

3 种二苯乙烯类化合物的细胞毒性、抗氧化及降血糖活性对比

陈莹^{1,2} 张潮斌¹ 陈少强¹ 晏日安² 陈永生²

(1. 李锦记(新会)食品有限公司, 广东 江门 529100; 2. 暨南大学理工学院, 广东 广州 510632)

摘要: [目的] 探究白藜芦醇、氧化白藜芦醇、白皮杉醇 3 种结构相似的二苯乙烯类化合物的细胞毒性、抗氧化和降血糖活性差异。[方法] 采用 CCK-8 比色法、总抗氧化活性、细胞抗氧化应激能力、细胞内活性氧 (ROS) 含量、细胞抗氧化法 (CAA)、 α -葡萄糖苷酶抑制活性分析 3 种化合物的细胞毒性、胞外/胞内抗氧化活性和降血糖活性。[结果] 相比于氧化白藜芦醇和白藜芦醇, 白皮杉醇表现出更低的细胞毒性活性、更好的胞外抗氧化活性和 α -葡萄糖苷酶抑制活性; 3 种二苯乙烯类化合物均能够很好地降低由 H_2O_2 溶液诱导的 HepG2 细胞氧化应激损伤, 且以剂量依赖性的方式降低了 HepG2 细胞内的 ROS 含量; 氧化白藜芦醇具有更强的抑制 HepG2 细胞中由 ABAP 诱导产生的氧自由基作用。[结论] 3 种二苯乙烯类化合物均具有较高的抗氧化活性和降血糖活性。

关键词: 二苯乙烯; 细胞毒性; 总抗氧化活性; 细胞抗氧化; 降血糖活性

Comparison of cytotoxicity, antioxidation and hypoglycemic activity of three stilbene compounds

CHEN Ying^{1,2} ZHANG Chaobing¹ CHEN Shaoqiang¹ YAN Rian² CHEN Yongsheng²

(1. Lee Kum Kee (Xinhui) Foods Co., Ltd., Jiangmen, Guangdong 529100, China; 2. College of Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China)

Abstract: [Objective] To explore the differences in cytotoxicity, antioxidant, and hypoglycemic activities of resveratrol, oxy-resveratrol, and piceatannol, three stilbene compounds with similar structures. [Methods] The cytotoxicity, extracellular/intracellular antioxidant activity, and hypoglycemic activity of the three compounds are analyzed by Cell Counting Kit-8 (CCK-8), total antioxidant activity, cellular antioxidant stress ability, intracellular reactive oxygen species (ROS) content, cellular antioxidant activity (CAA) assay, and α -glucosidase inhibitory activity. [Results] Compared with oxy-resveratrol and resveratrol, piceatannol shows lower cytotoxicity, better extracellular antioxidant activity, and α -glucosidase inhibitory activity. All three stilbenes effectively mitigate the oxidative stress damage of HepG2 cells induced by H_2O_2 solution and reduce the ROS content in HepG2 cells in a dose-dependent manner. Oxy-resveratrol demonstrates a stronger capacity to inhibit the generation of oxygen free radicals induced by ABAP in HepG2 cells. [Conclusion] The three stilbene compounds all have high antioxidant activity and hypoglycemic activity.

Keywords: stilbene; cytotoxicity; total antioxidant activity; cell antioxidation; hypoglycemic activity

多酚类化合物是一类重要的天然产物, 依据化学结构中的碳原子骨架结构可分为二苯乙烯类、酚酸类、黄酮类和木脂素类^[1]。二苯乙烯类化合物是许多植物产生的重要次生代谢产物, 也称为植物抗毒素, 作为一种合成防

基金项目: 阳西县科技项目 (编号: 21011)

通信作者: 陈永生 (1985—), 男, 暨南大学副教授, 博士。E-mail: chysh11@126.com

收稿日期: 2024-07-23 改回日期: 2025-03-05

引用格式: 陈莹, 张潮斌, 陈少强, 等. 3 种二苯乙烯类化合物的细胞毒性、抗氧化及降血糖活性对比[J]. 食品与机械, 2025, 41(4): 130-138.

Citation: CHEN Ying, ZHANG Chaobing, CHEN Shaoqiang, et al. Comparison of cytotoxicity, antioxidation and hypoglycemic activity of three stilbene compounds[J]. Food & Machinery, 2025, 41(4): 130-138.

御机制,以响应非生物和生物的胁迫,例如微生物攻击、毒素、感染或紫外线辐射等^[2-3]。二苯乙烯类化合物在自然界中存在顺式(*Z*)和反式(*E*)两种构型^[4]。研究^[5]表明,反式构型较顺式构型在热力学上更稳定,且抗癌活性也更强。

白藜芦醇(resveratrol,图1)是一类含二苯乙烯结构的天然多酚类化合物,存在于槐属、葡萄属、决明属和藜芦属等珍稀植物当中,具备抗氧化、抗炎、抑菌、抑制酪氨酸酶、抗心血管疾病、抗肿瘤及神经保护等多种生物活性^[6-8]。随着新的分离方法和光谱技术的飞速发展,越来越多的二苯乙烯类化合物被发现,如氧化白藜芦醇、白皮杉醇(图1)、紫檀芪等。氧化白藜芦醇是一种很强的酪氨酸酶抑制剂^[9],具有抗炎^[10-11]、抗氧化^[12]、降血糖、神经保护及抗菌^[13-17]等活性,含氧化白藜芦醇的代表植物有波罗蜜、桑树、紫檀科、藜芦(百合科)、三棱草(莎草科)、菝葜属(菝葜科)等^[18-20];白皮杉醇主要存在于葡萄、大黄藓、大黄和甘蔗中^[21],具备与白藜芦醇、氧化白藜芦醇相类似的生物活性,具有五抗六护一调节作用,其中清除自由基和抗氧化是基础,抗衰老、抗菌、抗炎、抗癌和保护心、脑、肝、肾、血管和骨质以及提高机体免疫调节力是其作用的延续或结果^[22]。

