

# 柚皮素酰肼类衍生物的合成、体外抗氧化活性以及细胞毒性研究

董家吏<sup>1,2</sup>, 廖岳婷<sup>1,2</sup>, 焦必宁<sup>2</sup>, 苏学素<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>西南大学化学化工学院, 重庆 400715; <sup>2</sup>中国农业科学院柑桔研究所(西南大学柑桔研究所) 农业农村部柑桔产品质量安全风险评价实验室, 重庆 400712

**摘要:**柚皮素具有良好的抗氧化活性,但由于其生物利用率低,导致其应用受限。本文合成得到 13 种柚皮素的酰肼类衍生物,其中 12 种未被文献报道。采用 ABTS、FRAP、DPPH 3 种方法测定了合成衍生物与柚皮素的体外抗氧化活性。结果显示 13 种化合物的抗氧化活性均强于柚皮素,其中 8 种衍生物的体外抗氧化活性是柚皮素活性的 3 到 6 倍。细胞毒性实验中细胞存活率 >90% 时,可认为化合物对细胞无抑制。8 种化合物对 HEK293 细胞的细胞毒性实验结果显示,在 0~25  $\mu\text{mol/L}$  浓度范围内,衍生物 **b**、**g**、**j**、**k**、**l** 对 HEK293 细胞存活率大于 90%,其中衍生物 **g**、**k**、**l** 的浓度在 0~50  $\mu\text{mol/L}$  时,HEK293 细胞的存活率仍大于 90%,而衍生物 **j** 在浓度高达 100  $\mu\text{mol/L}$  时细胞存活率仍大于 90%。研究结果为后期的抗氧化食品添加剂及抗氧化药物筛选提供理论依据。

**关键词:**柚皮素;酰肼;抗氧化活性;细胞毒性

中图分类号:O629.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)4-0535-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.4.001

## Synthesis, antioxidant activity *in vitro* and cytotoxicity of naringenin acylhydrazone derivatives

DONG Jia-li<sup>1,2</sup>, LIAO Yue-ting<sup>1,2</sup>, JIAO Bi-ning<sup>2</sup>, SU Xue-su<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China;

<sup>2</sup>Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Citrus Products, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Citrus

Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences (Citrus Research Institute of Southwest University), Chongqing 400712, China

**Abstract:** Naringenin has better antioxidant activity. However, its application is limited due to its low bioavailability. In this article, 13 kinds of naringenin acylhydrazone derivatives were synthesized, 12 of them have not been reported in the literature. The antioxidant activities *in vitro* of 13 derivatives were determined by ABTS, FRAP, and DPPH methods. The results show that the antioxidant activity of 13 compounds is stronger than that of naringenin, and the antioxidant activity of 8 derivatives is 3 to 6 times higher than that of naringenin. In the cytotoxicity test, when the cell survival rate is >90%, it is regarded that the compound does not inhibit the cells. When the concentration range of 0-25  $\mu\text{mol/L}$ , the survival rate of HEK293 cells treated with derivatives **b**, **g**, **j**, **k** and **l** was more than 90%. In addition, when the concentration of derivatives **g**, **k**, **l** is 0-50  $\mu\text{mol/L}$ , the survival rate of HEK293 cells is still more than 90%. Especially when the concentration of derivative **j** is as high as 100  $\mu\text{mol/L}$ , the cell survival rate was still above 90%. The results provide a theoretical basis for the later screening of antioxidant food additives and antioxidant drugs.

**Key words:** naringenin; acylhydrazone; antioxidant activity; cytotoxicity

黄酮类化合物是一类在植物界普遍存在的天然苯并- $\gamma$ -吡喃酮衍生物,具有抗菌<sup>[1]</sup>、抗氧化<sup>[2]</sup>、免疫

调节,化学预防和抗癌特性<sup>[3]</sup>,对人体健康大有益处。柚皮素作为一种二氢黄酮类化合物,也具有抗菌<sup>[4]</sup>、抗肿瘤<sup>[5]</sup>、抗氧化<sup>[6,7]</sup>等生物活性。Tutunchi 和 Filippin 等<sup>[8,9]</sup>研究了柚皮素抗击 COVID-19 的可行性机制。柚皮素可与 Vc、Ve 联用能更有效的治疗镉诱导和砷诱导的 Wistar 大鼠的氧化应激引起的

收稿日期:2020-10-29 接受日期:2021-02-22

基金项目:国家重点研发专项(2019YFC1605604-2);国家现代农业(柑桔)产业技术体系建设专项(CARS-26);国家农产品质量安全风险评估重大专项(GJFP2019043)

\* 通信作者 Tel:86-013996454536; E-mail:suxuesu@swu.edu.cn

肝损伤<sup>[10,11]</sup>。但由于柚皮素自身的脂溶性和水溶性都较差,导致其生物利用率不高。因此柚皮素的改性研究受到各界的广泛关注。

柚皮素的7位、4'位的酚羟基,以及4位的羰基较为活泼,因此可以通过化学反应修饰柚皮素的结构,改善其水溶性进而改善其生物利用率。据文献报道,酰肼类化合物具有良好的抗氧化活性<sup>[12,13]</sup>、抗菌活性<sup>[14]</sup>、抗癌活性<sup>[15]</sup>等,但由于酰肼中氨基的影响,对有机体有一定的毒性,因此将酰肼通过改造得到酰脲是改善酰肼毒性的有效手段<sup>[14]</sup>。酰脲类化合物同样具有良好的抗菌<sup>[16-18]</sup>、抗氧化<sup>[19,20]</sup>、抗增殖<sup>[21]</sup>等。因此,在现有关构效关系以及柚皮素改性研究的基础上,本文在4位引进酰脲基团形成酰脲,期望能得到既有生物活性,又能降低酰肼结构毒性的柚皮素衍生物。对所得衍生物进行体外抗氧化活性,以及其对 HEK293 细胞的细胞毒性实验,以筛选高抗氧化活性及低毒性物质,为进一步的开发利用提供參考。

