

· 药剂与炮制 ·

## 白藜芦醇脂质体对 C6 胶质瘤细胞的抑制作用分析

徐浩伦, 应雪\*, 王亚华, 闫荷露, 李霞, 唐辉, 陈文, 田星  
(石河子大学药学院, 新疆特种植物药资源教育部重点实验室, 新疆石河子 832000)

**[摘要]** **目的:**制备白藜芦醇脂质体并对其体外抗肿瘤作用进行评价。**方法:**通过薄膜分散-硫酸铵梯度法制备白藜芦醇脂质体,使用粒度仪对脂质体进行表征;确定 C6 胶质瘤细胞对数生长期;通过磺酰罗丹明 B 蛋白(SRB)法评价游离白藜芦醇及其脂质体对 C6 胶质瘤细胞的抗增殖作用,利用流式法考察白藜芦醇及其脂质体对 C6 胶质瘤细胞的凋亡作用,以及 C6 胶质瘤细胞对白藜芦醇和其脂质体的摄取作用。**结果:**白藜芦醇脂质体的平均粒径( $139.97 \pm 0.64$ ) nm, Zeta 电位( $-7.00 \pm 0.74$ ) mV;游离白藜芦醇和白藜芦醇脂质体对 C6 胶质瘤细胞的抑制率最高分别可达( $73.30 \pm 0.56$ )%和( $91.70 \pm 0.60$ )%,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );游离白藜芦醇和白藜芦醇脂质体对 C6 胶质瘤细胞的诱导凋亡率分别为( $20.03 \pm 0.85$ )%和( $27.18 \pm 0.96$ )%,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );C6 胶质瘤细胞对游离白藜芦醇和白藜芦醇脂质体的摄取率分别为( $67.79 \pm 1.19$ )%和( $77.61 \pm 1.67$ )%。**结论:**相比于游离的白藜芦醇,白藜芦醇脂质体对 C6 胶质瘤细胞的抗增殖作用更明显,具有更强的诱导 C6 胶质瘤细胞凋亡作用。白藜芦醇脂质体可以更多地被 C6 胶质瘤细胞摄取,这在一定程度上促进了其对 C6 胶质瘤细胞的抗增殖作用和诱导凋亡能力。说明白藜芦醇脂质体具有较强的体外抗 C6 胶质瘤作用。

**[关键词]** 白藜芦醇; 脂质体; 磺酰罗丹明 B 蛋白; 摄取; 凋亡; 抗肿瘤; C6 胶质瘤细胞

**[中图分类号]** R283.6;R945;R284.1;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)18-0001-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017180001

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170626.1622.006.html>

**[网络出版时间]** 2017-06-26 16:22

## Research for Inhibitory Effect of Resveratrol Liposomes on C6 Glioma Cells

XU Hao-lun, YING Xue\*, WANG Ya-hua, YAN He-lu, LI Xia, TANG Hui, CHEN Wen, TIAN Xing  
(Key Laboratory of Xinjiang Endemic Phytomedicine Resources, Ministry of Education, School of Pharmacy,  
Shihezi University, Shihezi 832000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To prepare resveratrol liposomes and evaluate its anti-tumor effect *in vitro*. **Method:** The resveratrol liposomes were prepared by film dispersion-ammonium sulfate gradient method and the free resveratrol was filtered by sephadex G-50 column afterwards. Moreover, the particle size and Zeta potential of liposomes were characterized by laser particle size analyzer. C6 glioma cells were cultured for 4 days and their logarithmic growth phase was decided by cell growth curve. These cells were tested in several experiments *in vitro* as below. The antiproliferative effect of free resveratrol on C6 glioma cells were evaluated by sulforhodamine B (SRB) method, while the antiproliferative effect of resveratrol liposomes on C6 glioma cells were tested by the same way. Furthermore, the apoptosis effect on C6 glioma cells treated by free resveratrol were tested by flow cytometry method. Also, the apoptosis effect on C6 glioma cells treated by resveratrol liposomes were observed by the same way. The uptake effect of resveratrol and resveratrol liposomes on C6 glioma cells were all determined by

