高等学校化学学报
CHEMICAL JOURNAL OF CHINESE UNIVERSITIES
研究论文

基于阿伏苯宗-阿魏酸的光释放与抗氧化性能

张天龙，陈　光
（陕西科技大学化学与化工学院，西安 710021）

摘要　阿魏酸是一种有效的抗氧化剂，因具有抵抗氧化应激和延缓皮肤衰老性能而被广泛应用于化妆品中．然而，光敏性对其应用提出了挑战．为了克服这一限制，本文开发了一种由阿伏苯宗(AB)和阿魏酸(FA)组成的二元分子．该设计基于阿伏苯宗结构中存在可以光去除的苯甲酰甲基，以保护阿魏酸免受光损伤并保持其抗氧化活性．研究结果表明，FA得以成功释放，AB对FA具有有效的光保护作用．体外实验结果表明，AB-FA分子及其光解产物具有显著的清除自由基活性；而细胞实验结果则证实其较低的细胞毒性和优异的清除活性氧自由基(ROS)能力．

关键词　阿伏苯宗；光保护；清除自由基活性
中图分类号　O625.43　　**文献标志码**　A　　doi：10.7503/cjcu20240056

Photorelease and Antioxidant Activity of Avobenzone-Ferulic Acid

ZHANG Tianlong，CHEN Guang*
（*College of Chemistry and Chemical Engineering*，*Shaanxi University of Science & Technology*，*Xi'an* 710021，*China*）

Abstract　Ferulic acid is an effective antioxidant that is widely used in the cosmetics due to its ability to resist oxidative stress and delay skin aging. However，its photosensitivity challenges its application. In order to overcome this limitation，we developed a binary molecule composed of avobenzone（AB）and ferulic acid（FA）. This design is based on the existence of photoremovable benzoyl methyl in the avobenzone to protect ferulic acid from photodamage and maintain its antioxidant activity. The results showed that FA was successfully released，and AB had an effectively photoprotective effect on FA. *In vitro* experiments showed that AB-FA molecules and their photolysis products had significant activity of scavenging free radical，while cell experiments confirmed their low cytotoxicity and excellent ability to reactive oxygen species（ROS）scavenging.

Keywords　Avobenzone；Photoprotection；Free radical scavenging activity

阿伏苯宗（AB）是一种常用的UVA防晒剂，其螯合稀醇结构在355 nm处显示出较大的吸光度[1]．在紫外光照射下，AB的β-二酮结构发生光异构化，吸收主要出现在260~280 nm范围内，且此过程可逆[2]．在黑暗条件下，AB的烯醇异构体将逐渐恢复到其初始状态．鉴于AB结构中含有2个可以光去除的苯甲酰甲基，其光化学性质已被广泛研究[3]．基于AB的这一特性，一种新的光保护策略被开发出来，利用光触发局部药物成分和UVA过滤器的释放[4-6]．此策略的优点是可以控制照射时间，同时可以释放被保护的分子和过滤器成分，比简单的混合物叠加更具优势[7]．光笼化合物目前已被广泛研究，

收稿日期：2024-01-31. 网络首发日期：2024-03-11.
联系人简介：陈　光，男，博士，教授，主要从事荧光探针化学方面的研究．E-mail：chenandguang@163.com
基金项目：国家自然科学基金(批准号：22174090)、陕西省自然科学基础研究计划项目(批准号：2022JM-089)、陕西省高层次人才创新长期项目(陈光)和国家外国专家计划高端项目(批准号：G2021041002L)资助．
Supported by the National Natural Science Foundation of China(No.22174090)，the Natural Science Basic Research Program of Shaanxi Province，China(No.2022JM-089)，the Shaanxi Province High-level Talent Innovation Long-term Project(Chen Guang)，China and the National Foreign Experts Plan High-end Project，China(No.G2021041002L).

并通过光触发激活分子来提供时间和空间控制，因此其已被应用于生物应用技术．苯甲酰甲基发色团是提高生物分子持久性的最有效方法之一，其α-取代二羰基酯在光照下可以释放羧酸[8]．其机理是当苯甲酰酯的羰基被光激发时，该物质从质子溶剂中捕获氢，形成羰基中间体，并最终释放羧酸．AB的光释放已成功应用于双氯芬酸等药物[9]．

阿魏酸(FA)是肉桂酸的苯基丙烯衍生物，主要以顺式和反式的形式存在于植物界，尤其是一些植物的细胞壁中[10]．作为羟基肉桂酸的重要衍生物，FA具有显著的生物活性，在医药、制药、食品和化妆品领域具有重要意义[11,12]．与其它天然酚类化合物一样，FA在体外具有出色的抗氧化作用，并已被确定为多种疾病的潜在治疗剂，包括炎症性疾病和糖尿病[13,14]．最近的研究表明，反式咖啡酸(CA)可能在光照条件下从反式异构体转化为顺式异构体，最终形成七叶皂苷[15]．FA的结构可以通过用甲氧基取代CA第4位的酚羟基来获得．鉴于CA和FA之间的结构相似性，推测FA在光照下也可能发生类似转化，导致其抗氧化活性下降．因此，保护FA的高效成分免受影响至关重要．

基于此，本文设计了一种由AB和FA组成的新化合物AB-FA．二元化合物利用AB的二酮互变异构作为苯甲酰光稳定化合物的保护基团，并可释放羧酸化合物．AB主要用于防晒和护肤品，其酮醇互变异构存在于溶液中，这是其具有高UVA吸收能力的原因[16]．FA是护肤领域广泛应用的光敏护肤成分．当光照射AB-FA时，AB-FA将被切割，释放出光敏物质和UVA过滤器．本文将FA连接到AB的β-二羰基化合物的α位，并通过405 nm紫外光照射AB-FA来释放活性物质FA和UVA滤光器AB．通过紫外-可见吸收光谱、荧光光谱和液相色谱-质谱联用技术验证了化合物的光解和释放可能性．体外抗氧化实验结果表明，二元化合物和光释放化合物具有良好的性能．细胞实验结果表明，二元化合物和光释放化合物毒性低，具有清除活性氧的功能．

