

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.18.002

中心粒周蛋白对胰岛素分泌的调节作用及其机制*

王良宸^{1,2} 龚燕平^{1Δ} 李春霖¹ 祖源¹ 万丽娟¹ 孙般若¹ 李剑¹

(1 解放军总医院老年内分泌科 北京 100853; 2 空军总医院内分泌科 北京 100142)

摘要 目的: 探讨中心粒周蛋白(pericentrin, PCNT)对胰岛素双相分泌的调节作用及其机制。**方法:** 构建在小鼠胰岛β细胞中PCNT表达减少的转基因鼠(Δ PCNTβ小鼠),检测Δ PCNTβ小鼠与正常对照小鼠在给予糖耐量试验后第一时相和第二时相血糖和胰岛素分泌情况。检测两组小鼠胰岛内PCNT、胰岛素、纤维肌动蛋白(F-actin)变化情况,以及相关蛋白表达情况。**结果:** Western blot和RT-PCR显示Δ PCNTβ小鼠胰尾组织PCNT表达较对照组明显减低,免疫荧光提示Δ PCNTβ小鼠胰岛内PCNT、胰岛素表达较对照组明显减低。行腹腔注射葡萄糖耐量试验(Intraperitoneal glucose tolerance tests, IPGTT)Δ PCNTβ小鼠第一时相血糖曲线下面积(Quantification of area under the curve, AUC)显著高于对照组,第二时相血糖AUC两组小鼠间无统计学差异。Δ PCNTβ小鼠空腹胰岛素水平与对照组比较明显升高,葡萄糖刺激胰岛素分泌(Glucose stimulated insulin secretion, GSIS)后15 min胰岛素增加值显著低于对照组,30 min和120 min时胰岛素水平与对照组无显著差异。Western blot显示Δ PCNTβ小鼠与对照组比较F-actin表达明显减低,ERK、p-ERK表达明显升高。RT-PCR测定Δ PCNTβ小鼠与对照组比较ETV4表达显著升高。免疫荧光提示Δ PCNTβ小鼠胰岛内F-actin和突触融合蛋白4(Syntaxin4, Syn-4)表达较对照组明显减低。**结论:** 抑制小鼠胰岛β细胞内PCNT表达后,其通过抑制F-actin和Syn-4表达影响胰岛素分泌,导致空腹时胰岛素过度分泌和第一时相胰岛素分泌受损。

关键词: 中心粒周蛋白; 胰岛β细胞; 胰岛素; 双相分泌

中图分类号: R-33; R587.1 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2017)18-3406-07

The Mechanism of the Pericentrin in Regulating Insulin Secretion*

WANG Liang-chen^{1,2}, GONG Yan-ping^{1Δ}, LI Chun-lin¹, ZU Yuan¹, WAN Li-juan¹, SUN Ban-ruo¹, LI Jian¹

(1 Department of Geriatric Endocrinology, Chinese PLA General Hospital, Beijing, 100853, China;

2 Department of Endocrinology, Air Force General Hospital of PLA, Beijing, 100142, China)

ABSTRACT Objective: To study the effect of pericentrin (PCNT) on biphasic insulin secretion and its mechanism. **Methods:** Transgenic mice (Δ PCNTβ mice) were established with the reduction expression of PCNT in pancreatic β-cells. The blood glucose and insulin levels of the Δ PCNTβ and control mice were detected after glucose tolerance tests. PCNT, insulin, F-actin and other related factors were detected. **Results:** Western blotting and RT-PCR suggested that the expression of PCNT was significantly lower in Δ PCNTβ mice than in control group. Immunofluorescence suggested that the expressions of PCNT and insulin were significantly lower in Δ PCNTβ mice than in control group. Intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) showed that the first-phase of glucose quantification of area under the curve (AUC) was significantly higher in Δ PCNTβ mice than in control group, however no statistical difference of the second-phase of glucose AUC was observed between the two group. The fasting insulin level was significantly higher in Δ PCNTβ mice than in control group, but the change of insulin level at 15 min in GSIS was significantly lower in Δ PCNTβ mice than in control group. There was no statistical difference of the insulin levels were observed at 30 min and 120 min in IPGTT between the two group. Western blotting suggested that the level of F-actin was significantly lower in Δ PCNTβ mice than in control group, while the level of ERK and p-ERK were significantly higher in Δ PCNTβ mice than in control group. RT-PCR suggested that the expression of ETV4 was significantly higher in Δ PCNTβ mice than in control group. Immunofluorescence suggested that the expression of F-actin and Syn-4 were significantly lower in Δ PCNTβ mice than in control group. **Conclusion:** Inhibition of PCNT expression in pancreatic beta cells could lead to low expression of F-actin and Syn-4, resulting in excessive insulin secretion in the fasting phase and impaired insulin secretion in the first phase.

