

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research咪达唑仑调节 LKB1/AMPK 信号通路对
结直肠癌细胞增殖、侵袭及凋亡影响的研究

Research of midazolam on the proliferation, invasion and apoptosis of colorectal cancer cells by regulating the LKB1/AMPK signaling pathway

徐国兴^{1a}, 徐国亭^{1a}, 王苗级^{1a},
刘 耿^{1b}

(1. 南阳医学高等专科学校 第一附属医院, a. 麻醉与围术期医学科; b. 普通外科, 河南 南阳 473000)

XU Guo-xing^{1a}, XU Guo-ting^{1a},
WANG Miao-ji^{1a}, LIU Geng^{1b}

(1. a. Department of Anesthesiology and Perioperative Medicine; b. Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanyang Medical College, Nanyang 473000, Henan Province, China)

基金项目: 河南省医学科技攻关计划项目基金
资助项目 (LHGJ20210104)

作者简介: 徐国兴 (1984-), 男, 副主任医师, 从事临床麻醉方面的研究和工作

通信作者: 徐国兴

Tel: (0377) 63328360

E-mail: bvxxzn@163.com

摘要:目的 探讨咪达唑仑调节肝激酶 B1 (LKB1)/腺苷酸 (AMP) 活化蛋白激酶 (AMPK) 信号通路对结直肠癌细胞增殖、侵袭及凋亡的影响。方法 用细胞计数试剂盒-8 (CCK-8) 实验法检测不同浓度 (5、10、20 和 40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的咪达唑仑对 HCT116 细胞增殖的影响, 选择 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 咪达唑仑进行后续实验。将 HCT116 细胞分为空白组 (不作处理)、咪达唑仑组 (20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 咪达唑仑)、si-NC 组 (转染 si-NC 质粒)、si-LKB1 组 (转染 si-LKB1 质粒)、咪达唑仑 + si-NC 组 (转染 si-NC 质粒 + 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 咪达唑仑) 和咪达唑仑 + si-LKB1 组 (转染 si-LKB1 质粒 + 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 咪达唑仑)。用流式细胞法、细胞计数试剂盒-8 (CCK-8) 实验法、EdU 试剂盒法及 Transwell 实验法检测细胞凋亡、增殖及侵袭变化; 用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测 LKB1 和 AMPK mRNA 相对表达水平; 用蛋白质印迹法检测增殖细胞核抗原 (PCNA)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (Caspase-3)、金属蛋白酶 9 (MMP-9)、LKB1 和 AMPK 蛋白相对表达水平。结果 空白组、咪达唑仑组、si-NC 组、si-LKB1 组、咪达唑仑 + si-NC 组和咪达唑仑 + si-LKB1 组的 EdU 阳性率分别为 (62.52 $\pm$ 6.38)%、(35.26 $\pm$ 3.64)%、(61.95 $\pm$ 6.24)%、(88.63 $\pm$ 8.94)%、(36.05 $\pm$ 3.71)% 和 (55.62 $\pm$ 5.67)%、增殖率分别为 (90.85 $\pm$ 9.04)%、(48.85 $\pm$ 4.92)%、(91.04 $\pm$ 8.92)%、(129.32 $\pm$ 13.05)%、(49.05 $\pm$ 4.98)% 和 (79.86 $\pm$ 8.11)%、凋亡率分别为 (5.05 $\pm$ 0.53)%、(20.22 $\pm$ 2.15)%、(4.86 $\pm$ 0.49)%、(3.11 $\pm$ 0.35)%、(19.86 $\pm$ 2.08)% 和 (8.77 $\pm$ 0.91)%、侵袭数分别为 198.64 $\pm$ 20.45、122.53 $\pm$ 12.37、195.32 $\pm$ 20.34、286.61 $\pm$ 29.33、123.64 $\pm$ 12.46 和 176.64 $\pm$ 18.06, LKB1 mRNA 相对表达水平分别为 0.93 $\pm$ 0.10、2.86 $\pm$ 0.31、1.08 $\pm$ 0.12、0.57 $\pm$ 0.07、2.78 $\pm$ 0.29 和 1.55 $\pm$ 0.17, AMPK mRNA 相对表达水平分别为 1.06 $\pm$ 0.11、2.25 $\pm$ 0.24、0.98 $\pm$ 0.10、0.42 $\pm$ 0.05、2.19 $\pm$ 0.23 和 1.35 $\pm$ 0.15, PCNA 相对表达水平分别为 0.79 $\pm$ 0.08、0.42 $\pm$ 0.05、0.81 $\pm$ 0.09、1.22 $\pm$ 0.14、0.46 $\pm$ 0.05 和 0.68 $\pm$ 0.07, Caspase-3 相对表达水平分别为 0.92 $\pm$ 0.10、1.44 $\pm$ 0.16、1.03 $\pm$ 0.11、0.51 $\pm$ 0.06、1.48 $\pm$ 0.16 和 1.07 $\pm$ 0.11, MMP-9 相对表达水平分别为 0.98 $\pm$ 0.10、0.52 $\pm$ 0.06、1.01 $\pm$ 0.12、1.53 $\pm$ 0.17、0.58 $\pm$ 0.06 和 0.82 $\pm$ 0.09, LKB1 相对表达水平分别为 0.31 $\pm$ 0.03、0.76 $\pm$ 0.08、0.34 $\pm$ 0.04、0.15 $\pm$ 0.02、0.72 $\pm$ 0.08 和 0.45 $\pm$ 0.05, AMPK 相对表达水平分别为 0.44 $\pm$ 0.05、0.85 $\pm$ 0.09、0.42 $\pm$ 0.05、0.23 $\pm$ 0.03、0.80 $\pm$ 0.09 和 0.57 $\pm$ 0.06, 咪达唑仑组的上述指标与空白组比较; si-LKB1 组的上述指标与 si-NC 组比较; 咪达唑仑 + si-LKB1 组的上述指标与咪达唑仑 + si-NC 组及 si-LKB1 组比较, 在统计学上差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。结论 咪达唑仑激活 LKB1/AMPK 信号通路抑制结直肠癌细胞增殖、侵袭, 诱导其凋亡。

