

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

江 昂， 陈李霞， 洪 超， 张立涓， 路 璐， 康 萍*， 赵文军， 丁 越*， 张 彤
(上海中医药大学，上海 201203)

摘要：目的 探究重楼皂苷 I 凝结细胞膜胆固醇影响肿瘤细胞对化疗药物敏感性的作用。方法 采用不同摩尔比的重楼皂苷 I 与胆固醇进行体外结合实验，并培养 HepG2 细胞，给予不同浓度重楼皂苷 I，检测细胞内总胆固醇含量、Filipin III 标记细胞内胆固醇，透射电镜观察细胞膜形态学变化，免疫荧光染色标记细胞膜脂筏及 ABCA1，Western bolt 法检测 ABCA1 蛋白表达，并通过激光共聚焦与细胞流式仪检测阿霉素的吸收作用。最后，通过 CCK-8 实验明确重楼皂苷 I 对阿霉素的增敏作用。**结果** 重楼皂苷 I 在体外可与胆固醇结合形成凝胶固态物；可降低 HepG2 细胞总胆固醇含量，改变细胞膜形态，降低细胞膜脂筏含量并抑制外排蛋白 ABCA1 表达，从而增加化疗药物阿霉素吸收提高敏感性。**结论** 重楼皂苷 I 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。

关键词：重楼皂苷 I；胆固醇；细胞膜；阿霉素；敏感性

中图分类号：R285.5

文献标志码：B

文章编号：1001-1528(2024)03-0971-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.03.040

胆固醇是细胞膜的必要组成成分之一^[1]，其能影响细胞膜脂区的形成及膜蛋白的结构和功能^[2]。胆固醇和脂质间的相互作用促进细胞膜上微结构域的形成，其中包括脂筏和膜微囊^[3-4]。细胞膜上胆固醇的增加有助于脂筏的扩增，对脂区的功能及膜蛋白的表达有重要的影响，并可进一步改变细胞膜的通透性、流动性和韧性等^[5-6]，调节参与肿瘤发生和癌症进展的信号通路。研究证实，在对肿瘤细胞进行化疗药物治疗过程时，异常聚集的胆固醇会降低细胞膜通透性^[7]，减少药物摄取，提高 ABC 转运蛋白水平^[8]，增加药物外排来抵抗化疗药物的治疗敏感性。

重楼为百合科植物云南重楼或七叶一枝花的干燥根茎，有清热解毒、消肿止痛之功效^[9]。其中重楼皂苷 I 为主要抗肿瘤活性成分，研究证明其对肝癌^[10]、肺癌^[11]、乳腺癌^[12]等多种癌症有较好的抑制作用。同时，有报道称重楼皂苷 I 可增加肿瘤细胞对化疗药物敏感性，如 Song 等^[13]研究发现重楼皂苷 I 可增加 HepG2 细胞对顺铂的敏感性；Zhu 等^[14]研究发现重楼皂苷 I 可增加 MCF-7 细胞对盐酸阿霉素的敏感性，以上研究表明重楼皂苷 I 具有良好的改善化疗药物敏感性逆转耐药的前景，但其具体作用机制尚不明确。本研究将阐明重楼皂苷 I 基于对细胞膜胆固醇的凝结作用，及其提高化疗药物敏感性的作用机制，以期为重楼皂苷 I 抗肿瘤机制提供新的理论依据。

1 材料

1.1 细胞株 人肝癌细胞株 HepG2 (编号 SCSP-510)，购于中国科学院干细胞库，将 HepG2 细胞加入含有 10% FBS、100 U/mL 青霉素及 100 μg/mL 链霉素的 MEM 培养基中，在 37 °C、5% CO₂ 环境中培养。

1.2 药物与试剂 重楼皂苷 I 对照品、盐酸阿霉素 (doxorubicin hydrochloride, DOX) (上海源叶生物科技有限公司，批号 M29N11S132593、A25GS158731)。胆固醇 (cholesterol, Chol) 对照品 (上海艾韦特医药科技有限公司，批号 B71154)；总胆固醇检测试剂盒 (南京建成科技有限公司，批号 20201128)；Fillipin III (美国 MedChemExpress 公司，批号 0604116)；鬼笔环肽、Anti-ABCA1 抗体 [艾博抗 (上海) 贸易有限公司，批号 GR3370348-1、GR3316971-7]；CTB-488 (美国赛默飞世尔科技公司，批号 2291509)；增强型 CCK-8 试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司，批号 031521211228)；DAPI 染色液 (合肥白鲨生物科技有限公司，批号 70120050)。

