doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.18.007

盐酸比哌立登与人血清蛋白的相互作用研究 *

韩永光 安 娜 闫 蕊 李晓飞△

（河南中医药大学药学院 河南 郑州 450046）

摘要 目的：研究盐酸比哌立登(BH)与人血清蛋白(HSA)的相互作用，为阐明其在体外的代谢过程、作用机理提供理论依据。**方法：**本研究采用紫外 - 可见分光光度法、荧光光谱法、傅里叶变换红外光谱(FTIR)法及分子对接模拟等方法，在不同温度下，测定BH与HAS的紫外吸收光谱变化、结合常数、结合位点，蛋白质二级结构变化和分子模拟对接情况。**结果：**在25 ℃时，BH与HSA的结合常数KA为2.71× 10^3 L/mol，结合位点数目是0.86；在37 ℃时，结合常数KA为1.58× 10^3 L/mol，结合位点数目为0.82。BH使得HSA的荧光波长向短波长方向蓝移；BH可导致HSA的α- 螺旋向无规卷曲的转变。**结论：**BH与HAS通过氢键和范德华力相互作用，导致HSA酪氨酸残基周围内环境被破坏，环境极性减弱，疏水性增加，同时还会导致HSA荧光静态猝灭。

关键词：盐酸比哌立登；人血清蛋白；荧光光谱；傅里叶变换红外光谱；分子模拟

中图分类号：R-33；R742.5；R392.7 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2018)18-3435-05

Study on the Interaction of Biperiden Hydrochloride with Human Serum Albumin*

HAN Yong-guang, AN Na, YAN Rui, LI Xiao-fei△

(School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou, Henan, 450046, China)

ABSTRACT Objective: To elucidate the metabolic process of BH in vitro and provide theoretical basis for its mechanism of action, the interaction between Biperiden Hydrochloride(BH) with human serum albumin (HSA) was investigated. UV absorption spectra, binding constants, binding sites, protein secondary structure changes and molecular docking of BH and HAS were measured under different temperatures. **Methods:** The interaction between BH and HSA was studied by UV-visible spectrophotometry, fluorescence spectrometry, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) method and molecular connection simulation. **Results:** The number of bingding sites was approximately 0.86 and the bingding constant Ka was 2.71× 10^3 L/mol at 298 K, while the number of bingding sites was approximately 0.82 and the bingding constant Ka was 1.58× 10^3 L/mol at 310K. The main fluorescence peaks of HSA shifted markedly to shorter wavelenth on account of BH and the α-helix of HSA changs to the random crimp on account of BH. **Conclusion:** The thermodynamic parameters show that the binding foroce between BH and HSA is mainly the hydrogen bond and van der Waals force. BH could lead to HSA Static quenching fluorescence, disturb the protein's structure around tyrosine residues and increase the protein hydrophobic. BH also lead to HSA static quenching fluorescence.

Key words: Biperiden Hydrochloride; Human serum albumin; Fluorescence spectrometry; Fourier Transform Infrared Spectroscopy; Molecular docking

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R742.5; R392.7 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2018)18-3435-05

前言

人血清白蛋白(Human Serum albumin，HSA)属于一种简单的蛋白质，是人血浆中含量最丰富的蛋白质，其与内源性物质、外源性物质(药物小分子、金属离子)等强大的结合实现了药物的运输、储存等重要功能[1-3]。多种外源性小分子(如表面活性剂、药物、各种离子、配合物、染料物质等)在生物体的功能体现多是通过和生物大分子物质(如HSA)结合完成的，在相互作用的过程中，这种小分子在生物体内的分布，代谢、排泄方式、作用强度以及作用时间等均有很大的变化，同时，结合后所形成的复合物的光谱性质也会发生一定的改变[4-6]。关于生物大分子 - 药物小分子体系的研究已成为生命科学、生物化学、临床医学等领域的热点，通过探索药物小分子与蛋白质结合过程中的一系列因素(结合位点、结合位数、结合力)在体外模拟构建结合模型，既可以指导新药的开发、设计和筛选，又为实地解决临床合理用药及药代动力学问题提供理论依据[7]。因此，对生命过程的研究中最基础的问题之一就是小分子与生物大分子的相互作用，尤其是具有活性的药物小分子与蛋白质生物大分

* 基金项目：河南省高等学校重点科研计划项目(15B350002)