Key words: Pericentrin; Pancreaticβ-cell; Insulin; Biphasic secretion**Chinese Library Classification (CLC):** R-33; R587.1 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2017)18-3406-07

* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81373458)

作者简介: 王良宸(1981-), 博士研究生, 主治医师, 主要研究方向: 老年医学、糖尿病足, E-mail: owenwlc@126.com

Δ 通讯作者: 龚燕平(1977-), 博士研究生, 副主任医师, 主要研究方向: 老年医学、糖尿病、骨质疏松, E-mail: gypmrp@163.com

(收稿日期: 2016-12-11 接受日期: 2017-01-13)

前言

糖尿病作为严重危害人类健康疾病之一,其发病机制主要是胰岛素抵抗和胰岛素分泌不足。近年来大量研究者一直在探寻胰岛素分泌的机制,希望通过机制的研究能够实现胰岛素的按需分泌。胰岛 β 细胞分泌胰岛素的过程主要包括近端步骤(第二信使水平)和末端步骤(胞吐分泌)。目前的胰岛素促泌剂主要是作用在近端步骤,通过与胰岛 β 细胞上的特异性受体结合,使细胞内 ATP/ADP 比例升高,关闭 ATP 敏感的钾离子通道,抑制钾外流,使细胞膜去极化,钙离子内流,细胞内钙离子浓度增加,促进胰岛素的释放,但这一过程并不是血糖依赖性的,所以患者应用此类药物时容易出现药物性低血糖。新型的降糖药物胰高血糖素样肽(GLP-1)与胰岛素 β 细胞膜上的 GLP-1 特异性受体结合,可以实现葡萄糖依赖性的促进胰岛素分泌^[1],但就目前研究结果显示 GLP-1 对胰岛素分泌的调节主要是通过近端调节步骤,即通过环磷酸腺苷 CAMP 途径激活 PKA 来调节胰岛素的分泌^[2]。而目前在末端步骤中还没有合适的药物作用于特定的调节点来实现胰岛素分泌的有效调节。有研究表明 F-actin-Syntaxin4(纤维肌动蛋白-突触融合蛋白4)复合物在胰岛素分泌的末端步骤中起着重要的作用^[3]。我们在前期的研究发现胰岛素的过度分泌与中心粒周蛋白(Pericentrin,PCNT)的表达水平降低有关,而 F-actin 就是 PCNT 的调控靶蛋白^[4]。本研究通过 Tet-on 诱导系统构建在胰岛 β 细胞中 shPCNT 表达转基因小鼠,降低 PCNT 在胰岛 β 细胞中的表达,研究 PCNT 在胰岛素分泌第一和第二时相中对胰岛素的影响,以及 PCNT 对胰岛素分泌影响的机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

通过 Tet-on 诱导系统构建在胰岛 β 细胞中 shPCNT 表达的转基因 C57BL/6 小鼠,降低 PCNT 在胰岛 β 细胞中的表达水平。具体包括:(1)构建质粒,pRP (Exp)-TRE3G promoter>SM30-shPcnt-SM30,pRP (Exp)-insulin II promoter>Tet3G。(2)在小鼠受精卵随机插入质粒,植入母体,繁育含有质粒的 F0 代小鼠。培育出原建鼠 F0 代。(3)将含有目的基因序列 shPCNT 或 Tet3G 的 F0 代鼠与野生鼠交配繁育出能够稳定遗传 F1 代,鉴定具有目的基因的小鼠是可以具有稳定遗传功能,可以保种和传代。(4)将具有目的基因 SM30-shPcnt-SM30 的 F1 小鼠和 Tet3G 的 F1 小鼠进行交配繁育 F2 代。对 F2 代应用 Southern Blot 进行基因型鉴定,同时具有上述两种目的基因的 F2 代杂合子命名为 Δ PCNT β 。在 Δ PCNT β 小鼠 4 周龄起给予含有强力霉素的饲料(625 mg/kg)诱导基因表型。

1.2 腹腔葡萄糖耐量试验 (Intraperitoneal glucose tolerance test, IPGTT) 和葡萄糖刺激胰岛素分泌试验 (Glucose stimulated insulin secretion, GSIS)

IPGTT 用于评价小鼠第一和第二时相血糖水平,GSIS 用于评价小鼠第一和第二时相胰岛素分泌水平。所有小鼠为 8-10 周龄雄性,体重在 22 ± 2 g。试验前需空腹 14-16 小时,糖耐量试验在上午 8-9 点开始。分为 Δ PCNT β 小鼠和正常对照组,腹腔注射葡萄糖的剂量为 2 g/kg。分别在糖耐量试验 0、2、5、10、

15、30、60、90、120 分取鼠尾静脉血 1-3 μ L 测血糖,每组小鼠为 7 只。分别在糖耐量试验 0、15、30、120 min 取内眦静脉血 100 μ L,离心取血清后测胰岛素浓度,每组小鼠在每个时间点取 3 只小鼠测胰岛素浓度。内眦静脉取血前 2 min 给予腹腔注射戊巴比妥(0.5 mg/10 g)麻醉小鼠。

1.3 血糖及胰岛素检测

血糖检测应用 GE 瑞特 GM550 血糖仪(华广生物科技股份有限公司)。胰岛素测定采用酶联免疫检测法,按照胰岛素试剂盒 MERCODIA MOUSE INSULIN ELISA (Mercodia AB, Sweden)说明书要求进行胰岛素测定。

1.4 Western 印记检测相关蛋白表达

于 4℃取小鼠胰尾组织,加入蛋白裂解液后粉碎匀浆,提取上清,即为总蛋白。加入上样缓冲液,95℃煮 10 min 后冰浴 10 min。根据蛋白分子量不同应用 6%及 10%SDS-PAGE 凝胶电泳,电泳结束后采用半干转膜法将蛋白转入 PVDF 膜上。2% Casein 封闭 1 h,分别加入一抗 PCNT(1:1000)、ERK(1:1000)、p-ERK(1:1000)、F-actin(1:1000)、 β -actin(1:2 0000),4℃过夜, β -actin 为内参。TBST 洗膜三遍后加入二抗室温孵育 1.5 h 后 TBST 洗膜三遍,加入显色剂在发光仪中显影。