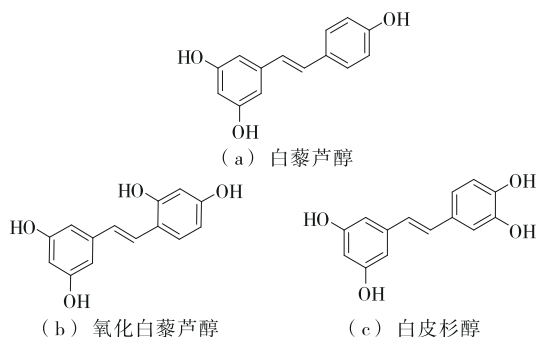


图1 白藜芦醇、氧化白藜芦醇及白皮杉醇结构

Figure 1 Structure of resveratrol, oxy-resveratrol, and piceatannol

白藜芦醇、氧化白藜芦醇、白皮杉醇的化学结构非常相似,区别在于二苯乙烯骨架上酚羟基的个数以及位点的不同,分子中的苯环和多个羟基是其生物活性基础。3种化合物的化学性质均不稳定,容易受到光照、温度、酸碱度等的影响造成氧化损失,尤其在紫外线照射下,反式结构会转化为顺式^[23-24]。

目前,有关研究主要集中在白藜芦醇的合成及其生物活性方面,对于氧化白藜芦醇及白皮杉醇的研究则较少,对白藜芦醇、氧化白藜芦醇、白皮杉醇3种化合物的生物活性进行系统对比的研究也未见报道。研究拟以茶多

酚、儿茶素、槲皮素、维生素C等物质作为参照,对比白藜芦醇、氧化白藜芦醇、白皮杉醇3种化合物的细胞毒性活性、胞外/胞内抗氧化活性和降血糖活性,旨在为3种化合物的进一步开发及其未来在食品、化妆品、药品等领域的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

白藜芦醇(熔点 255~257 °C)、氧化白藜芦醇(熔点 199~201 °C)、白皮杉醇(熔点 221.3~222.0 °C):实验室合成;

人体肝癌细胞系(HepG2)、人体正常肝细胞系(LO2):中山大学癌症研究所;

四水合钼酸铵:天津大茂化学试剂厂;

Na₃PO₄、浓硫酸(98%):广州化成达化工厂;

维生素E、维生素C、对硝基苯- α -D-葡萄糖吡喃苷(pNPG):上海阿拉丁生化科技有限公司;

2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)、茶多酚、儿茶素、特丁基对苯二酚(TBHQ)、阿卡波糖标准品:北京索莱宝科技有限公司;

α -葡萄糖苷酶:上海源叶生物科技有限公司;

高糖DMEM培养基、低糖DMEM培养基、胰蛋白酶-EDTA(0.25%):美国Gibco生物科技有限公司;

胎牛血清:武汉普诺赛生命科技有限公司;

磷酸缓冲盐溶液(PBS缓冲液):博士德生物工程有限公司;

活性氧检测试剂盒:上海碧云天生物技术有限公司;

2,2'-偶氮二异丁基脒二盐酸盐(ABAP):上海麦克林生化科技有限公司;

过氧化氢溶液(H₂O₂):3%,上海信裕生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

恒温培养箱:DHP-200型,金坛市万华实验仪器厂;

多功能酶标仪:Infinite M200 Pro型,瑞士IKA公司;

恒温水浴锅:HH-11型,欧莱德科学仪器(北京)有限公司;

倒置显微镜:BDS200-pH型,重庆奥特光学仪器有限公司;

涡旋混匀器:VM-03GU型,美国精骐公司;

二氧化碳培养箱:HC180型,美国ThermoFisher Scientific公司;

台式高速冷冻离心机:Sorvall ST 8R型,美国ThermoFisher Scientific公司;

细胞计数器:Countess II FL型,美国ThermoFisher Scientific公司。

1.3 试验方法

1.3.1 细胞毒性活性

(1) 细胞培养:细胞培养液由 45 mL 高糖 DMEM 培养基(或低糖 DMEM 培养基)、5 mL 胎牛血清和 0.5 mL 双抗(体积比为 9:1:0.1)混合配制得到。在细胞培养箱(37℃, 5% CO₂)中培养至细胞培养皿中细胞融合近 80% 时,弃掉培养皿中的培养液,用无菌 PBS 轻轻洗涤后,加入适量胰蛋白酶消化后离心,弃掉上清液,加入适量的完全培养基制成细胞悬液进行传代培养。

(2) 细胞毒性活性测定:参照 Liu 等^[25]的方法并修改。将处于对数生长期的 HepG2/LO2 细胞以 1.5×10^4 个细胞/孔接种于 96 孔微孔板中,于细胞培养箱(37℃, 5% CO₂)中培养 24 h,弃去孔板中细胞培养液,使用无菌 PBS 轻轻洗涤细胞,每孔加入 100 μL 含不同浓度(6.25, 12.50, 25.00, 50.00, 100.00, 200.00 μmol/L)样品的完全培养基,对照组和空白组中添加不含样品的完全培养基,对照组中接种细胞。培养 24 h 后,弃去培养液,无菌 PBS 洗涤,每孔加入 100 μL CCK-8 溶液(10%, 完全培养基稀释),于细胞培养箱中孵育 30 min,用酶标仪测定 450 nm 处吸光度值。当细胞存活率 > 90% 时,则认为该样品对细胞无毒性作用,按式(1)计算细胞存活率。

$$R = \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

R ——细胞存活率, %;

$A_{\text{样品}}$ ——样品组在 450 nm 处测得的吸光度值;

$A_{\text{空白}}$ ——空白组在 450 nm 处测得的吸光度值;

$A_{\text{对照}}$ ——对照组在 450 nm 处测得的吸光度值。

1.3.2 总抗氧化能力测定 参照范金波等^[26]的方法。以维生素 C 为标准物,绘制相关标准曲线方程为 $y = 1.996 6x - 0.055 7$, $R^2 = 0.998 9$ 。以与 0.1 mg/mL 样品溶液吸光值相同时的维生素 C 当量来表示化合物的总抗氧化能力。