1　实验部分

1.1　试剂与仪器

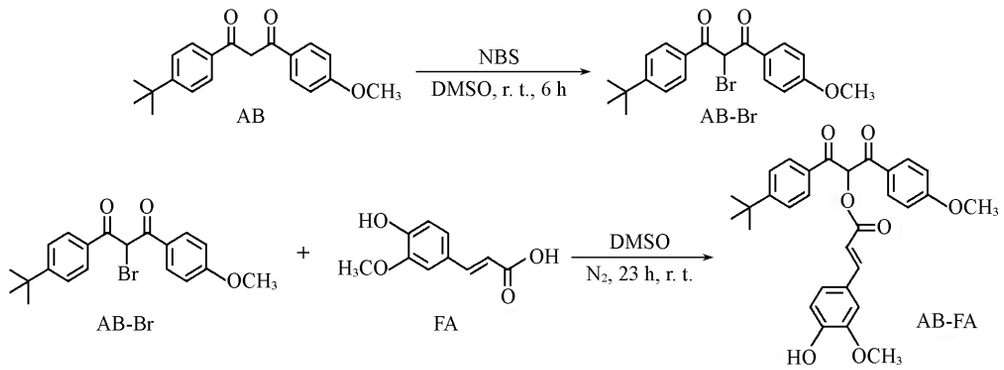
阿伏苯宗、*N*-溴琥珀酰亚胺、阿魏酸、无水二甲基甲酰胺、石油醚、二氯甲烷、乙醇、维生素E、乙酸乙酯、碳酸钾、氯化铵、无水硫酸镁和碳酸氢钠，分析纯，上海泰坦科技有限公司；2,2-联苯基-1-苦基肼基(DPPH)和2,2′-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)，纯度97%，合肥博美生物科技有限责任公司；3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)和2,7-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)，纯度97%，南京碧云天生物技术有限公司；乙二醇，分析纯，国药集团化学试剂有限公司；DMEM培养基，纯度98%，上海申启生物科技有限公司；胎牛血清(FBS)，纯度99%，森斯盛瑞仪器(西安)有限公司；青霉素-链霉素(双抗)，纯度99.99%，上海酶联生物科技有限公司；用于稳态光解的液相色谱-质谱级甲醇购自于美国Fisher化学公司．

AVANCE III 400型核磁共振波谱仪(NMR)，德国Bruker公司；Cary 60型紫外-可见(UV-Vis)光谱仪，安捷伦科技中国有限公司；FTMS LSM 800型激光共聚焦荧光显微镜，德国卡尔蔡司公司；Lumina型荧光分光光度计和Varioskan LUX型酶标仪，赛默飞世尔科技中国有限责任公司；HVS1300型超净台，安诺伦(北京)生物科技有限公司；CLM-170B-8-NF型二氧化碳培养箱，新加坡易时高科技有限公司；1000 W稳态光解氙灯，北京中教金源科技有限公司；模拟器的输出经过适当的过滤，以产生与自然紫外光非常相似的光谱，光谱输出测量为100 mw/cm^2；液相色谱-单四极柱质谱联用仪(LC-ISQEM-ESI)，美国赛默飞世尔科技公司，采用C18色谱柱(25 mm×0.46 mm，5m)，进样量5 μL，流动相为50%甲酸和甲醇溶液(体积比1∶1000)，流速为1 mL/min．检测波长均为254 nm．

1.2　实验过程

目标化合物AB-FA的合成路线如Scheme 1所示．

1.2.1　AB-Br的合成　在带有磁搅拌子的茄形瓶中，将0.311 g(1 mmol)AB溶解于8 mL DMSO中．将0.214 g(1.2 mmol)*N*-溴琥珀酰亚胺溶解于4 mL DMSO中，并滴加到AB溶液中．在室温下搅拌6 h，并监控反应进程．待反应完成后，向溶液中加入30 mL乙酸乙酯，随后用100 mL氯化铵饱和溶液萃取



Scheme 1　Synthesis route of AB-FA

3次. 以石油醚和乙酸乙酯作为洗脱剂(体积比10∶1)通过柱色谱分离纯化, 得到无色结晶的0.295 g AB-Br, 产率76%. ^{1}H NMR(400 MHz, $CDCl_3$), δ: 7.98(d, J=9.0 Hz, 2H), 7.92(d, J=8.8 Hz, 2H), 7.44(d, J=8.7 Hz, 2H), 6.90(d, J=8.9 Hz, 2H), 6.55(s, 1H), 3.82(s, 3H), 1.29(s, 9H); ^{13}C NMR(101 MHz, $CDCl_3$), δ: 188.67, 187.67, 164.41, 158.18, 131.82, 131.26, 129.29, 126.71, 126.04, 114.31, 55.66, 53.17, 35.30, 31.02.

1.2.2　AB-FA的合成　将0.194 g(1 mmol)阿魏酸溶解在3 mL水中. 将0.326 g Cs_2CO_3加入装有2 mL水的离心管中, 将其滴加到阿魏酸溶液中. 待反应完成后, 将0.234 g(0.06 mmol)AB-Br溶解在10 mL DMSO中, 在室温和N_2气氛围下搅拌反应24 h. 待反应完成后, 向溶液中加入20 mL乙酸乙酯, 随后用100 mL饱和碳酸氢钠溶液萃取3次. 用无水硫酸镁干燥和过滤除去乙酸乙酯. 使用少量二氯甲烷溶解粗产物, 以石油醚和乙酸乙酯(体积比6∶1)作为洗脱剂通过柱色谱分离纯化产物, 得到0.196 g淡黄色固体AB-FA, 产率65%. ^{1}H NMR(400 MHz, DMSO), δ: 9.73(s, 1H), 8.09~8.02(m, 2H), 8.02~7.96(m, 2H), 7.66~7.61(m, 2H), 7.60(d, J=1.8Hz, 1H), 7.46(s, 1H), 7.41(d, J=2.0 Hz,1H), 7.16(dd, J=8.2, 2.0 Hz, 1H), 7.14~7.09(m, 2H), 6.81(d, J=8.2 Hz, 1H), 6.68(d, J=15.8 Hz, 1H), 3.88(s, 3H), 3.82(s, 3H), 1.32(s, 9H). ^{13}C NMR(101 MHz, $CDCl_3$), δ: 190.98, 189.66, 165.56, 164.38, 158.11, 148.44, 147.11, 146.84, 132.14, 131.86, 129.58, 127.49, 126.75, 125.82, 123.73, 114.78, 114.06, 113.82, 109.45, 80.17, 56.03, 55.61, 35.31, 31.04.

