

瑞马唑仑调节HMGB1-RAGE通路对膀胱癌细胞增殖、凋亡和上皮-间充质转化的影响

武晓旭¹ 罗树军¹ 王然¹ 吴安石^{2*}

(¹北京怀柔医院麻醉科, 北京 101400; ²首都医科大学附属北京朝阳医院麻醉科, 北京 100020)

摘要 该文旨在探究瑞马唑仑调节 HMGB1-RAGE 通路对膀胱癌细胞增殖、凋亡和上皮-间充质转化 (EMT) 的影响。培养永生膀胱细胞系 SV-HUC-1 和膀胱癌细胞系 BIU-87, 采用 CCK-8 检测瑞马唑仑对 SV-HUC-1 和 BIU-87 细胞活力的影响。将 BIU-87 细胞依次分为: 对照组、低剂量瑞马唑仑组、中剂量瑞马唑仑组、高剂量瑞马唑仑组、高剂量瑞马唑仑+人重组 HMGB1 (rHMGB1) 组。集落形成实验评估细胞增殖能力; AO/EB 双染和 Annexin V-FITC/PI 双染检测细胞凋亡情况; 免疫荧光检测 EMT; Western blot 检测细胞行为相关蛋白及 HMGB1-RAGE 通路相关蛋白的表达水平。与 0 $\mu\text{g/mL}$ 瑞马唑仑比较, 当浓度在 0.5 $\mu\text{g/mL}$ ~4 $\mu\text{g/mL}$ 时, BIU-87 细胞活力显著降低 ($P < 0.05$)。与对照组比较, 低剂量瑞马唑仑组、中剂量瑞马唑仑组和高剂量瑞马唑仑组 BIU-87 细胞集落形成数量、Ki-67 阳性细胞率、Fibronectin 阳性细胞率、p-p65/p65 值以及 c-myc、CyclinD1、XIAP、Bcl-2、HMGB1、RAGE 蛋白水平均降低, AO/EB 双染凋亡率、Annexin V-FITC/PI 双染凋亡率、E-cadherin 阳性细胞率、Claudins 阳性细胞率均升高, 且高剂量瑞马唑仑组对 BIU-87 细胞恶性行为的抑制作用显著强于中、低剂量组 ($P < 0.05$), 与单纯高剂量瑞马唑仑处理相比, 高剂量瑞马唑仑联合 rHMGB1 可部分逆转瑞马唑仑对膀胱癌细胞恶性行为的抑制作用 ($P < 0.05$)。瑞马唑仑通过抑制 HMGB1-RAGE 通路激活调控膀胱癌细胞增殖、凋亡和 EMT 过程。

关键词 瑞马唑仑; HMGB1-RAGE 通路; 膀胱癌细胞增殖; 凋亡; 上皮-间充质转化

Effects of Remimazolam on the Proliferation, Apoptosis, and Epithelial-Mesenchymal Transition of Bladder Cancer Cells by Regulating the HMGB1-RAGE Pathway

WU Xiaoxu¹, LUO Shujun¹, WANG Ran¹, WU Anshi^{2*}

(¹Department of Anesthesiology, Beijing Huairou Hospital, Beijing 101400, China;

²Department of Anesthesiology, Beijing Chaoyang Hospital, Capital Medical University, Beijing 100020, China)

Abstract This study aims to investigate the mechanism by which remimazolam regulates the HMGB1-RAGE pathway and its subsequent effects on the proliferation, apoptosis, and EMT (epithelial-mesenchymal transition) of bladder cancer cells. The immortalized bladder cell line SV-HUC-1 and the bladder cancer cell line BIU-87 were cultured, and cell viability following remimazolam treatment was assessed using the CCK-8 assay. BIU-87 cells were sequentially divided into the following groups: control group, low-