1.3.3 化合物抗细胞氧化应激作用测定

(1) 细胞毒性:根据 1.3.1(1)的方法补充测定维生素 E 对 HepG2 细胞存活率的影响。

(2) 细胞氧化应激模型的建立:通过建立 H₂O₂ 溶液诱导的 HepG2 细胞氧化应激模型来评价白藜芦醇、氧化白藜芦醇、白皮杉醇 3 种化合物抗细胞氧化应激的作用。在 96 孔板中,将 100 μL 处于对数期的 HepG2 细胞悬液接种(1.5×10^4 个细胞/孔),37℃培养 24 h,弃去完全培养基,加入用低糖 DMEM 培养基稀释的不同质量浓度的 H₂O₂ 溶液(32, 34, 36, 38, 40 μg/mL),对照组和空白组中添加低糖 DMEM 培养基,对照组中接种细胞。24 h 后,按 1.3.1

的方法测定细胞存活率。

(3) 化合物对 H₂O₂ 溶液诱导的 HepG2 细胞氧化应激的影响:在 96 孔微孔板中,将 HepG2 细胞以 1.5×10^4 个细胞/孔的密度接种,细胞培养箱(37℃, 5% CO₂)中培养 24 h,弃去上清液,用 100 μL 混合溶液(样品浓度为 6.25, 12.50, 25.00 μmol/L, H₂O₂ 溶液终质量浓度 37 μg/mL)处理 24 h。模型组添加 H₂O₂ 和低糖 DMEM 培养基,对照组和空白组添加低糖 DMEM 培养基,对照组接种细胞。按 1.3.1 的方法测定细胞存活率。

1.3.4 细胞内活性氧分子(ROS)含量测定 在无菌全黑 96 孔微孔板中,将 HepG2 细胞以 1.5×10^4 个细胞/孔的密度接种,37℃培养 24 h,弃去培养液,加入 100 μL 含不同浓度(6.25, 12.50, 25.00 μmol/L)样品的无血清低糖 DMEM 培养基,样品处理 24 h 后,弃去培养液,加入 100 μL 浓度为 10 μmol/L 的二氯二氢荧光素—乙酐乙酸酯(DCFH-DA)荧光探针,在培养箱中孵育 20 min,用无菌 PBS 洗涤两次。每孔加入 100 μL PBS,避光条件下使用荧光酶标仪测定荧光强度,DCFH-DA 荧光探针的激发/发射波长为 495 nm/529 nm,按式(2)计算样品处理后细胞内活性氧(ROS)水平。

$$S = \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

S ——细胞内活性氧含量, %;

$A_{\text{样品}}$ ——样品组在 495 nm/529 nm 下的荧光值;

$A_{\text{空白}}$ ——空白组在 495 nm/529 nm 下的荧光值;

$A_{\text{对照}}$ ——对照组在 495 nm/529 nm 下的荧光值。

1.3.5 细胞内抗氧化活性(CAA)测定 参照丁锐等^[27]的方法并修改。将处于对数生长期的 HepG2 细胞以 6×10^4 个细胞/孔的密度接种于无菌的全黑 96 孔板中,37℃培养 24 h,弃去培养基,用无菌 PBS 洗涤,加入 100 μL 含不同浓度(0, 6.25, 12.50, 25.00 μmol/L)样品及 DCFH-DA 探针(25 μmol/L)的无血清低糖 DMEM 培养基,对照组和空白组中加入 100 μL 无血清培养液稀释的 DCFH-DA 探针。于培养箱中孵育 1 h 后,使用无菌 PBS 清洗细胞 3 次,试验组和对照组中加入 100 μL 无菌 PBS 稀释的 ABAP 溶液(600 μmol/L),空白组中加入 100 μL 无菌 PBS 溶液,随后立即用荧光酶标仪测定实时荧光值,设定测定时长 1 h,时间间隔 5 min,激发/发射波长为 485 nm/538 nm,按式(3)计算 CAA 值。

$$C = [1 - (AUC_{\text{样品}} - AUC_{\text{空白}}) / (AUC_{\text{对照}} - AUC_{\text{空白}})] \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

C ——细胞抗氧化(CAA)值, %;

$AUC_{\text{样品}}$ ——样品组在 485 nm/538 nm 下的荧光值曲线与时间形成的面积;

$AUC_{\text{对照}}$ ——对照组在 485 nm/538 nm 下的荧光值曲线与时间形成的面积;

$AUC_{\text{空白}}$ ——空白组在 485 nm/538 nm 下的荧光值曲线与时间形成的面积。

1.3.6 α -葡萄糖苷酶抑制能力测定 参考文献[28]并稍作修改,按表 1 进行 α -葡萄糖苷酶抑制试验,以阿卡波糖作为标准物并绘制标准曲线($y=1.484 1x+0.466 4$, $R^2=0.997 4$),按式(4)计算 α -葡萄糖苷酶抑制率。

$$E=[1-(A_{\text{样品}}-A_{\text{样品空白}})/(A_{\text{对照}}-A_{\text{空白}})]\times 100\%, \quad (4)$$

式中:

E —— α -葡萄糖苷酶抑制率,%;

$A_{\text{样品}}$ ——样品组在 400 nm 处的吸光度值;

$A_{\text{样品空白}}$ ——样品空白组在 400 nm 处的吸光度值;

$A_{\text{对照}}$ ——对照组在 400 nm 处的吸光度值;

$A_{\text{空白}}$ ——空白组在 400 nm 处的吸光度值。

1.4 数据处理

采用 Chemdraw 18.1 和 Origin 2019 软件绘制化合物

表 1 α -葡萄糖苷酶抑制活性测定

Table 1 Determination of α -glucosidase inhibitory activity

试剂	样品组	对照组	样品空白组	空白组
PBS (pH 6.8, 0.1 mol/L)	0	0.05	0.05	0.10
抑制剂	0.05	0	0.05	0
1.26 U/mL α -葡萄糖苷酶	0.05	0.05	0	0
6 mmol/L pNPG	0.10	0.10	0.10	0.10

结构式及图表;采用 SPSS26.0 统计软件分析差异显著性,字母不同表示差异显著($P<0.05$)。所有试验均重复 3 次,结果表示为平均值±标准偏差。

2 结果与分析

2.1 细胞毒性活性

由表 2 可知,白藜芦醇、氧化白藜芦醇、白皮杉醇在所选浓度(6.25~200.00 $\mu\text{mol/L}$)范围内对人体肝癌细胞系(HepG2)的无毒性作用浓度范围分别为 6.25~25.00, 6.25~25.00, 6.25~100.00 $\mu\text{mol/L}$,各物质对 HepG2 细胞的毒性作用大小顺序为茶多酚>儿茶素≈白藜芦醇≈氧化白藜芦醇>白皮杉醇。