1.2.3　DPPH和ABTS消除实验　首先, 在乙醇中制备1 mmol DPPH自由基和维生素E溶液以及1 mmol AB-FA溶液, 并对AB-FA紫外光解1 h(记为UV-AB-FA). 实验使用96孔板, 所有溶液的固定总量为0.2 mL. 取0.05 mL DPPH自由基溶液, 加入0.15 mL乙醇, 使其浓度为0.25 mmol/L. 随后, 将0.005, 0.010, 0.020, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1 mL AB-FA和UV-AB-FA溶液添加到96孔板中, 分别加入乙醇至总体积为0.2 mL, 浓度梯度为0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4和0.5 mmol/L. 对照组为0.05 mL DPPH溶液和0.15 mL乙醇溶液, 维生素E组和ABTS采用相同方法处理, 每个样品重复测试3次. 用酶标仪测定样品在517和734 nm波长处的吸光度. 利用下式计算DPPH和ABTS自由基的清除率(Scavenging rate, %):

$$\text{Scavenging rate} = [A(\text{Control}) - A(\text{Sample})]/A(\text{Control}) \times 100\% \quad (1)$$

式中: A(Sample)为细胞样品组吸光度; A(Control)为细胞对照组吸光度.

1.2.4　H_2O_2诱导的Hacat细胞损伤　复苏HaCaT细胞, 配制含有10%胎牛血清和1%双抗的DMEM完全培养基60 mL, 培养细胞瓶中的细胞汇合度约80%~90%. 将细胞消化并以每孔1×10^{4}个细胞的密度接种到96孔板中, 继续孵育24 h. 随后, 将细胞分为5组并置于不含任何血清或双抗体的DMEM培养基中. 培养基含有不同量的H_2O_2(100, 300, 500, 700和900 μmol/L), 对照组直接添加到DMEM培养基中, 然后将细胞孵育6 h. 采用MTT法确定了过氧化氢对细胞的毒性. 首先将25 mg MTT避光溶解于5 mL去离子水中, 浓度为5 mg/mL. 6 h后, 将各孔中的培养基吸出, 并用PBS缓冲液洗涤2次. 随后, 向每孔中加入10 mL MTT溶液和90 mL DMEM. 空白组加入等体积的试剂. 将孔板在37 ℃下孵育

4 h. 随后，将溶液倒入孔中，并向每个孔中添加100 μL DMSO. 将孔板放在振荡器上，使其完全溶解10 min. 使用酶标仪测量490 nm处的吸光度. 然后按下式计算细胞存活率(Cell viability，%)：

$$\text{Cell viability} = (A_s - A_b)/(A_c - A_b) \times 100\% \quad (2)$$

式中：A_c为细胞对照组吸光度；A_b为细胞空白组吸光度；A_s为细胞样品组吸光度.

1.2.5 AB-FA及其UV-AB-FA H_2O_2诱导的细胞损伤的保护测定 将HaCaT细胞以4×10^3个/孔的密度接种到96孔板中，在完全培养基中培养24 h. 随后，将细胞分为3组. 对照组仅用DMEM培养. 损伤组在DMEM中培养24 h，然后加入含500 μmol/L H_2O_2的DMEM培养6 h. 样品组在含有不同浓度AB-FA的DMEM中培养24 h，然后用含有500 μmol/L H_2O_2的DMEM刺激6 h. 按照分组进行实验，样品组中AB-FA和UV-AB-FA的浓度分别为1，2，4，8和16 μmol/L. 培养和刺激完成后，吸出培养液，用PBS缓冲液洗涤，按照式(2)计算细胞活力，以确定AB-FA和UV-AB-FA对H_2O_2诱导的HaCaT细胞损伤的保护作用.

1.2.6 细胞毒性测定 将Hela细胞接种到96孔板中，孵育24 h后，将细胞分为5组，并以1，2，4，8和16 μmol/L的浓度梯度添加含有AB-FA和AB-FA光解产物的DMEM培养基；继续孵育24 h后，吸出培养基并用PBS缓冲溶液洗涤2次. 随后，分析细胞，并根据式(2)计算细胞活力.

1.2.7 细胞内活性氧(ROS)的测量 实验使用荧光染料2′,7′-二氯荧光素(DCFH-DA)确定了AB-FA和AB-FA在光解1 h后抑制活性氧(ROS)产生的能力. 将HaCaT细胞以5×10^4个/孔的密度接种到6孔板中，在完全培养基中培养24 h. 按照1. 2. 4节步骤，将细胞分为3组进行实验. 对照组、损伤组和样品组浓度分别设置为4，8和16 μmol/L. 诱导氧化损伤后，用PBS缓冲液洗涤细胞. 然后，每孔加入1 mL DMEM，再加入1 μL DCFH-DA荧光探针，使荧光探针终浓度为10 μmol/L. 将细胞在培养箱中培养20 min后，弃去培养基，用DMEM洗涤3次以完全除去探针. 最后，加入1 mL PBS缓冲溶液，在共焦显微镜下观察，通过Image J软件计算荧光强度.

AB-Br和AB-FA的^{13}H NMR和^{13}C NMR谱图以及其它信息见本文支持信息图S1~图S8.

