

瑞马唑仑通过调控 HMGB1/TLR4/NF- κ B 通路促进卵巢癌细胞焦亡的作用机制研究[△]

杨小会^{1*}, 韩毅^{2#}, 吴立丽³ (1. 山西医科大学麻醉学院, 太原 030001; 2. 山西医科大学第二医院麻醉科, 太原 030001; 3. 山西医科大学附属运城中心医院肿瘤科, 山西 运城 044000)

中图分类号 R971⁺.2;R96 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2025)08-0918-07

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2025.08.004



摘要 目的:探讨瑞马唑仑(Rem)调控细胞焦亡对卵巢癌(OC)细胞恶性生物学行为的影响,以及高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)/Toll 样受体(TLR)4/核因子 κ B(NF- κ B)通路在其中的可能作用机制。方法:以人 OC 细胞株 SKOV3 为研究对象,噻唑蓝法筛选 Rem 有效干预浓度分为对照组、Rem 低剂量(2.5 μ mol/L)组、Rem 中剂量(5 μ mol/L)组、Rem 高剂量(10 μ mol/L)组、Rem+si-NC 组和 Rem+si-HMGB1 组。采用集落形成实验、Transwell 实验和流式细胞术检测细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡;通过倒置显微镜观察各组细胞形态变化;二氢乙锭染色评估活性氧(ROS)的产生;采用相应试剂盒检测培养基上清液中乳酸脱氢酶(LDH)漏出率、白细胞介素(IL)1 β 和 IL-18 含量;采用蛋白质印迹法检测焦亡和 HMGB1/TLR4/NF- κ B 通路相关蛋白表达。结果:与 0 μ mol/L Rem 处理的 SKOV3 细胞比较,1.25~20 μ mol/L Rem 处理 48 h 后细胞存活率逐渐降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与对照组比较,Rem 低、中和高剂量组 SKOV3 细胞集落形成数、迁移和侵袭细胞数逐渐降低,凋亡率逐渐升高,细胞数量减少,出现明显胞质肿胀和膜破裂,伴有气泡状突出物出现现象,ROS 水平、LDH 漏出率、IL-1 β 和 IL-18 含量,核苷酸结合结构域富含亮氨酸重复序列和含热蛋白结构域受体 3(NLRP3)、凋亡相关斑点样蛋白质(ASC)、裂解型半胱天冬酶-1(cleaved-caspase-1)、消皮素 D N 末端片段(GSDMD-N)、HMGB1、TLR4 和 NF- κ B 蛋白表达逐渐升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与 Rem+si-NC 组比较,Rem+si-HMGB1 组 SKOV3 细胞 NLRP3、ASC、cleaved-caspase-1、GSDMD-N、HMGB1、TLR4 和 NF- κ B 蛋白表达减少,细胞存活率升高,细胞凋亡率、LDH 漏出率、IL-1 β 和 IL-18 含量降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论:Rem 可抑制 OC 细胞增殖、迁移和侵袭,并促进细胞凋亡和损伤,其机制可能与激活 HMGB1/TLR4/NF- κ B 通路诱导 OC 细胞焦亡有关。

关键词 瑞马唑仑; 卵巢癌; 焦亡; 高迁移率族蛋白 B1/Toll 样受体 4/核因子 κ B 通路

Mechanism of Remazolam in Promoting Pyroptosis of Ovarian Cancer Cells by Regulating HMGB1/TLR4/NF- κ B Pathway[△]

YANG Xiaohui¹, HAN Yi², WU Lili³ (1. College of Anesthesiology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; 2. Dept. of Anesthesiology, Shanxi Medical University Second Hospital, Taiyuan 030001, China; 3. Dept. of Oncology, Yuncheng Central Hospital Affiliated to Shanxi Medical University, Shanxi Yuncheng 044000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To probe into the effect of remimazolam (Rem) in regulating pyroptosis on malignant biological behavior of ovarian cancer (OC) cells, and explore the possible mechanism of high mobility group protein B1 (HMGB1)/Toll-like receptor (TLR) 4/nuclear factor κ B (NF- κ B) pathway. **METHODS:** Human OC cell SKOV3 was used as the research object, and the effective intervention concentration of Rem screened by Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide method was divided into the control group, Rem low-dose (2.5 μ mol/L) group, Rem medium-dose (5 μ mol/L) group, Rem high-dose (10 μ mol/L) group, Rem+si-NC group and Rem+si-HMGB1 group. Colony formation assay, Transwell assay and flow cytometry were used to detect cell proliferation, migration, invasion and apoptosis. Inverted microscope was used to observe the morphologic changes of the cells in each group. Dihydroethidium (DHE) staining was used to assess the production of reactive oxygen species (ROS). The corresponding kit was used to detect the rate of lactate dehydrogenase (LDH) leakage and the content of interleukin (IL)-1 β and IL-18 in the supernatant of the culture medium. Western blot was used to detect the pyroptosis and HMGB1/TLR4/NF- κ B pathway-related protein expression. **RESULTS:** Compared with 0 μ mol/L Rem-

