稀土离子与胰岛素结合引起构象和聚集态变化*

程 驿** 李荣昌 王 夔***
(北京大学药学院化学生物系, 北京 100083)

摘要 为阐明稀土离子(Ln^{3+})对胰岛素的跨膜转运和降糖作用的机理, 通过谱学方法研究了 Ln^{3+}与去锌和含锌胰岛素的相互作用. 结果表明 Ln^{3+}与胰岛素的结合诱导胰岛素从二级到高级结构的改变与其浓度相关. 在低浓度下, 它们诱导胰岛素单体分子内的构象变化. 变化涉及它与胰岛素受体结合区域(B(24~30)). 这可能与 Ln^{3+}在低浓度下增强胰岛素与其受体结合有关. Ln^{3+}还能促进胰岛素单体之间的聚集. Ln^{3+}诱导胰岛素聚集的能力大于 Zn^{2+}. 这种聚集可以用 EDTA 解聚而部分恢复. 提示 Ln^{3+}诱导的聚集不是变性聚集. 与 Zn^{2+}相似, 在一定的浓度范围内, Ln^{3+}具有稳定胰岛素的作用, 但强于 Zn^{2+}.

关键词 稀土离子 胰岛素 构象 聚集态

曾有报告稀土离子(Ln^{3+})具有降糖作用, 认为有调节胰岛素分泌功能[1], 但机理不明. Williams 提出 Tb^{3+}的结合使胰岛素构象变得有利于与受体结合[2]. 我们发现经大鼠呼吸道先给 Ln^{3+}再给胰岛素时可增加胰岛素的吸收又能明显降低血糖水平, 但 Ln^{3+}与胰岛素混合后给药, 胰岛素吸收明显增加, 但是降糖作用不如前者[3]. 这说明 Ln^{3+}与胰岛素的相互作用影响它的吸收和功能.

Ln^{3+}与胰岛素结合方式及其后续变化所知甚少. 由于 Ln^{3+}与 Ca^{2+}的相似性, 它们很可能结合在 Ca^{2+}结合位点, 但不能排除其他结合位点. Dunn 等[4]认为 Ca^{2+}与含 Zn^{2+}胰岛素六聚体($(Ins)_6$-$2Zn^{2+}$)中 6 个 Glu (B13)的羧基结合构成强结合位点. 但 Alameda 等[5]认为六聚体中有 3 个等同的 Ca^{2+}强结合位点, 每个 Ca^{2+}与 2 个单体中的 Glu (B13)的羧基和 4 个 H_2O 的 OH^-结合, 因而能够桥接 2 个单体. 他们认为 Ln^{3+}在胰岛素中的特异结合位点与 Ca^{2+}相同, 而没有取代其中的 Zn^{2+}. $(Ins)_6$-$2Zn^{2+}$是胰岛β细胞内的存在形式. 其中 3 个 His(B10)的咪唑基与六聚体三重轴上的 Zn^{2+}形成配位键, 加上 Ca^{2+}的特异性结合, 稳定六聚体结构[6]. $(Ins)_6$-$2Zn^{2+}$在血液中解聚而 Zn^{2+}解离, 生成的单体与胰岛素受体结合. 如果 Ln^{3+}与胰岛素结合影响聚集-解聚平衡, 就会影响胰岛素的功能.

本工作研究 Ln^{3+}与胰岛素结合可能导致胰岛素构象变化和聚集, 来探讨 Ln^{3+}与胰岛素的作用机制和影响其吸收和功能的原因.

2001-12-28 收稿, 2002-03-20 收修改稿
* 国家自然科学基金重大项目(批准号: 29890280)
** 现在地址: Department of Cell Biology and Physiology, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA 15261, USA
*** 联系人, E-mail: wangkui@bjmu.edu.cn

1 材料和方法

1.1 试剂

含锌猪胰岛素(26 IU/mg)购自徐州生化试剂厂; 氯化稀土($LnCl_3$)溶液由相应的Ln_2O_3(99.99%)制得. 制备和浓度标定方法与文献[3]相同. 50 mmol/L Tris-HCl 的缓冲溶液, pH = 7.4; 其他试剂均为分析纯. 实验所用溶液均用灭菌去离子双蒸水配制.