**[收稿日期]** 20170329(019)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81160396,81460540);新疆生产建设兵团社会发展科技攻关与成果转化计划项目(2015AD007)

**[第一作者]** 徐浩伦,在读硕士,从事药物新剂型研究,Tel:18299092540,E-mail:1597371156@qq.com

**[通讯作者]** \*应雪,博士,副教授,从事药物新剂型研究,Tel:13579455890,E-mail:yingxueshu@163.com

this method. **Result:** The particle size of blank liposomes and resveratrol liposomes were separately ( $144.57 \pm 0.93$ ) nm and ( $139.97 \pm 0.64$ ) nm, while their Zeta potentials were respectively ( $-6.70 \pm 0.93$ ) mV and ( $-7.00 \pm 0.74$ ) mV. The logarithmic growth phase of C6 glioma cells was between 36 h to 48 h. The SRB method showed that the inhibitory effect on C6 glioma cells treated by resveratrol liposomes was ( $91.70 \pm 0.60$ )%, which was significantly higher than ( $73.30 \pm 0.56$ )% of free resveratrol ( $P < 0.05$ ). The apoptosis effect on C6 glioma cells induced by resveratrol liposomes was ( $27.18 \pm 0.96$ )%, which was obviously higher than ( $20.03 \pm 0.85$ )% of free resveratrol ( $P < 0.05$ ). The uptake effect of resveratrol liposomes was ( $77.61 \pm 1.67$ )%, which was also significantly higher than ( $67.79 \pm 1.19$ )% of free resveratrol ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Compared with free resveratrol, resveratrol liposomes has a more significant antiproliferative effect against C6 glioma cells, and has a stronger apoptosis effect on C6 glioma cells. The number of resveratrol liposomes that uptake is obviously more than that of free resveratrol. It is concluded that the resveratrol liposomes built in this study shows strongest anti-tumor effect on C6 glioma cells *in vitro* by comparing with other controlled groups.

[**Key words**] resveratrol; liposomes; sulforhodamine B protein; uptake; apoptosis; anti-tumor; C6 glioma cells

脑胶质瘤是一种致死性较高的原发性脑肿瘤,患者在 5 年内的生存率  $< 10\%$  [1]。其可以快速地浸润到正常脑组织并破坏其结构,为临床治疗带来困难。传统的脑胶质瘤化疗药物对肿瘤具有良好的抑制作用 [2-3],但其副作用也愈来愈引起人们的关注,如神经毒性、骨髓抑制、免疫抑制等。因此研究合适的脑胶质瘤靶向给药系统,以提高脑胶质瘤内药物浓度和降低毒副作用,具有十分重要的意义。

白藜芦醇 (resveratrol, RES) 是一种多酚类物质,主要来源于葡萄籽、虎杖等 [4]。近年来,GUAN 等 [5] 研究证明 RES 可抑制 C6 胶质瘤细胞的生长。脂质体作为一种纳米级的有机药物载体,即可包载脂溶性药物,也可包载水溶性药物 [6],其目前已被用作临床化疗药物载体,而且可作为大多数疾病、特定肿瘤的治疗和诊断工具 [7]。此外,由于脂质体对被包封药物的保护及缓释作用 [8],可在一定程度延长药物在体内的滞留时间,从而延长了药物的作用时间,并且可以减少一定的系统副作用。综合考虑,本实验将以脂质体的靶向性、载药性和缓释性等特性为基础,通过体外药效试验来验证 RES 脂质体的抗肿瘤作用。

## 1 材料

LC-15C 型高效液相色谱仪 (日本岛津公司), Luna C<sub>18</sub> 色谱柱 (美国菲罗门公司, 4.6 mm × 250 mm, 5 μm), BP211D 型电子天平和 16214 型脂质体挤压器 (德国赛多利斯集团), EYELA-1000S 型旋转蒸发器 (日本东京理化器械株式会社),