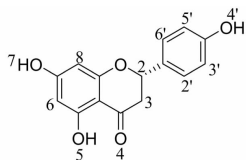


图1 柚皮素的结构

Fig. 1 The structure of naringenin

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 实验试剂

柚皮素标准品(纯度 $\geq 98\%$ ,源叶生物);肼基甲酸苄酯(毕得医药);2-氯苯甲酰肼(Aladdin);2-硝基苯酰肼(Macklin);苯乙酸肼(源叶生物);3-甲氧基苯酰肼(HAWN);4-氨基苯甲酰肼(源叶生物);2-咪喃苯甲酰肼(毕得医药);戊酰肼(毕得医药);3-溴苯甲酰肼(源叶生物);3-羟基苯甲酰肼(Alfa Aesar);烟酰肼(Adamas-beta);2-溴苯甲酰脲(Macklin);2,4-二羟基苯甲酰肼(Macklin);无水乙醇(HPLC, Knowles);乙酸(AR);乙酸乙酯(AR,成都市克隆化学品有限公司);石油醚(AR,成都市克隆化学品有限公司);硅胶;DMF(AR,重庆川东化工有限公司);DMSO(Merck);血清(康源生物);双抗(Gibco)去离子水。

具有快速 ABTS[2,2'-叠氮基双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)](S0121)和 FRAP[血浆铁还原能力](S0116)检测能力的试剂盒购自 Beyotime biotech-

nology company(上海,中国);DPPH[1,1-二苯基-2-苦基肼基自由基]自由基清除能力试剂盒(G0128W);CCK-8 试剂盒(abbkine);HEK293 细胞(珠海凯瑞生物科技有限公司)。

#### 1.1.2 实验仪器

RE-52AA 旋蒸仪(上海亚荣生化仪器厂);SZCL-3A 磁力搅拌器(郑州科泰实验设备有限公司);M1-L213C 微波炉(美的)3020-352 酶标仪(Thermo fisher scientific);SGWX-4 显微熔点仪(仪电物光);TGL-16c 台式离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);SW-CJ-2FD 超净工作台(AIRTECH);CO<sub>2</sub> 培养箱(Thermo);D1008E 掌上离心机(SCIOLOGEX);96 孔板(NEST)。

### 1.2 柚皮素酰脲类衍生物的合成方法

衍生物 a~f、h~m 的合成方法。取 1.5 mmol 柚皮素和 1.5 mmol 酰脲类化合物于圆底烧瓶中,加入 20 mL 乙醇,2 mL 乙酸溶解。将混合溶液在 700 W 微波炉中加热 4~5 min, TLC 跟踪反应。由于 4-氨基苯酰肼与柚皮素微波加热不反应,因此衍生物 g 的合成方法为称取 1.5 mmol 柚皮素和 1.5 mmol 4-氨基苯酰脲类化合物于圆底烧瓶中,加入 20 mL 乙醇,2 mL 乙酸溶解。将混合溶液在 110 °C 回流 8~12 h, TLC 跟踪反应。薄层色谱显示混合物中除反应物以外,有产物点,说明有新化合物生成。反应所得混合物用乙酸乙酯和石油醚作洗脱液分离,或用无水乙醇重结晶,得到衍生物纯品。通过<sup>1</sup>H NMR 及 HR-EI-MS 等方法确定衍生物结构。化合物的合成路线如图 2 所示。

### 1.3 体外抗氧化活性的测定

#### 1.3.1 ABTS 法测定体外抗氧化活性

参考 Hua 等<sup>[22]</sup>的方法对柚皮素衍生物以及 BHT、BHA 两种食品添加的抗氧化剂进行了抗氧化活性测定。将所有样品取 0.01 mmol,溶于 10 mL DMF 得到 1 mM 的溶液,备用。将试剂盒中的 10 mM 的 Trolox 溶液稀释为 1.5、1.2、0.9、0.6、0.3、0.15 mM。使用具有 ABTS 检测功能的总抗氧化剂含量测定试剂盒,确定总抗氧化剂活性。96 孔板中每个检测孔中加入 20  $\mu$ L 过氧化物酶工作液,空白对照孔中加入 10  $\mu$ L 蒸馏水;标准曲线检测孔加入 10  $\mu$ L 各种浓度的 Trolox 溶液,样品检测孔加入 10  $\mu$ L 各种样品溶液。每个孔再加入 170  $\mu$ L ABTS 工作液,轻轻混匀,在室温孵育 6 min,在 414 nm 的波长下检测其吸光度。每个样品 3 个复孔,结果取平均值。

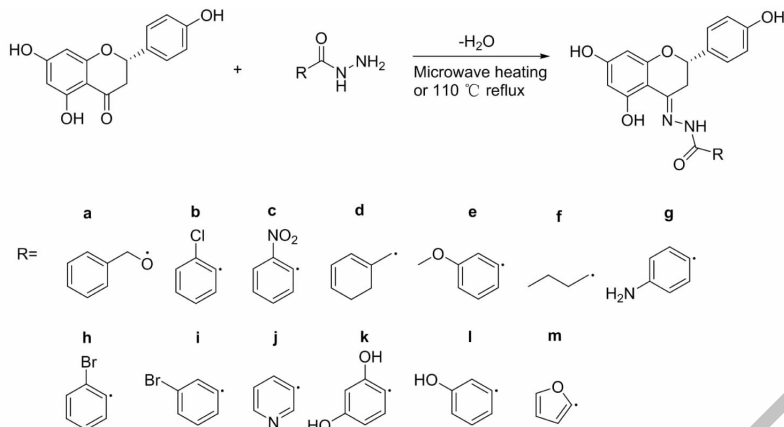


图 2 13 种衍生物合成路线及结构

Fig. 2 The synthetic routes and structures of 13 derivatives

标准曲线:

$$\Delta A_{414} = A_{414\text{空白}} - A_{414\text{标准}}$$

样品:

$$\Delta A_{414} = A_{414\text{空白}} - A_{414\text{标准}}$$

### 1.3.2 FRAP 法测定体外抗氧化活性

称取 0.01 mmol 化合物,溶于 5 mL DMF,再加入 5 mL 去离子水得到 1 mM 的溶液,备用。称取 2.78 mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  用 DMF:  $\text{H}_2\text{O} = 1:1$  溶解至 1 mL,得到 10 mM 的溶液。用 DMF:  $\text{H}_2\text{O} = 1:1$  的混合溶剂稀释为 1.5、1.2、0.9、0.6、0.3、0.15 mM 的溶液备用。96 孔板的每个检测孔中加入 180  $\mu\text{L}$  FRAP 工作液;空白对照加入 5  $\mu\text{L}$  1:1 的 DMF 和  $\text{H}_2\text{O}$  的混合溶剂;标准曲线检测孔加入 5  $\mu\text{L}$  不同浓度的  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  溶液;样品检测孔中加入 5  $\mu\text{L}$  样品溶液;37  $^\circ\text{C}$  孵育 3~5 min 后在 593 nm 波长下测定吸光度。每个样品 3 个复孔,结果取平均值。

