

# 吲哚美辛与牛血清白蛋白结合作用的研究

曹玺珉, 杜黎明\*

山西师范大学分析测试中心, 山西 临汾 041004

**摘要** 应用紫外光谱和荧光光谱研究了生理条件下吲哚美辛与牛血清白蛋白的相互作用机理, 确定静态猝灭和非辐射能量转移是导致吲哚美辛对 BSA 荧光猝灭的两大原因。利用荧光猝灭反应求得药物与牛血清白蛋白之间的结合常数和结合位点数, 根据热力学参数确定它们之间的作用力类型, 依据能量转移理论计算二者相互结合时给体-受体间的距离和能量转移效率, 结合紫外吸收光谱和荧光光谱结果, 探讨了吲哚美辛与牛血清白蛋白的相互作用模式。

**关键词** 吲哚美辛; 牛血清白蛋白; 紫外光谱; 荧光光谱

**中图分类号:** O644.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2007)05-0973-05

## 引言

吲哚美辛(indomethacin, IM), 属非甾体抗消炎药, 其作用机理是通过对环氧合酶的抑制而减少前列腺素的合成, 从而对肌体产生解热镇痛及消炎作用。与甾体消炎药相比具有安全性较好和副反应较小等优点, 常被作为评价非甾体抗消炎药物的标准药物。血清白蛋白是血浆中含量最丰富的重要载体蛋白, 它可与许多内源及外源性物质广泛结合。外源性物质药物进入生物体后, 通过血浆的贮存与运输才能到达受体部位产生药效。药物与蛋白质的结合可以控制药物向受体释放、避免药物迅速代谢而达不到一定的治疗效果。因此研究药物与血清白蛋白的作用对于了解药物在生物体内的吸收、转运及代谢进程, 阐明生物大分子与药物小分子相互作用的本质都具有特别重要的意义<sup>[1-3]</sup>。

本文用紫外和荧光光谱法研究了生理条件下吲哚美辛与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用, 探讨吲哚美辛与 BSA 的作用机理, 测定其荧光猝灭常数、结合常数和结合位点数, 证实吲哚美辛与 BSA 的相互结合作用主要为静态猝灭和非辐射能量转移过程; 通过计算得到给体-受体间的结合距离, 利用同步荧光技术考察了吲哚美辛对 BSA 构象的影响, 并推测了吲哚美辛与 BSA 的结合模式。这对进一步研究吲哚美辛及其衍生物在生物体内的储存、运输及代谢等提供了重要信息, 也为药物合成、临床用药提供了参考。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

LS-50B 型荧光分光光度计(美国 Perkin-Elmer 公司); UV-2201 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司); 501 型超级恒温器(重庆四达实验仪器厂)。吲哚美辛(中国药品生物制品检定所提供)先溶于少量的无水乙醇中, 与 BSA(上海丽珠东风生物技术有限公司)分别用浓度为  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 7.40 的 Tris-HCl 缓冲溶液(内含  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 维持体系的离子强度)配成  $5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的溶液, 使用时逐级稀释。其他试剂均为分析纯, 实验用水均为二次蒸馏水。

### 1.2 实验方法

在 10 mL 容量瓶中加入  $5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的吲哚美辛溶液 2.0 mL, 取适量的 BSA 溶液, 用缓冲溶液定容, 配制系列不同 BSA 浓度的 BSA/吲哚美辛混合溶液, 以相应浓度的 BSA 为参比测定吲哚美辛的紫外吸收光谱。

移取  $5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的牛血清白蛋白溶液 1.0 mL 于 10 mL 比色管中, 分别加入一定量的  $5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的吲哚美辛溶液, 用缓冲溶液定容至刻度后摇匀。放置 0.5 h, 然后置于 1 cm 荧光比色皿中, 固定荧光激发波长为 280 nm, 入射和出射狭缝均为 2.5 nm, 扫描其荧光光谱并测量其荧光强度。

