

## 花生红衣中反式白藜芦醇对 HEK293T 细胞抗氧化的影响

孙 畅<sup>1</sup>, 周春田<sup>2</sup>, 岳玉兰<sup>1</sup>, 吕呈蔚<sup>1</sup>, 李云飞<sup>1</sup>, 黄 威<sup>1</sup>, 李铁柱<sup>1\*</sup>, 胡济美<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup> 吉林省农业科学院农产品加工研究所 长春 130033

<sup>2</sup> 包头轻工职业技术学院 内蒙古包头 014035

<sup>3</sup> 中国国际工程咨询有限公司 北京 100048)

**摘要** 目的:分析花生红衣中的白藜芦醇成分,探究其主要成分反式白藜芦醇(RES)对人胚胎肾细胞 293(HEK293T)抗氧化的影响及其潜在的分子机制。方法:采用超声波辅助酶法提取花生红衣中的白藜芦醇,采用高效液相色谱-质谱联用(HPLC-MS)技术分析花生红衣中白藜芦醇粗提液的组成成分。通过测定细胞活力,检测 RES 对 HEK293T 细胞的最高毒性。通过荧光素酶报告基因试验及免疫印迹试验检测其对 Keap1-Nrf2-ARE 抗氧化信号通路的影响,以 DPPH 自由基清除率评价其体外抗氧化能力。结果:HPLC-MS 结果表明,花生红衣中含有白藜芦醇苷、白皮杉醇和 RES。由于白藜芦醇在自然界中主要以反式白藜芦醇形式存在,因此选择 RES 进行后续试验。细胞存活力检测结果表明,RES 对 HEK293T 细胞的最高无毒浓度为 50  $\mu\text{mol/L}$ ,体外抗氧化作用呈浓度依赖性。荧光素酶报告基因分析表明,RES 显著诱导了 ARE 介导的转录激活。免疫印迹结果显示,RES 能诱导 Nrf2 介导的 3 个抗氧化蛋白表达【血红素氧合酶 1(HO-1)、醌氧化还原酶 1(NQO1)和谷氨酸半胱氨酸连接酶(GCLM)]表达。此外,DPPH 自由基清除率测定结果表明,RES 能有效清除 DPPH 自由基,具有体外抗氧化能力。结论:花生红衣中白藜芦醇的主要成分 RES 对 HEK293T 细胞有抗氧化作用,可通过 Keap1-Nrf2-ARE 信号通路激活潜在的抗氧化活性。

**关键词** 花生红衣; 白藜芦醇; HEK293T; 高效液相色谱-质谱联用; Keap1-Nrf2-ARE 信号通路; 抗氧化

**文章编号** 1009-7848(2024)05-0150-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.05.011

花生含有丰富的营养成分,包括蛋白质、维生素、矿物质等。近年来,随着消费趋势的营养、健康化,富含植物蛋白的花生制品越来越受到消费者的喜爱。目前,花生制品加工产业链中产生的花生副产品未被充分开发和利用。如果将花生副产品有效利用起来,不仅可以促进绿色可持续发展策略的实施,还会带来很高的经济效益<sup>[1]</sup>。花生红衣是花生的主要副产品,是花生产业链中的工业废物,其应用较少并且价值被严重低估<sup>[2]</sup>。曹安堂等<sup>[3]</sup>将花生红衣用作反刍动物的饲料,虽然花生红衣得到利用,但是其中丰富的功能性成分,包括原花青素、黄酮类物质、白藜芦醇等被严重浪费。为进

一步开发和利用花生红衣资源,本文探究其白藜芦醇主要成分反式白藜芦醇(RES)对 HEK293T 细胞<sup>[4-5]</sup>(人类胚胎肾 HEK293 细胞优化产生的衍生株系,其转染效率高,易于培养和繁殖)抗氧化的影响及其潜在的分子机制。研究表明,RES 有抗氧化,保护心脑血管,保护肝脏,改善阿尔茨海默病等生理功能<sup>[6-7]</sup>。尽管 RES 在抗氧化等功能上得到认证,其对 HEK293T 细胞抗氧化的影响及其是否可通过 Keap1-Nrf2-ARE 信号通路激活一种潜在的抗氧化活性还未得到广泛关注。

Keap1-Nrf2-ARE 是细胞抗氧化损伤的信号通路之一<sup>[8]</sup>。Keap1 是细胞氧化应激反应中的重要调控因子,是 Nrf2 的关键负调节因子。Nrf2 是一种调节抗氧化应激的转录因子,其主要表达于肝、肾以及皮肤、肺、消化道等组织<sup>[9]</sup>。ARE 是一个特异的 DNA-启动子结合序列,这一序列能被多种氧化性和亲电性化合物激活,从而启动抗氧化酶基因的表达,保护细胞组织正常功能<sup>[10]</sup>。正常情况下,Keap1-Nrf2 两种蛋白在细胞内结合,当受到刺激时,Nrf2 被释放出来,并与 ARE 结合,激活下游

**收稿日期:** 2023-05-20

**基金项目:** 吉林省科技厅重点研发计划项目(20210203182SF, 20200403063SF);2022 年吉林省预算内基本建设资金项目(2022c043-12);吉林省农业科技创新工程项目(CXGC2021TD006,CXGC2021RCY 028)

**第一作者:** 孙畅,女,硕士,研究实习员

**通信作者:** 李铁柱 E-mail: ltzjlu@126.com

胡济美 E-mail: hujimei@ciecc.com.cn

基因的转录,进而翻译出一系列相关蛋白,发挥抗氧化功能。

本研究采用高效液相色谱-质谱联用(HPLC-MS)检测花生红衣中白藜芦醇化合物及含量,选取含量较高,在自然界中存在广泛的 RES 为研究对象,研究其能否作为 Keap1-Nrf2-ARE 信号通路的潜在抗氧化剂。通过体外抗氧化试验,协同验证 RES 的抗氧化效果。本研究明确了 RES 的抗氧化机制,为花生副产品的利用提供了思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与试剂

