

- [20] Han J H, Lee Y S, Im J H, *et al.* Astaxanthin ameliorates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation, oxidative stress and memory dysfunction through inactivation of the signal transducer and activator of transcription 3 pathway[J]. *Mar Drugs*, 2019, 17(2): 123.
- [21] Chung B Y, Park S H, Yun S Y, *et al.* Astaxanthin protects ultraviolet B-induced oxidative stress and apoptosis in human keratinocytes via intrinsic apoptotic pathway[J]. *Ann Dermatol*, 2022, 34(2): 125-131.
- [22] Huang Y W, Wang L T, Zhang M, *et al.* Caffeine can alleviate non-alcoholic fatty liver disease by augmenting LDLR expression via targeting EGFR[J]. *Food Funct*, 2023, 14(7): 3269-3278.
- [23] Zeng C, Zhu X, Li H, *et al.* The role of interferon regulatory factors in liver diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(13): 6874.

基于 UPLC-MS/MS 测定重楼皂苷 VII 逆转肝癌耐药过程中胆固醇及其关键产物的含量

李杰, 路璐, 刘焱利, 丁越, 张彤*
(上海中医药大学, 上海 201203)

摘要: 目的 建立 UPLC-MS/MS 法测定重楼皂苷 VII 逆转肝癌耐药过程中胆固醇及其 4 种合成代谢关键化合物(羊毛甾醇、链甾醇、7-脱氢胆固醇、27-羟基胆固醇)的含量。方法 分析采用 Zorbax Eclipse plus C₁₈ (2.1 mm×50 mm, 1.8 μm) 色谱柱; 流动相水(含 0.1% 甲酸)-甲醇, 梯度洗脱; 体积流量 0.5 mL/min; 柱温 40 °C; 大气压化学电离; 正离子扫描; 多反应监测模式。结果 5 种成分在各自范围内线性关系良好 ($r^2 \geq 0.992$), 提取回收率为 81.9%~97.1%, 基质效应为 79.9%~101.6%, 日内、日间精密度以及稳定性均符合生物样品分析的要求。重楼皂苷 VII 可逆转 HepG2 细胞的索拉非尼耐药, 降低耐药细胞中胆固醇含量, 升高 27-羟基胆固醇含量。结论 该方法简便、准确、灵敏, 可用于肿瘤耐药与胆固醇合成代谢相关性研究, 为中药成分靶向胆固醇代谢调控逆转肿瘤耐药提供技术支撑。

关键词: 重楼皂苷 VII; 肝癌; 耐药性; 胆固醇; LC-MS/MS

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2025)09-3139-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.09.049

胆固醇是细胞膜磷脂双分子层的重要成分, 维持膜的完整性和流动性^[1-3]。细胞内胆固醇代谢稳态由其合成、摄取、外排、氧化和酯化过程共同调节^[4-5]。胆固醇内源性合成途径通过甲羟戊酸途径将乙酰辅酶 A 转化为羊毛甾醇, 再经过一些中间产物合成 7-脱氢胆固醇和链甾醇, 再分别经 7-脱氢胆固醇还原酶 (DHCR7) 和 24-脱氢胆固醇还原酶 (DHCR24) 催化合成胆固醇。胆固醇可代谢为 27-羟基胆固醇, 再转化为胆汁酸进行代谢^[6]。

肿瘤细胞往往需大量胆固醇满足其快速生长需求, 通常表现为胆固醇代谢失调^[7-8], 具体为合成水平上调及代谢产物异常堆积^[9-11], 随之细胞膜胆固醇水平升高, 通过脂筏介导的膜蛋白(如 ABCB1、EGFR)进一步高表达从而引起耐药^[12]。研究表明, DHCR24 可促进黑色素瘤对维莫

非尼的耐药, 其机制与 27-羟基胆固醇积累及 AKT 通路激活有关^[13]。DHCR24 作为胆固醇合成途径的关键酶, 研究其作用相关的底物和产物水平可为肿瘤耐药研究提供重要依据。

重楼作为清热解毒药, 其主要成分重楼皂苷对肿瘤耐药和胆固醇代谢具有一定影响^[14]。重楼皂苷 VII 可通过阻滞细胞周期、诱导凋亡和自噬, 抑制肿瘤血管生成和转移^[15-16]。重楼皂苷 I 可破坏脂筏结构, 抑制膜上耐药相关蛋白合成, 从而逆转耐药^[17]。胆固醇及代谢物的常用检测方法有 GC-MS、LC-MS/MS 等^[18-22], 但其分析时间长、前处理复杂。因此, 本研究建立 UPLC-APCI-MS/MS 方法, 可同时检测细胞内胆固醇及其关键代谢产物(羊毛甾醇、链甾醇、7-脱氢胆固醇、27-羟基胆固醇), 具有样品前处