收稿日期: 2025-10-11 接受日期: 2026-01-08

*通信作者。Tel: 010-69622761, E-mail: 2347378@163.com

Received: October 11, 2025 Accepted: January 8, 2026

*Corresponding author. Tel: +86-10-69622761, E-mail: 2347378@163.com

dose remimazolam group, medium-dose remimazolam group, high-dose remimazolam group, and high-dose remimazolam+rHMGB1 (recombinant human HMGB1) group. Cell proliferation capacity was evaluated by colony formation assay; cell apoptosis was detected by AO/EB double staining and Annexin V-FITC/PI double staining; EMT was detected by immunofluorescence; the levels of cell behavior-associated proteins and HMGB1-RAGE pathway-associated proteins were detected by Western blot. Compared with the 0 $\mu\text{g/mL}$ remimazolam group, the viability of BIU-87 cells was significantly decreased when the concentration was in the range of 0.5 $\mu\text{g/mL}$ to 4 $\mu\text{g/mL}$ ($P<0.05$). Compared with the control group, the number of colonies formed, Ki-67 positive cell rate, Fibronectin positive cell rate, p-p65/p65 ratio, and the protein levels of c-myc, CyclinD1, XIAP, Bcl-2, HMGB1, and RAGE were decreased in the low-, medium-, and high-dose remimazolam groups, while the cell apoptosis rates detected by AO/EB double staining and Annexin V-FITC/PI flow cytometry, and the positive cell rates of E-cadherin and Claudins were increased. The inhibitory effect of the high-dose remimazolam group on malignant behaviors of BIU-87 cells was significantly stronger than those of the medium- and low-dose groups ($P<0.05$). Compared with high-dose remimazolam treatment alone, high-dose remimazolam combined with rHMGB1 partially reversed the inhibitory effect of remimazolam on malignant behaviors of bladder cancer cells ($P<0.05$). Remimazolam regulates the proliferation, apoptosis, and EMT process of bladder cancer cells by inhibiting the activation of the HMGB1-RAGE pathway.

Keywords remimazolam; HMGB1-RAGE pathway; bladder cancer cell proliferation; apoptosis; epithelial-mesenchymal transition

膀胱癌作为泌尿系统常见的恶性肿瘤,最新癌症统计结果显示,预计2025年膀胱癌新发病例为84 870例,死亡病例为17420例,其对患者的生活质量和医疗系统的成本都有重大影响^[1]。既往研究表明,上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)、肿瘤细胞的异常增殖和凋亡失衡等病理过程在膀胱癌恶化进程中相互交织,共同推动膀胱癌的恶化^[2]。因此,深入研究膀胱癌增殖、凋亡和EMT的调控机制,有助于开发新的治疗策略。

在肿瘤研究中, HMGB1-RAGE通路备受关注,其在多种肿瘤中异常激活,参与肿瘤细胞的增殖、存活和转移^[3]。研究显示,在膀胱癌细胞中,降低HMGB1/RAGE通路相关蛋白表达水平,可通过减少转化生长因子 β 相关的EMT进而抑制肿瘤细胞的迁移和侵袭^[4]。而瑞马唑仑作为新型超短效静脉注射苯二氮草衍生物药物备受关注,该药物凭借独特药代动力学特性和创新代谢机制(主要通过血液中非特异性酯酶代谢,不依赖肝肾),在麻醉及操作性诊疗镇静领域广泛应用^[5]。在临床研究中,瑞马唑仑已被用作经尿道膀胱肿瘤切除术中的麻醉药物,且患者术后恢复效果良好^[6]。已有研究证实,瑞马唑仑可

通过抑制细胞增殖和转移的恶性行为在喉鳞状细胞癌中发挥抗肿瘤作用^[7]。但目前,瑞马唑仑与膀胱癌中HMGB1-RAGE通路的关联尚未见报道。本研究首次探索瑞马唑仑通过调节HMGB1-RAGE通路,对膀胱癌细胞增殖、凋亡和EMT的影响,有望为膀胱癌治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

人正常膀胱上皮细胞系SV-HUC-1(货号: HT-X1556)和人膀胱癌细胞系BIU-87(货号: HTX2158C)均购自深圳华拓细胞库;人重组HMGB1(rHMGB1, 货号: rp147000)、CCK-8试剂盒(货号: C266180)、Annexin V-FITC/PI双染试剂盒(货号: A266226)均购自阿拉丁试剂(上海)有限公司;AO/EB双染试剂盒(货号: S0012)购自上海碧云天生物技术有限公司;一抗Ki-67(货号: ab15580)、E-cadherin(货号: ab314063)、Claudins(货号: ab211737)、Fibronectin(货号: ab2413)、c-myc(货号: ab32072)、CyclinD1(货号: ab16663)、XIAP(货号: ab229050)、Bcl-2(货号: ab182858)、HMGB1(货号: ab18256)、RAGE(货号: ab216329)、p-p65(货号: ab76302)、p65(货号: ab76311)和 β -actin(货

号: ab8227)均购自英国Abcam公司。

1.2 方法

1.2.1 CCK-8检测瑞马唑仑对SV-HUC-1和BIU-87细胞活力的影响 将SV-HUC-1和BIU-87细胞以 5×10^3 /孔的密度接种到96孔板上, 每孔添加100 μ L含胎牛血清的DMEM培养基常规培养24 h。待细胞贴壁后更换含有不同浓度(0、0.25、0.5、1、2、4 μ g/mL)^[7]瑞马唑仑的培养基, 培养24 h后每孔添加10 μ L的CCK-8溶液, 37 $^{\circ}$ C孵育2 h。使用酶标仪检测各孔细胞吸光度(*D*)值, 以*D*值大小来表示细胞活力。

