

钒化合物与胰岛素的结合扰动胰岛素的构象和聚集状态*

杨晓改¹ 杨晓达^{1,2**} 王夔^{1,2} 李荣昌¹

1. 北京大学药学院化学生物学系, 北京 100871; 2. 北京大学天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100083

摘要 运用荧光光谱、圆二色散(CD)及 Fourier 变换红外光谱(FT-IR)等谱学方法研究了不同钒化合物与去锌胰岛素的相互作用. 结果表明, 钒化合物 NaVO_3 、 $\text{VO}(\text{acac})_2$ (bis(acetylacetonato)oxovanadium)和 $\text{VO}(\text{ma})_2$ (bis(maltolato)oxovanadium)都能与胰岛素结合, 在 20°C 下的表观结合常数依次为 $(0.17 \pm 0.01) \times 10^4$, $(2.8 \pm 0.2) \times 10^4$ 和 $(4.0 \pm 0.1) \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$. 钒化合物的作用使源于酪氨酸残基的蛋白质自身荧光发生静态淬灭; 同时 280 nm 处的散射峰强度减弱, 提示钒化合物的作用使胰岛素趋向解聚, 且 CD 谱 273 nm 峰减弱也支持胰岛素的解聚. 另外, 钒化合物使胰岛素 FT-IR 谱中 $1650 \sim 1653 \text{ cm}^{-1}$ 处出现新峰, 此峰代表胰岛素 B 链中的 B(9-19) 肽段的 α -helix 结构, 它的出现表明胰岛素从伸展的构象(T 状态)向螺旋构象(R 状态)的改变. 总之, 钒化合物与去锌胰岛素结合后, 可导致去锌胰岛素的解聚, 同时诱导胰岛素从 T \rightarrow R 的构象转变, 这些作用可能是钒化合物使胰岛素与其受体结合力增强的一个原因.

关键词 胰岛素 钒化合物 构象

近年来, 钒化合物的降糖作用颇引人注目, 几乎所有的钒化合物, 无论是简单的钒酸盐(V), 钒(V)的过氧化物还是钒(IV)的有机配合物口服后都具有降糖能力, 但是显然作用能力不同^[1~5]. 有研究者认为这种差异不能完全归于肠吸收的不同, 因为它们与脂溶性和小肠吸收率都没有严格的正比关系. 即使通过静脉注射绕过胃肠道消除了吸收程度的差别, 它们的作用仍有差异^[6]. 这提示我们不同的钒化合物的降糖机理可能不同. 尽管钒化合物在体内的抗糖尿病效应的作用机制了解得还不是很清楚, 体内和体外的数据显示钒的确能影响胰岛素信号转导路径的许多方面^[4]. Kwong 等曾研究了钒化合物对胰岛素与胰岛素受体结合的影响^[7], 提出钒的过氧化物作为调节剂(modulator)形成调节剂-受体-胰岛素的三元配合物, 从而影响胰岛素和其受体的结合. 但是钒化合物是作用于胰岛素受体还是胰岛素, 抑或两者均有, 则还不清楚. 由于胰岛素与靶细胞膜上的相应受体间的特异性结合是胰岛素发

挥生物功能的最初事件, 而只有胰岛素单体才能与胰岛素受体结合, 因此钒化合物与胰岛素单体(即去锌胰岛素)的作用对解释钒化合物的降糖机理可能是关键的问题之一.

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

试剂: 含锌天然人胰岛素($26 \text{ IU} \cdot \text{mg}^{-1}$)购自 Sigma; 钒化合物由 Crans 教授(Colorado State University, USA)惠赠; N-2-hydroxy-ethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES)购自 Sigma; 其他试剂均为分析纯; NaVO_3 , bis(acetylacetonato)oxovanadium(IV) ($\text{VO}(\text{acac})_2$) 和 bis(maltolato)oxovanadium(IV) ($\text{VO}(\text{ma})_2$) 的储备液均在使用前配制于 HEPES 等渗溶液 (NaCl , $135 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; HEPES, $15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; pH 7.4); 实验所用溶液均用去离子双蒸水配制.