表 2 各物质对人体肝癌细胞系(HepG2)的毒性[†]

Table 2 Toxicity of each substance to human hepatocellular carcinomas (HepG2)

样品	浓度					
	200.00 $\mu\text{mol/L}$	100.00 $\mu\text{mol/L}$	50.00 $\mu\text{mol/L}$	25.00 $\mu\text{mol/L}$	12.50 $\mu\text{mol/L}$	6.25 $\mu\text{mol/L}$
氧化白藜芦醇	—	—	—	+	+	++
白藜芦醇	—	—	—	+	+	+
白皮杉醇	—	+	+	+	+	+
儿茶素	—	—	—	+	+	+
茶多酚	—	—	—	—	+	+

[†] +表示细胞存活率>90%;++表示细胞存活率>100%;—表示细胞存活率<90%。

由表 3 可知,白藜芦醇、氧化白藜芦醇、白皮杉醇在所选浓度范围(6.25~200.00 $\mu\text{mol/L}$)内对人体正常肝细胞系(LO2)的无毒性作用浓度范围分别为≤6.25, 6.25~25.00, 6.25~200.00 $\mu\text{mol/L}$,各物质对 HepG2 细胞的毒性作用大小顺序为白藜芦醇>氧化白藜芦醇>儿茶素≈茶多酚>白皮杉醇。综上,白皮杉醇均表现出更低的细胞毒性活性,其次为氧化白藜芦醇和白藜芦醇。二苯乙烯类化合物的酚羟基数量和位点与其细胞毒性活性有关^[29],酚类化合物在过氧化物酶的催化下发生氧化还原循环,可能会增加其细胞毒性活性,因此需进一步进行体内评估。

2.2 总抗氧化能力

由图 2 可知,各物质在质量浓度为 0.1 mg/mL 时,总抗氧化能力大小依次为白皮杉醇>茶多酚>TBHQ>氧

化白藜芦醇>儿茶素>白藜芦醇≈BHT。白藜芦醇与 BHT 的总抗氧化能力无显著性差异,氧化白藜芦醇与其余物质的总抗氧化能力存在显著性差异($P<0.05$)。白皮杉醇的总抗氧化能力最强,达到维生素当量(0.145 2±0.002 1) mg V_c /mL,与其余物质存在显著性差异($P<0.05$),氧化白藜芦醇为(0.074 2±0.002 1) mg V_c /mL,其余物质的总抗氧化能力大小依次为茶多酚>TBHQ>儿茶素>白藜芦醇>BHT。有研究^[30]表明,通过 ABTS 自由基清除能力和铁离子还原能力两种抗氧化能力的比较,3 种化合物的抗氧化活性顺序(白皮杉醇>氧化白藜芦醇>白藜芦醇)具有良好的一致性。白皮杉醇和氧化白藜芦醇的 B 环上的羟基分别位于邻位和间位。白皮杉醇分子 B 环上的儿茶酚羟基容易形成分子内氢键,导致

表 3 各物质对人体正常肝细胞系(LO2)的毒性[†]

Table 3 Toxicity of each substance to human normal liver cell line (LO2)

样品	浓度					
	200.00 μmol/L	100.00 μmol/L	50.00 μmol/L	25.00 μmol/L	12.50 μmol/L	6.25 μmol/L
氧化白藜芦醇	—	—	—	+	++	+
白藜芦醇	—	—	—	—	—	+
白皮杉醇	+	+	+	+	+	+
儿茶素	—	—	+	+	+	+
茶多酚	—	—	+	+	++	++

[†] +表示细胞存活率>90%;++表示细胞存活率>100%;—表示细胞存活率<90%。

更高的自由基清除活性。二苯乙烯类化合物的抗氧化能力在很大程度上取决于苯环上酚羟基的数量和位置。白藜芦醇类似物的抗氧化特性取决于对位或邻位是否存在羟基。共享 4'-羟基的白藜芦醇及其衍生物表现出最大的抗氧化活性^[31]。具备邻苯三酚和儿茶酚基团的多羟基化二苯乙烯比白藜芦醇具有更高的抗氧化能力,例如在 3'、4、5'位置具有羟基的白藜芦醇类似物具有更高的抗氧化活性^[29]。

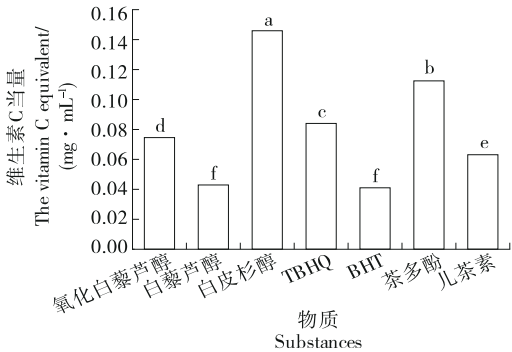


图 2 各物质的总抗氧化能力

Figure 2 Total antioxidant capacity of each substance

2.3 化合物对 H₂O₂ 诱导的 HepG2 细胞氧化应激的影响

由图 3 可知,与对照组相比,在所选浓度范围(6.25~25.00 μmol/L)内,白藜芦醇、氧化白藜芦醇、白皮杉醇和维生素 E 均未抑制 HepG2 细胞的正常增殖。因此,选择浓度为 6.25~25.00 μmol/L 的样品溶液进行后续的细胞抗氧化试验。

通过预试验对 H₂O₂ 的浓度以及作用时间进行筛选,确定 H₂O₂ 溶液的作用时间为 24 h。由图 4 可知,当 H₂O₂ 溶液质量浓度为 36 μg/mL 时, HepG2 细胞的存活率为 (63.12±3.10)%;当 H₂O₂ 溶液质量浓度为 38 μg/mL 时, HepG2 细胞的存活率为 (46.96±2.23)%。氧化应激模型的细胞存活率选择在 50% 时为最佳,因此,选择质量浓度 37 μg/mL 的 H₂O₂ 溶液作为添加量建立 HepG2 细胞氧化应激模型。

