

量子点标记活细胞内 GLUT4 蛋白的研究*

曲 峰 陈祖彬 瞿安连[△]

(华中科技大学生命科学与技术学院 湖北 武汉 430074)

摘要 目的:研究量子点标记活细胞内 GLUT4 蛋白的方法,用于长时程观察活细胞内 GLUT4 的转运过程。方法:使用在 GLUT4 蛋白膜外区构建了 myc 位点的 L6-GLUT4myc 细胞系,用胰岛素刺激 L6 细胞内的 GLUT4myc 转运到细胞膜上,通过抗体抗原反应先后将一抗 9E10 和偶联二抗 IgG 的量子点与特异性位点结合。结果:通过量子点标记固定细胞内 GLUT4 的实验,证明了标记方法的特异性和灵敏性。量子点能够标记细胞膜表面的 GLUT4 蛋白并伴随 GLUT4 的胞吞进入细胞。适当调整实验温度,用量子点标记细胞膜上的 GLUT4 并且在实验过程结束后将标记了量子点的 GLUT4 保持在细胞膜表面,能够观察活细胞内 GLUT4 蛋白内化和胞内循环的过程。结论:发展了量子点标记活细胞内 GLUT4 的方法,为进一步研究活细胞内 GLUT4 的转运过程打下了基础。

关键词 量子点 葡萄糖转运蛋白 4; 型糖尿病

中图分类号 Q75 Q78 Q813 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)04-605-03

Research of Labeling GLUT4 in Live Cells Using QDs*

QU Feng, CHEN Zu-bin, QU An-lian[△]

(College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, 430074, Wuhan, China)

ABSTRACT Objective: To investigate a strategy of labeling GLUT4 in live cells using QDs for long-term observing GLUT4 translocation in live cells. Methods: L6-GLUT4myc cell line with a myc epitope in the first exofacial loop was used. GLUT4myc was translocated to the membrane after stimulated by insulin, and then labeled by 9E10 and Qdot-IgG. Results: The specificity and sensitivity were proved by labeling GLUT4 in fixed cells with QDs. QDs can be bound and internalized with GLUT4 on the membrane of live cells. The complex of GLUT4 and QDs can be retained on the membrane of live cells by control the cells in a lower temperature, and the internalization and circulation of GLUT4 can be observed. Conclusion: A method of labeling GLUT4 in live cells was developed using QDs for studying translocation of GLUT4 in live cells.

Key words: Quantum dots; GLUT4; Type diabetes

Chinese Library Classification: Q75 Q78 Q813 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)04-605-03

前言

葡萄糖转运蛋白 4(GLUT4)是骨骼肌细胞和脂肪细胞中主要的葡萄糖转运蛋白,它在人体葡萄糖代谢中起到了关键作用^[1-3]。研究表明 GLUT4 的代谢失调与 2 型糖尿病直接相关^[4,5]。因此,研究 GLUT4 的转运机制,对研究 2 型糖尿病的发病机理以及寻找有效的治疗手段至关重要。为了研究 GLUT4 的转运机制,科学家利用荧光染料和荧光蛋白(例如 Texas Red, Cy3 和 EGFP 等)标记 GLUT4,进而直接观察活细胞内 GLUT4 囊泡转运的动态过程^[6-8]。但是,由于三维单微粒定位技术的局限性以及所使用的荧光标记物易于漂白且荧光强度相对较弱的缺陷,以上提到的研究仅局限于观察 GLUT4 囊泡在细胞内转运的某些短时程或者局部区域的片段。利用半导体荧光染料量子点(QDs)标记活细胞内的 GLUT4,将有助于克服上述缺陷,为活细胞内 GLUT4 转运过程提供新的途径。本文拟对 QDs 标记活细胞内 GLUT4 蛋白的方法展开研究。