1.5 RNA 提取及 Q-RT-PCR

Trizol 法提取胰尾组织 RNA,应用 RT-qPCR(TOYOBO 公司,FSQ-201)说明反转录成 cDNA。cDNA 样本应用 SYBR green 方法进行 Q-RT-PCR。PCNT(上游引物:5'-CGGGCAAGGAAAGATCAACTTCG-3',下游引物:5'-TGAGTAGAATCTGGCGGCAACC-3'),ETV4(上游引物:5'-GGTGAAGAGTAGGGATGG-3',下游引物:5'-TCTGCATAAGAGGCAAAG-3')GAPDH 为内参基因(上游引物:5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTG-3',下游引物:5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3')(北京六合华大基因有限公司合成)。Q-RT-PCR 结果通过 $\Delta\Delta$ Ct 值计算基因的相对表达量。

1.6 胰腺组织免疫荧光染色

于 4℃取小鼠胰尾组织,OCT 固定,应用冰冻切片机处理标本,4%多聚甲醛固定后 PBS 洗三遍,1%BSA 封闭 30 min,加入一抗 PCNT(1:400)、INS(1:200)、F-actin(1:100)、Syn-4(1:100),4℃过夜。PBS 洗三遍加入荧光二抗室温孵育 1.5 h 后 PBS 三遍,DAPI 封片,用荧光显微镜观察。

1.7 统计分析

采用 SPSS19.0 统计软件对实验数据进行分析,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为组间差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Δ PCNT β 小鼠胰岛 β 细胞内 PCNT 表达情况

通过 RT-PCR 检测 PCNT 在 Δ PCNT β 小鼠胰尾组织中表达水平显著低于对照组($P < 0.05$),通过 Western Blot 测定 PCNT 在 Δ PCNT β 小鼠胰尾组织中明显低于对照组($P < 0.005$)。通过胰岛组织免疫荧光发现 Δ PCNT β 小鼠胰岛内 PCNT 和 INS 的表达水平均明显低于对照组($P < 0.001$),尤其是在胰岛中心部分(图 1)。

