

LidHCl 和 TNZ 与血清白蛋白之间 相互作用的研究

刘 里*, 王开燕

(曲靖师范学院化学与材料工程学院, 云南 曲靖 655011)

摘要:通过实验和理论模拟研究了盐酸利多卡因(LidHCl)和替硝唑(TNZ)与牛血清白蛋白(BSA)的相互结合作用。结果显示,在缓冲液(pH=7.40)和不同温度(299,309 K 和 319 K)条件下,LidHCl 和 TNZ 可显著猝灭蛋白的荧光强度。结果表明,BSA 的荧光是由 LidHCl 和 TNZ 通过静态猝灭机制发生的。多光谱测量结果显示,LidHCl-TNZ 可影响 BSA 的二级结构,特别是对酪氨酸残基微环境的疏水性影响更大。荧光抑制曲线和分子对接研究显示,LidHCl 和 TNZ 结合在位于 Sudlow 位点 II 的亚结构 III A 中。

关键词:替硝唑;盐酸利多卡因;牛血清白蛋白;分子模拟;联合用药;光谱法

中图分类号:O657.3

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2025)06-0117-08

DOI:10.16606/j.cnki.issn0253-4320.2025.06.021

Deciphering interactions between serum albumin and tinidazole as well as lidocaine hydrochloride

LIU Li*, WANG Kai-yan

(College of Chemistry and Material Engineering, Qujing Normal University, Qujing 655011, China)

Abstract:The interactions between bovine serum albumin (BSA) and lidocaine hydrochloride (LidHCl) as well as tinidazole (TNZ) are deciphered with the help of experiments and theoretical simulation. Results demonstrate that the fluorescence intensity of serum albumin is significantly quenched by LidHCl and TNZ in buffer solution (pH=7.40) at different temperature conditions (299,309 K and 319 K). Experimental data show that the fluorescence quenching of serum albumin by LidHCl and TNZ takes place through a static quenching mechanism. UV-Vis measurement results suggest that LidHCl-TNZ can affect the secondary structure of serum albumin, particularly the hydrophobicity of serum albumin in a micro-environment around tyrosine (Tyr) residues. Fluorescence quenching curves and molecular docking studies indicate that LidHCl and TNZ bind each other within subdomain III A located at Sudlow site II.

Key words:tinidazole; lidocaine hydrochloride; bovine serum albumin; molecular simulation; combined therapy by drugs; spectroscopy

蛋白质被认为是药物作用的主要分子靶点,它决定了强效药物的治疗效果,因此,化合物与蛋白质相互作用的研究一直是一个活跃的领域^[1]。了解和控制配体-蛋白质结合相互作用可能有助于调节先导分子的药代动力学和药效学。蛋白质与配体相互作用的研究在激素作用、酶-底物识别、信号转导和细胞通讯等生物过程中具有广泛的应用^[2]。血清白蛋白是几种蛋白质最丰富的生物血液血浆之一(约占60%),在维持胶体渗透压、血液 pH 和清除自由基方面起着重要作用,有助于将多种内源性和外源性配体(如脂肪酸、氨基酸、类固醇、药物、金属离子和代谢产物)运输、分布和代谢到靶位点^[3-6]。由

于其无毒性和免疫原性,是药物输送的理想候选者^[7],它可以在典型的结合位点形成非共价复合物。与血清白蛋白的结合会显著影响配体的吸收、分布、代谢和排泄特征,从而影响其活性和毒性水平。此外,当药物与载体蛋白相互作用导致结构变化时,也可能影响血清蛋白的生物功能。因此,研究药物与血清白蛋白的相互作用具有重要的医学意义^[8]。牛血清白蛋白(BSA)是一种心球形蛋白,是血清载体蛋白的理想模型^[9]。它与人类血清白蛋白有76%的同源性,包括两个具有固有荧光的色氨酸残基,色氨酸134位于蛋白质表面的I域中,而色氨酸212位于II A子域的疏水口袋内^[10]。

收稿日期:2024-09-09;修回日期:2025-04-13

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(21804079);曲靖市科学技术局·曲靖师范学院科技创新联合专项(KJLH2024YB04);曲靖师范学院天然药用功能分子发现及生物转化创新团队;云南省科技厅科技人才与平台计划项目(202305AF150088,202405AF140016)

作者简介:刘里(1982-),女,副教授,主要从事食品分析和药物分析,通讯联系人,m18908746298@163.com。

BSA 的结构主要是 67% 的 α -螺旋,而剩余的肽链则以没有 β -片层的扩展灵活区域形式存在于各子域之间^[11]。

在临床上,盐酸利多卡因(LidHCl)是酰胺类局麻药和抗心律失常药,可用于浸润麻醉、硬膜外麻醉、表面麻醉及神经传导阻滞,还可用于急性心肌梗死后室性期前收缩和室性心动过速,以及洋地黄中毒、心胀外科手术及心导管引起的室性心律失常^[12]。替硝唑(TNZ)为咪唑类衍生物,属于抗原虫和抗真菌药,适用于治疗厌氧菌的系统与局部感染,如腹腔、妇科、手术创口、皮肤软组织、肺部、胸腔等部位感染,还可用于泌尿系统生殖道毛滴虫病以及口腔感染。其药理作用与甲硝唑(灭滴灵)类似,但疗效更高、疗程更短、副作用少而轻^[12]。治疗过程中,LidHCl 和 TNZ 经常先后应用^[11-12],再联合用药过程中,两种药物如何同时与血清白蛋白相互作用的研究至关重要,但国内外还未见报道。鉴于此,本文通过多光谱和分子对接方法对 TNZ 和 LidHCl 与 BSA 进行了详细的相互作用分析。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