收稿日期: 2025-01-20

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82374002); 上海市学术带头人项目(22XD1423000); 上海市“科技创新行动计划”生物医药创新发展项目(20S21902500); 上海市自然科学基金(21ZR1460800); 上海中医药大学科技发展项目(24KFL026)

作者简介: 李杰(2001—), 男, 硕士生, 研究方向为中药学。Tel: 15212762986, E-mail: 2798061045@qq.com

* **通信作者:** 张彤(1972—), 男, 博士生导师, 从事中药制药及中药分析技术研究。Tel: (021) 51322318, E-mail: zhangtdmj@hotmail.com

理简单、检测灵敏度高的特点，以期对肿瘤耐药与胆固醇代谢相关研究及中药靶向胆固醇代谢逆转耐药研究提供技术支持。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1290 UPLC-6470A 三重四级杆质谱超高效液相色谱联用仪（美国 Agilent 公司）；BSA124S 电子分析天平（北京赛多利斯仪器系统有限公司）；XS105 电子分析天平（瑞士梅特勒托利多公司）；SCIENTZ-24TD 超声波细胞粉碎机（宁波新芝生物科技股份有限公司）；VORTEX GENIUS3 涡旋仪（德国 IKA 公司）；Thermo 75002440 离心机（美国 Thermo 公司）；MD200-2 干式氮吹仪（上海沪析实业有限公司）。

1.2 试剂 胆固醇、7-脱氢胆固醇、27-羟基胆固醇、22R-羟基胆固醇、链甾醇、羊毛甾醇对照品（纯度 $\geq 99\%$ ，美国 Sigma-Aldrich 公司）；重楼皂苷 VII 对照品（纯度 98%，上海诗丹德标准技术服务有限公司）；索拉菲尼（SR，纯度 $>99\%$ ，大连美仑生物技术有限公司）。磷酸盐缓冲液（PBS，上海欲立生物科技有限公司）；BCA 蛋白定量试剂盒（上海碧云天生物技术有限公司）；MEM 培养基、胎牛血清（FBS）、青霉素及链霉素（美国 Gibco 公司）。甲酸

[色谱纯，梯希爱（上海）化成工业发展有限公司]；甲醇、乙腈（色谱纯，美国赛默飞世尔科技公司）；甲醇、乙腈、无水乙醇、异丙醇、氯仿、正己烷（分析纯，国药集团化学试剂有限公司）；水为蒸馏水（香港屈臣氏公司）。

1.3 细胞 人肝癌细胞 HepG2 购自中国科学院细胞库，HepG2 索拉菲尼耐药细胞（HepG2/SR）是由 HepG2 细胞通过每周逐步增加索拉菲尼浓度（孵育浓度为 0.5、1、1.5、2、3、5、7、9 $\mu\text{mol/L}$ ）进行诱导，直至耐药细胞的索拉菲尼 IC_{50} 为亲本细胞的 5 倍以上。

2 方法与结果

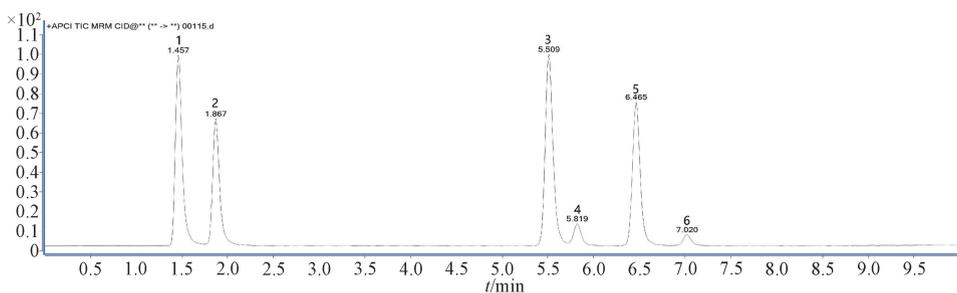
2.1 检测条件

2.1.1 色谱 Zorbax Eclipse plus C_{18} 色谱柱（2.1 mm \times 50 mm，1.8 μm ）；流动相水（含 0.1% 甲酸）（A）-甲醇（B），梯度洗脱（0~10 min，85%~100% B）；体积流量 0.5 mL/min；柱温 40 $^{\circ}\text{C}$ ；进样量 5 μL 。

2.1.2 质谱 APCI 离子源；以 22ROHC 为内标；正离子扫描；氮气温度 350 $^{\circ}\text{C}$ ；喷雾气氮气，压力 60 psi（1 psi=6.895 kPa），体积流量 5 L/min；多反应监测模式（MRM）；各成分质谱参数见表 1，总离子流图见图 1。