去锌胰岛素的制备^[8]: 将 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的含锌人胰

2002-03-20 收稿, 2002-05-09 收修改稿

* 国家自然科学基金(批准号: 20101001)资助项目

** 联系人, E-mail: xiaodayang@hotmail.com

胰岛素溶于 $\text{pH} = 3.0$ 的 HCl 溶液中, 然后以 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HCl 为透析液; 用截留分子量为 3000 的透析袋于 4°C 下进行透析 48 h, 由此得到不含锌的纯胰岛素. 胰岛素的浓度(按单体计)由 280 nm 处的吸光度用摩尔消光系数 $\epsilon_{280} = 5700 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 计算^[9].

仪器: 岛津-540 荧光分光光度计, JASCO J-720 型圆二色散仪; Bio-Rad FTS-65A FT-IR 光度仪; pH-2 型酸度计.

1.2 钒化合物对胰岛素内源性荧光的影响

荧光测定在岛津-540 荧光分光光度计上进行. 去锌胰岛素的终浓度为 $4.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 反应溶液的总浓度为 3 mL. 胰岛素与不同浓度的钒化合物分别在 $(20 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 和 $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 反应 1 h 后, 记录荧光光谱. 胰岛素内源性荧光光谱以 $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ 为激发波长, 在 λ_{em} 的范围为 200~400 nm 下测定, 在有或无钒化合物存在的条件下观测 $\lambda_{\text{em}} = 310 \text{ nm}$ 处的荧光强度和 280 nm 散射光的变化.

1.3 胰岛素的圆二色散(Circular Dichroism, CD)谱测定

所有进行 CD 谱测定的样品均为 HEPES 等渗溶液 (NaCl , $135 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; HEPES, $15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; $\text{pH} 7.4$), 去锌人胰岛素的终浓度为 $4.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 钒化合物的终浓度为 $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. 钒化合物与胰岛素反应 1 h 后

($37 \pm 0.5^\circ\text{C}$), 在 JASCO J-720 型圆二色散仪上进行胰岛素 CD 谱的测定. 石英杯光程长度为 0.1 cm, 谱带宽度为 2.0 nm, 扫描速率为 $50 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$, 灵敏度为 $10 \text{ mdeg} \cdot \text{cm}^{-1}$, 时间常数为 4 s.

1.4 胰岛素的 Fourier 变换红外光谱(Fourier Transformed Infrared Spectroscopy, FT-IR)测定

$4.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的胰岛素与 $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 不同的钒化合物在 $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 反应 1 h; 对照组用等体积的缓冲溶液 (NaCl , $135 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; HEPES, $15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; $\text{pH} 7.4$) 代替钒化合物. 反应后冷冻干燥, 再在 4°C 下用重水溶解, 进行 24 h 的氘交换, 再一次冷冻干燥后用 D_2O 配制 $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的胰岛素溶液. 所有样品的 FT-IR 谱均用 Bio-Rad FTS-65A FT-IR 光度仪采集, 然后减去在同样实验条件下记录的水蒸气光谱, 在 $1700 \sim 1600 \text{ cm}^{-1}$ 范围内的去卷积光谱用 Win-IR 模拟程序和 Gauss 曲线方法拟合^[10].

2 实验结果和讨论

2.1 去锌胰岛素的制备

去锌胰岛素按文献[8]方法制备, 经原子吸收光谱法测定, 制得的去锌胰岛素单体中的锌含量 $< 2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

2.2 钒化合物对胰岛素内源性荧光的影响

研究结果表明 3 种钒化合物都能够使胰岛素的自身荧光淬灭(图 1).