1.2.2 BIU-87细胞分组 将BIU-87细胞分为5组, 对照组(不做任何处理)、低剂量瑞马唑仑组(0.5 μ g/mL瑞马唑仑处理)、中剂量瑞马唑仑组(1 μ g/mL瑞马唑仑处理)、高剂量瑞马唑仑组(2 μ g/mL瑞马唑仑处理)、高剂量瑞马唑仑+rHMGB1组(先加入2 μ g/mL瑞马唑仑处理24 h, 再加入100 ng/mL rHMGB1^[3]继续处理24 h), 以上各组BIU-87细胞均处理48 h。

1.2.3 集落形成实验检测各组BIU-87细胞集落形成数量 将各组BIU-87细胞以每孔500个细胞的密度接种于6孔板中, 添加相应培养基置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养14天, 每3天更换一次培养基, 待出现肉眼可见的集落时, 用多聚甲醛于37 $^{\circ}$ C固定30 min后添加结晶紫于37 $^{\circ}$ C染色20 min, 染色完成后在显微镜下对集落数进行统计。

1.2.4 免疫荧光检测各组BIU-87细胞中Ki-67和EMT相关蛋白的表达情况 将各组BIU-87细胞以 1×10^4 /孔的密度接种到24孔板上, 添加相应培养基置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养48 h, 然后进行多聚甲醛固定(37 $^{\circ}$ C、30 min)、Triton X-100通透(37 $^{\circ}$ C、10 min), 添加牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)在37 $^{\circ}$ C下封闭2 h后, 分别补充兔抗人Ki-67抗体、E-cadherin抗体、Claudins抗体、Fibronectin抗体(均为1:200稀释)在4 $^{\circ}$ C下过夜培养, 添加相应荧光二抗(1:200)室温孵育2 h后, 使用DAPI复染细胞核。封片后在荧光显微镜下拍照并计算阳性细胞占总细胞的比例。

1.2.5 Western blot检测各组BIU-87细胞中相关蛋白水平 收集各组培养的BIU-87细胞, 获取总蛋白。将蛋白分离后转移到PVDF膜上, 封闭后添加兔抗人HMGB1抗体、RAGE抗体、p-p65抗体、p65抗体、c-myc抗体、CyclinD1抗体、XIAP抗体、Bcl-2抗体

和 β -actin(均为1:1 000稀释)在4 $^{\circ}$ C下过夜培养, 添加HRP二抗(1:2 000)于室温孵育2 h, 显影后使用凝胶成像系统分析蛋白条带灰度值(β -actin为内参)并计算p-p65/p65值。

1.2.6 AO/EB和Annexin V-FITC/PI双染检测各组BIU-87细胞凋亡率 AO/EB染色: 将各组BIU-87细胞以 1×10^5 /孔的密度接种到6孔板上, 48 h后收集细胞, 洗涤后分别添加100 μ L AO/EB染色液, 37 $^{\circ}$ C避光孵育15 min, 在荧光显微镜下拍照, 并计算细胞凋亡率(橙红色与绿色细胞比例)。

Annexin V-FITC/PI染色: 将各组BIU-87细胞以 1×10^5 /孔的密度接种到6孔板上, 48 h后收集细胞, 洗涤后分别添加10 μ L Annexin V-FITC/PI染色液, 37 $^{\circ}$ C避光孵育15 min, 使用流式细胞仪检测细胞凋亡率(早期凋亡细胞与晚期凋亡细胞百分比之和)。

1.3 统计学分析

用SPSS 25.0软件进行统计分析。若数据服从正态分布(Shapiro-Wilk检验)且方差齐性(Levene检验), 则以均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 瑞马唑仑对SV-HUC-1和BIU-87细胞增殖活力的影响

表1数据表明, 与0 μ g/mL瑞马唑仑比较, 当瑞马唑仑浓度在0.5~2 μ g/mL时, BIU-87细胞活力显著降低($P < 0.05$), 而SV-HUC-1细胞活力变化无显著差异($P > 0.05$), 而当瑞马唑仑浓度为4 μ g/mL时可明显抑制SV-HUC-1和BIU-87细胞活力($P < 0.05$)。通过计算得出瑞马唑仑对BIU-87细胞的24 h半数抑制浓度(half-maximal inhibitory concentration, IC₅₀)值为1.85 μ g/mL, 基于IC₅₀值, 并参考临床麻醉血药浓度范围(0.5~2 μ g/mL), 选用0.5、1、2 μ g/mL作为后续研究中的低、中和高剂量瑞马唑仑浓度。

