

两种组氨酸酰胺衍生物的合成及其 与人血清白蛋白的结合

何蔚^a 邹嘉佳^a 逯东伟^a 程辉^a 林翠梧^{a,b*}

(广西大学^a化学化工学院; ^b广西高校应用化学技术与资源开发重点实验室 广西 南宁 530004)

摘要 *L*-组氨酸对生物有机体有着良好的亲和能力,通过修饰其化学结构以期寻找药理活性和生物利用度高的衍生物。本文将*L*-组氨酸分别与反式肉桂酸和对甲氧基肉桂酸反应,合成了两种组氨酸酰胺类衍生物,利用傅里叶变换红外光谱、质谱、氢谱/碳谱核磁共振谱进行了结构表征。采用分子操作环境(MOE)软件分子对接技术、荧光光谱法、同步荧光光谱法(SFS)、紫外-可见光谱法(UV-Vis),共同研究了两种衍生物分别和人血清白蛋白(HSA)相结合的机理。MOE对接结果显示,这两种衍生物与HSA的模拟结合能分别为-13.82和-16.25 kcal/mol,主要是通过范德华力和疏水作用结合在HSA亚结构域II A(即site I)的疏水腔内。荧光猝灭数据表明,衍生物与HSA相互作用并形成了新的基态配合物,荧光猝灭过程为静态猝灭;不同温度(300、305和310 K)下衍生物与HSA相互作用的结合常数分别为 1.773×10^4 、 6.354×10^3 、 1.260×10^3 和 5.314×10^4 、 4.614×10^3 、 1.420×10^3 ;由热力学参数得到衍生物与HSA的结合过程是由范德华力驱动;SFS表明,衍生物使得HSA的二级结构发生了变化。结合UV-Vis的结果可以确定,在体外生理条件下,组氨酸酰胺类衍生物均可以通过范德华力与HSA结合,并对HSA内源荧光产生静态猝灭及构象影响,这与分子对接结果一致,从而为组氨酸酰胺类衍生物药物的进一步开发提供了参考。

关键词 组氨酸酰胺衍生物;光谱法;人血清白蛋白;分子对接

中图分类号:O629.7

文献标识码:A

文章编号:1000-0518(2017)10-1150-11

DOI:10.11944/j.issn.1000-0518.2017.10.160473

人血清白蛋白(Human serum albumin, HSA)是血浆中最丰富的蛋白质,能够与类别广泛的内源及外源性小分子结合,起着重要的储存和运输作用。因此,药物进入血液后将会不同程度地与血清白蛋白结合。其结合程度极大地影响了药物在体内的药效、代谢、作用持续时间和消除速度以及毒性。长期以来,人血清白蛋白一直是作为研究药物与蛋白相互作用机理的模型蛋白^[1-2]。*L*-组氨酸(*L*-Histidine)是组成蛋白质的20多种氨基酸之一,广泛存在于生物有机体中。组氨酸结构中含有一个咪唑基,故其在生理环境中既能接受质子又能释放质子,且它还能与蛋白质分子中的其它一些基团形成氢键^[3]。利用其对生物有机体有着良好的亲和能力,将其引入到药物分子中,对药物进行修饰,以期得到具有更强活性的药物和增强药物的疗效^[4]。

本文以组氨酸为起始原料,分别与反式肉桂酸和对甲氧基肉桂酸反应,设计合成了两种未见文献报道的组氨酸酰胺衍生物。本文采用分子操作环境(Molecular Operating Environment, MOE)软件分子对接技术,结合荧光光谱、同步荧光光谱、紫外可见光谱法,在模拟生理条件下研究了这两种组氨酸酰胺衍生物与HSA的结合特性,求出了相关结合参数,并探讨了其对入血清白蛋白构象的影响。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

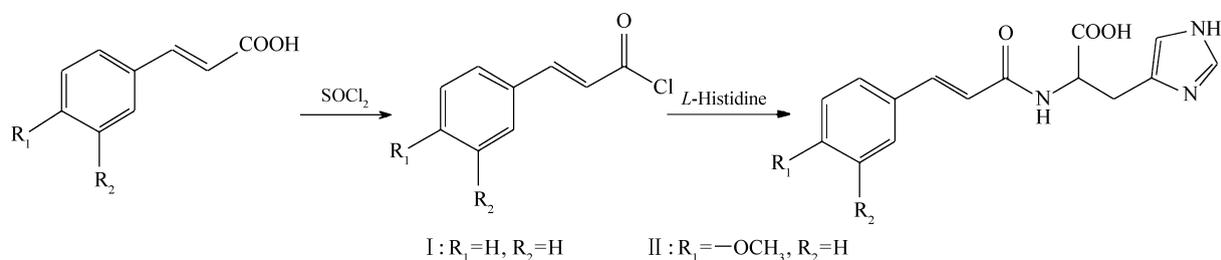
Shimadzu LCMS-8040 型液质联用仪(日本 Shimadzu 公司);Avance-600 型核磁共振仪(600 MHz,德

国 Bruker 公司); Cary Eclipse 型荧光分光光度计(带恒温装置,美国 Agilent Technologies 公司); Agilent Cary 60 UV-Vis 型紫外-可见分光光度计(带恒温装置,美国 Agilent Technologies 公司); Advantage A10 型超纯水系统(美国 Millipore 公司); Boetius 型显微熔点测定仪(德国 Boetius 公司); Is50 FT-IR 型傅里叶变换红外光谱仪(美国 Thermo Nicolet 公司)。

人血清白蛋白(HSA, 99%, 美国 Sigma 公司), pH = 7.4 的 PBS 缓冲液(粉剂, 美国 Sigma 公司), 对甲氧基肉桂酸(珠海嘉信康医药科技有限公司, HPLC $\geq 95\%$), 反式肉桂酸(珠海嘉信康医药科技有限公司, HPLC $\geq 95\%$), 其余试剂均为国产分析纯, 购自南宁蓝天实验设备有限公司, 实验用水为 Milli-Q 超纯水。