2.2 小鼠 IPGTT 和葡萄糖刺激胰岛素分泌(GSIS)结果

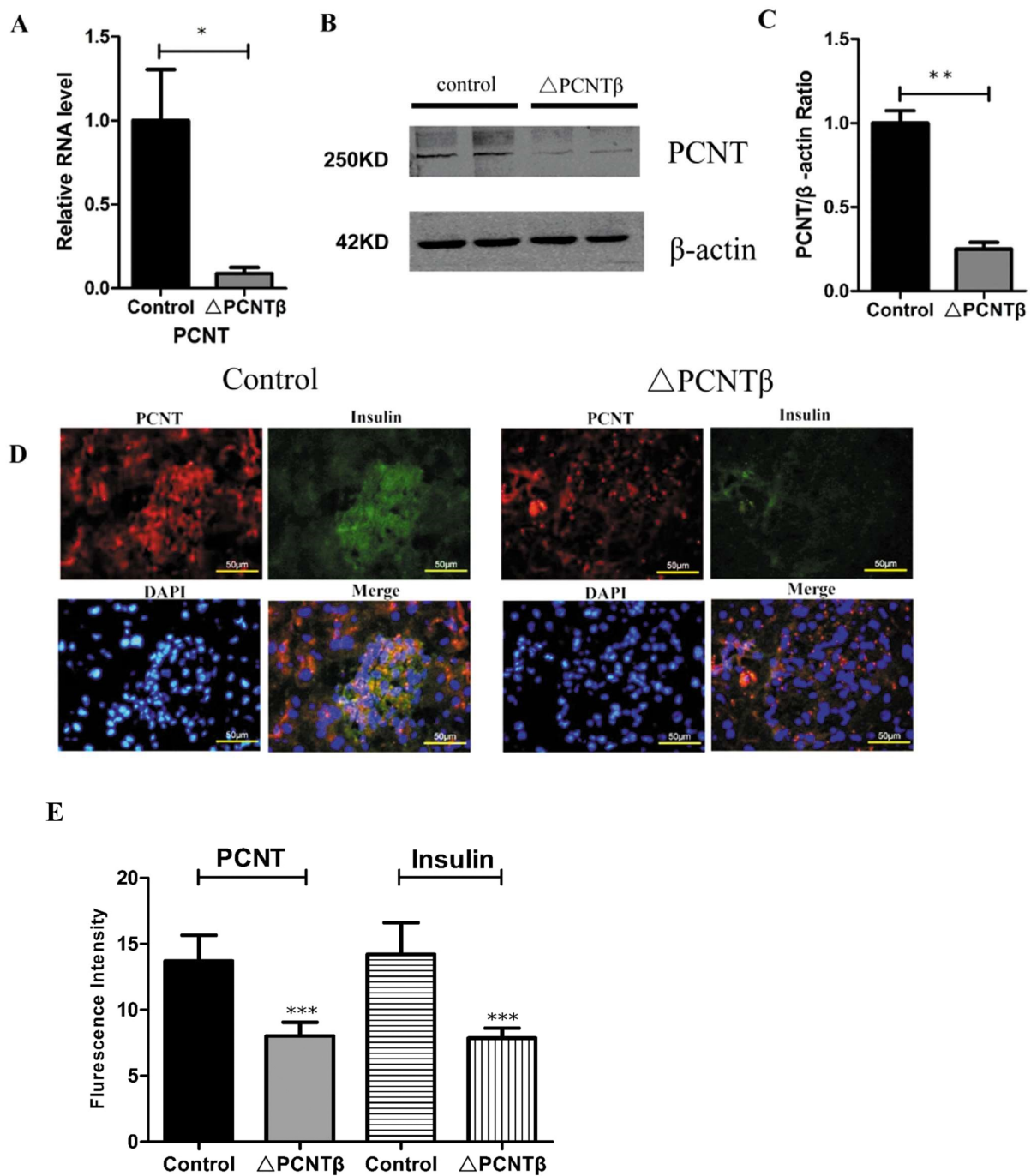


图 1 Δ PCNTβ 小鼠与对照组小鼠 PCNT 和胰岛素表达情况。A: RT-PCR 检测情况。B 和 C: Western blotting 测定情况。D 和 E: 组织免疫荧光双染检测两组小鼠胰岛中 PCNT 和胰岛素变化。(*P<0.05, ** P<0.005, *** P<0.001)

Fig.1 The expression levels of PCNT and insulin in Δ PCNTβ mice and control group. A: The result of RT-PCR. B and C: The result of WB. D and E: The changes of PCNT and INS in the two groups were detected by immunofluorescence double staining. (*P<0.05, ** P<0.005, *** P<0.001)

两组小鼠空腹血糖无明显差异,行 IPGTT 后提示 Δ PCNT β 小鼠第一时相血糖 $AUC_{4403.7 \pm 371.3}$ 显著高于对照组小鼠 2976.8 ± 224.4 组小鼠明显差 ($P<0.001$),而第二时相 AUC 两组小鼠 (Δ PCNTβ 小鼠 20145.9 ± 1925.7 小, 对照组小鼠 19899 ± 1900.4) 无统计学差异。Δ PCNTβ 小鼠空腹胰岛素 0.395 ± 0.082 较对照组小鼠 0.233 ± 0.035 显著升高 ($P<0.05$)。IPGTT 后 15min 胰岛素增加值 Δ PCNTβ 小鼠 0.183 ± 0.171 显著低于对照组 0.588 ± 0.133 ($P<0.05$),15min 胰岛素水平 Δ PCNTβ 小鼠 0.547 ± 0.153 与对照组 0.821 ± 0.133 比较虽无

统计学差异,但已明显低于对照组。30 min 和 120 min 时胰岛素水平两组小鼠 (30 min, Δ PCNTβ 小鼠 0.379 ± 0.105 , 对照组小鼠 0.336 ± 0.066 ; 120 min, Δ PCNTβ 小鼠 0.291 ± 0.062 , 对照组小鼠 0.277 ± 0.022) 无统计学差异。IPGTT 后 120 min 胰岛素增加值 Δ PCNTβ 小鼠 0.0445 ± 0.022 显著低于对照组 -0.104 ± 0.062 ($P<0.05$) (图 2)。