去锌胰岛素的制备: 将含锌猪胰岛素溶于 pH = 3.0 HCl 配成 10 mg/mL 溶液, 然后以 1.0 mmol/L HCl 为透析液, 用截流 3000Dalton 的透析袋于 4℃下透析 48 h. 由此得到不含锌的胰岛素. 胰岛素的浓度由文献[6]所示的方法测定. 含 2 个 Zn^{2+}的胰岛素, $(Ins)_6$-$2Zn^{2+}$按摩尔比配制.

1.2 紫外示差光谱测定

用岛津 UV-vis-3100 光谱仪测定胰岛素和不同浓度的稀土离子的各反应溶液对不加 Ln^{3+}的胰岛素溶液在 250~310 nm 范围内的示差光谱. 反应温度 25℃. 混合后胰岛素及 Ln^{3+}的分析浓度见图例.

1.3 胰岛素内源性荧光和 Tb^{3+}自身荧光测定

荧光测定在岛津-540 荧光分光光度计上进行. 胰岛素内源性荧光光谱以λ_{ex} = 280 nm 为激发波长, 在λ_{em}范围为 200~400 nm 下测定. 另外在有或无 Ln^{3+}的情况下分别观测λ_{em} = 280 nm 和λ_{em} = 310 nm 处的荧光强度变化. 对于 Tb^{3+}的自身荧光, λ_{ex} = 275 nm, 在λ_{em} 460~560 nm 范围内测定. 并测定λ_{em} = 545 nm 处荧光峰的强度变化. 胰岛素和 Ln^{3+}的浓度参见图例.

1.4 胰岛素的圆二色(CD)和 FT-IR 谱测定

在 5.32×10^{-6} mol·L^{-1}的胰岛素单体溶液中加入不同量的 Tb^{3+}溶液, 反应 15 min 后, 在 190~240 nm 范围内测定 CD 谱.

胰岛素(单体浓度 5.32×10^{-5} mol/L)或相同单体浓度的$(Ins)_6$-$2Zn^{2+}$与不同浓度的 Ln^{3+}在 25℃下反应 2 h. 对照组用缓冲溶液(50 mmol/L Tris-HCl, pH = 7.4)代替 Ln^{3+}. 0.2 mg/mL 的胰岛素溶液在 4℃下用 D_2O 进行氢-氘交换. 所有样品的 FT-IR 光谱均用 Bio-Rad FTS-65A FT-IR 光谱仪采集. 在 1700~1600 cm^{-1}范围内其二级差分和去卷积光谱用 Bio-Rad Win-IR 程序和 Gauss 曲线方法进行拟合(详细方法见文献[7]).

2 结果和讨论

2.1 紫外示差光谱提示稀土离子诱导胰岛素构象改变

实验结果表明 Ln^{3+}在胰岛素单体和$(Ins)_6$-$2Zn^{2+}$上结合时的紫外示差光谱都以位于 289 和 279 nm 的 2 个吸收峰的变化为特征. 它们是胰岛素两条肽链中的 4 个酪氨酸残基(Tyr(A14), Tyr(A19), Tyr(B16), Tyr(B26)的紫外扰动峰[8]. 这些残基所处的微环境变化可反映胰岛素 A 和 B 两条链的构象变化.

图 1 为用 Zn^{2+}(a)和 Tb^{3+}(b)分别滴定胰岛素单体以及用 Tb^{3+}滴定$(Ins)_6$-$2Zn^{2+}$ (c)时, 这 2 个吸收峰强度的变化. 我们注意到ΔA 随 Zn^{2+}或 Tb^{3+}浓度增加的变化有不同程度的涨落. 这与金属离子逐级结合引起的构象的连续变化, 包含因过多金属离子的非特异性结合引起的构象变化和聚集有关. 从图 1(a)可见, 2 个吸收峰的ΔA 值随 Zn^{2+}浓度增加明显增长(R_{Zn} ([Insulin]$_{单体}$/