1.3 仪器 高效液相色谱仪 (型号 Agilent1100，美国安捷伦公司)；激光共聚焦显微镜 (型号 CLSM，德国 Leica 公司)；多功能酶标仪 (型号 SpectraMax iD5，美国 BioTek 公司)；细胞流式仪 (型号 CytoFLEX，美国贝克曼库尔特公司)；电子透射电镜 (型号 JEM-1230，日本 JEOL 公司)；超净工作台 (型号 DL-CJ-IND-II，北京东联哈尔仪器制造

收稿日期：2023-01-29

基金项目：国家自然基金面上项目 (81872981)；国家科技重大专项 (2019ZX09201004-002)；上海市科委科技创新项目 (20S21902500, 22S21901200)；上海市青年科技英才扬帆计划项目 (19YF1449000)

作者简介：江 昂 (1996—)，女，硕士生，研究方向为中药学。Tel: 15221051012, E-mail: jm_caroline@163.com

*通信作者：康 萍 (1984—)，女，硕士，实验师，从事中药制药技术研究。Tel: (021) 51328024, E-mail: konnie1984@163.com
丁 越 (1982—)，男，博士，研究员，博士生导师，从事中药制药技术及体内过程研究。Tel: (021) 51322325,
E-mail: dingyue-2001@hotmail.com

有限公司); CO₂ 细胞培养箱(型号 Forma 3100, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

2 方法

2.1 体外结合实验 称取重楼皂苷 I 对照品 1 mg 加入甲醇 1 mL, 配制成 1 mg/mL 的溶液; 称取胆固醇对照品 100 mg 加入氯仿 1 mL, 配制成 100 mg/mL 的溶液, 备用。根据胆固醇、重楼皂苷 I 摩尔比 5:1、2:1、1:1、1:2、1:5, 取 200 μL 重楼皂苷 I 溶液, 加入 5 μL 胆固醇溶液, 充分混匀后, 室温下摇床振摇 2 h, 然后, 8 000 r/min 离心 5 min, 取上清液检测粒径; 并采用高效液相色谱法检测上清液中剩余重楼皂苷 I 的含量, 通过计算得到不同比例下重楼皂苷 I 与胆固醇的结合率。

2.2 HepG2 细胞总胆固醇含量检测 取对数生长期 HepG2 细胞混悬液 2 mL, 分别置于 6 孔培养板中, 每孔约 1×10⁶ 个, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h, 分别加入重楼皂苷 I (2、6 μmol/L)、洛伐他汀 (2 μmol/L)、胆固醇 (5 μmol/L), 继续培养 24 h。弃去含药培养基, 用含 EDTA 胨酶消化后, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 留细胞沉淀, 用等渗缓冲液 PBS 清洗 1~2 次, 1 000 r/min 离心 10 min, 细胞沉淀用 PBS 重悬。取细胞重悬液 2 μL 加入 96 孔板中, 加入 200 μL 总胆固醇工作液, 37 °C 孵育 10 min, 于 510 nm 波长处检测光密度 (OD) 值。根据公式胆固醇量 = (OD_{样本} - OD_{空白}) / (OD_{校准} - OD_{空白}) × 校准品浓度, 计算细胞中胆固醇含量。

2.3 Filipin III 试剂检测细胞内总胆固醇变化 将培养好的 HepG2 细胞铺于激光共聚焦培养皿, 每孔 2×10⁴ 个, 培养 24 h 后, 加入重楼皂苷 I (2、6 μmol/L) 孵育 24 h。弃去含药培养基, 用 PBS 清洗 2~3 次, 加入鬼笔环肽抗体 (1:1 000) 孵育 1 h, 然后加入 Filipin III 抗体 (1:1 000) 孵育 1 h, 弃去含药培养基, 加入 500 μL PBS, 于激光共聚焦显微镜下观察。

2.4 透射电镜观察 HepG2 细胞膜结构 将 HepG2 细胞以每孔 4×10⁵ 个的密度接种于培养皿中, 培养 24 h 后, 用不同浓度重楼皂苷 I (2、4、8 μmol/L) 处理 24 h。用 0.1 mol/L 二甲肿酸钠缓冲液清洗细胞, 1.5% 戊二醛 4 °C 固定 2 h, 再清洗 3 次, 1% 四氧化锇固定 1 h, 清洗 2 次, 用不同体积分数的乙醇 (30%~100%) 和 100% 环氧丙烷脱水制备。将细胞浸润并嵌入 Agar-100 树脂中, 60 °C 加热过夜硬化。制备超薄切片, 并使用 JeolJEM-1230 透射电子显微镜观察细胞膜结构并获取图像^[15]。