1 材料与方法

1.1 实验细胞和试剂

实验用 L6-GLUT4myc 细胞由 Amira Klip 教授提供(加拿大多伦多儿童医院)。抗 c-myc 单克隆抗体 9E10 以及耦合了羊抗小鼠 IgG 的 Qdot 605(Qdot-IgG)由 Invitrogen 公司提供。胰岛素由 Sigma 公司提供。其他试剂,如培养基、胎牛血清、双抗,均由 Invitrogen 公司提供。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 QDs 标记固定细胞内的 GLUT4 (1)在实验开始前的 24 小时,将 L6-GLUT4myc 细胞传代至实验用 chamber,用培养基孵育,37℃,5% CO₂。待细胞覆盖率达到 75%后开始实验。(2)用 PBS 洗去 chamber 中的培养基,用 4%甲醛孵育 10 分钟以处死细胞。(3)用 PBS 洗去 chamber 中的甲醛溶液,用 0.25% Triton X-100 孵育 15 分钟。(4)用 PBS 洗去 chamber 中的细胞通透液,将 9E10 1:100 稀释于 α-MEM 孵育细胞 1.5 小时。(5)

* 基金项目 国家自然科学基金项目(60571011)

作者简介:曲峰(1984-)男,博士研究生,主要研究方向:生物图像处理,单微粒跟踪。E-mail: phonequ@gmail.com

△通讯作者:瞿安连,电话:027-87792032 E-mail: alqu@mail.hust.edu.cn。

(收稿日期:2011-08-12 接受日期:2011-08-31)

吸出 chamber 中的孵育液,用 PBS 清洗 chamber 5 次,每次 3 分钟。(6)将 Qdot-IgG 1:50 稀释于 α -MEM,孵育细胞 1.5 小时。(7)重复步骤(5),用 PBS 浸润样本以备成像。

1.2.2 QDs 标记活细胞内的 GLUT4 (1)在实验开始前的 24 小时,将 L6-GLUT4myc 细胞传代至实验用 chamber,用培养基孵育 37°C 5% CO_2 。待细胞覆盖率达到 75%后开始实验。(2)实验开始前 3 小时,用 PBS 洗去 chamber 中的培养基,接着用无血清的贫化基(α -MEM)孵育细胞 37°C 5% CO_2 ,使细胞饥饿。(3)吸出 chamber 中的 α -MEM,用胰岛素刺激液(100 nM 胰岛素溶于 α -MEM)孵育细胞 10 分钟 37°C 5% CO_2 ,使细胞内的 GLUT4myc 大量上膜。(4)吸出 chamber 中的胰岛素刺激液,用经 37°C 温浴的封闭液(5%羊血清溶于胰岛素刺激液)孵育 10 分钟 37°C 5% CO_2 。(5)用经 37°C 温浴的胰岛素刺激液清洗 chamber 中的封闭液,紧接着用经 37°C 温浴的一抗孵育液(9E10 1:100 稀释于胰岛素刺激液)孵育细胞 1 小时 37°C 5% CO_2 。(6)吸出 chamber 中的孵育液,用经 37°C 温浴的胰岛素刺激液清洗 chamber 5 次,每次 3 分钟 37°C 5% CO_2 。(7)重复步骤(4)。(8)用经 37°C 温浴的胰岛素刺激液清洗 chamber 中的封闭液,紧接着用经 37°C 温浴的二抗孵育液(Qdot-IgG 1:50 稀释于胰岛素刺激液)孵育细胞 1.5 小时 37°C 5% CO_2 。(9)重复步骤(6),用培养基浸润样本以备成像。

1.3 图像采集及预处理

实验使用倒置宽场显微镜(Axiovert X100 TV, Zeiss),激发光源采用单色光源(Polychrome IV, TILL),物镜镜头选用 100 $\times$ 油镜(UplanApo, 100 $\times$, 1.35 NA, Olympus),图像采集使用制冷数字 CCD(sensicam qe, PCO)。激发光波长选择 488 nm, Qdot-IgG 发射的 605 nm 红色荧光通过 >600 nm 波长的长通滤光片滤光。曝光时间 200 ms。图像由 TILLvisION 软件采集并使用 ImageJ 预处理。