2.2 瑞马唑仑对各组BIU-87细胞增殖的影响

图1~图3和表2表明, 与对照组比较, 低剂量瑞马唑仑组、中剂量瑞马唑仑组和高剂量瑞马唑仑组BIU-87细胞集落形成数量、Ki-67阳性细胞率、c-myc蛋白水平、CyclinD1蛋白水平均降低, 且低、中、高剂量瑞马唑仑组之间的差异也具有统计学意义($P < 0.05$); 与高剂量瑞马唑仑组比较, 高剂量瑞马唑仑+rHMGB1组BIU-87细胞集落形成数量、Ki-67阳性细胞率、c-myc

表1 CCK-8检测瑞马唑仑对SV-HUC-1和BIU-87细胞活力的影响

Table 1 The effects of remimazolam on the viability of SV-HUC-1 and BIU-87 cells were detected by CCK-8 assay

瑞马唑仑/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Remimazolam / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	SV-HUC-1	BIU-87
0	0.87 \pm 0.08	0.94 \pm 0.06
0.25	0.92 \pm 0.05	0.87 \pm 0.06
0.5	0.86 \pm 0.04	0.79 \pm 0.05*
1	0.84 \pm 0.06	0.68 \pm 0.04*
2	0.77 \pm 0.05	0.56 \pm 0.05*
4	0.68 \pm 0.07*	0.33 \pm 0.02*

* $P < 0.05$, 与0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 瑞马唑仑比较。 $\bar{x} \pm s$, $n=6$ 。

* $P < 0.05$ compared with 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ remimazolam. $\bar{x} \pm s$, $n=6$.

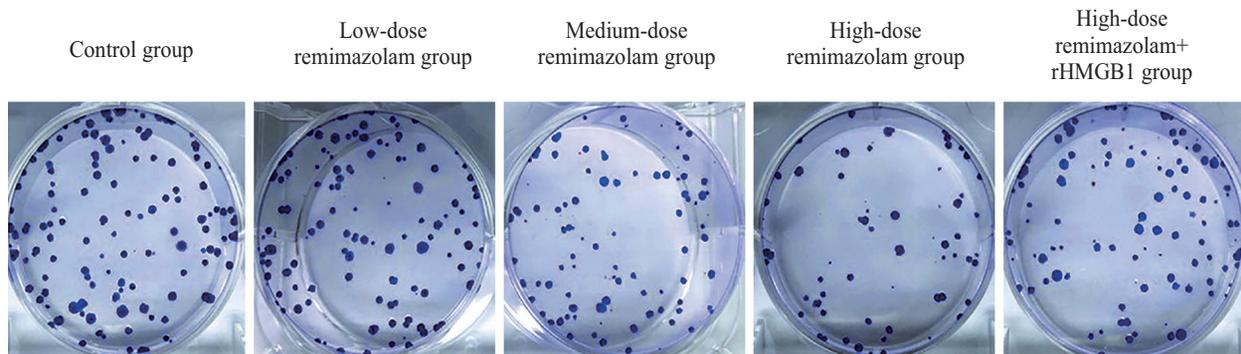


图1 集落形成实验检测各组BIU-87细胞集落形成数量

Fig.1 The number of colonies formed in each group of BIU-87 cells was detected by colony formation assay

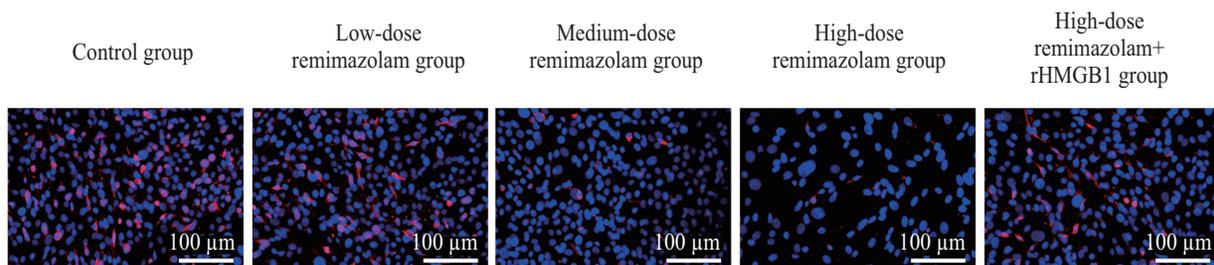
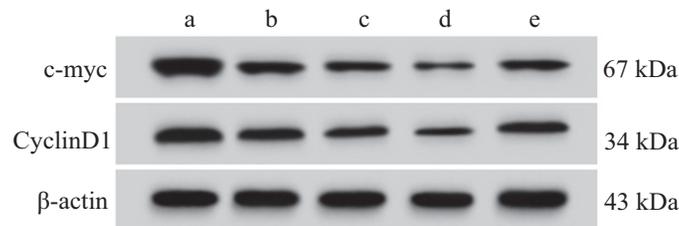