VCX130 型超声细胞超声破碎仪 (美国 Sonics 公司), Zetasizer Nano S90 型粒度仪 (英国马尔文仪器有限公司), 3111 型 CO<sub>2</sub> 恒温培养箱 (美国 Thermo 公司), Sunrise A-5082 型酶标免疫测定仪 (瑞士 Tecan 公司), IX71-A12FL/PH 型倒置显微镜 (日本 Olympus 公司), FACSAria III 型流式细胞仪 (美国 BD 公司)。

聚碳酸酯膜 (德国 Merck Millipore 集团), 透析袋 (截留相对分子质量 12 ~ 14 kDa, 上海宝曼生物科技有限公司), 大鼠 C6 胶质瘤细胞 (中国科学院上海细胞库), 白藜芦醇 (南京天尊泽众化工有限公司, 批号 20150110, 纯度  $> 98\%$ ), 蛋黄卵磷脂 (德国 Lipoid 公司, 批号 510800-2140088, 纯度  $> 98\%$ ), 胆固醇 (北京双旋微生物培养基制品厂, 批号 20110510), 葡聚糖凝胶 G-50 (sephadex G-50, 北京拜尔迪生物技术有限公司, 批号 17-0043-02), DMEM 高糖培养基和 0.25% 胰酶 (美国 Gibco 公司, 批号分别为 8116375 和 1737903), 胎牛血清 (杭州四季青生物公司, 批号 20160324), 二甲基亚砜和磺酰罗丹明 B 蛋白 (SRB) (美国 Sigma 公司, 批号分别为 200-664-3 和 1001271699), Annexin V-APC/7-氨基放线菌素 D (7-AAD) 双染细胞凋亡检测试剂盒 (南京凯基生物科技发展有限公司, 批号 KGA1019), 甲醇、乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 空白脂质体的制备** 称取处方量的膜材 (蛋黄卵磷脂与胆固醇的质量比 105:45), 与甲醇 20 mL

一同充分溶解在茄形瓶中,在 35 ℃ 且真空条件下于悬液旋转蒸发仪上缓慢旋转成膜,加入 250 mmol·L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液 10 mL,超声水化,完全水化后移入血清瓶,利用细胞超声破碎仪将悬液超声 5 min,分别使用 0.4,0.2 μm 的聚碳脂膜将悬液各过滤 3 次,将过滤后的液体装入透析袋中,于 100 mL 的磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4) 中每 8 h 透析 1 次,共 3 次,得空白脂质体。

**2.2 白藜芦醇脂质体的制备** 按 2.1 项下空白脂质体的制备步骤,在加入与空白脂质体等量的膜材

表 1 脂质体的表征 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Characterization of liposomes ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

脂质体	粒径/nm	多分散系数	Zeta 电位/mV	包封率/%	载药量/%
空白	144.57 ± 0.93	0.247 ± 0.007	-6.70 ± 0.93	-	-
白藜芦醇	139.97 ± 0.64	0.250 ± 0.016	-7.00 ± 0.74	60.66 ± 0.65	1.01 ± 0.01

采用 HPLC 检测白藜芦醇脂质体中白藜芦醇的含量,以 C<sub>18</sub> 色谱柱为固定相,流动相甲醇-乙腈-0.4% 磷酸水溶液 (16:21:63),流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 306 nm。在检测前,需先用甲醇将 RES-L 破乳,进样量 20 μL。分别按包封率 = (W<sub>透析</sub>/W<sub>总1</sub>) × 100% 和载药量 = (W<sub>透析</sub>/W<sub>总2</sub>) × 100% 计算白藜芦醇脂质体中白藜芦醇的包封率、载药量,式中 W<sub>透析</sub> 代表经 PBS 透析后,RES-L 中白藜芦醇的质量;W<sub>总1</sub> 代表最初 RES-L 悬液中白藜芦醇的总量;W<sub>总2</sub> 为总物料的质量,即白藜芦醇和脂质体制备物料的总投入量。见表 1。