1.2 衍生物的合成和表征

衍生物 *L*-组氨酸肉桂酰胺(I)和 (*E*)-{3-(4-甲氧苯基)丙烯酰}-*L*-组氨酸(II)的合成路线如 Scheme 1 所示。

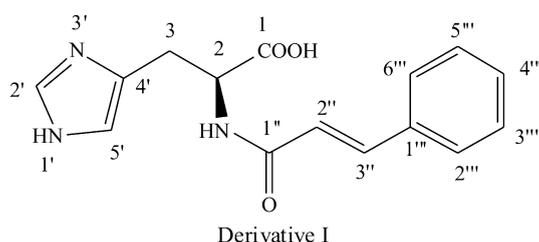


Scheme 1 Synthetic route of derivatives I and II

1.2.1 中间体内桂酰氯的制备 肉桂酸(对甲氧基肉桂酸)20 mmol, 加入 15 mL 二氯亚砷, 在 60 °C 油浴下搅拌回流反应 6 h, 减压旋蒸除去溶剂, 即得肉桂酰氯粗产品, 用 6 mL 四氢呋喃溶解后密封备用。

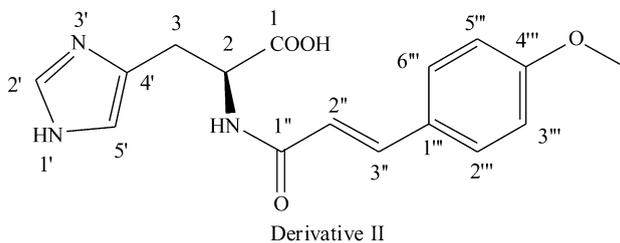
1.2.2 衍生物的制备 将 3.1 g 组氨酸(20 mmol) 于常温下溶解在 10 mL NaOH(2 mol/L) 溶液中, 在 0 ~ 5 °C 下缓慢滴入上述酰氯溶液, 控制滴加速度, 10 min 左右滴加完毕, 反应温度由其自然升至室温。薄层色谱 TLC(V (甲醇): V (氯仿) = 1:10) 跟踪反应, 反应 3 h 后停止反应, 减压旋蒸除去溶剂, 得到黄色粘稠状固体, 将其用无水乙醇洗涤, 过滤, 除去组氨酸原料。随后将粗产物用干法上样过硅胶柱层析(甲醇-氯仿)梯度洗脱。用此方法分别得到目标产物衍生物 I 和 II。

1.2.3 衍生物 I 和 II 的结构表征波谱数据 衍生物 I: 黄色固体, 产率为 34.6%, mp 166 ~ 168 °C, ESI-MS(m/z): 284[$M - H$]⁻, IR(KBr), σ/cm^{-1} : 3263.25(O—H), 3143.14(N—H), 1657.38(C=O), 1594.85, 1448.87(aromatic ring and alkene C=C), 978.37(alkene C—H), 766.39, 686.96(aromatic ring C—H); ¹H NMR(DMSO-*d*₆, 600 MHz), δ : 8.33(s, —CONH—), 7.93(s, 1H, imidazole-H), 7.34 ~ 7.47(m, 2H + 2H + 1H, aromatic-H), 7.14(s, 1H, imidazole-H), 6.55(d, $J = 15.60$ Hz, 1H, olefin-H), 4.57(dd, $J_1 = 8.40$ Hz, $J_2 = 4.80$ Hz, 1H, —CH—), 3.09 ~ 3.23(m, 2H, —CH₂); ¹³C NMR(DMSO-*d*₆, 150 MHz), δ : 176.62, 167.83, 141.43, 134.18, 133.53, 130.33, 128.94, 127.90, 119.70, 116.87, 54.44, 27.85。



Scheme 2 Structure of derivative I

衍生物 II: 黄色固体, 产率为 43.2%, mp 164 ~ 166 °C, ESI-MS (m/z): 313 [M - H]⁻, IR (KBr), σ/cm^{-1} : 3389.97 (O—H), 3271.05 (N—H), 2852.12 (C—O—C), 1662.61 (C=O), 1602.75, 1513.51 (benzene ring and alkene C=C), 1386.34 (C—H), 1257.00, 1230.38 (C—O), 978.37 (alkene C—H), 826.95 (benzene ring C—H); ¹H NMR (DMSO-d₆, 600 MHz), δ : 8.450 (s, —CONH—), 7.89 (s, 1H, imidazole-H), 7.38 (d, $J = 8.40$ Hz, 2H, aromatic-H), 7.29 (d, $J = 15.60$ Hz, 1H, olefin-H), 6.99 (s, 1H, imidazole-H), 6.84 (d, $J = 8.40$ Hz, 2H, aromatic-H), 6.39 (d, $J = 16.20$ Hz, 1H, olefin-H), 4.55 (dd, $J_1 = 8.40$ Hz, $J_2 = 4.80$ Hz, 1H, —CH—), 3.73 (s, 3H, —OCH₃), 3.04 ~ 3.17 (m, 2H, —CH₂); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆), δ : 177.54, 168.09, 160.34, 140.87, 134.87, 132.08, 129.63, 127.28, 117.57, 117.41, 114.26, 55.32, 54.99, 28.80。



Scheme 3 Structure of derivative II

1.3 分子模拟

从 Protein Data Bank 数据库下载 HSA-warfarin 复合物晶体结构 (PDB 编码: 1H9Z^[5])。将配体 (衍生物 I ~ II) 用 ChemBio3D Ultra (version 12.0) 画出三维结构, 另存为 mol 文件导入至 MOE 中, 并用 MM94 力场对其结构进行能量最小化优化。对接前将受体 1H9Z 进行质子化, 清除非结合水等预处理, 配合 Site Finder 找出活性口袋, 剔除活性口袋外的配体。通过 MOE 分别将衍生物 I ~ II 对接到 HSA 的活性口袋, 进行计算, 最终得到 10 种对接模型, 结合能最负的为最佳。打分函数为 MOE 自带函数 ASE^[6-7]。

1.4 光谱测定

1.4.1 溶液配制 用 pH = 7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 配制浓度为 1.0×10^{-4} mol/L 人血清白蛋白。用生理盐水配制浓度为 1.0×10^{-3} mol/L 的衍生物 I 或 II 储备液, 均在 4 °C 下保存备用。

扫描溶液的配制: 取 10 支 10 mL 的比色管, 用移液枪加入 1.0 mL 的人血清白蛋白溶液, 再依次加入 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 和 900 μL 的衍生物 I 或 II 储备液, 用 PBS 定容至 10 mL, 摇匀。分别在 300, 305 和 310 K 下恒温静置 60 min 后扫描荧光光谱和紫外吸收光谱。