△ 基金项目:山西省基础研究计划(No. 20210302123266)

* 主治医师。研究方向:麻醉药理学、器官保护。E-mail:13593596755@163.com

通信作者:副主任医师。研究方向:麻醉药理学、器官保护。E-mail:13753171979@163.com

treated SKOV3 cells, the cell survival rate decreased after 1.25 to 20 $\mu\text{mol/L}$ Rem treatment for 48 h, with statistically significant differences ($P < 0.05$). Compared with control group, SKOV3 cells in the Rem low-, medium- and high-dose groups showed a decrease in the number of colony forming, migrating and invading cells, a increase in the apoptosis rate, a decrease in the number of cells, obvious cytoplasmic swelling and membrane rupture accompanied by the phenomenon of bubbly protruding material emerging, and a increase in the levels of ROS, rate of LDH leakage, contents of IL-1 β and IL-18, expression of nucleotide-binding domain leucine-rich repeat-containing receptor 3 (NLRP3), apoptosis-associated speck-like protein (ASC), cleaved-caspase-1, N-terminal fragment of dermatan D (GSDMD-N), HMGB1, TLR4 and NF- κ B proteins, with statistically significant differences ($P < 0.05$). Compared with the Rem+si-NC group, SKOV3 cells in the Rem+si-HMGB1 group showed decreased expression of NLRP3, ASC, cleaved-caspase-1, GSDMD-N, HMGB1, TLR4 and NF- κ B proteins, increased cell survival rate, and decreased apoptosis rate, LDH leakage, content of IL-1 β and IL-18, the difference was statistically significant ($P < 0.05$).

CONCLUSIONS: Rem could inhibit OC cell proliferation, migration and invasion and promote apoptosis and cell injury, and the mechanism may be related to the activation of HMGB1/TLR4/NF- κ B pathway to induce OC cell pyroptosis.

KEYWORDS Remimazolam; Ovarian cancer; Pyroptosis; HMGB1/TLR4/NF- κ B pathway

卵巢癌 (ovarian cancer, OC) 是威胁女性健康的妇科肿瘤中死亡率最高的恶性肿瘤^[1]。由于大多数化疗药的非特异性和不良反应严重限制其治疗效果, OC 患者的 5 年生存率较低^[2]。这导致患者需在麻醉下进行手术治疗。瑞马唑仑 (remimazolam, Rem) 是超短效苯二氮草类麻醉剂, 作用于脑内的 γ -氨基丁酸 (GABA) 受体, 具有起效快、恢复迅速和血流动力学稳定等特点^[3]。临床研究发现, 与常用麻醉剂相比, Rem 在诱导成功率和恶心、呕吐、低血压等不良事件发生率方面具有显著安全性优势, 提示其广泛的临床应用前景^[4-5]。据报道, OC 样本中 GABA 含量可随着恶性肿瘤的进展而蓄积, 瘤内 GABA 低含量患者比 GABA 高含量患者存活时间更长^[6]。基础研究也证实, GABA 受体激活可促进 OC 细胞恶性生物学行为进展^[7]。但以 GABA 为靶点的 Rem 对 OC 细胞的影响及机制尚不明确。细胞焦亡是细胞程序性死亡形式, 通常伴随炎症反应^[8]。与传统的非炎性死亡方式不同, 焦亡可在体内吸引免疫细胞, 在肿瘤组织中引起强大的免疫反应, 抑制其增殖, 已成为抗肿瘤治疗的新型治疗方式^[8]。高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 为高迁移率族蛋白超家族成员, 具有较强的致炎性, 可通过激活下游 Toll 样受体 (TLR) 4 后激活核因子 κ B (NF- κ B) 通路, 刺激免疫细胞分泌炎症因子, 诱导细胞焦亡^[9-10]。有证据表明, HMGB1/TLR4 信号蛋白在 OC 组织中呈高表达并与临床病理特征相关^[11]。因此, 本研究拟在此基础上通过体外实验, 探究 Rem 对 OC 细胞焦亡的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 实验细胞

人 OC 细胞株 SKOV3 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。复苏后接种于含 10% 胎牛血清和 1% 链霉素/青霉素的 RPMI-1640 细胞培养基中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中培养。待细胞生长至对数生长期时进行后续实验。

1.2 仪器

Spark 多功能酶标仪 (西安纵横仪器科技有限公司); BD

FACSCalibur 流式细胞仪, ChemiDocTMXRS+扫描成像仪 (美国 BD 公司); BX53 光学显微镜 (日本 Olympus 公司); DYCZ-24DN 蛋白电泳仪 (北京六一仪器厂)。

1.3 药品与试剂

Rem (四川维克奇生物科技有限公司); 噻唑蓝 (MTT) 检测试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司); Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (上海碧云天生物技术股份有限公司); 二氢乙锭 (DHE) 荧光探针法活性氧检测试剂盒 (北京百奥莱博科技有限公司); 乳酸脱氢酶 (LDH) 微量法检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 白细胞介素 (IL) 1 β 和 IL-18 的酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测试剂盒 (武汉赛培生物科技有限公司); 核苷酸结合结构域富含亮氨酸重复序列和含热蛋白结构域受体 3 (NLRP3)、凋亡相关斑点样蛋白质 (ASC)、裂解型半胱天冬酶-1 (cleaved-caspase-1)、消皮素 D N 末端片段 (GSDMD-N)、HMGB1、TLR4 和 NF- κ B 抗体 (美国 Abcam 公司)。