F-4500 型荧光光谱计,日本 Hitachi 公司生产;T9 双光束紫外-可见分光光度计(UV-Vis),北京普析通用仪器有限责任公司生产;数字 Systronic 高精度 pH 计(MK-VI),准确度 >0.01 ;恒温水浴锅,湖南力辰仪器科技有限公司生产。BSA(冻干粉,98%),上海源叶生物科技有限公司生产;TNZ(97%),上海笛柏生物科技有限公司生产;LidHCl 一水合物($\geq 99\%$),天津希恩思奥普德科技有限公司生产;三(羟甲基)氨基甲烷(Tris)、NaCl、硫酸镁一水合物、氯化铬(III)六水合物、硫酸铜、六水合三氯化铁和氯化钴(II)六水合物,纯度均 $\geq 99\%$,上海皓鸿生物医药科技有限公司生产;盐酸(GR,沪试),国药集团化学试剂有限公司生产。双蒸去离子水(millipore)用于实验缓冲液。主要实验在 pH 为 7.4 的 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液中进行,使用等量的缓冲溶液作为参照。

1.2 实验方法

首先配制了 1.0 mol/L NaCl、10 $\mu\text{mol/L}$ 的 BSA、69.25 mmol/L LidHCl 和 1.617 6 mmol/L TNZ 的储备溶液,并通过适当稀释后用于不同的实验,使其终浓度为 0.1 mol/L NaCl、1 $\mu\text{mol/L}$ 的 BSA、6.925 mmol/L LidHCl 和 0~0.243 mmol/L TNZ。为

研究温度对相互作用的影响,在不同温度条件(293、304 K 和 308 K)下进行荧光猝灭实验。

1.2.1 荧光测试

荧光分析在配备 1 cm 石英池的荧光分光光度计上进行。激发和发射狭缝的宽度均设置为 5.0 nm,激发波长设置为 280 nm。在 300~450 nm 的范围内以 1 500 nm/min 的扫描速率记录发射光谱。同步荧光光谱记录在两个不同的扫描间隔下: $\Delta\lambda = 20$ nm(酪氨酸残基激发)和 $\Delta\lambda = 60$ nm(色氨酸残基激发)。其中, $\Delta\lambda = \lambda_{EM} - \lambda_{EX}$ ^[10]。所有光谱均在室温下记录。

1.2.2 UV-Vis 测试

使用 1 cm 光程的石英比色皿记录纯 BSA(1.0 $\mu\text{mol/L}$)和添加不同浓度药物分子后的 BSA 的 UV-Vis 光谱。室温下在 200~500 nm 范围内测试。

1.2.3 分子对接

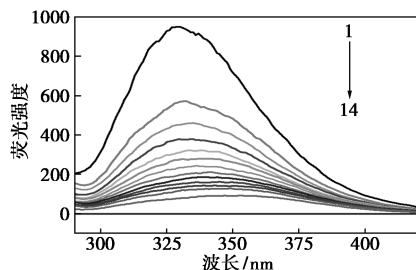
用于对接分析的 BSA 结构(PDB 条目 4F5S)从蛋白质数据库(<https://www.rcsb.org/structure/4F5S>)获得^[13-14]。LidHCl 和 TNZ 分子的结构使用 GAUSSIAN 09W 程序包绘制并最小化能量。AutoDock 1.5.6 程序利用拉马克遗传算法(LGA)^[15]进行复合对接研究。网格盒在 x 、 y 和 z 轴上分别设置为 126、126 Å 和 126 Å(1 Å = 0.1 nm),网格间距为 0.4 Å。对于蛋白质的对接准备,去除水分子,添加极性氢和 Gasteiger 电荷。AutoDock 工具用于分配配体中的可旋转键。使用 PyMol 可视化 AutoDock 输出结果。

2 结果与讨论

2.1 TNZ 和 LidHCl 与 BSA 结合研究

多种分子相互作用,例如基态复合物的形成、激发态反应、能量转移、分子重排和碰撞猝灭,都会导致荧光团的荧光强度降低^[16],即为荧光猝灭。测量 BSA 的荧光猝灭是研究药物与 BSA 相互作用的重要方法。它有助于理解 BSA 与药物的结合机制,并为关键结合现象提供线索^[17]。BSA 具有内源性荧光的特性^[18],本质上是由于 3 种内源性荧光团如酪氨酸、色氨酸和苯丙氨酸的荧光发射^[18]。如图 1 所示,激发波长 280 nm 下,在 338 nm 处观察到 BSA 强烈的荧光发射,TNZ 和 LidHCl 可以有效地猝灭 BSA 的荧光强度。观察发现,固定 LidHCl 浓度,随着 TNZ 浓度的增加,BSA 的荧光强度逐渐降低,发射波长明显红移(15 nm)。这一现象清楚地表明,LidHCl 和 TNZ 两种配体与 BSA 发生了相互作用,

形成了 BSA 内源性荧光猝灭的基础。



在 0.01 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH = 7.40) 中, 1—LidHCl (6.925 mmol/L) 和 TNZ (32 μ mol/L) 的吸收光谱; 2~14—在不同浓度 TNZ (0、32.0、48.6、64.8、81.0、97.2、113.4、129.6、145.8、162.0、178.2、194.4 μ M 和 243.0 μ M) 存在下, BSA (1.0 μ mol/L) 和 LidHCl (6.925 mmol/L) 的吸收光谱

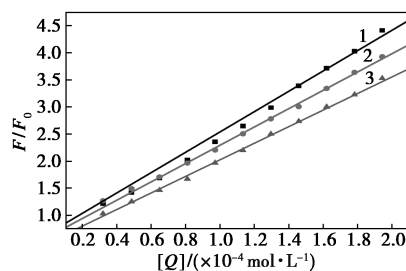
图 1 299 K 时 BSA 在 LidHCl 和 TNZ 存在下的荧光发射光谱