2.5 CTB-488 检测细胞膜脂筏含量变化 将 HepG2 细胞接种到激光共聚焦皿上, 培养 24 h 后, 加入重楼皂苷 I (2、6 μmol/L) 孵育 24 h, 弃去原有培养基, 每孔加入 1 mL AF488-CTB (5 μg/mL), 并将 6 孔板置于冰上孵育 20 min 以完成 CTB-488 对细胞膜脂筏的标记。用灭菌 PBS 清洗 2~3 次后, 每孔加入 1 mL 4% 多聚甲醛, 再用灭菌 PBS 清洗 2~3 次, 于激光共聚焦显微镜下分别观察各组荧光强弱情况。

2.6 免疫荧光染色检测细胞膜脂筏及 ABCA1 蛋白表达变

化 将 HepG2 细胞接种到激光共聚焦皿上, 培养 24 h 后, 分为对照组、DOX 组 (1 μmol/L)、DOX (1 μmol/L) + 重楼皂苷 I (2 μmol/L) 组及 Chol (5 μmol/L) + DOX (1 μmol/L) + 重楼皂苷 I (2 μmol/L) 组, 加入相应药物于培养箱中培养 24 h, 弃去含药培养基, 用灭菌 PBS 清洗 2~3 次, 每皿加入 1 mL 4% 多聚甲醛室温固定 10 min, 加入 0.5% Triton-100X 溶液透化细胞 5 min, 2% BSA 溶液封闭 30 min, 加入 anti-ABCA1 一抗 4 °C 孵育过夜, 第二天回收一抗, 加入 Alex647-荧光二抗室温孵育 1 h, 回收二抗, 用 PBS 清洗 2~3 次。AF488-CTB 染色方法同上。于激光共聚焦显微镜下分别观察各组荧光强弱情况。

2.7 Western blot 法检测细胞膜 ABCA1 蛋白表达 取对数生长期 HepG2 细胞混悬液 1 mL, 接种于 6 孔培养板中培养 24 h, 分别加入 1 mL 不同浓度重楼皂苷 I (2、6 μmol/L) 和 DOX (2 μmol/L) 继续培养 48 h, 弃去含药培养基, 用细胞刮刀收集细胞, 冷 PBS 洗涤 2 次, 收集至 1 mL 离心管中, 3 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清, 加入细胞裂解液和 PMSF 混合液 (100:1) 100 μL, 吹打均匀, 冰上放置 30 min 后, 4 °C、15 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 10 μL, BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 剩余上清液加入 1/5 总体积 loading buffer, 100 °C 加热 10 min, 取出后于 -20 °C 保存。通过常规 Western blot 法检测蛋白表达。

2.8 DOX 的吸收作用

2.8.1 激光共聚焦显微镜检测 将 HepG2 细胞接种于共聚焦培养皿中, 培养 24 h 后, 分别给予重楼皂苷 I (2 μmol/L) 及游离胆固醇 (5 μmol/L) + 重楼皂苷 I (2 μmol/L), 孵育 3 h, 去除含药培养基, PBS 清洗 3 次, 加入含 DOX (1 μmol/L) 的培养基, 孵育 3 h, 去除培养基, PBS 清洗 3 次, 加入不含血清培养基, 于激光共聚焦显微镜下观察 DOX 荧光强弱。

2.8.2 细胞流式仪检测 取对数生长期 HepG2 细胞混悬液 1 mL 接种于 6 孔板中, 培养 24 h, 分别给予重楼皂苷 I (2 μmol/L) 及游离胆固醇 (5 μmol/L) + 重楼皂苷 I (2 μmol/L), 37 °C 孵育 4 h, 去除含药培养基, PBS 清洗 3 次, 加入含 DOX (1 μmol/L) 的培养基, 37 °C 孵育 3 h, 胨酶消化, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清, PBS 清洗 3 次, 加入 1 mL PBS 重悬, 转移至流式管中, 上机进行流式检测。

2.9 CCK-8 法检测细胞毒性 取对数生长期 HepG2 细胞混悬液 100 μL (约每孔 1×10⁴ 个细胞), 接种于无菌 96 孔培养板中, 培养 24 h 后, 每孔分别加入 100 μL 不同浓度的重楼皂苷 I、DOX 及 DOX+重楼皂苷 I 组, 另外再设 Chol+重楼皂苷 I 组及 Chol+DOX+重楼皂苷 I 组 (均加游离胆固醇 5 μmol/L), 继续培养 48 h, 弃去含药培养基, 加入 10 μL CCK-8 试剂及 100 μL 无血清 MEM 培养基, 置于培养箱避光孵育 1 h, 在 450 nm 波长处用酶标仪测定吸光度 (A) 值, 并计算细胞存活率和 IC₅₀ 值, 公式为细胞存活率 = (A_{样品} - A_{空白}) / (A_{对照} - A_{空白}) × 100%。