关键词: 咪达唑仑; 结直肠癌; 肝激酶/腺苷酸活化蛋白激酶信号通路; 侵袭; 增殖; 凋亡

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.21.017

中图分类号:R971 文献标志码:A
文章编号:1001-6821(2025)21-3103-07

Abstract: Objective To explore the effects of midazolam on the proliferation, invasion and apoptosis of colorectal cancer cells by regulating the liver kinase B1 (LKB1)/AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling pathway.

Methods Cell counting kit-8 method was used to detect the effects of different concentrations (5, 10, 20 and 40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) midazolam on the proliferation of HCT116 cells. 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ midazolam was selected for the subsequent experiments. HCT116 cells were grouped into blank group (no treatment), midazolam group (20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ midazolam), si-NC group (transfected with si-NC plasmid), si-LKB1 group (transfected with si-LKB1 plasmid), midazolam + si-NC group (transfected with si-NC plasmid + 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ midazolam) and midazolam + si-LKB1 group (transfected with si-LKB1 plasmid + 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ midazolam). Flow cytometry, cell counting kit-8 (CCK-8), EdU and Transwell experiments were used to detect changes in cell apoptosis, proliferation and invasion. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to measure the LKB1 and AMPK mRNAs. Western blot was used to measure the proliferating cell nuclear antigen (PCNA), cysteinyl aspartate-specific protease 3 (caspase-3), matrix metalloproteinase 9 (MMP-9), liver kinase B1 (LKB1) and AMP-activated protein kinase (AMPK) proteins. **Results** The EdU positive rates of the blank group, midazolam group, si-NC group, si-LKB1 group, midazolam + si-NC group and midazolam + si-LKB1 group were $(62.52 \pm 6.38)\%$, $(35.26 \pm 3.64)\%$, $(61.95 \pm 6.24)\%$, $(88.63 \pm 8.94)\%$, $(36.05 \pm 3.71)\%$ and $(55.62 \pm 5.67)\%$, respectively; the proliferation rates were $(90.85 \pm 9.04)\%$, $(48.85 \pm 4.92)\%$, $(91.04 \pm 8.92)\%$, $(129.32 \pm 13.05)\%$, $(49.05 \pm 4.98)\%$ and $(79.86 \pm 8.11)\%$, respectively; the apoptosis rates were $(5.05 \pm 0.53)\%$, $(20.22 \pm 2.15)\%$, $(4.86 \pm 0.49)\%$, $(3.11 \pm 0.35)\%$, $(19.86 \pm 2.08)\%$ and $(8.77 \pm 0.91)\%$, respectively; the invasion numbers were 198.64 ± 20.45 , 122.53 ± 12.37 , 195.32 ± 20.34 , 286.61 ± 29.33 , 123.64 ± 12.46 and 176.64 ± 18.06 , respectively; the relative expression levels of LKB1 mRNA were 0.93 ± 0.10 , 2.86 ± 0.31 , 1.08 ± 0.12 , 0.57 ± 0.07 , 2.78 ± 0.29 and 1.55 ± 0.17 , respectively; AMPK mRNA were 1.06 ± 0.11 , 2.25 ± 0.24 , 0.98 ± 0.10 , 0.42 ± 0.05 , 2.19 ± 0.23 and 1.35 ± 0.15 , respectively; the relative protein expression levels of PCNA were 0.79 ± 0.08 , 0.42 ± 0.05 , 0.81 ± 0.09 , 1.22 ± 0.14 , 0.46 ± 0.05 and 0.68 ± 0.07 , respectively; Caspase-3 were 0.92 ± 0.10 , 1.44 ± 0.16 , 1.03 ± 0.11 , 0.51 ± 0.06 , 1.48 ± 0.16 and 1.07 ± 0.11 , respectively; MMP-9 were 0.98 ± 0.10 , 0.52 ± 0.06 , 1.01 ± 0.12 , 1.53 ± 0.17 , 0.58 ± 0.06 and 0.82 ± 0.09 , respectively; LKB1 were 0.31 ± 0.03 , 0.76 ± 0.08 , 0.34 ± 0.04 , 0.15 ± 0.02 , 0.72 ± 0.08 and 0.45 ± 0.05 , respectively; AMPK were 0.44 ± 0.05 , 0.85 ± 0.09 , 0.42 ± 0.05 , 0.23 ± 0.03 , 0.80 ± 0.09 and 0.57 ± 0.06 , respectively. For all these indicators, compared between the midazolam group and the blank group, the si-LKB1 group and the si-NC group, the midazolam + si-LKB1 group and the midazolam + si-NC group, and the si-LKB1 group, all showed statistically significant differences (all $P < 0.05$). **Conclusion** Midazolam activates the LKB1/AMPK signaling pathway, inhibits the proliferation and invasion of colorectal cancer cells, and induces their apoptosis.