花生红衣白藜芦醇类化合物粗提液,自制;HEK293T 细胞,中国科学院细胞库;DMEM 低糖培养基、Anti-GCLM、Anti-NQO1、Anti-HO-1,北京索莱宝科技有限公司;3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(mtt)粉末,美国 Gibco 公司;Lipofectamine 2000 转染试剂盒,Invitrogen 公司;荧光素酶报告基因测定试剂盒,Promega 公司;四甲基乙二胺(TEMED),上海雅酶生物医药科技有限公司;叔丁基对苯二酚(TBHQ),美国 Sigma-Aldrich 公司;蛋白酶抑制剂,Cell Signaling Technology 公司;蛋白裂解液、羊抗小鼠 IgG-HRP,江苏凯基生物股份有限公司;Anti-GAPDH,义翘神州生物科技有限公司;GCLM、NQO1、HO-1,安诺伦(北京)生物科技有限公司(Proteintech);白藜芦醇苷、氧化白藜芦醇、白皮杉醇、反式白藜芦醇、白藜芦醇-4'-甲醚、紫檀芪、白藜芦醇三甲醚、三乙酰基白藜芦醇,均为标准品,上海源叶生物科技有限公司;DPPH 自由基(分析纯级),TCI(上海)化成工业发展有限公司。

### 1.2 仪器与设备

Agilent1290-6470B 液相色谱质谱联用仪,色谱柱(ZORBAX Eclipse PlusC18,2.1 mm×100 mm,1.8 μm),安捷伦科技(中国)有限公司;DHP-9052 恒温培养箱,上海捷呈科技有限公司;VS-840K(-U)/1300L(-U)超净工作台,安泰科技股份有限公司;BPN-80CH(UV)CO<sub>2</sub> 细胞培养箱,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;iMark 多功能酶标仪、Trans-Blot®SD 转膜仪,伯乐生命医学(上海)有限公司(Bio-Rad);CR21G II 高速冷冻离

离心机,日立(中国)有限公司;CellMini-Protein 蛋白电泳系统,江苏凯元科技有限公司;ChemiScope 6000 Touch 一体式化学发光显影系统,上海勤翔科学仪器有限公司。

### 1.3 方法

1.3.1 花生红衣白藜芦醇的提取 准确称取质量为 5 g 的花生红衣全粉置于锥形瓶中,添加 10 mg 半纤维素酶,10 mL 超纯水,50 °C 条件下酶解 90 min,提取条件:用 75%乙醇进行提取,料液比为 1:20、超声强度为 400 W、超声时间为 40 min。6 000 r/min 离心 15 min 取上清,浓缩后,定容 50 mL,即为提取的白藜芦醇类化合物粗提液<sup>[11-13]</sup>。

1.3.2 花生红衣白藜芦醇化合物成分的测定

1.3.2.1 检测方法 液相色谱条件<sup>[14]</sup>:ZORBAX Eclipse Plus C18 柱(2.1 mm×100 mm,1.8 μm);柱温 40 °C;进样量 2 μL;流速 0.3 mL/min;流动相 A-2 mmol/L 乙酸铵溶液;流动相 B-乙腈;梯度洗脱条件:0~15 min,30% B;15~17 min,30%~80% B;17~20 min,80% B;20~21 min,80%~30% B;21~25 min,30% B。

质谱条件:采用电喷雾离子源,正负离子扫描模式,多反应监测,干燥气温度 250 °C;干燥气流量 7 L/min;雾化器压力(Ion Source Gas 1)206 850 Pa;鞘气温度 325 °C;鞘气流量 11 L/min;毛细管电压正模式 3 500 V、负模式 3 000 V;喷嘴电压正模式 0 V、负模式 500 V。

1.3.2.2 绘制标准曲线 绘制最常见的 8 种白藜芦醇及其衍生物白藜芦醇苷、氧化白藜芦醇、白皮杉醇、反式白藜芦醇、白藜芦醇-4'-甲醚、紫檀芪、白藜芦醇三甲醚、三乙酰基白藜芦醇的标准曲线,为了计算花生红衣粗提液中白藜芦醇及其衍生物含量。将配制的 100 mmol/L 的标准溶液利用乙腈定容至 10 mL 容量瓶中摇匀,稀释到 2 μg/mL 后测定。以标准品质量浓度标为横坐标,以峰面积为纵坐标绘制标准曲线。

1.3.2.3 精密度试验 取质量浓度为 2 μg/mL 的混合标准溶液,进样 6 次,根据定量的质量浓度分别计算 8 种白藜芦醇的精密度。

1.3.2.4 回收率试验 向已知含量的白藜芦醇样品中加入不同浓度的白藜芦醇混合标准溶液,确定 3 个浓度水平的含有白藜芦醇标准品的混合溶

液,在上述试验条件下分别平行检测3次,计算回收率的平均值。

1.3.3 细胞培养 HEK293T细胞在DEME培养基中培养,辅以10%胎牛血清、100 U/mL链霉素和100 mg/mL青霉素。将细胞置于37℃和5% CO<sub>2</sub>下孵育过夜,每1~2 d换1次液。

1.3.4 细胞活力测定 用MTT测定法测量细胞活力<sup>[15]</sup>。将HEK293T细胞以1.0×10<sup>5</sup>个细胞/孔的密度接种在96孔板中培养16 h,然后弃去培养基,加入不同浓度的标准品RES(0,5,10,20,50,100,200 μmol/L)100 μL继续培养24 h。24 h后,再次弃去培养基,每孔加入10 μL MTT (0.5 mg/mL),置于37℃和5% CO<sub>2</sub>培养4 h,然后除去含有MTT的培养基,加入50 μL DMSO,置于室温10 min。使用多功能酶标仪测量波长570 nm处的吸光度值(OD)。细胞存活率按式(1)计算。

$$\text{细胞存活率(\%)} = \frac{A_s}{A_c} \times 100 \quad (1)$$

式中, $A_s$ ——RES作用细胞的OD值; $A_c$ ——对比细胞的OD值。

1.3.5 荧光素酶报告基因检测 荧光素酶报告基因检测参考了前人的研究<sup>[16]</sup>。利用试剂盒提取ARE质粒,将瞬时转染后的质粒体系加入到HEK293T细胞中(每孔5×10<sup>4</sup>个细胞),选择RES低、中、高浓度分别为10,20,40 μmol/L,向每孔中加入含有浓度为10,20,40 μmol/L和12.5 μmol/L TBHQ以及对照组的培养基溶液500 μL,在细胞培养箱中继续培养24 h,对照组为2 mL培养基+0.2 μL DMSO。然后弃去培养基,洗涤,在24孔板中加入80 μL裂解细胞,裂解30 min,细胞完全破碎后。取80 μL于96孔板中,用多功能酶标仪检测,调整参数。先加入100 μL/孔萤火虫荧光素酶进行检测,再加入100 μL/孔海肾荧光素酶进行检测。两者的比值为样品的双荧光素酶活性值。