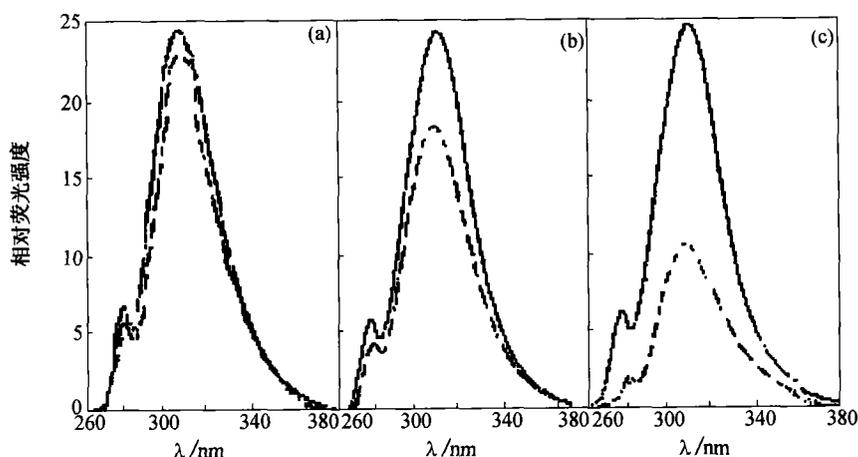


图 1 天然人胰岛素($4 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)与不同钒化合物($4 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)作用后的荧光光谱

实线: 胰岛素; 虚线: 胰岛素 + 钒化合物;
(a) NaVO_3 ; (b) $\text{VO}(\text{acac})_2$; (c) $\text{VO}(\text{ma})_2$

因为胰岛素中没有色氨酸残基, 其内源性荧光来自于酪氨酸和苯丙氨酸残基. 在 280 nm 激发时, 内源性荧光则来源于 4 个酪氨酸残基 A14, A19, B16 和 B26^[11]. 如图 1 所示, $4.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 去锌胰岛素在 310 nm 处有酪氨酸的特征荧光峰, 同时在 280 nm 处存在一个散射峰, 后者的强弱反映了胰岛素分子在溶液中的聚集情况^[12], 在此介质中 ($\text{NaCl}, 135 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; $\text{HEPES}, 15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; $\text{pH } 7.4$), 胰岛素主要以单体形式存在, 同时也有多种聚集体共存^[13, 14]. 当加入钒化合物时, 310 nm 处的酪氨酸特征荧光峰强度下降, 同时 280 nm 处的散射峰相应减小, 说明在钒化合物的作用下, 胰岛素的多聚体有解聚的趋势.

进一步分析钒化合物对胰岛素内源性荧光的淬灭, 可确定其淬灭方式. 一般来说, 荧光淬灭可分做两类: 动态淬灭和静态淬灭^[15]. 可以通过在不同温度下测定的不同浓度淬灭剂 Q 存在下的荧光强度, 按照 Stern-Volmer 方程的相对荧光强度与淬灭剂浓度的关系确定淬灭的性质:

$$F_0/F = 1 + K[Q]$$

其中, F_0 和 F 分别是没有和有淬灭剂时测得的荧光强度, $[Q]$ 是淬灭剂的浓度. 在动态淬灭中, K 就是 Stern-Volmer 淬灭常数 K_D ; 在静态淬灭时, 它就成为淬灭剂和荧光体形成配合物的结合常数 K_S .

如图 2 所示, 3 种钒化合物在 37°C 时对胰岛素内源性荧光的淬灭能力均比在 20°C 时低, 尤其对于 $\text{VO}(\text{acac})_2$ 和 NaVO_3 . 这说明 3 种钒化合物的淬灭主要属于静态淬灭, 即形成了钒配合物-胰岛素复合物, 因为温度升高可降低配合物的稳定性从而降低了静态淬灭常数. 而当钒化合物浓度较低时, 两种温度下的 Stern-Volmer 曲线均为直线, 从其斜率可以得到它们的表观结合常数(见表 1).

表 1 钒化合物与胰岛素的表观结合常数 (K_s)

($10^{-4} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$)			
$T/^\circ\text{C}$	NaVO_3	$\text{VO}(\text{acac})_2$	$\text{VO}(\text{ma})_2$
20	0.17 ± 0.01	2.8 ± 0.2	4.0 ± 0.1
37	0.11 ± 0.01	1.2 ± 0.3	3.7 ± 0.3

从表中计算结果可看到, $\text{VO}(\text{ma})_2$ 与 $\text{VO}(\text{acac})_2$ 较 NaVO_3 易于与胰岛素结合. 但随着钒化合物浓度的增高, 除了形成复合物形式的静态淬灭以外, 也产生了分子碰撞形式的动态淬灭, 呈现为向上弯曲的形状(见图 2).