表 1 各成分质谱参数

化合物	保留时间/min	母离子 m/z	子离子 m/z		碎裂电压/V	碰撞能量/eV
			定量	定性		
羊毛甾醇	7.020	409.9[M+H-H ₂ O] ⁺	109.2	95.3	115	25、36
22R-羟基胆固醇	1.457	367.3[M+H-2H ₂ O] ⁺	147.2	187.2	132	25、24
27-羟基胆固醇	1.867	385.2[M+H-H ₂ O] ⁺	81.1	161.2	137	29、30
7-脱氢胆固醇	5.819	367.3[M+H-H ₂ O] ⁺	159.1	145.2	88	17、25
胆固醇	6.465	369.3[M+H-H ₂ O] ⁺	147.0	95.1	130	23、43
链甾醇	5.509	367.6[M+H-H ₂ O] ⁺	146.8	160.8	104	24、30



1. 22R-羟基胆固醇 2. 27-羟基胆固醇 3. 链甾醇 4. 7-脱氢胆固醇 5. 胆固醇 6. 羊毛甾醇

图 1 各成分总离子流图

2.2 对照品溶液制备 精密称取胆固醇、羊毛甾醇、链甾醇、27-羟基胆固醇、22R-羟基胆固醇、7-脱氢胆固醇对照品各 5 mg，置于 10 mL 量瓶中，甲醇溶解并定容至刻度，配制成质量浓度为 0.5 mg/mL 的对照品储备液。吸取各对照品储备液适量，用甲醇制成质量浓度分别为 3.91、7.81、15.63、31.25、62.50、125、250、500 ng/mL 的系列对照品溶液。另取 22R-羟基胆固醇储备液适量，用甲醇稀释成 1 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液，作为内标，于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存，备用。

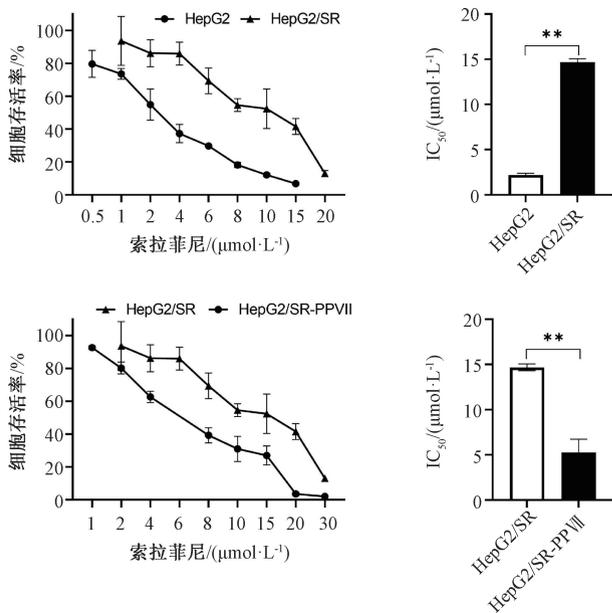
2.3 细胞培养 HepG2 细胞和 HepG2/SR 耐药细胞用含 3140

10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素溶液的 MEM 完全培养基，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的恒温培养箱中培养，待培养瓶中细胞密度达 80% 以上，进行消化和传代培养。

2.4 CCK-8 法测定细胞毒性 取生长对数期的细胞消化计数，调整细胞密度至 $1 \times 10^5/\text{mL}$ ，接种于 96 孔板，每孔 100 μL ，置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中培养 24 h 后，分别加不同浓度的索拉菲尼，或含有 1 $\mu\text{mol/L}$ 重楼皂苷 VII 的培养基配制的不同浓度的索拉菲尼，继续培养 48 h。弃去含药培养基，在 96 孔板中分别加入 10 μL CCK-8 和 100 μL 培养

基,继续孵育1 h,用酶标仪在450 nm波长处测定吸光度(A),计算细胞存活率,公式为细胞存活率=[(A药物-A空白)/(A对照-A空白)]×100%。根据索拉非尼的IC₅₀值计算耐药倍数和逆转耐药倍数,公式为耐药倍数=耐药株的IC₅₀/亲本株的IC₅₀,逆转耐药倍数=不加重楼皂苷VII耐药株的IC₅₀/加重楼皂苷VII后耐药株的IC₅₀。