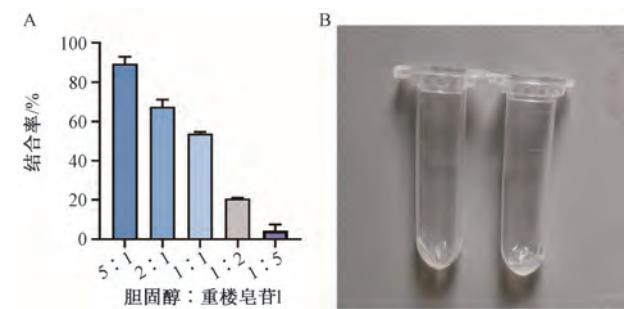
2.10 统计学分析 通过SPSS 18.0软件进行处理,数据以($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较采用独立样本t检验,多组间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 重楼皂苷I与胆固醇的体外结合反应 如表1、图1A所示,在胆固醇、重楼皂苷I为5:1的摩尔比下,上清液中几乎检测不到重楼皂苷I成分,溶液中粒径较小,表明重楼皂苷I与胆固醇充分结合;而随着重楼皂苷I的比重增加,结合率也逐步下降,溶液中粒径增大,游离重楼皂苷I含量增加,表明在胆固醇和重楼皂苷I的不同摩尔比下,重楼皂苷I可随着胆固醇的含量增加与胆固醇充分结合,而胆固醇含量减少则结合反应减弱。同时,本研究还发现,重楼皂苷I可与胆固醇形成凝胶状固态物,见图1B,推测其可能为两者发生氢键结合反应形成非共价键的水凝胶分子,为两者的结合反应提供进一步的佐证。

表1 重楼皂苷I与胆固醇体外结合后上清液中成分粒径信息

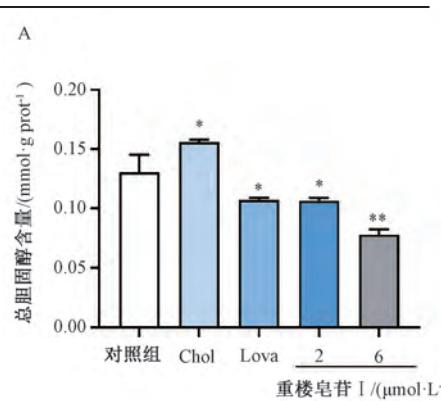
胆固醇:重楼皂苷I	上清液中粒径/nm	PDI
1:0	152.97±2.37	0.160
0:1	657.90±126.18	0.577
5:1	99.27±1.07	0.188
2:1	124.70±1.31	0.144
1:1	242.10±10.02	0.402
1:2	225.77±20.74	0.324
1:5	184.43±6.73	0.443



注: A为HPLC检测重楼皂苷I与胆固醇的体外结合率,B为重楼皂苷I与胆固醇形成的凝胶状固体物。

图1 重楼皂苷I与胆固醇的体外结合反应

3.2 重楼皂苷I对HepG2细胞膜胆固醇含量的影响 如图2A所示,重楼皂苷I可有效降低细胞的总胆固醇含量($P<0.05$, $P<0.01$),且与阳性药物洛伐他汀(Lovastatin, Lova)作用相当,且高浓度药效更为显著。如图2B所示,通过Filipin III标记定位HepG2细胞胆固醇分布,显示绿色荧光即为与胆固醇结合的Filipin III,红色荧光即为与鬼笔环肽(Phalloidin)结合的细胞膜骨架结构。对照组HepG2细胞膜上绿色荧光强度较强,细胞内分布较弱;在重楼皂苷I的作用下,细胞膜上的绿色荧光减弱,红色荧光强度不变,浓度越大效果越明显,表明重楼皂苷I可使细胞膜上胆固醇含量明显减少。



注: A为总胆固醇试剂盒检测HepG2细胞内总胆固醇含量,B为Filipin III标记细胞内胆固醇含量的变化。与对照组比较,* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图2 重楼皂苷I对HepG2细胞膜胆固醇含量的影响($\bar{x}\pm s$, n=3)

3.3 重楼皂苷I对HepG2细胞膜形态的影响 如图3所示,对照组HepG2细胞表面膜质非常光滑,且外层有许多微绒毛,线粒体及内质网结构正常;不同浓度重楼皂苷I组细胞膜形态学发生改变,表面凹凸不平且随着浓度的增加有不同程度的膜断裂现象(如红色箭头所示),微绒毛脱落并在膜外形成特化结构,内质网肿胀及线粒体凋亡,表明在重楼皂苷I的作用下,细胞膜通透性发生改变,降低了物质进出细胞的抵抗力,促进了化疗药物的渗透作用。