**2.4 大鼠 C6 胶质瘤细胞的培养** 于 C6 胶质瘤细胞培养液 (含 10% 胎牛血清,DMEM 高糖培养基,100 U·mL<sup>-1</sup> 青霉素和 100 mg·L<sup>-1</sup> 链霉素) 中培养细胞,在 37 ℃,5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的条件下于培养箱中孵育。C6 胶质瘤细胞生长形态见图 1。结果显示 C6 胶质瘤细胞传代后细胞的生长状态为贴壁生长,呈梭形且排列紧密。

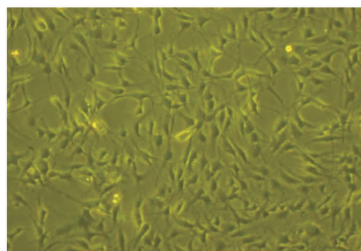


图 1 C6 胶质瘤细胞在显微镜下的形态 (×200)  
Fig. 1 Micro-morphology of C6 glioma cells (×200)

**2.5 大鼠 C6 胶质瘤细胞生长曲线的测定** 取生

时,按 1:30 的药脂比加入白藜芦醇,共同溶解在甲醇中,后续过程与空白脂质体的制备方法相同,使用 sephadex G-50 柱分离未包载到脂质体中的白藜芦醇,得白藜芦醇脂质体 (RES-L)。

**2.3 脂质体的表征** 取新制备的空白脂质体及 RES-L 各 1 mL,各稀释 10 倍,测定 2 种混悬液的粒径,Zeta 电位及多分散系数,见表 1。结果发现与空白脂质体相比,RES-L 的粒径有所减小;由多分散系数可推断出 2 种脂质体均分散均匀。RES-L 的 Zeta 电位低于空白脂质体,说明 RES-L 的稳定性要更强。

长状态良好的 C6 胶质瘤细胞,采用细胞计数法绘制其生长曲线,按细胞数 = (四大格细胞个数之和/4) × 10<sup>4</sup> 个/mL 计算。将 C6 胶质瘤细胞以每孔 2 × 10<sup>4</sup> 个接种于 24 孔板中,每 12 h 计数 1 次,每次取 3 个复孔求平均值,连续计数 4 d。以细胞数的对数值为纵坐标,时间为横坐标,绘制生长曲线,见图 2。结果显示 C6 胶质瘤细胞于 36 ~ 48 h 处于对数生长期。

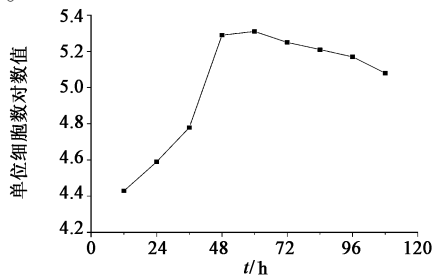
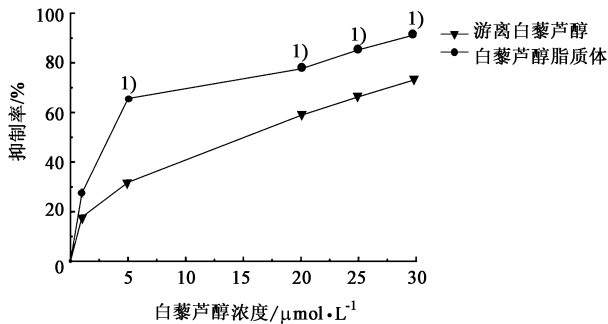


图 2 C6 胶质瘤细胞的生长曲线  
Fig. 2 Growth curve of C6 glioma cells

**2.6 白藜芦醇脂质体对 C6 胶质瘤细胞的抑制作用检测** 取对数生长期 C6 胶质瘤细胞以每孔 5 × 10<sup>3</sup> 个接种于 96 孔板中,接种体积 190 μL,移入培养箱中,于 37 ℃,5% CO<sub>2</sub> 和相对湿度 95% 的条件下孵育 24 h。向各培养孔中分别加入预先配制好的药液 10 μL,每种药液设 4 个复孔,再设溶剂对照组 4 个复孔。各药液分别为用 DMEM 配制的系列质量浓度的游离 RES 和 RES-L,使细胞培养孔中 RES 的最终浓度梯度为 1,5,20,25,30 μmol·L<sup>-1</sup>。将加好各药液的细胞培养板置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养。各药液作用 48 h 后,吸弃培养液,每孔加入