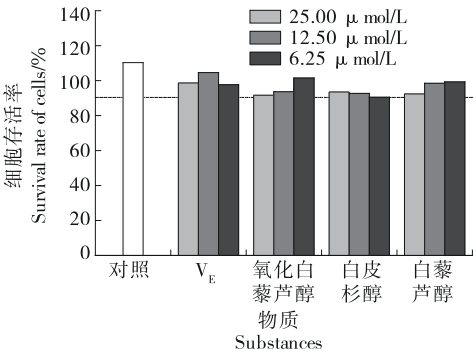


图 3 各物质处理 HepG2 细胞 24 h 的细胞存活率

Figure 3 Survival rate of HepG2 cells treated with various substances for 24 h

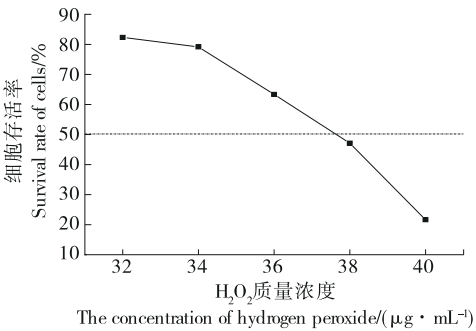


图 4 不同质量浓度 H₂O₂ 处理 HepG2 细胞 24 h 后的细胞存活率

Figure 4 Survival rate of HepG2 cells treated with different concentrations of H₂O₂ for 24 h

由图 5 可知,37 μg/mL 的 H₂O₂ 溶液处理 HepG2 细胞 24 h 后,模型组的细胞存活率为 (52.86±1.14)%, HepG2 细胞氧化应激模型造模成功。与模型组相比,白藜芦醇/氧化白藜芦醇/白皮杉醇/维生素 E 处理后的氧化应激损伤 HepG2 细胞的存活率显著提高,表明这 4 种物质能够很好地降低由 H₂O₂ 溶液诱导的 HepG2 细胞氧化应激损伤。其中氧化白藜芦醇和维生素 E 处理的 HepG2 细胞的细胞存活率随着质量浓度的增加而减小,可能是由于过量的

抗氧化剂也可能充当促氧化剂并引起氧化应激^[32]。白皮杉醇和白藜芦醇以剂量依赖性的方式降低了由H₂O₂溶液诱导的HepG2细胞氧化应激损伤。氧化白藜芦醇处理浓度为25.00 μmol/L和白皮杉醇处理浓度为6.25 μmol/L时的细胞存活率与模型组无显著性差异。白藜芦醇组内细胞存活率无显著性差异,氧化白藜芦醇组内细胞存活率存在显著性差异($P<0.05$),白皮杉醇与白藜芦醇处理浓度为12.50, 25.00 μmol/L和氧化白藜芦醇处理浓度为6.25 μmol/L时的组间细胞存活率无显著性差异。细胞氧化损伤是最常见的应激损伤,会使细胞内部产生过量的活性氧,细胞膜及细胞结构被自由基及其过氧化反应产物破坏,细胞清除自由基能力下降,最终导致细胞氧化损伤甚至凋亡。H₂O₂的添加会打破细胞内氧化与抗氧化之间的平衡,因为H₂O₂会产生氧自由基或羟自由基从而导致氧化应激。

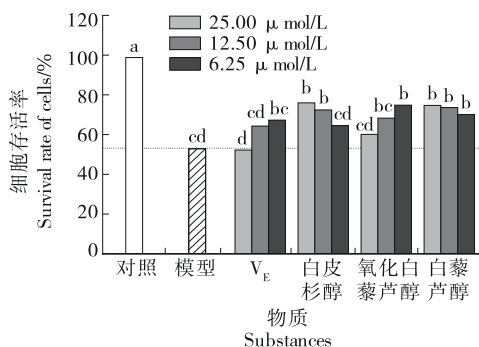


图5 各物质对H₂O₂诱导的HepG2细胞氧化应激的影响
Figure 5 Effects of various substances on H₂O₂-induced oxidative stress in HepG2 cells

2.4 化合物对HepG2细胞内活性氧(ROS)水平的影响

由图6可知,经样品处理后的细胞与正常对照组相比较ROS含量显著降低($P<0.05$),其中白藜芦醇/氧化白藜芦醇/白皮杉醇均以剂量依赖性的方式降低了HepG2细胞内的ROS含量。白藜芦醇处理浓度为6.25 μmol/L与维生素E处理浓度为12.50 μmol/L时的ROS含量相近($P>0.05$);氧化白藜芦醇处理浓度为6.25 μmol/L时的细胞ROS含量与维生素E处理浓度为6.25 μmol/L时的细胞ROS含量无显著性差异;白皮杉醇处理浓度为6.25 μmol/L时的ROS含量比白藜芦醇和氧化白藜芦醇相同处理浓度下的ROS含量更低;氧化白藜芦醇、白皮杉醇在处理浓度为25.00 μmol/L时细胞内ROS含量最低,与相同浓度的白藜芦醇无显著性差异;白藜芦醇、氧化白藜芦醇和白皮杉醇3种化合物组内不同浓度之间皆存在显著性差异($P<0.05$)。有研究^[33]发现,在水溶液和脂质溶液中,白皮杉醇均是比白藜芦醇更好的过氧清除剂;更有

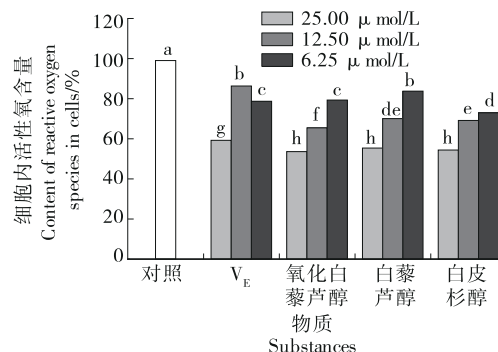


图6 各物质处理24 h后细胞内活性氧水平的变化
Figure 6 Changes in intracellular active oxygen levels of cells after treatment with various substances for 24 h

研究^[34]表明,白皮杉醇淬灭单线态氧的能力强于氧化白藜芦醇和白藜芦醇,与白藜芦醇相比,白皮杉醇结构上多一种儿茶酚;与氧化白藜芦醇相比,白皮杉醇的邻苯二酚淬灭单线态氧的能力强于氧化白藜芦醇的间苯二酚。此外,碳碳双键淬灭单线态氧的能力也强于间苯二酚。