荧光猝灭机制已被有效地用于理解配体与大分子间的结合模式^[19]。分子相互作用导致的量子产率下降导致荧光猝灭, 这可能是静态的、动态的或两者的组合^[20-21]。通过研究药物与蛋白质之间复合物形成对温度的依赖性, 可以区分猝灭的模式^[22]。在静态猝灭中, Stern-Volmer 猝灭常数 K_{SV} 随着温度的升高而降低; 对于动态猝灭, 观察到的是相反的效果。在动态猝灭中, 猝灭剂和荧光团之间会发生大碰撞, 在较高的温度下, 扩散系数增大, 因此动态猝灭常数增大。而静态猝灭温度的升高可能会导致稳定性降低^[21-24]。为了研究猝灭机制, 在 3 个温度 (299、309 K 和 319 K) 下进行了温度依赖性荧光研

究 (稳态)。图 2 是根据 Stern-Volmer 方程^[25] [式 (1)] 得出的 Stern-Volmer 图。

$$F_0/F = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (1)$$

其中: 在 F_0 和 F 为在固定 LidHCl 的浓度下, 不存在和存在各种浓度的猝灭剂 TNZ 时稳态荧光强度的变化; τ_0 为平均荧光寿命, s; K_q 为猝灭速率常数, $L/(mol \cdot s)$; K_{SV} 为 Stern-Volmer 猝灭常数, L/mol ; $[Q]$ 为猝灭剂 TNZ 的浓度, mmol/L。



1—299 K; 2—309 K; 3—319 K

图 2 不同温度下 LidHCl 和 TNZ 对 BSA 猝灭的 Stern-Volmer 图

图 2 表明只存在一种类型的猝灭, 表 1 显示猝灭常数随着实验温度的升高而降低, 这表明 BSA 与 LidHCl 和 TNZ 的猝灭机制是静态猝灭或在基态下形成特定的复合物。表 1 中 $K_q [10^{12} L/(mol \cdot s)]$ 比先前报道的动态猝灭的最高散射碰撞猝灭常数 $[2.0 \times 10^{10} L/(mol \cdot s)]$ ^[27] 高两个数量级, 进一步揭示静态猝灭在 LidHCl+TNZ+BSA 相互作用中占主导地位, 这与 TNZ+BSA 的猝灭机理相同^[26]。

表 1 在不同温度下体系的 K_{SV} 和 K_q

体系	温度/K	Stern-Volmer 方程	R	$K_{SV}/(L \cdot mol^{-1})$	$K_q/(L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1})$
TNZ+BSA ^[26]	299	$F_0/F = 29240 [Q] - 0.7847$	0.9993	29240	2.9240×10^{12}
	309	$F_0/F = 29104 [Q] - 1.4403$	0.9960	29104	2.9104×10^{12}
	319	$F_0/F = 25311 [Q] - 0.8023$	0.9976	25311	2.5311×10^{12}
LidHCl+TNZ+BSA	299	$F_0/F = 20602 [Q] + 0.3896$	0.9985	20602	2.0602×10^{12}
	309	$F_0/F = 17144 [Q] + 0.5638$	0.9993	17144	1.7144×10^{12}
	319	$F_0/F = 15977 [Q] + 0.4069$	0.9996	15977	1.5977×10^{12}

由于 LidHCl 和 TNZ 可以与 BSA 紧密结合, 从而静态猝灭其固有的荧光, 因此可以通过修正的 Stern-Volmer 方程 [式 (2)]^[21-25] 来计算系统的结合常数 (K_{LB} , L/mol):

$$(F_0 - F)^{-1} = F_0^{-1} + (K_{LB} F_0 [Q])^{-1} \quad (2)$$

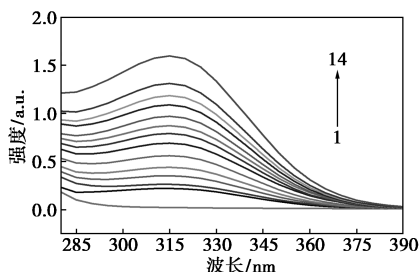
如表 2 所示, K_{LB} 值随温度升高而降低的趋势与 K_{SV} 对温度的依赖性相同, 再次证实了两种药物-血

清体系静态荧光猝灭机制的存在^[28]。室温时, K_{LB} 最大, 表明低温结合更为紧密, 高温结合更为松散。3 个温度下的 K_{LB} 值都在 10^3 数量级, 说明 LidHCl 和 TNZ 与 BSA 的结合作用力较强。 $K_{LB} (TNZ+BSA)$ ^[26] 是 $K_{LB} (LidHCl+TNZ+BSA)$ 的 2 倍左右, 表明 LidHCl 的加入降低了 TNZ 与 BSA 的相互作用力, 这与上述 Stern-Volmer 方程的结果高度一致。

表 2 不同温度下体系的结合参数

体系	温度/K	修正的 Stern-Volmer 方程	R	$K_{LB}/(L \cdot mol^{-1})$
TNZ+BSA ^[26]	299	$(F_0 - F)^{-1} = 5.6495 \times 10^{-8} [Q]^{-1} + 0.00079$	0.9998	1.5207×10^4
	309	$(F_0 - F)^{-1} = 1.2354 \times 10^{-7} [Q]^{-1} + 0.00104$	0.9999	1.0312×10^4
	319	$(F_0 - F)^{-1} = 1.3311 \times 10^{-7} [Q]^{-1} + 0.00122$	0.9982	1.0828×10^4
LidHCl+TNZ+BSA	299	$(F_0 - F)^{-1} = 1.5317 \times 10^{-7} [Q]^{-1} + 0.00065$	0.9965	7.4699×10^3
	309	$(F_0 - F)^{-1} = 1.5642 \times 10^{-7} [Q]^{-1} + 0.00048$	0.9960	6.1649×10^3
	319	$(F_0 - F)^{-1} = 8.5564 \times 10^{-8} [Q]^{-1} - 0.00084$	0.9986	5.5105×10^3