[Zn^{2+}])>3∶1), 然后随浓度的增加表现出涨落. 2 个 Zn^{2+}首先与 His (B10)的咪唑结合[6], 从而使胰岛素从单体形成特定的六聚体形态. 在 Zn^{2+}浓度进一步增加时表现的涨落可能由于结合在非特异性结合部位引起构象变化所致. 在用 Tb^{3+}滴定含锌胰岛素时(图 1(c)), 最初加入的 Tb^{3+}优先占据$(Ins)_6$-2Zn^{2+}中的 Ca^{2+}结合位点, Glu(B13), 导致 Glu(B13)附近的荧光生色团 Tyr(B16)的环境变化使Δ*A* 明显升高. 到 R_{Tb}([Insulin]$_{单体}$/[Tb^{3+}])≒2∶1 时升到最高值, 相当于六聚体中在 Ca^{2+}结合部位结合了 3 个 Tb^{3+}. 随着 Tb^{3+}浓度的增加, Tb^{3+}进一步结合在其他弱结合位点上, 使胰岛素的构象进一步改变, 从而连续影响其他 Tyr 所处的微环境, 而且同时会引起$(Ins)_6$-2Zn^{2+}的进一步聚集, 导致Δ*A* 值涨落. 至于用 Tb^{3+}滴定单体胰岛素时, 由于在此浓度下, 主要是以单体存在, 仅有少量二聚体[9], 所以加入的 Tb^{3+}首先结合在非特异的弱结合位点上, 也引起构象和聚集态变化, 但是涨落变化不大(图 1(b)). 显然 Tb^{3+}与 Zn^{2+}在胰岛素单体上的结合以及引起的构象变化和聚集不同. 而 Ln^{3+}结合位点不是 Zn^{2+}的结合位点. 实验结果表明无论是 Tb^{3+}还是 Zn^{2+}, 当浓度增加到一定程度以后总是Δ*A* 值下降. 这与胰岛素进一步的聚集相关. 这将由以下的实验结果得到进一步的证实.

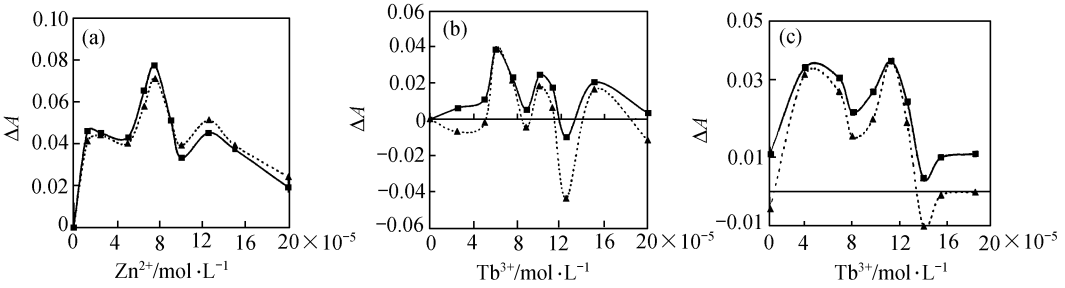


图 1　Tb^{3+}和 Zn^{2+}离子对胰岛素酪氨酸残基微环境的微扰

■: 289 nm 峰; ▲: 279 nm 峰; 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲溶液, pH = 7.4, 25℃. (a) 1.6×10^{-4} mol/L 胰岛素(单体); (b) 1.6×10^{-4} mol/L 胰岛素(单体); (c) 2.6×10^{-5} mol/L $(Ins)_6$-2Zn^{2+}

2.2　内源性荧光和稀土自身荧光的变化表明胰岛素分子内构象的改变和分子间的聚集

胰岛素中没有色氨酸, 其内源性荧光来源于酪氨酸和苯丙氨酸残基. 当在 280 nm 激发时, 内源性荧光来源于酪氨酸残基. 如图 2(a)实体曲线所示: 1.33×10^{-5} mol/L 胰岛素在 310 nm 处有一个酪氨酸的特征荧光峰, 同时在 280 nm 处存在一个微弱散射光峰[10]. 它的强弱反映胰岛素分子在溶液中的聚集情况. 由此可见在此浓度下, 胰岛素主要以单体形式存在, 同时有微量的聚集体(二聚体[9]). 我们从用 Tb^{3+}, Gd^{3+}和 Zn^{2+}滴定胰岛素单体和用 Tb^{3+}滴定$(Ins)_6$-2Zn^{2+}时, 由酪氨酸特征荧光峰和散射峰的变化可以考察这时构象和聚集态的变化.