1.3.6 免疫印迹试验 设置6个试验组:空白组、500 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组、10 μmol/L RES+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组、20 μmol/L RES+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组、40 μmol/L RES+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、12.5 μmol/L TBHQ组。将培养好的细胞弃去上清,分别按照对应的组加入不同浓度的试剂,继续培养18 h,TBHQ作为阳性对照组,500 μmol/L的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>作为氧化应激模型。用试剂盒进行细胞蛋白的提

取及浓度测定,统一浓度。取100 μL蛋白样品,加入上样缓冲液,二者体积比为4:1,100℃沸水煮7 min,-20℃冰箱保存。

按配方配制12%的分离胶,制备5%的浓缩胶,蛋白上样量为20 μg。电泳条件为恒压80 V至Maker条带分明,将电压调至120 V,溴酚蓝到达分离胶底部,停止电泳。采用恒压模式,依据目的蛋白分子大小调整转模时间,将凝胶上蛋白转移至PVDF膜。转膜后将PVDF膜置于封闭液中封闭90 min。加入一抗(GCLM、NQO1、HO-1),4℃孵育过夜。加入二抗,室温摇床孵育60 min。TBST洗膜5 min×5次。配置ECL发光液,暗室孵育1 min,采用一体式化学发光成像系统拍照。

1.3.7 体外抗氧化试验 DPPH自由基清除试验参考文献[17-18]中的方法并稍作改动:配置质量浓度为1×10<sup>-5</sup> g/mL的DPPH溶液,将2 mL新鲜配置的DPPH溶液与2 mL样品混合,充分混匀,室温避光反应30 min,在波长517 nm处测吸光度(OD值),VC为阳性对照。

$$\text{DPPH自由基清除率(\%)} = 1 - \frac{(A_1 - A_2)}{A_0} \times 100 \quad (2)$$

式中, $A_0$ ——空白对照OD值; $A_1$ ——样品OD值; $A_2$ ——阴性对照OD值。

1.3.8 数据处理与分析 使用SPSS 22.0进行差异显著性分析( $P < 0.05$ ,差异显著);所有试验进行3次平行,测定结果以平均值±标准差表示。并使用Origin 8.1和Excel 2016进行图、表的绘制。

## 2 结果与分析

### 2.1 花生红衣中白藜芦醇成分分析

2.1.1 花生红衣中白藜芦醇类化合物鉴定结果分析 图1是8种白藜芦醇及其衍生物标准品的HPLC-MS色谱图,分别是白藜芦醇苷、白皮杉醇、反式白藜芦醇、氧化白藜芦醇、白藜芦醇-4'-甲醚、紫檀芪、白藜芦醇三甲醚、三乙酰基白藜芦醇。

图2是花生红衣中所存在的白藜芦醇类化合物样品各个峰的HPLC-MS色谱图,如图可见,样品中以白藜芦醇苷、白皮杉醇及反式白藜芦醇的形式存在,根据峰面积计算得出含量分别为23.64,172.27,83.02 ng/mL。花生红衣中白藜芦醇化合物的光谱分析见图3,白藜芦醇苷、白皮杉醇及反式

