋白偶联受体 - G 蛋白 - PLC- IP_3 信号转导途径, 动员细胞内 IP_3 敏感的钙库释放钙离子. 胞外 ATP 对细胞分泌活动的影响表现出对立的双向调节作用. 一方面通过降低去极化引起的钙电流, 削弱了去极化引起的分泌; 另一方面, 胞外 ATP 通过动员胞内钙库 Ca^{2+} 释放引起静

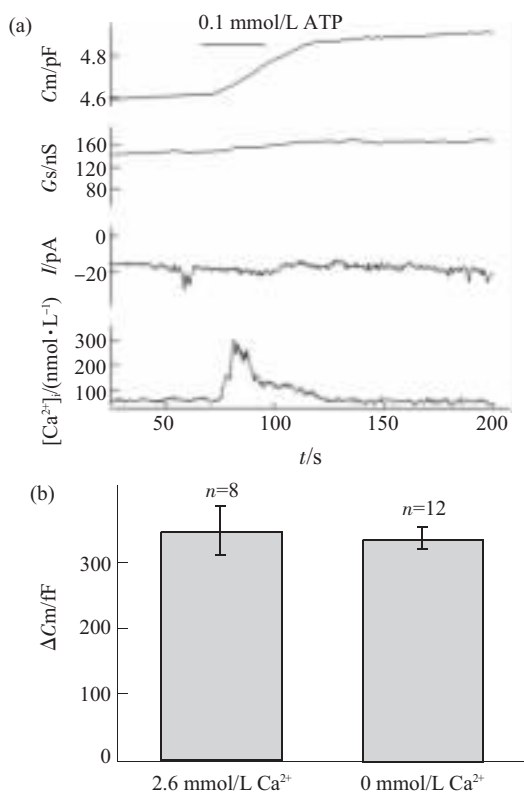


Fig. 4 ATP triggered exocytosis via intracellular Ca^{2+} mobilization

(a) Illustration of exocytosis induced by ATP. Individual traces of membrane capacitance (C_m), series conductance (G_s), membrane current (I) and intracellular free- Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) were shown. (b) Summary of the effects of ATP on the C_m increment (ΔC_m). ATP triggered β cells to secrete the same amount of insulin in both 2.6 mmol/L Ca^{2+} ((350.1 ± 38.0) fF, $n=8$) and Ca^{2+} free ((338.3 ± 16.5) fF, $n=12$) bath solutions.

息状态下的 β 细胞产生强烈的分泌活动。

机体的胰岛素分泌通常分为两个时相, 首先是快速且幅度较大的第一分泌时相, 持续大约 10 min 的时间, 紧接着是幅度较低的第二分泌相, 在第二分泌相胰岛素的浓度逐渐增加, 在 25 ~ 30 min 后达到一个平台. 已有证据表明, K_{ATP} 通道依赖的作用机制参与第一时相的胰岛素分泌, 而 K_{ATP} 通道不依赖的作用机制存在于第二时相的胰岛素分泌过程^[26,27]. 并且两个时相的胰岛素分泌活动都受胞内 Ca^{2+} 浓度的调控^[27]. 从 ATP 对 β 细胞分泌活动的双向调节作用来看, 我们推测细胞外 ATP 信号对胰岛素分泌的两个时相均有调节作用, 而且对这两个时相分泌活动的调节作用完全不同. 在胰岛素分泌的第一时相, 葡萄糖代谢使 β 细胞胞浆中的 ATP 浓度增加, 造成 K_{ATP} 通道关闭, 使细胞去极化, 钙离子通道开放, 胞外钙离子内流并触发细胞分泌胰岛素, 与胰岛素共释放的 ATP 通过抑制钙离子通道活动, 对 β 细胞的胰岛素分泌活动产生负反馈调节. ATP 的这种负反馈作用也可能参与对神经支配所引起的胰岛素分泌过程的调节. 在第二时相 K_{ATP} 通道非依赖性的胰岛素分泌过程中, 与胰岛素共释放的 ATP 起着正反馈调节作用, 血浆或 β 细胞外液中的 ATP 也可能是第二时相分泌的刺激信号. 我们的初步研究结果为进一步的研究提供了重要线索, 但目前仍然存在多个关键问题有待解答: 胞外 ATP 信号作用的胞内钙库是哪一种或几种细胞器? 除了内质网钙库是否还有其他钙库, 例如分泌囊泡钙库, 也参与对胰岛素分泌的调控? 钙库的受体除了 IP_3 受体外是否还有其他受体类型? 胞内钙库调控胰岛素分泌的分子机制具体是怎样的? 等等, 对这些问题的解答, 将促进人们更进一步从生理功能和分子水平上认识胰岛素分泌的调节过程, 也将为糖尿病治疗药物的开发提供理论指导.

致谢 感谢许想平老师为我们提供细胞培养.