作者简介：韩永光(1984-)，博士，主要研究方向：蛋白质生物化学，E-mail：hyg1207@163.com，电话：037165676656

△ 通讯作者：李晓飞(1979-)，副教授，主要研究方向：计算机辅助药物设计，E-mail：lixiaofei@hactcm.edu.cn，电话：037165676656

(收稿日期：2018-03-17 接受日期：2018-04-13)

子的相互作用[8,9]。盐酸比哌立登(Biperiden hydrochloride,BH)又称安克痉,属于中枢抗胆碱类药物,它通过进入中枢抑制黑质纹状体通路的兴奋性递质乙酰胆碱,从而对震颤麻痹有一定疗效,适用于治疗药物引起的椎体外系综合征及震颤麻痹等病症。因此,它常常被用为治疗帕金森的早期药物[10]。

本实验采用紫外 - 可见分光光度法、荧光光谱法、FTIR 及分子模拟等方法研究 BH 与 HSA 的相互作用，探讨了 BH 对蛋白质的影响,有助于深入了解 BH 在医药领域有广泛应用的分子作用机理,为阐明其在体内的代谢过程,作用机理提供实验依据，同时对于 BH 分子结构的改造和设计也有重要的帮助,有利用设计出新的,更高效的药物。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

紫外分光光度计 Thermo evolution300(美国赛默飞公司);荧光分光光度计 日立 F-7000(日本日立公司);傅里叶红外变换仪 Thermo Nicolet IS10（美国赛默飞公司）；电子天平 BSA-224S(德国赛多利斯公司);酸度计 PB-10(德国赛多利斯公司);金属浴 PROIII(卡尤迪生物科技(北京)有限公司)。人血清白蛋白(北京索莱宝科技有限公司);磷酸二氢钠、磷酸氢二钠以及氯化钠等化学试剂均由天津市瑞金特化学品有限公司生产,均为分析纯;盐酸比哌立登购于 Sigma 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 溶液的配置 HSA 溶液，用 pH 7.4,0.2 mol/L 的 PBS 配置成 1.5× 10^{-4} mol/L 的 HSA 液,在 -20℃下保存;盐酸比哌立登储备液，用 pH 7.4,0.2 mol/L 的 PBS 配置成 1.0× 10^{-3} mol/L 的储备液,根据需要稀释,4℃下冷藏保存备用。

1.2.2 紫外可见光谱测定 BH 与 HSA 的混合液分别在 25 ℃下相互作用 10 min，设置紫外分光光度计的波长扫描范围 200-500 nm,循环次数 3 次。以相应浓度的 BH 溶液做参比。

1.2.3 荧光光谱测定 (1)选择扫描方式为 Emission,设定荧光激发波长 λ =295 nm,发射波长的扫描范围 300 -500 nm。(2)同步荧光,选择扫描方式为 Synchronous,固定荧光发射和激发的波长之差 Δλ =15 nm，设定发射波长的扫描范围 200-600 nm[11]。以上扫描速度均为 1200 nm/min,激发和发射狭缝均为 5 nm,样品池光径 1 cm,扫描次数 3 次,测定温度 25 ℃和 37 ℃,电压 400 V。

1.2.4 傅里叶红外变换光谱的测定 使用 OMNIC 软件,安装 ATR 配件,设置采集条件为样品采集后再采集背景,分辨率为 4 cm^{-1}，用得到的 HSA 红外图谱差减磷酸缓冲溶液的图谱,以差减效果 1800-2000 cm^{-1} 表现为光滑的直线为标准,然后在酰胺 I 带范围做基线校准,取 5 点进行 Savistik-Golay 函数平滑,再做傅里叶去卷积与二阶导数，推测子峰的峰位和半峰宽,选择二者用 Gausse 函数拟合谱图,重复多次,使得分离重叠在一起的子峰,最后归属对照各个子峰和二级结构,计算其积分面积得到二级结构的相对含量[12]。

1.2.5 分子对接 在 PDB 库中搜索 HSA 结构式(1AO6)下载保存，用 Chemsketch 软件画出 BH 分子结构式并保存为.mol2 格式。在 AutoDock 程序中同时打开 HSA 和 BH 的结构图,不断调试直到找出二者相互作用的活性区域以及结合能最优模式,然后进行下一步的具体分析[13]。

2 结果

2.1 紫外吸收光谱

由图 1 可以看出随着 BH 浓度从 3× 10^{-4} mol/L 的增加到 1.05× 10^{-3} mol/L,HSA 在 264 nm 左右处的吸收峰强度明显下降,并有 2 nm 左右的蓝移。

