

DOI: 10.3969/j.issn.1007-5461.2023.06.003

光谱法研究牛磺酸与人血清白蛋白相互作用

玉叶^{1,2}, 廖娟³, 文彬³, 邓鑫^{4*}

(1 桂林市中医医院, 广西 桂林 541000;

2 北海市中医医院, 广西 北海 536000;

3 广西中医药大学附属瑞康医院, 广西 南宁 530000;

4 广西中医药大学基础医学院, 广西 南宁 530000)

摘要: 采用荧光光谱法和紫外吸收光谱法, 研究了牛磺酸对人血清白蛋白 (HSA) 微环境和构象的影响, 结果发现不同温度下牛磺酸与HSA通过静态猝灭机制发生有规律地猝灭, 速率常数均 $> 2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 结合常数随温度升高而升高, 结合位点数接近0.5; 热力学参数焓变 < 0 , 熵变 > 0 , 自由能变化 < 0 表明结合过程是自发进行, 主要作用力是静电引力; 根据Forster非辐射能量转移理论估算出牛磺酸与HSA结合距离为2.645, 存在非放射能量转移。结果表明牛磺酸影响HSA微环境, 使HSA空间构象发生变化, 牛磺酸保护肝细胞, 改善门静脉结构和功能可能与此作用机制有关。

关键词: 光谱学; 静态猝灭; 荧光光谱; 牛磺酸; 非放射能量转移

中图分类号: O433.4 文献标识码: A 文章编号: 1007-5461(2023)06-00827-09

Study on interaction between taurine and human serum protein by spectroscopy

YU Ye^{1,2}, LIAO Juan³, WEN Bin³, DENG Xin^{4*}

(1 Guilin Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guilin 541000, China;

2 Beihai Hospital of Chinese Medicine, Beihai 536000, China;

3 Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530000, China;

4 School of Basic Medicine, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530000, China)

Abstract: The effect of taurine on the microenvironment and conformation of human serum albumin (HSA) are studied using fluorescence spectroscopy and ultraviolet absorption spectroscopy. The results show that HSA can be quenched regularly by taurine through a static quenching mechanism at different temperatures, with quenching rate constants greater than $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. The binding constant increases with the increase of temperature, and the number of binding sites also increases, approaching to 0.5. The thermodynamic parameters enthalpy change is less than 0, entropy change is greater than 0, and free energy change is less than 0, indicating that the binding process is spontaneous and the main force is electrostatic attraction. According to Forster's non-radiative energy transfer theory, the binding distance

基金项目: 国家自然科学基金 (81860790), 广西自然科学基金 (2020GXNSFAA297160, 2018GXNSFBA050050), 广西科技计划项目 (桂科AB20297002), 广西一流学科中西医结合培育学科 (2019XK159), 广西特聘专家专项

作者简介: 玉叶 (1993 -), 女, 广西河池人, 硕士, 主要从事中西医结合防治消化系统疾病方面的研究。E-mail: 172470216@qq.com

收稿日期: 2022-01-22; 修改日期: 2022-06-27

*通信作者。E-mail: 260446391@qq.com

between taurine and HSA is estimated to be 2.645, indicating that there is non-radiative energy transfer. The results of this study indicate that taurine can affect the microenvironment of HSA and change the spatial conformation of HSA. This mechanism may be the essential source of taurine's ability to protect hepatocyte and improve the structure and function of portal vein.

Key words: spectroscopy; static quenching; fluorescence spectroscopy; taurine; nonradioactive energy transfer

0 引言

牛磺酸是一种含硫氨基酸, 主要由肝脏和肾脏产生, 它存在于视网膜、脑、心脏和胎盘在内的不同器官中, 并显示出体内广泛的生理活性, 包括渗透调节、膜稳定、调节钙水平、抗氧化、抗凋亡、抗炎和抗脂质活性。其中牛磺酸的抗氧化作用影响细胞增殖, 炎症和胶原^[1,2]。牛磺酸消耗引起组织生理稳态失衡可能会导致骨骼肌、心脏、肝脏和脂肪组织的能量代谢失衡^[3]。