由图2可知,索拉非尼对HepG2和HepG2/SR细胞的IC₅₀值分别为(2.17±0.21)、(14.68±0.37) μmol/L (P<0.01),耐药倍数为6.8倍;安全浓度(1 μmol/L)下重楼皂苷VII与索拉非尼联合给药HepG2/SR细胞后,索拉非尼IC₅₀值为(5.26±1.47) μmol/L,与索拉非尼单独作用于HepG2/SR细胞的IC₅₀值相比,逆转耐药倍数为2.8倍,提示重楼皂苷VII具有逆转肝癌索拉非尼耐药作用。



注:A~B分别为索拉非尼对HepG2和HepG2/SR细胞的存活率、IC₅₀值的影响;C~D分别为重楼皂苷VII(PPVII)干预后索拉非尼对HepG2/SR细胞存活率、IC₅₀值的影响。组间比较,**P<0.01。

图2 HepG2和HepG2/SR细胞毒实验结果

2.5 样品前处理优化

2.5.1 抗氧化剂2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)对含量测定结果的影响 胆固醇及其合成前体易被活性氧化,胆固醇可被氧化生成7α-羟基胆固醇、7β-羟基胆固醇、7-酮基胆固醇等,因此为了定量更准确,考察样品前处理过程中加入抗氧化剂对测定结果的影响,即在超声破碎前,细胞样品加入50 μL BHT(90 mg/mL),结果见表2。由此可知,与未经BHT处理的样品比较,胆固醇及其3种合成代谢关键产物的含量升高(P<0.01),提示BHT的加入可以有效抑制胆固醇、链甾醇、7-脱氢胆固醇、27-羟基胆固醇在样品处理阶段的氧化损失。

2.5.2 正己烷/异丙醇萃取步骤的考察 实验过程中发现,使用甲醇沉淀蛋白并作为待测物的提取溶剂,虽然步骤简

表2 抗氧化剂对胆固醇及其合成代谢产物含量的影响 (n=6)

含量/ (ng·mg ⁻¹ 蛋白)	胆固醇	7-脱氢胆固醇	链甾醇	27-羟基 胆固醇
不加BHT	106 225.6	1 917.6	42.8	71.8
加BHT	120 805.4**	3 691.5**	78.4**	98.6**

注:与不加BHT比较,**P<0.01。

便,回收率较高,但是由于生物样本的复杂性,甲醇提取的样品中杂质较多,易对目标化合物的测定造成干扰,产生较强的基质效应,还会污染仪器使其响应降低。根据前期实验优化过程,本实验考察了不同溶剂(甲醇、正己烷、异丙醇)对胆固醇及氧化甾醇萃取效率的影响,发现正己烷-异丙醇(4:1)作为萃取剂时测得的含量相对最高,而且该溶剂体系在后续氮吹步骤中,干燥时间大大缩短。因此,本实验在甲醇沉淀蛋白后,取上清液经氮气吹干后,加入1 mL正己烷/异丙醇(4:1)萃取,考察该萃取步骤对细胞样品测定结果的影响,结果见表3,可知增加正己烷/异丙醇萃取步骤后测得的胆固醇及其合成代谢产物含量更高,因此确定在细胞样品处理过程中增加正己烷/异丙醇萃取。

表3 液液萃取条件优化对胆固醇及其合成代谢产物含量的影响 (n=6)

含量/ (ng·mg ⁻¹ 蛋白)	胆固醇	7-脱氢胆固醇	链甾醇	27-羟基 胆固醇
不萃取	102 834.2	1 954.0	45.3	63.8
萃取	120 805.4**	3 691.5**	78.4**	98.6**

注:与不萃取比较,**P<0.01。

2.6 方法学考察

2.6.1 线性关系考察及最低定量限(LLOQ)测定 取“2.2”项下系列质量浓度对照品溶液各100 μL,用氮气吹干,加入空白细胞裂解液,按细胞样品的处理方法处理,并在“2.1”项条件下进样测定。以待测物质量浓度为横坐标(X),待测物和内标峰面积的比值为纵坐标(Y),利用加权(1/x²)最小二乘法进行线性回归,根据信噪比确定最低检测限(LLOQ),结果见表4,可知胆固醇及其合成代谢产物在各自范围内线性关系良好。

2.6.2 准确度与精密度试验 取低、中、高3个浓度的对照品溶液各100 μL,氮气吹干,分别加入400 μL空白细胞裂解液复溶,13 000 r/min离心10 min,取上清液,得质控(QC)样品,按细胞样品的处理方法处理,在“2.1”项条件下进样测定。日内精密度为每个浓度连续检测6次,日间精密度用6份平行样品连续测定3 d,计算日内及日间准确度、精密度。准确度用相对误差(RE)表示,精密度用相对标准偏差(RSD)表示,结果见表5,可知胆固醇及其合成代谢产物日内及日间准确度、精密度良好。