1.4 MTT 筛选 Rem 干预浓度

将对数生长期的 SKOV3 细胞以 4×10^3 个/孔的密度均匀接种至 96 孔板中, 培养 24 h 后, 分别加入 0、1.25、2.5、5、10 及 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 Rem, 每个浓度设置 4 个复孔。24 h 后加入 MTT 试剂 (10 μL /孔), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 利用酶标仪检测 450 nm 波长处各孔吸光度 (A), 细胞存活率 (%) = $A_{\text{实验组}}/A_{\text{对照组}} \times 100\%$ 。

1.5 实验分组及处理

取对数生长期的 SKOV3 细胞均匀接种至 6 孔板, 分为对照组、Rem 低剂量 (2.5 $\mu\text{mol/L}$) 组、Rem 中剂量 (5 $\mu\text{mol/L}$) 组、Rem 高剂量 (10 $\mu\text{mol/L}$) 组、Rem + si-NC 组和 Rem + si-HMGB1 组, 每组设置 3 个复孔。待细胞融合度达 70% 左右时, Rem 低、中和高剂量组加入对应剂量 Rem 处理。Rem + si-NC 组和 Rem + si-HMGB1 组细胞在加入 10 $\mu\text{mol/L}$ Rem 处理后, 按照 LipofectamineTM 2000 脂质体说明书转染 si-NC 或 si-HMGB1。对照组仅给予等量磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 处理, 所有细胞均培养 24 h 后进行后续实验。

1.6 集落形成实验检测细胞增殖

将对数生长期的 SKOV3 细胞均匀接种于 6 孔板 (1×10^3 个/孔), 培养 12 h 后, 用含 10% 胎牛血清的培养基替换上清液, 在 37 °C 细胞培养箱中孵育 2 周。弃去培养基, PBS 清洗, 4% 多聚甲醛固定 30 min, 0.2% 结晶紫染色 30 min, 清洗后光学显微镜下拍照并统计各组集落数。

1.7 Transwell 实验检测细胞迁移和侵袭

使用具有或不具有 Matrix 基质胶的 Transwell 腔室测定来观察细胞迁移和侵袭能力。在用相关药物或干预处理各组细胞 24 h 后, 将约 1.5×10^4 个各组细胞均匀接种于无血清的 Transwell 上室中(侵袭实验需在上室中提前加入预冷的基质胶, 迁移实验无需加入基质胶), 下室加入含有 10% 胎牛血清的完全培养基 600 μ L。培养 48 h 后, 取出上室并用 PBS 洗涤, 4% 多聚甲醛固定 15 min 并用结晶紫染色 10 min。去除未从膜顶部迁移/侵入的细胞, 在光学显微镜下观察细胞并拍照计数。

1.8 流式细胞术检测细胞凋亡

收集各组 SKOV3 细胞, 4 °C 下 1 000 r/min 离心(离心半径为 10 cm)5 min, 重复 2 次, 弃去上层液体。对于细胞周期分析, 加入 70% 乙醇固定细胞 12 h, 然后在 4 °C 下 2 000 r/min 离心(离心半径为 10 cm)5 min, 弃去乙醇, 加入 100 μ L 碘化丙啶(500 μ g/mL), 避光孵育 15 min。对于凋亡分析, 加入 1 \times 结合缓冲液重悬细胞, Annexin V-FITC 和碘化丙啶各 5 μ L, 标记 20 min。采用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.9 倒置显微镜观察各组细胞形态变化

各组细胞相应处理 24 h 后, 弃去培养基, 取出 6 孔板并放于倒置显微镜下观察细胞形态变化并拍照记录。

1.10 DHE 染色评估各组细胞活性氧(ROS)产生

弃去各组细胞培养基, 4% 多聚甲醛固定 30 min 后, 根据制造商说明书加入 DHE 试剂在 37 °C 黑暗环境中孵育 30 min, PBS 洗涤 3 次。超氧化物在 DHE 染料存在下显示红色荧光。用 DAPI(蓝色荧光)对细胞核进行复染。荧光显微镜下拍照记录, 并使用 Image J 定量。

1.11 各组细胞培养基上清液中 LDH 漏出率及 IL-1 β 和 IL-18 含量检测

各组细胞经对应处理 72 h 后, 收集培养基上清液, 分别按照 LDH 检测试剂盒、IL-1 β 和 IL-18 的 ELISA 检测试剂盒说明书方法, 测定上清液中 LDH 含量(细胞损伤重要标志)、IL-1 β 和 IL-18 含量(炎症因子指标)。