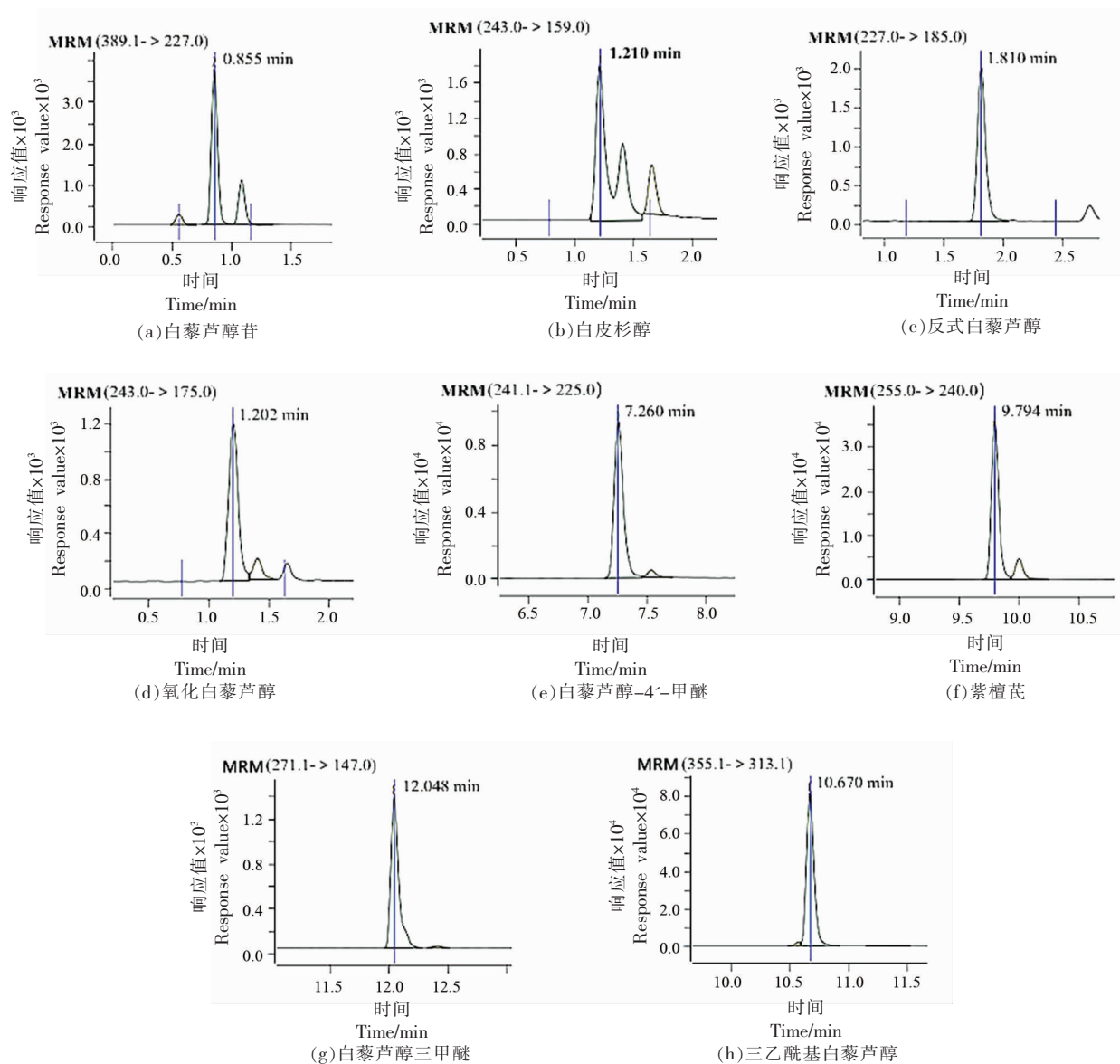


图 1 白藜芦醇标准品的 HPLC-MS 色谱图

Fig.1 HPLC-MS chromatogram of resveratrol standards

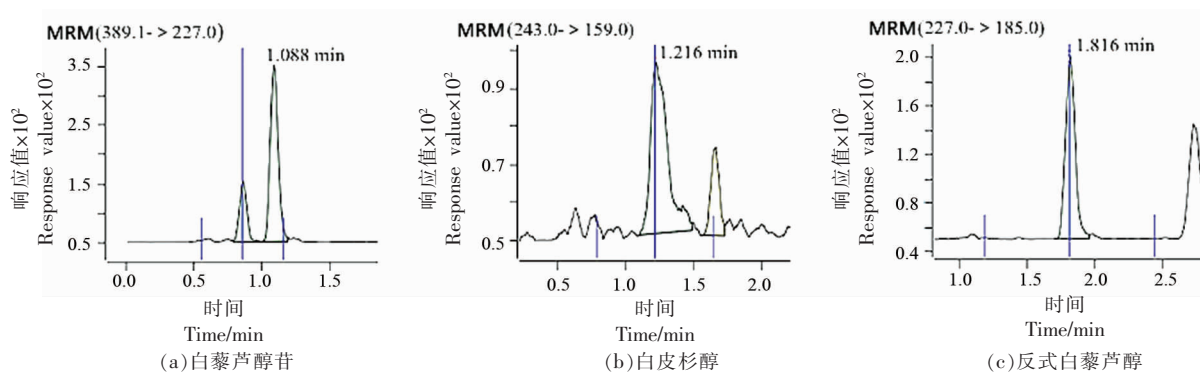


图 2 花生红衣中白藜芦醇类化合物样品的 HPLC-MS 色谱图

Fig.2 HPLC-MS chromatogram of resveratrol samples in peanut red coat

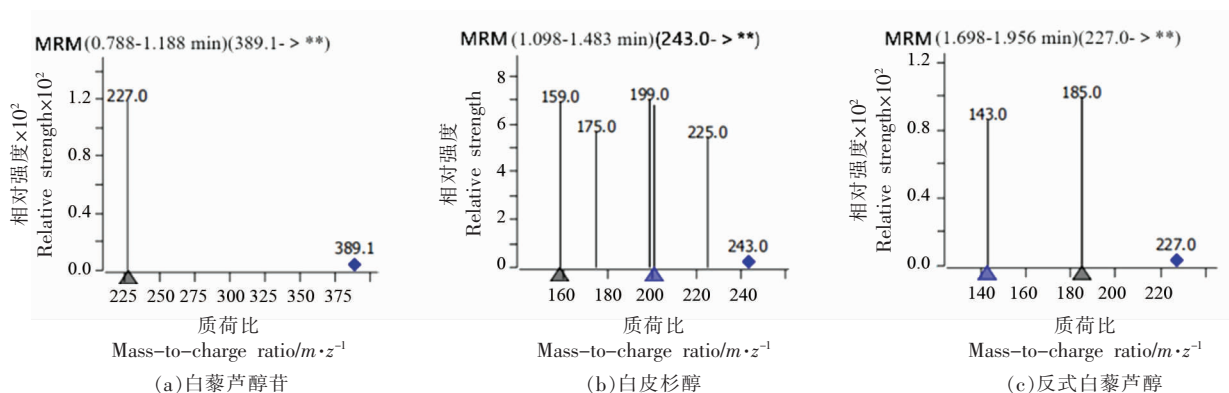


图3 花生红衣中白藜芦醇类化合物样品的离子碎片图

Fig.3 Ion fragmentation map of resveratrol-like samples in peanut red coat

白藜芦醇母离子碎片分别为 389.1, 243, 227  $m/z$ , 子离子碎片分别为 227, 159, 185  $m/z$ 。上述结果与白藜芦醇苷、白皮杉醇、反式白藜芦醇标准品的测

定结果相同。

2.1.2 标准曲线的测定 8种白藜芦醇及其衍生物的标准曲线回归方程如表1所示。

表1 8种白藜芦醇标准曲线方程

Table 1 Standard curve equation of eight types of resveratrol

标准品	回归方程	相关系数( $R^2$ )
白藜芦醇苷	$y=9.388721x+40.135293$	0.99998988
氧化白藜芦醇	$y=5.248504x+14.376092$	0.99999980
白皮杉醇	$y=12.474244x+89.818767$	0.99999784
反式白藜芦醇	$y=8.419386x+50.834028$	0.99998647
白藜芦醇-4'-甲醚	$y=41.791192x+128.49336$	0.99998793
紫檀芪	$y=121.108599x+283.518837$	0.99999601
白藜芦醇三甲醚	$y=4.679622x+55.270653$	0.99989566
三乙酰基白藜芦醇	$y=212.026288x+1722.839477$	0.99781496

2.1.3 精密度试验 由表2可知,白藜芦醇苷、氧化白藜芦醇、白皮杉醇、反式白藜芦醇、白藜芦醇-4'-甲醚、紫檀芪、白藜芦醇三甲醚、三乙酰基白藜

芦醇6次试验的相对标准偏差(RSD)均小于1.5%,说明本试验采用的仪器及检测方法的精密度较好。

表2 8种白藜芦醇精密度试验结果

Table 2 Experimental results of eight types of resveratrol precision experiments

白藜芦醇	测定结果/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$						平均值/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	RSD/%
	1	2	3	4	5	6		
白藜芦醇苷	1.85	1.84	1.84	1.86	1.88	1.85	1.8533	0.81
氧化白藜芦醇	1.64	1.65	1.62	1.61	1.65	1.67	1.6400	1.3
白皮杉醇	1.72	1.71	1.70	1.70	1.71	1.75	1.7150	1.09
反式白藜芦醇	1.95	1.99	1.94	1.98	1.96	1.98	1.9667	1.00
白藜芦醇-4'-甲醚	1.55	1.58	1.57	1.55	1.55	1.56	1.5600	0.81
紫檀芪	1.62	1.62	1.65	1.62	1.61	1.65	1.6283	1.06
白藜芦醇三甲醚	1.65	1.63	1.62	1.61	1.63	1.62	1.6267	0.84
三乙酰基白藜芦醇	1.54	1.57	1.55	1.56	1.53	1.56	1.5517	0.95