图2 免疫荧光检测各组Ki-67阳性细胞率

Fig.2 The Ki-67 positive cell rate in each group was detected by immunofluorescence



a~e依次表示对照组、低剂量瑞马唑仑组、中剂量瑞马唑仑组、高剂量瑞马唑仑组和高剂量瑞马唑仑+rHMGB1组。

a-e represent control group, low-dose remimazolam group, medium-dose remimazolam group, high-dose remimazolam group, and high-dose remimazolam+rHMGB1 group, respectively.

图3 Western blot检测各组BIU-87细胞c-myc和CyclinD1蛋白水平

Fig.3 The protein levels of c-myc and CyclinD1 in each group of BIU-87 cells were detected by Western blot

表2 瑞马唑仑对各组BIU-87细胞增殖相关指标的影响

Table 2 The effects of remimazolam on proliferation-related indicators in each group of BIU-87 cells

组别 Group	集落形成数量 Number of colonies formed	Ki-67阳性细胞率/% Ki-67 positive cell rate /%	c-myc	CyclinD1
Control group	89.65±7.15	67.12±5.19	1.24±0.12	0.85±0.07
Low-dose remimazolam group	69.12±6.05*	53.02±4.19*	0.78±0.06*	0.67±0.05*
Medium-dose remimazolam group	55.00±5.11*#	37.33±3.85*#	0.55±0.05*#	0.54±0.03*#
High-dose remimazolam group	44.62±3.82*#&	25.02±2.12*#&	0.38±0.04*#&	0.41±0.02*#&
High-dose remimazolam+rHMGB1 group	60.15±5.06@	41.36±4.65@	0.61±0.06@	0.59±0.05@

* $P < 0.05$, 与对照组比较; # $P < 0.05$, 与低剂量瑞马唑仑组比较; & $P < 0.05$, 与中剂量瑞马唑仑组比较; @ $P < 0.05$, 与高剂量瑞马唑仑组比较。 $\bar{x} \pm s$, $n = 6$ 。
* $P < 0.05$ compared with control group; # $P < 0.05$ compared with low-dose remimazolam group; & $P < 0.05$ compared with medium-dose remimazolam group; @ $P < 0.05$ compared with high-dose remimazolam group. $\bar{x} \pm s$, $n = 6$.

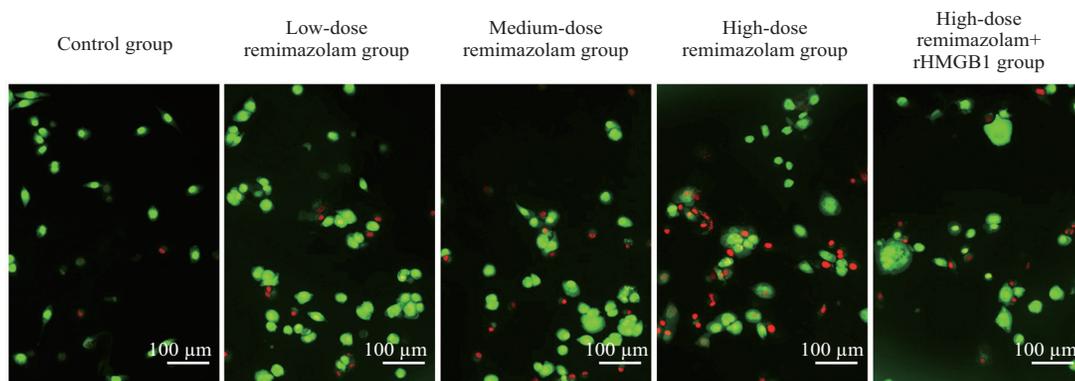


图4 AO/EB双染检测各组BIU-87细胞凋亡率

Fig.4 The apoptosis rate in each group of BIU-87 cells was detected by AO/EB double staining