2.3 WB 检测小鼠胰尾组织相关蛋白表达情况

Δ PCNTβ 小鼠与对照组小鼠比较 ERK、p-ERK 水平明显升高, F-actin 水平降低明显 (图 3)。

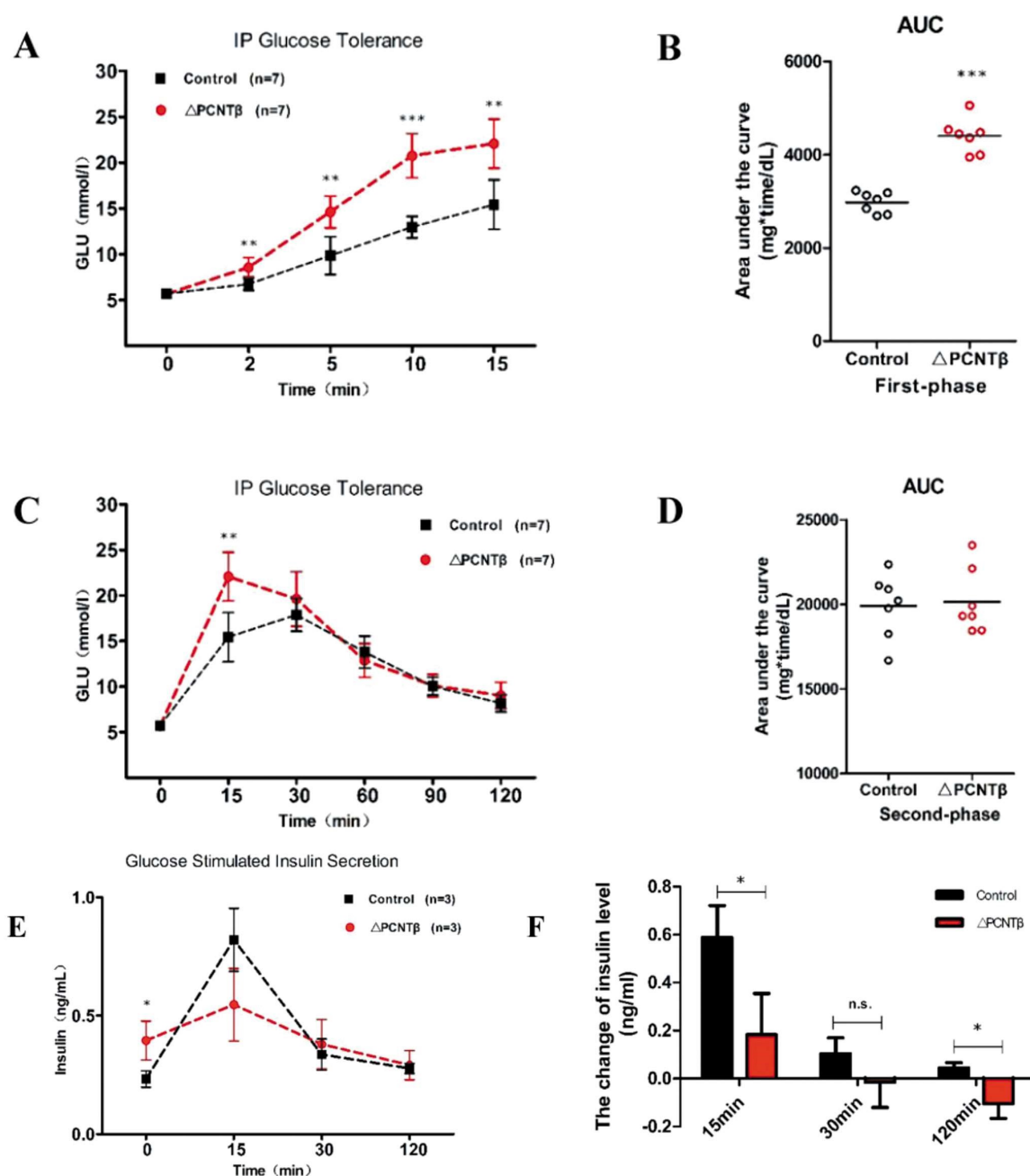


图2 PCNT 表达减低导致糖耐量受损和胰岛分泌异常。A.B IPGTT 第一时相血糖曲线和曲线下面积。C.D IPGTT 第二时相血糖曲线和曲线下面积。E.F GSIS 胰岛素水平和胰岛素增加值。(* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$)

Fig.2 Low expression of PCNT results in glucose intolerance and abnormal insulin secretion. A.B: Blood glucose curve and AUC for first-phase of individual IPGTT. C.D: Blood glucose curve and AUC for second-phase of individual IPGTT. E.F: Insulin levels and the change of insulin for individual GSIS. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$)

2.4 RT-PCR 检测胰尾组织 ETV-4 表达水平

RT-PCR 测定 Δ PCNT β 小鼠与对照组小鼠比较 ETV4 表达水平明显升高($P < 0.05$)(图4)。

2.5 小鼠胰岛组织免疫荧光检测 F-actin 和 Syn-4 情况

小鼠胰岛组织免疫荧光双染观察, F-actin 和 INS, Syn-4 和 INS 的变化。提示 Δ PCNT β 小鼠胰岛组织中 F-actin ($P < 0.001$), Syn-4($P < 0.05$)和 INS($P < 0.001$)表达较对照组明显减低(图5、图6)。

3 讨论

PCNT 是一种高度保守的脚手架蛋白,其在细胞的周期进程和信号传导过程中发挥关键作用,包括参与调控中心体的结构和功能、有丝分裂期纺锤体形成和微管成核等^[5,6]。有研究表明 PCNT 的异常表达与 II 型骨发育不良性原发性侏儒症(osteodysplastic primordial dwarfism of Majewski type 2, MOPDI-1)、肿瘤、精神疾病和纤毛类疾病的发生有关^[7,8],近年来发现其对胰岛 β 细胞的胰岛素分泌有一定的影响^[4,9]。

随着对糖尿病发病机制和胰岛 β 细胞研究的深入,目前已明确在正常情况下葡萄糖刺激后胰岛素的分泌呈双相分泌模式,即胰岛素分泌第一时相和第二时相。第一时相一般是在葡

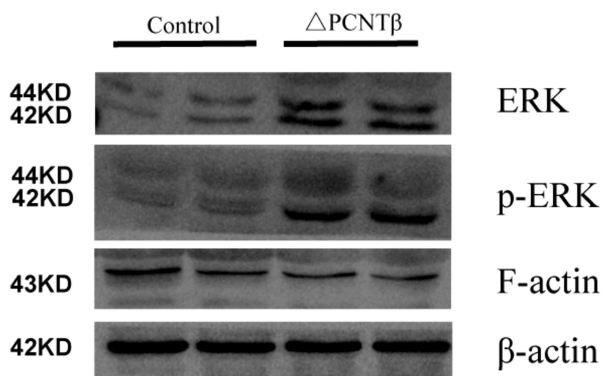


图3 WB 检测胰尾组织 ERK、p-ERK 和 F-actin 的表达情况
Fig.3 Expression of ERK, p-ERK, F-actin in tails of pancreas were detected by Western blot

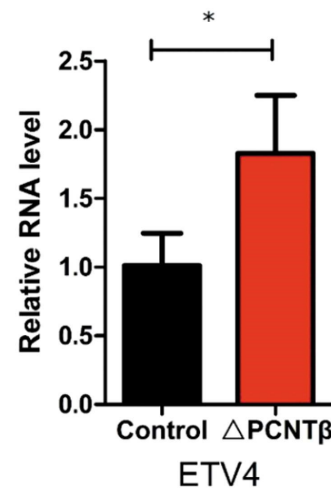


图4 RT-PCR 检测胰尾组织 ETV4 的表达情况(*P<0.05)
Fig.4 Expression of ETV4 in tails of pancreas were detected by RT-PCR.
(*P<0.05)