3 种化合物相比, NaVO_3 的作用非常微弱, $\text{VO}(\text{ma})_2$ 和 $\text{VO}(\text{acac})_2$ 的淬灭能力较大, 且 $\text{VO}(\text{ma})_2 > \text{VO}(\text{acac})_2$. 这提示它们结合方式可能有所差异, 而这种差异必然与它们的作用物种相关. 但有一点它们是相似的, 其作用结果使胰岛素的多聚体都有解聚的趋势.

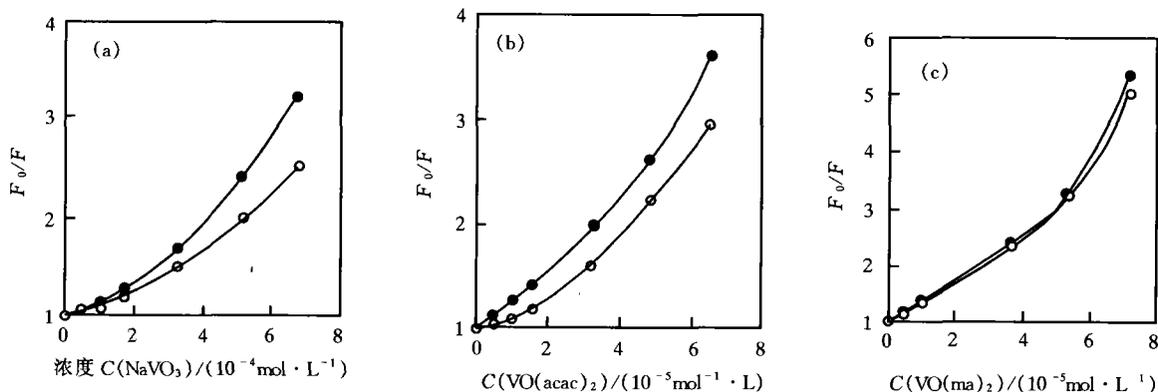


图 2 不同温度下钒化合物淬灭胰岛素内源性荧光的 Stern-Volmer 图

● 为 20°C; ○ 为 37°C

2.3 钒化合物对胰岛素 CD 谱的影响

胰岛素的 CD 谱在 200~300 nm 显示出 3 个特征峰: 208, 222 及 273 nm, 273 nm 的峰应归属于二硫桥及 Tyr-B26 和 Phe-B24 或 Phe-B25^[16], 此峰的

减弱是与胰岛素的解聚相关的^[16]. 相反此峰的增强与其聚合有关^[16], 许多金属离子在胰岛素晶体的形成中由于能替换锌离子, 而造成在 273 nm 处峰的增强^[16]. 222 nm 峰大体上可归属于 β 结构, 208 nm

的峰大部分应归属于 α -helix^[17].

如图3所示, 3种钒化合物与去锌胰岛素作用后, α -helix 均略微下降, β 结构相应略微上升. 三者相比值得注意的是, 273 nm 的峰均减弱, 如前所述, 此峰的减弱是与胰岛素的解聚相关的. 说明3种钒化合物与去锌胰岛素的结合导致了胰岛素的解聚. 同时 Tyr-B26 和 Phe-B24 或 Phe-B25 恰处在胰岛素与受体结合的部位, 所以我们认为, 3种钒化合物的结合扰动了胰岛素与其受体结合区的构象.