在用 Tb^{3+}和 Zn^{2+}滴定胰岛素单体时都引起两峰增加. 但是随 Zn^{2+}的浓度的增加荧光峰下降的幅度大于 Tb^{3+}, 而散射峰增加小于 Tb^{3+}(图 2(a), (b)). 表明 Zn^{2+}在特定部位的结合影响 Tyr 环境较大, 但 Tb^{3+}的非特异性结合引起的聚集大于 Zn^{2+}. 与之不同, 在对相同胰岛素单体浓度的$(Ins)_6$-2Zn^{2+}溶液的滴定中, Tb^{3+}使散射峰强度增加幅度显著大于对不含 Zn^{2+}的胰岛素溶液的影响(图 2(c)). 说明六聚体进一步聚集. Ln^{3+}诱导蛋白质内源性荧光下降的原因可归于以下两方面[11]: (ⅰ) Tb^{3+}与蛋白质结合导致的构象改变; (ⅱ) Tb^{3+}结合在色氨酸, 酪氨酸附近的氨基酸残基上导致从残基到 Tb^{3+}的非辐射能量转移. Tb^{3+}的自身荧光峰(λ_{em} = 545 nm)强度随胰岛素浓度增加而增强(图 3(a))支持非辐射能量转移机理. 另一方面, 从 Gd^{3+}有与 Tb^{3+}相似的效应(图

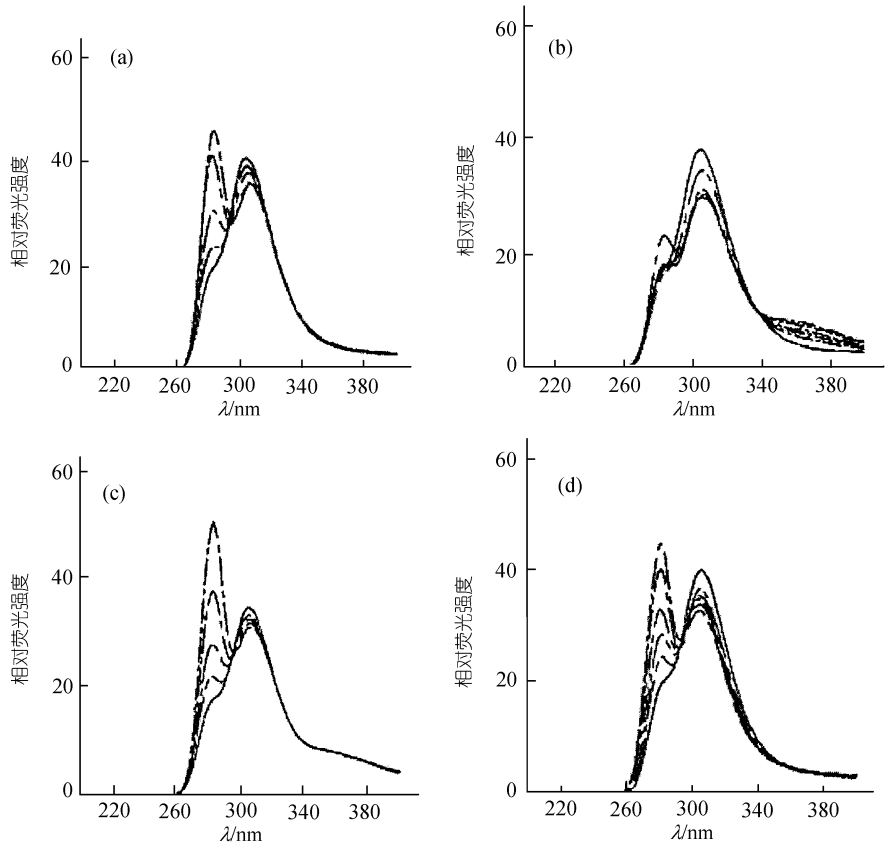


图 2 Ln^{3+}和 Zn^{2+}对胰岛素酪氨酸残基的荧光发射光谱的影响

λ_{ex} = 280 nm, λ_{em} 200~400 nm; 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲溶液, pH = 7.4, 25℃. 溶液终体积: 2 mL. (----): 滴定用 Ln^{3+} (4×10^{-3} mol/L Tb^{3+}或 4×10^{-3} mol/L Gd^{3+})或 4×10^{-3} mol/L Zn^{2+}每次加入 1 μL; 胰岛素(单体): 1.33×10^{-5} mol/L; $(Ins)_6$-$2Zn^{2+}$: 2.21×10^{-6} mol/L. (a) 胰岛素(----): Tb^{3+}; (—): 未加 Tb^{3+}; (b) 胰岛素(----): Zn^{2+}; (—): 未加 Zn^{2+}; (c) $(Ins)_6$-$2Zn^{2+}$, (----): Tb^{3+}; (—): 未加 Tb^{3+}; (d) 胰岛素(----): Gd^{3+}; (—): 未加 Gd^{3+}

2(d))看出有构象变化, 因为酪氨酸残基到 Gd^{3+}的非辐射能量转移不能发生. 因此, 可以认为这两种机理同时存在.