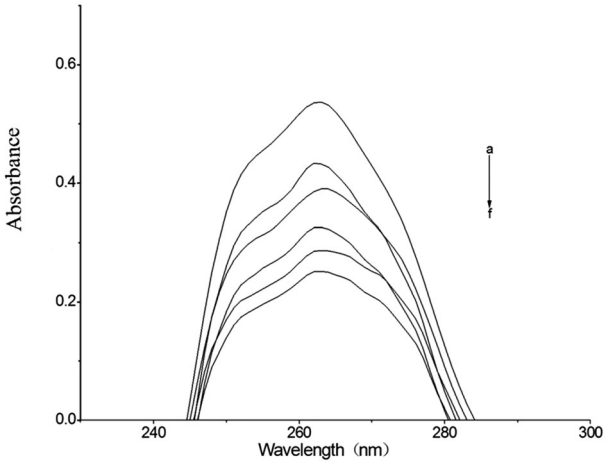

图 1 在 25℃下,不同浓度 BH 与 HSA 的紫外吸收图谱

Fig.1 UV absorption spectra of HSA in presence of BH at 298 K

Note: C_{HSA}=1.5× 10^{-4} mol/L; a-f: C_{BH}:C_{HSA}=2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1

2.2 BH 与 HSA 相互作用的荧光光谱研究

随着 BH 浓度从 0.75× 10^{-4} mol/L 的增加到 7.5× 10^{-4} mol/L,HSA 在 343 nm 荧光发射强度不断降低,而在 408 nm 的荧光强度逐渐增大,并在 369 nm 处出现了一个等发射点(图 2)。

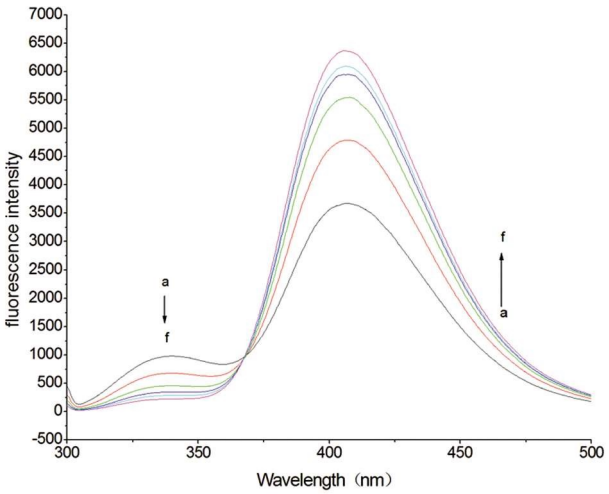

图 2 在 25℃下,不同浓度 BH 与 HSA 的荧光图谱

Fig.2 Fluorescence spectra of HSA in the presence of BH at 298K

Note: C_{HSA}=1.5× 10^{-4} mol/L; a-f: C_{BH}: C_{HSA}=1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1

根据荧光猝灭机制原理得到 BH 能导致 HSA 的静态荧光淬灭[14]。另外我们还根据计算同样得出 BH 能导致 HSA 的静态荧光淬灭。

假设这个淬灭过程是动态猝灭过程，借助经典的 Stern-Volmer 方程：

$F_0/F=1+K_qt_0[Q]=1+K_{sv}[Q]$ (1)

公式(1)中 F0 是未加入猝灭剂时荧光物质的荧光强度，F 是加入猝灭剂后的荧光强度，[Q]是猝灭剂的浓度，K_q 是双分子猝灭速率常数，t_0 是未加入猝灭剂时荧光物质的荧光寿命（大约 10^{-8} s），K_{sv} 是 Stern-Volmer 猝灭常数。随着 BH 的不断加入，HSA 的荧光猝灭强度值见表 1 和表 2，以 F_0/F 对[Q]拟合散点图，发现有很强的线性关系，由拟合直线的斜率可得到猝灭常数 K_{SV} 和 K_q（表 2）。

表 1 不同浓度 BH 与 HSA 的荧光猝灭值(CHSA=1.5× 10^{-4} mol/L)

Table 1 The Fluorescence quenching value of HSA at different concentation of BH

[BH]/[HSA]	25 ℃		37 ℃	
	F	F_0/F	F	F_0/F
3.33	983	2.0326	760.7	2.5884
6.67	682.4	2.9279	422	4.6659
13.33	460.1	4.3425	336.4	5.8532
20.00	347.6	5.7480	256.2	7.6854
26.67	287.7	6.9447	187.1	10.5238
33.33	225.4	8.8642	153.8	12.8023