1.12 蛋白质印迹法检测各组细胞中焦亡和 HMGB1/TLR4/NF- κ B 通路相关蛋白表达

将各组细胞在含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 500 μ L 放射免疫沉淀分析裂解缓冲液中裂解, 然后在 4 °C、13 500 r/min 条件下离心(离心半径 10 cm)25 min。采用二喹啉甲酸法检测上清液中的蛋白浓度。用 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳对总蛋白进行分离, 然后将分离蛋白转移到聚偏二氯乙烯膜上。将膜在含有 5% 脱脂牛奶的 PBS 溶液中室温(25 °C)阻断 2 h, 加入 NLRP3、ASC、cleaved-

caspase-1、GSDMD-N、HMGB1、TLR4 和 NF- κ B 一抗 4 °C 孵育过夜。次日, 与相应二抗室温孵育 1 h。蛋白表达通过奥德赛红外成像系统进行扫描和定量, 以 GAPDH 为内参。

1.13 统计学方法

采用 SPSS 26.0 统计学软件对数据进行分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 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(ANOVA)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Rem 对 OC 细胞存活率的影响

MTT 结果显示, 与 0 μ mol/L Rem 处理的 SKOV3 细胞比较, 1.25~20 μ mol/L Rem 处理 48 h 后细胞存活率逐渐降低, 呈浓度依赖性, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见表 1。经计算 Rem 的半数抑制浓度(IC_{50})约为 5 μ mol/L, 故选用 2.5、5 和 10 μ mol/L 浓度进行后续实验。

表 1 不同浓度 Rem 对 OC 细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| Rem 浓度/ μ mol/L | 细胞存活率/% |
|---------------------|---------------------|
| 0 | 100.05 \pm 4.63 |
| 1.25 | 83.72 \pm 5.26* |
| 2.5 | 63.18 \pm 3.67** |
| 5 | 49.36 \pm 2.74*** |
| 10 | 24.55 \pm 2.33*** |
| 20 | 23.41 \pm 2.25*** |

注: 与 0 μ mol/L Rem 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

2.2 Rem 对 OC 细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响

与对照组比较, Rem 低、中和高剂量组 SKOV3 细胞集落形成数、迁移和侵袭细胞数逐渐降低, 细胞凋亡率逐渐升高, 呈浓度依赖性, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见图 1、表 2。

表 2 各组 OC 细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡水平比较

| 组别 | ($\bar{x} \pm s, n = 3$) | | | |
|----------|----------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|
| | 集落形成数/个 | 迁移细胞数/个 | 侵袭细胞数/个 | 细胞凋亡率/% |
| 对照组 | 136.27 \pm 8.36 | 362.73 \pm 26.35 | 334.78 \pm 32.15 | 6.72 \pm 0.67 |
| Rem 低剂量组 | 103.46 \pm 12.31* | 162.97 \pm 28.33*** | 148.93 \pm 25.67*** | 12.88 \pm 1.25** |
| Rem 中剂量组 | 52.35 \pm 5.47*** | 92.36 \pm 11.67*** | 84.35 \pm 10.45*** | 17.94 \pm 0.58*** |
| Rem 高剂量组 | 16.38 \pm 3.11*** | 40.42 \pm 6.44*** | 35.12 \pm 4.78*** | 26.37 \pm 3.62*** |

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

2.3 Rem 对 OC 细胞形态的影响

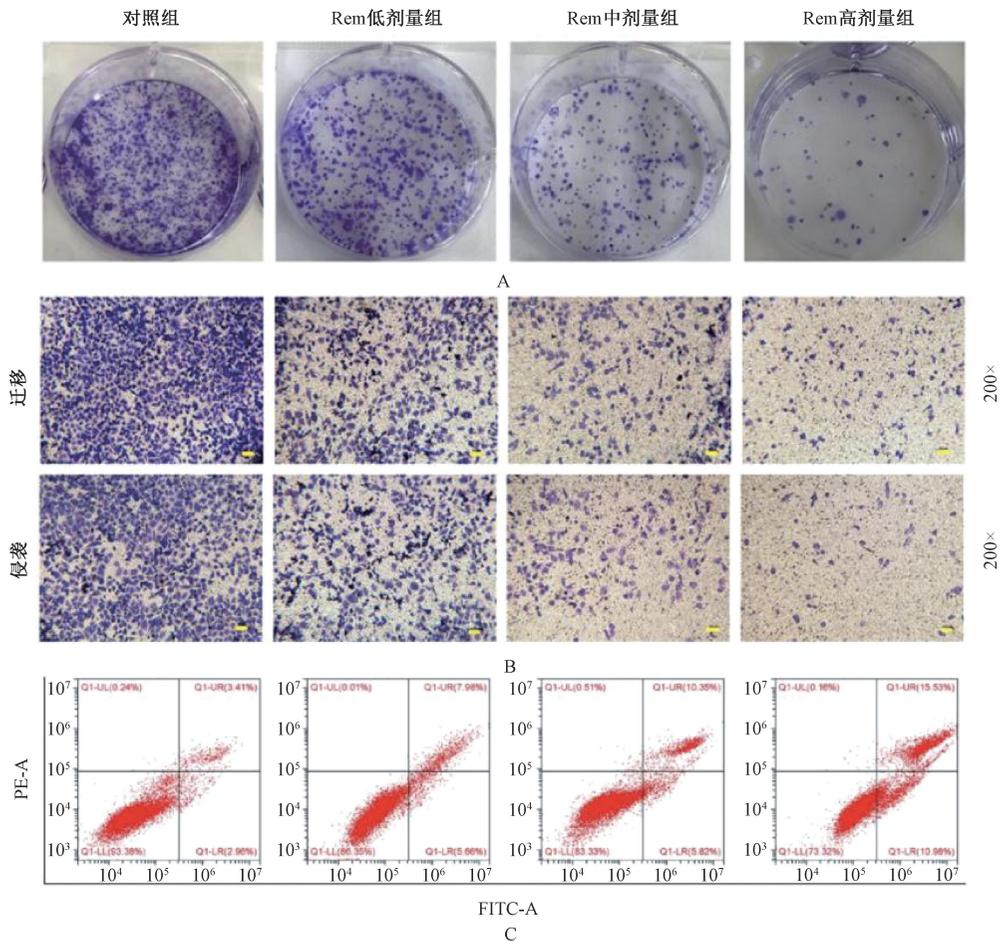
通过倒置显微镜观察细胞形态变化发现, 与对照组比较, Rem 低、中和高剂量组 SKOV3 细胞数量减少, 出现明显胞质肿胀和膜破裂, 伴有气泡状突出物冒出现象, 出现典型焦亡特征, 见图 2。