2 结果

2.1 QDs 标记 GLUT4 的特异性和灵敏性

为了验证 QDs 标记 GLUT4 方法的特异性和灵敏性,本研究在经过甲醛固定的细胞上进行了一系列实验。利用 1.2.1 中描述的试验方法,能够观察到全细胞内 GLUT4 的分布情况。如图 1(A)所示, GLUT4 在细胞膜上和细胞膜内胞质中广泛分布且在细胞核附近锥形区域有聚集现象。另外,我们做了三组对照试验。对照组一利用 QDs 标记静息状态下细胞膜表面的 GLUT4,即省去了 1.2.1 的第(3)步。实验结果如图 1(B)所示,与图 1(A)对比,静息状态下 L6-GLUT4myc 细胞表面的 GLUT4myc 数量远远小于全细胞内 GLUT4myc 的数量。这一结果符合早前的研究结论,即静息状态下大约有 3-10%的 GLUT4 在细胞膜上,而大于 90%的 GLUT4 在胞内特定的细胞器上^[9]。由此可以看出这种标记方法的灵敏性。对照组二利用 QDs 标记胰岛素刺激状态下细胞膜表面的 GLUT4。在胰岛素刺激的条件下 L6-GLUT4myc 细胞内的 GLUT4myc 响应刺激上膜,然后立即用甲醛溶液处死并固定细胞,标记并观察细胞表面 GLUT4myc 的分布,即在 1.2.1 的步骤(2)之前用 100 nM 胰岛素孵育细胞 20 分钟,并且省去第(3)步。实验结果如图 1(C)所示,与图 1(B)相比较可以看出胰岛素刺激 L6 细胞 20 分

钟后细胞膜内的 GLUT4myc 大量上膜。这一结果与之前研究中描述的胰岛素刺激使细胞膜表面的 GLUT4 增加到静息状态时的 10-20 倍^[2]相一致。对照组三为阴性对照组,即省去了 1.2.1 中一抗 9E10 孵育的步骤。实验结果如图 1(D)所示,与图 1(A)、(B)、(C)比较,证明利用抗体抗原反应标记 GLUT4myc 的特异性。

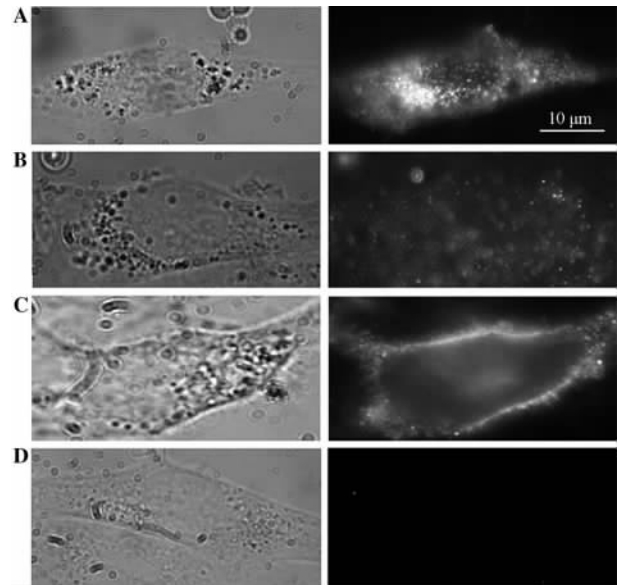


图 1 Qdot-IgG 标记固定细胞内的 GLUT4myc。(A)Qdot-IgG 标记全细胞 GLUT4myc (B)Qdot-IgG 标记静息状态下细胞膜表面 GLUT4myc; (C)Qdot-IgG 标记胰岛素刺激状态下细胞膜表面 GLUT4myc (D)没有一抗孵育的对照组。

Fig.1 Labeling GLUT4myc in fixed cells using Qdot-IgG. (A) Labeling GLUT4 in whole cell using QDs. (B) Labeling GLUT4 on membrane surface in basal state using QDs. (C) Labeling GLUT4 on membrane surface in stimulation state using QDs. (D) Control without primary antibody.