2 结果与讨论

2.1 AB-FA的合成及其紫外吸收光谱

AB-FA的合成分两步完成. 首先，使用DMSO作为溶剂，以AB和*N*-溴琥珀酰亚胺作为反应物制备了AB-Br；然后，反应混合物与FA反应生成AB-FA. 核磁共振波谱(NMR)结果表明，在溶液中，AB主要以二酮烯醇的互变异构体形式存在. 在螯合的烯醇式形态中，原本位于δ 6. 75的特征质子信号峰发生了化学位移，出现在δ 6. 94. 这一化学位移通过二维NMR光谱学技术得到了确证，表明δ 6. 94处的质子与位于δ 81. 2处的α-二羰基碳相关联[9]. 图1(A)示出了AB-FA，AB和FA各自浓度为3×10^{-6} mol/L时的紫外-可见吸收光谱. 结果表明，FA的峰值吸收波长为325 nm，AB-FA的波长为330 nm，阿伏苯宗的波长为355 nm. 此外，AB-FA和AB在355~390 nm波长范围内的吸收峰重叠，为AB-FA和AB的二酮互变异构体的吸收特性提供了解释. 值得注意的是，这种UVA成分在实现光诱导释放分子和滤光器中起着重要作用.

在N_2气和空气下分别对AB-FA的乙醇溶液进行了UV(405 nm)照射. 结果[图1(B)和(C)]表明，AB-FA的紫外吸收在330 nm处降低，充入N_2气的AB-FA紫外吸收在355 nm处增强. 在空气条件下，最大吸收峰的减少不会导致新的UVA波段的形成. 在空气和N_2气溶液中也观察到AB-FA的光谱变化有显著差异.

为了探索空气平衡实验的新替代品，筛选出具有特定性质(如低氧分压、高黏度和低扩散系数)的质子化溶剂至关重要. 这些特性有助于操纵速率常数，从而提高光诱导从二元系统中释放AB-FA的可行性. 实验选择乙二醇(EG)作为AB-FA的溶剂，原因是其能够有效地满足以上要求. 此外，良好的皮肤渗透性使其成为护肤品配方中广泛使用的保湿剂. 由于乙二醇具有多重功能，因此成为本文研究的最佳溶剂. 实验程序包括将AB-FA溶解在用氮气饱和的乙二醇中，然后将其暴露于紫外光下，测定了

不同时间下AB-FA的紫外光谱[图1(D)]. 结果表明，在355 nm波长带内信号强度显著增加，同时330 nm附近的信号峰强度相应降低. 上述结果表明，AB-FA的光解导致了AB的形成，同时FA得以释放.

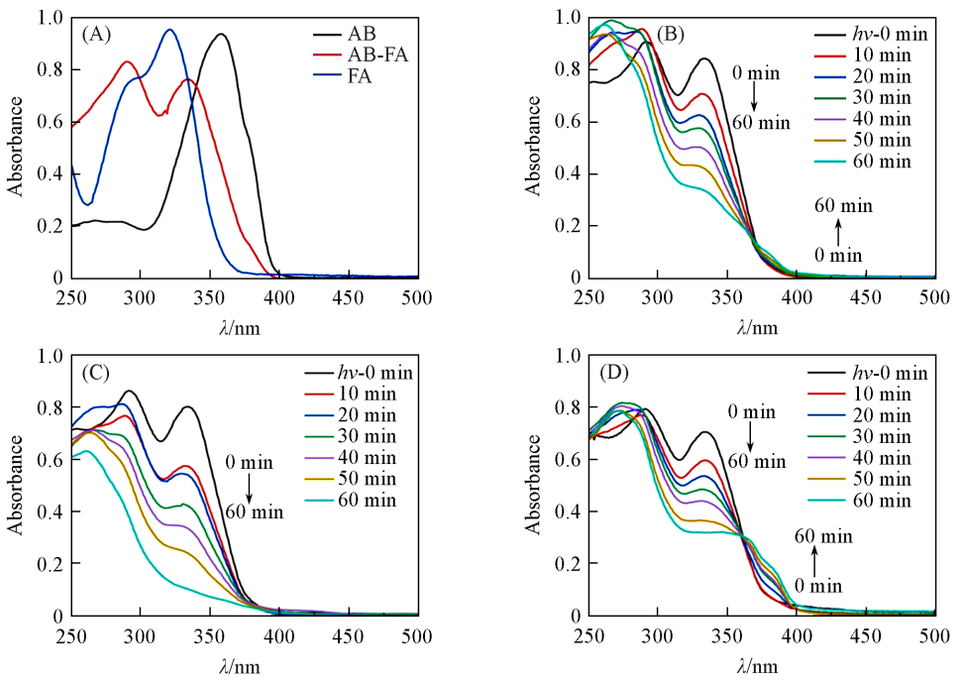


Fig. 1 UV-Vis absorption spectra of AB, FA and AB-FA in ethanol(A), AB-FA in ethanol solution in N_2(B) and air(C) environment, and AB-FA in ethylene glycol(D) exposed to 405 nm UV lamps at different time intervals

Concentration: 3×10^{-6} mol/L.

2.2 LC-ISQEM-ESI监测乙醇或乙二醇中AB-FA的释放

通过紫外-可见分光光度法评估了光释放反应的可行性. 由于FA与初始二元组的吸收光谱重叠，这给AB和FA释放的准确定量分析带来了挑战. 为了解决这一问题，本文利用液相色谱-单四级杆质谱联用仪(LC-ISQEM-ESI)对AB-FA的光释放结果进行了定量分析，据此计算了AB和FA的释放量[图2(A)和(B)].