邓鑫课题组前期研究表明, 牛磺酸具有改善肝功能及抗肝纤维化作用^[4,5]。同时也首次发现了天然牛磺酸能显著降低肝硬化大鼠门静脉压力、门静脉阻力、门静脉血流量, 具有抑制肝硬化门脉高压作用^[6]; 能提高门静脉顺应性, 提示了天然牛磺酸抑制肝硬化门脉高压可能主要与改善门静脉力学作用相关^[7]。目前国内外对牛磺酸的生理、病理以及其对肝硬化等疾病的作用疗效已深入开展, 然而其对肝脏的微观作用机理一直鲜见报道。因血清白蛋白(SA)在肝脏中合成, 它调节渗透压, 帮助储存、运输、代谢和分配具有生物重要性的化合物。人血清白蛋白(HSA)可灭活各种有毒脂溶性代谢物, 内源性(脂肪酸、激素、胆汁酸、氨基酸)和外源性化合物(药物分子和营养素)的运输。同样, 它使自由基失活, 水解后提供氨基酸, 以合成新的蛋白^[8,9]。基于上述, 科研人员提出牛磺酸可能与HSA相互作用达到改善细胞内部力学微环境, 从而保护肝细胞, 改善门静脉结构和功能的假说。

荧光测量经常被用来研究药物与蛋白质的结合, 本研究采用荧光光谱和紫外吸收光谱技术研究牛磺酸与HSA的相互作用, 分析其猝灭机理、结合参数、热力学参数、能量转移, 并对牛磺酸在HSA上的结合方式进行探讨。研究结果为了解牛磺酸与蛋白质的相互作用机理提供了多种科学数据, 为开发具有相似结构骨架的新药提供了有益参考。

1 材料和方法

1.1 材料

材料准备有: 人血清白蛋白[Solarbio(索莱宝)HSA], 纯度96~99%, 分子量为66478 Da; 牛磺酸从珍珠贝中提取, 经蒸煮后, 收集汤汁浓缩, 加乙醇沉淀物和上清液, 然后对上清液进行脱色处理, 结晶得到。Tirs-HCl缓冲液(北京雷根生物技术有限公司), PH = 7.40; 在pH = 7.40的Tris-HCl缓冲溶液中制备成浓度为 1×10^{-5} g/L人血清白蛋白溶液。准确称取适量牛磺酸溶于超纯水中, 配制成浓度为 2.5×10^{-3} g/L的溶液。

1.2 设备和方法

所用设备有荧光分光光度计(日本岛津, RF7600)、电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司, HWS12型)、漩涡混合器(无锡沃信有限公司)。

1.2.1 测量荧光光谱

准确移取浓度为 2.5×10^{-3} g/L的牛磺酸0、1、3、5、8、10、15、25、35、45、50、65、75、100 μ L于5 mL离心管中,并用移液管向每个离心管中移入2 mL的 1×10^{-5} g/L的HSA溶液,置于漩涡混合器10 s,使混合液充分混合。放入291、301、311 K的电热恒温水浴锅水浴30 min后取出,移至石英皿用荧光分光光度计测量。

荧光光谱扫描参数设置:发射光波长(E_m)范围为295~500 nm,荧光激发光波长(E_x)设定为280 nm,狭缝宽度为5.0 nm,扫描速度为6000 nm/min,数据间隔为1.0 nm,灵敏度为Auto。

1.2.2 测量紫外可见吸收光谱

将牛磺酸用超纯水制备成浓度与HSA浓度相似的溶液,浓度为 1×10^{-5} g/L。启动紫外分光光度计,移液管移取2 mL超纯水放入石英皿,放入参比池,校准基线及调零。按照上述牛磺酸浓度逐一移取2 mL加入样品池。测量并记录200~500 nm处相应的牛磺酸紫外荧光值。

1.3 牛磺酸与人血清白蛋白结合实验

1.3.1 荧光猝灭

荧光测量采用日本岛津RF7600荧光分光光度计,激发波长280 nm,发射波长为295~500 nm。研究牛磺酸诱导HSA荧光猝灭的机理,用Stern-Volmer方程测定了HSA在不同温度(291、301、311 K)下的荧光猝灭^[10]