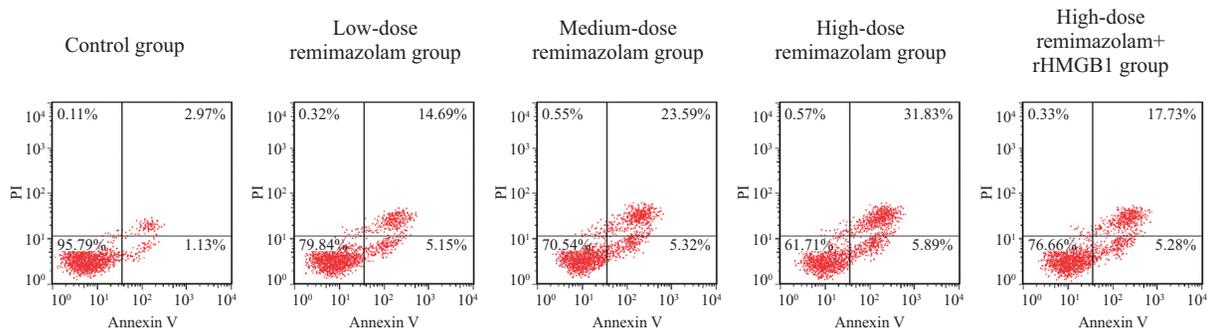


图5 Annexin V-FITC/PI双染检测各组BIU-87细胞凋亡率

Fig.5 The apoptosis rate in each group of BIU-87 cells was detected by Annexin V-FITC/PI double staining

蛋白水平、CyclinD1蛋白水平均升高($P < 0.05$)。

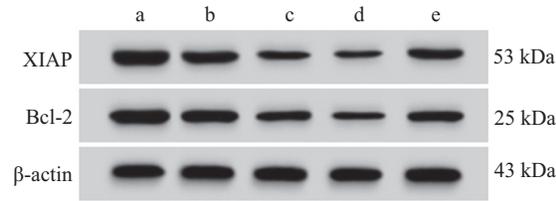
2.3 瑞马唑仑对各组BIU-87细胞凋亡的影响

图4~图6和表3表明,与对照组比较,低剂量瑞马唑仑组、中剂量瑞马唑仑组和高剂量瑞马唑仑组BIU-87细胞AO/EB双染凋亡率、Annexin V-FITC/PI双染凋亡率均升高, XIAP和Bcl-2蛋白水平均降低,且低、中、高剂量瑞马唑仑组之间的差异也具有统计学意义($P < 0.05$); 与高剂量瑞马唑仑组比较,高剂

量瑞马唑仑+rHMGB1组BIU-87细胞AO/EB双染凋亡率、Annexin V-FITC/PI双染凋亡率均降低, XIAP和Bcl-2蛋白水平均升高($P < 0.05$)。

2.4 瑞马唑仑对各组BIU-87细胞上皮-间充质转化的影响

图7和表4表明,与对照组比较,低剂量瑞马唑仑组、中剂量瑞马唑仑组和高剂量瑞马唑仑组BIU-87细胞E-cadherin、Claudins阳性细胞率均升高,



a~e依次表示对照组、低剂量瑞马唑仑组、中剂量瑞马唑仑组、高剂量瑞马唑仑组和高剂量瑞马唑仑+rHMGB1组。

a-e represent control group, low-dose remimazolam group, medium-dose remimazolam group, high-dose remimazolam group, and high-dose remimazolam+rHMGB1 group, respectively.

图6 Western blot检测各组BIU-87细胞XIAP和Bcl-2蛋白水平

Fig.6 The protein levels of XIAP and Bcl-2 in each group of BIU-87 cells were detected by Western blot

表3 瑞马唑仑对各组BIU-87细胞凋亡相关指标的影响

Table 3 The effects of remimazolam on apoptosis-related indicators in each group of BIU-87 cells

组别 Group	AO/EB双染凋亡率/% AO/EB apoptosis rate /%	Annexin V-FITC/PI双染凋亡率/% Annexin V-FITC/PI apoptosis rate /%	XIAP	Bcl-2
Control group	4.25±0.32	3.88±0.37	1.03±0.12	0.97±0.07
Low-dose remimazolam group	15.02±3.12*	19.65±2.11*	0.75±0.06*	0.82±0.07*
Medium-dose remimazolam group	24.03±4.13*#	28.66±3.02*#	0.60±0.05*#	0.59±0.05*#
High-dose remimazolam group	35.64±3.02*#&	37.33±2.45*#&	0.42±0.04*#&	0.40±0.02*#&
High-dose remimazolam+rHMGB1 group	19.64±1.58@	22.51±2.16@	0.66±0.05@	0.65±0.05@

* $P < 0.05$, 与对照组比较; # $P < 0.05$, 与低剂量瑞马唑仑组比较; & $P < 0.05$, 与中剂量瑞马唑仑组比较; @ $P < 0.05$, 与高剂量瑞马唑仑组比较。 $\bar{x} \pm s$, $n=6$ 。

* $P < 0.05$ compared with control group; # $P < 0.05$ compared with low-dose remimazolam group; & $P < 0.05$ compared with medium-dose remimazolam group; @ $P < 0.05$ compared with high-dose remimazolam group. $\bar{x} \pm s$, $n=6$.