Key words: midazolam; colorectal cancer; liver kinase B1/adenosine monophosphate activated protein kinase signaling pathway; invasion; proliferation; apoptosis

结直肠癌是全球范围内发病率和死亡率均位居前列的常见恶性肿瘤,严重威胁居民生命健康,临床中由于结直肠癌早期症状隐匿,多数患者确诊时已进展至中晚期,甚至已发生肝、肺等远处转移,错失手术根治的最佳时机,尽管近年来手术切除联合化疗、放疗、靶向治疗及免疫治疗的综合方案取得了一定进展,但晚期结直肠癌患者仍面临严峻的治疗困境,如

放化疗耐药性频发、肿瘤复发转移率居高不下,5年生生存率较低,严重制约了目前治疗效果的提升,因此仍要寻找新的治疗药物,以便有效治疗结直肠癌^[1-3],最新研究表明,大多数麻醉剂可以影响肿瘤细胞的活性,如氯胺酮在体外和体内通过调节铁死亡显著抑制肝癌细胞活力和增殖^[4]。局部麻醉剂利多卡因也具有抗癌作用,可诱导头颈部鳞状细胞癌凋亡^[5]。咪达

唑仑作为苯二氮䓬类药物,在临床情况下,咪达唑仑起效快、时间短,是目前首选的镇静药物^[6],除了用作麻醉剂外,咪达唑仑还可能具有预防或抑制肿瘤发展的能力^[7]。早期研究表明,咪达唑仑通过激活细胞凋亡的线粒体途径抑制结肠癌 HT29 细胞的存活,并抑制异种移植小鼠肿瘤生长^[8],但咪达唑仑在结直肠癌中研究鲜有报道。肝激酶 B1(liver kinase B1, LKB1)通常被认为是一种重要的肿瘤抑制因子,其缺失会导致不同癌症的进展,如黑色素瘤、胰腺癌、宫颈癌等,腺苷酸(adenosine monophosphate, AMP)活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)是 LKB1 下游激酶,是细胞存活和代谢过程的主要调节因子,是癌症治疗的新靶点^[9]。LUO 等^[10]研究表明,抑制 LKB1/AMPK 信号通路可以减弱结直肠癌自噬,是结直肠癌治疗的新靶点。但咪达唑仑能否通过调节 LKB1/AMPK 信号通路影响结直肠癌治疗尚不可知。本研究旨在探索咪达唑仑对结直肠癌细胞的恶性行为影响及潜在作用机制。

材料与方法

1 材料

细胞株 结直肠癌细胞 HCT116,购自美国 ATCC 细胞库。

药品与试剂 咪达唑仑,规格:每瓶 1 g,纯度:≥99.0%,批号:MZ20240315-01,宜昌人福药业有限责任公司生产;基质胶,规格:5 mL,纯度:≥98.0%,批号:BD20240122-08,美国 BD 公司生产;4',6-二脒基-2-苯基吡啶二盐酸盐,规格:每瓶 10 mg,纯度:≥99.5%,批号:DAPI20240205-12,上海 Sigma-Aldrich 公司生产;膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素和碘化丙啶,规格:每盒 100 次,纯度:≥95.0%,批号:AP20240410-05,江苏麦格生物科技有限公司生产;杜氏改良 Eagle 培养基(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM),规格:500 mL,批号:PM150210,武汉益普生物科技有限公司生产;放射免疫沉淀分析缓冲液,规格:100 mL,批号:YSRIBIO-C5440,上海研生实业有限公司生产;细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8),上海碧云天生物公司生产;Lipo-fectamine™ 2000 试剂盒,美国 Invitrogen 公司生产;逆转录试剂盒,北京达科为生物技术有限公司生产;二辛可宁酸试剂盒,广州市左克科技发展有限公司生产;增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(cysteinyln

aspartate-specific protease 3, Caspase-3)、金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase 9, MMP-9)、LKB1 和 AMPK 抗体,均由英国 Abcam 公司生产;阴性对照(si-NC)、干扰 LKB1(si-LKB1)质粒,均由广州锐博生物有限公司生产;EdU 试剂盒,上海翌圣生物科技股份有限公司生产。

仪器 IX73 显微镜,日本 Olympus 公司产品;MK3 酶标仪,美国赛默飞公司产品;FACScalibur 流式细胞仪,美国 BD 公司产品。

2 方法

2.1 细胞培养

将结直肠癌细胞 HCT116 维持在 DMEM 培养基中,并在标准培养箱中(37℃、5% CO₂)孵育。

2.2 CCK-8 实验法检测不同浓度的咪达唑仑对细胞增殖的影响

将 HCT116 细胞接种到 96 孔平底板(每孔 5×10^3 个细胞)中,用咪达唑仑(5、10、20 和 40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)在 37℃ 下培养 48 h^[11],随后加入 CCK8 试剂 10 μL ,孵育 2 h,用酶标仪在 450 nm 处测量光密度值,评估细胞活性。

2.3 HCT116 细胞分组及处理

将状态良好的 HCT116 细胞分为空白组、咪达唑仑组、si-NC 组(排除转染操作本身、非特异性小干扰 RNA 对实验结果的干扰)、si-LKB1 组、咪达唑仑 + si-NC 组、咪达唑仑 + si-LKB1 组,其中空白组不作处理;咪达唑仑以 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度处理;si-NC 组、si-LKB1 组分别转染 si-NC、si-LKB1 质粒至 HCT116 细胞;咪达唑仑 + si-NC 组、咪达唑仑 + si-LKB1 组分别转染 si-NC、si-LKB1 质粒,并以 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 咪达唑仑处理细胞,48 h 后进行指标检测。