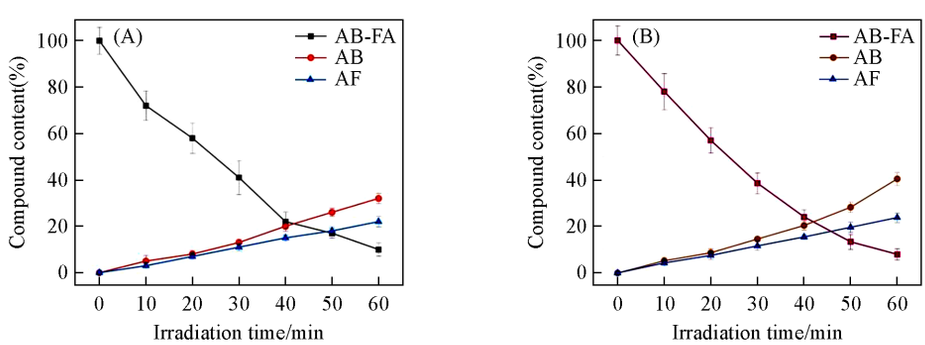


Fig. 2 LC-ISQEM-ESI moditored the release kinetics of AB-FA in nitrogen-filled ethanol(A) and ethylene glycol(B)

将AB-FA溶解在乙二醇中，使其浓度为3×10^{-3} mol/L，并在N_2气氛围下进行UV(405 nm)照射. 利用LC-ISQEM-ESI监测AB和FA的释放，流动相为甲醇-水(流速1 mL/min). 在无光照条件下，AB和FA的保留时间(t_R)分别为11.85和2.26 min(图3)，AB-FA的保留时间为9.17 min. 经过30 min的UV照射，AB-FA的色谱峰减弱，而AB和FA的峰值在相应保留时间处增强. 随着照射时间增加，AB-FA的峰强度逐渐降低，表明其逐渐分解，60 min后几乎完全分解. 此外，对比以乙二醇和乙醇作为溶剂的光释放实验结果，发现乙二醇作为溶剂时AB的释放量更高，这可能与其独特的溶剂性质有关.

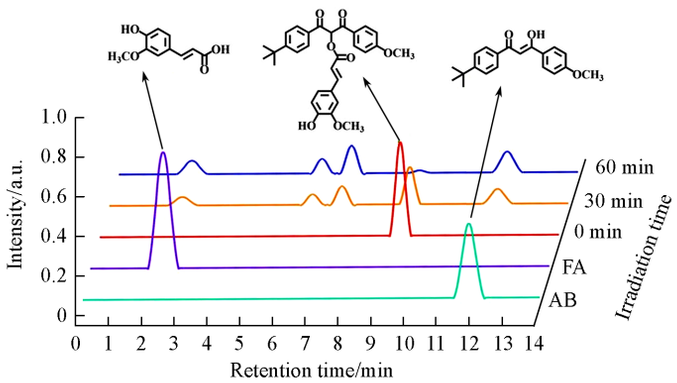


Fig. 3　Photolysis of nitrogen-filled glycol under 405 nm ultraviolet irradiation for 60 min

2.3　AB-FA的荧光分析和可能的光释放机制

上述实验已经验证了AB和FA的释放. 随后, 实验选择充氮乙二醇作为溶剂, 制备了等摩尔浓度(3×10^{-6} mol/L)的FA, AB-FA和AB+FA(1∶1)混合溶液. 使用405 nm紫外光照射FA, 并测量λ_{ex}=330 nm处的荧光强度. 结果[图4(A)]表明, 溶液中FA的荧光强度在60 min内逐渐降低, 在光照10 min后观察到最显著的降低. 推测FA在光照过程中可能会产生活性氧及其自身的氧化反应产物, 导致其荧光强度下降. 随后, 进行了AB-FA和AB+FA(1∶1)的UV照射实验. 结果如图4(B)和(C)所示, 虽然AB-FA和AB+FA(1∶1)的荧光强度随着光照时间的增加而下降, 但在一定时间内2种化合物的荧光强度下降速度明显慢于FA, 表明AB对FA具有一定的光保护作用. 由于AB具有可被光除去的苯甲酰甲基, 因此在光作用下发生烯醇异构化.

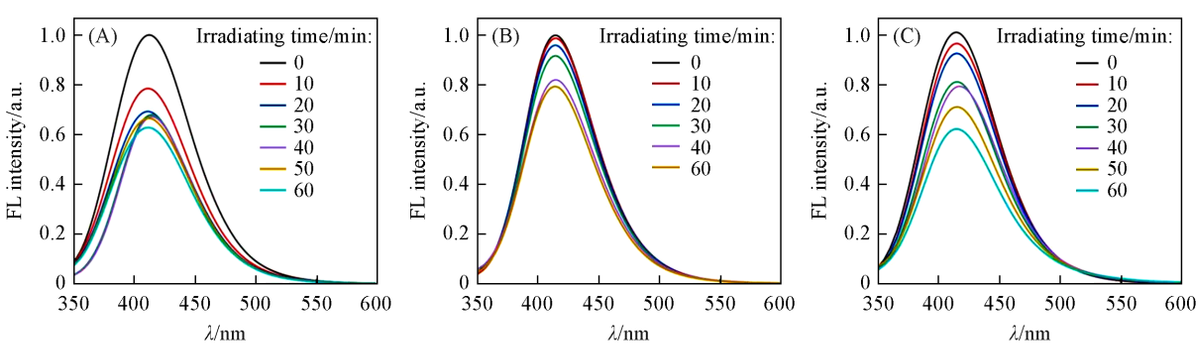
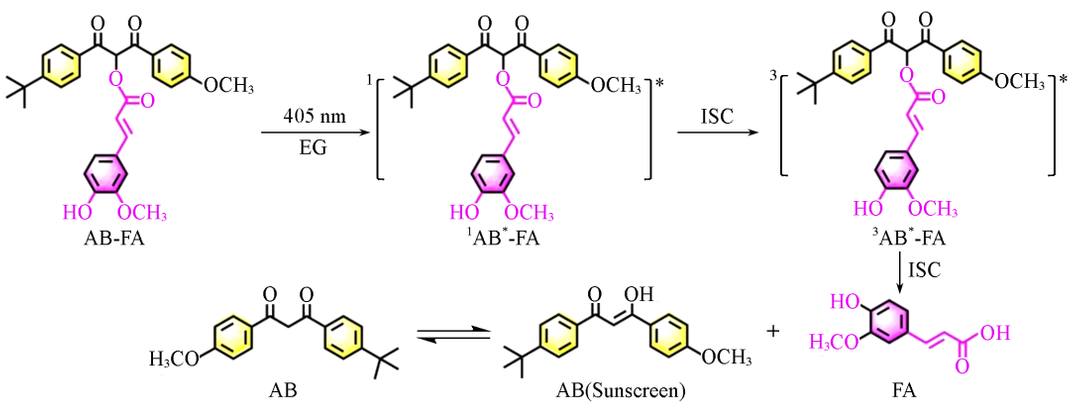