上述结论也可以由用 Tb^{3+}滴定去锌胰岛素溶液时, Tb^{3+}在λ_{em} = 545 nm 处的相对荧光峰强度随 Tb^{3+}浓度的变化得到支持. 从图 3(b)可见, Tb^{3+}的荧光峰强度随 Tb^{3+}浓度的增加而迅速增加, 但是分为 2 个阶段, 在第一阶段荧光的较大增长可能是由于 Tb^{3+}结合在 Ca^{2+}强结合位点 Glu(B13)上诱导的. 因为 Glu(B13)与 Tyr (B16)距离较近, 可发生从酪氨酸到 Tb^{3+}的非辐射能量转移. 而随着 Tb^{3+}浓度的增加, Tb^{3+}结合在胰岛素中的其他弱结合位点上, 进而导致其构象变化, 表现为 Tb^{3+}荧光的第二次增长.

散射峰的大小反映胰岛素分子之间的聚集程度. 当 R_{Zn} = 3∶1 时, 此时主要以紧密聚集的 $(Ins)_6$-$2Zn^{2+}$形式存在, 所以散射峰增强不大(图 3(b)), 即使增加 Zn^{2+}浓度, 散射峰的增强也非常缓慢. 但是不论向以胰岛素单体为主的溶液或$(Ins)_6$-$2Zn^{2+}$溶液中加入 Tb^{3+}, 散射峰的增强很大, 而且与 Tb^{3+}的浓度有正相关. 这表明在非特异性部位的结合会引起与胰岛素正常六聚不

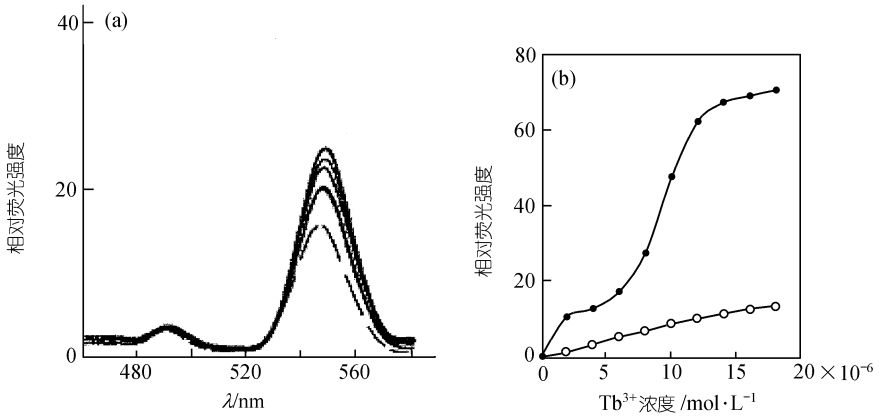


图 3　Tb^{3+}与胰岛素结合时自身荧光发射光谱的变化

λ_{ex} = 275 nm, λ_{em} = 460~580 nm; 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲溶液, pH = 7.4, 25℃. (a) 1.0×10^{-5} mol/L Tb^{3+}; (----): 未加胰岛素; (—): 每次加入 1.33×10^{-3} mol/L 胰岛素(单体)2 μL; (b) λ_{ex} = 275 nm, λ_{em} = 545 nm; ●示 5.0×10^{-6} mol/L 胰岛素(单体); ○示未加胰岛素

同的聚集. 但是从荧光峰的变化看, Tb^{3+}诱导胰岛素构象变化是胰岛素聚集的前提. 显然 Tb^{3+}促进的聚集不同于 Zn^{2+}, 但是引起的聚集程度大于 Zn^{2+}. 由于加入 EDTA 可使散射峰强度迅速减弱, 说明 Tb^{3+}诱导的聚集并非变性性聚集, 而是金属离子通过静电相互作用桥接引起的. 显然这说明 EDTA 可把引起聚集的稀土离子从非特异性位点上夺取下来, 从而解聚(图 4). 但是我们注意到 310 nm 处荧光峰变化并不明显, 说明不直接影响到胰岛素内的酪氨酸荧光, 即不影响六聚体. 不过加入过多 EDTA 时, EDTA 可能进一步去除结合在胰岛素六聚体中 Ca^{2+}结合位点上的 Tb^{3+}, 影响胰岛素内酪氨酸所处的微环境, 导致其荧光增强.