2.4 CCK-8 实验法、EdU 试剂盒测定 HCT116 细胞增殖^[12-13]

将细胞接种至孔板中(96 孔, 2×10^3 个细胞),经上述分组处理后,按照“2.2”中操作进行 CCK-8 实验法检测。

收集各组处理后的细胞,加入 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EdU 试剂处理细胞 2 h,然后用 4% 多聚甲醛固定,0.5% Triton X-100 透化 20 min,用 4',6-二脒基-2-苯基吡啶二盐酸盐进行细胞核染色,在荧光显微镜下观察染色的细胞,并用 Image J 软件计数。

2.5 流式细胞术法检测 HCT116 细胞凋亡^[14]

收集细胞,以胰蛋白酶消化,并以 3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min。随后重悬细胞 $1 \times$ 结合缓冲液中,用膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素和碘化丙啶染色,用流式

细胞仪分析。

2.6 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应 (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR) 法检测 HCT116 细胞中 LKB1 和 AMPK mRNA 表达^[15]

TRIzol 试剂各组 HCT116 细胞中分离总 RNA, 用互补脱氧核糖核酸合成试剂盒逆转录成互补脱氧核糖核酸, 互补脱氧核糖核酸作为 Applied Biosystem 7900 系统中 qPCR 检测的反应模板。并与特异性引物轻轻混合。PCR 反应条件如下: 在 95 ℃ 下初始变性 5 min, 随后 35 个变性循环 (95 ℃, 45 s)、退火 (60 ℃, 45 s) 和延伸 (68 ℃, 15 s)。β-actin 用于归一化, 其中使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因表达, 引物序列: LKB1, 正向 5'-GAGATGGACTTATATGAGGACTAC-3' 和反向 5'-TTGCTGCTAACACTTGAGAC-3'; AMPK, 正向 5'-AACTGCAGAGAGCCATTCACTTT-3' 和反向 5'-GGTGAACTGAAGACAATGTGCTT-3'; β-actin, 正向 5'-TGGAGTCCACTGGCGTCTTC-3' 和反向 5'-GCTTGACAAAGTGGTCGTTGAG-3'。

2.7 Transwell 实验法检测 HCT116 细胞侵袭^[16]

将 HCT116 细胞 (5×10^4 个细胞) 接种到 Transwell 板上腔室中, 其中 Transwell 板提前用基质胶孵育 1 h, 下孔填充含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 上孔填充无血清 DMEM 培养基, 固定细胞 10 min, 0.5% 结晶紫染色 10 min, 对侵袭细胞进行计数。

2.8 蛋白质印迹法检测 PCNA、Caspase-3、MMP-9、LKB1 和 AMPK 蛋白表达^[17]

用放射免疫沉淀分析缓冲液在冰上裂解细胞, 在 4 ℃ 下以 1.2×10^4 r·min⁻¹ 离心 15 min 后, 收集上清液并使用二辛可宁酸试剂盒测量蛋白质浓度。通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质 40 μg, 并转移到膜上。封闭膜后, 用特异性抗体检测印迹, 增强化学发光试剂可视化蛋白质印迹图像, 软件定量分析。

3 统计学处理

用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较用单因素方差分析, 进一步行 SNK-q 检验。

结 果

1 不同浓度的咪达唑仑对 HCT116 细胞增殖的影响

10、20 和 40 μg·mL⁻¹ 咪达唑仑处理 HCT116 细胞, 增殖率较 0 μg·mL⁻¹ 咪达唑仑均显著降低 (均 $P < 0.05$), 5 μg·mL⁻¹ 咪达唑仑与 0 μg·mL⁻¹ 咪达唑仑

比较, 在统计学上差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 其中 20 μg·mL⁻¹ 咪达唑仑处理细胞后, 增殖率接近 50%, 故以咪达唑仑浓度为 20 μg·mL⁻¹ 进行后续研究, 见表 1。

2 咪达唑仑对各组 HCT116 细胞增殖变化的影响

与空白组相比, 咪达唑仑组细胞 EdU 阳性率、增殖率均显著降低 (均 $P < 0.05$); 与阴性对照组相比, 干扰 LKB1 组细胞 EdU 阳性率、增殖率均显著增加 (均 $P < 0.05$); 与咪达唑仑 + 阴性对照组相比, 咪达唑仑 + 干扰 LKB1 组细胞 EdU 阳性率、增殖率均显著增加 (均 $P < 0.05$); 与干扰 LKB1 组相比, 咪达唑仑 + 干扰 LKB1 组细胞 EdU 阳性率、增殖率均显著降低 (均 $P < 0.05$), 见表 2。

3 咪达唑仑对各组 HCT116 细胞凋亡变化的影响

空白组、咪达唑仑组、si-NC 组、si-LKB1 组、咪达唑仑 + si-NC 组和咪达唑仑 + si-LKB1 组的细胞凋亡率分别为 (5.05 ± 0.53)%、(20.22 ± 2.15)%、(4.86 ± 0.49)%、(3.11 ± 0.35)%、(19.86 ± 2.08)% 和 (8.77 ± 0.91)%, 与空白组相比, 咪达唑仑组显著

表 1 不同浓度的咪达唑仑对 HCT116 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of different concentrations of midazolam on the proliferation of HCT116 cells ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Proliferation rate(%)
0 μg·mL ⁻¹	6	91.05 ± 8.51
5 μg·mL ⁻¹	6	87.12 ± 8.82
10 μg·mL ⁻¹	6	68.04 ± 7.02 **
20 μg·mL ⁻¹	6	49.24 ± 5.02 **
40 μg·mL ⁻¹	6	20.73 ± 2.25 **

Compared with 0 μg·mL⁻¹ group, ** $P < 0.01$.