Fig. 4　Fluorescence intensity curves of FA(A), AB-FA(B) and AB+FA(C) irradiated by 405 nm UV from 0 to 60 min

Solvent: N_2/ethyene glycol, λex=330 nm.

Lineros-Rosa等[17]对AB-KP的光释放进行了光机理验证, 基于此推测AB-FA的光解机制如下. AB-FA最初暴露在光下触发^{1}AB*-FA的形成, 随后生成^{3}AB*-FA, 最终导致AB和FA的释放(Scheme 2).



Scheme 2　Photorelease mechanism of AB-FA in ethylene glycol

总体而言，光照荧光实验表明，AB-FA 和 AB+FA(1∶1)中的滤光片 AB 在相同浓度下部分保护了 FA. 虽然不能完全阻止 FA 的降解，但与 AB 和 FA 的混合物相比，该化合物具有时间光控释放的优势.

2.4 AB-FA 及其光解产物对 DPPH 和 ABTS 自由基清除能力评价

DPPH 和 ABTS 是评价抗氧化活性的常用试剂[18]. DPPH 是一种含氮自由基，在乙醇溶液中呈紫色，最大吸收峰位于 517 nm 处. 当 DPPH 与具有抗氧化活性的物质配对时，溶液会褪色并导致吸光度降低[19]. 因此，可通过测量溶液的颜色和吸光度来评估样品的抗氧化活性.

实验结果[图 5(A)]表明，AB-FA 和 UV-AB-FA 对 DPPH 自由基的清除能力与其浓度呈正相关. 当浓度<300 μmol/L 时，随着浓度的增加，其清除能力显著增强. 但当 AB-FA 浓度为 300~500 μmol/L 时，其清除能力逐渐减慢，最终稳定在约 92%. 虽然 AB-FA 对 DPPH 自由基的总体清除率略低于维生素 E，但由于维生素 E 的结构不稳定，光照后其抗氧化活性显著下降.

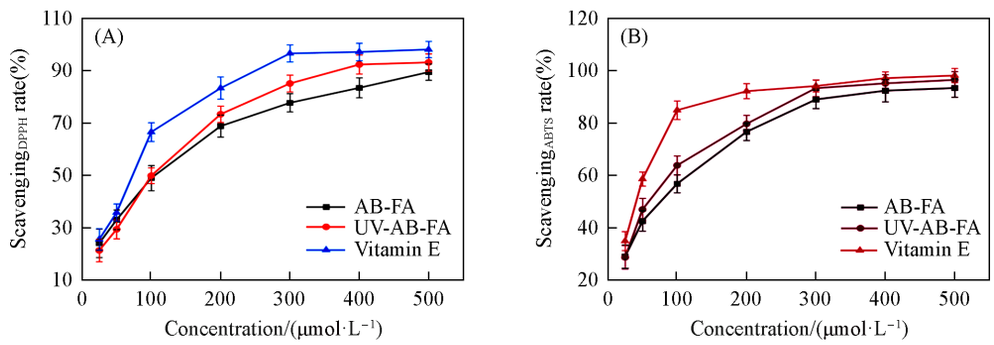


Fig. 5 Antioxidant activity of AB-FA, UV-AB-FA and vitamin E against DPPH free radicals(A) and ABTS free radicals(B) at concentrations ranging from 25 to 500 μmol/L

另外，ABTS 自由基的水溶液呈绿色，最大吸收峰位于 734 nm 处[20]. 由于 ABTS 自由基与抗氧化剂反应后可以改变溶液的颜色，因此可通过分光光度法测量 ABTS 自由基的清除率. 实验结果[图 5(B)]表明，不同浓度的 AB-FA 和 UV-AB-FA 对 ABTS 自由基的清除率与其浓度呈正相关. 尤其是在 300 μmol/L 浓度范围内，其清除率与维生素 E 相当. 虽然 AB-FA 的清除能力略低于维生素 E，但考虑到维生素 E 的光不稳定性，实验结果仍然证明 AB-FA 和 UV-AB-FA 对 ABTS 自由基具有良好的清除活性. 综上所述，体外实验证明了 AB-FA 和 UV 1 h-AB-FA 具有良好的抗氧化能力. 虽然与维生素 E 相比，其清除效果可能略有不同，但 AB-FA 作为抗氧化剂的潜力仍然很高.

2.5 AB-FA 及其光解产物的细胞毒性和细胞保护作用评价

H_2O_2 诱导的细胞氧化损伤模型是通过模拟细胞内产生活性氧和自由基的氧化环境来研究细胞氧化损伤和抗氧化能力的重要方法[21]. 适当浓度的 H_2O_2 对于诱导细胞损伤并使细胞活力降低至 40%~60% 至关重要，从而建立起 H_2O_2 诱导的细胞损伤模型. 考察了不同浓度的 H_2O_2(100~900 μmol/L)对 HaCaT 细胞的影响. 结果[图 6(A)]表明，H_2O_2 浓度增加与细胞活力下降之间存在直接相关性. 在 500 μmol/L H_2O_2 浓度下，细胞活力下降至 48.7%，适合在维持细胞活力的同时诱导氧化损伤.