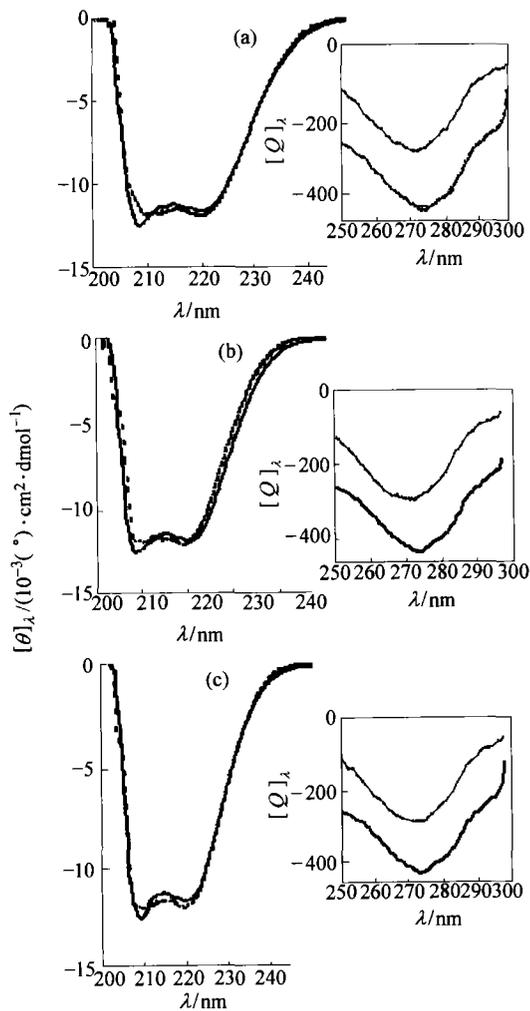


图3 不同钒化合物($5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)与胰岛素($4 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)作用后的 CD 谱
实线: 胰岛素; 虚线: 胰岛素 + 钒化合物.
(a) NaVO_3 ; (b) $\text{VO}(\text{acac})_2$; (c) $\text{VO}(\text{ma})_2$

2.4 钒化合物对胰岛素 FT-IR 谱的影响

钒化合物对去锌胰岛素二级结构的影响可由 FT-IR 光谱更精细地确定. 图4代表去锌胰岛素的酰胺 I 带去卷积拟合后的各子峰谱, 对照组和实验组进行曲线拟合后得到各子峰的面积, 根据文献

[18]的指认, 归属了各个子峰并计算了各自的质量分数 w (见表2). 可以观察到, 在与 $\text{VO}(\text{acac})_2$ 作用下, 出现了 1628 cm^{-1} 处的新峰; 在与 NaVO_3 和 $\text{VO}(\text{ma})_2$ 作用后, 出现了 1665 cm^{-1} 处的新峰. 值得注意的是, 加入钒化合物后, 在 $1650 \sim 1653 \text{ cm}^{-1}$ 处出现的新峰, 此峰代表了胰岛素 B 链中的 B(9-19) 肽段的 α -helix 结构, 它的出现表明胰岛素从伸展的构象(T 状态)向螺旋构象(R 状态)的改变^[19, 20]. 已知, 胰岛素从 T \rightarrow R 的构象转变对于胰岛素与其受体的结合至关重要^[21], 在上述影响方面 $\text{NaVO}_3 > \text{VO}(\text{ma})_2 > \text{VO}(\text{acac})_2$. 在 T \rightarrow R 的构象转变中, Tyr(B26)更多地暴露于溶剂^[21], 这会导致钒化合物对胰岛素内源性荧光的淬灭.

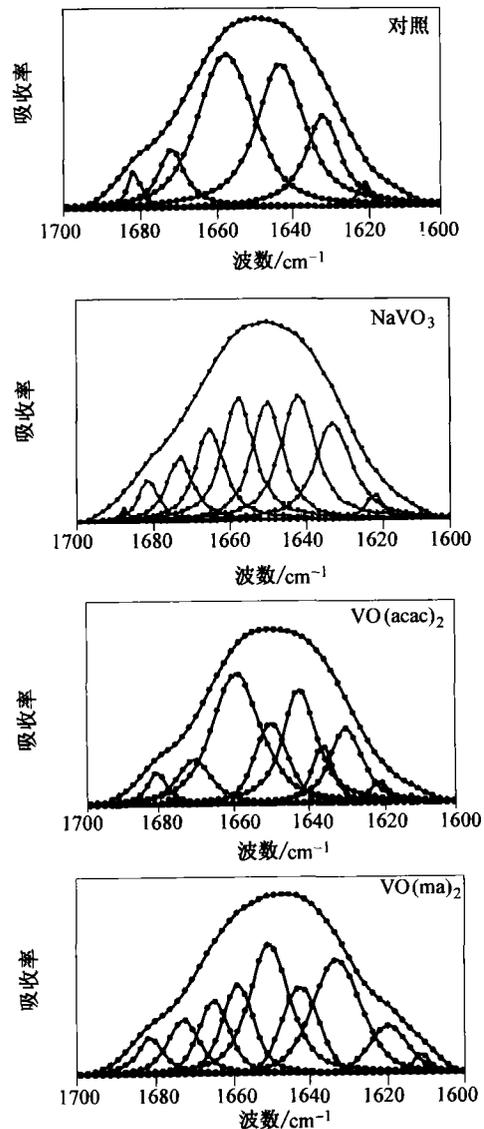


图4 去锌胰岛素($4 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的酰胺 I 带 FT-IR 去卷积拟合后的各子峰谱
钒化合物的浓度: $5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