不同温度下 F_0/F 对[Q]的线性关系，将计算出的猝灭常数归纳表 2 中：

表 2 不同温度 BH 与 HSA 的猝灭常数值

Table 2 The Fluorescence quenching value of HSA at 298 K and 310 K

	25 ℃		37 ℃	
	K_q(L/mol·s)	r	K_q(L/mol·s)	r
HSA	2.1947× 10^{11}	0.99617	3.2406× 10^{11}	0.98543

结果发现 KQ 值均大于动态碰撞的最大猝灭常数 2.0× 10^{10} L/mol·S[15]，由此可得出 BH 与 HSA 之间的荧光猝灭方式是静态猝灭，二者之间发生了较强的相互作用，并且在一定程度上改变了蛋白质的构象。

2.3 BH 与 HSA 的结合常数 K_A、结合位点数 n 及作用力类型

静态猝灭过程荧光物质和猝灭剂之间依靠分子间作用力相结合，从而使荧光物质的荧光强度有了一定程度的减弱。通常使用位点结合模型来概括它们之间的相互作用过程。假定 HSA 分子（P）对小分子药物 BH（Q）有 n 个相同却分别独立的结合位点，HSA 的浓度为[P]，BH 的浓度为[Q]，根据静态猝灭公式：

$Lg[(F_0-F)/F]=lgK_A+nlg[Q]$ (2)

Lg[$(F_0$-F)/F]对 lg[Q]进行线性分析，代入数据，即可通过斜率和截距求得结合位点数 n 与结合常数 KA 见下表 3。

表 3 不同温度下 BH 与 HSA 的结合常数和结合位点数目(C_{HSA}=1.5× 10^{-4} mol/L)

Table 3 Binding constants (K_A) and binding sites (n) of BH-HSA at 298 K and 310 K

	25℃		37℃	
	K_A(L/mol)	n	K_A(L/mol)	n
HSA	2.71× 10^3	0.86	1.58× 10^3	0.82

药物小分子 BH 与 HSA 的结合位点数接近 1，证明在结合过程中的结合力还是比较稳定的，BH 可以被 HSA 贮藏和运载，另外随着温度的增加二者的结合常数逐渐变小，进一步证明它们之间的猝灭方式是静态猝灭。

根据 Ross 等[16]归纳出的关于判定生物大分子和小分子结合力特性以及大分子本身结合力特点的热力学规律，由反应前后的熵变△ S 与焓变△ H 的相对大小，推断小分子与生物大分子之间的主要作用形式：范德华力和氢键作用力使得△ H＜0 且△ S＜0；而当反应体系△ H＞0 且△ S＞0 时，是疏水作用力；当△ H＜0 但△ S＞0 时，断定为静电引力。另外，当温度变换并不明显时，△ H 可以被看作常数[9]，R 是热力学常数，我们利用热力学公式：

$LnK_{A1}/K_{A2}=(1/T_1-1/T_2)\Delta H/R$ （3）

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

BH 与 HSA 在 25 ℃得出的 K_A 推算出：

△ G=-21.674（KJ/mol），△ H=-47.164（KJ/mol），△ S=-85.53（J/mol）；

BH 与 HSA 在 37 ℃得出的 K_A 推算出：

△ G=-20.652（KJ/mol），△ H=-47.164（KJ/mol），△ S=-85.52（J/mol）。

由计算的结果可得出该反应是自发进行的放热的过程，BH 与 HSA 的主要的作用力类型是氢键和范德华作用力。

2.4 同步荧光对蛋白质二级构象的影响

由图 3 可知△ =15 时，从 0.75× 10^{-4} mol/L 的增加到 7.5× 10^{-4} mol/L 使得 HSA 的荧光波长向短波方向移动即发生蓝移。

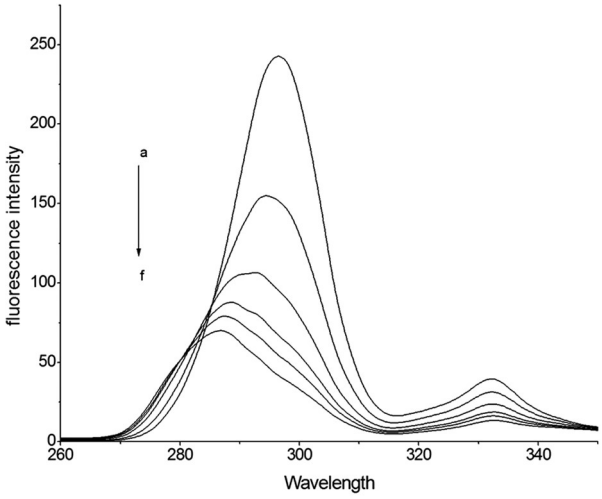

图 3 在 25℃下，不同浓度 BH 与 HSA 的△ 15 同步荧光光谱

Fig.3 Synchronous fluorescence spectra of BH-HSA mixture at λ =15 nm at 298 K

Note: C_{HSA}=1.5× 10^{-4} mol/L; a-f: C_{BH}: C_{HSA}=1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1