2.4 Rem 对 OC 细胞氧化应激、LDH 漏出率和炎症因子的影响

与对照组比较, Rem 低、中和高剂量组 SKOV3 细胞 ROS 水平、LDH 漏出率、IL-1 β 和 IL-18 含量均逐渐升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见图 3、表 3。

2.5 Rem 对 OC 细胞焦亡和 HMGB1/TLR4/NF- κ B 通路的影响

蛋白质印迹法结果显示, 与对照组比较, Rem 低、中和高剂



A. 集落成型实验; B. Transwell 实验; C. 流式细胞术。

图 1 Rem 对 OC 细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响

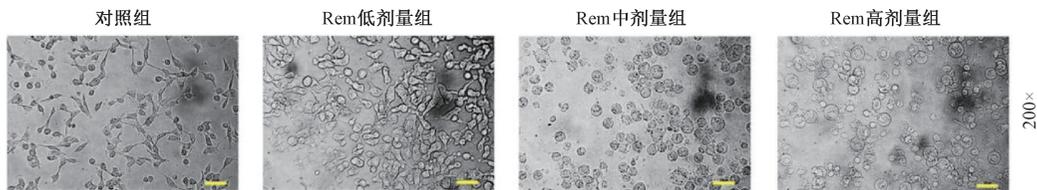


图 2 Rem 对 OC 细胞形态的影响 (×200)

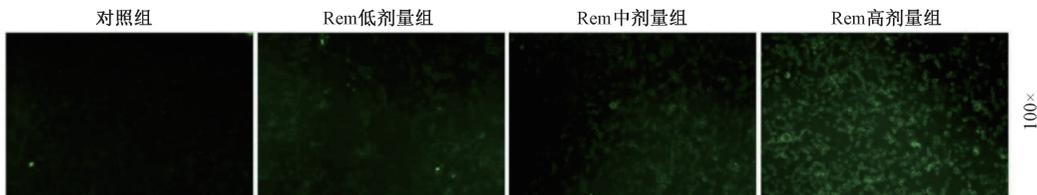


图 3 Rem 对 OC 细胞氧化应激的影响

量组 SKOV3 细胞 NLRP3、ASC、cleaved-caspase-1、GSDMD-N、HMGB1、TLR4 和 NF- κ B 蛋白表达均逐渐升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 4、表 4。

2.6 Rem 通过激活 HMGB1/TLR4/NF- κ B 通路触发 OC 细胞焦亡

与对照组比较, Rem 高剂量组 SKOV3 细胞 NLRP3、ASC、cleaved-caspase-1、GSDMD-N、HMGB1、TLR4 和 NF- κ B 蛋白表

达增多, 细胞存活率降低, 细胞凋亡率、LDH 漏出率、IL-1 β 和 IL-18 含量均升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 Rem + si-NC 组比较, Rem + si-HMGB1 组 SKOV3 细胞 NLRP3、ASC、cleaved-caspase-1、GSDMD-N、HMGB1、TLR4 和 NF- κ B 蛋白表达减少, 细胞存活率升高, 细胞凋亡率、LDH 漏出率、IL-1 β 和 IL-18 含量均降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 5、表 5—6。