10% 三氯乙酸 100  $\mu\text{L}$ , 5 min 后于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中固定细胞, 放置 1 h 后取出 96 孔板, 用水洗涤各培养孔, 于室温干燥。每孔加入 0.4% SRB 染液(用 1% 乙酸配制)100  $\mu\text{L}$ , 室温下放置 15 min 以染色, 弃去各孔内液体, 用 1% 乙酸洗涤 5 遍, 以去除未结合的染料, 室温下晾干。加入 10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris 碱 (pH 10.5)100  $\mu\text{L}$ , 在水平振荡器上振荡 20 min, 置酶标仪中于 540 nm 处测定每孔吸光度  $A$ 。经给药培养后, 各药液对 C6 胶质瘤细胞抑制率 (inhibition rate, IR) 按  $\text{IR} = [(A_x - A_0)/A_0] \times 100\%$  计算。式中  $A_0$  为各药液作用前的细胞经过固定、染色后测得平均  $A$ ;  $A_x$  为各药液作用终点时细胞经过固定、染色后测得平均  $A$ 。以梯度浓度的 RES 为横坐标, 其对 C6 胶质瘤细胞的抑制作用为纵坐标, 绘制抑制率曲线, 见图 3。结果发现 RES 浓度与细胞的抑制率呈正相关, 游离 RES 和 RES-L 的抑制率最高值分别可达 (73.30  $\pm$  0.56)% 和 (91.70  $\pm$  0.60)%, 二者差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 说明 RES-L 对 C6 胶质瘤细胞的抗增殖作用大大提高, 明显高于游离 RES。



与游离 RES 比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$

图 3 白藜芦醇脂质体及游离白藜芦醇对 C6 胶质瘤细胞的抗增殖作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 2$ )

Fig. 3 Antiproliferative effect of free resveratrol and resveratrol liposomes on C6 glioma cells ( $\bar{x} \pm s, n = 2$ )

**2.7 白藜芦醇脂质体对 C6 胶质瘤细胞的凋亡作用检测** 取对数生长期的 C6 胶质瘤细胞, 以每孔  $2 \times 10^5$  个的细胞密度接种在 6 孔板中, 于 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  和相对湿度 95% 的培养箱中培养 24 h 后, 对接种的细胞给药, 1 组为无血清培养基, 2 组为游离 RES, 3 组为 RES-L, 每组设 3 个复孔, 给药时 RES 的终浓度为 2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。置培养箱中继续培养 48 h 后, 用冷 PBS 漂洗 3 遍, 用不含乙二胺四乙酸 (EDTA) 的胰酶消化, 离心 (1 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ ) 5 min。经 PBS 洗涤后, 用回流的 PBS 300  $\mu\text{L}$  吹匀细胞。依次加入 binding 缓冲液 500  $\mu\text{L}$ , Annexin V-APC 5  $\mu\text{L}$  和 7-AAD 5  $\mu\text{L}$ , 于室温下避光反应 10 min, 经流式

细胞仪检测。检测 Annexin V-APC 的最大激发波长和最大发射波长分别为 633, 660 nm, 7-AAD 的最大激发波长和最大发射波长分别为 546, 647 nm。

结果发现在药物浓度和细胞孵育时间相同的条件下, RES-L 组的诱导凋亡率大于游离 RES 组, 细胞凋亡率分别为 (27.18  $\pm$  0.96)% 和 (20.03  $\pm$  0.85)%。经分析可得, RES-L 对 C6 脑胶质瘤细胞的诱导凋亡率与游离 RES 相比有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 提示 RES-L 较游离 RES 具有更强的诱导 C6 脑胶质瘤细胞凋亡的作用。