2.1.4 回收率试验 由表3可知,3种白藜芦醇的平均加标回收率均在98%以上,最高值为

101.90%。回收率在可接受的标准内,说明试验准确高。

表3 加标回收率结果

Table 3 Method of standard recovery results

白藜芦醇	序号	原含量/ng·mL <sup>-1</sup>	加入量/ng·mL <sup>-1</sup>	实际测定量/ng·mL <sup>-1</sup>	回收率/%	平均回收率/%
白皮杉醇	1	23.64	30	53.27	98.77	98.58
	2	23.64	50	72.60	97.92	
	3	23.64	60	83.07	99.05	
白藜芦醇苷	1	172.27	30	202.14	99.57	98.23
	2	172.27	50	221.17	97.80	
	3	172.27	60	230.66	97.32	
反式白藜芦醇	1	83.02	30	112.90	99.60	99.03
	2	83.02	50	133.97	101.90	
	3	83.02	60	140.38	95.60	

## 2.2 RES对ARE报告基因激动作用

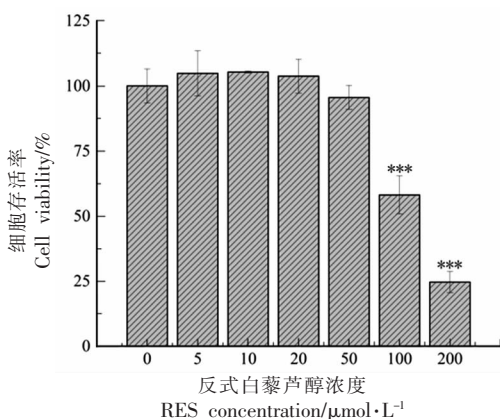
为了评估RES对HEK293T细胞的影响,进行了细胞活力测定。如图4所示,当RES浓度低于50 μmol/L时,对细胞增殖没有明显影响。此外,当RES浓度为100 μmol/L时,细胞增殖受到显著抑制,100 μmol/L和200 μmol/L之间存在浓度依赖性关系。抑制率分别为(61.34±4.94)%和(56.95±3.92)%。

如图5所示,TBHQ组的激动倍数为对照组的(12.73±0.35)倍,RES诱导浓度为10,20,40 μmol/L时,激动倍数约为对照组的(3.09±0.05),

(7.67±0.95),(10.48±0.35)倍,表现出明显的ARE活化作用( $P<0.01$ ),并且呈剂量依赖性。

## 2.3 RES对Nrf2下游靶基因关键蛋白表达的影响

2.2节试验结果表明,RES可以激活ARE报告基因活性,继续采用免疫印迹方法,探究RES对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的氧化损伤Nrf2-ARE通路下游关键蛋白GCLM、NQO1和HO-1表达的调控作用。结果如图6所示,RES可以激活Nrf2-ARE信号通路以实现诱导细胞保护关键蛋白的表达。如图7所示,在H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激下,10 μmol/L的浓度能够上调细胞内NQO1和HO-1的蛋白水平,20 μmol/L的



注:“\*\*\*”表示 $P<0.001$ (与对照组相比)。

图4 暴露于不同浓度RES 24 h后HEK293T细胞的存活率

Fig.4 Survival rate of HEK293T cells after exposure to different concentrations of RES for 24 hours

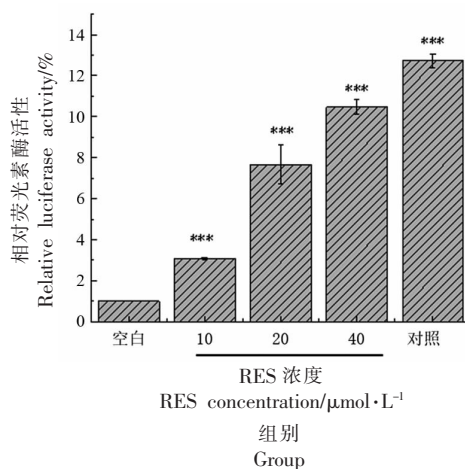
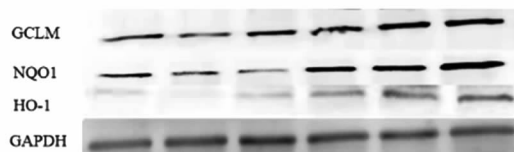


图5 RES对ARE激活效应

Fig.5 The activation effect of RES on ARE

浓度能够上调细胞内 GCLM 的蛋白水平,并且均呈剂量依赖的关系。结果表明,RES 成功上调了 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激下的 GCLM、NQO1 和 HO-1 基因的表

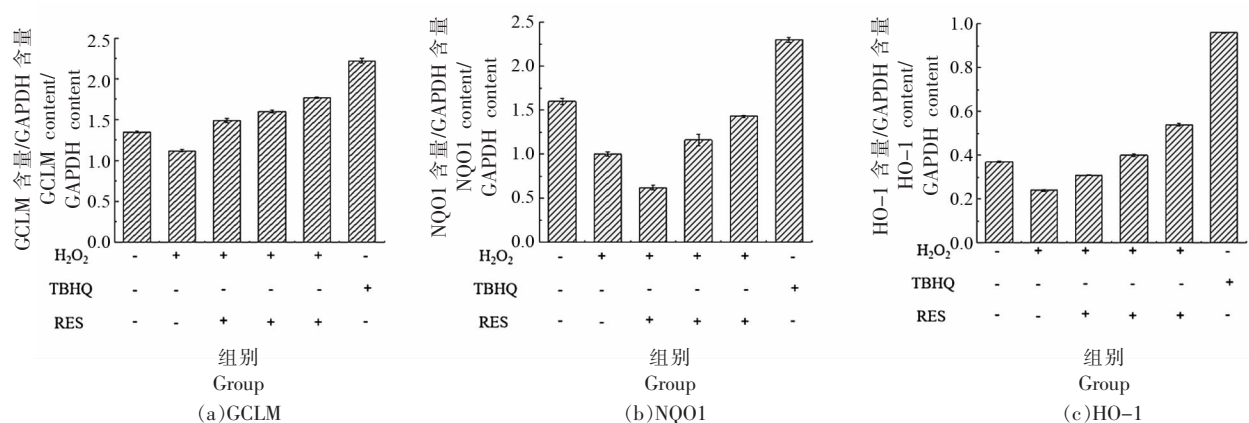
达,同时代表 RES 可以通过 Nrf2 激活抗氧化基因的表达。



注:GAPDH 为内参;GCLM、NQO1、HO-1 组每个条带依次为空白组、500  $\mu\text{mol/L}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组、10  $\mu\text{mol/L}$  RES+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组、20  $\mu\text{mol/L}$  RES+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组、40  $\mu\text{mol/L}$  RES+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组、阳性对照组。