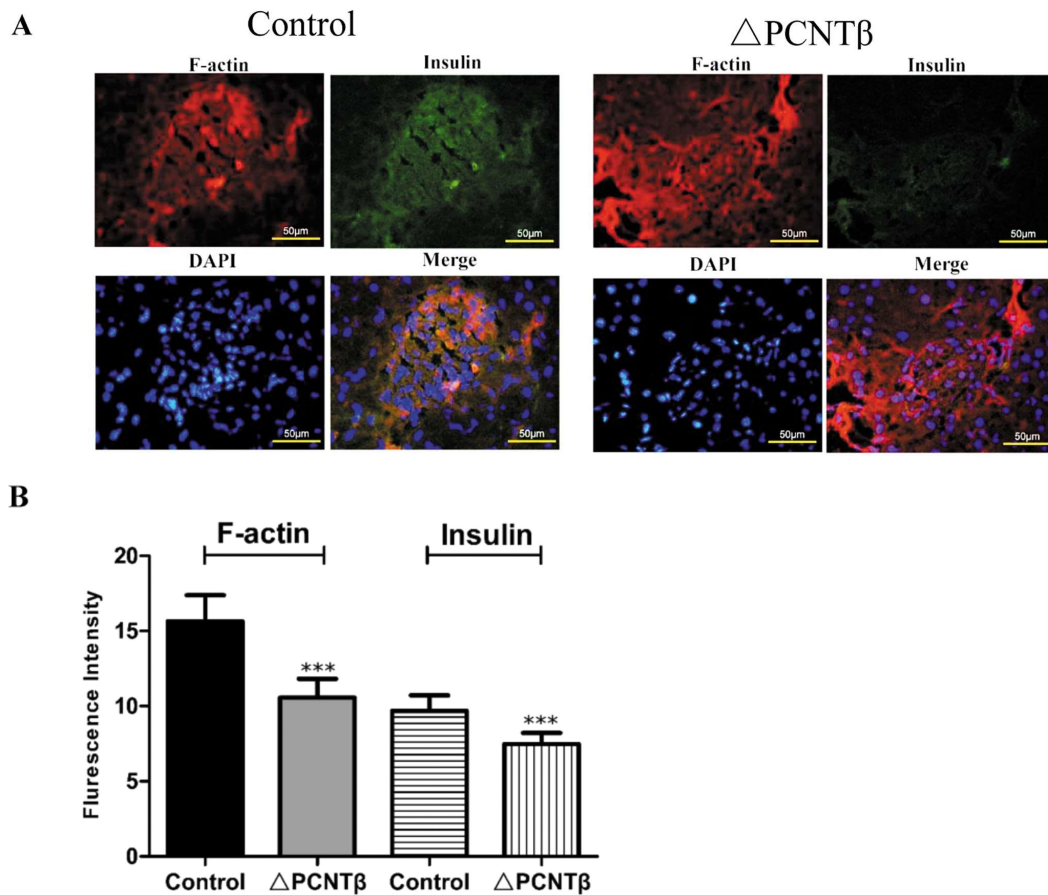


图5 胰岛组织免疫荧光双染检测 F-actin 和 INS 的变化(*** P<0.001)
Fig.5 The changes of F-actin and INS in pancreas islets were detected by immunofluorescence double staining(*** P<0.001)

葡萄糖刺激后 5-10 min,而第二时相可以持续数小时^[10]。早期糖尿病患者表现为第一时相胰岛素分泌缺失和第二时相胰岛素分泌高峰延迟^[11]。在胰岛素分泌末端调节步骤对胰岛素第一和第二时相有调节作用的蛋白主要包括 F-actin、t-SNAREs (Syn-1、Syn-4)、Munc13 以及 Munc18 等蛋白^[3,10,12-14]。我们在前期研究中通过离体细胞实验发现抑制 MIN-6 细胞 PCNT 的表达水平可能通过抑制 F-actin 的表达造成胰岛素的过度释放。在本研究中我们降低了 Δ PCNT β 小鼠胰岛 β 细胞内 PCNT 的

表达并进行 IGPTT。结果发现两组小鼠空腹血糖无统计学差异,但 Δ PCNT β 小鼠空腹胰岛素水平显著高于对照组,提示 Δ PCNT β 小鼠存在空腹状态时胰岛素的过度释放。通过组织免疫荧光明确 Δ PCNT β 小鼠胰岛内 PCNT 减少的同时胰岛素和 F-actin 水平均减低。这与我们前期细胞试验结果一致,进一步支持 PCNT 可能通过对 F-actin 的影响来胰岛素分泌。