**2.8 C6 胶质瘤细胞对白藜芦醇及其脂质体的摄取能力检测** 取对数生长期 C6 胶质瘤细胞, 以每孔  $1 \times 10^5$  个细胞密度接种于 12 孔板, 于细胞培养箱中培养, 24 h 后对细胞给药。细胞分为 3 组, 1 组为无血清培养基, 2 组为游离 RES, 3 组为 RES-L, 每组设 3 个复孔, 给药时 RES 的终浓度为 2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。给药后继续培养 4 h, 经处理得到离心后的细胞, 用预冷的 PBS 洗涤 2 遍, 用回流的 PBS 300  $\mu\text{L}$  吹匀离心后的细胞, 采用流式细胞仪进行检测。结果 C6 胶质瘤细胞对游离 RES 和 RES-L 的摄取率分别为 (67.79  $\pm$  1.19)% 和 (77.61  $\pm$  1.67)%, 二者之间存在显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 说明 C6 脑胶质瘤细胞对 RES-L 的摄取能力明显强于游离 RES。

**2.9 统计学分析** 采用 SPSS 17.0 统计软件分析, 多均数比较使用单因素方差分析, 两组间比较采用独立样本  $t$  检验,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

### 3 讨论

近年来, 白藜芦醇被广泛用于肿瘤的治疗。但该成分脂溶性较强, 并且在肝脏中会参与谷胱甘肽的代谢<sup>[9]</sup>。这样一来, 当白藜芦醇被用于脑肿瘤的治疗时, 将无法充分地抵达病灶区, 难以达到预期的治疗效果。其次, 考虑到血脑屏障的存在, 本实验选择以脂质体作为药物载体设计给药系统。本实验使用薄膜分散-硫酸铵梯度法制备了 RES-L, 通过检测粒径、包封率和 Zeta 电位等指标对脂质体进行了表征, 并通过 SRB 实验、凋亡实验和摄取实验验证了 RES-L 的体外抗肿瘤作用。表征结果说明制备的 RES-L 粒径均一、稳定性强且分散均匀。在 SRB 实验中, RES-L 比游离 RES 具有更好的抗肿瘤增殖作用, 说明 RES-L 能一定程度的提高白藜芦醇的体外抗肿瘤效果。此外, 凋亡实验的结果表明与游离 RES 相比, RES-L 可更好地诱导 C6 胶质瘤细胞凋亡。在摄取实验中, RES-L 能被 C6 胶质瘤细胞更多地摄取。证实了本实验制备给药系统的方法可靠,

并且可以增强白藜芦醇的体外抗肿瘤作用。

相较于前人的工作,本研究有以下几点不同。在脂质体表征试验中,RES-L 的粒径要小于空白脂质体的,而许汉林等<sup>[10]</sup>和 Vijayakumar 等<sup>[11]</sup>的实验结果表明载药后的脂质体的粒径要大于空白脂质体。推测具体原因可能和药物的本身性质有关,白藜芦醇是一种脂溶性药物,其与磷脂膜之间的相互作用可能会一定程度的增强,导致粒径减小<sup>[12]</sup>。但相较于 Vijayakumar 等<sup>[11]</sup>的实验,本文制备的 RES-L 的 Zeta 电位更低,说明更加稳定。另一方面,目前文献<sup>[13]</sup>指出 RES-L 有助于提高 C6 胶质瘤细胞对游离 RES 的摄取作用,但未有文献明确提供 C6 胶质瘤细胞对 RES-L 的摄取率数据,说明本文的摄取实验结果具有一定的参考意义。