3.4 重楼皂苷I对细胞膜脂筏及ABCA1表达的影响 如图4所示,绿色荧光为CTB-488标记的细胞膜脂筏,红色荧光为

抗体标记的ABCA1蛋白,蓝色荧光为DAPI标记的细胞核。DOX组细胞膜脂筏及ABCA1蛋白荧光强度无明显变化,与对照组相似;DOX+重楼皂苷I组绿色及红色荧光强度明显减弱,表明重楼皂苷I可结合细胞膜上胆固醇,从而降低膜上胆固醇含量,进一步影响细胞膜脂筏的形成及功能,在降低膜上脂筏含量的同时,能进一步影响到ABCA1蛋白表达,对增加DOX的敏感性具有一定积极意义;而加入游离胆固醇后,重楼皂苷I的作用被明显抑制,脂筏及ABCA1的荧光强度都有不同程度的恢复,推测重楼皂苷I对细胞膜脂筏及ABCA1的作用与细胞膜胆固醇含量密切相关。

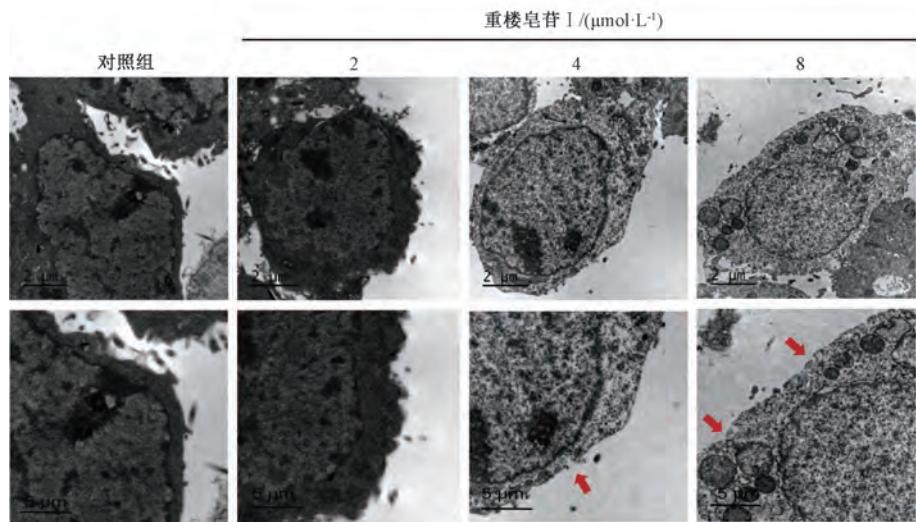


图3 重楼皂苷 I 对 HepG2 细胞膜形态的影响

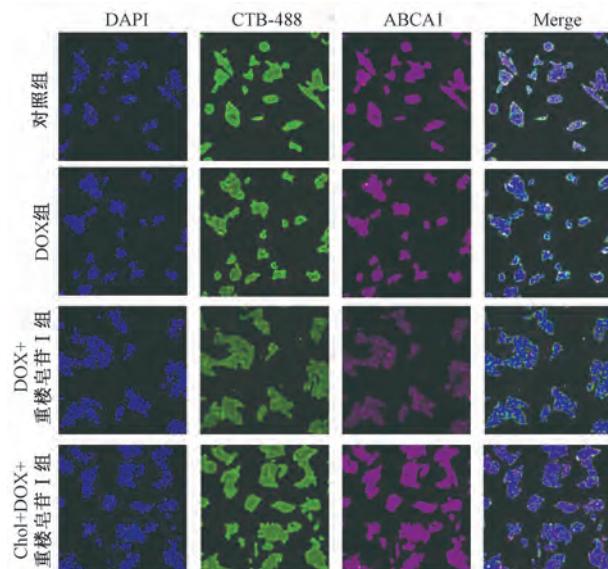
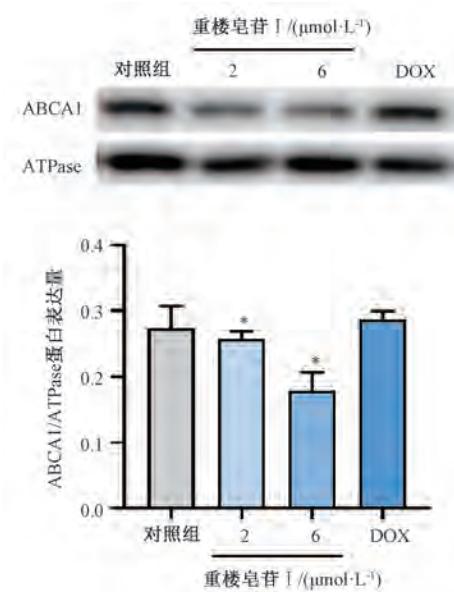


图4 重楼皂苷 I 对细胞膜脂筏及 ABCA1 表达的影响

3.5 重楼皂苷 I 对细胞膜 ABCA1 蛋白表达的影响 如图 5 所示, 与对照组比较, 重楼皂苷 I 组 ABCA1 蛋白表达降低 ($P<0.05$), 且化疗药物 DOX 无明显作用 ($P>0.05$), 表明重楼皂苷 I 可有效降低 ABCA1 蛋白在细胞膜上的表达, 从而抑制药物的外排作用。