收稿日期: 2006-10-12, 修订日期: 2007-01-16

基金项目: 山西省自然科学基金项目(20041030)资助

作者简介: 曹玺珉, 1969 年生, 山西师范大学分析测试中心讲师

\* 通讯联系人

e-mail: liuwzh@dus.sxnu.edu.cn

## 2 结果与讨论

### 2.1 吡啶美辛与 BSA 结合的紫外吸收光谱

固定吡啶美辛浓度不变, 改变 BSA 的浓度, 以相应浓度的 BSA 为参比, 测量混合溶液的吸收光谱, 可得到吡啶美辛与 BSA 结合后的紫外吸收差示光谱图(见图 1)。从图 1 可见, 在 pH 7.40 的 Tris-HCl 缓冲溶液中吡啶美辛的紫外吸收光谱有三个吸收带, 分别为 200~240 nm 的强吸收带、240~300 nm 的中强吸收带、300~380 nm 的弱吸收带。随着 BSA 浓度的增大, 位于 200~240 nm 的吸收带发生了显著变化, 206 nm 附近的强吸收峰明显降低, 240~300 nm 的吸收带在强度降低的同时最大吸收峰蓝移, 而 300~380 nm 的吸收带在整个过程中几乎没什么变化。当吡啶美辛和 BSA 的摩尔比大于 1 后, 266 nm 的吸收峰逐渐消失, 最大吸收峰移到 250 nm 处, 其他两个吸收带的峰位和峰形没有明显变化。这说明吡啶美辛与 BSA 发生了相互作用, 使吡啶美辛的  $\pi$  电子共轭体系的能级发生了明显变化, 即吡啶美辛与 BSA 间形成了配合物, 引起了吡啶美辛紫外吸收光谱的变化。由于基态配合物的生成, 可以初步判断吡啶美辛对 BSA 的荧光猝灭应为静态猝灭。

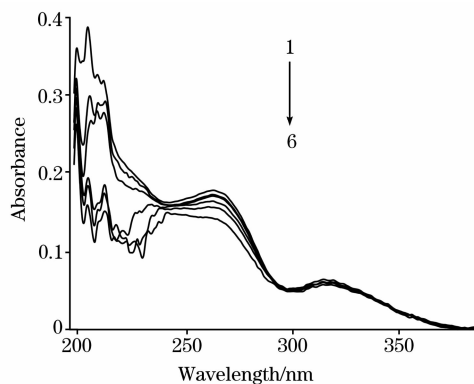


Fig. 1 The effect of bovine serum albumin on the absorption spectra of  $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  IM

$c_{\text{BSA}}(1-6)$ : 0, 1, 2, 5, 10,  $20 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

### 2.2 吡啶美辛与 BSA 结合的荧光光谱及荧光猝灭类型

蛋白质分子中的色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)和苯丙氨酸(Phe)残基能吸收紫外光, 发射荧光, 所以蛋白质具有内源荧光。蛋白质的内源荧光主要是 Trp 和 Tyr 残基所发射的, BSA 含有 19 个 Tyr 残基, 两个 Trp 残基分别在 134 及 212 位。固定 BSA 的量, 随着吡啶美辛浓度的增大, BSA 的内源荧光强度有规律地降低, 且发射峰峰位及峰形基本不变, 说明吡啶美辛对 BSA 的荧光有猝灭作用(如图 2 所示)。在 280 nm 的激发波长下, 吡啶美辛本身无荧光, 因此可以忽略“内滤光效应”的干扰问题。

在荧光发射过程中, 部分荧光体通过和其他粒子碰撞而失去激发能称为荧光猝灭。导致荧光猝灭的因素很多, 主要包括激发态反应、能量转移、生成配合物和碰撞猝灭等, 碰撞猝灭又称为动态猝灭, 静态猝灭是由于生成配合物而引起的

荧光猝灭。区别荧光猝灭是动态猝灭还是静态猝灭, 一是看相互作用物质间是否形成基态配合物, 二是依据荧光猝灭常数随温度的变化关系来确定。分别测定 17 °C 和 37 °C 温度下实验体系的荧光光谱随吡啶美辛浓度的变化情况, 绘制不同温度下 BSA 的 Stern-Volmer 图<sup>[4]</sup>(见图 3)。可以看出曲线有良好的线性关系, 且随着温度的升高曲线的斜率降低, 即吡啶美辛对 BSA 的荧光猝灭常数随温度的升高而降低, 荧光猝灭是由于二者之间形成基态配合物所引起, 结合 2.1 节吡啶美辛和 BSA 相互作用形成基态配合物的紫外吸收光谱实验结果, 说明该荧光猝灭过程为静态猝灭。根据 Stern-Volmer 方程<sup>[4]</sup>