本实验中也存在一些不足之处。在 SRB 实验中 48 h 时白藜芦醇对 C6 胶质瘤细胞的半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ )  $14.80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,而同等条件下,Zamin 等<sup>[14]</sup>的实验证实白藜芦醇对 C6 胶质瘤细胞的  $IC_{50} = 36 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,造成这一差异的原因可能与本实验的环境有关。但是仅针对于本实验中游离 RES 来说,RES-L 的  $IC_{50}$  要更低 ( $3.15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),说明药物经脂质体包载后抗肿瘤效果有所提升。另外,从凋亡实验中的数据可知,RES-L 组对 C6 胶质瘤细胞的凋亡作用要强于游离 RES 组,但根据凋亡实验结果图中荧光部分的分布来看,游离 RES 组和 RES-L 组的 Q3 和 Q4 区域都有细胞分散,并不集中,与理想的图有一定差距,这可能与设备长时间使用后准确度降低有关,另外,细胞密度低也与制备过程中细胞的损失有关,可以适当增加离心时间并吸弃上清液<sup>[15-16]</sup>。

在后续实验中,为了进一步使脂质体在稳定性增强的同时降低其被体内吞噬细胞、内皮网状系统等识别,将会在脂质体表面修饰聚乙二醇链<sup>[17]</sup>。另外,就抗增殖实验来说,有文献报道白藜芦醇抑制肿瘤增殖的原因是导致肿瘤细胞周期被阻滞在  $G_0/G_1$  期,使 DNA 和蛋白质的合成受到抑制,细胞分裂停滞<sup>[18]</sup>。也有文献报道白藜芦醇可将肿瘤细胞阻滞在 S 期,主要通过抑制 DNA 的合成来诱导细胞凋亡<sup>[19]</sup>。据此,在初步验证了 RES-L 抗肿瘤作用的基础上,后期将进一步研究白藜芦醇对肿瘤细胞不同分裂周期的阻滞作用,从而更准确地了解白藜芦醇的抗肿瘤增殖作用。考虑到白藜芦醇诱导胶质瘤细胞凋亡机制可能与抑制 C6 胶质瘤细胞的核因子有关<sup>[20]</sup>,也可能与 C6 胶质瘤细胞内 NO 的释放减少

有关<sup>[21]</sup>,或者与活性氧碎片 (ROS) 的生成增多<sup>[22]</sup>有关,所以在本实验验证了 RES-L 诱导 C6 胶质瘤细胞凋亡效果的基础上,有望再增设实验对药物诱导肿瘤凋亡的原理进行深入研究。对于摄取实验,有文献报道呈负电性的纳米粒相较于正电性的纳米粒在体内的循环时间更久也更稳定<sup>[23]</sup>。所以后期实验中将 RES-L 表面修饰上一些靶头,如氨基酸、蛋白、单抗等,利用其与肿瘤细胞表面受体的特异性结合,让脂质体在保障稳定性的同时,具有一定的靶向能力,从而进一步提升载药脂质体的治疗效果。基于上述实验,在后续实验中将会在更多的肿瘤细胞系上考察白藜芦醇及其靶向脂质体给药系统的抗肿瘤作用,从而更全面地研究并阐述其抗肿瘤机制。

#### [参考文献]

- [1] 蒋新国. 靶向递药系统的研究进展[J]. 复旦学报: 医学版, 2012, 39(5): 441-448.
- [2] BAI R Y, Staedtke V, Riggins G J. Molecular targeting of glioblastoma: drug discovery and therapies [J]. Trends Mol Med, 2011, 17(6): 301-312.
- [3] Nwachukwu J C, Srinivasan S, Bruno N E, et al. Resveratrol modulates the inflammatory response via an estrogen receptor-signal integration network [J]. Elife, 2014, doi: 10.7554/eLife.02057.
- [4] 邢宝恒, 曹亚磊, 董秀娟, 等. 白藜芦醇对妊娠期糖尿病大鼠胰岛细胞氧化应激损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(16): 149-154.
- [5] GUAN R, MA J, WU Y, et al. Development and characterization of lactoferrin nanoliposome: cellular uptake and stability [J]. Nanoscale Res Lett, 2012, 7(1): 679.
- [6] SHU X H, HONG L, ZHENG S, et al. Identification of metabolic pattern and bioactive form of Resveratrol in human medulloblastoma cells [J]. Biochem Pharmacol, 2010, 79(10): 1516-1525.
- [7] TANG F Y, Chiang E P, SUN Y C. Resveratrol inhibits heregulin-beta1-mediated matrix metalloproteinase-9 expression and cell invasion in human brain cancer cells [J]. J Nutr Biochem, 2008, 19(5): 287-294.
- [8] 王莉, 张三奇, 顾宜. 具有肝脏靶向性的白藜芦醇脂质体[J]. 解放军药理学学报, 2006, 22(4): 241-244.
- [9] ZHANG W, XUE J, GE M, et al. Resveratrol attenuates hepatotoxicity of rats exposed to arsenic trioxide [J]. Food Chem Toxicol, 2012, doi: 10.1016/j.fct.2012.09.023.
- [10] 许汉林, 张念, 刘浩, 等. 白藜芦醇脂质体的制备工艺研究[J]. 湖北中医杂志, 2009, 31(2): 55-56.