2.6.3 稳定性试验 低、中、高3个浓度QC样品按如下条件考察稳定性。(1)短期稳定性,将细胞样品室温放置6 h,按细胞样品处理方法处理,在“2.1”项条件下进样测定;(2)长期稳定性,将细胞样品置于-80℃冰箱中保

表4 胆固醇及其合成代谢产物线性关系

化合物	回归方程	R ²	线性范围/(ng·mL ⁻¹)	LLOQ/(ng·mL ⁻¹)
胆固醇	Y=1.461 1X-0.086 6	0.998	19.531~10 000	9.77
27-羟基胆固醇	Y=1.948 6X-0.056 5	0.992	7.812 5~1 000	3.91
7-脱氢胆固醇	Y=0.046 9X-0.001 5	0.999	78.125~10 000	39.06
羊毛甾醇	Y=0.208 4X-0.070 5	0.992	78.125~10 000	39.06
甾甾醇	Y=1.184 6X-0.029 4	0.993	7.812 5~1 000	3.91

表5 胆固醇及其合成代谢产物精密度的测定结果 (n=6)

化合物	质量浓度/ (ng·mL ⁻¹)	日内		日间	
		RSD/%	RE/%	RSD/%	RE/%
胆固醇	156.25	6.38	-8.42	5.04	-10.72
	1 250.00	4.97	-5.82	3.20	-9.17
	5 000.00	4.36	4.56	1.80	2.43
7-脱氢胆固醇	156.25	8.39	-2.29	3.14	1.23
	1 250.00	1.87	-3.02	4.48	-7.54
	5 000.00	4.16	1.41	9.72	8.87
羊毛甾醇	156.25	3.70	-4.24	10.39	3.36
	1 250.00	7.37	-6.52	0.60	-6.13
	5 000.00	0.19	2.51	2.58	0.67
甾甾醇	15.63	8.40	1.93	9.53	4.13
	125.00	8.62	-6.58	2.36	-5.19
	500.00	2.20	7.17	1.49	5.48
27-羟基胆固醇	15.63	5.54	-2.19	3.50	-0.47
	125.00	1.62	-4.27	4.89	-8.87
	500.00	2.84	7.63	3.89	6.90

存1个月,按细胞样品处理方法处理,在“2.1”项条件下进样测定。由表6可知,胆固醇及其合成代谢产物的短期稳定性及长期稳定性均良好。

2.6.4 提取回收率和基质效应试验 取 HepG2 细胞样品,按照细胞样品前处理方法处理,平行3份,在“2.1”项条件下进样测定,记录峰面积 Resp₁。取 HepG2 细胞样品,加低、中、高3个浓度 QC 样品,按照细胞样品前处理方法

处理,每一浓度平行3份,在“2.1”项条件下进样测定,记录峰面积 Resp₂。低、中、高3个浓度 QC 样品,按细胞样品处理方法处理,在“2.1”项条件下进样测定,记录峰面积 Resp₃。计算提取回收率,公式为提取回收率=(Resp₂-Resp₁)/Resp₃,结果见表7,可知各化合物提取回收率为81.9%~97.1%,表明建立的方法可以用于细胞样品的检测。

表6 胆固醇及其合成代谢产物稳定性测定结果 (n=6)

化合物	质量浓度/ (ng·mL ⁻¹)	短期稳定性	长期稳定性
		RSD/%	RSD/%
胆固醇	156.25	3.40	2.11
	1 250.00	5.45	5.76
	5 000.00	4.36	6.83
7-脱氢胆固醇	156.25	4.73	9.06
	1 250.00	4.93	7.64
	5 000.00	4.28	4.07
羊毛甾醇	156.25	4.13	6.74
	1 250.00	8.71	8.71
	5 000.00	4.61	5.18
甾甾醇	15.63	5.09	8.40
	125.00	4.03	5.60
	500.00	3.40	4.72
27-羟基胆固醇	15.63	6.14	9.09
	125.00	3.74	3.28
	500.00	1.90	4.84

表7 胆固醇及其合成代谢产物的回收率和基质效应测定结果 (n=3)