2.2 QDs 标记活细胞内的 GLUT4

用 Qdot-IgG 标记 L6-GLUT4myc 细胞中 GLUT4myc 的特异性和高灵敏度在固定细胞免疫荧光标记试验中得到验证后,开始用 Qdot-IgG 标记活细胞中的 GLUT4myc 蛋白。实验方法如 1.2.2 所述。实验结果如图 2 所示,实验细胞表面能够清晰的看到绑定了 GLUT4myc 的 Qdot-IgG,同时在细胞膜内有大量的 Qdot-IgG 并且能够观察到有部分 Qdot-IgG 聚集在细胞核周围锥形区域。由于整个实验在 37°C 条件下完成,而 L6-GLUT4myc 细胞内的 GLUT4myc 在正常生理条件下循环上膜,所以我们可以观察到细胞膜上、胞吞进入细胞以及到达细胞质内特定区域的 GLUT4myc 蛋白都被 Qdot-IgG 标记。

2.3 QDs 标记活细胞表面的 GLUT4

为特异性标记细胞膜上的 GLUT4myc 且在标记实验完成后让被标记的 GLUT4myc 全部停留在细胞表面以便于进一步观察,我们对 1.2.2 的实验条件进行了修改,即从第(6)步开始反应条件和反应试剂的温度均控制在 4°C 。在 Qdot-IgG 标记 GLUT4myc 的试验中,适当的控制 L6-GLUT4myc 细胞在 4°C 条件下培养,将能够使标记有 Qdot-IgG 的 GLUT4myc 蛋白停留在细胞膜表面。由此能够进一步观察 GLUT4 蛋白通过胞吞

进入细胞及其在胞内细胞器间循环的过程。实验的结果如图3所示。L6-GLUT4myc 细胞膜表面有大量的 Qdot-IgG ,表明细胞膜表面的 GLUT4myc 蛋白被 Qdot-IgG 标记,且在 4℃ 下一直保持在细胞膜表面,这为我们观察 GLUT4 在 L6 细胞内的循环过程特别是胞吞动力学特性提供了一个很好的研究模型。

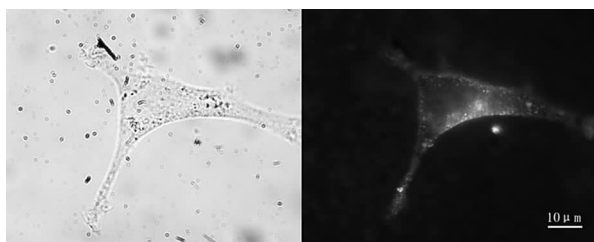


图 2 37℃ 下 Qdot-IgG 标记细胞内的 GLUT4myc

Fig. 2 Labeling GLUT4myc using Qdot-IgG in 37℃.

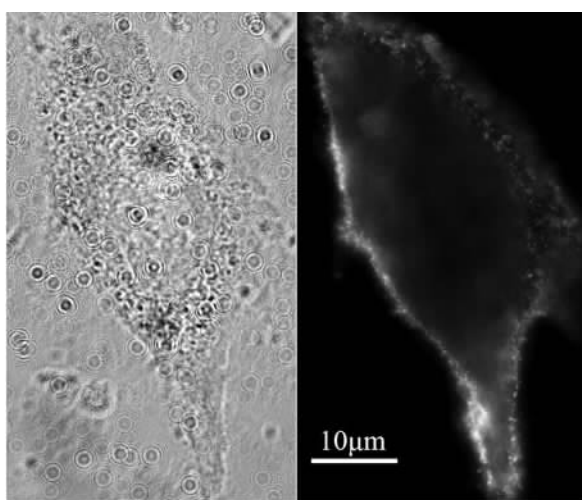


图 3 4℃ 下 Qdot-IgG 标记细胞内的 GLUT4myc。

Fig.3 Labeling GLUT4myc using Qdot-IgG in 4℃.