3.6 重楼皂苷 I 对化疗药物 DOX 在 HepG2 细胞中吸收的影响 DOX 自带荧光表现为红色荧光。如图 6 所示, 在单独给予 DOX 时, HepG2 细胞内红色荧光强度较弱, 表明肿瘤细胞对 DOX 的吸收较差; 但在重楼皂苷 I 作用下, HepG2 细胞内红色荧光增强, 表明 DOX 含量增加, 重楼皂苷 I 可起到促进 DOX 吸收的作用, 从而增加 DOX 的疗效。然而, 在联合用药组中加入游离胆固醇后, DOX 吸收增加的作用被抑制, 表明游离胆固醇可竞争性地与重楼皂苷 I 结合从而抑制重楼皂苷 I 对细胞膜胆固醇的作用, 进而影响 DOX 的吸收。



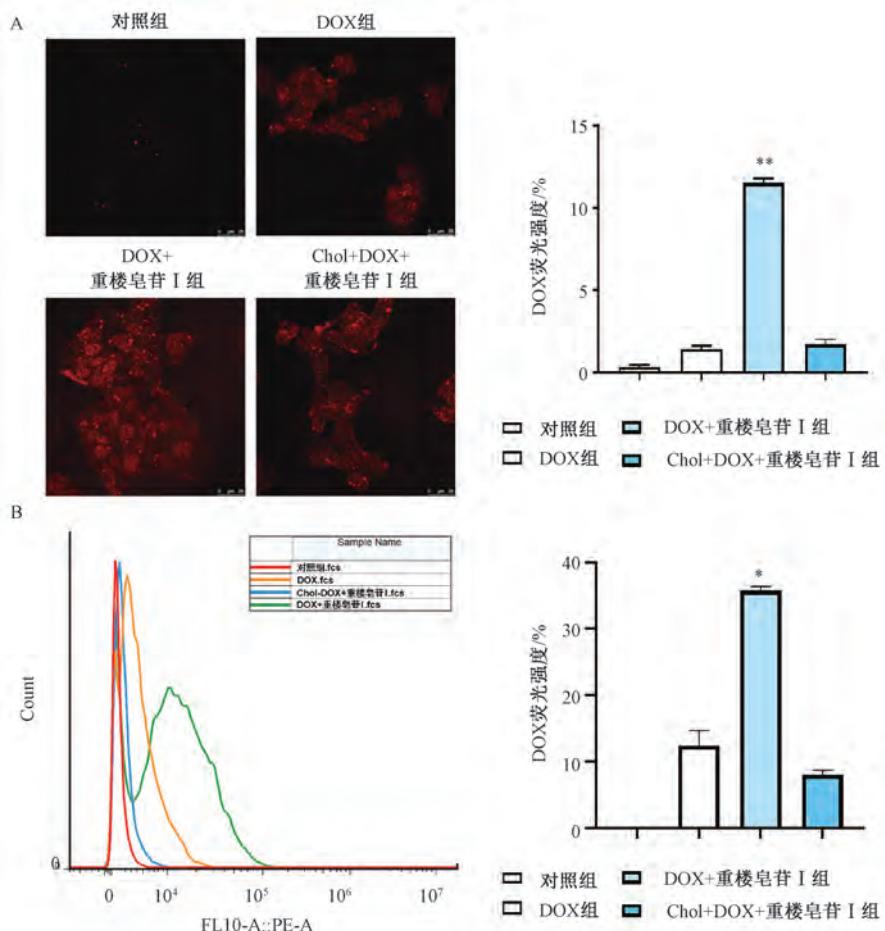
注: 与对照组比较, * $P<0.05$ 。

图5 重楼皂苷 I 对细胞膜 ABCA1 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

3.7 重楼皂苷 I 对化疗药物 DOX 在 HepG2 细胞中敏感性的影响 如表 2、图 7 所示, DOX 单药的 IC_{50} 值为 $(0.77\pm0.12) \mu\text{mol/L}$, 在 DOX 中加入重楼皂苷 I 后, DOX 的抗肿瘤活性提升, IC_{50} 值下降为 $(0.32\pm0.095) \mu\text{mol/L}$, 表明重楼皂苷 I 可增加 HepG2 对 DOX 的敏感性。然而, 在重楼皂苷 I 及 DOX+重楼皂苷 I 的联合给药组别中加入游离胆固醇后, 重楼皂苷 I 及联合给药组的细胞抑制率降低, 表明重楼皂苷 I 对 DOX 的增敏作用与细胞膜胆固醇密切相关。