1.4.2 荧光光谱的测定 参数设置: 激发波长 280 nm, 激发、发射狭缝宽度分别为 5 和 2.5 nm, 扫描速度为中速, 荧光发射光谱波长范围 300 ~ 500 nm。同时测定 $\Delta\lambda = 15$ nm 和 $\Delta\lambda = 60$ nm 时的同步荧光光谱。

1.4.3 紫外吸收光谱的测定 以 PBS 缓冲液为参比, 测定在 300 ~ 500 nm 波长范围的紫外可见吸收光谱。

2 结果与讨论

2.1 分子模拟研究衍生物与 HSA 的相互作用

衍生物 I 和 II 与 HSA 相互作用的最佳构象及模拟结合模式见图 1。

根据结合能最低及构象合理原则, 选取了衍生物 I 和 II 与 HSA 的最佳结合模式。由图 1 中可以看出, 其主要结合位点均为 Site I 位点, 且各衍生物构象均能较好地嵌入靶标蛋白的活性口袋中, 且伸展方向与疏水腔的方向基本保持一致, 表现出较好的结合。同时可以看出, 不同衍生物与 HSA 之间的相互作用力主要是疏水作用力和静电引力, 并且不同衍生物的介绍改变了残基周围微环境的疏水性, 因此可以推断它们之间的作用力主要为范德华力^[8]。其对接计算得到的结合能如表 1 所示。

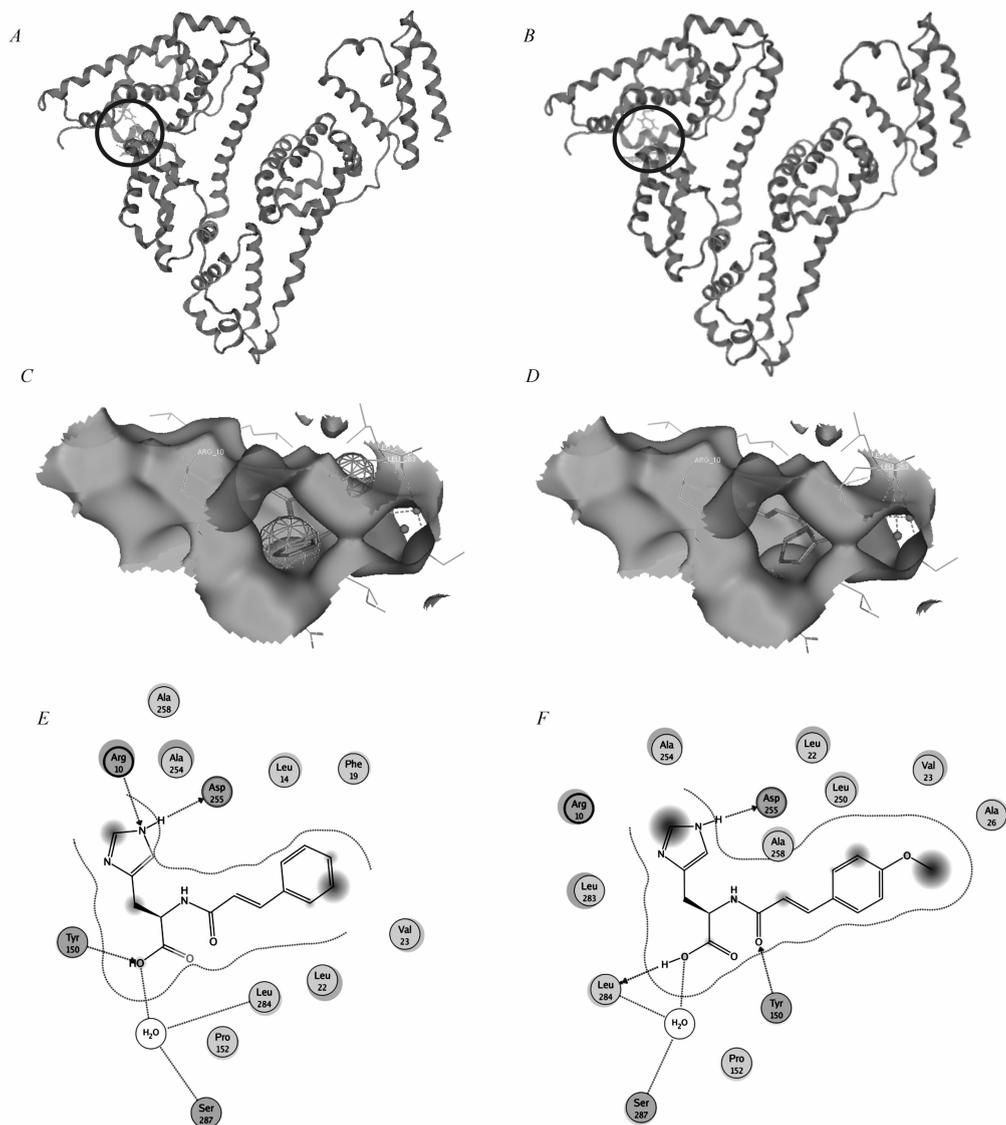


图 1 不同衍生物-HSA 体系的分子对接图

Fig. 1 Molecular docking modes of different derivative-HSA systems

1H9Z-ligands complexes of derivatives I (A) and II (B); Ligand surface and map of derivatives I (C) and II (D); Ligand interaction of derivatives I (E) and II (F)

表 1 衍生物 I 和 II 与 HSA 的模拟结合能

Table 1 Simulation binding energy of derivatives I and II

Derivative	Site	Binding energy/(kcal·mol ⁻¹)
I	Site I	-13.82
II	Site I	-16.25

2.2 衍生物 I 和 II 与 HSA 相互作用的荧光发射光谱

在激发波长为 280 nm 时, HSA 最大荧光发射峰在 350 nm 附近。衍生物 I 和 II 在此条件下并无荧光发射,但在 λ_{ex} 、 λ_{em} 处均有一定吸收,这样获得的结合常数等数据存在一定的误差,需根据式(1)予以校正^[9-10]。

$$F_c = F_0 e^{\frac{A_{ex} + A_{em}}{2}} \quad (1)$$

式中, F_0 和 F_c 分别表示测试和校正后的荧光发射峰强度, A_{ex} 、 A_{em} 分别是体系在 λ_{ex} 、 λ_{em} 处的吸收值。

根据式(1)分别绘制了衍生物 I 和 II 与 HSA 相互作用的荧光猝灭光谱,如图 2 所示。从图 2 可以看出,HSA 的最大荧光发射峰为 348 nm,随着体系中的衍生物浓度的不断增加,HSA 在 348 nm 附近的荧光峰强度呈现出有规律的降低,且最大荧光发射峰有轻微的红移(I-HSA:由 348 nm 移动至 352 nm; II-HSA:由 347 nm 移动至 355 nm)。这可能是由于衍生物 I、II 均与 HSA 结合,进入了蛋白质的疏水腔内,导致了发荧光的芳香族氨基酸周围微环境极性变大,疏水性变小,从而引起了 HSA 空间构象的改变^[11]。