### 1.3.3 DPPH 自由基清除能力测定

称取化合物 2 mg 溶于 10 mL DMF 中,得到 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的药液,备用。用甲醇配制 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 Trolox 溶液。再用甲醇将标准品按 0、5、10、15、20、25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的浓度梯度稀释,备用。将各种药液用 80% 甲醇水,稀释至 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,分别吸取药物稀释液 150  $\mu\text{L}$  于 1.5 mL 离心管中,再加入 150  $\mu\text{L}$  DPPH 工作液,避光反应 30 min 后,吸取反应液 200  $\mu\text{L}$  于 96 孔板中,测定 517 nm 波长的吸光度。每个样品做 3 个复孔,结果取平均值。

化合物自由基清除率的计算:

$$\text{自由基清除率} = \left(1 - \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{空白}}}\right) \times 100\%$$

化合物的自由基清除能力是于 Trolox 的浓度

( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 来评估:

$$\text{自由基清除率} = 0.351 \times (\text{清除率} - 0.7084)$$

### 1.4 细胞毒性测定

本实验所用细胞为 HEK293 细胞,实验前需先做预实验。在 96 孔板中加 100  $\mu\text{L}$  细胞密度分别为  $1 \times 10^3$ 、 $2 \times 10^3$ 、 $3 \times 10^3$ 、 $4 \times 10^3$ 、 $5 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^4$  的三组 HEK293 细胞,以及一个空白对照,一共 63 个孔。然后将板放在 37  $^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 24 h。再向 96 孔板的每个孔中加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 溶液。在培养箱中将平板孵育 1~4 h,并每隔 1 h 使用酶标仪测量 450 nm 处的吸光度。结果显示当 293 细胞数量为  $1 \times 10^4$  细胞/孔、孵育时间为 2.5 h,吸光值的结果接近 1.0,符合预期。因此,选取的最佳细胞数量为  $1 \times 10^4$  细胞/孔,孵育的最佳时间为 2.5 h。

正式实验,在 96 孔板中的加 100  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^4$  细胞/孔 293 细胞悬液,将板在 37  $^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中预培养 24 h,在平板中加入培养基稀释过的不同浓度的待测药物。每种药物的浓度梯度设置为:0、25、50、100、250、500  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ,空白对照(不含细胞的培养液)、阴性对照(DMSO 终浓度为 1%),每个浓度做 3 个复孔。药物用 DMSO 溶解,其中 DMSO 终浓度为 1%。在培养箱中孵育 48 h,向 96 孔板的每个孔中加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 溶液。在培养箱中将平板孵育 80 min。使用酶标仪测量 450 nm 波长的吸光度。

细胞存活率的计算:

$$\text{细胞存活率} = \left(1 - \frac{OD_{\text{O浓度}} - OD_{\text{实验组}}}{OD_{\text{O浓度}} - OD_{\text{空白}}}\right) \times 100\%$$

## 2 结果与分析

### 2.1 化合物表征结果

柚皮素[芐氧基甲酸]-4-酰胺(a) 乙酸乙酯:

石油醚 = 1:4 洗脱, 产率 56%; 白色粉末 ( $C_{23}H_{20}N_2O_6$ ); mp. 210 ~ 212 °C; HR-EI-MS:  $m/z$  421. 132 9  $[M + H]^+$  (calcd for  $C_{23}H_{21}N_2O_6^+$ , 421. 132 1);  $^1H$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 12. 58 (1H, s, NH), 10. 66 (1H, s, 5-OH), 9. 86 (1H, s, 7-OH), 9. 51 (1H, s, 4'-OH), 7. 40 (4H, dd,  $J = 18. 0, 7. 8$  Hz, Ph-4H), 7. 34 (1H, d,  $J = 6. 6$  Hz, Ph-H), 7. 28 (2H, d,  $J = 8. 4$  Hz, H-2', H-6'), 6. 79 (2H, d,  $J = 8. 4$  Hz, H-3', H-5'), 5. 89 (1H, d,  $J = 2. 0$  Hz, H-8), 5. 84 (1H, d,  $J = 2. 0$  Hz, H-6), 5. 20 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 5. 05 (1H, dd,  $J = 12. 0, 2. 4$  Hz, H-2), 3. 23 (1H, dd,  $J = 16. 8, 2. 4$  Hz, H-3a), 2. 78 (1H, dd,  $J = 16. 8, 12. 0$  Hz, H-3b)。

**柚皮素[2-氯苯甲酸]-4-酰脲(b)** 用无水乙醇重结晶, 产率 67%。橙色粉末 ( $C_{22}H_{17}ClN_2O_5$ ); mp. 217 ~ 219 °C; HR-EI-MS:  $m/z$  425. 082 6  $[M + H]^+$  (calcd for  $C_{22}H_{18}ClN_2O_5^+$ , 425. 088 2);  $^1H$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 12. 90 (1H, s, NH), 11. 36 (1H, s, 5-OH), 9. 99 (1H, s, 7-OH), 9. 52 (1H, s, 4'-OH), 7. 55 (1H, m, Ph-Ha), 7. 50 (1H, dd,  $J = 15. 6, 8. 4$  Hz, Ph-Hb), 7. 42 (1H, dd,  $J = 15. 0, 7. 8$  Hz, Ph-Hc), 7. 38 (1H, d,  $J = 3. 8$  Hz, Ph-Hd), 7. 30 (2H, d,  $J = 8. 4$  Hz, H-2', H-6'), 6. 78 (2H, d,  $J = 8. 4$  Hz, H-3', H-5'), 5. 94 (1H, d,  $J = 2. 0$  Hz, H-8), 5. 87 (1H, d,  $J = 2. 0$  Hz, H-6), 5. 10 (1H, dd,  $J = 12. 0, 2. 4$  Hz, H-2), 3. 29 (1H, dd,  $J = 16. 8, 2. 4$  Hz, H-3a), 2. 87 (1H, dd,  $J = 16. 8, 12. 0$  Hz, H-3b)。