表 2 各组 HCT116 细胞增殖变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Changes in proliferation of HCT116 cells in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Proliferation rate(%)	EdU positive rate(%)
Blank	6	90.85 ± 9.04	62.52 ± 6.38
Midazolam	6	48.85 ± 4.92 *	35.26 ± 3.64 *
si-NC	6	91.04 ± 8.92	61.95 ± 6.24
si-LKB1	6	129.32 ± 13.05 [#]	88.63 ± 8.94 [#]
Midazolam + si-NC	6	49.05 ± 4.98	36.05 ± 3.71
Midazolam + si-LKB1	6	79.86 ± 8.11 $\Delta \square$	55.62 ± 5.67 $\Delta \square$

Blank group: No treatment; Midazolam group: Treated with 20 μg·mL⁻¹ concentration; si-NC group, si-LKB1 group: Transfected si-NC and si-LKB1 plasmids into HCT116 cells, respectively; Midazolam + si-NC group, Midazolam + si-LKB1 group: Transfected si-NC and si-LKB1 plasmids, respectively, and treated the cells with 20 μg·mL⁻¹ midazolam; Compared with blank group, * $P < 0.05$; Compared with si-NC group, [#] $P < 0.05$; Compared with midazolam + si-NC group, $\Delta P < 0.05$; Compared with si-LKB1 group, $\square P < 0.05$.

增加($P < 0.05$);与 si - NC 组相比,si - LKB1 组显著降低($P < 0.05$);与咪达唑仑 + si - NC 组相比,咪达唑仑 + si - LKB1 组显著降低($P < 0.05$);与 si - LKB1 组相比,咪达唑仑 + si - LKB1 组显著增加($P < 0.05$)。

4 咪达唑仑对各组 HCT116 细胞侵袭变化的影响

与空白组的 198.64 ± 20.45 相比,咪达唑仑组细胞侵袭数(122.53 ± 12.37)显著降低($P < 0.05$);与 si - NC 组的 195.32 ± 20.34 相比,干扰 LKB1 组细胞侵袭数(286.61 ± 29.33)显著增加($P < 0.05$);与咪达唑仑 + si - NC 组的 123.64 ± 12.46 相比,咪达唑仑 + 干扰 LKB1 组细胞侵袭数(176.64 ± 18.06)显著增加($P < 0.05$);与干扰 LKB1 组相比,咪达唑仑 + 干扰 LKB1 组细胞侵袭数显著降低($P < 0.05$),见图 1。

5 咪达唑仑对各组 HCT116 细胞 LKB1 和 AMPK mRNA 表达变化的影响

与空白组相比,咪达唑仑组细胞 LKB1 和 AMPK mRNA 相对表达水平均显著增加(均 $P < 0.05$);与 si - NC 组相比,si - LKB1 组细胞的 LKB1 和 AMPK mRNA 相对表达水平均显著降低(均 $P < 0.05$);与咪达唑仑 + si - NC 组相比,咪达唑仑 + si - LKB1 组细胞的 LKB1 和 AMPK mRNA 相对表达水平均显著降低(均 $P < 0.05$);与 si - LKB1 组相比,咪达唑仑 + si - LKB1 组细胞的 LKB1 和 AMPK mRNA 相对表达水平均显著增加(均 $P < 0.05$),见表 3。

6 咪达唑仑对各组 HCT116 细胞 PCNA、Caspase - 3、MMP - 9、LKB1 和 AMPK 蛋白表达变化的影响

与空白组相比,咪达唑仑组细胞 Caspase - 3、LKB1 和 AMPK 蛋白相对表达水平均显著增加,PCNA 和 MMP - 9 蛋白相对表达水平均显著降低(均 $P < 0.05$);与 si - NC 组相比,si - LKB1 组细胞的 Caspase - 3、LKB1 和 AMPK 蛋白相对表达水平均显著降低,PCNA 和 MMP - 9 蛋白相对表达水平均显著增

加(均 $P < 0.05$);与咪达唑仑 + si - NC 组相比,咪达唑仑 + si - LKB1 组细胞的 Caspase - 3、LKB1 和 AMPK 蛋白相对表达水平均显著降低,PCNA 和 MMP - 9 蛋白相对表达水平均显著增加(均 $P < 0.05$);与 si - LKB1 组相比,咪达唑仑 + si - LKB1 组细胞的 Caspase - 3、LKB1 和 AMPK 蛋白相对表达水平均显著增加,PCNA 和 MMP - 9 蛋白相对表达水平均显著降低(均 $P < 0.05$),见图 2、表 4。

表 3 各组 HCT116 细胞 LKB1 mRNA 和 AMPK mRNA 相对表达水平变化($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Changes in the relative expression levels of LKB1 mRNA and AMPK mRNA in HCT116 cells of each group ($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	LKB1 mRNA	AMPK mRNA
Blank	6	0.93 ± 0.10	1.06 ± 0.11
Midazolam	6	2.86 ± 0.31 *	2.25 ± 0.24 *
si - NC	6	1.08 ± 0.12	0.98 ± 0.10
si - LKB1	6	0.57 ± 0.07 #	0.42 ± 0.05 #
Midazolam + si NC	6	2.78 ± 0.29	2.19 ± 0.23
Midazolam + si LKB1	6	1.55 ± 0.17 △□	1.35 ± 0.15 △□

Dose and n refer to Table 2; LKB1: Liver kinase B1; AMPK: AMP - activated protein kinase; Compared with blank group, * $P < 0.05$; Compared with si - NC group, # $P < 0.05$; Compared with midazolam + si - NC group, △ $P < 0.05$; Compared with si - LKB1 group, □ $P < 0.05$.