图 6 不同浓度 RES 处理后 GCLM、NQO1 和 HO-1 的表达图

Fig.6 Expression maps of GCLM, NQO1 and HO-1 after treatment with different concentrations of RES



注:GAPDH 为内参;GCLM、NQO1、HO-1 组每个条带依次为空白组、500  $\mu\text{mol/L}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组、10  $\mu\text{mol/L}$  RES+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组、20  $\mu\text{mol/L}$  RES+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组、40  $\mu\text{mol/L}$  RES+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组、阳性对照组。

图 7 RES 对 HEK293T 细胞 GCLM、NQO1 和 HO-1 相对表达量的影响

Fig.7 Effect of RES on the relative expression of GCLM, NQO1 and HO-1 in HEK293T cells

## 2.4 RES 的体外抗氧化活性

DPPH 是一种稳定的有机自由基,常作为评价抗氧化剂清除自由基活性的试剂<sup>[9]</sup>。如图 8 所示,RES 以剂量依赖性方式清除 DPPH 自由基,在 3.2 mmol/L 时清除率达到(80.37 $\pm$ 0.76)%,并且逐渐趋于平缓,进一步证实了 RES 的抗氧化能力。

## 3 分析与讨论

花生红衣是花生的主要副产品,其中含有大量的白藜芦醇可被利用。白藜芦醇有 2 种形态,其化学结构分为顺式和反式 2 种异构体,植物中主要以反式形式存在,因此,本研究选择反式白藜芦醇(RES)进行试验。同时,当白藜芦醇的三羟基或

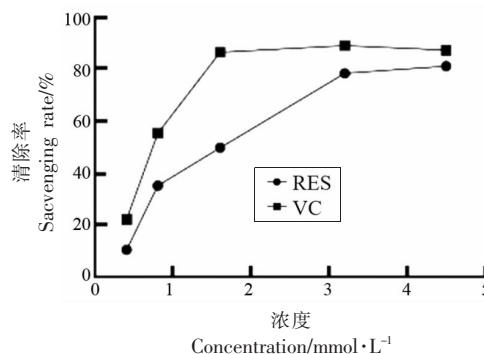


图 8 不同浓度 RES 对 DPPH 自由基的清除作用  
Fig.8 Scavenging effects of different concentrations of RES on DPPH free radical

苯环上的氢被甲基、糖基等基团取代,就变成了白藜芦醇衍生物或类似物。白藜芦醇衍生物也有抗

炎、抗氧化和抗肿瘤等功效,在食品、医药等很多同样领域备受国内外专家的关注<sup>[20-21]</sup>。

本文利用高效液相色谱-质谱联用 (HPLC-MS)对花生红衣中白藜芦醇粗提液组成成分进行分析,结果表明其中含有白藜芦醇苷、白皮杉醇和 RES。Huang 等<sup>[22]</sup>使用高灵敏度分子印迹电化学传感器检测白藜芦醇,此方法虽能直接从葡萄酒中检测白藜芦醇,但需要精心优化功能性材料、精准度不够高。Wu 等<sup>[23]</sup>通过 HPLC-MS/MS 方法同时检测大鼠血浆中木犀草素(LUT)和白藜芦醇的生物利用度,此方法在准确度、精密度等方面得到了验证。综合对比,本试验采用 HPLC-MS 法检测白藜芦醇类化合物,ESI-源与多反应监测的模式,回收率好,精密度高、准确性符合要求,能用于白藜芦醇及其衍生物的定性及定量检测。

在研究 RES 的抗氧化机制试验时,RES 对 HEK293T 细胞最高无毒浓度为 50  $\mu\text{mol/L}$ 。张晔青<sup>[24]</sup>的研究表明当反式白藜芦醇浓度为 50  $\mu\text{mol/L}$  时对内皮祖细胞增殖没有显著影响,而姚尚莉<sup>[25]</sup>的研究表明白藜芦醇浓度为 100  $\mu\text{mol/L}$  时卵巢癌细胞的细胞活力明显下降,与本研究一致。同时,RES 表现出明显的 ARE 活化作用( $P<0.01$ ),并且呈剂量依赖性。ARE 可以介导多种抗疾病、抗氧化因子的表达<sup>[26]</sup>,对其有活化作用表明可以激活其抗氧化能力。当然,不同浓度的 RES 对不同的报告基因调控效果不完全相同,这大概是由于构建的不同报告基因模型对试验结果造成一定程度上的差异<sup>[27]</sup>。

$\text{H}_2\text{O}_2$  是一种已被证明会导致各种癌症的活性氧。异常的活性氧可诱导 DNA 损伤、增加突变率和遗传不稳定性<sup>[28-29]</sup>。RES 成功上调了  $\text{H}_2\text{O}_2$  刺激下的 GCLM、NQO1 和 HO-1 蛋白的表达。HO-1 是一种重要的抗氧化酶,可以通过促进血红素降解和防止氧化参与血管保护。HO-1 过表达可能在动脉粥样硬化、心肌缺血再灌注损伤等心血管疾病中发挥保护作用。NQO1 是一种同型二聚体黄酮酶,NQO1 可以防止环境应激源引起的 DNA 氧化损伤。GCLM 的功能是保护细胞免受自由基和其它有毒物质的侵害,并维持细胞内的氧化还原状态。GCLM 是 GCLC 的修饰亚基,通过调节 GCLC 的谷氨酸亲和力,可以有效控制细胞内