表2 去锌胰岛素的二级结构各成分的定量解析(去锌胰岛素: $4 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$;
钒化合物: $5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

结构	谱峰位置 /cm ⁻¹	ω/%				肽段
		对照	NaVO ₃	VO(acac) ₂	VO(ma) ₂	
β-turn	1687	0.22	0.57			B(20~22)
	1681	2.70	4.25	3.77	4.99	B(7~8), A(18-20)
β-sheet	1671~1672	8.47	8.35	8.26	7.92	A(1~9)
	1631~1635	16.00	16.61	6.35	22.28	
	1620~1621		2.06	2.29	6.94	
	1628			12.86		
3 ₁₀ -helix	1657~1659	37.79	18.11	32.23	11.99	A(12~17)
Extended chain	1611~1612		0.18	0.28	1.48	B(1-6)
	1665		12.60		9.49	
α-helix	1650~1653		16.80	12.60	11.27	B(9-19)
Random	1641~1642	33.24	20.47	21.36	11.27	A(10-11, 21), B(27-30), B(1-3)

2.5 讨论

从上述结果看, 钒化合物与去锌胰岛素作用后, 可诱导胰岛素从 T→R 的构象转变. 其中, NaVO₃ 的作用强于 VO(ma)₂ 和 VO(acac)₂; 但从钒化合物对胰岛素内源性荧光的淬灭常数计算得到的表观结合常数看, NaVO₃ 的结合却弱于 VO(ma)₂ 和 VO(acac)₂, 造成区别的原因可能是因为从淬灭常数计算得到的表观结合常数反映的是化合物与蛋白质作用结合的总平均结果; 而 T→R 的构象转变反映的却是化合物对二级结构造成的局部特异性作用. 这也说明, NaVO₃ 的结合方式和结合部位与 VO(ma)₂ 和 VO(acac)₂ 可能不同.

从钒化合物促进去锌胰岛素聚集体解聚看, 它们可能不是以解离生成 VO²⁺ 阳离子方式结合, 更不应是结合在 Zn²⁺ 结合部位, 因为在 Zn²⁺ 结合部位结合应该引起聚集程度增加^[16]. 另一方面不能排除它们的氧化产物的结合, 我们知道, 在实验条件下, NaVO₃ 在溶液中主要以 H₂VO₄⁻ 形式存在, 包括少量的 HVO₄²⁻^[22], VO(ma)₂ 在水溶液中可缓慢氧化为 [VO₂(ma)₂]⁻^[23], VO(acac)₂ 在水溶液中有较强的氧化还原稳定性, 其主要水解物种为带一个正电荷的 1:1 配合物^[24](如图 5), 少量氧化后可形成 VO₃⁻^[24]. 有实验结果表明 VO(ma)₂ 和 VO(acac)₂ 在水溶液中可氧化成阴离子而通过阴离子通道进入人红细胞, 且 VO(ma)₂ 比 VO(acac)₂ 更容易氧化^[30]. 另外, 胰岛素作为一变构蛋白质, 可与两类配基相互作用, 一类是环状有机分子(诸如间苯二酚、苯酚、环己醇等)^[25, 26]; 另一类为一价阴离子(诸如 SCN⁻, N₃⁻, I⁻ 和 Cl⁻)^[27, 28], 本文研究的 3 种钒化合物中 VO(ma)₂ 和 VO(acac)₂ 均具有环状结构(如图 6), H₂VO₄⁻、VO₃⁻ 和 [VO₂(ma)₂]⁻ 为阴离子, 这可能是造成它们与胰岛素结合与构象扰动程度不同的原因,

具体来说, VO(ma)₂ 既具有环状结构, 氧化产物又是一价阴离子, 所以无论在结合程度还是对胰岛素构象的扰动方面均较 VO(acac)₂ 和 NaVO₃ 的影响大.