2.5 细胞的抗氧化活性(CAA)

由图7可知,白藜芦醇/氧化白藜芦醇/白皮杉醇作用于HepG2细胞可减少HepG2细胞中因氧自由基作用而使2',7'-二氯二氢荧光素(DCFH)产生的荧光物质2',7'-二氯二氢荧光素化氢探针(DCF)的量。细胞抗氧化CAA值随着氧化白藜芦醇浓度的增加而升高,表明氧化白藜芦醇的细胞抗氧化能力以剂量依赖性的方式增强。白藜芦醇和白皮杉醇的细胞抗氧化活性在浓度为6.25 μmol/L时最强,并随着浓度的增加而减小。3种化合物组内不同浓度在统计学上存在显著性差异($P<0.05$),化合物组间不同浓度在统计学上存在显著性差异($P<0.05$)。在所选试验浓度范围内,3个样品的HepG2细胞抗氧化作用大小顺序为氧化白藜芦醇>白皮杉醇>白藜芦醇,说明氧化白藜芦醇的细胞抗氧化活性更强。抗氧化反应与抗氧化剂衍生自由基的形成有关,必须考虑此类化合物可能的促氧化特性,由于促氧化特性,特别是在较高浓度下,可以支持其用作新型抗癌剂,但不能用作抗氧化剂。邻位的羟基之间容易形成分子内氢键,因此白皮杉醇表现出比氧化白藜芦醇更低的稳定性,以上各因素均会影响化合物在体内发挥的抗氧化活性效果。

2.6 α-葡萄糖苷酶的抑制能力

α-葡萄糖苷酶通过将双糖或低聚糖水解为单糖,从而促进碳水化合物在人体内的吸收。当α-葡萄糖苷酶活性受到抑制时,碳水化合物在人体内的消化速率可以有效降低,人体的餐后血糖和空腹血糖也随之降低,因此寻找

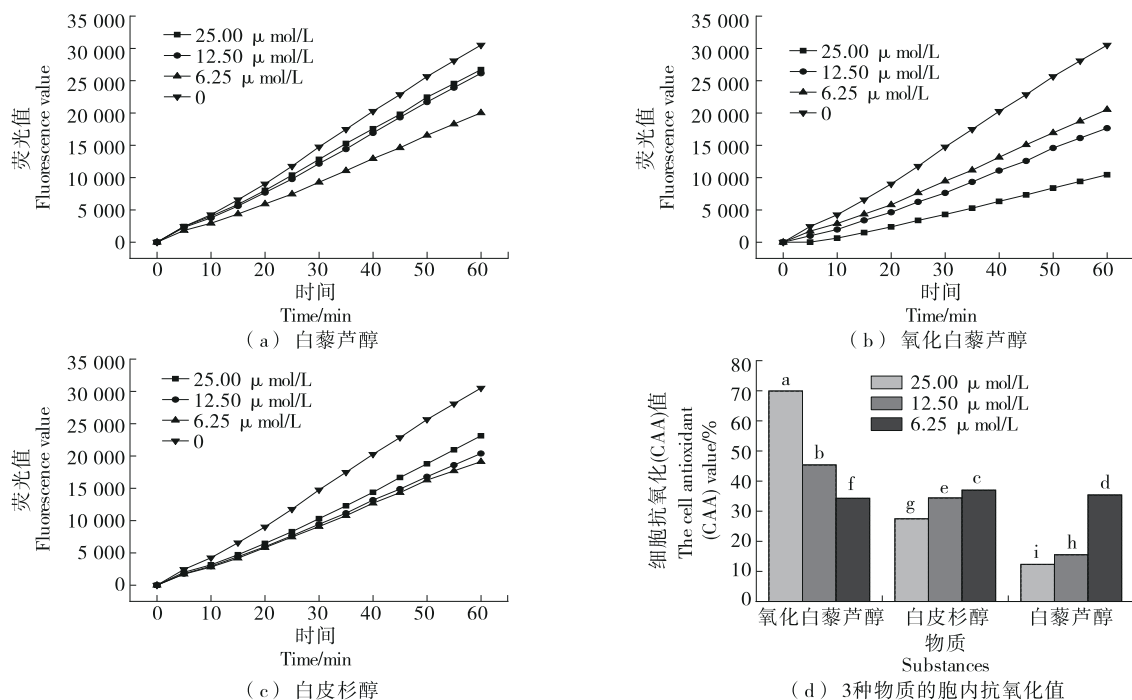


Figure 7 Time kinetics, dose response curve, and intracellular antioxidant values of each substance

安全无毒、天然高效的 α -葡萄糖苷酶抑制剂一直是糖尿病学领域的研究热点^[35]。由图8可知,白皮杉醇的 α -葡萄糖苷酶抑制能力最强,达到阿卡波糖当量的 $(0.434\ 4\pm 0.009\ 5)\ \mu\text{mol/mL}$,与槲皮素相近,约为白藜芦醇的20倍($P<0.05$);氧化白藜芦醇的 α -葡萄糖苷酶抑制能力达到阿卡波糖当量的 $(0.103\ 2\pm 0.029\ 7)\ \mu\text{mol/mL}$,约为白藜芦醇的5倍($P<0.05$),与干国平等^[36]的研究结果一致;各物质的 α -葡萄糖苷酶抑制能力大小依次为白皮杉醇 $\approx$ 槲皮素 $>$ 氧化白藜芦醇 $>$ 白藜芦醇。白皮杉醇、氧化白藜芦醇在结构上与白藜芦醇的不同之处在于分别在3',2'位置处多一个额外的羟基,这种羟基的添加有助于提高 α -葡萄糖苷酶的抑制活性。有研究^[37]表明,3'-OH和4'-OH基团为抑制 α -葡萄糖苷酶的重要结构。此外,白皮杉醇、氧化白藜芦醇、白藜芦醇的降血糖活性还受其作用机制、生物利用度等因素的综合影响,因此还需更多的体内降血糖活性研究进行充分验证。