**柚皮素[2-硝基苯甲酸]-4-酰脲(c)** 乙酸乙酯: 石油醚 = 1:1 洗脱, 产率 78%; 橙红色粉末 ( $C_{22}H_{17}N_3O_7$ ); mp. 105 ~ 108 °C; HR-EI-MS:  $m/z$  436. 106 6  $[M + H]^+$  (calcd for  $C_{22}H_{18}N_3O_7^+$ , 436. 106 9);  $^1H$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 12. 85 (1H, s, NH), 11. 45 (1H, s, 5-OH), 10. 02 (1H, s, 7-OH), 9. 53 (1H, s, 4'-OH), 8. 15 (1H, d,  $J = 7. 8$  Hz, Ph-Ha), 7. 84 (1H, t,  $J = 7. 3$  Hz, Ph-Hb), 7. 75 (2H, dd,  $J = 8. 4, 7. 2$  Hz, Ph-Hc, Ph-Hd), 7. 31 (2H, d,  $J = 8. 4$  Hz, H-2', H-6'), 6. 78 (2H, d,  $J = 7. 8$  Hz, H-3', H-5'), 5. 95 (1H, d,  $J = 2. 0, H-8$ ), 5. 88 (1H, d,  $J = 2. 0, H-6$ ), 5. 11 (1H, dd,  $J = 12. 0, 2. 4$  Hz, H-2), 3. 23 (1H, dd,  $J = 16. 8, 2. 4$  Hz, H-3a), 2. 86 (1H, dd,  $J = 16. 8, 12. 0$  Hz, H-3b)。

**柚皮素[苯乙酸]-4-酰脲(d)** 乙酸乙酯: 石油醚 = 1:3 洗脱, 产率 47%; 淡黄色粉末 ( $C_{23}H_{20}N_2O_5$ ); mp. 117 ~ 119 °C; HR-EI-MS:  $m/z$  405. 137 2

$[M + H]^+$  (calcd for  $C_{23}H_{21}N_2O_5^+$ , 405. 139 4);  $^1H$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 12. 86 (1H, s, NH), 10. 93 (1H, s, 5-OH), 9. 90 (1H, s, 7-OH), 9. 55 (1H, s, 4'-OH), 7. 34 (2H, d,  $J = 8. 4$  Hz, H-2', H-6'), 7. 30 (4H, d,  $J = 3. 0$  Hz, Ph-4H), 7. 24 (1H, d,  $J = 4. 8$  Hz, Ph-H), 6. 82 (2H, d,  $J = 8. 4$  Hz, H-3', H-5'), 5. 89 (1H, d,  $J = 2. 4$  Hz, H-8), 5. 84 (1H, d,  $J = 2. 4$  Hz, H-6), 5. 09 (1H, dd,  $J = 12. 0, 2. 4$  Hz, H-2), 3. 61 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 3. 26 (1H, dd,  $J = 16. 8, 2. 4$  Hz, H-3a), 2. 87 (1H, dd,  $J = 16. 8, 12. 0$  Hz, H-3b)。

**柚皮素[3-甲氧基苯甲酸]-4-酰脲(e)** 乙酸乙酯: 石油醚 = 1:4 洗脱, 产率 56%; 黄棕色粉末 ( $C_{23}H_{26}N_2O_6$ ); mp. 250 ~ 252 °C; HR-EI-MS:  $m/z$  421. 138 5  $[M + H]^+$  (calcd for  $C_{23}H_{27}N_2O_6^+$ , 421. 132 1);  $^1H$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 13. 07 (1H, s, NH), 11. 10 (1H, s, 5-OH), 9. 98 (1H, s, 7-OH), 9. 54 (1H, s, 4'-OH), 7. 45 (1H, d,  $J = 7. 8$  Hz, Ph-Ha), 7. 41 (2H, d,  $J = 8. 4$  Hz, Ph-Hb, Ph-Hc), 7. 33 (2H, d,  $J = 8. 4$  Hz, H-2', H-6'), 7. 15 (1H, d, 7. 8 Hz, Ph-Hd), 6. 81 (2H, d,  $J = 8. 4$  Hz, H-3', H-5'), 5. 93 (1H, d,  $J = 2. 4$  Hz, H-8), 5. 87 (1H, d,  $J = 2. 4$  Hz, H-6), 5. 09 (1H, dd,  $J = 12. 0, 2. 4$  Hz, H-2), 3. 81 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 3. 41 (1H, dd,  $J = 16. 8, 2. 4$  Hz, H-3a), 2. 94 (1H, dd,  $J = 16. 8, 12. 0$  Hz, H-3b)。

**柚皮素[戊酸]-4-酰脲(f)** 乙酸乙酯: 石油醚 = 1:4 洗脱, 产率 58%; 黄色粉末 ( $C_{20}H_{22}N_2O_5$ ); mp. 244 ~ 247 °C; HR-EI-MS:  $m/z$  371. 158 7  $[M + H]^+$  (calcd for  $C_{20}H_{23}N_2O_5^+$ , 371. 152 9);  $^1H$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 12. 94 (1H, s, NH), 10. 65 (1H, s, 5-OH), 9. 88 (1H, s, 7-OH), 9. 54 (1H, s, 4'-OH), 7. 32 (2H, d,  $J = 8. 3$  Hz, H-2', H-6'), 6. 81 (2H, d,  $J = 8. 3$  Hz, H-3', H-5'), 5. 89 (1H, d,  $J = 1. 8$  Hz, H-8), 5. 84 (1H, d,  $J = 1. 8$  Hz, H-6), 5. 07 (1H, dd,  $J = 12. 0, 2. 4$  Hz, H-2), 3. 22 (1H, dd,  $J = 16. 8, 2. 4$  Hz, H-3a), 2. 81 (1H, dd,  $J = 16. 8, 12. 0$  Hz, H-3b), 2. 26 (2H, t,  $J = 7. 4$  Hz, OCCH<sub>2</sub>), 1. 54 (2H, dt,  $J = 14. 4, 7. 2$  Hz, CH<sub>2</sub>), 1. 29 (2H, dd,  $J = 14. 4, 7. 2$  Hz, CH<sub>2</sub>), 0. 87 (3H, t,  $J = 7. 3$  Hz, CH<sub>3</sub>)。