紫外分光光度法是一种高效且便捷的方法,常用于检测蛋白质的二级结构^[29]。图 3 显示了添加 LidHCl 和 TNZ 后 BSA 的 UV-Vis 光谱。BSA 在 314 nm 处有特征吸收峰,是由蛋白质骨架和氨基酸残基产生^[29]。同时,随着 TNZ 浓度从 0 增加到 243 μmol/L,以 314 nm 为中心的吸收峰强度逐渐降低,最大吸收峰的位置明显红移(约 15 nm)。这表明 LidHCl 和 TNZ 可以与 BSA 形成基态复合物,导致 BSA 骨架结构无法维持其原始形态。此外,随着 LidHCl 和 TNZ 的加入,芳香族氨基酸残基的微环境也发生了轻微变化,具体内容将通过同步荧光进行研究。上述结论为 LidHCl 和 TNZ 对 BSA 的静态猝灭机制提供了理论依据,因为动态猝灭不会导致 BSA 吸收峰的移动^[29]。



在 0.01 M Tris-HCl 缓冲液 (pH = 7.40) 中, 1—LidHCl (6.925 mmol/L) + TNZ (32 μmol/L) 的吸收光谱; 2~14—在不同浓度 TNZ (0, 32.0, 48.6, 64.8, 81.0, 97.2, 113.4, 129.6, 145.8, 162.0, 178.2, 194.4 μM 和 243.0 μM) 存在下, BSA (1.0 μmol/L) 和 LidHCl (6.925 mmol/L) 的吸收光谱

图 3 LidHCl 和 TNZ 存在下 BSA 的 UV-Vis 光谱

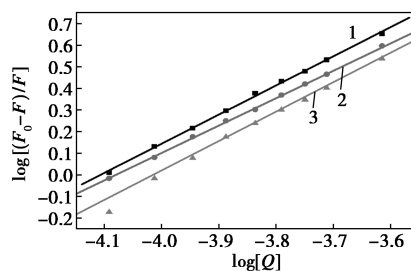
2.2 结合平衡分析

结合常数 (K_B) 是评估蛋白质与配体之间相互作用的重要指标之一,它与药物-受体亲和力密切相关。通常,药物对受体的亲和力随着 K_B 值的增加而增加,反之亦然。由于 LidHCl+TNZ+BSA 复合物是非荧光性的,假设 BSA 具有独立的结合位点,通过式 (3) 双对数方程来评估 K_B 和结合位点数 (n)^[30]:

$$\log[(F_0 - F)/F] = \log K_B + n \log[Q] \quad (3)$$

其中: $[Q]$ 为药物的总浓度, mmol/L; F_0 和 F 分别为蛋白质溶液和药物-蛋白质混合物的荧光强度。

如图 4 和表 3 所示,以 $\log(F_0 - F)/F$ 为纵坐标,以 $\log[Q]$ 为横坐标绘制的曲线具有良好的相关性(相关系数 $R > 0.999$),并且在实验温度范围内的 n 值都接近 1.3,这意味着 LidHCl 和 TNZ 与 BSA 之间的结合化学计量比为 1:1。随着温度的升高, K_B



1—299 K; 2—309 K; 3—319 K

图 4 LidHCl+TNZ+BSA 相互作用在不同温度下的双对数图

表 3 通过荧光实验获得的体系在不同温度下的结合参数

体系	温度/K	回归方程式	$K_B(L \cdot mol^{-1})$	n	R
TNZ+BSA ^[26]	299	$\lg[(F_0 - F)/F] = 1.3595 \lg[Q] + 5.6241$	4.2082×10^5	1.3595	0.9992
	309	$\lg[(F_0 - F)/F] = 1.5122 \lg[Q] + 6.1083$	1.2832×10^6	1.5122	0.9998
	319	$\lg[(F_0 - F)/F] = 1.4062 \lg[Q] + 5.7036$	5.0536×10^5	1.4062	0.9998
LidHCl+TNZ+BSA	299	$\lg[(F_0 - F)/F] = 1.3470 \lg[Q] + 5.5326$	3.4088×10^5	1.3470	0.9993
	309	$\lg[(F_0 - F)/F] = 1.2792 \lg[Q] + 5.2176$	1.6504×10^5	1.2792	0.9995
	319	$\lg[(F_0 - F)/F] = 1.3567 \lg[Q] + 5.4405$	2.7574×10^5	1.3567	0.9990

值呈现降低的趋势,这表明高温降低了 TNZ+BSA 复合物的稳定性。此外, K_B 值的数量级为 10^5 (K_B 值在 $10^5 \sim 10^7$ L/mol 之间表示强结合;在 $10^2 \sim 10^4$ L/mol 之间表示低到中等的结合^[31]),表明 LidHCl 和 TNZ 与 BSA 之间存在较强的相互结合作用。值得注意的是,在相应温度下, TNZ 的 K_B 值高于 LidHCl+TNZ 的,表明单一药物 TNZ 与 BSA 结合的亲和力更强; TNZ 的结合数的平均值(1.4)虽然略