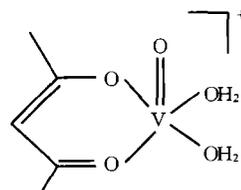


图5 VO(acac)₂ 在水溶液中形成的 1:1 配合物^[21]

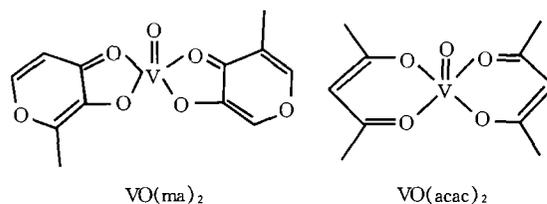


图6 VO(ma)₂ 和 VO(acac)₂ 的结构式

一般认为, 胰岛素参与受体的结合部位是一个由 A 链的 Gly(A1), Glu(A5), Tyr(A19), Asn(A21) 以及 B 链的 Val(B12), Tyr(B16), Phe(B24), Phe(B25), Tyr(B26) 组成的较大的疏水区^[29]. 钒化合物对于胰岛素内源性荧光淬灭的结果表明, 加入钒化合物后, 随着 310 nm 处的酪氨酸特征荧光峰强度的下降, 280 nm 处的散射峰相应减小, 后者的强弱反映了胰岛素分子在溶液中的聚集情况^[12], 说明在钒化合物的作用下, 胰岛素的多聚体有解聚的趋势. 同时 CD 谱的结果也表明, 3 种钒化合物与去锌胰岛素作用后, 273 nm 的峰均减弱, 此峰的减弱与胰岛素的解聚相关^[16], 由于此峰归属于二硫桥及 Tyr-B26 和 Phe-B24 或 Phe-B25^[16], 同时 Tyr-B26 和 Phe-B24 或 Phe-B25 恰处在胰岛素与受体结合的部位, 所以我们认为, 3 种钒化合物的结合可能扰动了胰岛素与其受

体结合区的构象。FT-IR的结果表明,加入钒化合物后,在 $1650\sim 1653\text{ cm}^{-1}$ 处出现的新峰,此峰代表了胰岛素B链中的B(9-19)肽段的 α -helix结构,这一方面提示钒化合物的作用可能扰动了胰岛素参与受体的结合部位;另一方面,它的出现表明胰岛素从伸展的构象(T状态)向螺旋构象(R状态)的改变^[19, 20],而这种改变对于胰岛素与其受体的结合至关重要^[21]。

文献报道3种钒化合物的降糖效应作用次序为: $\text{NaVO}_3 < \text{VO}(\text{ma})_2 < \text{VO}(\text{acac})_2$ ^[6],这个顺序与它们对胰岛素的结合和构象的扰动的结果并不完全一致,这说明钒化合物降糖机制具有多样性与复杂性,这个过程可能有多种环节参与,而影响胰岛素与胰岛素受体的结合只是其中一个方面。

总之,钒化合物与去锌胰岛素结合后,可导致去锌胰岛素的解聚,同时诱导胰岛素从T \rightarrow R的构象转变。钒化合物诱导胰岛素解聚及其构象改变的作用可能是导致胰岛素与其受体结合力增强的原因之一;在钒化合物的降糖效应中有可能涉及了这一过程。