第一时相胰岛素分泌缺失已被证明与胰岛 β 细胞膜下的 RRP 内胰岛素囊泡不足有关,这一改变与胰岛 β 细胞内的骨架

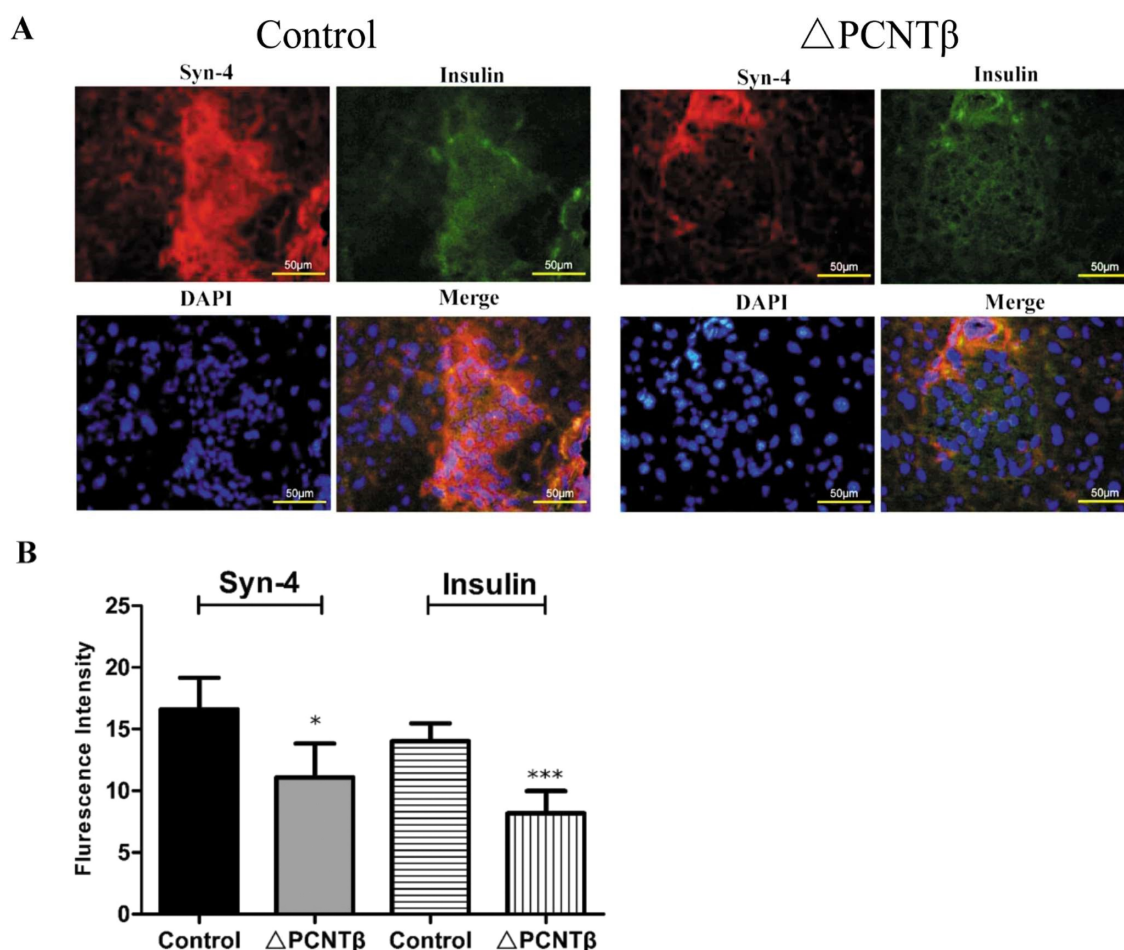


图 6 胰岛组织免疫荧光双染检测 Syn-4 和 INS 的变化。(* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$)

Fig.6 The changes of Syn-4 and INS in pancreas islets were detected by immunofluorescence double staining. (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$)

蛋白的改变有着重要的关系。细胞骨架蛋白对胰岛素分泌影响的研究已经有 40 余年, 最初的假设是细胞骨架蛋白可以阻止胰岛素囊泡在细胞膜下的锚定, 后续研究发现细胞骨架蛋白包括微管的聚合与解聚作用, F-actin 结构改变对胰岛素囊泡在胰岛 β 细胞内转移、锚定和分泌过程中都有重要的影响^[15-17]。另外对胰岛素分泌有着重要影响的就是 SNARE 蛋白复合物(包括 Syn-1, Syn-4 等), SNARE 蛋白复合物在胰岛素囊泡的锚定和分泌过程中起着重要的作用^[3]。Spurlin 等应用 SiRNA 技术降低 Syn-4 在 MIN6 细胞内的表达后发现给予高糖刺激后胰岛素分泌明显减少; 另外通过提取过表达 Syn-4 转基因鼠的胰岛 (Syn-4 表达水平是野生鼠的 2.4 倍), 并给予高糖刺激, 发现在第一和第二时相胰岛素分泌水平较对照组升高约 35%, 该研究表明 Syn-4 水平增加有利于加强胰岛素的双相分泌^[12]。另外在人胰岛 β 细胞中降低 Syn-4 的表达后发现胰岛素在第一和第二时相均减少^[18]。本研究 Δ PCNT β 小鼠基础胰岛素水平升高, 而第一时相胰岛素分泌受损, 第二时相两组小鼠血糖和胰岛素水平无明显差异, 但 Δ PCNT β 小鼠 120 min 胰岛素增加值显著低于对照组, 提示第二时相胰岛素分泌也受到一定影响。其原因可能是 PCNT 表达的下降, 导致 F-actin 表达减少, 阻止胰岛素囊泡由储藏池向可释放池转移的作用减弱, 导致空腹状态时胰岛素过度分泌, 胰岛 β 细胞膜下的胰岛素囊泡可释放池

(readily releasable pool, RRP) 内的胰岛素囊泡储备不足导致胰岛素第一时相分泌不足。同时 PCNT 表达下降后抑制 Syn-4 表达水平也会造成胰岛素第一时相分泌受损和第二时相分泌不足。

近期有研究表明在成人胰岛 β 细胞内在给予高糖刺激后, 胞内 Ca^{2+} 浓度升高激活 MEK/ERK MAPK 途径, ERK 水平的升高通过抑制泛素化酶 1 (COP1, 其抑制 ETVs 的表达) 使转录因子 ETVs 表达升高, 从而抑制胰岛素囊泡的锚定和释放^[19-21]。本研究发现 Δ PCNT β 小鼠 ERK、p-ERK、ETV4 水平升高, 可能是 PCNT 表达水平下降, 胰岛素过度释放, 胰岛 β 细胞内存在一定的反馈调节使 ERK 表达水平升高以阻止胰岛素的进一步释放, 这一机制还有待进一步的验证。