大于 LidHCl+TNZ 的,但无论单一药物还是两种药物同时与 BSA 结合,都能形成 1 个结合位点。

2.3 热力学参数和协同性

表 4 为体系的热力学参数。焓 ΔH 和熵 ΔS 的数值分别为负数和正数,所以最可能的相互作用力是静电引力。此外, ΔH 负值意味着 LidHCl-TNZ 与 BSA 为放热相互作用,吉布斯自由能 ΔG 负值表明相互作用是自发的。

表 4 不同温度下体系的热力学和 Hill 模型参数

体系	温度/K	$\Delta G/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	$\Delta H/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	$\Delta S/(\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1})$	n_H	R
TNZ+BSA ^[26]	299	-32.1921	7.2581	131.9407	0.9457	0.9990
	309	-36.1330	7.2581	140.4245	0.9722	0.9978
	319	-34.8310	7.2581	131.9407	0.9751	0.9982
LidHCl+TNZ+BSA	299	-31.3507	-7.2014	81.5854	0.9722	0.9970
	309	-30.5645	-7.2014	76.3502	0.9821	0.9987
	319	-32.9118	-7.2014	81.3621	1.0121	0.9966

Hill 模型[式(4)]最初被用于描述配体与生物分子(如蛋白质)的结合,评估二者结合位点的数量以及它们之间的协同性^[32-33]。在荧光研究中,它被用来描述静态猝灭,其中猝灭剂与荧光团之间的结合是永久性的(至少在激发态寿命的尺度上)。然后,将猝灭剂建模为永久附着在荧光团上的配体,使用 n_H 参数来评估猝灭过程中的协同性。

$$\lg \theta / (\theta_m - \theta) = \lg K_B + n_H \lg [Q] \quad (4)$$

式中: $\theta = (F_0 - F) / F_0$; $1/\theta_m$ 为 $1/\theta$ 对 $1/[Q]$ 作图的截距。

表 4 中 3 个温度下的 n_H 值接近 1 表明,药物小分子配体与蛋白质分子的结合不依赖于其他小分子是否结合,随着温度的升高, n_H 值增大,即体系的结合从负协同作用逐渐转变为正协同作用。与 TNZ+BSA 体系相比, LidHCl+TNZ+BSA 体系的 n_H 值更高,表明 LidHCl 的加入增强了 TNZ 与 BSA 之间的结合能力,促进了它们之间的相互作用。

2.4 实验方法探究结合位置

BSA 的主要结合位点位于子域 II A 和 III A, 分别被称为 Sudlow 的位点 I 和位点 II^[11]。为了明确 LidHCl 和 TNZ 与 BSA 结合的确切位置,以及揭示其在相互作用过程中色氨酸和酪氨酸残基的具体参与情况,本文借鉴了文献[12-14]的研究方法,即通过对比在 280 nm 和 295 nm 激发波长下体系的荧光比值(F/F_0)来进行分析。如图 5 所示,280 nm 激发下 F/F_0 的数值相较于 295 nm 激发时更高。这一现

象揭示了 LidHCl 和 TNZ 与 BSA 相互作用时,色氨酸和酪氨酸残基均发挥了作用,并且结合位点位于亚螺旋域 III A,即 Sudlow 的位点 II,与 TNZ 和 BSA 的结合位置相吻合^[26]。

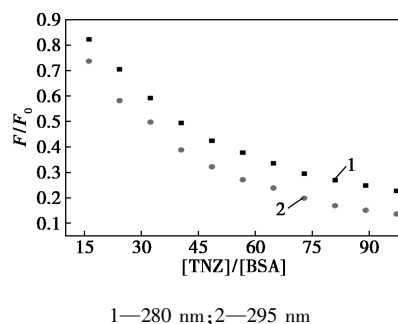


图 5 不同激发波长下的 F/F_0

2.5 LidHCl 和 TNZ 对蛋白构象的影响

同步荧光光谱法(SFS)作为一种先进的分析手段,能够精确地揭示小分子与蛋白质络合后,酪氨酸和色氨酸残基周边极性环境的变化^[14,18]。该方法通过同步扫描激发与发射单色器,并维持二者间恒定的波长差($\Delta\lambda$)来实现^[20],其中酪氨酸与色氨酸的 $\Delta\lambda$ 分别设定为 15 nm 和 60 nm^[21],以区分并监测这两种氨基酸残基的荧光特性。图 6 展示了采用 SFS 研究 BSA 与 LidHCl 及 TNZ 分子结合后,色氨酸与酪氨酸残基光谱变化的结果。在图 6(a)中,针对色氨酸残基($\Delta\lambda = 60$ nm)未观察到显著的波长位移,而图 6(b)则显示在酪氨酸残基($\Delta\lambda = 15$ nm)处出现了 1 nm 的红移,表明酪氨酸残基周围的微环境

极性增加,变得更为亲水,说明 LidHCl 和 TNZ 分子更倾向于在 BSA 的酪氨酸残基附近结合,进而影响了 BSA 分子的整体疏水性。进一步分析显示,随着 TNZ 浓度的提升,图 6(a)中色氨酸残基的荧光强度降低程度约是图 6(b)中酪氨酸残基降低程度的两倍,这一差异强有力地表明 TNZ 和 LidHCl 与 BSA 的结合位点更趋近于酪氨酸残基^[20-21]。这一现象与先前研究^[26]相一致,即在添加 TNZ 的条件下,LidHCl 对 BSA 构象的影响更为显著,再次证实了小分子药物与蛋白质相互作用的复杂性和特异性。