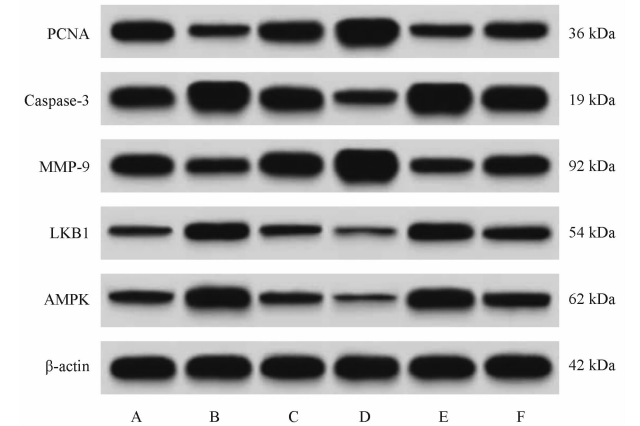


图 2 蛋白质印迹法检测细胞中增殖细胞核抗原(PCNA)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(Caspase - 3)、金属蛋白酶 9(MMP - 9)、肝激酶 B1(LKB1)和活化蛋白激酶(AMPK)蛋白相对表达水平

Figure 2 Relative expression levels of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), cysteinyl aspartate - specific protease 3 (Caspase - 3), matrix metalloproteinase 9 (MMP - 9), liver kinase B1 (LKB1), and AMP - activated protein kinase (AMPK) proteins in cells detected by Western blot

A: Blank group; B: Midazolam group; C: Negative control group; D: LKB1 interference group; E: Midazolam + negative control group; F: Midazolam + LKB1 interference group.

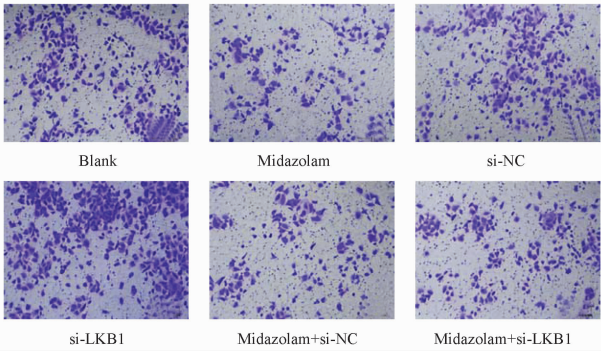


图 1 各组 HCT116 细胞侵袭变化
Figure 1 Changes in invasion of HCT116 cells in each group

表 4 各组 HCT116 细胞 PCNA、Caspase - 3、MMP - 9、LKB1、AMP - AMPK 蛋白表达变化($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Changes in the protein expressions of PCNA, Caspase - 3, MMP - 9, LKB1, and AMPK in HCT116 cells of each group ($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	PCNA/ β - actin	Caspase - 3/ β - actin	MMP - 9/ β - actin	LKB1/ β - actin	AMPK/ β - actin
Blank	6	0.79 $\pm$ 0.08	0.92 $\pm$ 0.10	0.98 $\pm$ 0.10	0.31 $\pm$ 0.03	0.44 $\pm$ 0.05
Midazolam	6	0.42 $\pm$ 0.05 *	1.44 $\pm$ 0.16 *	0.52 $\pm$ 0.06 *	0.76 $\pm$ 0.08 *	0.85 $\pm$ 0.09 *
si - NC	6	0.81 $\pm$ 0.09	1.03 $\pm$ 0.11	1.01 $\pm$ 0.12	0.34 $\pm$ 0.04	0.42 $\pm$ 0.05
si - LKB1	6	1.22 $\pm$ 0.14 #	0.51 $\pm$ 0.06 #	1.53 $\pm$ 0.17 #	0.15 $\pm$ 0.02 #	0.23 $\pm$ 0.03 #
Midazolam + si NC	6	0.46 $\pm$ 0.05	1.48 $\pm$ 0.16	0.58 $\pm$ 0.06	0.72 $\pm$ 0.08	0.80 $\pm$ 0.09
Midazolam + si LKB1	6	0.68 $\pm$ 0.07 $\Delta \square$	1.07 $\pm$ 0.11 $\Delta \square$	0.82 $\pm$ 0.09 $\Delta \square$	0.45 $\pm$ 0.05 $\Delta \square$	0.57 $\pm$ 0.06 $\Delta \square$

Dose and n refer to Table 2; Compared with blank group, * $P < 0.05$; Compared with si - NC group, # $P < 0.05$; Compared with midazolam + si - NC group, $\Delta P < 0.05$; Compared with si - LKB1 group, $\square P < 0.05$.