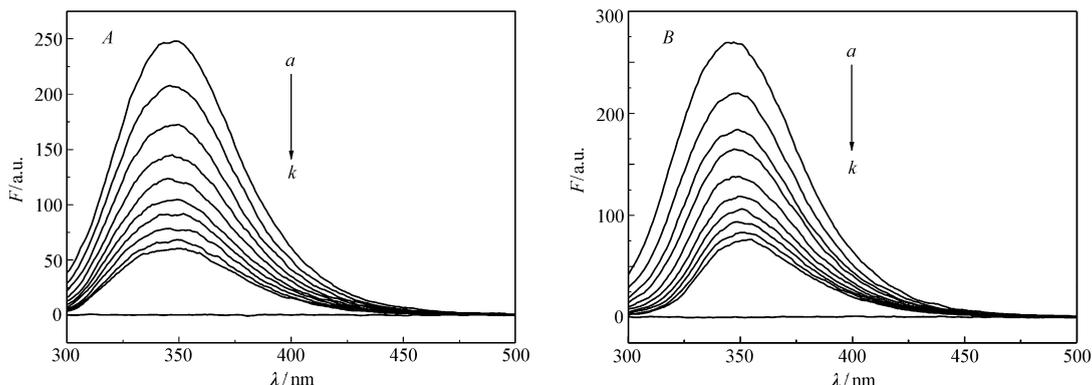


图 2 I-HSA 体系(A)及 II-HSA 体系(B)的荧光猝灭光谱

Fig. 2 Fluorescence quenching spectra of I-HSA systems(A) and II-HSA systems(B)

$a \sim j$: $c(\text{HSA}) = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, $c(\text{I/II}) = (0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0) \times 10^{-5} \text{ mol/L}$,
 k : $c(\text{HSA}) = 0 \text{ mol/L}$, $c(\text{I/II}) = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, $T = 300 \text{ K}$, $\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$

2.3 衍生物 I 和 II 与 HSA 相互作用的猝灭机理

荧光猝灭大体上可分为静态猝灭和动态猝灭。无论是静态猝灭还是动态猝灭,荧光分子与猝灭剂之间的猝灭效率都遵循 Stern-Volmer 方程^[12]:

$$F_0/F = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad (2)$$

根据式(2)分别绘制 300、305 和 310 K 温度下衍生物 I/II-HSA 体系的 F_0/F -[Q] 关系图(见图 3),计算得出猝灭常数(K_{sv})和猝灭速率常数 k_q (见表 2),数据具有良好的线性关系。依据猝灭常数随温度的不同变化,可以大体区分猝灭是属于动态还是静态, K_{sv} 随着温度的升高而增大,为动态猝灭;静态猝灭与之相反,温度升高可能降低基态配合物的稳定性,从而减小荧光猝灭的程度^[13]。由图 3 和

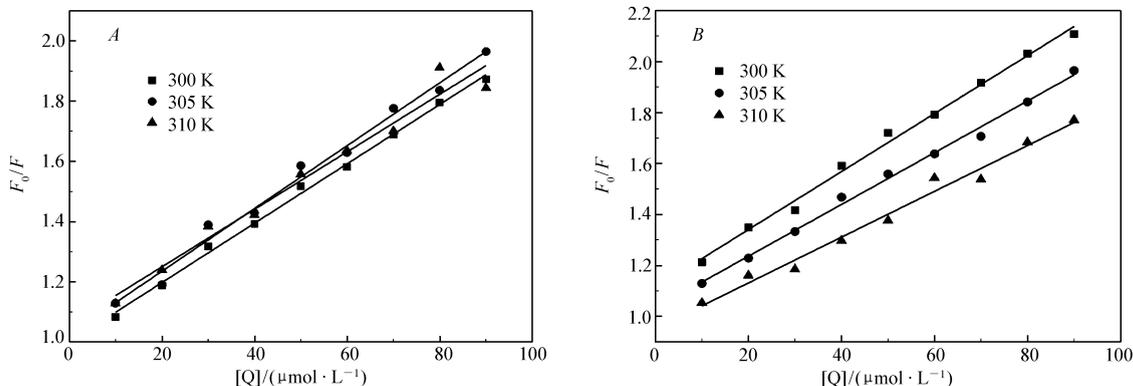


图 3 不同温度下 I-HSA 体系(A)及 II-HSA 体系(B)的荧光猝灭 Stern-Volmer 图

Fig. 3 Stern-Volmer plots of fluorescence quenching of I-HSA systems(A) and II-HSA systems(B) at different temperatures

表 2 可见,猝灭常数 K_{SV} 随着温度的升高而降低,且衍生物 I/II-HSA 体系的 k_q 值均远大于小分子猝灭剂对蛋白质大分子的最大碰撞猝灭速率 $2.0 \times 10^{10} \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})^{[14-15]}$,由此可以推断荧光猝灭过程为生成稳定基态配合物的静态猝灭。

表 2 不同温度下 I-HSA 体系(A)及 II-HSA 体系(B)的猝灭参数

Table 2 Quenching constants of I-HSA systems(A) and II-HSA systems(B) at different temperatures

Systems	T/K	$K_{SV}/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$k_q/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	R
I-HSA	300	1.042×10^4	1.042×10^{12}	0.998 1
	305	9.850×10^3	9.850×10^{11}	0.997 3
	310	8.590×10^3	8.590×10^{11}	0.995 6
II-HSA	300	1.139×10^4	1.139×10^{12}	0.997 0
	305	1.016×10^4	1.016×10^{12}	0.997 6
	310	9.000×10^3	9.000×10^{11}	0.991 9