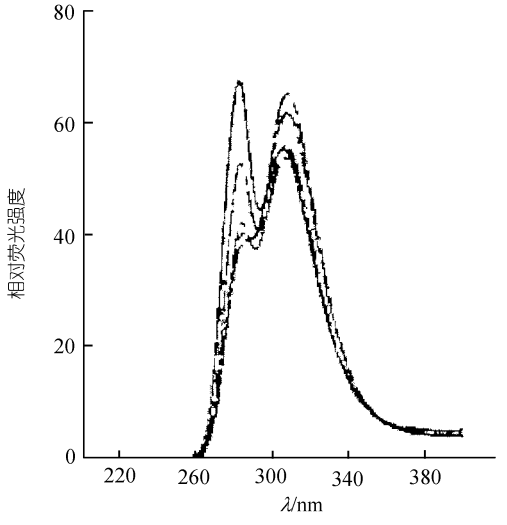


图 4　EDTA 对结合 Tb^{3+}的胰岛内源性荧光的影响

λ_{ex} = 280 nm, λ_{em} = 200~400 nm; 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲溶液, pH = 7.4, 25℃. 2.66×10^{-5} mol/L 胰岛素(单体), 1.0×10^{-5} mol/L Tb^{3+}, 曲线自下向上对应逐次加入 4.0×10^{-3} mol/L EDTA 的体积为 0, 5, 5, 5 μL

2.3　稀土离子结合影响胰岛素的二级结构

由图 5 所给的 Tb^{3+}与去锌胰岛素相互作用后的圆二色(CD)谱可见在 200~240 nm 范围内, 代表胰岛素的α-螺旋结构[12]的 208 nm 处的负峰随 Tb^{3+}浓度的增加而减少. 当浓度增加到 2×10^{-5} mol/L 之后, α-螺旋结构的含量趋于恒定(图略). 提示由于 Tb^{3+}在去锌胰岛素上的结合使构象改变, 无序性增加, 或者引起胰岛素单体的聚集.

为进一步了解上述结果, 用 FT-IR 光谱测定了 Tb^{3+}与$(Ins)_6$-$2Zn^{2+}$和去锌胰岛素作用对二级结构组成的影响(图略, 结果列于表 1, 2). $(Ins)_6$-$2Zn^{2+}$与去锌胰岛素相比, 其二级结构的变化特征之一是α-helix 含量大幅度增加, 3_{10}- helix 减少. 这些变化可能反映 Zn^{2+}结合在胰岛素 His

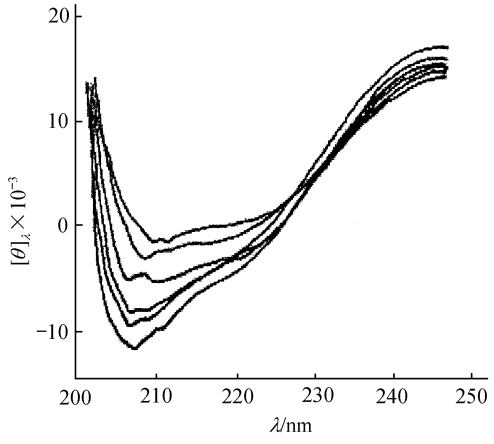


图 5 Tb^{3+}对胰岛素圆二色谱的影响

50 mmol/L Tris-HCl 缓冲溶液, pH = 7.4, 25℃. 5.0×10^{-6} mol/L 胰岛素(单体), 曲线自下向上分别对应逐次加入 4.0×10^{-3} mol/L Tb^{3+}的体积为 0, 2, 2, 2, 2, 2 μL. 反应体系终体积为 2 mL