表 3 各组 OC 细胞氧化应激、LDH 漏出率和炎症因子

水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 组别 | DHE 荧光强度/AU | LDH 漏出率/% | IL-1 β /(pg/mL) | IL-18/(pg/mL) |
|----------|---------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|
| 对照组 | 6.57 \pm 0.87 | 14.33 \pm 3.68 | 41.37 \pm 2.57 | 51.38 \pm 4.31 |
| Rem 低剂量组 | 14.67 \pm 1.58*** | 23.87 \pm 2.93** | 63.87 \pm 8.93* | 84.79 \pm 6.11*** |
| Rem 中剂量组 | 27.83 \pm 4.94*** | 36.71 \pm 4.52*** | 93.15 \pm 5.64*** | 118.74 \pm 14.36*** |
| Rem 高剂量组 | 34.89 \pm 6.33*** | 46.79 \pm 5.47*** | 115.83 \pm 6.79*** | 157.38 \pm 7.45*** |

注:与对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

3 讨论

OC 是妇科最常见的三大恶性肿瘤之一,且死亡率最高^[1]。由于临床实践中缺乏特异性症状和有效筛查手段,OC 早期诊断困难,患者平均 5 年生存率仅为 44%^[2]。虽然化疗在晚期 OC 中可以达到与手术相似的治疗效果,但根治性切除仍然是 OC 的主要治疗手段^[2]。因此,麻醉药物的选择对于 OC 根治术至关重要。

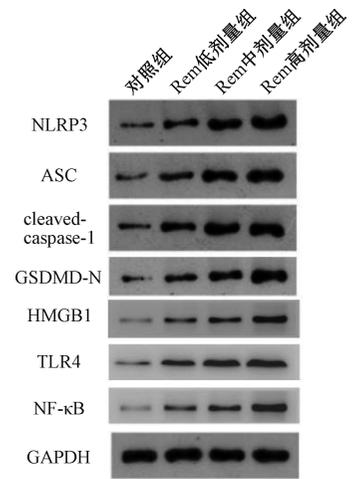
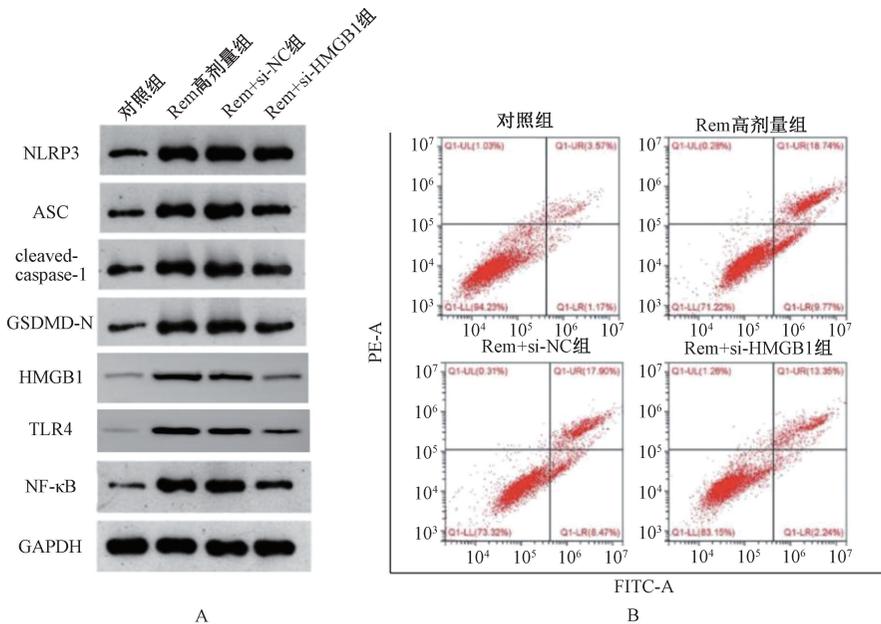


图 4 Rem 对 OC 细胞焦亡和 HMGB1/TLR4/NF- κ B 通路的影响

表 4 各组 OC 细胞焦亡和 HMGB1/TLR4/NF- κ B 通路相关蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 组别 | NLRP3 | ASC | cleaved-caspase-1 | GSDMD-N | HMGB1 | TLR4 | NF- κ B |
|----------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 对照组 | 1.02 \pm 0.13 | 1.06 \pm 0.08 | 1.02 \pm 0.08 | 0.98 \pm 0.05 | 1.01 \pm 0.07 | 1.03 \pm 0.05 | 0.99 \pm 0.03 |
| Rem 低剂量组 | 1.83 \pm 0.24** | 1.96 \pm 0.09*** | 2.07 \pm 0.35** | 1.74 \pm 0.14*** | 1.47 \pm 0.09** | 2.43 \pm 0.21*** | 1.78 \pm 0.11*** |
| Rem 中剂量组 | 2.71 \pm 0.18*** | 2.94 \pm 0.23*** | 3.16 \pm 0.11*** | 2.14 \pm 0.15*** | 2.19 \pm 0.11*** | 2.89 \pm 0.33*** | 2.23 \pm 0.16*** |
| Rem 高剂量组 | 3.69 \pm 1.20*** | 3.81 \pm 0.32*** | 3.87 \pm 0.32*** | 3.25 \pm 0.27*** | 3.05 \pm 0.34*** | 3.25 \pm 0.36*** | 4.36 \pm 0.36*** |