2.5 傅里叶红外变换光谱

实验结果如表 4，二级结构形式中主要是发生α- 螺旋向无规卷曲的转变，β- 转角和 β- 折叠的含量变化并非非常明显，这也进一步证实了药物 BH 与 HSA 之间确实发生了相互作用。

2.6 分子模拟

由分子对接模拟图 4 中可以很明显地看出 BH 与 HSA 的蛋白质之间存在的氢键作用力，结合位点周围的氨基酸残基 LYS-195、GLN196、SER192、GLU153、HIS288、GLU292 均为亲水性氨基酸，这与我们从荧光光谱计算得出的δH 与 δS 均＜0，主要作用力形式是氢键和范德华力的判断是一致的。

3 讨论

BH 常用做治疗帕金森的早期药物，但其作用机制尚不完全清楚，在体内的运输，结合方式也有待阐明。药物在生物体内多会与 HSA 结合后，实现了药物的运输等重要功能，因此本文通过紫外 - 可见分光光度法、荧光光谱法、傅里叶变换红外光谱（FTIR）法及分子对接模拟等方法，在不同温度下，测定 BH 与 HAS 的紫外吸收光谱变化、结合常数、结合位点，蛋白质二级结构变化和分子模拟对接情况，研究 BH 与 HAS 的相互作用特点。随着 BH 浓度的增加，HSA 在 264nm 处的吸收峰强度

表 4 在 25 ℃下，BH 与 HSA 作用后酰胺 I 带各二级结构含量变化（C_{HSA}=1.5× 10^{-4} mol/L）

Table 4 Secondary structure of BH-HSA determined by Amide I Regions of FTIR Spectra at 298 K

HSA	α-helix	β-folding	β-turn	Random coil
HSA	48.1	18.8	21.8	11.3
BH＋has	39.4	19.1	20.8	20.7