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q], \quad (1)$$

式中: F_0 是未加入猝灭剂时的荧光强度; F 是加入猝灭剂后的荧光强度; K_q 是双分子猝灭过程速率常数; K_{sv} 是Stern-Volmer动态猝灭常数; $[Q]$ 是猝灭剂的浓度; τ_0 是未加入猝灭剂时荧光分子的平均寿命,生物大分子的平均荧光寿命约为 10^{-8} s。

1.3.2 结合常数的计算

蛋白质的荧光猝灭为静态猝灭过程,当药物分子独立地与大分子上的一组等效位点结合时,根据 $\lg(F_0/F)$ 与 $\lg[Q]$ 相比绘制双对数曲线,可以通过截距和斜率分别得到结合位点数 n 和结合常数 K_a 。结合常数 K_a 和结合位点数 n 可以由下式确定^[11,12]

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = \lg K_a + n \lg [Q], \quad (2)$$

式中: F_0 表示未加入猝灭剂时荧光体的荧光强度; F 表示加入猝灭剂时荧光体的荧光强度, K_a 是猝灭剂与HSA的表观结合常数; n 是结合位点数; $[Q]$ 为猝灭剂的浓度。

1.3.3 热力学参数的测定

热力学参数可根据van't Hoff方程^[13,14]来估算

$$\ln K_b = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R}, \quad (3)$$

式中: K_b 类似于相应温度下的缔合结合常数即 K_a , R 为气体常数。焓变(ΔH)是由van't Hoff关系式的斜率计算出来的。然后,根据以下关系^[14,15]估计自由能变化(ΔG)

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S. \quad (4)$$

1.3.4 能量转移的计算

R_0 可以根据施主发射光谱和受主吸收光谱使用Forster公式来计算^[16,17],即

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}, \quad (5)$$

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} K^2 N^{-4} \phi J, \quad (6)$$

$$J = \sum F_i \varepsilon_i \lambda^4 \frac{\Delta \lambda}{\sum F_i \Delta \lambda}, \quad (7)$$

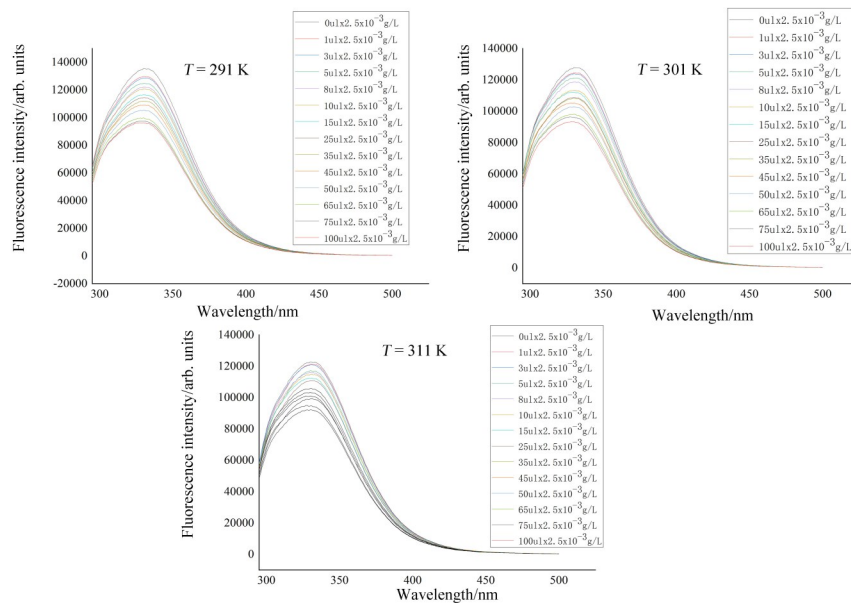
$$E = 1 - \frac{F_0}{F}, \quad (8)$$

式中能量传递效率 E 由(5)式定义, r 是受体和施主间距, R_0 是Forster临界距离,在该临界距离下,50%的激发能量转移到受体。(6)式中 K^2 表示供体相对于受体分子的相对取向因子, N 是介质的折射率, ϕ 是在无受体或供体的情况下量子产率,而 J 是供体荧光发射光谱和受体吸收光谱的重叠积分。 F_i 是在波长 λ 处无受体情况下的荧光强度, ε_i 是受体在 λ 处的紫外摩尔吸收系数。已有文献报道 $K^2=2/3$, $N=1.336$, $\phi=0.118$ ^[18]。 J 是重叠区域,从而计算出 J 、 E 、 R_0 和 r 。