4 讨论

肝癌是严重危害人类健康的主要恶性肿瘤之一, 位居恶性肿瘤发病谱的第 6 位, 死亡谱的第 4 位^[16]。2018 年, 我国肝癌新发病例数占全球 46.6%, 死亡病例数占全球

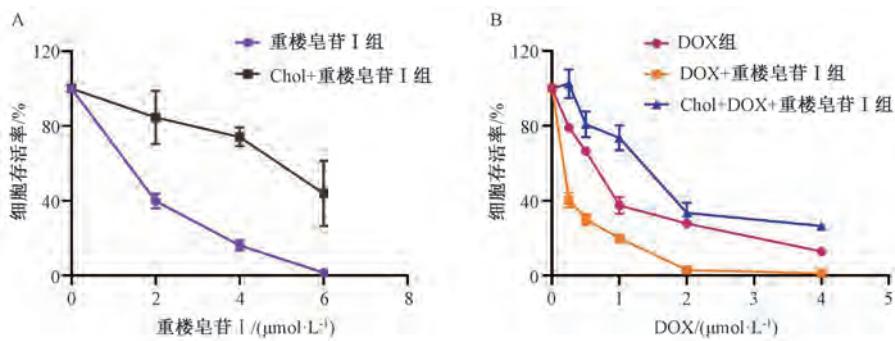


注：A 为重楼皂苷 I 作用下细胞内 DOX 含量共聚焦图，B 为重楼皂苷 I 作用下细胞内 DOX 含量流式图。与 DOX 组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

图 6 重楼皂苷 I 对 DOX 在 HepG2 细胞中吸收的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

表 2 各组药物的 IC_{50} 值

$IC_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	重楼皂苷 I	Chol+重楼皂苷 I	DOX	DOX+重楼皂苷 I	Chol+DOX+重楼皂苷 I
重楼皂苷 I	2.02±0.30	4.88±0.68	—	0.61±0.18	2.82±0.45
DOX	—	—	0.77±0.12	0.32±0.095	1.41±0.15



注：A 为重楼皂苷 I 组和 Chol+重楼皂苷 I 组中重楼皂苷 I 的细胞存活曲线；B 为 DOX 组、DOX+重楼皂苷 I 组及 Chol+DOX+重楼皂苷 I 组中 DOX 的细胞存活曲线。

图 7 重楼皂苷 I 对 DOX 在 HepG2 细胞中敏感性的影响

47.1%^[17]。我国作为肝癌高发国家，中晚期肝癌患者比例高，肝癌的高复发率和转移率以及耐药问题使其防控形势

异常严峻。目前，采用中西医联合治疗肝癌在临幊上取得了较好的效果，特别是在增加化疗药物疗效和提高敏感性

方面有一定优势。

目前，中药活性成分在临床肿瘤防治中越发重要，甾体皂苷作为中药和天然药物中一类重要的生物活性物质，大多存在于单子叶植物的百合科、石蒜科和薯蓣科等植物中，包括中药知母、天冬、重楼等。甾体皂苷具有广泛的生物活性，如抗肿瘤、降血脂、抗炎和调节免疫等作用^[18]。重楼皂苷 I 针对多种肿瘤细胞都具有良好抗肿瘤药效，同时研究也表明其可增加各分类化疗药物敏感性，提升化疗药物疗效。基于课题组前期对重楼皂苷 I 降低肿瘤胆固醇含量的研究，及相关研究证实细胞膜上胆固醇降低可影响脂筏的形成及聚集，起到抗肿瘤以及逆转耐药等相关作用^[19]。表明重楼皂苷 I 具有良好的改善化疗药物敏感性，逆转肿瘤细胞耐药的前景，但其具体机制尚不明确，有待进一步研究。

脂筏为细胞质膜上富含胆固醇和鞘磷脂的微结构域。其中，胆固醇为促进脂筏形成的重要原料，去除细胞膜上胆固醇可改变与脂筏结合的膜成分的分布或功能^[20]。脂筏在细胞膜表面可结合不同种类的蛋白如胆固醇结合蛋白及跨膜蛋白等，广泛参与了细胞信号传导及物质转运等细胞事件。ABCA1 蛋白为细胞膜上 ABC 转运家族蛋白之一，它在促进胆固醇外流出细胞进而启动逆向转运的起始阶段发挥重要的作用^[21]。本实验基于重楼皂苷 I 与胆固醇的结合作用，发现其在体外可与胆固醇结合形成凝胶固态物，进一步探究了重楼皂苷 I 对 HepG2 细胞膜胆固醇的影响，发现其可通过与膜胆固醇形成复合物。重楼皂苷 I 不仅增强了质膜的流动性和通透性，而且破坏了细胞膜上脂筏的分布，进一步抑制了 ABC 转运蛋白的表达和功能，使更多的 DOX 到达细胞质或细胞核并增加对肿瘤细胞的敏感性。该结果为中药活性成分与化疗药物联合使用提供了新的研究思路，并为重楼皂苷 I 的抗肿瘤机制提供了新的理论和实验基础。