- [11] Vijayakumar M R, Vajanthri K Y, Balavigneswaran C K, et al. Pharmacokinetics, biodistribution, *in vitro* cytotoxicity and biocompatibility of Vitamin E TPGS coated trans resveratrol liposomes [J]. *Colloid Surf B Biointerfaces*, 2016, doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.05.037.
- [12] Bozzuto G, Molinari A. Liposomes as nanomedical devices[J]. *Int J Nanomedicine*, 2015, 10:975-999.
- [13] WANG S, SU R, NIE S, et al. Application of nanotechnology in improving bioavailability and bioactivity of diet-derived phytochemicals [J]. *J Nutr Biochem*, 2014, 25(4):363-376.
- [14] Zamin L L, Filippi-Chiela E C, Dillenburg-Pilla P, et al. Resveratrol and quercetin cooperate to induce senescence-like growth arrest in C6 rat glioma cells[J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(9):1655-1662.
- [15] 任改艳, 孙阿宁, 张晶晶, 等. NF- $\kappa$ B 在细胞凋亡中调节作用的研究进展[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2015, 29(2):323-327.
- [16] FAN C, ZHENG W, FU X, et al. Enhancement of auranofin-induced lung cancer cell apoptosis by selenocystine, a natural inhibitor of TrxR1 *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cell Death Dis*, 2014, doi: 10.1038/cddis.2014.132.
- [17] Moosavian S A, Abnous K, Badiie A, et al. Improvement in the drug delivery and anti-tumor efficacy of PEGylated liposomal doxorubicin by targeting RNA aptamers in mice bearing breast tumor model [J]. *Colloid Surf B Biointerfaces*, 2016, doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.12.009.
- [18] YUAN L, ZHANG Y, XIA J, et al. Resveratrol induces cell cycle arrest *via* a p53-independent pathway in A549 cells[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(4):2459-2464.
- [19] Hahnvajjanawong C, Ketnimit S, Boonyanugomol W, et al. Inhibition of cell cycle progression and apoptotic activity of resveratrol in human intrahepatic cholangiocarcinoma cell lines[J]. *Asian Biomed*, 2011, 5(6):775-785.
- [20] XU J, LIU D, NIU H, et al. Resveratrol reverses Doxorubicin resistance by inhibiting epithelial-mesenchymal transition (EMT) through modulating PTEN/Akt signaling pathway in gastric cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36(1):19-32.
- [21] Bigdeli A, Palchetti S, Pozzi D, et al. Exploring cellular interactions of liposomes using protein corona fingerprints and physicochemical properties [J]. *ACS Nano*, 2016, 10(3):3723-3737.
- [22] 杜琴, 沈克平, 胡兵, 等. 白藜芦醇对 Hepa1-6 肝癌细胞凋亡和 ROS 的影响[J]. *中药材*, 2012, 35(3):443-446.
- [23] Çağdaş M, Sezer A D, Bucak S. *Liposomes as potential drug carrier systems for drug delivery* [M]. Rijeka: InTech Open Access Publisher, 2014:1-50.

[责任编辑 刘德文]