2 结果与讨论

2.1 牛磺酸与HSA荧光光谱

不同温度下测量出的牛磺酸与HSA荧光光谱如图1所示。



$$C_{\text{HSA}} = 1 \times 10^{-5} \text{ g/L}; C_{\text{taurine}} = (0, 1, 3, 5, 8, 10, 15, 25, 35, 45, 50, 65, 75, 100 \text{ ul}) \times 2.5 \times 10^{-3} \text{ g/L}$$

图1 不同温度下牛磺酸与HSA的荧光光谱图

Fig. 1 Fluorescence spectra of taurine and HSA at different temperatures

人血清白蛋白的荧光来源于色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸残基。人血清白蛋白的本征荧光几乎是由色氨酸单独引起的,因为苯丙氨酸的量子产率低,如果酪氨酸被电离或靠近氨基、羧基或色氨酸,其荧光几乎完全被猝灭。故小分子与HSA结合时,HSA固有荧光强度的变化是由于色氨酸残基引起的^[19]。图1是在291、

301、311 K 温度下, 用固定浓度的 HSA 滴定不同量的药物溶液时, 牛磺酸对 HSA 的荧光强度有明显规律的减弱作用。也就是说明 HSA 的荧光发生了猝灭。此外, 291、301、311 K 时均在 331 nm 附近出现荧光的最高峰值, 且最大发射波长均出现蓝移, 蓝移可达 4.3 nm (对应波长移动范围是 327.3~331.6 nm), 蓝移表明色氨酸残基的极性较弱(或疏水性较强)。该现象表明牛磺酸中药物小分子可能与 HSA 相互作用生成复合物, 其空间构象可能在一定程度上发生变化。

2.2 牛磺酸对 HSA 的荧光猝灭

为了确定猝灭机制, 在假设发生动态猝灭的情况下对荧光猝灭数据进行了分析, 根据(1)式作 F_0/F 与 $[Q]$ 的线性回归方程, 绘制在不同温度下猝灭牛磺酸与 HSA 的 Stern-Volmer 图, 如图 2 所示。

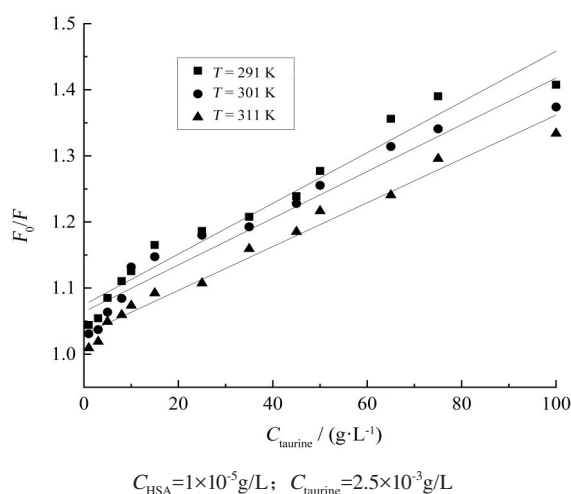


图2 不同温度下牛磺酸与HSA的荧光猝灭Stern-Volmer曲线

Fig. 2 Stern-Volmer curve of fluorescence quenching of taurine and HSA at different temperatures