(B10)上所导致的 B(9~19)区域内α-螺旋含量增加. 另外 1634.0 cm^{-1}附近的β-片增加 10%(表 2). 这与 Zn^{2+}的结合促进胰岛素六聚体形成有关. 若在含锌胰岛素中加入 Tb^{3+}, A(12 ~ 17)区域的 3_{10}-螺旋含量增加约 6%, 同时α-helix 含量降低约 28%. 说明 Tb^{3+}与 Glu(B13)结合使结构的无序性增加. 同时, 1626.0 cm^{-1}附近新的β-片峰的出现和 1634.0 cm^{-1}附近的β-片峰含量的减少又支持 Tb^{3+}的结合所引起的含锌胰岛素六聚体之间的聚集[13]. 值得注意的是在低 Tb^{3+}浓度下, 去锌胰岛素的 Random 结构从 18.21%显著升高到 26.15%. 基于 Random 结构位于胰岛素中 B(1~3), B(27~30), A(10~11,21)等氨基酸片段[14], 而胰岛素与胰岛素的受体结合的区域位于 B(24~30)内的 COOH-末端畴结构(Domain)内[15]. 因此 Random 结构的增加可能意味着 B(24~30)区域的构象变化有利于胰岛素与其受体的相互作用.

表 1 Tb^{3+}对无 Zn^{2+}胰岛素二级结构各组分的影响(5.3×10^{-5} mol/L 无 Zn^{2+}胰岛素)

结构	峰位/cm^{-1}	百分率/%				肽段
		Tb^{3+}/mol · L^{-1}				
		0	5.0×10^{-5}	2.6×10^{-4}	5.0×10^{-4}	
β-转角	1689	0.15		0.36	0.34	B(20~22)
	1681	2.33	2.40	5.57	5.28	B(7~8), A(18~20)
β-片	1674	3.45	3.36	5.72	5.36	
	1634~1635	29.94	33.26	15.10	13.70	A(1~9)
	1626			19.92	16.62	
延伸链	1667~1668	7.49	7.25	8.15	9.13	B(4~6), B(1~6)
	1611~1612	1.45	0.10	1.57	3.72	
3_{10}-螺旋	1658~1660	17.44	13.09	13.41	17.41	A(12~17)
α-螺旋	1651~1653	19.54	14.40	12.93	9.00	B(9~19),B(9~15)
无规卷曲	1643~1645	18.21	26.15	17.27	19.43	A(10~11,21) B(27~30), B(1~3)

表 2 Tb^{3+}对$(Ins)_6$-$2Zn^{2+}$二级结构各组分的影响(8.8×10^{-6} mol/L$(Ins)_6$-$2Zn^{2+}$)

结构	峰位/cm^{-1}	百分率/%				肽段
		Tb^{3+}/mol · L^{-1}				
		0	5.0×10^{-5}	1.1×10^{-4}	2.6×10^{-4}	
β-转角	1681~1682	2.21	8.40	2.95	6.07	B(7~8), A(18~20)
β-片	1674	3.47	5.78	3.40	5.06	
	1634~1636	38.60	14.41	14.86	11.37	A(1~9)
	1624~1627		14.32	17.91	19.23	
延伸链	1667	6.12	9.67	8.72	9.89	B(4~6), B(1~6)
	1611~1612	0.21	3.44	0.45	2.64	
3_{10}-螺旋	1659	11.05	17.71	17.01	16.21	A(12~17)
α-螺旋	1649~1652	38.34	9.53	10.53	9.51	B(9~19),B(9~15)
无规卷曲	1643~1645		16.75	24.17	20.02	A(10~11,21) B(27~30), B(1~3)

3　结论

(ⅰ) Ln^{3+}与胰岛素单体和$(Ins)_6$-$2Zn^{2+}$的结合都可诱导胰岛素二级到高级结构变化. 变化涉及构象变化和分子聚集且与 Ln^{3+}在胰岛素单体和$(Ins)_6$-$2Zn^{2+}$中的结合部位和结合量有关, 所以这些改变都依赖于 Ln^{3+}浓度.