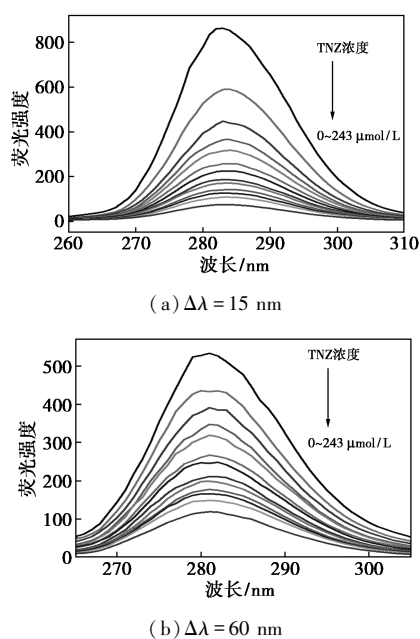


图 6 LidHCl 存在下不同浓度 TNZ 与 BSA 的同步荧光光谱

2.6 金属离子的影响

一些药物会与 Mg^{2+} 、 Fe^{3+} 等金属离子形成螯合物。这些螯合作用可能会导致药物的吸收和生物利用度降低,并改变药物的药代动力学特性^[34]。螯合作用还可能降低药物的治疗效果,并导致形成不溶性复合物。例如,四环素与二价阳离子的螯合物可能会降低抗生素的效率^[35]。为了避免这种相互作用,在治疗过程中,患者甚至被建议避免服用含镁或含铁的补充剂。因此,本研究分析了药物分子与通常作为膳食补充剂使用,但很少探究的 Mg^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ni^{2+} 和 Cr^{3+} 对 TNZ 和 LidHCl 两种配体分子同时与血清蛋白相互作用的影响,结果见表 5。实验发现,分子的螯合作用较强,结合常数有显著变化。配体与蛋白质之间的相互作用越强,结合常数越高,血浆中游离分子的数量越少。化合物的结合常数必须适当,以便在整个生物体内运输和分布,同时到

达目标组织时释放化合物。结合常数在 $10^3 \sim 10^6$ L/mol 范围内的值被认为是满足运输需求的。金属离子的添加对 LidHCl+TNZ+BSA 体系中的结合位点的数量影响较小,而结合常数的数值降低至原来的 24%~54%,特别是在 Fe^{3+} 存在的情况下,最为明显。这种金属离子与白蛋白结合后形成的复合物可能会改变蛋白质的构象,进而影响药物分子的结合动力学。更严重的是,这种复合物甚至可能抑制药物与血清蛋白的结合,从而影响药物在体内的运输和药效发挥。

表 5 金属离子对结合作用的影响

体系	金属离子	$K_B / (10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1})$	n	R
TNZ+BSA ^[26]	—	4.2082	1.3595	0.9992
	Mg^{2+}	15.1182	1.5293	0.9999
	Co^{2+}	6.7174	1.4500	0.9998
	Fe^{3+}	5.3149	1.4248	0.9996
	Ni^{2+}	74.4046	1.7020	0.9996
	Cr^{3+}	11.7598	1.5086	0.9995
LidHCl+TNZ+BSA	—	3.4088	1.3470	0.9993
	Mg^{2+}	0.8278	1.1965	0.9997
	Co^{2+}	0.9521	1.2139	0.9998
	Fe^{3+}	0.5133	1.1214	0.9997
	Ni^{2+}	1.2996	1.1682	0.9999
	Cr^{3+}	1.8548	1.2812	0.9996

2.7 分子对接研究

现代分析蛋白质与配体相互作用的方法是分子建模。本研究采用 AutoDock 4.2 以探讨 LidHCl 和 TNZ 与 BSA 的结合模式及结合位置。在 BSA 蛋白上的结合位点(由 I、II 和 III 3 个同源结构域组成; I 氨基酸残基 1~183、II 184~376、III 377~583,每个结构域包含 A 和 B 两个子域^[8-11]),如图 7 所示。在 BSA 蛋白与 LidHCl 和 TNZ 的相互作用中,主要的配体结合位点是 Sudlow 位点 I (子域 II A) 和 II (子域 III A) 中的疏水空腔^[9-11]。图 8 描述了适当的对接能量模型和 BSA 蛋白与 LidHCl、TNZ 的相互作用模式。表明配体结合位点位于 Sudlow 位点 II (子域 III A)。如图 9 所示,LidHCl 主要结合在氨基酸 GLU339 和 GLU443 组成的空腔之中;TNZ 结合在氨基酸 ARG217、LYS221 和 LYS294 组成的空腔之中。LidHCl 的酰胺可以与 GLU339 的酰胺骨架形成氢键,键长 1.86 Å;此外 LidHCl 的四级铵正电荷中心

可以与 GLU443 的侧链羧基负电荷中心形成作用力较强的盐桥(静电相互作用),键长 2.95 Å。TNZ 的 O 原子可以与 ARG217、LYS221 和 LYS294 形成一个氢键相互作用网络,其中与 ARG217 形成的氢键键长为 2.28 Å、与 LYS294 形成的氢键键长为 2.36 Å、与 LYS221 形成的 2 个氢键键长分别为 2.71 Å 和 2.92 Å。此外 TNZ 的硝基负电荷中心可以与 LYS294 的侧链氨基正电荷中心形成作用力较强的盐桥(静电相互作用),键长 3.19 Å。LidHCl 和 TNZ 主要依靠其上的电荷中心与周围带相反电荷的氨基酸形成静电相互作用,这一最终观察结果与荧光抑制曲线研究的成果相符。综上所述,对接结果表明,LidHCl 和 TNZ 在亚域 III A 结合口袋中,通过静作用力与 BSA 蛋白相互作用。结合过程导致复合物微环境的变化,从而导致了 BSA 的内源荧光猝灭。对接理论计算的结果与荧光光谱的研究结果一致。