讨 论

结直肠癌是全球第 3 大最常见的癌症,发病率和癌症死亡率每年都在增加,患者呈现年轻化趋势,可能与其生活方式、慢性炎症及遗传因素密切相关,但结直肠癌的症状又不易被注意,治愈率和长期生存率较低^[18-19],因此探索结直肠癌机制并寻求高效治疗药物是人们关注的重点。

研究报道表明,手术切除期间使用的麻醉剂类型与癌症的长期预后有关,表明麻醉剂可能在癌症发展和不良预后中起关键作用。七氟烷可调节 *circ_0000423/miR - 525 - 5p*/鞘氨醇 - 1 - 磷酸酶 1 轴抑制结直肠癌细胞增殖、迁移和侵袭^[20]。布比卡因通过调节核因子 κ B 信号通路抑制结直肠癌细胞增殖,抑制体内肿瘤生长^[21]。咪达唑仑作为一种短效苯二氮䓬类药物,主要通过增强中枢神经系统抑制性神经递质 γ - 氨基丁酸的活性,发挥抗焦虑、抗惊厥、镇静、抗癫痫作用^[22]。咪达唑仑在癌症治疗中也有研究,如咪达唑仑可抑制细胞周期蛋白和细胞周期蛋白依赖性激酶进而抑制细胞增殖,减少细胞的局部浸润,从而抑制胰腺导管腺癌的进展^[23]。咪达唑仑抑制甲状腺癌细胞增殖、迁移和侵袭并诱导细胞凋亡,进而发挥抗癌作用^[11]。本研究显示,不同浓度的咪达唑仑可以抑制 HCT116 细胞增殖,提示咪达唑仑可能在结直肠癌中发挥抗癌作用。抑制癌细胞无限增殖、诱导其凋亡是评价抗肿瘤药物的重要指标之一,PCNA 是经典增殖标志物,Caspase - 3 是与细胞凋亡过程相关的关键蛋白,激活该蛋白可启动细胞凋亡途径,MMP - 9 可降解基底膜和细胞外基质的成分,在肿瘤生长、侵袭和转移过程中起关键作用,是结直肠癌诊断、预后的潜在生物标志物^[24-25]。本研究显示,咪达唑仑可以抑制 EdU 阳性率、增殖率、侵袭,诱导其调

亡,蛋白质印迹法同样显示,咪达唑仑可以下调 PCNA 和 MMP - 9 表达,上调 Caspase - 3 表达,表明咪达唑仑可能是治疗结直肠癌的潜在药物,但其机制尚不明确。

LKB1 是一种必需的丝氨酸/苏氨酸激酶,可以调节各种细胞凋亡及代谢等细胞过程,通常被认为是一种肿瘤抑制基因,是非常有前途的癌症治疗靶点,LKB1 正向调节其底物 AMPK 及其他 AMPK 下游激酶,参与控制细胞生长和代谢,激活 AMPK 可降低癌症发病率并起到肿瘤抑制因子的作用^[26]。LKB1 的缺失可能通过肌动蛋白细胞骨架重塑促进结直肠癌细胞转移^[27]。本研究显示,干扰 LKB1 可显著下调 AMPK 表达,促进 HCT116 细胞增殖、侵袭,抑制其凋亡,提示 LKB1/AMPK 信号通路参与结直肠癌发展。但咪达唑仑干预后,LKB1 和 AMPK 表达上调,HCT116 细胞恶性行为被抑制,推测咪达唑仑可能通过激活 LKB1/AMPK 信号通路发挥抗结直肠癌作用。随后回补实验显示,干扰 LKB1 联合咪达唑仑处理 HCT116 细胞,减弱了咪达唑仑对 HCT116 细胞恶性发展的抑制作用,表明咪达唑仑的抗结直肠癌作用,可能通过激活 LKB1/AMPK 信号通路实现。

本研究提示:咪达唑仑可以通过激活 LKB1/AMPK 信号通路促进 HCT116 细胞凋亡、抑制其增殖与侵袭,为结直肠癌的治疗提供了新的潜在靶点与实验依据,但当前研究仍存在一定局限性:仅开展体外细胞实验,缺乏裸鼠移植瘤等动物模型验证,无法完全模拟体内复杂肿瘤微环境中咪达唑仑对肿瘤生长的抑制作用及通路调控效应;未探究其与 5 - 氟尿嘧啶、奥沙利铂等临床常用化疗药物的协同作用,限制了该研究结果在临床联合用药中的参考价值;同时未深入分析 LKB1/AMPK 通路下游具体效应分子的表达变化,尚未明确通路调控细胞生物学行为的下游分子机制。后续将推进体内实验的核验工作,进一步通

过多细胞系验证、联合用药研究及下游效应分子筛选,完善咪达唑仑抗结直肠癌的作用机制,为其临床转化应用提供依据。

参考文献:

- [1] DIALLO M T, CHEN B, YAO Q, *et al.* KIF3C inhibits the progression and proliferation of colorectal cancer [J]. *BMC Gastroenterol*, 2025, 25(1):165—176.
- [2] ZHOU J, LIU J, YU Y, *et al.* Melanoma cell adhesion molecule plays a pivotal role in proliferation, migration, tumor immune microenvironment, and immunotherapy in colorectal cancer[J/OL]. *Cancer Med*, 2025, 14(5): e70740. 2025 - 03 - 05 [2025 - 07 - 01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40042109/>.
- [3] WANG C, ZHAO Y, CHEN Y, *et al.* The oncogenic role of TNFRSF12A in colorectal cancer and pan - cancer bioinformatics analysis[J]. *Cancer Res Treat*, 2025, 57(1):212—228.
- [4] HE G N, BAO N R, WANG S, *et al.* Ketamine induces ferroptosis of liver cancer cells by targeting lncRNA PVT1/miR - 214 - 3p/GPX4[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2021, 15(1):3965—3978.
- [5] MILLER Z A, MUELLER A, KIM T, *et al.* Lidocaine induces apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma through activation of bitter taste receptor T2R14[J]. *Cell Rep*, 2023, 42(12):113437—113448.
- [6] WANG P, WANG P, LUAN H, *et al.* Midazolam alleviates cellular senescence in SH - SY5Y neuronal cells in Alzheimer's disease [J]. *Brain Behav*, 2023, 13(1): e2822. 2022 - 11 - 28 [2025 - 07 - 04]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36444490/>.
- [7] SETHI A, REZK A, COUBAN R, *et al.* Role of midazolam on cancer progression/survival - an updated systematic review [J]. *Indian J Anaesth*, 2023, 67(11):951—961.
- [8] MISHRA S K, KANG J H, LEE C W, *et al.* Midazolam induces cellular apoptosis in human cancer cells and inhibits tumor growth in xenograft mice[J]. *Mol Cells*, 2013, 36(3):219—226.
- [9] CHEN L, ZHANG W, CHEN D, *et al.* RBM4 dictates ESCC cell fate switch from cellular senescence to glutamine - addiction survival through inhibiting LKB1 - AMPK - axis [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1):159—168.
- [10] LUO S, LI Z, MAO L, *et al.* Sodium butyrate induces autophagy in colorectal cancer cells through LKB1/AMPK signaling [J]. *J Physiol Biochem*, 2019, 75(1):53—63.
- [11] 汪峻羽, 卢想, 佟凯, 等. 咪达唑仑通过下调 circASXL1 抑制胃癌细胞增殖、迁移和侵袭[J]. *中国实验诊断学*, 2022, 27(4):472—476.
- [12] 夏坤锟, 黑志军, 杨海龙, 等. 角蛋白 23 对结直肠癌细胞增殖、转移、侵袭能力和上皮 - 间充质转化的影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2025, 42(06):1072—1075.
- [13] SUN Y, SUN Y, LIN G, *et al.* Multicolor flow cytometry analysis of the proliferations of T - lymphocyte subsets *in vitro* by EdU incorporation[J]. *Cytometry A*, 2012, 81(10):901—909.
- [14] 董永杰, 董静, 岳峰, 等. 棕矢车菊素通过调节 cGAS - STING 信号通路影响结直肠癌细胞免疫逃逸的机制研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2025, 41(03):634—639.
- [15] 谭艳芳, 张艳冰, 万红霞, 等. 黄芪总皂苷调控 LKB1/AMPK 信号通路对人乳腺癌细胞增殖、凋亡周期的影响及机制[J]. *中国老年医学杂志*, 2023, 43(2):388—391.
- [16] 鲁旭娟, 孔振兴. miR - 146a 靶向 PTP1B 对结直肠癌细胞增殖、迁移及侵袭的影响[J]. *中华消化病与影像杂志(电子版)*, 2025, 15(4):294—299.
- [17] 许汉兵, 韩建涛, 张成鹏. lncRNA TMPO - AS1 调节 miR - 340 - 5p/RUNX1 轴对结直肠癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响[J]. *河北医药*, 2024, 46(2):165—170.
- [18] WANG C, YOU Z, ZHOU G, *et al.* Amarogentin suppresses cell proliferation and EMT process through inducing ferroptosis in colorectal cancer[J]. *BMC Gastroenterol*, 2025, 25(1):46—55.
- [19] ZHOU F, GAO H, SHANG L, *et al.* Oridonin promotes endoplasmic reticulum stress via TP53 - repressed TCF4 transactivation in colorectal cancer[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2023, 42(1):150—161.
- [20] KANG X, LI X, LI Y. Sevoflurane suppresses the proliferation, migration and invasion of colorectal cancer through regulating circ_0000423/miR - 525 - 5p/SGPP1 Network [J]. *Cell Mol Bioeng*, 2022, 15(2):219—230.
- [21] LIU B, YAN X, HOU Z, *et al.* Impact of bupivacaine on malignant proliferation, apoptosis and autophagy of human colorectal cancer SW480 cells through regulating NF - κ B signaling path [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1):2723—2733.
- [22] KIENTITZ R, KAY L, BEUCHAT I, *et al.* Benzodiazepines in the management of seizures and status epilepticus: A review of routes of delivery, pharmacokinetics, efficacy, and tolerability [J]. *CNS Drugs*, 2022, 36(9):951—975.
- [23] OSHIMA Y, SANO M, KAJIWARA I, *et al.* Midazolam exhibits antitumour and anti - inflammatory effects in a mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Br J Anaesth*, 2022, 128(4):679—690.
- [24] ZHENG G, FANG Z, LIN Z, *et al.* Miltirone induces GSDME - dependent pyroptosis in colorectal cancer by activating caspase 3 [J]. *Heliyon*, 2024, 10(16): e36603. 2024 - 08 - 30 [2025 - 07 - 06]. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11388397/>.
- [25] SHOARI A, ASHJA ARDALAN A, DIMESA A M, *et al.* Targeting invasion: The role of MMP - 2 and MMP - 9 inhibition in colorectal cancer therapy[J]. *Biomolecules*, 2024, 15(1):35—44.
- [26] CICCARESE F, ZULATO E, INDRACCOLO S. LKB1/AMPK pathway and drug response in cancer: A therapeutic perspective [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019:8730816. 2019 - 10 - 31 [2025 - 07 - 08]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31781355/>.
- [27] HU G, HUANG N, ZHANG J, *et al.* LKB1 loss promotes colorectal cancer cell metastasis through regulating TNIK expression and actin cytoskeleton remodeling [J]. *Mol Carcinog*, 2023, 62(11):1659—1672.

(收稿日期 2025 - 07 - 16)