化合物	质量浓度/(ng·mL ⁻¹)	回收率		基质效应	
		平均值/%	RSD/%	平均值/%	RSD/%
7-脱氢胆固醇	156.25	87.2	8.3	93.3	10.2
	1 250.00	86.5	4.6	101.6	6.7
	5 000.00	84.1	11.7	89.8	11.7
甾甾醇	31.25	88.5	9.9	89.6	11.9
	250.00	95.7	4.0	94.5	5.8
	1 000.00	81.9	12.3	92.9	10.0
27-羟基胆固醇	31.25	91.5	9.6	88.9	8.9
	250.00	87.9	4.3	89.9	8.6
	1 000.00	94.6	9.9	98.4	5.6
羊毛甾醇	156.25	97.1	10.9	97.7	6.3
	1 250.00	84.7	3.2	89.1	9.3
	5 000.00	90.7	10.4	79.9	4.3
胆固醇	156.25	92.8	7.8	88.7	11.0
	1 250.00	90.1	9.5	99.0	6.0
	5 000.00	92.6	11.0	88.5	4.9

取 HepG2 细胞样品，按照细胞样品前处理方法处理，平行3份，在“2.1”项条件下进样测定，记录峰面积 $Resp_4$ 。取 HepG2 细胞样品，按照细胞样品前处理方法处理，向获得的全部上清中加入低、中、高浓度 QC 样品，每个浓度平行3份，氮气吹干，初始流动相复溶，在“2.1”项条件下进样测定，记录峰面积 $Resp_5$ 。低、中、高浓度 QC 样品，按细胞样品处理方法处理，在“2.1”项条件下进样测定，记录峰面积 $Resp_6$ 。计算基质效应，公式为基质效应 = $(Resp_5 - Resp_4) / Resp_6$ ，结果见表7，可知基质效应为 79.9%~101.6%，表明基质对待测物的离子抑制影响较小，符合方法学要求。

2.7 细胞样品中胆固醇及其合成代谢产物含量测定

2.7.1 细胞样品预处理 收集胰酶消化后的细胞，PBS 洗涤3次后，用 1 mL PBS 重悬，取 10 μ L 细胞悬液稀释5倍后，用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量；其余细胞悬液离心后收集细胞沉淀，用滤纸条将残留的 PBS 吸尽；向 EP 管中加入 400 μ L 裂解液（氯仿：异丙醇 = 7：11）和 50 μ L BHT（90 mg/mL），用细胞破碎仪在冰水浴上进行超声处理（25% 功率，3 s 开，2 s 关，总共 20 min），加入 1 mL 甲醇涡旋 5 min 后，13 000 r/min 离心 10 min，取全部上清液，氮气吹干，加 1 mL 正己烷-异丙醇（4：1）复溶，涡旋 10 min，13 000 r/min 离心 5 min；取 900 μ L 上清，加入 50 μ L 内标（1 μ g/mL），氮气吹干，加入 100 μ L 初始流动相甲

醇-水-甲酸复溶，13 300 r/min 离心 10 min，测定胆固醇时稀释 200 倍。

2.7.2 肝癌耐药细胞中胆固醇及其合成代谢产物含量测定 取“2.7.1”项下预处理好的样品，在“2.1”项条件下进样测定，结果见表8。由此可知，与 HepG2 亲本细胞比较，HepG2/SR 细胞中胆固醇含量升高（ $P < 0.01$ ），而7-脱氢胆固醇、链甾醇、27-胆固醇含量降低（ $P < 0.01$ ），羊毛甾醇在2种细胞中均未检测到。由于7-脱氢胆固醇和链甾醇是胆固醇合成的前体物质，推测 HepG2 细胞在索拉非尼诱导耐药过程中，细胞对胆固醇的高需求促使胞内胆固醇合成增加，加快了7-脱氢胆固醇和链甾醇向胆固醇的合成转化，因此表现出更高的胆固醇水平，同时胆固醇代谢转化为27-羟基胆固醇减少，提示肝癌细胞产生索拉非尼耐药性过程中，胆固醇的代谢稳态受到影响，最终表现为细胞内的胆固醇含量增加。

在 HepG2/SR 细胞中给药安全浓度的重楼皂苷 VII 后，细胞内胆固醇及其合成代谢产物含量发生变化，含量测定结果见表9。由此可知，重楼皂苷 VII 给药后，HepG2/SR 细胞中的胆固醇含量降低（ $P < 0.01$ ），7-脱氢胆固醇、链甾醇和27-羟基胆固醇含量均升高（ $P < 0.01$ ）。提示重楼皂苷 VII 可能抑制了7-脱氢胆固醇和链甾醇向胆固醇的转化，同时促进了胆固醇代谢为27-羟基胆固醇，进而降低细胞内胆固醇水平。

表8 HepG2 和 HepG2/SR 细胞中胆固醇及其合成代谢产物含量测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