综上所述, 本研究在前期研究的基础上, 构建了在胰岛 β 细胞中 PCNT 表达减低的 Δ PCNT β 小鼠, 发现 Δ PCNT β 小鼠空腹状态时胰岛素过度分泌, 第一时相胰岛素分泌缺失和血糖升高, 而第二时相胰岛素分泌也出现分泌不足。PCNT 对胰岛素分泌影响的机制可能是通过自身表达减低后抑制 F-actin 和 Syn-4 的表达来调节胰岛素双相分泌。而 ERK 和 p-ERK 水平升高可能是阻止胰岛素的过度释放。本研究在具体机制调节方面还有待进一步深入, 但 PCNT 对胰岛素分泌的调节有可能成为糖尿病治疗的新靶点。

参 考 文 献(References)

- [1] Drucker D J, Nauck M A. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes[J]. *Lancet*, 2006, 368(9548): 1696-1705
- [2] Doyle M E, Egan J M. Mechanisms of action of glucagon-like peptide 1 in the pancreas [J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2007, 113(3): 546-593
- [3] Jewell J L, Luo W, Oh E, et al. Filamentous actin regulates insulin exocytosis through direct interaction with Syntaxin 4 [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(16): 10716-10726
- [4] Zu Y, Gong Y, Wan L, et al. Pericentrin Is Related to Abnormal β -Cell Insulin Secretion through F-Actin Regulation in Mice [J]. *Plos One*, 2015, 10(6)
- [5] Zimmerman W C, Sillibourne J, Rosa J, et al. Mitosis-specific anchoring of gamma tubulin complexes by pericentrin controls spindle organization and mitotic entry [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2004, 15(8): 3642-3657
- [6] Tibelius A, Marhold J, Zentgraf H, et al. Microcephalin and pericentrin regulate mitotic entry via centrosome-associated Chk1 [J]. *Journal of Cell Biology*, 2009, 185(7): 1149-1157
- [7] Delaval B, Duxsey S J. Pericentrin in cellular function and disease[J]. *Journal of Cell Biology*, 2010, 188(2): 181-190
- [8] Rauch A, Thiel C T, Schindler D, et al. Mutations in the pericentrin (PCNT) gene cause primordial dwarfism [J]. *Science*, 2008, 319(5864): 816-819
- [9] Jurezyk A, Pino S C, O'sullivanmurphy B, et al. A novel role for the centrosomal protein, pericentrin, in regulation of insulin secretory vesicle docking in mouse pancreatic beta-cells [J]. *Plos One*, 2010, 5(7): e11812
- [10] Wang Z, Thurmond D C. Mechanisms of biphasic insulin-granule exocytosis - roles of the cytoskeleton, small GTPases and SNARE proteins[J]. *Journal of Cell Science*, 2009, 122(7): 893-903
- [11] Gerich J E. Is reduced first-phase insulin release the earliest detectable abnormality in individuals destined to develop type 2 diabetes?[J]. *Diabetes*, 2002, 51 Suppl 1(Supplement 1): S117
- [12] Spurlin B A, Thurmond D C. Syntaxin 4 facilitates biphasic glucose-stimulated insulin secretion from pancreatic beta-cells [J]. *Molecular Endocrinology*, 2006, 20(1): 183-193
- [13] Ohara-Imaizumi M, Fujiwara T, Nakamichi Y, et al. Imaging analysis reveals mechanistic differences between first- and second-phase insulin exocytosis[J]. *Journal of Cell Biology*, 2007, 177(4): 695-705
- [14] Oh E, Thurmond D C. Munc18c Depletion Selectively Impairs the Sustained Phase of Insulin Release[J]. *Diabetes*, 2009, 58(5): 1165-1174
- [15] Li G, Runggerbrändle E, Just I, et al. Effect of disruption of actin filaments by Clostridium botulinum C2 toxin on insulin secretion in HIT-T15 cells and pancreatic islets[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 1994, 5(11): 1199-1213
- [16] Thurmond D C, Gonelle-Gispert C, Furukawa M, et al. Glucose-stimulated insulin secretion is coupled to the interaction of actin with the t-SNARE (target membrane soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor protein) complex [J]. *Molecular Endocrinology*, 2003, 17(4): 732-742
- [17] Howell S L, Tyhurst M. The cytoskeleton and insulin secretion[J]. *Diabetes*, 1986, 2(1-2): 107-123
- [18] Zhu D, Xie L, Karimian N, et al. Munc18c mediates exocytosis of pre-docked and newcomer insulin granules underlying biphasic glucose stimulated insulin secretion in human pancreatic beta-cells[J]. *Diabetologia*, 2015, 323(6): 418-264
- [19] Suriben R, Kaihara K A, Paolino M, et al. β -Cell Insulin Secretion Requires the Ubiquitin Ligase COP1[J]. *Cell*, 2015, 163(6): 1457-1467
- [20] Xie L, Zhu D, Kang Y, et al. Exocyst Sec5 Regulates Exocytosis of Newcomer Insulin Granules Underlying Biphasic Insulin Secretion[J]. *Plos One*, 2013, 8(7): e67561
- [21] Kurowska M, Goudin N, Nehme N T, et al. Terminal transport of lytic granules to the immune synapse is mediated by the kinesin-1/Slp3/Rab27a complex[J]. *Blood*, 2012, 119(17): 3879-3889