参考文献：

- [1] 孙晓丽, 朱毅. 细胞膜脂筏结构蛋白质组与血管内皮细胞功能调控[J]. 天津医药, 2015, 43(8): 845-847.
- [2] Rothnie A, Theron D, Soceneantu L, et al. The importance of cholesterol in maintenance of P-glycoprotein activity and its membrane perturbing influence[J]. *Eur Biophys J*, 2001, 30(6): 430-442.
- [3] Rodrigues D S C, Fonseca I, Dias S, et al. Plasma level of LDL-cholesterol at diagnosis is a predictor factor of breast tumor progression[J]. *BMC Cancer*, 2014, 14(1): 132-132.
- [4] Weinstein J N, Collisson E A, Mills G B, et al. The cancer genome atlas pan-cancer analysis project[J]. *Nat Genet*, 2013, 45(10): 1113-1120.
- [5] van Gijsel-Bonnello M, Acar N, Molino Y, et al. Pantethine alters lipid composition and cholesterol content of membrane rafts, with down-regulation of CXCL12-induced t cell migration [J]. *J Cell Physiol*, 2015, 230(10): 2415-2425.
- [6] Jacques C, Martin M B, Elise R, et al. Cell biology of caveolae and caveolin[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 49(3): 223-235.
- [7] Zalba S. Sensitization of drug resistant sarcoma tumors by membrane modulation via short chain sphingolipid-containing nanoparticles[J]. *Nanoscale*, 2020, 12(32): 16967-16979.
- [8] Zhang Z, Ma C, Li P, et al. Reversal effect of FW-04-806, a macrolide dilactone compound, on multidrug resistance mediated by ABCB1 and ABCG2 *in vitro* and *in vivo*[J]. *Cell Commun Signal*, 2019, 17(1): 110.
- [9] 李世昌, 彭寿杰, 王一博, 等. 重楼本草考证[J]. 中成药, 2023, 45(8): 2662-2670.
- [10] 喻青青, 樊旭, 朱敏, 等. 重楼皂苷 I 抗肝癌细胞作用的初步研究[J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(1): 57-60.
- [11] 彭鹏, 金鑫, 申杰, 等. 重楼皂苷 I 通过激活 AMPK 信号通路诱导非小细胞肺癌自噬的作用机制[J]. 湖北医药学院学报, 2021, 40(1): 1-6.
- [12] 张特, 张亮, 陆俊霏, 等. 重楼皂苷 I 靶向 EGFR 影响人乳腺癌细胞增殖及凋亡的作用机制[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(3): 721-729.
- [13] Song S C, Du L W, Jiang H, et al. Paris saponin I sensitizes gastric cancer cell lines to cisplatin via cell cycle arrest and apoptosis[J]. *Med Sci Monit*, 2016, 22: 3798-3803.
- [14] Zhu X, Na X, Zeng Y, et al. Polyphyllin I combined with doxorubicin shows chemosensitization effect *in vivo* and reduces immunotoxicity of doxorubicin[J]. *Mol Cell Toxicol*, 2022: 1-11.
- [15] Ihkwan R S, Yamunadevi S, Nataliya F, et al. Membrane disintegration caused by the steroid saponin digitonin is related to the presence of cholesterol[J]. *Molecules*, 2015, 20(11): 20146-20160.
- [16] 国家卫生健康委办公厅. 原发性肝癌诊疗指南(2022年版)[J]. 中华外科杂志, 2022, 60(4): 273-309.
- [17] 牛玉清, 杨冰, 王丽, 等. 抗肝癌中药作用机制研究进展[J]. 中医肿瘤学杂志, 2021, 3(6): 88-96.
- [18] 杨贝贝, 曹栋, 耿亚男, 等. 植物甾醇与胆固醇对脂质体膜性质的影响[J]. 食品工业科技, 2013, 34(7): 77-81.
- [19] Un-Jung Y, Ji-Hye L, Kyung H K, et al. Lipid raft modulation by Rp1 reverses multidrug resistance via inactivating MDR-1 and Src inhibition[J]. *Biochem Pharmacol*, 2013, 85(10): 1441-1453.
- [20] 刘卫霞, 祝贺, 邢艳霞. 脂筏促进肿瘤发生的分子机制研究进展[J]. 山东医药, 2015, 55(33): 103-105.
- [21] 王琳, 贾宇, 姜远英. 脂筏参与耐药: 多药耐药相关 ABC 转运蛋白与脂筏的关系[J]. 第二军医大学学报, 2011, 32(2): 213-215.