3 结论

研究表明,二苯乙烯类化合物具有多种生理功能。白藜芦醇、氧化白藜芦醇、白皮杉醇在所选浓度(6.25~200.00 $\mu\text{mol/L}$)范围内对人体肝癌细胞系(HepG2)的无毒性作用浓度范围分别为6.25~25.00, 6.25~25.00, 6.25~100.00 $\mu\text{mol/L}$,对人体正常肝细胞系(LO2)的无毒性作用浓度范围分别为 ≤ 6.25 , 6.25~25.00, 6.25~200.00 $\mu\text{mol/L}$;

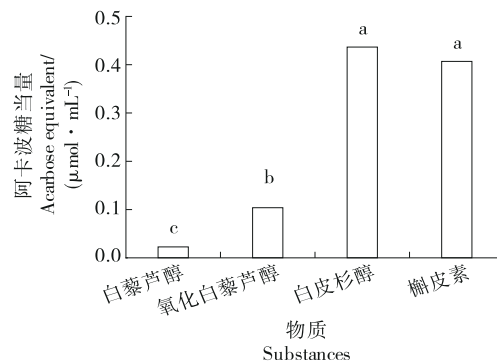


图8 各物质的 α -葡萄糖苷酶抑制能力

Figure 8 α -glucosidase inhibitory capacity of each substance

白皮杉醇的总抗氧化能力最强,达到维生素C当量的 $(0.145\ 2\pm 0.002\ 1)\ \text{mg V}_c/\text{mL}$;3种化合物均能够很好地降低由过氧化氢(H_2O_2)溶液诱导的HepG2细胞氧化应激损伤,且以剂量依赖性的方式降低了HepG2细胞内的活性氧(ROS)含量;在细胞抗氧化活性(CAA)测定中显示氧化白藜芦醇具有最强的抑制HepG2细胞中由2,2'-偶氮二异丁基脒二盐酸盐(ABAP)诱导产生的氧自由基作用;白皮杉醇的 α -葡萄糖苷酶抑制能力与槲皮素相近,约为白藜芦醇的20倍,氧化白藜芦醇的 α -葡萄糖苷酶抑制能力约为白藜芦醇的5倍。

白皮杉醇与氧化白藜芦醇化学结构上均含有4个酚羟基,比白藜芦醇多一个酚羟基,白皮杉醇与氧化白藜芦

醇在多个方面均展现出比白藜芦醇更强的生物活性。近年来随着二苯乙烯类化合物的合成工艺、提纯技术、生物活性作用机制、安全性以及提高其生物利用率等方面的不断探索与进步,未来白皮杉醇、氧化白藜芦醇将有望被广泛应用于食品工业、保健品、化妆品及药品等领域中。

参考文献

[1] 张霓裳, 冯月梅, 张腾, 等. 多酚类化合物促进白色脂肪组织棕色化的研究进展[J]. 现代预防医学, 2022, 49(22): 4 185-4 190.

ZHANG N C, FENG Y M, ZHANG T, et al. Research progress in polyphenols promoting the browning of white adipose tissue [J]. Modern Preventive Medicine, 2022, 49(22): 4 185-4 190.

[2] RAMAWAT K G, MÉRILLON J M. Natural products[M]. Heidelberg: Springer Berlin, 2013: 3 497-3 514 .

[3] RIVIERE C, ALISON D P, MERILLON J M. Natural stilbenoids: distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in Vitaceae[J]. Natural Product Reports, 2012, 29(11): 1 317-1 333.

[4] FLAMINI R, ZANZOTTO A, DE ROSSO M, et al. Stilbene oligomer phytoalexins in grape as a response to *Aspergillus carbonarius* infection[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2016, 93: 112-118.

[5] ALI KHAN Z, IQBAL A, SHAHZAD S A. Synthetic approaches toward stilbenes and their related structures[J]. Molecular Diversity, 2017, 21(2): 483-509.

[6] SAIKO P, SZAKMARY A, JAEGER W, et al. Resveratrol and its analogs: defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? [J]. Mutation Research, 2008, 658(1/2): 68-94.

[7] 乔珍. 反式-二苯乙烯类化合物的合成研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2006: 1-3.

QIAO Z. Study on synthesis of trans-stilbenes[D]. Xi'an: Shaanxi Normal University, 2006: 1-3.

[8] RAYNE S, KARACABEY E, MAZZA G. Grape cane waste as a source of trans-resveratrol and trans-viniferin: high-value phytochemicals with medicinal and anti-phytopathogenic applications[J]. Industrial Crops and Products, 2008, 27(3): 335-340.

[9] SHIN N H, RYU S Y, CHOI E J, et al. Oxyresveratrol as the potent inhibitor on dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998, 243(3): 801-803.

[10] AZIZ R S, SIDDIQUA A, SHAHZAD M, et al. Oxyresveratrol ameliorates ethanol-induced gastric ulcer via downregulation of IL-6, TNF- α , NF- κ B, and COX-2 levels, and upregulation of TFF-2 levels[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2019, 110: 554-560.

[11] YEOM J, MA S, KIM J K, et al. Oxyresveratrol ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in rats by suppressing inflammation[J]. Molecules, 2021, 26(9): 2 630.

[12] LORENZ P, ROYCHOWDHURY S, ENGELMANN M, et al. Oxyresveratrol and resveratrol are potent antioxidants and free radical scavengers: effect on nitrosative and oxidative stress derived from microglial cells[J]. Nitric Oxide, 2003, 9(2): 64-76.

[13] GALINDO I, HERNÁEZ B, BERNÁ J, et al. Comparative inhibitory activity of the stilbenes resveratrol and oxyresveratrol on African swine fever virus replication[J]. Antiviral Research, 2011, 91(1): 57-63.

[14] WU J Y, YANG Q Y, JIANG X G, et al. Oxyresveratrol promotes biofilm formation, cell attachment and aggregation of streptococcus gordonii in the presence of sucrose[J]. FEMS Microbiology Letters, 2020, 367(12): 90.

[15] WONGON M, LIMPEANCHOB N. Inhibitory effect of artocarpus lakoocha Roxb and oxyresveratrol on α -glucosidase and sugar digestion in Caco-2 cells[J]. Heliyon, 2020, 6(3): e03458.

[16] HWANG D, JO S P, LEE J, et al. Antihyperlipidaemic effects of oxyresveratrol-containing Ramulus mori ethanol extract in rats fed a high-cholesterol diet[J]. Journal of Functional Foods, 2015, 19: 353-362.