(ⅱ) Ln^{3+}对胰岛素单体和$(Ins)_6$-$2Zn^{2+}$的上述影响表现不同. 这与 Ln^{3+}在两者中的优先结合部位不同有关. Ln^{3+}作用于胰岛素单体时, 在低浓度下, 它们的结合使构象改变, 这涉及到胰岛素与其受体结合的肽段(B(24~30)). 这可能是 Ln^{3+}在低浓度下增强胰岛素与其受体相互作用的原因之一. 较高浓度的 Ln^{3+}能促进胰岛素单体的聚集. 但是由于 Zn^{2+}的优先配位基团和 Ln^{3+}不同, 所以两者所诱导的胰岛素聚集体组成和结构都可能不同. 在 Ln^{3+}与$(Ins)_6$-$2Zn^{2+}$作用时, Ln^{3+}结合在六聚体轴中心位置, 虽然单体间相互作用有些变化, 但不破坏六聚结构. 在 Ca^{2+}结合部位被 Ln^{3+}占据之后, 更多的 Ln^{3+}在非特异性部位结合会引起六聚体之间聚集. 虽然过量的 Zn^{2+}也有此效应, 但是 Ln^{3+}诱导六聚体之间聚集的能力要大于 Zn^{2+}.

(ⅲ) 可以认为在 Ln^{3+}与含锌胰岛素混合给药时, Ln^{3+}在$(Ins)_6$-$2Zn^{2+}$中 Ca^{2+}特异性结合部位结合可参与稳定六聚体结构, 但是在非特异性结合部位结合则诱导六聚体之间的聚集. Ln^{3+}诱导六聚体二次聚集妨碍在血液中解聚成单体, 所以血液中胰岛素单体的浓度增加的并不显著, 故最终对血糖降低的影响程度也不大[3].

参　考　文　献

1　聂毓秀, 周　莉, 黄可欣. 低剂三氯化镧对糖尿病大鼠胰岛细胞分泌功能的调节作用. 白求恩医科大学学报, 1997, 23: 588~590

2　Williams P F, Turtle J R. Terbium, a fluorescent probe for insulin receptor binding. Diabetes, 1984, 33: 1106~1111

3　Cheng Y, Shen Z, Zhang Q, et al. Lanthanides enhance absorption of insulin and reduction of blood glucose of rat by administration by pulmonary administration. Chin Sci Bull, 2000, 45: 604~608

4　Sudmeier J L, Bell S J, Storm M C, et al. Cadmium-113 nuclear magnetic resonance studies of bovine insulin: Two-zinc insulin hexamer specifically binds calcium. Science, 1981, 212: 560~562

5　Alameda G K, Evelhoch J L, Sudmeier J L, et al. Characterization of the internal calcium(Ⅱ) binding sites in dissolved insulin hexamer using europium(Ⅲ) fluorescence, Biochemistry, 1985, 24: 1757~1762

6　Dunn M F, Pattison S E, Storm M C, et al. Comparison of the zinc binding domains in the 7S nerve growth factor and the zinc-insulin hexamer. Biochemistry, 1980, 19: 718~725

7　Cheng Y, Yao H, Lin H, et al. The events relating to lanthanide ions enhanced permeability of human erythrocyte membrane: Binding, conformational change, phase transition, perforation and ion transport. Chem-Biol Interact, 1999, 121: 267~289

8　Lord R S, Gubensek F, Rupley J A. Insulin self-association. spectrum changes and thermodynamics. Biochemistry, 1973, 12: 4385~4391

9　Holladay L A, Ascoli M, Puett D. Conformational stability and self-association of zinc-free bovine insulin at neutral pH. Biochim Biophys Acta, 1977, 494: 245~254

10　Brand J G, Cagen R H. Fluorescence characteristics of native and denatured monellin. Biochim Biophys Acta, 1977, 493: 178~187

11　Lin W, Dombrosky P, Atkins W M, et al. Terbium(Ⅲ) luminescence study of tyrosine emission from *Escherichia coli* glutamine synthetase. Biochemistry, 1991, 30: 3427~3431

12　Goldman J, Carpenter F H. Zinc binding, circular dichroism, and equilibrium sedimentation studies on insulin (bovine) and several of its derivatives. Biochemistry, 1974, 13: 4566~4574

13　Fink A L. Protein aggregation: Folding aggregates, inclusion bodies. Fold Des, 1998, 3 :R9-R23

14　Wei J, Lin Y, Zhou J, et al. FTIR studies of secondary structures of bovine insulin and its derivatives. Biochim Biophys Acta, 1991, 1080: 29~33

15　Mirmira R G, Tager H S. Disposition of the phenylalanine B25 side chain during insulin-receptor and insulin-insulin interactions. Biochemistry, 1991, 30: 8222~8229