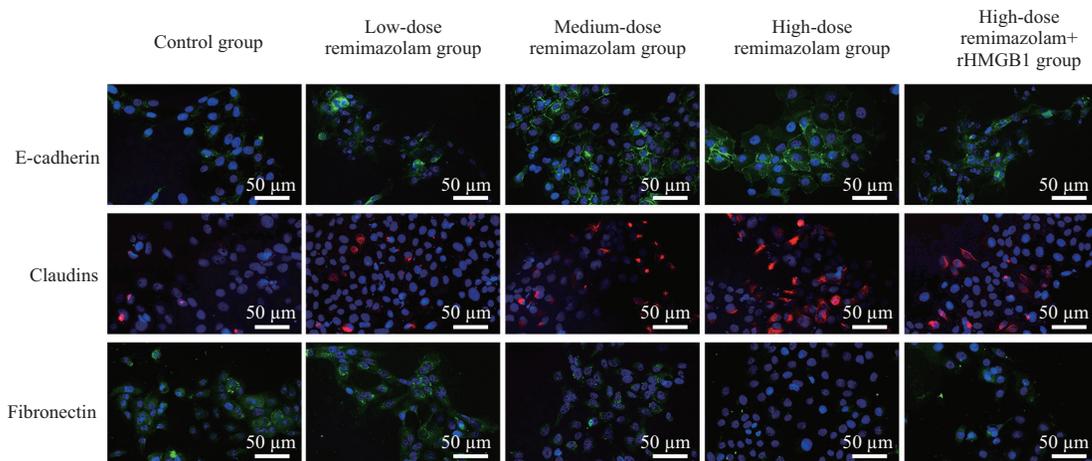


图7 免疫荧光检测瑞马唑仑对各组BIU-87细胞EMT相关标志物阳性细胞率

Fig.7 The positive cell rates of EMT-related markers in each group of BIU-87 cells were detected by immunofluorescence

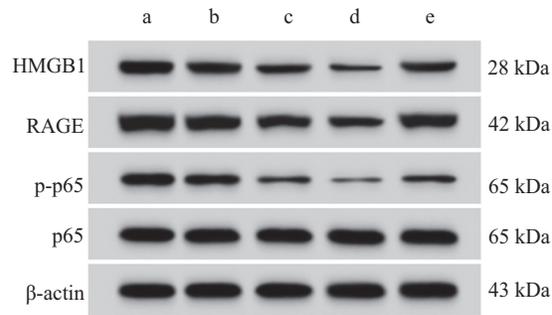
表4 瑞马唑仑对各组BIU-87细胞EMT相关指标的影响

Table 4 The effects of remimazolam on EMT-related indicators in each group of BIU-87 cells

组别 Group	E-cadherin	Claudins	Fibronectin
Control group	20.16±2.36	15.23±1.26	69.15±5.16
Low-dose remimazolam group	41.33±4.02*	31.62±2.05*	50.03±3.84*
Medium-dose remimazolam group	58.62±5.03*#	42.32±3.02*#	33.05±2.84*#
High-dose remimazolam group	70.05±6.54*#&	66.03±5.02*#&	15.36±1.05*#&
High-dose remimazolam+rHMGB1 group	49.02±5.12@	38.64±3.12@	39.66±2.02@

* $P < 0.05$, 与对照组比较; # $P < 0.05$, 与低剂量瑞马唑仑组比较; & $P < 0.05$, 与中剂量瑞马唑仑组比较; @ $P < 0.05$, 与高剂量瑞马唑仑组比较。 $\bar{x} \pm s$, $n=6$ 。

* $P < 0.05$ compared with control group; # $P < 0.05$ compared with low-dose remimazolam group; & $P < 0.05$ compared with medium-dose remimazolam group; @ $P < 0.05$ compared with high-dose remimazolam group. $\bar{x} \pm s$, $n=6$.



a~e依次表示对照组、低剂量瑞马唑仑组、中剂量瑞马唑仑组、高剂量瑞马唑仑组和高剂量瑞马唑仑+rHMGB1组。

a-e represent control group, low-dose remimazolam group, medium-dose remimazolam group, high-dose remimazolam group, and high-dose remimazolam+rHMGB1 group, respectively.