参 考 文 献

- Petersen O H, Findlay I. Electrophysiology of the pancreas. *Physiol Rev*, 1987, **67** (3): 1054~1116
- Ashcroft F M, Proks P, Smith P A, *et al.* Stimulus-secretion coupling in pancreatic β cells. *J Cell Biochem*, 1994, **55** (Suppl): 54~65
- Miller R E. Pancreatic neuroendocrinology: peripheral neural mechanisms in the regulation of the Islets of Langerhans. *Endocr Rev*, 1981, **2** (4): 471~494
- Bertrand G, Chapal J, Loubatieres-Mariani M M. Potentiating synergism between adenosine diphosphate or triphosphate and acetylcholine on insulin secretion. *Am J Physiol*, 1986, **251** (4 Pt 1): E416~E421
- Detimary P, Jonas J C, Henquin J C. Stable and diffusible pools of nucleotides in pancreatic islet cells. *Endocrinology*, 1996, **137** (11): 4671~4676
- Burnstock G, Kennedy C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor?. *Gen Pharmacol*, 1985, **16** (5): 433~440
- Gordon J L. Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem J*, 1986, **233** (2): 309~319
- Abbracchio M P, Burnstock G. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors?. *Pharmacol Ther*, 1994, **64** (3): 445~475
- Simon J, Webb T E, King B F, *et al.* Characterisation of a recombinant P2Y purinoceptor. *Eur J Pharmacol*, 1995, **291** (3): 281~289
- Valera S, Hussy N, Evans R J, *et al.* A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature*, 1994, **371** (6497): 516~519
- Bertrand G, Chapal J, Loubatieres-Mariani M M, *et al.* Evidence for two different P2-purinoceptors on β cell and pancreatic vascular bed. *Br J Pharmacol*, 1987, **91** (4): 783~787
- Blachier F, Malaisse W J. Effect of exogenous ATP upon inositol phosphate production, cationic fluxes and insulin release in pancreatic islet cells. *Biochim Biophys Acta*, 1988, **970** (2): 222~229
- Li G D, Milani D, Dunne M J, *et al.* Extracellular ATP causes Ca^{2+} -dependent and -independent insulin secretion in RINm5F cells. Phospholipase C mediates Ca^{2+} mobilization but not Ca^{2+} influx and membrane depolarization. *J Biol Chem*, 1991, **266** (6): 3449~3457
- Petit P, Bertrand G, Schmeer W, *et al.* Effects of extracellular adenine nucleotides on the electrical, ionic and secretory events in mouse pancreatic β -cells. *Br J Pharmacol*, 1989, **98** (3): 875~882
- Poulsen C R, Bokvist K, Olsen H L, *et al.* Multiple sites of purinergic control of insulin secretion in mouse pancreatic β -cells. *Diabetes*, 1999, **48** (11): 2171~2181
- Gong Q, Kakei M, Koriyama N, *et al.* P2Y-purinoceptor mediated inhibition of L-type Ca^{2+} channels in rat pancreatic β -cells. *Cell Struct Funct*, 2000, **25** (5): 279~289
- Hillaire-Buys D, Chapal J, Bertrand G, *et al.* Purinergic receptors on insulin-secreting cells. *Fundam Clin Pharmacol*, 1994, **8** (2): 117~127
- Arkhammar P, Hallberg A, Kindmark H, *et al.* Extracellular ATP increases cytoplasmic free Ca^{2+} concentration in clonal insulin-producing RINm5F cells. A mechanism involving direct interaction with both release and refilling of the inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} pool. *Biochem J*, 1990, **265** (1): 203~211
- Xie L, Lu J, Ostenson C G, *et al.* GIP1-39, a novel insulinotropic peptide form and aspects on its mechanism of action. *Regul Pept*, 2004, **121** (1~3): 107~112

- 20 Johnson J D, Misler S. Nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate-sensitive calcium stores initiate insulin signaling in human β cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (22): 14566~14571
- 21 Holz G G, Leech C A, Heller R S, *et al.* cAMP-dependent mobilization of intracellular Ca^{2+} stores by activation of ryanodine receptors in pancreatic β -cells. A Ca^{2+} signaling system stimulated by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1- (7-37). *J Biol Chem*, 1999, **274** (20): 14147~14156
- 22 Gillis K D, Mossner R, Neher E. Protein kinase C enhances exocytosis from chromaffin cells by increasing the size of the readily releasable pool of secretory granules. *Neuron*, 1996, **16** (6): 1209~1220
- 23 Prentki M, Wollheim C B. Cytosolic free Ca^{2+} in insulin secreting cells and its regulation by isolated organelles. *Experientia*, 1984, **40** (10): 1052~1060
- 24 Fernandez-Alvarez J, Hillaire-Buys D, Loubatieres-Mariani M M, *et al.* P2 receptor agonists stimulate insulin release from human pancreatic islets. *Pancreas*, 2001, **22** (1): 69~71
- 25 Hellman B, Dansk H, Grapengiesser E. Pancreatic β -cells communicate via intermittent release of ATP. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2004, **286** (5): E759~E765
- 26 Straub S G, Sharp G W. Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion. *Diabetes Metab Res Rev*, 2002, **18** (6): 451~463
- 27 Henquin J C, Ravier M A, Nenquin M, *et al.* Hierarchy of the β -cell signals controlling insulin secretion. *Eur J Clin Invest*, 2003, **33** (9): 742~750

Dual Role of Extracellular ATP on Secretion of Insulin in Rat Pancreatic β Cells*

WU Zheng-Xing**, XIE Li**, XU Tao***

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

Abstract By measurement of intracellular free Ca^{2+} concentration using micro-fluorometric assay, whole cell calcium current and capacitance, regulative effects of extracellular ATP on insulin secretion in primary rat β cells were studied. ATP elevated intracellular free Ca^{2+} concentration by mobilizing intercellular IP_3 sensitive calcium pool, therefore it induced a strong secretion in resting β cells. Meanwhile, ATP attenuated depolarization-evoked Ca^{2+} influx and inhibited secretion induced by excitation of cell. The results demonstrated that ATP had dual regulative effects on insulin secretion in rat β cell. It is suggested extracellular ATP signal maybe have different effects on the two phases of insulin secretion in organisms: a negative feedback effect on the first phase, and a positive feedback effect on the second. Although, there are open questions to be resolved, the data support cue to the further study of mechanism underlying ATP regulation of insulin secretion.

Key words extracellular ATP, $[\text{Ca}^{2+}]_i$, membrane capacitance, exocytosis, insulin

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30025023, 3000062, 30130230, 30240003).

** These authors contribute equally to the work.

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

Received: May 24, 2005 Accepted: June 30, 2005