**柚皮素[4-氨基苯甲酸]-4-酰脲(g)** 乙酸乙酯: 石油醚 = 2:1 洗脱, 产率 45%; 红褐色粉末 ( $C_{22}H_{19}N_3O_5$ ); mp. 231 ~ 233 °C; HR-EI-MS:  $m/z$  407. 132 9  $[M + H]^+$  (calcd for  $C_{22}H_{20}N_3O_5^+$ , 407. 132 5);  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ , 600 MHz)  $\delta$ : 13. 20 (1H, s, NH), 10. 64 (1H, s, 5-OH), 9. 89 (1H, s, 7-OH), 9. 54 (1H,

s, 4'-OH), 7.63 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, Ar-Ha, Ar-Hb), 7.33 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, Ar-Hc, Ar-Hd), 6.81 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-2', H-6'), 6.56 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-3', H-5'), 5.92 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-8), 5.85 (1H, d,  $J = 1.2$  Hz, H-6), 5.77 (2H, s, NH<sub>2</sub>), 5.07 (1H, dd,  $J = 12.0, 1.8$  Hz, H-2), 3.38 (1H, dd,  $J = 16.8, 2.4$  Hz, H-3a), 2.91 (1H, dd,  $J = 16.8, 12.0$  Hz, H-3b)。

**柚皮素[4-溴苯甲酸]-4-酰胺(h)** 乙酸乙酯:石油醚 = 1:1 洗脱, 产率 62%; 橙色粉末 (C<sub>22</sub>H<sub>17</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>); mp. 228 ~ 231 °C; HR-EI-MS:  $m/z$  469.037 6 [M + H]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup>, 469.032 1); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 12.91 (1H, s, NH), 11.36 (1H, s, 5-OH), 10.00 (1H, s, 7-OH), 9.53 (1H, s, 4'-OH), 7.69 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz, Ar-Ha), 7.52 (1H, d,  $J = 7.4$  Hz, Ar-Hb), 7.46 (1H, t,  $J = 7.4$  Hz, Ar-Hc), 7.41 (1H, t,  $J = 7.8$  Hz, Ar-Hd), 7.30 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-2', H-6'), 6.78 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-3', H-5'), 5.94 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-8), 5.87 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-6), 5.10 (1H, dd,  $J = 12.0, 2.4$  Hz, H-2), 3.29 (1H, dd,  $J = 16.8, 2.4$  Hz, H-3a), 2.87 (1H, dd,  $J = 16.8, 12.0$  Hz, H-3b)。

**柚皮素[3-溴苯甲酸]-4-酰胺(i)** 用乙酸乙酯重结晶, 产率 78%; 橙色粉末 (C<sub>22</sub>H<sub>17</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>); mp. 235 ~ 237 °C; HR-EI-MS:  $m/z$  469.037 7 [M + H]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup>, 469.032 1); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 13.01 (1H, s, NH), 11.21 (1H, s, 5-OH), 10.00 (1H, s, 7-OH), 9.55 (1H, s, 4'-OH), 8.05 (1H, s, Ar-Ha), 7.87 (1H, d,  $J = 7.7$  Hz, Ar-Hb), 7.78 (1H, d,  $J = 7.7$  Hz, Ar-Hc), 7.46 (1H, t,  $J = 7.9$  Hz, Ar-Hd), 7.33 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-2', H-6'), 6.81 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-3', H-5'), 5.93 (1H, d,  $J = 1.6$  Hz, H-8), 5.87 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-6), 5.10 (1H, dd,  $J = 12.0, 1.8$  Hz, H-2), 3.45 (1H, dd,  $J = 16.8, 1.8$  Hz, H-3a), 2.94 (1H, dd,  $J = 16.8, 12.0$  Hz, H-3b)。

**柚皮素[4-吡啶甲酸]-4-酰胺(j)** 用无水乙醇重结晶, 产率 81%; 淡黄色粉末 (C<sub>21</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>); mp. 266 ~ 267 °C; HR-EI-MS:  $m/z$  392.117 9 [M + H]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup>, 392.116 8); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 12.99 (1H, s, NH), 11.30 (1H, s, 5-OH), 10.01 (1H, s, 7-OH), 9.55 (1H, s, 4'-OH), 9.02 (1H, s, Py-Ha), 8.74 (1H, d,  $J = 4.2$  Hz,

Py-Hb), 8.22 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz, Py-Hc), 7.53 (1H, dd,  $J = 7.8, 4.8$  Hz, Py-Hc), 7.34 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-2', H-6'), 6.81 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-3', H-5'), 5.94 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-8), 5.88 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz, H-6), 5.11 (1H, dd,  $J = 12.0, 2.4$  Hz, H-2), 3.44 (1H, dd,  $J = 16.8, 2.4$  Hz, H-3a), 2.94 (1H, dd,  $J = 16.8, 12.5$  Hz, H-3b)。

**柚皮素[2,4-二羟基苯甲酸]-4-酰胺(k)** 乙酸乙酯:石油醚 = 1:1 洗脱, 产率 58%; 棕色粉末 (C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>); mp. 236 ~ 238 °C; HR-EI-MS:  $m/z$  423.118 0 [M + H]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>+</sup>, 423.111 4); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 12.91 (1H, s, Ph-OHa), 11.79 (1H, s, NH), 11.10 (1H, s, 7-OH), 10.13 (1H, s, 5-OH), 9.96 (1H, s, Ph-OHb), 9.56 (1H, s, 4'-OH), 7.80 (1H, d,  $J = 8.6$  Hz, Ph-Ha), 7.33 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-2', H-6'), 6.81 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-3', H-5'), 6.37 (1H, dd,  $J = 8.7, 1.7$  Hz, Ph-Hb), 6.34 (1H, s, Ph-Hc), 5.94 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz, H-8), 5.87 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz, H-6), 5.12 (1H, dd,  $J = 12.0, 2.4$  Hz, H-2), 3.16 (1H, dd,  $J = 16.8, 2.4$  Hz, H-3a), 3.00 (1H, dd,  $J = 16.8, 12.0$  Hz, H-3b)。