基于图2中的实验数据, 计算出相应的牛磺酸与HSA相互作用的动态猝灭常数及猝灭速率, 结果如表1所示。

表1 牛磺酸-HSA体系的Stern-Volmer常数

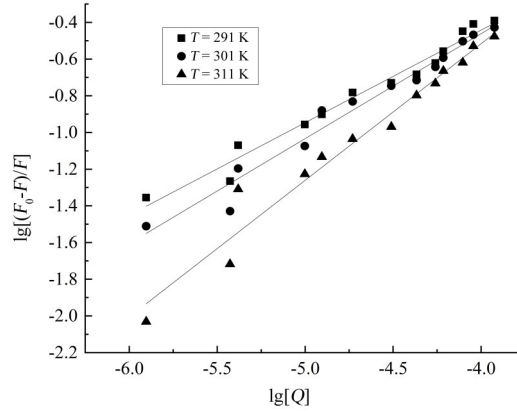
Table 1 Stern-Volmer constant of taurine-HSA system

T / K	K_{sv} / M^{-1}	$K_q / (M^{-1} \cdot s^{-1})$	R^2
291	3.28×10^3	1.24×10^{11}	0.9548
301	3.01×10^3	3.01×10^{11}	0.94571
311	2.69×10^3	2.69×10^{11}	0.97733

HSA 荧光强度下降的现象即荧光猝灭, 荧光猝灭可由猝灭剂与荧光团之间的碰撞或形成络合物引起, 通常分为动态猝灭和静态猝灭。动态猝灭是荧光团和猝灭剂分子在介质中扩散的结果, 只影响荧光团的激发态, 不改变吸收光谱。静态猝灭是由于荧光团和猝灭剂分子之间形成暗色络合物, 常导致吸收光谱的变化。静态猝灭时, 由于配合物的稳定性降低, 猝灭速率常数随温度的升高而减小。相反, 动态猝灭速率常数会随着温度的升高而增加, 因为温度越高, 猝灭剂的扩散就越快, 因此碰撞猝灭的量就越大^[20]。猝灭剂与生物大分子的最大猝灭和分散碰撞常数为 $2.0 \times 10^{10} L \cdot M^{-1} \cdot s^{-1}$ ^[21], 而牛磺酸与 HSA 相互作用的 K_q 值要高得多, 证明牛磺酸对 HSA 的作用是静态猝灭。随着温度的升高, 牛磺酸与 HSA 相互作用的猝灭常数 K_{sv} 减小, 进一步证明了牛磺酸以静态猝灭方式导致 HSA 的荧光猝灭, 牛磺酸与 HSA 结合形成新的复合物。

2.3 结合常数和结合位点

对于静态淬灭过程, 假设蛋白质上存在 n 个等同的独立结合位点, 利用 (2) 式绘制 $\lg(F_0-F)/F$ 与 $\lg[Q]$ 的关系图, 如图 3 所示, 可以从截距和斜率分别测得结合常数 K_a 和结合位点数 n , 如表 2 所示。



$$C_{\text{HSA}}=1 \times 10^{-5} \text{ g/L}; C_{\text{taurine}}=2.5 \times 10^{-3} \text{ g/L}$$

图 3 不同温度牛磺酸-HSA 体系双对数曲线

Fig. 3 Double logarithmic curve of taurine-HSA system at different temperatures

表 2 牛磺酸与 HSA 的结合常数及结合位点数

Table 2 The binding constant and number of binding sites of taurine and HSA

T/K	K_a	K_a	n	R^2
291	1.57547 ± 0.11638	37.6	0.50435 ± 0.0247	0.9743
301	1.8267 ± 0.14185	66.9	0.57197 ± 0.0301	0.97043
311	2.4619 ± 0.20787	260	0.74448 ± 0.04412	0.96281

由表 2 可看出, 牛磺酸与人血清白蛋白结合位点数近 0.5, 说明天然牛磺酸与 HSA 结合比例约为 0.5:1, 且受温度影响, 温度越高值越大。 K_a 值在温度上的增加表明 HSA-牛磺酸复合物的稳定性随着温度的升高而增加。 n 值的增加可能归因于牛磺酸与 HSA 结合的能力随着温度的升高而增加^[22]。