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

其中,  $K_q$  为双分子猝灭过程速率常数,  $K_{sv}$  为 Stern-Volmer 动态猝灭常数,  $\tau_0$  为猝灭体不存在时荧光分子的平均寿命,  $[Q]$  为猝灭剂浓度, 生物大分子的荧光寿命  $\tau_0$  约为  $10^{-8} \text{ s}$ <sup>[5]</sup>, 从猝灭曲线的斜率得到  $K_{sv}$ , 由  $K_{sv} = K_q \tau_0$  求得吡啶美辛对 BSA 荧光猝灭过程的速率常数:  $t = 17 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $K_q = 1.05 \times 10^{13} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ;  $t = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $K_q = 8.91 \times 10^{12} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。各类猝灭剂对生物大分子的最大扩散碰撞猝灭(动态猝灭)速率常数为  $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ <sup>[6]</sup>, 而吡啶美辛对 BSA 荧光猝灭过程速率常数远远大于扩散控制的  $K_q$ , 所以进一步证实: 吡啶美辛对 BSA 的荧光猝灭是形成

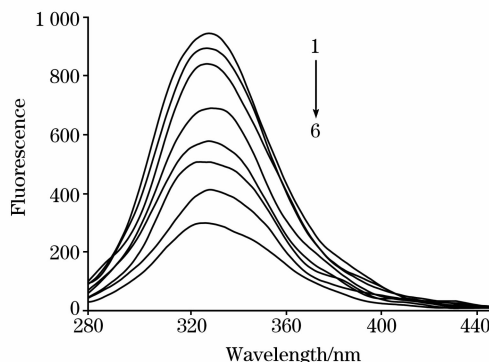


Fig. 2 The fluorescence quenching spectra of  $5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  BSA with various concentrations of IM

$c_{\text{IM}}(1-8)$ : 0, 2, 5, 8, 10, 15, 20,  $25 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

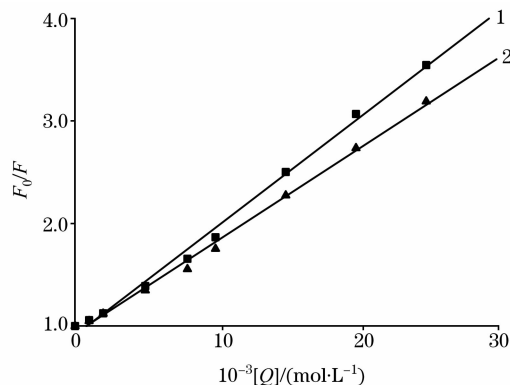


Fig. 3 Stern-Volmer plots of IM vs BSA

1: 17 °C; 2: 37 °C

了配合物所引起的静态猝灭。

### 2.3 吲哚美辛与 BSA 的结合常数和结合位点数

对于静态猝灭过程,可按静态猝灭公式<sup>[7,8]</sup>

$$\lg(F_0 - F)/F = \lg K_A + n \lg[Q]$$

处理实验数据,以  $\lg(F_0 - F)/F$  对  $\lg[Q]$  作图可得一直线,由直线的截距和斜率即可确定结合常数  $K_A$  和结合位点数  $n$ 。

将 17 和 37 °C 温度下实验体系的测量数据用静态猝灭公式处理,分别得到 17 和 37 °C 两个温度下的线性方程

$$\lg(F_0 - F)/F = 1.196 \lg[Q] + 5.924$$

$$\lg(F_0 - F)/F = 1.174 \lg[Q] + 5.754$$

线性相关系数分别为 0.997 9 和 0.997 6。由直线的截距和斜率求得两个温度下吲哚美辛和 BSA 作用的结合常数  $K_A$  和结合位点数  $n$  的值列于表 1。吲哚美辛与 BSA 相互作用时具

有一个结合位点,它们的结合常数较大,而温度对吲哚美辛与 BSA 的结合常数影响不大,吲哚美辛与 BSA 之间有较强的结合力。

### 2.4 吲哚美辛与 BSA 的主要作用力类型

药物小分子与生物大分子的作用力类型包括氢键、范德华力、静电引力、疏水作用力等<sup>[9,10]</sup>,药物不同,与 BSA 作用力的类型也不相同。在温度变化范围不大时,若将吲哚美辛与 BSA 之间的作用过程的焓变  $\Delta H$  作为一个不随温度改变的常数,依据热力学参数方程

$$\ln(K_2/K_1) = (1/T_1 - 1/T_2)\Delta H/R$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K$$