**柚皮素[3-羟基苯甲酸]-4-酰胺(l)** 乙酸乙酯:石油醚 = 1:1 洗脱, 产率 61%; 红棕色粉末 (C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>); mp. 256 ~ 258 °C; HR-EI-MS:  $m/z$  407.123 5 [M + H]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub><sup>+</sup>, 407.116 5); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 13.08 (1H, s, NH), 11.04 (1H, s, 7-OH), 9.97 (1H, s, 5-OH), 9.72 (1H, s, Ph-OH), 9.54 (1H, s, 4'-OH), 7.33 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-2', H-6'), 7.28 (2H, d,  $J = 7.2$  Hz, Ph-Ha, Ph-Hb), 7.24 (1H, s, Ph-Hc), 6.95 (1H, d,  $J = 7.0$  Hz, Ph-Hd), 6.81 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-3', H-5'), 5.93 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-8), 5.87 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-6), 5.09 (1H, dd,  $J = 12.0, 2.4$  Hz, H-2), 3.40 (1H, dd,  $J = 16.8, 2.4$  Hz, H-3a), 2.94 (1H, dd,  $J = 16.8, 12.0$  Hz, H-3b)。

**柚皮素[2-呋喃甲酸]-4-酰胺(m)** 用无水乙醇重结晶, 产率 76%; 淡黄色粉末 (C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>); mp. 258 ~ 260 °C; HR-EI-MS:  $m/z$  381.106 6 [M + H]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub><sup>+</sup>, 381.100 8); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 12.91 (1H, s, NH), 11.02 (1H, s, 7-OH), 10.00 (1H, s, 5-OH), 9.55 (1H, s, 4'-OH), 7.91 (1H, s, Furan-Ha), 7.33 (3H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-2', H-6', Furan-Hb), 6.81 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz,

H-3', H-5'), 6.68 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, Furan-Hc), 5.93 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-8), 5.87 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-6), 5.09 (1H, dd,  $J = 12.6, 2.4$  Hz, H-2), 3.44 (1H, dd,  $J = 16.8, 1.8$  Hz, H-3a), 2.96 (1H, dd,  $J = 16.8, 12.6$  Hz, H-3b)。

## 2.2 抗氧化活性

由图3、4、5可得,合成的13种衍生物对ABTS、FRAP、DPPH三种自由基的清除能力均强于柚皮素。结合三种测试方法,8种衍生物**b、e、g、i、j、k、l、m**的抗氧化活性显著强于柚皮素。并且**g、k**两种衍生物在三种方法下均表现出强的抗氧化活性,与

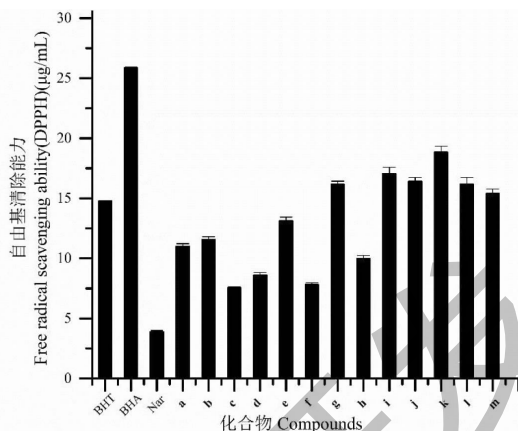


图5 BHT、BHA、柚皮素和13种衍生物对DPPH自由基的清除能力

Fig. 5 The scavenging ability of BHT, BHA, naringenin and 13 kinds of derivatives on DPPH free radical

BHT的抗氧化活性接近。

## 2.3 黄酮类化合物的抗氧化活性构效关系分析

黄酮类化合物的抗氧化活性与黄酮环上的羟基密切相关,柚皮素5位、7位和4'位的酚羟基是其抗氧化活性的活性基团,本文所得的13种衍生物抗氧化活性均强于柚皮素,推测其构效关系如下:(1)合成的衍生物都具有酰脲结构,酰脲结构具有良好的抗氧化活性<sup>[20]</sup>,合成的衍生物抗氧化活性均强于柚皮素;(2)体外抗氧化活性测定显示,**f**的自由基清除能力弱于其余衍生物,推测原因是**f**酰基所连基团为烷基,只有较弱的超共轭效应,其余衍生物酰基所连基团为苯环,具有一定程度的共轭作用。此外,若酰基未直接与苯环相连(如**a、d**),自由基清除能力也相对较弱。推测原因是参与共轭的原子数目有限;(3)苯环连接的给电子基团使得生成的自由基更稳定,因此,当苯环连接给电子基团时,苯环上电子云密度增加,自由基的稳定性增加,因此衍生物**j~m**的抗氧化活性较**c**更强;(4)化合物中酚羟基的个数显著影响其抗氧化活性<sup>[23]</sup>,衍生物**k、l**的抗氧化活性明显强于柚皮素,因**k**含有5个酚羟基,其抗氧化活性强于其他化合物;(5)由图3、4、5的结果显示,衍生物**g**与**b、h、i**等衍生物相比,抗氧化活性相对较好,因其修饰基团的苯环上具有给电子基团氨基,使其抗氧化活性增强;(6)ABTS、FRAP、DPPH三种体外抗氧化活性测定结果都显示**h**与**i**相比,**i**的自由基清除能力较强,因此,对于单取代的溴原子,间位具有较弱的诱导效应,因而较邻位有更强的抗氧化活性。

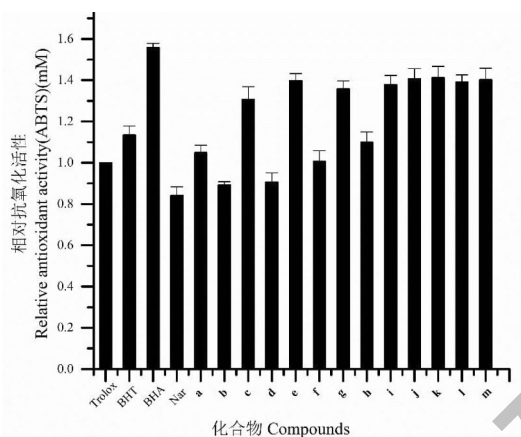


图3 BHT、BHA、柚皮素和13种衍生物对ABTS自由基的清除能力

Fig. 3 The scavenging ability of BHT, BHA, naringenin and 13 kinds of derivatives on ABTS free radical

注:BHT为2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚;BHA为丁基羟基茴香醚;Nar为柚皮素,下同。Note: BHT was butylated hydroxytoluene; BHA was butyl hydroxyanisole; Nar was naringenin, the same below.