2.4 热力学参数和结合力的性质

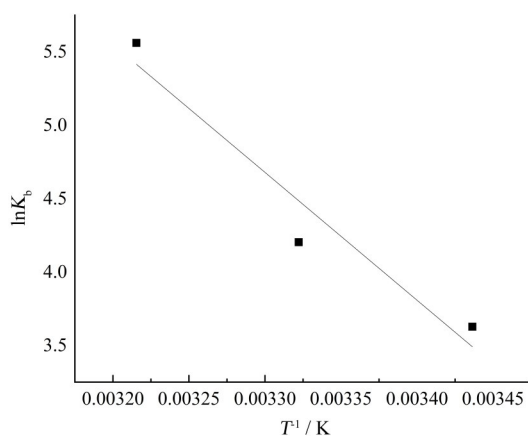
生物大分子与有机小分子间的结合力有四种: (1) 氢键; (2) 范德华相互作用; (3) 静电力; (4) 疏水相互作用。当温度变化不大时, 焓变化 ΔH 可视为常数。为了解释牛磺酸与 HSA 相互作用的能量变化, 用 van't Hoff 方程计算热力学参数。在 ΔH 近似恒定的假设下, 给出了牛磺酸与 HSA 结合的 van't Hoff 关系如图 4 所示。

图 4 显示了拟合线原点处的斜率和纵坐标获得结合位点的 ΔH 和 ΔS 值, 根据 (4) 式计算出 ΔG , 如表 3 所示。

表 3 牛磺酸-HSA 体系的 Stern-Volmer 对数方程结合常数 K_b 值及相关热力学参数

Table 3 The Stern-Volmer logarithm equation of taurine-HSA system combined with constant K_b and related thermodynamic parameters

T/K	K_b	$\Delta H/(\text{k} \cdot \text{J} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta S/(\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1})$	$\Delta G/(\text{k} \cdot \text{J} \cdot \text{mol}^{-1})$
291	37.6	-8707.6336	33.41395	-1.8431×10^4
301	66.9	-8707.6336	33.41395	-1.8765×10^4
311	260	-8707.6336	33.41395	-1.9099×10^4



$C_{\text{HSA}}=1\times 10^{-5}\text{g/L}; C_{\text{taurine}}=2.5\times 10^{-3}\text{g/L}$

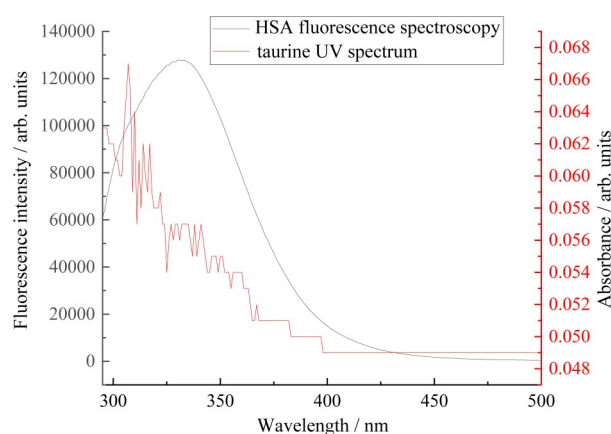
图 4 牛磺酸-HSA 体系 van't Hoff 曲线

Fig. 4 Taurine-HSA system van't Hoff curve

蛋白质反应的热力学参数的显著性和大小可以解释对蛋白质稳定性有贡献的主要作用力。从热力学角度看, $\Delta H > 0$ 和 $\Delta S > 0$ 表示疏水相互作用, $\Delta H < 0$ 和 $\Delta S < 0$ 表示范德华力或氢键形成, $\Delta H < 0$ 和 $\Delta S > 0$ 表示静电作用力^[8]。表 3 所示的自由能 $\Delta G < 0$, 支持结合过程是自发的。牛磺酸和 HSA 相互作用的结果负焓(ΔH)和正熵(ΔS)值表明, 静态相互作用在结合反应中起主要作用^[23]。