2.4 衍生物 I 和 II 与 HSA 相互作用的紫外-可见吸收光谱

衍生物 I/II-HSA 体系溶液的吸收光谱如图 4 所示。由图 4 可知,衍生物 I/II-HSA 体系的最大吸收峰强度随着衍生物 I、II 浓度的递增而明显减弱,说明衍生物 I(II)的加入均使 HSA 分子构象发生了变化^[16]。此外,紫外吸收光谱显示衍生物 I/II-HSA 体系和游离 I(II)的差谱与 HSA 的紫外吸收曲线并不重合(见图 4 中插图)。进一步说明了衍生物 I、II 均分别与 HSA 基态分子形成了基态配合物,其猝灭即为静态猝灭^[17]。

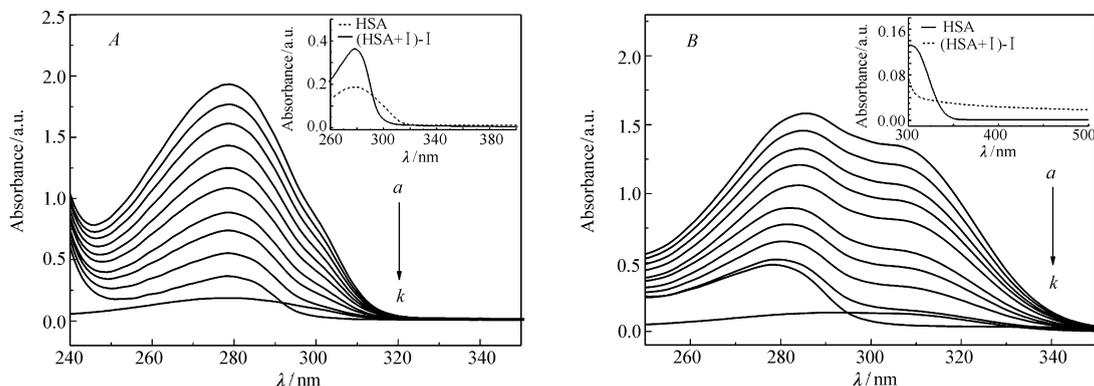


图 4 I-HSA 体系(A)及 II-HSA 体系(B)的紫外吸收光谱

Fig. 4 UV absorption spectra of I-HSA systems(A) and II-HSA systems(B)

$a \sim j; c(\text{HSA}) = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}, 10^5 c(\text{I/II})/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}); 0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0; k; c(\text{HSA}) = 0 \text{ mol/L}, c(\text{I/II}) = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}, T = 300 \text{ K}$

2.5 衍生物与 HSA 相互作用的结合常数及结合位点数

假设衍生物与 HSA 有多个结合位点,静态猝灭可以用张勇^[18]等提出的一个求取结合位点数(n)及结合常数(K_A)的线性回归式(3)来描述:

$$\lg \left(\frac{F_0 - F}{F} \right) = \lg K_A + n \lg [Q] \quad (3)$$

以 $\lg [(F_0 - F)/F]$ 对 $\lg [Q]$ 作图,分别绘制了衍生物 I/II-HSA 体系的关系图,如图 5 所示,根据其斜率和直线截距可得到不同温度下的 K_A 和 n 值(见表 3)。由表 3 可知,结合常数 K_A 均随着温度升高而降低,说明衍生物 I(II)与 HSA 结合形成基态配合物且其稳定性随着温度的增加而降低,更进一步证明两种体系的猝灭过程为静态猝灭^[19]。此外,在不同温度下 n 值均接近 1,表明 HSA 与衍生物 I、II 的结合均只存在 1 个结合位点。

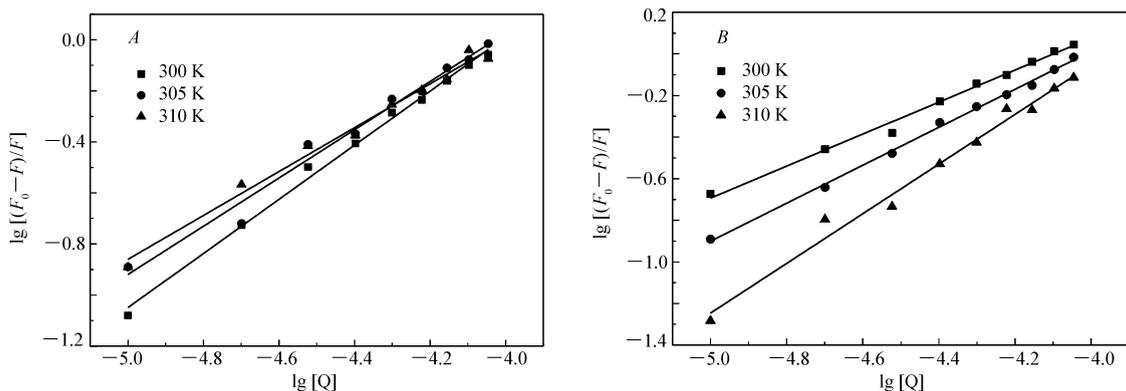


图 5 不同温度下 I-HSA 体系(A)及 II-HSA 体系(B)的荧光猝灭双对数图

Fig.5 Double logarithmic plots of fluorescence quenching of I-HSA systems (A) and II-HSA systems (B) at different temperatures

表 3 不同温度下 I-HSA 体系(A)及 II-HSA 体系(B)的结合参数

Table 3 Binding parameters of I-HSA systems (A) and II-HSA systems (B) at different temperatures

Systems	T/K	$K_A / (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	n	R
I-HSA	300	1.773×10^4	1.059 5	0.997 6
	305	6.354×10^3	0.944 5	0.990 8
	310	1.260×10^3	0.777 6	0.948 9
II-HSA	300	5.314×10^4	1.194 4	0.992 5
	305	4.614×10^3	0.913 0	0.998 7
	310	1.420×10^3	0.769 2	0.996 0

2.6 衍生物 I / II-HSA 体系结合距离 (r) 及能量转移效率 (E)

根据非辐射能量转移理论^[20-21],分别绘制 HSA 荧光光谱与衍生物紫外吸收光谱的重叠图,见图 6。计算到供体的荧光光谱与受体的吸收光谱的重叠积分 J 、能量转移效率 E 、结合距离 r 值列于表 4。 r 均大于临界能量转移距离 R_0 ,说明静态猝灭的概率大于非辐射能量转移引起的猝灭,衍生物与 HSA 发生