根据 17 和 37 °C 两个温度下的结合常数可以计算出吲哚美辛与 BSA 相互作用的热力学函数值,结果列于表 1。

Table 1 Thermodynamic parameters of the Indomethacin-BSA binding procedure

$T/^\circ\text{C}$	$K_A/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$n$	$\Delta H/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta G/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta S/(\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1})$
17	$8.40 \times 10^5$	1.196	-14.62	-32.89	63.0
37	$5.68 \times 10^5$	1.174	-14.62	-34.15	63.0

Ross<sup>[10]</sup>等根据大量的实验结果,总结了判断生物大分子与小分子结合作用力类型及生物大分子自身作用力类型的热力学规律, $\Delta S > 0$  可能是疏水和静电作用力; $\Delta H \approx 0$  或较小, $\Delta S > 0$  为静电作用力; $\Delta H < 0$  时静电作用力为主要作用力。因此可以认为该体系中吲哚美辛与 BSA 之间的作用力以静电引力为主,疏水作用力也存在。

### 2.5 吲哚美辛在 BSA 上的结合位置

根据 Förster 的偶极-偶极无辐射能量转移理论,当两种化合物分子满足以下条件时,将发生非辐射能量转移:(1)供能体发荧光;(2)供能体的荧光发射与受能体的吸收光谱有足够的重叠;(3)供能体与受能体足够接近,最大距离不超过 7 nm。能量转移效率与给体和受体间的距离  $r$  及临界能量转移距离  $R_0$  有关,且给体与受体间能量转移效率  $E$  为:

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6) \quad (1)$$

其中  $R_0$  是转移效率为 50% 时的临界距离。

$$R_0 = 8.8 \times 10^{-25} K^2 n^{-4} \varphi J \quad (2)$$

其中  $K^2$  为偶极空间取向因子, $n$  为介质的折射指数, $\varphi$  为给体的荧光量子产率, $J$  为给体的荧光发射光谱与受体的吸收光谱间的光谱重叠积分:

$$J = \sum F(\lambda) \epsilon(\lambda) \lambda^4 \Delta\lambda / (\sum F(\lambda) \Delta\lambda) \quad (3)$$

其中  $F(\lambda)$  为荧光给体在波长  $\lambda$  处的荧光强度, $\epsilon(\lambda)$  为受体在波长  $\lambda$  处的摩尔吸光系数,能量转移效率  $E$  又可由下式求出:

$$E = 1 - F/F_0 \quad (4)$$

由(1)~(4)式可计算出  $R_0$  和  $r$ 。

药物与蛋白质的物质的量为 1:1 时 BSA 的荧光光谱和吲哚美辛的吸收光谱见图 4,二者有一定程度的重叠。用矩形分割法对该图中光谱重叠部分的面积求和,求得重叠积分  $J = 7.91 \times 10^{-15} \text{ cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。在实验条件下,取向因子取给体-受体各向随机分布的平均值  $K^2 = 2/3$ <sup>[11]</sup>,折射指数  $n$  取水和有机物的平均值 1.336<sup>[11]</sup>,BSA 的荧光主要来自第

212 位的色氨酸残基,量子效率  $\varphi$  取 0.118<sup>[11]</sup>,将上述各量代入式(2)求得临界距离  $R_0 = 2.36 \text{ nm}$ ,由实验数据及式(4)求得能量转移效率  $E = 0.28$ ,代入式(1)得到吲哚美辛与 BSA 荧光残基间的距离  $r = 2.76 \text{ nm}$ ,小于 7 nm,符合非辐射能量转移的条件,所以吲哚美辛与 BSA 间存在非辐射能量转移,并且结合距离  $r$  大于能量转移效率为 50% 时的临界距离  $R_0$ ,说明非辐射能量转移引起荧光猝灭的概率比静态猝灭要小。

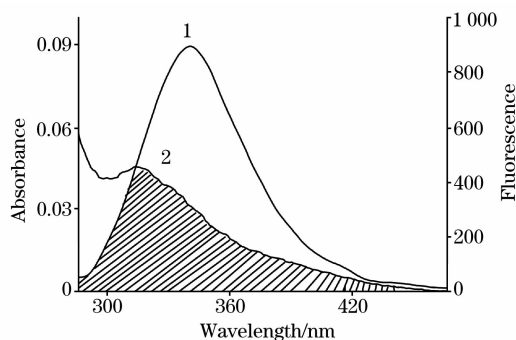


Fig. 4 Overlapping plots of the fluorescence spectra of  $5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  BSA(1) with the absorption spectra of  $5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  IM(2)