3 讨论

与传统的荧光标记物相比, QDs 具有独特的优点: 吸收光谱宽且连续, 发射光谱较窄且对称, 没有红尾, 荧光亮度高, 耐光漂白^[10-12]。近十年来, 表面偶联生物活性分子(例如链霉素和素、肽、蛋白质和 DNA)的 QDs 克服了传统荧光标记物荧光亮度低且易漂白的缺点, 为长时程多色标记活细胞成像提供了有效的工具^[13-16]。Klip 等人培养出了一种 L6-GLUT4myc 细胞系, 这种细胞系能稳定地过表达带 myc 位点的 GLUT4myc 蛋白, 其 myc 表位位于第 66 与第 67 个氨基酸残基之间(即 GLUT4 蛋白第一个膜外区)^[17, 18]。本文通过抗体抗原反应, 先后将一抗 9E10 和偶联了二抗 IgG 的 QDs 与 L6 细胞膜上 GLUT4 蛋白的 myc 位点结合, 用于长时程观察活细胞内 GLUT4 的转运过程。

由图 2 可知, 本研究已经成功的用 QDs 标记 L6 活细胞内的 GLUT4 蛋白。但是由于 37℃ 条件下, GLUT4 蛋白不断地在细胞膜和细胞质内特定细胞器之间循环, 在标记实验结束后还不能清楚的分辨出哪些被标记的 GLUT4 在细胞膜上, 而哪些在细胞膜内。这对研究活细胞内 GLUT4 囊泡完整的循环过程提出了新的难题。正常生理环境下的活细胞有胞吞现象, 故不

排除有一小部分 Qdot-IgG 通过胞吞作用进入细胞质内而没有和 GLUT4myc 特异性结合的可能性。

不论是在静息状态还是在有胰岛素刺激的状态, GLUT4 在细胞膜和细胞质内的特定细胞器之间不断地循环。在静息状态下, L6 细胞内一半的 GLUT4 循环上膜的时间为 2 小时, 而胰岛素的刺激将此时间缩短为 40 分钟。L6 细胞内全部 GLUT4 循环上膜的时间为 6 小时, 而胰岛素的刺激将这一时间缩短为三小时^[19]。此外, 胰岛素的刺激使细胞内 GLUT4 囊泡胞吞的速率降低了 70%, 同时使其胞吐上膜的速率提高了 7 到 10 倍^[20]。因此在胰岛素刺激的条件下用一抗孵育液孵育细胞 1 小时后, L6-GLUT4myc 细胞内的大部分 GLUT4myc 蛋白已经与一抗 9E10 结合。紧接着将细胞培养环境改变为 4℃ 并在胰岛素刺激的条件下用二抗孵育液孵育细胞, 将使细胞膜表面大部分结合了 9E10 的 GLUT4myc 保持在细胞膜上并和 Qdot-IgG 结合。因为 4℃ 的培养环境减缓甚至中止了 GLUT4 囊泡的胞吞, 同时胰岛素的刺激减缓了 GLUT4 囊泡的胞吞速率且延长了 GLUT4myc 在细胞膜表面停留的时间。在两种因素的共同作用下, 使 Qdot-IgG 与细胞膜表面 GLUT4myc 结合的时间显著延长, 并使绑定了 Qdot-IgG 的 GLUT4myc 驻留在细胞表面等待实验者观察(如图 3)。实验过程结束后, 迅速用经 37℃ 温浴的完全培养基孵育细胞, 并在 37℃, 5%CO₂ 环境下培养过夜, 能够观察到 L6-GLUT4myc 细胞在经过一段时间恢复后生理状态回复正常并继续分裂增殖, 证明 Qdot-IgG 对 L6-GLUT4myc 细胞不具备生理毒性, 不影响细胞的正常生长和增殖。