2.5 HSA 与牛磺酸之间的能量转移

荧光共振能量转移(FRET)是一种非破坏性的光谱方法, 被广泛应用于测量分子距离或供体-受体近似度。它研究复杂蛋白质的结构、构象、空间分布和组装。当荧光团的发射光谱与受体分子的吸收光谱重叠时, 就会发生荧光共振能量转移。在这一部分中, Forster 的偶极-偶极能量转移理论被用来确定荧光团 HSA (作为供体)与结合的牛磺酸分子(作为受体)之间的距离。牛磺酸的紫外光谱(UV 光谱)与 HSA 荧光光谱如图 5 所示。



$C_{\text{HSA}}=C_{\text{taurine}}=1\times 10^{-5}\text{g/L}$, 室温

图 5 HSA 的荧光光谱与牛磺酸的紫外光谱

Fig. 5 The fluorescence spectrum of HSA and the UV spectrum of taurine

由图 5 可知牛磺酸的紫外-可见光谱曲线与 HSA 的荧光光谱曲线存在重叠, 这说明牛磺酸与 HSA 之间存

在非辐射能量转移的可能性。根据 Forster 公式即 (5)~(8) 式计算牛磺酸-HSA 系统的能量传递效率 $E = 7.15\%$, 重叠积分 J 为 $9.337 \times 10^{-16} \text{ cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 结合距离 $r = 2.645 \text{ nm}$, 临界距离 $R_0 = 1.672 \text{ nm}$, 两者反应结合距离为 2.645 nm , 小于 7 nm , 说明牛磺酸与 HSA 之间存在非放射性的能量转移。此外, $r > R_0$ 表明存在静态猝灭机制, 当药物的结合距离 r 大于它们各自的临界距离 R_0 时, 进一步说明了牛磺酸与人血清白蛋白的荧光猝灭更可能是由静态猝灭引起的。

3 结 论

HSA 的内源性色氨酸荧光是理解分子发生关键和特异变化的重要工具。本工作利用荧光光谱法的研究为牛磺酸与人血清白蛋白的结合提供了初步信息。实验结果表明, 牛磺酸对 HSA 的荧光猝灭是牛磺酸-HSA 复合物形成的结果, 证实该体系随着温度升高牛磺酸-HSA 复合物稳定性增加, 其荧光猝灭是静态猝灭, 自发性和静电是结合反应中相互作用的主要因素, 存在非放射能量转移。牛磺酸使 HSA 所处的微环境极性减弱、疏水性增强导致 HSA 空间构象可能在一定程度上发生变化。牛磺酸保护肝细胞, 改善门静脉结构和功能可能与此作用机制有关。

参考文献:

- [1] Chaudhry S, Tandon B, Gupta A, *et al.* Taurine: A potential mediator for periodontal therapy [J]. *Indian Journal of Dental Research*, 2018, 29(6): 808.
- [2] Jakaria M, Azam S, Haque M E, *et al.* Taurine and its analogs in neurological disorders: Focus on therapeutic potential and molecular mechanisms [J]. *Redox Biology*, 2019, 24: 101223.
- [3] Wen C Y, Li F N, Zhang L Y, *et al.* Taurine is involved in energy metabolism in muscles, adipose tissue, and the liver [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2019, 63(2): e1800536.
- [4] Liang J, Deng X, Wang Q, *et al.* Microarray-bioinformatics analysis of taurine-regulated gene expression in hepatic stellate cells [J]. *Academic Journal of Naval Medical University*, 2010, 31(2): 226-227.
梁健, 邓鑫, 王勤, 等. 应用基因芯片分析牛磺酸对肝星状细胞基因表达的调控 [J]. 海军军医大学学报, 2010, 31(2): 226-227.
- [5] Deng X, Liang J, Li Y Z, *et al.* Protective effect of natural taurine on mitochondria of hepatic fibrosis in rats [J]. *Journal of Xi'an Jiaotong University (Medical Sciences)*, 2007, 28(6): 648-650.
邓鑫, 梁健, 李益忠, 等. 天然牛磺酸对肝纤维化大鼠肝线粒体的保护作用 [J]. 西安交通大学学报(医学版), 2007, 28(6): 648-650.
- [6] Wen B, Liang J, Deng X, *et al.* Effect of fluid shear stress on portal vein remodeling in a rat model of portal hypertension [J]. *Gastroenterology Research and Practice*, 2015, 2015: 545018.
- [7] Liang J, Deng X, Lin Z X, *et al.* Attenuation of portal hypertension by natural taurine in rats with liver cirrhosis [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2009, 15(36): 4529-4537.
- [8] Marković O S, Cvijetić I N, Zlatović M V, *et al.* Human serum albumin binding of certain antimalarials [J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2018, 192: 128-139.
- [9] Guhathakurta B, Pradhan A B, Das S, *et al.* Spectroscopic and molecular docking studies on the interaction of human serum albumin with copper (II) complexes [J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2017, 173: 740-748.
- [10] Jiao Y H, Zhang Q, Zou T, *et al.* Synthesis of a novel *p*-hydroxycinnamic amide and its interaction with bovine serum albumin [J]. *Journal of Molecular Structure*, 2020, 1210: 127959.