### 2.6 吲哚美辛对 BSA 构象的影响

使激发波长和发射波长的间距固定为  $\Delta\lambda$ ,同步扫描激发和发射单色器可得到同步荧光光谱。蛋白质的同步荧光光谱已被用来判断蛋白质的构象变化。对于蛋白质的同步荧光光谱, $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$  时只表现出酪氨酸残基的荧光, $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$  时仅表现出色氨酸残基的荧光<sup>[12]</sup>。因为氨基酸残基的最大荧光波长与其所处环境的疏水性有关,所以由荧光波长的改变可判断蛋白质构象的变化<sup>[13]</sup>。

固定 BSA 浓度而逐渐增大吲哚美辛的浓度,记录  $\Delta\lambda =$

15 nm 和  $\Delta\lambda = 60$  nm 时的同步荧光光谱(见图 5)。发现酪氨酸残基的最大发射波长保持不变,而色氨酸残基的最大发射波长明显红移,从 285 nm 红移至 296 nm。表明吲哚美辛的加入使 BSA 的构象发生变化,色氨酸残基所处环境的疏水性降低,BSA 内部的疏水结构有所瓦解,肽链的伸展程度增加。

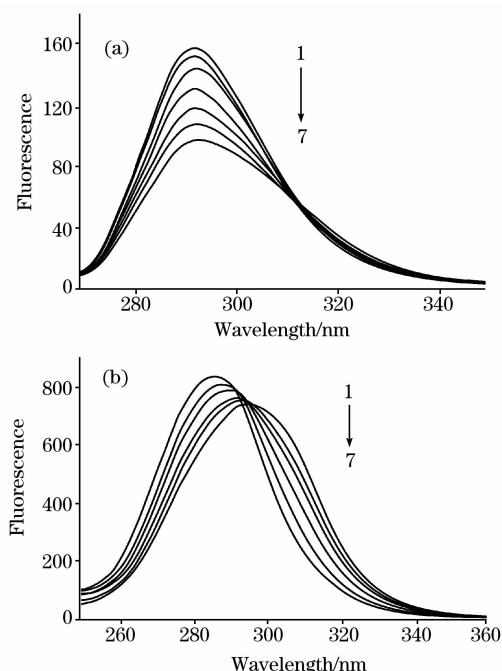


Fig. 5 Synchronous fluorescence spectrum of BSA

$c(\text{BSA}) = 5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $c(\text{IM})(1-7)$ : 0, 2, 4, 8, 12, 16,  $20 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; (a):  $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ ; (b):  $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$

## 2.7 吲哚美辛与 BSA 结合模式的分析

血清白蛋白的空间结构由 3 个结构域组成,每个结构域又由 2 个亚结构域以槽口相对的方式形成圆筒状结构,几乎所有疏水性氨基酸残基都包埋在圆筒内部,构成疏水腔<sup>[14]</sup>。药物与血清白蛋白的结合受药物分子疏水性的影响,脂溶性的药物容易进入疏水腔与蛋白质形成分子缔合物<sup>[15]</sup>。吲哚

美辛的脂溶性强,容易进入 BSA 的疏水腔与疏水性氨基酸残基相互作用,使色氨酸残基疏水性降低,蛋白质的构象发生变化。在血清白蛋白分子中,有 2 个药物分子的主要结合位点 site I 和 site II,它们分别位于分子的 II A 和 III A 亚结构域,在 site I 结合的药物通常是电荷位于分子中央的环状结构的阴离子<sup>[16]</sup>,而电荷位于分子末端的链状分子,如脂肪酸等通常结合在 site II 位点<sup>[17]</sup>。吲哚美辛是吲哚类衍生物,吲哚环及 N 上的氯苯甲酰基使分子中产生大的共轭体系(见图 6),电荷分布在共轭体系的环上,从实验结果看,吲哚美辛在 BSA 上只有一个结合位点,它结合在 site I 位点的可能性较大。用差光谱技术检测相互作用后的 BSA 谱图,吲哚美辛仅能使 BSA 在 220 nm 处的吸收峰强度产生微弱降低,而对于吲哚美辛分子,两者相互作用后其差示谱图的变化非常显著,药物与蛋白质的浓度比大于 1 后吲哚美辛差谱比较相似,说明它们的结合基本平衡,1 个 BSA 分子结合了 1 个吲哚美辛分子,与荧光光谱的实验结果相符。当药物与蛋白质的浓度比大于 1 时,随着药物浓度的增加,荧光猝灭还在持续加强,说明药物除了在 site I 结合位点与蛋白质进行特征结合外,还与蛋白质表面的其他官能团发生相互作用,引起蛋白质荧光的持续猝灭。BSA 的 2 个药物主要结合位点是在蛋白质分子中疏水性氨基酸残基通过疏水作用聚集在一起构成的疏水腔内,在疏水腔的入口处主要是一些带电荷的氨基酸残基,吲哚美辛分子通过静电引力靠近疏水腔,并因为吲哚环、苯环的疏水性以疏水作用力与疏水腔中的氨基酸残基发生相互作用,作用结果不但阻止了酪氨酸残基与色氨酸残基间的能量转移,而且使色氨酸残基与吲哚美辛分子间产生非辐射能量转移,从而猝灭 BSA 的内源荧光。