此外，采用 H_2O_2 作为对照组，探究了 AB-FA 及 UV-AB-FA 针对 H_2O_2 诱导的 HaCaT 细胞氧化应激的保护效果. 由[图 6(B)]可见，经 H_2O_2 处理的细胞组的细胞活力显著降低. 以 4 μmol/L AB-FA 进行预处理后，细胞存活率提升至 67.5%；当浓度增至 16 μmol/L 时，存活率进一步升高至 75.4%. 以上数据表明，在 H_2O_2 诱导的 HaCaT 细胞损伤模型中，AB-FA 的浓度与细胞的存活率呈正相关. 值得注意的是，即使将 UV-AB-FA 的浓度从 8 μmol/L 增加至 16 μmol/L，细胞活力也未见显著改善. 综上所述，在 4~16 μmol/L 的浓度范围内，UV 1h-AB-FA 对抵抗 H_2O_2 诱导的 HaCaT 细胞损伤表现出比未经照射的 AB-FA 更优异的保护效果.

采用 MTT 法对 Hela 细胞进行了细胞毒性实验[22]，比较了 AB-FA 和 UV-AB-FA 的作用[图 6(C)]，目的是评估安全性并确定这些化合物的适当给药浓度. 通常，如果细胞存活率超过 90%，则认为药物无

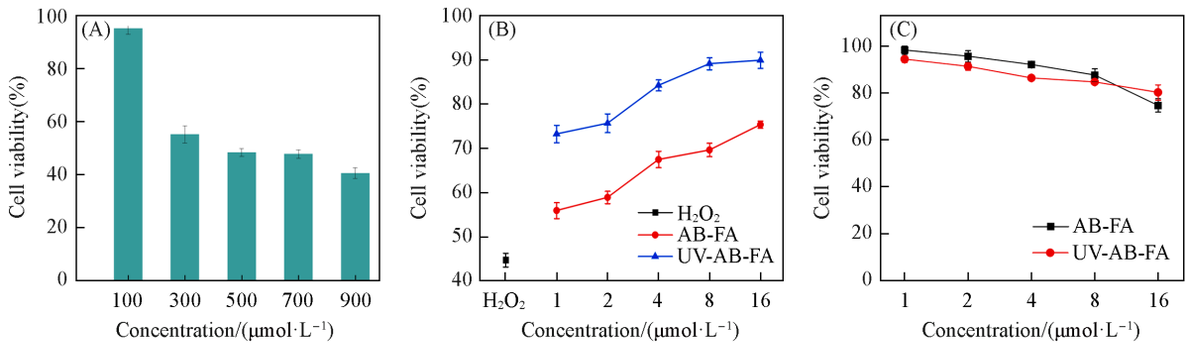


Fig. 6 Effects of H_2O_2 on the viability of HaCaT cells(A), protective effects of AB-FA and UV-AB-FA at different concentrations on H_2O_2-induced HaCaT cells damage(B) and effects of AB-FA and UV-AB-FA on Helacytotoxicity(C)

毒. 实验结果表明, 当AB-FA浓度低于4 μmol/L时, Hela细胞的存活率保持在90%以上. 同样, 当AB-FA浓度低于2 μmol/L时, 细胞无明显毒性. 当UV-AB-FA浓度低于2 μmol/L时, 对细胞无明显毒性作用. 但在16 μmol/L浓度下, 其细胞活力略低于AB-FA. 因此, 建议将剂量浓度控制在8 μmol/L以下, 以保证最佳的细胞存活率和治疗效果.

2.6 AB-FA和UV-AB-FA对H_2O_2诱导的HaCaT损伤细胞胞内ROS含量的影响

采用DCFH-DA荧光探针法确定了细胞内活性氧(ROS)的水平, 该探针可以穿透细胞膜并被去乙酰化形成DCFH[23]. ROS氧化DCFH生成荧光产物DCF, 通过检测DCFH-DA处理细胞的荧光强度来准确测量细胞内ROS水平[24].

由图7(A)和(B)可见, 使用500 μmol/L H_2O_2处理后细胞的ROS水平显著升高, 约为对照组的4.32倍, 表明H_2O_2诱导HaCaT细胞氧化应激, ROS生成升高. 随着AB-FA浓度的增加, 细胞内荧光强度相对于H_2O_2组逐渐降低. ROS清除能力测试结果表明, AB-FA对ROS清除水平具有剂量依赖性. 当AB-FA浓度达到16 μmol/L时, 荧光强度比8 μmol/L AB-FA组降低35%, 比H_2O_2组降低281%. UV-AB-FA清除ROS的能力也呈剂量依赖性. 当其浓度为16 μmol/L时荧光强度相比8 μmol/L下降28%, 比H_2O_2组降低了234%, 略低于未经紫外线照射的AB-FA组. 值得注意的是, 当浓度为16 μmol/L时, AB-FA和紫外线照射的AB-FA对细胞内活性氧自由基均有明显的清除作用. 荧光强度持续降低, 逐渐接近对照组水平, 验证了AB-FA及其光产物减少细胞内活性氧积累的有效性. 虽然荧光强度仍略高于对照组, 但这些结果表明AB-FA具有作为抗氧化剂的潜力.