注:与对照组比较,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。



A. 蛋白质印迹法;B. 流式细胞术。

图 5 Rem 通过激活 HMGB1/TLR4/NF- κ B 通路触发 OC 细胞焦亡

表 5 抑制 HMGB1 后 HMGB1/TLR4/NF- κ B 通路和焦亡相关蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 组别 | NLRP3 | ASC | cleaved-caspase-1 | GSDMD-N | HMGB1 | TLR4 | NF- κ B |
|----------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 对照组 | 1.02 \pm 0.02 | 1.01 \pm 0.03 | 0.99 \pm 0.04 | 1.02 \pm 0.05 | 0.98 \pm 0.04 | 0.99 \pm 0.05 | 1.04 \pm 0.07 |
| Rem 高剂量组 | 2.43 \pm 0.08*** | 2.09 \pm 0.11*** | 2.36 \pm 0.27*** | 2.43 \pm 0.31*** | 2.56 \pm 0.22*** | 3.68 \pm 0.31*** | 3.47 \pm 0.29*** |
| Rem+si-NC 组 | 2.51 \pm 0.13 | 2.32 \pm 0.13 | 2.38 \pm 0.23 | 2.57 \pm 0.07 | 2.35 \pm 0.21 | 3.13 \pm 0.22 | 3.36 \pm 0.27 |
| Rem+si-HMGB1 组 | 1.84 \pm 0.07### | 1.51 \pm 0.15### | 1.65 \pm 0.19### | 1.81 \pm 0.12### | 1.67 \pm 0.14### | 1.86 \pm 0.12### | 1.75 \pm 0.12### |

注:与对照组相比,*** $P<0.001$;与 Rem+si-NC 组相比,### $P<0.001$ 。

Rem 作用于 GABA 受体,具有起效快、代谢快、无蓄积、血流动力学稳定和呼吸抑制轻微等特点。临床研究表明,Rem

是多种恶性肿瘤手术治疗的理想麻醉剂,镇静效果好,呼吸抑制和血流动力学波动小,不良反应少^[12-14]。这些研究强调了

表6 Rem通过激活HMGB1/TLR4/NF-κB通路触发OC细胞焦亡($\bar{x}\pm s, n=3$)

| 组别 | 细胞存活率/% | 细胞凋亡率/% | LDH漏出率/% | IL-1β/(pg/mL) | IL-18/(pg/mL) |
|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|----------------|
| 对照组 | 102.83±4.37 | 6.53±1.32 | 16.67±3.41 | 38.29±8.93 | 52.63±3.77 |
| Rem高剂量组 | 45.82±5.13*** | 27.83±3.16*** | 47.83±7.94*** | 114.67±6.34*** | 154.27±6.58*** |
| Rem+si-NC组 | 48.92±5.75 | 26.83±1.69 | 49.35±4.67 | 110.62±6.12 | 142.36±9.26 |
| Rem+si-HMGB1组 | 78.84±7.73### | 15.43±0.79### | 28.93±5.23### | 77.83±12.13## | 99.36±8.37### |

注:与对照组相比,*** $P<0.001$;与Rem+si-NC组相比,## $P<0.01$,### $P<0.001$ 。

其广泛且有效的临床应用前景。此外,Rem对恶性肿瘤细胞恶性生物学影响的相关基础研究也取得了一定进展。Liu等^[15]研究发现,Rem可通过调控转位因子蛋白/电压依赖性阴离子通道通路抑制结直肠癌细胞增殖及肿瘤标志物表达,并促进其凋亡。Peng等^[16]研究发现,Rem可能通过调控脊髓星形胶质细胞转位蛋白减轻小鼠骨癌痛。Xu等^[17]研究显示,Rem可通过下调NF-κB通路抑制胶质瘤细胞生长并诱导其凋亡。但Rem对OC细胞恶性生物学行为的影响尚未可知。本研究结果显示,Rem可抑制OC细胞增殖、迁移和侵袭,并抑制其凋亡,与Liu等^[15]和Xu等^[17]的研究结果类似。上述结果提示,Rem可能是抑制OC细胞恶性生物学进展的有效药物。

焦亡的特点是GSDMD蛋白在质膜上形成多个孔后导致细胞内容物渗漏、细胞肿胀,最终在渗透压破坏后导致细胞死亡^[8]。多种抗肿瘤药(如顺铂和紫杉醇)可诱导细胞焦亡,不仅可以抑制OC细胞增殖,还可以通过细胞内蛋白渗漏产生抗原,从而恢复抗肿瘤免疫^[18]。caspase-1依赖性途径是细胞焦亡的经典途径,多种刺激(如NLRP3激活)可触发caspase-1激活以及GSDMD、IL-1β和IL-18前体的C端和N端裂解并插入细胞膜,引起多个5'-核苷三磷酸聚合形成内径为10~20nm的膜孔复合物,导致细胞内容物泄漏和细胞焦亡^[8]。近期研究证明,caspase-1依赖性细胞焦亡途径激活可杀伤OC细胞。如Calbay等^[19]研究发现,二十二碳六烯酸可通过增加caspase-1活性,导致IL-1β分泌和GSDMD裂解,诱导OC细胞焦亡。此外,诱导细胞焦亡在减轻OC耐药性方面具有潜在价值,随着非凋亡性细胞死亡的进展,焦亡可以克服OC细胞对与凋亡缺陷相关化疗药耐药的作用^[20]。因此,诱导焦亡可能是抗OC治疗的有效方式。本研究中,Rem处理后,OC细胞中焦亡相关蛋白ASC、cleaved-caspase-1和GSDMD-N的表达水平呈浓度依赖性上调,表明Rem可能通过激活caspase-1,进而裂解GSDMD,诱导OC细胞焦亡。