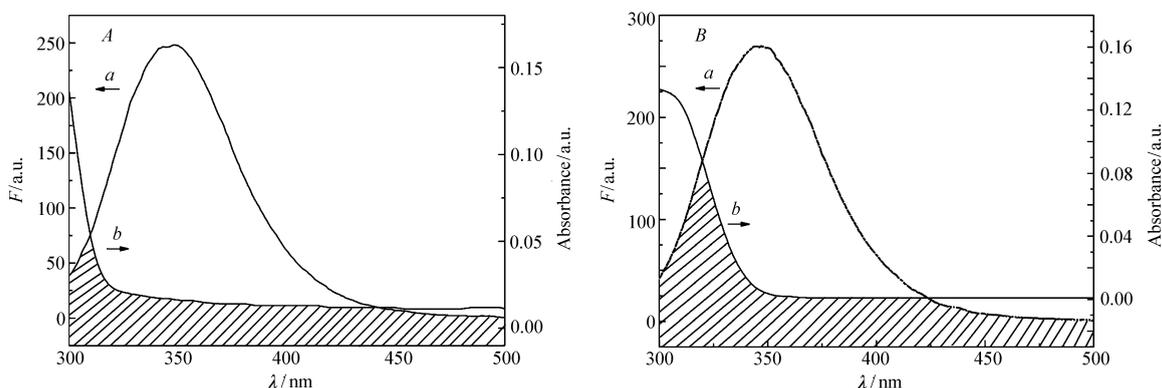


图 6 I-HSA 体系(A)及 II-HSA 体系(B)的荧光发射光谱(a)与衍生物(b)的紫外吸收光谱重叠图

Fig.6 Overlap of fluorescence emission spectrum of HSA (a) and absorption spectra of derivatives (b) of I-HSA systems (A) and II-HSA systems (B)

表 4 I-HSA 体系(A)及 II-HSA 体系(B)的结合距离参数

Table 4 Distance parameters of I-HSA systems (A) and II-HSA systems (B)

Systems	T/K	$J / (\text{cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	E	R_0 / nm	r / nm
I-HSA	300	9.749×10^{-16}	0.110 6	1.639	2.32
II-HSA	300	4.133×10^{-15}	0.110 6	2.085	2.95

作用的猝灭方式主要为形成复合物导致的静态猝灭^[22-23]。

2.7 衍生物 I / II-HSA 体系的作用力类型

小分子配体与蛋白质之间的作用力包括氢键、疏水作用、静电力和范德华力等非共价作用力。根据反应的热力学参数 ΔH 、 ΔS 在反应前后的变化可大致确定作用力类型^[22]。根据 van't Hoff 定律,可获得两物质间相互作用的热力学参数(见表 5):

$$\ln K_A = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (4)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (5)$$

表中显示不同温度下 $\Delta G < 0$, 表明衍生物 I、II 与 HSA 结合的作用过程是一个 Gibbs 自由能降低的自发过程; $\Delta H < 0$, $\Delta S < 0$, 表明其结合过程是焓驱动, 主要的相互作用力为范德华力^[23]。此结果与分子模拟的结果一致。

表 5 不同温度下衍生物-HSA 体系的热力学参数

Table 5 Thermodynamic parameters of derivative-HSA systems at different temperatures

Systems	T/K	$\Delta G / (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta H / (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta S / (\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1})$
I-HSA	300	-21.44	-73.13	-173.36
	305	-20.58		
	310	-19.71		
II-HSA	300	-26.66	-280.80	-846.85
	305	-22.42		
	310	-18.19		

2.8 衍生物 I 和 II 对 HSA 构象的影响

利用同步荧光光谱可以了解药物分子对蛋白质构象的影响。当 $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ 时, 同步荧光光谱只显

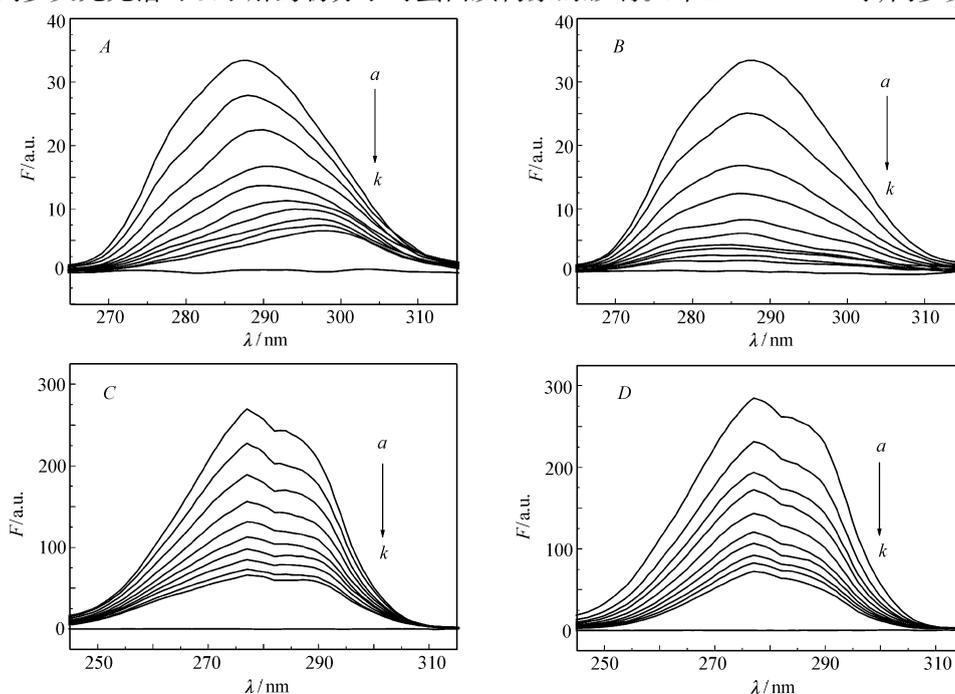


图 7 不同衍生物-HSA 体系的同步荧光光谱

Fig. 7 Synchronous fluorescence spectra at $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ (A, B) and 60 nm (C, D) of derivatives I (A, C) and II (B, D)-HSA systems