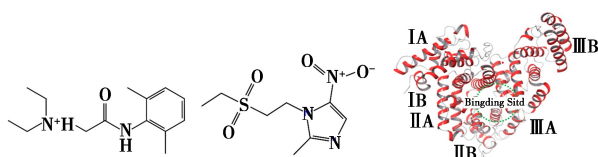


图7 LidHCl(左)、TNZ(中间)的化学结构图和 BSA 的 3D 模型(右)

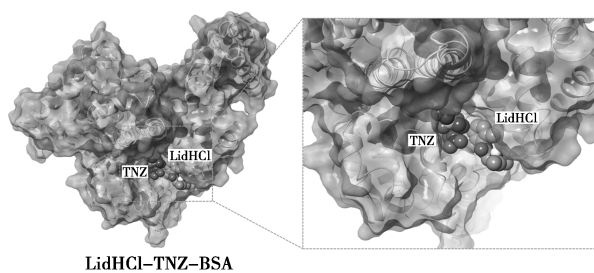


图8 BSA 与 LidHCl 和 TNZ 的计算机分子对接(左)和放大图(右)

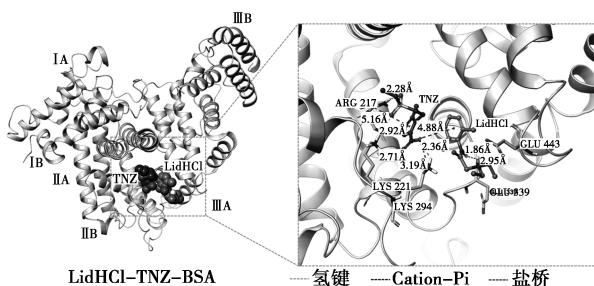


图9 使用 Discovery Studio 可视化软件对化合物与蛋白质的最低对接能量构象进行分子对接(左)和相互作用放大图(右)

3 结论

本研究采用多样化的光谱分析手段与计算技术,系统评估了 LidHCl 与 TNZ 联合作用下与 BSA 的结合特性。研究发现,Stern-Volmer 猝灭常数 K_{SV} 与温度之间呈现负相关,表明荧光猝灭过程主要由静态猝灭机制主导。进一步通过热力学参数分析,预测静电相互作用是驱动 LidHCl+TNZ+BSA 复合物形成的主要力量。UV-Vis 光谱与 SFS 数据共同揭示了 LidHCl 与 TNZ 和 BSA 的相互作用显著改变了 BSA 的二级结构构象,结合位点更趋近于酪氨酸残基。特别是 SFS 研究强调了所研究药物对酪氨酸残基微观环境的显著影响。通过计算获得的结合常数 K_b 与结合位点数 n 表明,这两种药物均可被 BSA 有效运输,且其结合位点定位于 BSA 的亚螺旋域 III A。值得注意的是,LidHCl 与 TNZ 分子在结合过程中并未展现出明显的协同作用。此外,实验还发现特定金属离子(如 Mg^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ni^{2+} 、 Cr^{3+})能够抑制 LidHCl+TNZ+BSA 复合物的形成。为深入探究药物与 BSA 的相互作用机制,采用了分子对接技术,其结果与实验数据高度吻合。综上所述,本研究不仅极大地拓宽了对 TNZ 与 LidHCl 两种药物与蛋白质相互作用机制的认识边界,还为评估药物的药理学效应、深入解析其生物转化途径以及准确预测体内分布模式提供了坚实的实验证据与强有力的理论支撑。

参考文献

- [1] Zheng K, Liu F, Xu X M, *et al.* Synthesis, structure and molecular docking studies of dicopper(II) complexes bridged by *N*-phenolato-*N'*-[2-(dimethylamino)ethyl] oxamide: The influence of terminal ligands on cytotoxicity and reactivity towards DNA and protein BSA[J]. *New Journal of Chemistry*, 2014, 38: 2964-2978.
- [2] Jisha V S, Arun K T, Hariharan M, *et al.* Site-selective interactions: Squaraine dye-serum albumin complexes with enhanced fluorescence and triplet yields[J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 2010, 114: 5912-5919.
- [3] Valstar A, Almgren M, Brown W, *et al.* The interaction of bovine serum albumin with surfactants studied by light scattering[J]. *Langmuir*, 2000, 16(3): 922-927.
- [4] Castelletto V, Krysmann M, Kellarakis A, *et al.* Complex formation of bovine serum albumin with a poly(ethylene glycol) lipid conjugate complex formation of bovine serum albumin with a poly(ethylene glycol) lipid conjugate[J]. *Biomacromolecules*, 2007, 8(7): 2244-2249.
- [5] Hu Y J, Yue H L, Li X L, *et al.* Molecular spectroscopic studies on the interaction of morin with bovine serum albumin[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-biology*, 2012, 112: 16-22.