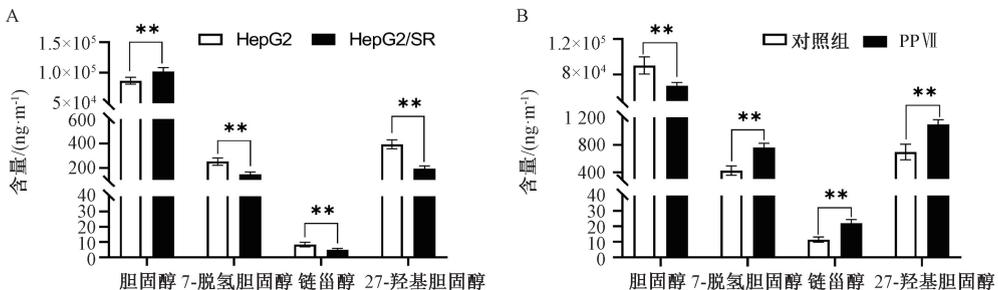
含量/(ng·mg ⁻¹ 蛋白)	胆固醇	7-脱氢胆固醇	链甾醇	27-羟基胆固醇
HepG2	86 874.9 ± 5 625.6	253.3 ± 29.9	8.3 ± 1.5	394.5 ± 36.9
HepG2/SR	101 982.9 ± 6 293.2**	148.3 ± 18.2**	4.9 ± 0.9**	195.2 ± 21.0**

注：与 HepG2 细胞比较，** $P < 0.01$ 。

表9 HepG2/SR 细胞给药重楼皂苷 VII 前后胆固醇及其合成代谢产物含量测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

含量/(ng·mg ⁻¹ 蛋白)	胆固醇	7-脱氢胆固醇	链甾醇	27-羟基胆固醇
对照组	90 255.9 ± 9 614.0	424.4 ± 66.7	11.4 ± 1.7	696.2 ± 113.9
重楼皂苷 VII	67 115.7 ± 3 698.3**	761.7 ± 60.7**	21.9 ± 2.5**	1 098.3 ± 66.7**

注：与对照组比较，** $P < 0.01$ 。



注：A 为 HepG2 和 HepG2/SR 细胞中胆固醇及其合成代谢产物含量对比；B 为 HepG2/SR 细胞给药重楼皂苷 VII 前后胆固醇及其合成代谢产物含量对比。组间比较，** $P < 0.01$ 。

图3 肝癌细胞中胆固醇及其合成代谢相关化合物的含量对比 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

2.8 统计学分析 通过 SPSS 18.0 软件进行处理，数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示，组间比较采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 讨论

本研究建立的 UPLC-MS/MS 方法前处理简单、灵敏度

高、分析快速，符合方法学要求，可用于肿瘤细胞耐药过程中胆固醇及其代谢物的定量分析，以探索胆固醇合成代谢在肿瘤耐药中的关键作用，为相关研究提供可靠的信息和依据。

本研究诱导的 HepG2/SR 细胞耐药倍数为 6.8 倍，与

亲本细胞相比, 耐药细胞中胆固醇含量显著升高, 是亲本细胞的 1.2 倍, 而 7-脱氢胆固醇、链甾醇、27-羟基胆固醇含量显著下降, 推测耐药细胞内胆固醇合成增加、代谢减少, 最终导致胆固醇含量处于高水平状态, 与研究报道一致^[23-24]。重楼皂苷 VII 给药后, 逆转了 HepG2/SR 细胞的耐药, 逆转耐药倍数为 2.8 倍, 细胞内 7-脱氢胆固醇、链甾醇、27-羟基胆固醇含量升高, 胆固醇含量降低, 推测其通过抑制 DHCR7 和 DHCR24 活性抑制胆固醇前体向胆固醇转化, 同时促进胆固醇代谢为 27-羟基胆固醇, 从而降低耐药细胞内胆固醇水平, 后续研究可进行 Western blot 实验验证。有研究报道重楼皂苷可凝结细胞膜胆固醇, 改变细胞膜通透性, 使化疗药物吸收和敏感性增加^[17]。重楼皂苷 VII 对细胞膜胆固醇没有凝结作用, 但其降低耐药细胞中胆固醇水平可能对细胞膜上脂筏的扩增产生影响, 进一步影响脂筏区的功能及相关膜蛋白的表达, 从而使耐药情况得到逆转, 具体机制有待进一步研究。

综上所述, 本研究建立了细胞中胆固醇及其关键合成代谢产物的检测方法, 并探索了重楼皂苷 VII 调控胆固醇水平、逆转肝癌细胞耐药的作用, 研究结果可为肿瘤细胞耐药过程与胆固醇合成代谢稳态的相关研究提供技术支持与思路, 并为中药皂苷类成分靶向调控胆固醇合成代谢从而逆转耐药作用提供参考与依据。

参考文献:

[1] 曾阳玲, 王运踊, 关海梅, 等. 胆固醇在肝细胞癌中的作用及治疗潜在价值[J]. 海南医学院学报, 2024, 30(12): 952-960.