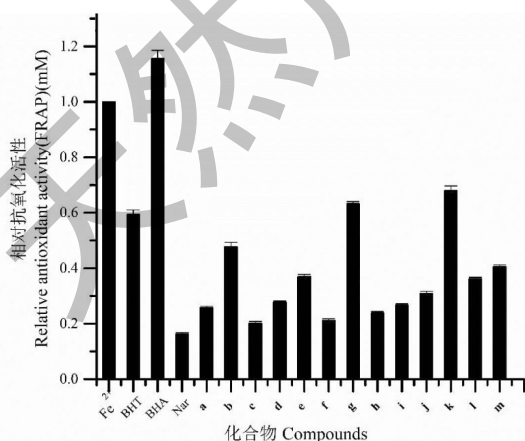


图4 BHT、BHA、柚皮素和13种衍生物对FRAP自由基的清除能力

Fig. 4 The scavenging ability of BHT, BHA, naringenin and 13 kinds of derivatives on FRAP free radical

## 2.4 细胞毒性结果

综上所述,8种衍生物的抗氧化活性显著强于柚皮素,具有很好的研究前景。因此测定了柚皮素

和8种衍生物对于HEK293细胞的细胞毒性。各衍生物在不同浓度下,HEK293细胞存活率如表1所示,各衍生物的 $IC_{50}$ 结果如图2所示。

表1 不同浓度柚皮素和衍生物对于HEK293细胞存活率的影响

Table 1 The effect of different concentrations of derivatives and naringenin on the survival rate of HEK293 cells

浓度 Concentration ( $\mu\text{mol/L}$ )	药后 HEK293 细胞存活率 Survival rate of HEK293 cells after treatment (%)								
	Nar	b	e	g	i	j	k	l	m
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
25	105	106	83	93	93	99	95	109	83
50	101	85	49	90	62	101	92	99	74
100	96	40	33	56	40	93	71	52	58
250	83	3	11	38	20	70	33	30	24
500	52	6	13	14	19	44	29	30	17

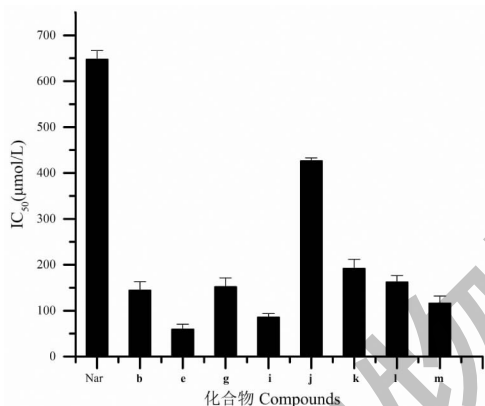


图6 柚皮素和8种衍生物作用HEK293细胞的 $IC_{50}$

Fig. 6  $IC_{50}$  of 8 kinds of derivatives and naringenin on HEK293 cells

检测结果显示,在0~500  $\mu\text{mol/L}$  的范围内,HEK293细胞存活率均随衍生物浓度的增大而减小,具有一定的剂量效应关系。本实验条件下细胞存活率大于90%,可认为衍生物对细胞无抑制<sup>[24]</sup>。由表1可得,除e、m外,其余衍生物在0~25  $\mu\text{mol/L}$  的浓度范围内细胞无抑制作用;g、k、l在0~50  $\mu\text{mol/L}$  浓度范围内,细胞存活率大于90%,可以认为这3种化合物在0~50  $\mu\text{mol/L}$  的范围内对HEK293细胞无抑制作用;j在0~100  $\mu\text{mol/L}$  浓度范围内时,细胞存活率仍大于90%。而柚皮素在0~250  $\mu\text{mol/L}$  的浓度范围内细胞存活率仍在90%以上,比8种衍生物的细胞毒性都要低。图6为柚皮素和8种化合物的 $IC_{50}$ 值,结果显示,衍生物j在相同条件下,对HEK293细胞的毒性较小,并且毒性

与柚皮素最为接近,衍生物g、k、l三种衍生物对HEK293细胞的毒性次之。

## 3 结论

本实验利用微波辅助的方式合成了13种柚皮素酰脲类衍生物,其中有12种未被文献报道。通过ABTS、FRAP、DPPH三种方法测定了13种衍生物的体外抗氧化活性。所得衍生物抗氧化活性均强于柚皮素。且8种衍生物b、e、g、i、j、k、l、m的抗氧化活性效果尤为显著,且g、i、j、k、l、m等衍生物的抗氧化活性与BHT相当,说明柚皮素4位羰基通过反应引入酰脲基团能有效提高母体的抗氧化活性。对衍生物抗氧化活性进行了构效关系分析,显示当R基团为吸电子基团时,衍生物电荷密度分散,反应所得的自由基中间体稳定性增加,导致其抗氧化活性强于柚皮素本身。活性较强的8种衍生物对HEK293细胞存活率的影响结果显示,除e、m外,其余衍生物在0~25  $\mu\text{mol/L}$  的浓度范围内对HEK293表现为无毒。衍生物j对细胞无毒的浓度范围在0~100  $\mu\text{mol/L}$ ,而衍生物g、k的检测结果显示,浓度为0~50  $\mu\text{mol/L}$  的范围内,仍有大量细胞存活。但所得衍生物的细胞毒性均强于柚皮素,可见在引入酰脲基团增加抗氧化活性的同时,还是不同层度的增加了化合物的细胞毒性。这为各衍生物后续研究中的添加剂量提供了参考依据。因此,经过初筛,衍生物g、j、k拥有良好的抗氧化活性,并且细胞毒性较小,其中衍生物j既具有较强的抗氧化活性,又有较低的细胞毒性,具有一定的应用前景。为进一步开发研究提供了依据。对13种衍生物抗氧化活性的构