$a \sim j; c(\text{HSA}) = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, $10^5 c(\text{I/II}) / (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}) = 0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0$; $k. c(\text{HSA}) = 0 \text{ mol/L}$, $c(\text{I/II}) = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$

酪氨酸残基(Tyr)的光谱特征;而当 $\Delta\lambda = 60$ nm 时,仅表现色氨酸残基(Trp)的荧光^[24]。

图7为300 K时不同浓度衍生物 I (II)存在下 HSA 的同步荧光光谱。由图7可以看出,HSA 荧光随衍生物 I (II)浓度的升高而呈显著下降趋势。在 I-HSA 体系中,酪氨酸残基的最大荧光发射峰所在波长明显红移,由 288 nm 红移至 298 nm,说明衍生物 I 加入后使得 HSA 酪氨酸残基附近的微环境极性增加。而在 II-HSA 体系中,酪氨酸残基的最大荧光发射峰所在波长轻微蓝移,由 288 nm 蓝移至 285 nm,说明衍生物 II 加入后 HSA 酪氨酸残基附近的微环境疏水性有得到增加。而色氨酸残基的最大荧光发射峰所在的波长没有明显的变化,这可能表明衍生物 I (II)与 HSA 的结合靠近酪氨酸。

3 结 论

分子对接结果显示衍生物 L-组氨酸肉桂酰胺(I)或(E)-3-(4-甲氧苯基)丙烯酰-L-组氨酸(II)主要通过范德华力和疏水作用结合在 HSA 亚结构域 II A(即 site I)的疏水腔内,荧光猝灭数据和紫外-可见光谱结果表明,在体外生理条件下,衍生物 I (II)均可以与 HSA 结合形成基态配合物,静态猝灭是引起 HSA 内源荧光产生显著猝灭的主要原因,其主要的结合力为范德华力,这种结合作用引起了酪氨酸残基附近的微环境变化,并最终导致了 HSA 构象的改变,且结合能力衍生物 II > 衍生物 I。这些结果为实现组氨酸酰胺类衍生物在生物体内的药代动力学进一步研究发展提供了有益探索,为药物的设计、改良提供了一些有价值的理论参考。

参 考 文 献

- [1] YANG Feng, LIANG Hong. Structure of Human Serum Albumin and Its Complexes[J]. *Prog Chem*, 2013, **25**(4): 530-538 (in Chinese).
杨峰,梁宏. 人血清白蛋白及其复合物的结构基础[J]. 化学进展, 2013, **25**(4): 530-538.
- [2] LIANG Jin, FENG Suling. Study on the Interaction Between Ambroxol Hydrochloride and Human Serum Albumin by Spectroscopy and Molecular Docking[J]. *Spectrosc Spectr Anal*, 2011, **31**(4): 1020-1024 (in Chinese).
梁晶,冯素玲. 光谱法和分子对接法研究盐酸氨溴索与人血清白蛋白的相互作用[J]. 光谱学与光谱分析, 2011, **31**(4): 1020-1024.
- [3] Noguchi T, Inoue Y, Tang X S. Hydrogen Bonding Interaction Between the Primary Quinone Acceptor Qa and a Histidine Side Chain in Photosystem II as Revealed by Fourier Transform Infrared Spectroscopy[J]. *Biochemistry*, 1999, **38**(1): 399-403.
- [4] Mathieu V, Van Den Berge E, Ceusters J, et al. New 5-Aryl-1H-Imidazoles Display *in Vitro* Antitumor Activity Against Apoptosis-Resistant Cancer Models, Including Melanomas, Through Mitochondrial Targeting[J]. *J Med Chem*, 2013, **56**(17): 6626-6637.
- [5] Petitpas I, Bhattacharya A A, Twine S, et al. Crystal Structure Analysis of Warfarin Binding to Human Serum Albumin Anatomy of Drug Site I [J]. *J Biol Chem*, 2001, **276**(25): 22804-22809.
- [6] Kheder N A. Hydrazonoyl Chlorides as Precursors for Synthesis of Novel Bis-Pyrrole Derivatives[J]. *Molecules*, 2016, **21**(3): 326.
- [7] WANG Cunxin, CHANG Shan, GONG Xinqi, et al. Progress in the Scoring Functions of Protein-Protein Docking[J]. *Acta Phys Chim Sin*, 2012, **28**(4): 751-758 (in Chinese).
王存新,常珊,龚新奇,等. 蛋白质-蛋白质分子对接中打分函数研究进展[J]. 物化学报, 2012, **28**(4): 751-758.
- [8] YU Yonghui. Study on Interactions and Recognition Between Ligand and Protein [D]. Beijing: Beijing University of Technology, 2003 (in Chinese).
于永辉. 配体-受体相互作用与识别的研究[D]. 北京:北京工业大学, 2003.
- [9] Li D, Hong D, Guo H, et al. Probing the Influences of Urea on the Interaction of Sinomenine with Human Serum Albumin by Steady-State Fluorescence[J]. *J Photochem Photobiol B*, 2012, **117**(117C): 126-131.
- [10] Pacheco M E, Bruzzone L. Synchronous Fluorescence Spectrometry: Conformational Investigation or Inner Filter Effect[J]. *J Lumin*, 2013, **137**(9): 138-142.
- [11] Xie M X, Long M, Liu Y, et al. Characterization of the Interaction Between Human Serum Albumin and Morin[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, **1760**(8): 1184-1191.