- [11] Qureshi M A, Javed S. Investigating binding dynamics of trans resveratrol to HSA for an efficient displacement of aflatoxin B1 using spectroscopy and molecular simulation [J]. *Scientific Reports*, 2022, 12: 2400.
- [12] Pan D Q. *A Study of the Interaction Between Drugs Molecules and Biomacromolecules* [D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2017.
潘冬琪. 药物小分子与生物大分子相互作用的研究 [D]. 杭州: 浙江工业大学, 2017.
- [13] Li X, Yuan Y, Zhao R, *et al.* Assessment on the binding characteristics of residual marbofloxacin in animal-derived food to bovine/human serum albumin by spectroscopy and molecular modelling [J]. *Luminescence*, 2021, 36(4): 977-985.
- [14] Mokaberi P, Babayan-Mashhadi F, Zadeh Z A T, *et al.* Analysis of the interaction behavior between Nano-Curcumin and two human serum proteins: Combining spectroscopy and molecular stimulation to understand protein-protein interaction [J]. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2021, 39(9): 3358-3377.
- [15] Shahabadi N, Razlansari M. Exploring the binding mechanisms of inorganic magnetic nanocarrier containing L-Dopa with HSA protein utilizing multi spectroscopic techniques [J]. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2021, 39(18): 7160-7167.
- [16] Li X, Sun X Y, Zhao R, *et al.* Study on the binding of sulfaclozine sodium monohydrate with bovine and human serum albumins using multi-spectroscopy and molecular docking [J]. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2021, 39(13): 4835-4844.
- [17] Li X, Yuan Y, Zhao R, *et al.* Assessment on the binding characteristics of residual marbofloxacin in animal-derived food to bovine/human serum albumin by spectroscopy and molecular modelling [J]. *Luminescence*, 2021, 36(4): 977-985.
- [18] Mansouri-Torshizi H, Khosravi F, Ghahghaei A, *et al.* Investigation on the interaction of newly designed potential antibacterial Zn(II) complexes with CT-DNA and HSA [J]. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2018, 36(10): 2713-2737.
- [19] Naik P N, Chimatadar S A, Nandibewoor S T. Interaction between a potent corticosteroid drug - Dexamethasone with bovine serum albumin and human serum albumin: A fluorescence quenching and Fourier transformation infrared spectroscopy study [J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2010, 100(3): 147-159.
- [20] Khan A, Khan F, Shahwan M, *et al.* Mechanistic insight into the binding of graphene oxide with human serum albumin: Multispectroscopic and molecular docking approach [J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2021, 256: 119750.
- [21] Makarska-Bialokoz M. Interactions of hemin with bovine serum albumin and human hemoglobin: A fluorescence quenching study [J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2018, 193: 23-32.
- [22] Gan R X, Zhao L D, Sun Q M, *et al.* Binding behavior of trelagliptin and human serum albumin: Molecular docking, dynamical simulation, and multi-spectroscopy [J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2018, 202: 187-195.
- [23] Rabbani G, Lee E J, Ahmad K, *et al.* Binding of tolperisone hydrochloride with human serum albumin: Effects on the conformation, thermodynamics, and activity of HSA [J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2018, 15(4): 1445-1456.