越来越多的证据表明,炎症在肿瘤的发生、发展、侵袭和转移中起着重要作用^[8]。炎症小体是一种固有免疫通路,参与IL-1β、IL-18等促炎细胞因子的释放,其中炎症小体NLRP3是驱动caspase-1依赖的细胞焦亡途径的关键蛋白,在多种外源性刺激情况下触发炎症反应,这些反应涉及NF-κB炎症通路和ROS^[21]。多项研究结果表明,恶性肿瘤细胞中炎症和ROS调控的NLRP3激活是促进细胞焦亡的上游通路。Teng等^[22]发现,重楼皂苷VI可通过诱导ROS/NF-κB/NLRP3/GSDMD信号轴诱导非小细胞肺癌中caspase-1介导的细胞焦亡。Chen等^[23]发现,柴胡皂苷D通过增加ROS,激活NF-κB/NLRP3/caspase-1/GSDMD通路诱导肺癌细胞焦亡。与这些结果类似,本研究发现,Rem可促进OC细胞氧化应激、炎症因子分泌和

细胞损伤,提示Rem的焦亡触发作用可能是通过炎症和ROS通路发挥的。

HMGB1是高度保守的非组蛋白染色质结合细胞外核蛋白,通过结合染色质,稳定核小体,调节核转录,并作为细胞外信号分子发挥作用^[9]。目前认为,HMGB1由肿瘤细胞主动分泌,并由坏死细胞被动释放到肿瘤微环境^[9]。据报道,HMGB1在多种肿瘤类型中表达增加,包括OC、乳腺癌、前列腺癌、结直肠癌和胃癌,并与肿瘤发生、血管生成、转移和较差的生存率相关^[9]。此外,HMGB1高表达与OC的低分化、高分期和阳性淋巴结状态相关^[11]。TLR4通过整合炎症、血管生成与细胞死亡信号,不仅直接塑造促癌微环境,更通过与HMGB1的动态相互作用放大其病理效应^[24]。作为重要的损伤相关分子模式,HMGB1激活肿瘤细胞表面TLR启动促炎信号通路,介导肿瘤细胞释放细胞因子和趋化因子^[25]。这些分子募集免疫细胞,随后释放额外的细胞因子,抑制肿瘤生长。近期的研究证实,Rem可通过调控HMGB1/TLR4通路发挥作用,如Mao等^[26]发现,Rem可通过HMGB1/TLR4/NF-κB通路改善深低温停循环术后认知功能障碍。本研究结果显示,Rem处理可激活OC细胞HMGB1/TLR4/NF-κB通路,而抑制HMGB1表达可逆转Rem对OC细胞恶性生物学行为的抑制作用及对细胞焦亡的促进作用。提示Rem可能通过激活HMGB1/TLR4/NF-κB通路促进OC细胞焦亡。

综上所述,Rem可抑制OC细胞增殖、迁移和侵袭,并促进细胞凋亡和损伤,其机制可能与激活HMGB1/TLR4/NF-κB通路、诱导OC细胞焦亡有关。

参考文献

- [1] LUMISH M A, KOHN E C, TEW W P. Top advances of the year: ovarian cancer[J]. *Cancer*, 2024, 130(6): 837-845.
- [2] WANG L, WANG X, ZHU X P, et al. Drug resistance in ovarian cancer: from mechanism to clinical trial[J]. *Mol Cancer*, 2024, 23(1): 66.
- [3] HU Q X, LIU X, WEN C L, et al. Remimazolam: an updated review of a new sedative and anaesthetic[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2022, 16: 3957-3974.
- [4] DAI G R, PEI L L, DUAN F Y, et al. Safety and efficacy of remimazolam compared with propofol in induction of general anesthesia[J]. *Minerva Anesthesiol*, 2021, 87(10): 1073-1079.
- [5] 陈媛,朱明明. 瑞马唑仑对腹腔镜卵巢囊肿切除术的麻醉效果及对认知功能和应激反应的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2024, 34(7): 93-98.
- [6] HUANG D, WANG Y, THOMPSON J W, et al. Cancer-cell-derived GABA promotes β-catenin-mediated tumour growth and immunosuppression[J]. *Nat Cell Biol*, 2022, 24(2): 230-241.

(下转第927页)