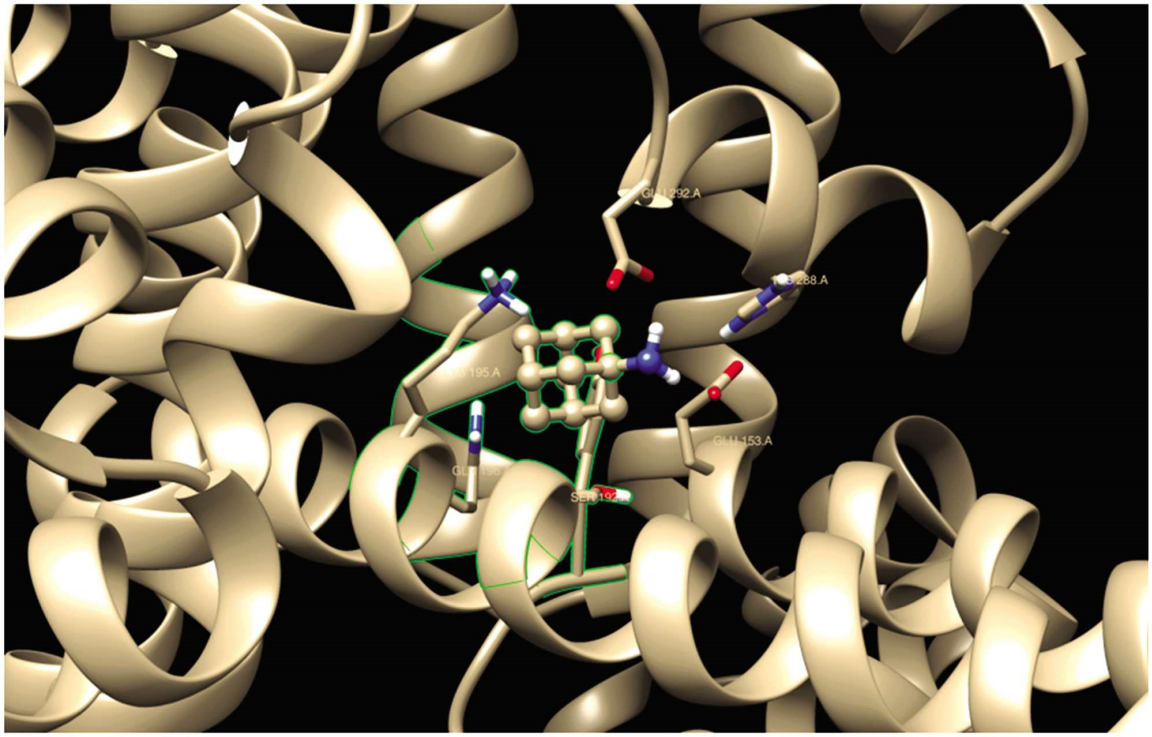

图 4 BH 与 HSA 的分子对接模拟图

Fig.4 Molecular docking model of BH and HSA

Note: The white, red and blue regions of the Fig.4 Represent the H, O and N atoms, respectively.

明显下降,并有 2 nm 左右的蓝移,说明 BH 影响了 HSA 的酪氨酸、苯丙氨酸或色氨酸残基的芳香环疏水基团,导致 HSA 空间结构发生一定的改变,说明 BH 确实与 HAS 发生了相互作用,并导致蛋白结构发生了变化。随着 BH 浓度的增加,HSA 在 343 nm 处的荧光发射强度不断降低,而在 408 nm 处的荧光强度逐渐增大,并在 369 nm 处出现了一个等发射点,表明 BH 与 HSA 形成稳定的复合物。通过实验结果计算也得出 BH 与 HSA 之间的荧光猝灭方式是静态猝灭,二者之间发生了较强的相互作用,并且在一定程度上改变了蛋白质的构象。荧光猝灭指的是溶液中随着荧光猝灭剂的不断加入而使得荧光物质的荧光寿命减少或者荧光强度减弱的情况。荧光猝灭机制通常分为两种:静态猝灭与动态猝灭。静态猝灭的过程,基态荧光物质和猝灭剂相互作用形成不发射荧光的配合物;动态猝灭是猝灭剂和激发态的荧光物质快速相碰而后没有辐射能量跃迁回到基态的过程,它会随着温度的升高猝灭地越完全,而且动态猝灭过程对于荧光物质的生理活性和结构不会产生影响[17]。我们又进一步通过红外光谱分析了 BH 和 HAS 的相互作用,在红外测定中,酰胺 I 带中的各个二级结构的归属已经有了比较公认的结论:α- 螺旋对应 1650-1658 cm^{-1},β- 转角对应 1700-1660 cm^{-1},无规卷曲对应 1650-1640 cm^{-1},β- 折叠对应 1640-1610 cm^{-1}[18]。实验结果显示 HSA 中α- 螺旋的相对含量减少,而无规卷曲的相对含量增加,而 β- 折叠和 β- 转角相对含量并无明显变化,说明增加的无规卷曲主要是有α- 螺旋转变而来的,蛋白质的结构的松散程度增加,肽链部分展开,进一步证实 BH 和蛋白发生了相互作用,并使得蛋白二级结构发生一定的改变。

分子模拟对接是揭示药物和蛋白质相互作用非常好的一种手段,可为实验提供理论上的支持和指示。也可为设计新的药物提供帮助。HSA 的晶体结构主要是由区域 I(1-195)、区域 II(196-383)、区域 III(384-585)这三个部分组成,有两个理论的结合位点 -- 位点 I 与位点 II 位于它的疏水腔中,这两个结合位点又分别处在亚域 IIA 与亚域 IIIA[19,20]。BH 的亲水基团与蛋白质疏水腔中外的亲水氨基酸残基发生相互作用。进入疏水腔外后,其主要官能团如羟基等会与蛋白质的主肽链上的亲水基团发生相互作用,同时 BH 中的苯环与疏水腔中疏水氨基酸残基之间也会发生相互作用,这样相互作用可能会破坏 HSA 原有的二级结构,导致α- 螺旋向松散的无规卷曲转变。