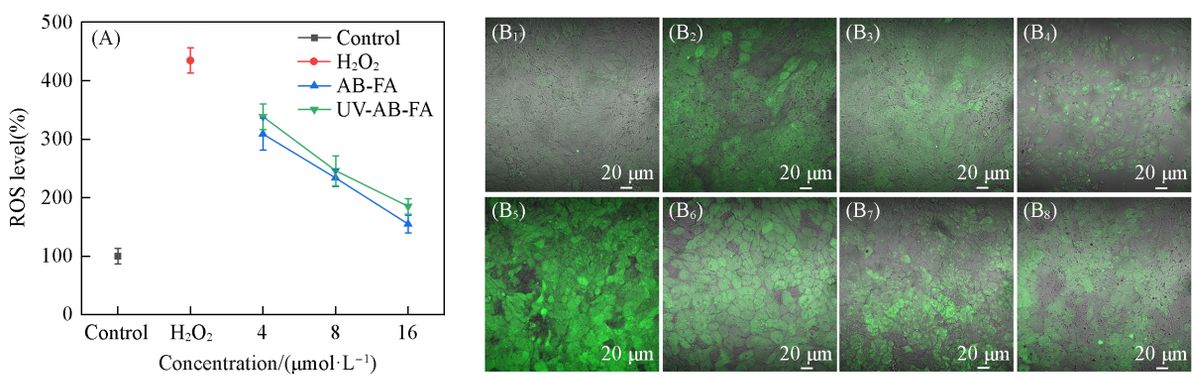


Fig. 7 Effects of AB-FA and UV-AB-FA on H_2O_2-induced intracellular reactive oxygen species(ROS) level in HaCaT cells(A) and fluorescence microscopic images of HaCaT cells damaged by H_2O_2 treated after AB-FA and UV-AB-FA treatment(B)

(B) λ_{ex}=488 nm. (B_1) Control; (B_5) H_2O_2. $c_{AB\text{-}FA}$/(μmol·L^{-1}): (B_2) 4; (B_3) 8; (B_4) 16. $c_{UV\text{-}AB\text{-}FA}$/(μmol·L^{-1}): ($B_6$) 4; ($B_7$) 8; ($B_8$) 16.

3 结　论

合成了一种新的化合物AB-FA，该化合物在光照下可释放FA和AB(UVA)滤光剂．此外，AB-FA及其光解产物在体外表现出显著的抗氧化活性，对H_2O_2诱导的HaCaT细胞损伤具有保护作用．本文提出了开发释放羧酸活性物质和UVA过滤器的新化合物的有效策略，证明了其在体外抗氧化和细胞保护方面的潜在应用．

支持信息见http://www.cjcu.jlu.edu.cn/CN/10.7503/20240056.

参　考　文　献

[1] Andrae I., Bringhen A., Böhm F., Gonzenbach H., Hill T., Mulroy L., Truscott T., *J. Photoch. Photobio. B*, **1997**, *37*(1/2), 147—150
[2] Mturi G. J., Martincigh B. S., *J. Photoch. Photobio. A*, **2008**, *200*(2/3), 410—420
[3] Chaudhuri R. K., Ollengo M. A., Singh P., Martincigh B. S., *Int. J. Cosmetic Sci.*, **2017**, *39*(1), 25—35
[4] Weinstain R., Slanina T., Kand D., Klan P., *Chem. Rev.*, **2020**, *120*(24), 13135—13272
[5] Karimi M., Zangabad P. S., Baghaee-Ravari S., Ghazadeh M., Mirshekari H., Hamblin M. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **2017**, *139*(13), 4584—4610
[6] Bao C. Y., Zhu L. Y., Lin Q. N., Tian H., *Adv. Mater.*, **2015**, *27*(10), 1647—1662
[7] Yamaji M., Kida M., *J. Phys. Chem. A*, **2013**, *117*(9), 1946—1951
[8] Klán P., Solomek T., Bochet C. G., Blanc A., Givens R., Rubina M., Popik V., Kostikov A., Wirz J., *Chem. Rev.*, **2013**, *113*(1), 119—191
[9] Aparici-Espert I., Miranda M. A., Lhiaubet-Vallet V., *Molecules*, **2018**, *23*(3), 673
[10] Sgarbossa A., Giacomazza D., di Carlo M., *Nutrients*, **2015**, *7*(7), 5764—5782
[11] Ou S., Kwok K. C., *J. Sci. Food Agric.*, **2004**, *84*(11), 1261—1269
[12] Mancuso C., Santangelo R., *Food Chem. Toxicol.*, **2014**, *65*, 185—195
[13] Anselmi C., Centini M., Andreassi M., Buonocore A., La Rosa C., Facino R. M., Sega A., Tsuno F., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2004**, *35*(5), 1241—1249
[14] Dong X. Y., Huang R., *Phytomedicine*, **2022**, *105*, 154355
[15] Razboršek M. I., Ivanović M., Kolar M., *Molecules*, **2021**, *26*(9), 2475
[16] Afonso S., Horita K., Silva J. P. S. E., Almeida I. F., Amaral M. H., Lobão P. A., Costa P. C., Miranda M. S., da Silva J. C. G. E., Lobo J. M. S., *J. Photoch. Photobio. B*, **2014**, *140*, 36—40
[17] Lineros-Rosa M., Cuquerella M. C., Francés-Monerris A., Monari A., Miranda M. A., Lhiaubet-Vallet V., *Org. Biomol. Chem.*, **2021**, *19*(8), 1752—1759
[18] Ozgen M., Reese R. N., Tulio A. Z., Scheerens J. C., Miller A. R., *J. Agric. Food. Chem.*, **2006**, *54*(4), 1151—1157
[19] Baliyan S., Mukherjee R., Priyadarshini A., Vibhuti A., Gupta A., R. P., Pandey R. P., Chang C. M., *Molecules*, **2022**, *27*(4), 1326
[20] Lü J. M., Lin P. H., Yao Q. Z., Chen C. Y., *J. Cell Mol. Med.*, **2010**, *14*(4), 840—860
[21] Wen C. T., Zhang J. X., Feng Y. Q., Duan Y. Q., Ma H. L., Zhang H. H., *Food Chem.*, **2020**, *327*, 127059
[22] Patel S., Gheewala N., Suthar A., Shah A., *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, **2009**, *1*(1), 38—46
[23] Wang W. Y., Zhao Y. Q., Zhao G. X., Chi C. F., Wang B., *Mar. Drugs.*, **2020**, *18*(3), 156
[24] Shen H. M., Shi C. Y., Shen Y., Ong C. N., *Free Radical Bio. Med.*, **1996**, *21*(2), 139—146

(Ed.: L, W, K)