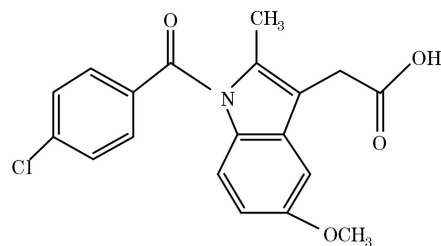


Fig. 6 Molecular structure of indomethacin

## 参 考 文 献

- [1] YU Tian-zhi, TAO Zu-yi(俞天智, 陶祖贻). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 1999, 19(3): 453.
- [2] Guo M, Zou J W, Yi P G, et al. Analytical Sciences, 2004, 20(3): 465.
- [3] Cui F L, Fan J, Li J P, et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2004, 12: 151.
- [4] CHEN Guo-zhen, HUANG Xian-zhi, ZHENG Zhu-zi, et al(陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓, 等). Methods of Fluorescence Analysis, 2nd Ed (荧光分析法·第2版). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 1990. 112.
- [5] Lakowica J R, Weber G. Biochemistry, 1973, 12(21): 4161.
- [6] Ware W R. J. Phys. Chem., 1962, 66(3): 455.
- [7] ZHANG Hai-rong, GUO Si-yuan, LI Lin, et al(张海容, 郭祀远, 李琳, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2001, 21(6): 829.
- [8] BI Xin-ying, CHI Yan-hua(迟欣颖, 迟燕华). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(11): 2097.
- [9] Klotz I M, Urquhart J M. J. Am. Chem. Soc., 1949, 71(3): 847.
- [10] Ross P D, Subramanian S. Biochem., 1981, 20(11): 3096.
- [11] YANG Man-man, YANG Pin, ZHANG Li-wei(杨曼曼, 杨频, 张立伟). Chinese Science Bulletin(科学通报), 1994, 39(1): 31.
- [12] MA Chun-qi, LI Ke-an, et al(马春琪, 李克安, 等). Acta Chimica Sinica(化学学报), 1999, 57(4): 389.
- [13] Brustein E A, Vedenkina N S, Irkova M N. Photochem. Photobio., 1973, 18: 263.
- [14] Ulrich K H. Pharmacol. Rev., 1981, 33(1): 17.
- [15] MA Gui-bin, GAO Fei, et al(马贵斌, 高飞, 等). Acta Chimica Sinica(化学学报), 1995, 53(12): 1193.
- [16] Dockal M, Chang M, Carter D C, et al. Protein Sci., 2000, 9: 1455.
- [17] Vorum H, Honore B. J. Pharm. Pharmacol., 1996, 48(8): 870.

## Spectroscopic Study on Binding of Indomethacin to Bovine Serum Albumin

CAO Xi-min, DU Li-ming\*

Center of Analysis and Test, Shanxi Normal University, Linfen 041004, China

**Abstract** The interaction between indomethacin (IM) and bovine serum albumin (BSA) under physiological condition was studied using fluorescence and absorption spectra. It was proved that fluorescence quenching of BSA by IM is deduced by combining static quenching with nonradiative energy transfer. The binding constants were obtained by fluorescence quenching method. The main sorts of binding force were determined according to the thermodynamic parameters. The binding distances and energy transfer efficiencies between indomethacin and bovine serum albumin were obtained based on the theory of Förster nonradiative energy transfer. Combining the results of UV absorption and fluorescence spectroscopic methods, the binding mode of IM with BSA was discussed.

**Keywords** Indomethacin; Bovine serum albumin; Fluorescence spectrum; UV-Vis spectrum

(Received Oct. 12, 2006; accepted Jan. 16, 2007)

\* Corresponding author