- [6] De D, Santra K, Datta A, Prototropism of [2,2'-bipyridyl]-3,3'-diol in albumin SDS aggregates[J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 2012, 116(37): 11466–11472.
- [7] Li X, Wang G, Chen D, *et al.* Binding of ascorbic acid and α -tocopherol to bovine serum albumin; A comparative study[J]. *Molecular Biosystems*, 2014, 10(2): 326–337.
- [8] Frostell-Karlsson Å, Remaeus A, Roos H, *et al.* Biosensor analysis of the interaction between immobilized human serum albumin and drug compounds for prediction of human serum albumin binding levels[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2000, 43(10): 1986–1992.
- [9] He X M, Carter D C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin[J]. *Nature*, 1992, 358(6383): 209–215.
- [10] Moriyama Y, Ohta D, Hadiya K, *et al.* Fluorescence behavior of tryptophan residues of bovine and human serum albumins in ionic surfactant solutions; A comparative study of the two and one tryptophan (s) of bovine and human albumins[J]. *Journal of Protein Chemistry*, 1996, 15: 265–272.
- [11] Ege B, Calisir M, Al-Haideri Y, *et al.* Comparison of local anesthetic efficiency of tramadol hydrochloride and lidocaine hydrochloride [J]. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2018, 76(4): 744–751.
- [12] Fung H B, Doan T L. Tinidazole: A nitroimidazole antiprotozoal agent[J]. *Clinical Therapeutics*, 2005, 27(12): 1859–1884.
- [13] Srivastav A K, Gupta S K, Kumar U. A molecular simulation approach towards the development of universal nanocarriers by studying the pH- and electrostatic-driven changes in the dynamic structure of albumin[J]. *RSC Advances*, 2020, 10: 13451–13459.
- [14] Scognamiglio P L, Vicidomini C, Fontanella F, *et al.* Protein binding of benzofuran derivatives: A CD spectroscopic and *in silico* comparative study of the effects of 4-nitrophenyl functionalized benzofurans and benzodifurans on BSA protein structure [J]. *Biomolecules*, 2022, 12: 1–12.
- [15] Allouche A. Software news and updates Gabedit—A graphical user interface for computational chemistry softwares[J]. *Journal of Computational Chemistry*, 2012, 32: 174–182.
- [16] Hu Y J, Liu Y, Zhang L X, *et al.* Studies of interaction between colchicine and bovine serum albumin by fluorescence quenching method[J]. *Journal of Molecular Structure*, 2005, 750: 174–178.
- [17] Zhou B, Qi Z D, Xiao Q, *et al.* Interaction of loratadine with serum albumins studied by fluorescence quenching method[J]. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2007, 70: 743–747.
- [18] Feizi-Dehmayebi M, Dehghanian E, Mansouri-Torshizi H. Probing the biomolecular (DNA/BSA) interaction by new Pd(II) complex via in-depth experimental and computational perspectives; Synthesis, characterization, cytotoxicity, and DFT approach[J]. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 2022, 19: 3155–3175.
- [19] Van De Weert M, Stella L. Fluorescence quenching and ligand binding: A critical discussion of a popular methodology[J]. *Journal of Molecular Structure*, 2011, 998: 144–150.
- [20] Eslami-Farsani R, Shareghi B, Farhadian S, *et al.* Experimental and theoretical investigations on the interaction of glucose molecules with myoglobin in the aqueous solution using theoretical and experimental methods[J]. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 2021, 39: 6384–6395.
- [21] Asgharzadeh S, Shareghi B, Farhadian S. Experimental and theoretical investigations on the interaction of L-methionine molecules with α -chymotrypsin in the aqueous solution using various methods[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 131: 548–556.
- [22] Tian Z, Zang F, Luo W, *et al.* Spectroscopic study on the interaction between mononaphthalimide spermidine (MINS) and bovine serum albumin (BSA) [J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, 2015, 142: 103–109.
- [23] Jash C, Basu P, Payghan P V, *et al.* Chelerythrine-lysozyme interaction; Spectroscopic studies, thermodynamics and molecular modeling exploration [J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2015, 17: 16630–16645.
- [24] Moradi S, Shareghi B, Saboury A A, *et al.* Investigation on the interaction of acid phosphatase with putrescine using docking, simulations methods and multispectroscopic techniques [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 150: 90–101.
- [25] Kandagal P B, Ashoka S, Seetharamappa J, *et al.* Study of the interaction of an anticancer drug with human and bovine serum albumin; Spectroscopic approach [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, 41: 393–399.
- [26] 刘里, 成飞翔, 王开燕. 光谱法研究替硝唑与牛血清白蛋白的相互作用[J]. *湖南师范大学自然科学学报*, 2016, 39(6): 55–60.
- [27] Hu Z Y, Wang W J, Hu L, *et al.* Comprehending the intermolecular interaction of dacomitinib with bovine serum albumin; Experimental and theoretical approaches [J]. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2024, 42(7): 3579–3592.
- [28] Zhu R, Liang Y, Luo H, *et al.* Investigations of interaction mechanism and conformational variation of serum albumin affected by artemisinin and dihydroartemisinin [J]. *Journal of Molecular Recognition*, 2023, 36(1): e3000.
- [29] Zargar S, Wani T A. Exploring the binding mechanism and adverse toxic effects of persistent organic pollutant (dicofol) to human serum albumin: A biophysical, biochemical and computational approach [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2021, 350: 109707.
- [30] Kou S B, Lin Z Y, Wang B L, *et al.* Evaluation of the binding behavior of olmutinib (HM61713) with model transport protein; Insights from spectroscopic and molecular docking studies [J]. *Journal of Molecular Structure*, 2021, 1224: 29024.
- [31] Zhang R J, Kou S B, Hu L, *et al.* Exploring binding interaction of baricitinib with bovine serum albumin (BSA); Multi-spectroscopic approaches combined with theoretical calculation [J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2022, 354: 118831.
- [32] Goutelle S, Maurin M, Rougier F, *et al.* The Hill equation: A review of its capabilities in pharmacological modelling [J]. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 2008, 22: 633–648.
- [33] Vasti C, Marengo-Viada C, Giacomelli C E, *et al.* Fluorescence study of the interaction between albumin and layered double hydroxides [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2024, 394: 110974.
- [34] Seedher N, Agarwal P. Effect of metal ions on some pharmacologically relevant interactions involving fluoroquinolone antibiotics [J]. *Drug Metabolism and Personalized Therapy*, 2010, 25(1/4): 17–24.
- [35] Guerra W, Silva-Caldeira P P, Terenzi H, *et al.* Impact of metal coordination on the antibiotic and non-antibiotic activities of tetracycline-based drugs [J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2016, 327: 188–199. ■