GSH 浓度,从而保护细胞免受自由基等有毒物质的侵害,维持细胞内的氧化还原状态<sup>[30-31]</sup>。

可见,RES 是一种很好的抗氧化剂,能对  $\text{H}_2\text{O}_2$  刺激下的 HEK293 起到很好的抗氧化作用。它可以通过与 Keap1 蛋白结合激活 Nrf2-ARE 通路,上调抗氧化蛋白 GCLM、NQO1 和 HO-1 的水平,保护细胞免受氧化损伤。此外,白藜芦醇能有效清除 DPPH 自由基,进一步证实白藜芦醇是一种潜在的抗氧化剂。综上所述,白藜芦醇可能是 Keap1-Nrf2-ARE 信号通路的新型抗氧化剂。本研究为花生的综合利用提供了新思路,其药效和毒性有待通过动物模型进一步研究。

#### 4 结论

本研究以花生红衣中白藜芦醇类化合物为研究对象,利用液相色谱-质谱联用法对花生红衣中总白藜芦醇的成分进行鉴定,进一步探究其主要成分对人胚胎肾细胞 293(HEK293T)抗氧化的影响及其潜在的分子机制。结果表明,花生红衣中白藜芦醇及其化合物为白藜芦醇苷、白皮杉醇、反式白藜芦醇,其中反式白藜芦醇(RES)含量最多;RES 对 ARE 转录活性具有激动作用且呈现一定浓度依赖性关系,可以上调抗氧化蛋白 GCLM、NQO1、HO-1 的表达;此外,RES 还能有效清除 DPPH 自由基。综上所述,RES 有激活 Keap1-Nrf2-ARE 信号通路的能力,可以通过此通路对 HEK293T 细胞起到抗氧化的作用。

#### 参 考 文 献

- [1] DALLARM SORITA G, VITORIA LEIMANN F, FERREIRA S R S. Biorefinery approach: Is it an upgrade opportunity for peanut by-products? [J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 105: 56-69.
- [2] BODOIRA R, CECILIA CITTADINI M, VELEZ A, et al. An overview on extraction, composition, bioactivity and food applications of peanut phenolics [J]. Food Chemistry, 2022, 308(1): 132250.
- [3] 曹安堂, 鲁梅, 李洪志. 花生和花生皮在反刍动物饲料中的营养价值和抗氧化活性评估[J]. 中国饲料, 2020(4): 68-71.



- CAO A T, LU M, LI H Z. Evaluation of nutritional value and antioxidant activity of peanut and peanut skin in ruminant feed[J]. *China Feed*, 2020(4): 68–71.
- [4] 宋超群. 酿酒酵母孢子表面 RNA 绑定的机制及功能研究[D]. 无锡: 江南大学, 2021.
- SONG C Q. Research on the mechanism and function of RNA binding on the surface of *Saccharomyces cerevisiae* spore[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021.
- [5] HU J W, HAN J Z, LI H R, et al. Human embryonic kidney 293 cells: A vehicle for biopharmaceutical manufacturing, structural biology, and electrophysiology[J]. *Cells Tissues Organs*, 2018, 205(1): 1–8.
- [6] KOVACIC P, SOMANATHAN R. Multifaceted approach to resveratrol bioactivity focus on antioxidant action cell signaling and safety[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2010, 3(2): 86–100.
- [7] 吴良文, 张虎, 吴桐, 等. 白藜芦醇对阿尔兹海默症调控的研究进展[J]. *食品科学*, 2023, 44(3): 237–245.
- WU L W, ZHANG H, WU T, et al. Research progress on the regulation of resveratrol in Alzheimer's disease[J]. *Food Science*, 2023, 44(3): 237–245.
- [8] LIU S N, PI J B, ZHANG Q. Signal amplification in the KEAP1–NRF2–ARE antioxidant response pathway[J]. *Redox Biology*, 2022, 54: 102389.
- [9] ULASOV A V, ROSENKRANZ A A, GEORGIEV G P, et al. Nrf2/Keap1/ARE signaling: Towards specific regulation[J]. *Life Sciences*, 2022, 291(15): 120111.
- [10] LEE J M, CALKINS M J, CHAN K, et al. Identification of the NF- $\kappa$ B-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(14): 12029–12038.
- [11] 刘翠, 石爱民, 刘红芝, 等. 超声辅助法制备花生红衣的多酚类物质[J]. *中国食品学报*, 2016, 16(12): 141–150.
- LIU C, SHI A M, LIU H Z, et al. Preparation of polyphenols from peanut red coat by ultrasound-assisted method[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2016, 16(12): 141–150.
- [12] 赵萍, 林樱姬, 金征宇, 等. 超声辅助提取花生红衣中多酚类物质及其抗氧化活性的研究[J]. *食品科学*, 2010, 31(12): 52–57.
- ZHAO P, LIN Y J, JIN Z Y, et al. Ultrasonic-assisted extraction and antioxidant evaluation of polyphenols from peanut seed testa[J]. *Food Science*, 2010, 31(12): 52–57.
- [13] 范金波, 周素珍, 郑立红, 等. 微波辅助提取花生壳总黄酮工艺参数的优化[J]. *中国食品学报*, 2013, 13(11): 55–60.
- FAN J B, ZHOU S Z, ZHENG L H, et al. Optimization of process parameters for microwave-assisted extraction of total flavonoids from peanut shells[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2013, 13(11): 55–60.
- [14] 季梅, 姜红祥, 王小宁. 液相色谱-质谱联用法测定不同产地虎杖中白藜芦醇及其糖苷的含量[J]. *药物分析杂志*, 2008, 28(12): 1987–1992.
- JI M, LOU H X, WANG X N. LC-MS determination of *cis/trans*-resveratrols and piceids in the rhizome of *Polygonum cuspidatum* from different habitats[J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2008, 28(12): 1987–1992.
- [15] 刘彦飞. 地黄活性物质与功能研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2013.
- LIU Y F. Research on active substances and functions of *Rehmannia glutinosa*[D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2013.
- [16] 冷玥. 糖皮质激素受体介导的PAEs内分泌干扰效应的体外研究[D]. 长春: 吉林大学, 2021.
- LENG Y. Endocrine-disrupting effects of phthalate esters through interference with glucocorticoid receptor *in vitro*[D]. Changchun: Jilin University, 2021.
- [17] 姚旭, 郇萍, 顾青. 4种甜橙皮黄酮类化合物体外抗氧化活性及降糖降脂功能研究[J]. *中国食品学报*, 2022, 22(1): 49–57.
- YAO X, LI P, GU Q. Antioxidant activity and hypoglycemic and lipid-lowering function of four sweet orange peel flavonoids *in vitro*[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2022, 22(1): 49–57.
- [18] 牧丹, 萨仁高娃, 包良, 等. 天冬多糖的结构、免疫调节活性及体外抗氧化活性[J]. *中国食品学报*, 2022, 22(8): 51–60.
- MU D, SANREN G W, BAO L, et al. Structure, immunomodulatory activity and *in vitro* antioxidant