[17] RATCHANEE R, HATTAYA A B, NARUDOL T, et al. Neuroprotective effect of oxyresveratrol in rotenone-induced parkinsonism rats[J]. Natural Product Communications, 2020, 15(10): 1-6.

[18] 魏小翊, 周晋, 李顺祥, 等. 氧化白藜芦醇(苷)的植物资源分布及药用价值的研究进展[J]. 科技导报, 2011, 29(30): 63-67.

GUO X Y, ZHOU J, LI S X, et al. Summary of plant resources distribution and research progress in medicinal value of oxyresveratrol and mulberroside A[J]. Science & Technology Review, 2011, 29(30): 63-67.

[19] KITTISAK L. Oxyresveratrol: sources, productions, biological activities, pharmacokinetics, and delivery systems[J]. Molecules, 2021, 26(14): 4 212.

[20] ZHOU J, LI S X, WANG W, et al. Variations in the levels of mulberroside A, oxyresveratrol, and resveratrol in mulberries in different seasons and during growth[J]. The Scientific World Journal, 2013, 2 013: 380692.

[21] 李晓霞, 晏日安, 段翰英. 白皮杉醇的合成及抗氧化活性研究[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(4): 78-81.

LI X X, YAN R A, DUAN H Y. Synthesis and antioxidant activity of piceatannol[J]. Food and Fermentation Industries, 2011, 37(4): 78-81.

[22] 刘芝兰, 曾春娇, 吴梅青, 等. 3种二苯乙烯类化合物的生物活性与临床应用[J]. 广东医学, 2013, 34(4): 631-634.

LIU Z L, ZENG C J, WU M Q, et al. Biological activity and

- clinical application of three stilbene structures[J]. Guangdong Medical Journal, 2013, 34(4): 631-634.
- [23] 喻艳, 向伟, 刘俊池, 等. 3 种二苯乙烯类化合物的稳定性研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(2): 148-151, 155.
- YU Y, XIANG W, LIU J C, et al. Stability analysis of three kinds of stilbene compounds in *Morus alba* L[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(2): 148-151, 155.
- [24] FADHILA M, IM A M, JUFRI M. A preparation, characterization, and in vitro skin penetration of morus alba root extract nanoemulsion[J]. Asian J Pharm Clin Res, 2019, 12(8): 292-296.
- [25] LIU B G, CHEN Y S, MO H Z, et al. Catapult steam explosion significantly increases cellular antioxidant and anti-proliferative activities of *Adinandra nitida* leaves[J]. Journal of Functional Foods, 2016, 23: 423-431.
- [26] 范金波, 蔡茜彤, 冯叙桥, 等. 5 种天然多酚类化合物抗氧化活性的比较[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(7): 77-83.
- FAN J B, ZAI Q T, FENG X Q, et al. The comparison of five natural phenolic compounds on antioxidant activity in vitro[J]. Food and Fermentation Industries, 2014, 40(7): 77-83.
- [27] 丁锐, 冯铭镭, 陈阿琴. 基于 HepG2 细胞评价不同来源虾青素抗氧化能力差异[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(13): 172-176, 182.
- DING R, FENG M L, CHEN A Q. Evaluation of antioxidant capacity of astaxanthin from different sources based on HepG2 cells[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(13): 172-176, 182.
- [28] 潘玥, 刘小莉, 王英, 等. 蓝莓叶多酚对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的体外抑制活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2022, 34(4): 579-587.
- PAN Y, LIU X L, WANG Y, et al. Inhibitory effect of polyphenols from blueberry leaves on the activity of α -amylase and α -glucosidase in vitro[J]. Natural Product Research and Development, 2022, 34(4): 579-587.
- [29] MURIAS M, JÄGER W, HANDLER N, et al. Antioxidant, prooxidant and cytotoxic activity of hydroxylated resveratrol analogues: structure-activity relationship[J]. Biochemical Pharmacology, 2005, 69(6): 903-912.
- [30] NAVARRO-ORCAJADA S, CONESA I, MATENCIO A, et al. Molecular encapsulation and bioactivity of gnetol, a resveratrol analogue, for use in foods[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2022, 102(10): 4 296-4 303.
- [31] GARCIA G X, LARSEN S W, PYE C, et al. The functional group on (*E*)-4, 4'-disubstituted stilbenes influences toxicity and antioxidative activity in differentiated PC-12 cells[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2013, 23(23): 6 355-6 359.
- [32] TAN X J, LI H M, HUANG W J, et al. Enzymatic acylation improves the stability and bioactivity of lutein: protective effects of acylated lutein derivatives on L-O2 cells upon H₂O₂-induced oxidative stress[J]. Food Chemistry, 2023, 410: 135393.
- [33] CORDOVA-GOMEZ M, GALANO A, ALVAREZ-IDABOY J R. Piceatannol, a better peroxy radical scavenger than resveratrol[J]. RSC Advances, 2013, 3(43): 20 209-20 218.
- [34] LI X, CAI X Y, ZENG Q Z, et al. Exploring the mechanism of stilbenes to quench singlet oxygen based on the key structures of resveratrol and its analogues[J]. Food Chemistry, 2023, 403: 134350.
- [35] 代嫚婷, 宋静, 余潇, 等. 海黄牡丹不同部位的成分分析、体外抗氧化能力及其 α -葡萄糖苷酶、 α -淀粉酶抑制能力[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(19): 190-198.
- DAI M T, SONG J, YU X, et al. The phytochemical profiling, antioxidant capacity, α -glucosidase and α -amylase inhibition abilities of different parts of *Paonia suffruticosa* 'Hai Huang' [J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(19): 190-198.
- [36] 干国平, 袁杰, 钱凯. 菝葜中 α -葡萄糖苷酶抑制活性成分的筛选[J]. 湖北中医药大学学报, 2014, 16(4): 45-46.
- GAN G P, YUAN J, QIAN K. Screening of α -glycosidase inhibitory active constituents from rhizome of smilax China[J]. Journal of Hubei University of Chinese Medicine, 2014, 16(4): 45-46.
- [37] ZHANG A J, RIMANDO A M, MIZUNO C S, et al. A-Glucosidase inhibitory effect of resveratrol and piceatannol [J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2017, 47: 86-93.