- [12] Yan Z Y, Lin X F, Yuzhu H U. Interaction Between Gatifloxacin and Bovine Serum Albumin[J]. *J Chinese Pharm Sci*, 2005, **14**(1):33-37.
- [13] Ph. D. Haleem, J Issaq. Capillary Electrochromatography and Pressurized Flow Capillary Electrochromatography[J]. *Instrum Sci Technol*, 2000, **54**(5):209-210.
- [14] Wang C, Wu Q H, Li C R, et al. Interaction of Tetrandrine with Human Serum Albumin: A Fluorescence Quenching Study [J]. *Anal Sci*, 2007, **23**(4):429.
- [15] Du C R, Luo X, Wei J R, et al. Preparation of (2E)-3-(4'-Halophenyl) prop-2-enoyl Sulfachlorpyridazine Sodium Salts and Their Interaction with Bovine Serum Albumin by Fluorescence Spectroscopy[J]. *Chem Res Chinese Univ*, 2013, **29**(5):854-860.
- [16] ZHANG Qiong, SONG Yumin, LIU Jiacheng, et al. Interaction Between Complexes of Transition Metal with Warfarin and Human Serum Albumin[J]. *Chinese J Inorg Chem*, 2011, **27**(9):1772-1780 (in Chinese).
张琼, 宋玉民, 刘家成, 等. 华法灵过渡金属配合物与人血清白蛋白相互作用研究[J]. *无机化学学报*, 2011, **27**(9):1772-1780.
- [17] FENG Xiaoqiang, FU Guoqing, LI Xiaofang, et al. Interaction of Rare Earth with Bovine Serum Albumin[J]. *Chinese J Lumin*, 2011, **32**(2):205-209 (in Chinese).
冯小强, 伏国庆, 李小芳, 等. 稀土 La(III)、Nd(III)与牛血清白蛋白的相互作用[J]. *发光学报*, 2011, **32**(2):205-209.
- [18] ZHANG Yong, ZHANG Guizhu, WANG Yuemei, et al. Studies of Interaction of Mitomycin C and Serum Albumin in by Spectrum Method[J]. *J Anal Sci*, 2000, **16**(6):445-449 (in Chinese).
张勇, 张贵珠, 王月梅, 等. 光谱法研究丝裂霉素、血清白蛋白以及金属离子间的相互作用[J]. *分析科学学报*, 2000, **16**(6):445-449.
- [19] WU Jinxiu, LI Mei, LIU Shaogang, et al. Study on Interaction of Y^{3+} and Bovine Serum Albumin by Spectrometry[J]. *Chinese J Lumin*, 2012, **33**(10):1153-1159 (in Chinese).
吴锦绣, 李梅, 柳召刚, 等. 光谱法研究稀土离子钇(III)与牛血清白蛋白的相互作用[J]. *发光学报*, 2012, **33**(10):1153-1159.
- [20] WANG Jian, ZHENG Xuefang, CAO Hongyu, et al. Synthesis of 4-Thio-5-iodouridine and the Interaction Between It and Human Serum Albumin[J]. *Chinese J Lumin*, 2013, **34**(3):361-368 (in Chinese).
王健, 郑学仿, 曹洪玉, 等. 4-硫-5-碘尿苷的合成及其与人血清白蛋白间的相互作用[J]. *发光学报*, 2013, **34**(3):361-368.
- [21] Liu Y, Xie M X, Kang J, et al. Studies on the Interaction of Total Saponins of Panax Notoginseng and Human Albumin by Fourier Transform Infrared Spectroscopy[J]. *Spectrochim Acta Part A*, 2003, **59**(12):2747-2758.
- [22] Mandal P, Bardhan M, Ganguly T. A Detailed Spectroscopic Study on the Interaction of Rhodamine 6g with Human Hemoglobin[J]. *J Photochem Photobiol B*, 2010, **99**(2):78-86.
- [23] XU Li. Studies on Solution Thermodynamics of Protein and Its Model Molecules[D]. Zhengjiang University, 2004 (in Chinese).
许莉. 蛋白质模型分子溶液热力学研究[D]. 浙江大学, 2004.
- [24] DU Chuanrong, LU Dongwei, SHI Kang, et al. Synthesis of Three Cinnamamide Derivatives and Their Interaction Mechanism with Human Serum Albumin[J]. *Chinese J Lumin*, 2015, **36**(11):1342-1352 (in Chinese).
杜传荣, 逯东伟, 石康, 等. 三种肉桂酰胺衍生物的制备及其与人血清白蛋白的结合[J]. *发光学报*, 2015, **36**(11):1342-1352.

Synthesis of Two *L*-Histidine Amide Derivatives and the Interaction Mechanism with Human Serum Albumin

HE Wei^a, ZOU Jiajia^a, LU Dongwei^a, CHENG Hui^a, LIN Cuiwu^{a,b*}

(^aSchool of Chemistry and Chemical Engineering;

^bGuangxi Colleges and Universities Key Laboratory of Applied Chemistry Technology and Resource Development, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530004, China)

Abstract *L*-Histidine has excellent affinity for biological organism. Its derivatives by structural modification

may possess high pharmacological activity and bio-availability. In this work, two *L*-histidineamide derivatives were designed and synthesized by the reaction of *L*-histidine with *trans*-cinnamic acid and *p*-methoxycinnamic acid. Their structures were characterized by infrared, mass spectrometry, and nuclear magnetic resonance. The interaction mechanism of derivatives and human serum albumin (HSA) was investigated by molecular operating environment (MOE) molecular docking, fluorescence spectroscopy, synchronous fluorescence spectroscopy (SFS) and ultraviolet-visible (UV-Vis) absorption spectroscopy. The results of MOE molecular docking shows that the two derivatives exist in the hydrophobic pocket of subdomain II A (site I) of HSA under the action of *van der Waals* force and hydrophobic effect, with the simulation binding energy are -13.82 and -16.25 kcal/mol, respectively. The fluorescence quenching results show that the derivatives can interact with HSA and form new ground-state complexes and the fluorescence quenching process is a static quenching procedure. The binding of HSA to derivatives driven by *van der Waals* force was found from the thermodynamic parameters, and the binding equilibrium constants at different temperatures (300 K, 305 K, and 310 K) are 1.773×10^4 , 6.354×10^3 , 1.260×10^3 , 5.314×10^4 , 4.614×10^3 , 1.420×10^3 , respectively. The SFS characterization shows that the secondary structure of HSA has been changed by derivatives. Combining the results of UV-Vis spectra, it is obviously that under physiological conditions *in vitro*, the interaction between derivatives with HSA produces static quenching and conformational effects to the internal fluorescence of HSA through *van der Waals* force, which is consistent with the prediction of molecular docking, thus providing a reference for the further development of histidine amide derivatives research.

Keywords *L*-histidineamide derivatives; spectrometry methodology; human serum albumin; molecular docking

Received 2016-11-24; Revised 2017-02-06; Accepted 2017-03-10

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21362001), the Guangxi Natural Science Foundation of China (No. 2013GXNSFDA019005)

Corresponding author: LIN Cuiwu, professor; Tel/Fax: 0771-3233718; E-mail: cuiwulin@163.com; Research interests: natural organic and synthetic chemistry