我们主要借助荧光光谱法,紫外可见吸收光谱法、傅里叶红外变换光谱法以及分子对接技术为辅助方法从分子水平研究了 BH 与 HSA 的相互作用,实验数据表明它们之间确实产生了较强的作用,使得蛋白质的结构也发生了变化。结果表明,在 25 ℃时,BH 与 HSA 的结合常数 KA 为 2.71×10^3 L/mol,结合位点数目是 0.86;在 37℃时,结合常数 KA 为 1.58×10^3 L/mol,结合位点数目为 0.82。依照热力学原理可断定 BH 与 HSA 之间的相互作用可能是自发进行的放热的过程,计算得知两者之间主要的作用力为氢键和范德华力。荧光结果表明 BH 能够导致 HSA 荧光静态猝灭,同步荧光结果表明 BH 与 HSA 结合时,其酪氨酸残基周围内环境被破坏,环境极性减弱,疏水性增加。分子对接模拟研究结果与光谱法得到的结果一致。本文探讨了 BH 对蛋白质的影响,为阐明其在体内的代谢过程,作用机理提供理论依据。

参 考 文 献(References)

[1] Abdelhameed A S, Alam P, Khan R H. Binding of Janus kinase inhibitor tofacitinib with human serum albumin: multi-technique approach [J]. Journal of Biomolecular Structure & Dynamics, 2016, 34 (9): 2037-2044

[2] Chaves O A, Amorim A P, Castro L H, et al. Fluorescence and Docking Studies of the Interaction between Human Serum Albumin and Pheophytin[J]. Molecules, 2015, 20(10): 19526-19539

[3] Fasano M, Curry S, Terreno E, et al. The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin [J]. IUBMB Life, 2005, 57(12): 787-796

[4] Lomis N, Westfall S, Farahdel L, et al. Human Serum Albumin Nanoparticles for Use in Cancer Drug Delivery: Process Optimization andIn Vitro Characterization[J]. Nanomaterials, 2016, 6(6): 116

[5] Bern M, Sand K M K, Nilsen J, et al. The role of albumin receptors in regulation of albumin homeostasis: Implications for drug delivery[J]. Journal of Controlled Release Official Journal of the Controlled Release Society, 2015, 211: 144-162

[6] Levitt D G, Levitt M D. Human serum albumin homeostasis: a new look at the roles of synthesis, catabolism, renal and gastrointestinal excretion, and the clinical value of serum albumin measurements[J]. International Journal of General Medicine, 2016, 9(Issue 1): 229-255

[7] Bi S, Yan L, Wang Y, et al. Spectroscopic study on the interaction of eugenol with salmon sperm DNA in vitro [J]. Journal of Luminescence, 2012, 132(9): 2355-2360

[8] Xiang Y, Duan L, Qiang M, et al. Fluorescence spectroscopy and molecular simulation on the interaction of caffeic acid with human serum albumin [J]. Luminescence, 2016, 31(8): 1496-1502

[9] Khodaei A, Bolandnazar S, Valizadeh H, et al. Interactions Between Sirolimus and Anti-Inflammatory Drugs: Competitive Binding for Human Serum Albumin [J]. Adv Pharm Bull, 2016, 6(2): 227-233

[10] 高中宝,王洁,王炜,等.帕金森病诊断与治疗新进展[J].中国现代神经疾病杂志, 2015, 15(10): 777-781
Gao Zhong-bao, Wang Jie, Wang Wei, et al. Advances in the diagnosis and treatment of Parkinson's disease [J]. Chinese Journal of Contemporary Neurology and Neurosurgery, 2015, 15(10): 777-781

[11] Zhao Y, Li F, Carvajal M T, et al. Interactions between bovine serum albumin and alginate: an evaluation of alginate as protein carrier[J]. Journal of Colloid & Interface Science, 2009, 332(2): 345-353

[12] Surewicz W K, Mantsch H H. New insight into protein secondary structure from resolution-enhanced infrared spectra[J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 1988, 952(2): 115-130

[13] 度浔,刘学军,吕小兰,等.光谱法结合分子对接研究盐酸文拉法辛与牛血清白蛋白的相互作用[J].分析试验室, 2016, (2): 153-156
Tuo Xun, Liu Xue-jun, Lv Xiao-lan, et al. Study on the interaction of bovine serum albumin and venlafaxine hydrochloride by spectroscopy and molecular modeling method[J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2016, (2): 153-156

[14] 陈毅挺,李艳霞,黄露,等.苋菜红的解离常数及与 BSA 的相互作用[J].分析试验室, 2015, (5): 520-524
Chen Yi-ting, Li Yan-xia, Huang Lu, et al. The amaranth dissociation and its interactions with bovine serum albumin [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2015, (5): 520-524

(下转第 3475 页)

gren's syndrome patients with thrombocytopenia [J]. Clin Rheumatol, 2013, 32(12): 1783-9170