本文发展了利用 QDs 标记活细胞内 GLUT4 蛋白的方法, 并且在标记实验后 GLUT4 蛋白保持在细胞膜表面, 这为研究活细胞膜上 GLUT4 胞吞进入细胞膜内经过分选和胞内循环重新募集到细胞膜上的生命过程提供了新的途径。

参考文献(References)

- [1] Shepherd PR, Kahn BB. Glucose transporters and insulin action-implications for insulin resistance and diabetes mellitus[J]. N Engl J Med, 1999, 341(4): 248-257
- [2] Bryant NJ, Govers R, James DE. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002, 3(4): 267-277
- [3] He A, Liu X, Liu L, et al. How many signals impinge on GLUT4 activation by insulin?[J]. Cell Signal, 2007, 19(1): 1-7
- [4] Zierath JR, He L, Guma A, et al. Insulin action on glucose transport and plasma membrane GLUT4 content in skeletal muscle from patients with NIDDM[J]. Diabetologia, 1996, 39(10): 1180-1189
- [5] Zierath JR, Krook A, Wallberg-Henriksson H. Insulin action and insulin resistance in human skeletal muscle[J]. Diabetologia, 2000, 43(7): 821-835
- [6] Lampson MA, Racz A, Cushman SW, et al. Demonstration of insulin-responsive trafficking of GLUT4 and vpTR in fibroblasts[J]. J Cell Sci, 2000, 113(22): 4065-4076
- [7] Dawson K, Aviles-Hernandez A, Cushman SW, et al. Insulin-Regulated Trafficking of Dual-Labeled Glucose Transporter 4 in Primary Rat Adipose Cells*1[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001, 287(2): 445-454

(下转第 604 页)

- Guidelines for the Management of Patients With Unstable Angina/Non-ST-Elevation Myocardial Infarction) developed in collaboration with the American College of Emergency Physicians, the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and the Society of Thoracic Surgeons endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation and the Society for Academic Emergency Medicine [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2007,50(7):e1-e157
- [2] Steinhubl SR, Berger PB, Mann JT, et al. Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial[J]. *JAMA*, 2002,288(19):2411-2420
 - [3] Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, et al. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation[J]. *N Engl J Med*, 2001, 345(7): 494-502
 - [4] Serebruany VL, Steinhubl SR, Berger PB, et al. Variability in platelet responsiveness to clopidogrel among 544 individuals [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005,45(2):246-251
 - [5] Sweeny JM, Gorog DA, Fuster V. Antiplatelet drug 'resistance'. Part 1: mechanisms and clinical measurements[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2009,6(4): 273-282
 - [6] Gurbel PA, Bliden KP, Hiatt BL, et al. Clopidogrel for coronary stenting: response variability, drug resistance, and the effect of pretreatment platelet reactivity [J]. *Circulation*, 2003,107 (23): 2908-2913
 - [7] Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, et al. PIA polymorphism and platelet reactivity following clopidogrel loading dose in patients undergoing coronary stent implantation [J]. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2004,15(1):89-93
 - [8] Taubert D, von Beckerath N, Grimberg G, et al. Impact of P-glycoprotein on clopidogrel absorption [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2006,80(5): 486-501
 - [9] Mega JL, Close SL, Wiviott SD, et al. Genetic variants in ABCB1 and CYP2C19 and cardiovascular outcomes after treatment with clopidogrel and prasugrel in the TRITON-TIMI 38 trial: a pharmacogenetic analysis[J]. *Lancet*, 2010,376(9749):1312-1319
 - [10] Marcucci R, Gori AM, Paniccia R, et al. Cardiovascular death and nonfatal myocardial infarction in acute coronary syndrome patients receiving coronary stenting are predicted by residual platelet reactivity to ADP detected by a point-of-care assay: a 12-month follow-up [J]. *Circulation*, 2009,119(2):237-242
 - [11] Simon T, Verstuyt C, Mary-Krause M, et al. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events [J]. *N Engl J Med*, 2009,360(4):363-375
 - [12] Shuldiner AR, O'Connell JR, Bliden KP, et al. Association of cytochrome P450 2C19 genotype with the antiplatelet effect and clinical efficacy of clopidogrel therapy[J]. *JAMA*, 2009,302(8):849-857
 - [13] Mega JL, Close SL, Wiviott SD, et al. Cytochrome P450 genetic polymorphisms and the response to prasugrel: relationship to pharmacokinetic, pharmacodynamic, and clinical outcomes[J]. *Circulation*, 2009,119(19):2553-2560
 - [14] Brandt JT, Close SL, Iturria SJ, et al. Common polymorphisms of CYP2C19 and CYP2C9 affect the pharmacokinetic and pharmacodynamic response to clopidogrel but not prasugrel [J]. *J Thromb Haemost*, 2007,5(12):2429-2436
 - [15] Kim RB, Leake BF, Choo EF, et al. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans[J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2001,70(2):189-199