- activity of *Aspartate polysaccharide* [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(8): 51–60.
- [19] YI Z B, YU Y, LIANG Y Z, et al. *In vitro* antioxidant and antimicrobial activities of the extract of pericarpium *Citri reticulatae* of a new *Citrus cultivar* and its main flavonoids[J]. LWT – Food Science and Technology, 2008, 41(4): 597–603.
- [20] 李小妹, 李娜, 黄开胜, 等. 白藜芦醇低聚体类似物的光谱特征、生源与生物活性[J]. 药学学报, 2002(1): 69–74.
- LI X M, LI N, HUANG K S, et al. Spectral characteristics, biogenesis and biological activities of resveratrol oligomer analogs [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2002(1): 69–74.
- [21] PEZET R, GINDRO K, VIRET O, et al. Glycosylation and oxidative dimerization of resveratrol are respective associated to sensitivity and resistance of grapevine cultivars to downy mildew[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2004, 65(6): 297–303.
- [22] HUANG S Q, YANG J Y, LI S T, et al. Highly sensitive molecular imprinted voltammetric sensor for resveratrol assay in wine via polyaniline/gold nanoparticles signal enhancement and polyacrylamide recognition[J]. Journal of Electroanalytical Chemistry. 2021, 895(15): 115455.
- [23] WU W Y, LI K X, ZHAO C, et al. A rapid HPLC–MS/MS method for the simultaneous determination of luteolin, resveratrol and their metabolites in rat plasma and its application to pharmacokinetic interaction studies[J]. Journal of Chromatography B, 2022, 1191(15): 123118.
- [24] 张晔青. 白藜芦醇通过 miR-138 对内皮祖细胞迁移及成血管功能的影响和调控机制的试验研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2019.
- ZHANG Y Q. Experimental studies on effect of resveratrol on migration and angiogenesis of endothelial progenitor cells and regulation mechanisms via miR-138[D]. Suzhou: Soochow University, 2019.
- [25] 姚尚莉. 白藜芦醇通过调节 microRNA-34a 抑制卵巢癌细胞生长和侵袭的机制研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2019.
- YAO S L. Resveratrol inhibited ovarian cancer cell growth and invasion through regulation of microRNA-34a [D]. Hefei: Anhui Medical of University, 2019.
- [26] THIERRY J H, WI S L, DEBORAH J S, et al. Stimulation of polo like kinase 3 mRNA decay by tristetraprolin [J]. Molecular and Cellular Biology, 2009, 29(8): 1999–2010.
- [27] 杨林凤. 白藜芦醇调控基因表达控制系统的设计、构建及其应用研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2021.
- YANG L F. The design, construction and application of resveratrol –controlled transgene expression systems[D]. Shanghai: East China Normal University, 2021.
- [28] VATNER S F, ZHANG J, OYDANICH M, et al. Healthful aging mediated by inhibition of oxidative stress[J]. Ageing Research Reviews, 2020, 64: 101194.
- [29] SHI L, HAO Z X, ZHANG S B, et al. Baicalein and baicalin alleviate acetaminophen –induced liver injury by activating Nrf2 antioxidative pathway: The involvement of ERK1/2 and PKC [J]. Biochemical Pharmacology, 2018, 150: 9–23.
- [30] CHAHARSOOGHI S K, HONARVAR M, MODARRES M. A multi-stage stochastic programming model for dynamic pricing and lead time decisions in multi-class make –to –order firm [J]. Scientia Iranica, 2011, 18(3): 711–721.
- [31] TONOLO F, FIORESE F, MORETTO L. Identification of new peptides from fermented milk showing antioxidant properties: Mechanism of action[J]. Antioxidants, 2020, 9(2): 117.

### Effects of *Trans*-resveratrol in Peanut Red Coat on Antioxidant in HEK293T Cells

Sun Chang<sup>1</sup>, Zhou Chuntian<sup>2</sup>, Yue Yulan<sup>1</sup>, Lü Chengyu<sup>1</sup>, Li Yunfei<sup>1</sup>, Huang Wei<sup>1</sup>, Li Tiezhu<sup>1\*</sup>, Hu Jimei<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Agro-food Technology, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033

<sup>2</sup>Baotou Light Industry Vocational Technical College, Baotou 014035, Inner Mongolia

<sup>3</sup>China International Engineering Consulting Corporation, Beijing 100048)

**Abstract** Objective: This experiment analyzed the resveratrol composition in peanut red coat to investigate the antioxidant effects of its main component *trans*-resveratrol (RES) on human embryonic kidney cell 293 (HEK293T) and its potential molecular mechanism. Methods: The resveratrol in peanut red coat was extracted by ultrasonic-assisted enzymatic method, and the constituents of the crude extract of resveratrol in peanut red coat were analyzed by high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS). The highest toxicity of RES on HEK293T cells was detected by cell viability assay, its effects of Keap1-Nrf2-ARE antioxidant signaling pathway was detected by luciferase reporter gene assay and Western blot assay, and its *in vitro* antioxidant capacity was determined by DPPH free radical clearance. Results: The results of HPLC-MS showed that resveratrol glycosides, paclitaxel and RES were contained in peanut red coat. Since resveratrol mainly exists in the form of *trans*-resveratrol in nature, RES was selected for the subsequent experiments. The results of cell viability assay showed that the highest non-toxic concentration of RES on HEK293T cells was 50  $\mu\text{mol/L}$ , and the *in vitro* antioxidant effects was concentration-dependent. Western blot results showed that RES induced Nrf2-mediated expression of three target proteins heme oxygenase 1 (HO-1), quinone oxidoreductase 1 (NQO1) and glutamate cysteine ligase (GCLM). In addition, the results of the DPPH radical scavenging assay showed that RES could effectively scavenge DPPH radicals and had *in vitro* antioxidant capacity. Conclusion: The major components of resveratrol in peanut red coat have antioxidant effects on HEK293T cells and can activate a potential antioxidant activity through the Keap1-Nrf2-ARE signaling pathway.

**Keywords** peanut red coat; resveratrol; HEK293T; high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS); Keap1-Nrf2-ARE signaling pathway; antioxidant