[20] 董振华.风湿病多系统损害的中医治疗[J].中国临床医生, 2014, 42 (11): 5-8
Dong Zhen-hua. Traditional Chinese medicine treatment of rheumatic disease with multiple system damage [J]. Chinese Journal for Clinicians, 2014, 42(11): 5-8

[21] 王丹,薛鸾,陆秋菊,等.解毒通络生津法对干燥综合征大鼠免疫功能影响的初步研究[J].浙江中医杂志, 2011, 46(11): 837-839
Wang Dan, Xue Luan, Lu Qiu-ju, et al. Preliminary study on the effect of detoxification and dredging collaterals on the immune function of rats with Sjogren syndrome [J]. Zhejiang Journal of Traditional Chinese Medicine, 2011, 46(11): 837-839

[22] Hernández-Molina G, Nuñez-Alvarez C, Avila-Casado C, et al. Usefulness of IgA Anti- α-fodrin Antibodies in Combination with Rheumatoid Factor and/or Antinuclear Antibodies as Substitute Immunological Criterion in Sj ögren Syndrome with Negative Anti-SSA/SSB Antibodies[J]. J Rheumatol, 2016, 43(10): 1852-1857

[23] Capaldo C, Carvajal Alegria G, Cornec D, et al. The active immunological profile in patients with primary Sjögren's syndrome is restricted to typically encountered autoantibodies [J]. Clin Exp Rheumatol, 2016, 34(4): 722

[24] Jayakanthan K, Ramya J, Mandal SK, et al. Younger patients with primary Sjögren's syndrome are more likely to have salivary IgG anti-muscarinic acetylcholine receptor type 3 antibodies[J]. Clin Rheumatol, 2016, 35(3): 657-662

[25] Maślińska M, Kontny E, Kwiatkowska B. The relationship between the presence of autoantibodies, indicators of local and systemic inflammation, the serum concentration of B-cell activating factor (BAFF) and the intensity of salivary gland infiltration in patients with primary Sjśgren's syndrome - a preliminary study [J]. Reumatologia, 2015, 53(6): 321-327

[26] Yang L, Bai L, Wei F, et al. Autoantibodies against interferon-γ reduce the frequency of pulmonary fibrosis and concentration of C-reactive protein in patients with primary Sjśgren's syndrome [J]. Mod Rheumatol, 2015, 25(2): 325-327

[27] Demarchi J, Papasidero S, Medina MA, et al. Primary Sjśgren's syndrome: Extraglandular manifestations and hydroxychloroquine therapy [J]. Clin Rheumatol, 2017, 36(11): 2455-2460

[28] Yoon CH, Lee HJ, Lee EY, et al. Effect of Hydroxychloroquine Treatment on Dry Eyes in Subjects with Primary Sjśgren's Syndrome: a Double-Blind Randomized Control Study [J]. J Korean Med Sci, 2016, 31(7): 1127-1135

[29] Wang SQ, Zhang LW, Wei P, et al. Is hydroxychloroquine effective in treating primary Sjogren's syndrome: a systematic review and meta-analysis[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2017, 18(1): 186

[30] Gottenberg JE, Ravaud P, Puéchal X, et al. Effects of hydroxychloroquine on symptomatic improvement in primary Sjśgren syndrome: the JOQUER randomized clinical trial[J]. JAMA, 2014, 312(3): 249-258

(上接第 3439 页)

[15] Hu YJ, Li W, Liu Y, et al. Fluorometric investigation of the interaction between methylene blue and human serum albumin [J]. J Pharm Biomed Anal. 2005, 39(3): 740-745

[16] Ross P D, Subramanian S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability [J]. Biochemistry, 1981, 20 (11): 3096-3012

[17] Wang Qi , Huang Chuan-ren . Binding interaction of atorvastatin with bovine serum albumin: Spectroscopic methods and molecular docking [J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2016, 5 (156): 155-163

[18] Cartery D C, He X M, Munson S H, et al. Three-dimensional structure of human serum albumin[J]. Science, 1989, 244: 1195-1198

[19] Zhang J, Wang X J, Yan Y J, et al. Comparative studies on the interaction of genistein, 8-chlorogenistein, and 3',8-dichlorogenistein with bovine serum albumin [J]. Journal of Agricultural and Food emistry, 2011, 59: 7506-7513

[20] Carter D C, He X M. Structure of human serum albumin [J]. Science, 1990, 249: 302-303