致谢 感谢 Crans 教授提供钒化合物及其在实验过程中的讨论和建议。

参 考 文 献

- 1 Shechter Y, et al. Insulin-like stimulation of glucose oxidation in rat adipocytes by vanadyl (IV) ions. *Nature*, 1980, 284(5756): 556
- 2 Shechter Y, et al. Vanadium salts and the future treatment of diabetes. *Endeavour*, 1993, 17(1): 27
- 3 Posner B I, et al. Peroxovanadium compounds. A new class of potent phosphotyrosine phosphatase inhibitors which are insulin mimetics. *J Biol Chem*, 1994, 269(6): 4596
- 4 Fantus I G, et al. Multifunctional actions of vanadium compounds on insulin signaling pathways: Evidence for preferential enhancement of metabolic versus mitogenic effects. *Mol Cell Biochem*, 1998, 182(1-2): 109
- 5 Thompson K H, et al. Vanadium compounds as insulin mimics. *Chem Rev*, 1999, 99(9): 2561
- 6 Reul B A, et al. Effects of vanadium complexes with organic ligands on glucose metabolism: A comparison study in diabetic rats. *Br J Pharmacol*, 1999, 126(2): 467
- 7 Kwong D W, et al. Modulatory effects of peroxovanadates on insulin receptor binding. *J Inorg Biochem*, 1996, 64(3): 163
- 8 Palmieri R, et al. 1H Fourier transform NMR studies of insulin: Coordination of Ca^{2+} to the Glu(B13) site drives hexamer assembly and induces a conformation change. *Biochemistry*, 1988, 27(9): 3387
- 9 Frank B H, et al. Physical studies on proinsulin-association behavior and conformation in solution. *Biochem Biophys Res Commun*, 1968, 32(2): 155
- 10 Pullen R A, et al. Receptor-binding region of insulin. *Nature*, 1976, 259(5542): 369
- 11 Holladay L A, et al. Conformational stability and self-association of zinc-free bovine insulin at neutral pH. *Biochim Biophys Acta*, 1977, 494(1): 245
- 12 Brand J G, et al. Fluorescence characteristics of native and denatured monellin. *Biochim Biophys Acta*, 1977, 493(1): 178
- 13 Hogue C W, et al. Comparison of terbium (III) luminescence enhancement in mutants of EF hand calcium binding proteins. *J Biol Chem*, 1992, 267(19): 13340
- 14 Kadima W, et al. The influence of ionic strength and pH on the aggregation properties of zinc-free insulin studied by static and dynamic laser light scattering. *Biopolymers*, 1993, 33(11): 1643
- 15 Eftink M R, et al. Exposure of tryptophanyl residues in proteins. Quantitative determination by fluorescence quenching studies. *Biochemistry*, 1976, 15(3): 672
- 16 Goldman J, et al. Zinc binding, circular dichroism, and equilibrium sedimentation studies on insulin (bovine) and several of its derivatives. *Biochemistry*, 1974, 13(22): 4566
- 17 Ettinger M J, et al. Optical activity of insulin. I. On the nature of the circular dichroism bands. *Biochemistry*, 1971, 10(5): 824
- 18 Wei J A, et al. FTIR studies of secondary structures of bovine insulin and its derivatives. *Biochim Biophys Acta*, 1991, 1080(1): 29
- 19 Smith G D, et al. Structure of a rhombohedral R6 insulin/phenol complex. *Proteins*, 1992, 14(3): 401
- 20 Smith G D, et al. The structure of a complex of hexameric insulin and 4'-hydroxyacetanilide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91(19): 8851
- 21 Pittman I T, et al. A spectroscopic investigation of the conformational dynamics of insulin in solution. *Biochemistry*, 1995, 34(33): 10578
- 22 Crans D C, et al. Vanadium chemistry and biochemistry of relevance for use of vanadium compounds as antidiabetic agents. *Mol Cell Biochem*, 1995, 153(1-2): 17
- 23 Sun Y, et al. Oxidation kinetics of the potent insulin mimetic agent bis(maltolato) oxovanadium (IV) (BMOV) in water and in methanol. *Inorg Chem*, 1996, 35(6): 1667
- 24 Crans D C. Chemistry and insulin-like properties of vanadium(IV) and vanadium(V) compounds. *J Inorg Biochem*, 2000, 80(1-2): 123
- 25 Kim Y, et al. pH dependent conformational changes in the T- and R-states of insulin in solution: circular dichroic studies in the pH range of 6 to 10. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, 186(2): 1115
- 26 Ciszak E, et al. Crystallographic evidence for dual coordination around zinc in the T3R3 human insulin hexamer. *Biochemistry*, 1994, 33(6): 1512
- 27 Brzovic P S, et al. Structural asymmetry and half-site reactivity in the T to R allosteric transition of the insulin hexamer. *Biochemistry*, 1994, 33(44): 13057
- 28 Choi W E, et al. The allosteric transition of the insulin hexamer is modulated by homotropic and heterotropic interactions. *Biochemistry*, 1993, 32(43): 11638
- 29 Gammeltoft S. Insulin receptors: Binding kinetics and structure-function relationship of insulin. *Physiol Rev*, 1984, 64(4): 1321