[2] 张喆, 何元洋, 王冰, 等. 胆固醇合成与转运相关信号调控通路的研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2023, 44(5): 380-382; 386.

[3] Espinosa G, López-Montero I, Monroy F, et al. Shear rheology of lipid monolayers and insights on membrane fluidity[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(15): 6008-6013.

[4] 罗娜, 时荣臣, 代荣阳, 等. 胆固醇代谢与肿瘤免疫[J]. 四川大学学报(医学版), 2022, 53(2): 335-341.

[5] 王爽, 肖俊, 靳苗, 等. 胆固醇代谢与免疫反应[J]. 生物医学转化, 2024, 5(2): 36-45.

[6] Lin J C, Yang X, Wang A H, et al. LC-MS/MS profiling of colon oxysterols and cholesterol precursors in mouse model of ulcerative colitis. [J]. *J Chromatogr A*, 2024, 1722: 464865.

[7] Huang B L, Song B L, Xu C Q, et al. Cholesterol metabolism in cancer: mechanisms and therapeutic opportunities[J]. *Nat Metab*, 2020, 2(2): 132-141.

[8] Kloudova A, Guengerich F P, Soucek P, et al. The role of oxysterols in human cancer[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2017, 28(7): 485-496.

[9] Mok E H K, Leung C O N, Zhou L, et al. Caspase-3-induced activation of SREBP2 drives drug resistance via promotion of cholesterol biosynthesis in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2022, 82(17): 3102-3115.

[10] Wang Y Y, Wang J, Li X Y, et al. N1-methyladenosine methylation in tRNA drives liver tumorigenesis by regulating cholesterol metabolism[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 6314.

[11] Batlle E, Clevers H, et al. Cancer stem cells revisited[J]. *Nat Med*, 2017, 23(10): 1124-1134.

[12] Ni J, Zhou L L, Ding L. Efatutazone and T0901317 exert synergistically therapeutic effects in acquired gefitinib-resistant lung adenocarcinoma cells[J]. *Cancer Med*, 2018, 7(5): 1955-1966.

[13] Wang X H, Zhong F L, Chen T T, et al. Cholesterol neutralized vemurafenib treatment by promoting melanoma stem-like cells via its metabolite 27-hydroxycholesterol [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2024, 81(1): 226.

[14] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 271-272.

[15] Zhang C, Jia X J, Bao J L, et al. Polyphyllin VII induces apoptosis in HepG2 cells through ROS-mediated mitochondrial dysfunction and MAPK pathways[J]. *BMC Complement Med*, 2016, 16: 58.

[16] Zhang C, Li Q R, Qin G Z, et al. Anti-angiogenesis and anti-metastasis effects of polyphyllin VII on hepatocellular carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*[J]. *Chin Med*, 2021, 16(1): 41.

[17] 江旻, 陈李霞, 洪超, 等. 重楼皂苷 I 凝结 HepG2 细胞膜胆固醇增加阿霉素敏感性的研究[J]. 中成药, 2024, 46(3): 971-976.

[18] Schött H F, Lütjohann D. Validation of an isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry method for combined analysis of oxysterols and oxysterols in serum samples[J]. *Steroids*, 2015, 99(Pt B): 139-150.

[19] Matysik S, Klünemann H H, Schmitz G, et al. Gas chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of oxysterols, plant sterols, and cholesterol precursors[J]. *Clin Chem*, 2012, 58(11): 1557-1564.

[20] Ahmida H S, Bertucci P, Franzò L, et al. Simultaneous determination of plasmatic phytosterols and cholesterol precursors using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) with selective ion monitoring (SIM) [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2006, 842(1): 43-47.

[21] Ikegami T, Hyogo H, Honda A, et al. Increased serum liver X receptor ligand oxysterols in patients with non-alcoholic fatty liver disease[J]. *J Gastroenterol*, 2012, 47(11): 1257-1266.

[22] Griffiths W J, Abdel-Khalik J, Crick P J, et al. New methods for analysis of oxysterols and related compounds by LC-MS[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2016, 162: 4-26.

[23] Hu B Y, Zou T T, Qin W, et al. Inhibition of EGFR overcomes acquired lenvatinib resistance driven by STAT3-ABC1 signaling in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2022, 82(20): 3845-3857.

[24] Pan Z Z, Wang K, Wang X N, et al. Cholesterol promotes EGFR-TKIs resistance in NSCLC by inducing EGFR/Src/Erk/SP1 signaling-mediated ERR α re-expression[J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 77.