效关系分析,为以后的合成设计提供了方向。

### 参考文献

- 1 Adamczak A, Ozarowski M, Karpinski TM. Antibacterial activity of some flavonoids and organic acids widely distributed in plants[J]. J Clin Med, 2020, 9(1): 109.
- 2 Zeng Y, Song J, Zhang M, et al. Comparison of *in vitro* and *in vivo* antioxidant activities of six flavonoids with similar structures[J]. Antioxidants, 2020, 9(8): 732.
- 3 Williamson G, Courts F. The occurrence, fate and biological activities of glycosyl flavonoids in the human diet[J]. Crit Rev Food Sci, 2015, 55: 1352-1367.
- 4 Patel K, Singh GK, Patel DK. A review on pharmacological and analytical aspects of naringenin[J]. Chin J Integr Med, 2018, 24: 551-560.
- 5 Zaim O, Doganlar O, Zreigh M, et al. Synthesis, cancer-selective antiproliferative and apoptotic effects of some (+/-)-naringenin cycloaminoethyl derivatives[J]. Chem Biodivers, 2018, 15: e18000167.
- 6 Zaidun NH, Thent ZC, Abd Latiff A. Combating oxidative stress disorders with citrus flavonoid: naringenin[J]. Life Sci, 2018, 208: 111-122.
- 7 Hong Y, Yin Y, Tan Y, et al. The flavanone, naringenin, modifies antioxidant and steroidogenic enzyme activity in a rat model of letrozole-induced polycystic ovary syndrome[J]. Med Sci Monitor, 2019, 25: 395-401.
- 8 Tutunchi H, Naeini F, Ostadrahimi A, et al. Naringenin, a flavanone with antiviral and anti-inflammatory effects: A promising treatment strategy against COVID-19[J]. Phytother Res, 2020, 34: 3137-3147.
- 9 Filippini A, D'Amore A, Palombi F, et al. Could the inhibition of endo-lysosomal two-pore channels (TPCs) by the natural flavonoid naringenin represent an option to fight SARS-CoV-2 infection? [J]. Front Microbiol, 2020, 11: 970.
- 10 Prabu SM, Shagirtha K, Renugadevi J. Naringenin in combination with vitamins C and E potentially protects oxidative stress-mediated hepatic injury in cadmium-intoxicated rats[J]. J Nutr Sci Vitaminol, 2011, 57: 177-185.
- 11 Jain A, Yadav A, Bozhkov AI, et al. Therapeutic efficacy of silymarin and naringenin in reducing arsenic-induced hepatic damage in young rats[J]. Ecoyox Environ Safe, 2011, 74: 607-614.
- 12 Abdelhamid AA, Salah HA, Marzouk AA. Synthesis of imidazole derivatives: Ester and hydrazide compounds with antioxidant activity using ionic liquid as an efficient catalyst[J]. J Heterocyclic Chem, 2019, 57: 676-685.
- 13 Yilmaz AD, Coban T, Suzen S. Synthesis and antioxidant activity evaluations of melatonin-based analogue indole-hydrazide/hydrazone derivatives[J]. J Enzyme Inhib Med Chem, 2012, 27: 428-436.
- 14 Huang SS, Yuan RQ, Diao YP, et al. Antibacterial and antioxidant activities of 2, 4-dihydroxy-N'-(5-chloro-2-hydroxybenzylidene) [J]. Chin J Microecol (中国微生物学杂志), 2015, 27: 256-259.
- 15 Tumosienė I, Kantminienė K, Kleivinskas A, et al. Antioxidant and anticancer activity of novel derivatives of 3-[(4-methoxyphenyl) amino] propanehydrazide [J]. Molecules, 2020, 25(13): 2980.
- 16 Zhang GC, Gao X, Qiao CF, et al. Synthesis and antibacterial activities of two novel holmium(III) and dysprosium(III) complexes with benzoyl hydrazone ligand[J]. J Shaanxi Normal U; Nat Sci (陕西师范大学学报: 自科版), 2020, 48(5): 11-18.
- 17 Huo PY, Liu WY. Study on microwave synthesis and antibacterial activity of naringenin aroylhydrazone compounds[J]. Chem Reagents (化学试剂), 2012, 34: 312-314.
- 18 Lazzarini C, Haranahalli K, McCarthy JB, et al. Preclinical evaluation of acylhydrazone SB-AF-1002 as a novel broad-spectrum antifungal agent[J]. Antimicrob Agents Ch, 2020, 64(9): e00946-20.
- 19 Chen YM, Jiang X, Chen GH, et al. Syntheses, crystal structures, antioxidant activity and quantum chemistry calculation of an acylhydrazone ligand containing thiophene moiety and its Cu(II) complex[J]. Chin J Inorg Chem (无机化学学报), 2015, 31: 2159-2166.
- 20 Du P, Yu YY, Cao SW. Synthesis and characterization of three phloretin acyl hydrazones and their tyrosinase inhibition and antioxidant activity investigation[J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2013, 25: 525-529.
- 21 Liu K, Ding YY, Kang CM. Synthesis and antiproliferative activity of new n-acylhydrazone derivatives containing benzothiazole and indole based moiety[J]. Pharm Chem J, 2020, 54: 345-352.
- 22 Hua QZ, Chen CB, Qin YH. Metabolomic characterization of pitaya fruit from three red-skinned cultivars with different pulp colors[J]. Plant Physiol Bioch, 2018, 126: 117-125.
- 23 Shi QW, Zhao XW, Liu PY. Research progress on the structure-activity relationship of flavonoids[J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2015, 46: 3264-3271.
- 24 Wang JZ, Sun ZF, Liu SZ, et al. Naringenin might inhibit proliferation, migration and differentiation of lung cancer stem cells via the Notch1/Hes1 pathway[J]. Genom Appl Biol (基因组学与应用生物学), 2019, 38: 1448-1453.