(上接第 607 页)

- [8] Bai L, Wang Y, Fan J, et al. Dissecting multiple steps of GLUT4 trafficking and identifying the sites of insulin action [J]. *Cell Metab*, 2007, 5(1): 47-57
- [9] Thong FS, Dugani CB, Klip A. Turning signals on and off: GLUT4 traffic in the insulin-signaling highway [J]. *Physiology (Bethesda)*, 2005, 20: 271-284
- [10] Gao X, Yang L, Petros J A, et al. In vivo molecular and cellular imaging with quantum dots [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2005, 16(1): 63-72
- [11] Monton H, Nogues C, Rossinyol E, et al. QDs versus Alexa: reality of promising tools for immunocytochemistry [J]. *J Nanobiotechnology*, 2009, 7: 4
- [12] Reiss P, Protiere M, Li L. Core/Shell semiconductor nanocrystals[J]. *Small*, 2009, 5(2): 154-168
- [13] Dahan M, Laurence T, Pinaud F, et al. Time-gated biological imaging by use of colloidal quantum dots [J]. *Optics letters*, 2001, 26(11): 825-827
- [14] Jaiswal JK, Goldman ER, Mattoussi H, et al. Use of quantum dots for live cell imaging[J]. *Nat Methods*, 2004, 1(1): 73-78
- [15] Chang YP, Pinaud F, Antelman J, et al. Tracking bio-molecules in live cells using quantum dots[J]. *J Biophotonics*, 2008, 1(4): 287-298
- [16] Yu HW, Lee J, Kim S, et al. Photoelectronic characterization of IgG antibody molecule-quantum dot hybrid as biosensing probe [J]. *Nanotechnology*, 2010, 21(42): 425-501
- [17] Wang Q, Khayat Z, Kishi K, et al. GLUT4 translocation by insulin in intact muscle cells: detection by a fast and quantitative assay[J]. *FEBS Lett*, 1998, 427(2): 193-197
- [18] Huang C, Somwar R, Patel N, et al. Sustained exposure of L6 myotubes to high glucose and insulin decreases insulin-stimulated GLUT4 translocation but upregulates GLUT4 activity [J]. *Diabetes*, 2002, 51(7): 2090-2098
- [19] Foster LJ, Li D, Randhawa VK, et al. Insulin accelerates inter-endosomal GLUT4 traffic via phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(47): 44212-44221
- [20] Muretta JM, Romenskaia I, Mastick CC. Insulin releases Glut4 from static storage compartments into cycling endosomes and increases the rate constant for Glut4 exocytosis [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(1): 311-323