图8 Western blot检测各组BIU-87细胞HMGB1、RAGE、p-p65和p65蛋白水平

Fig.8 The protein levels of HMGB1, RAGE, p-p65, and p65 in each group of BIU-87 cells were detected by Western blot

表5 瑞马唑仑对各组BIU-87细胞HMGB1-RAGE通路相关蛋白表达的影响

Table 5 The effects of remimazolam on the expression of HMGB1-RAGE pathway-related proteins in each group of BIU-87 cells

组别 Group	HMGB1	RAGE	p-p65/p65
Control group	0.89±0.07	1.20±0.14	0.75±0.05
Low-dose remimazolam group	0.70±0.05*	0.88±0.07*	0.58±0.04*
Medium-dose remimazolam group	0.44±0.03* [#]	0.65±0.06* [#]	0.32±0.02* [#]
High-dose remimazolam group	0.32±0.02* ^{#&}	0.46±0.03* ^{#&}	0.16±0.03* ^{#&}
High-dose remimazolam+rHMGB1 group	0.49±0.03 [@]	0.71±0.05 [@]	0.39±0.04 [@]

* $P < 0.05$, 与对照组比较; [#] $P < 0.05$, 与低剂量瑞马唑仑组比较; [&] $P < 0.05$, 与中剂量瑞马唑仑组比较; [@] $P < 0.05$, 与高剂量瑞马唑仑组比较。 $\bar{x} \pm s$, $n=6$ 。

* $P < 0.05$ compared with control group; [#] $P < 0.05$ compared with low-dose remimazolam group; [&] $P < 0.05$ compared with medium-dose remimazolam group; [@] $P < 0.05$ compared with high-dose remimazolam group. $\bar{x} \pm s$, $n=6$.

Fibronectin阳性细胞率降低,且低、中、高剂量瑞马唑仑组之间的差异也具有统计学意义($P < 0.05$);与高剂量瑞马唑仑组比较,高剂量瑞马唑仑+rHMGB1组BIU-87细胞E-cadherin、Claudins阳性细胞率均降低, Fibronectin阳性细胞率升高($P < 0.05$)。

2.5 瑞马唑仑对各组BIU-87细胞中HMGB1、RAGE蛋白水平以及p-p65/p65值的影响

图8和表5表明,与对照组比较,低剂量瑞马唑仑组、中剂量瑞马唑仑组和高剂量瑞马唑仑组BIU-87细胞HMGB1、RAGE蛋白水平以及p-p65/p65值均降低,且低、中、高剂量瑞马唑仑组之间的差异也具有统计学意义($P < 0.05$);与高剂量瑞马唑仑组比较,高剂量瑞马唑仑+rHMGB1组BIU-87细胞HMGB1、RAGE蛋白水平以及p-p65/p65值均升高($P < 0.05$)。

3 讨论

膀胱癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一,严重威胁人类健康。当前,膀胱癌治疗效果受限于出血、

感染并发症以及耐药性等副作用^[8]。膀胱癌细胞系BIU-87具有典型膀胱癌细胞特征,在体外条件下可以很好地模拟膀胱癌细胞在体内的生物学特性^[9],因此本研究选择该细胞系进行实验,深入研究膀胱癌发病机制,为早日开发高效低毒的治疗方法奠定基础。

瑞马唑仑是一种新型短效苯二氮类药物,在临床麻醉和镇静领域应用广泛^[5-6]。已有研究表明,瑞马唑仑具有一定的抗肿瘤潜力。例如:在结肠癌细胞中,1 μg/mL的瑞马唑仑可通过抑制癌细胞增殖活力以及肿瘤标志物CEA和CA19-9的表达来发挥抗肿瘤功能^[10]。蔡玉红等^[7]研究还表明,瑞马唑仑可通过抑制Wnt/β-catenin通路来抑制细胞增殖和转移的恶性行为。本研究结果显示,当瑞马唑仑浓度为0.5~2 μg/mL时,BIU-87细胞活力呈剂量依赖性降低。在临床常用镇静剂量下,瑞马唑仑的血药浓度通常维持在0.1~0.5 μg/mL,而在达到深度镇静或麻醉状态时瑞马唑仑的血药浓度可升至0.5~2 μg/mL,其与本研究设定的浓度

范围(0.5~2 $\mu\text{g/mL}$)相似,提示在该浓度下瑞马唑仑可能兼具麻醉与抗肿瘤双重作用。进一步分析发现,瑞马唑仑可明显降低BIU-87细胞集落形成数量、Ki-67阳性细胞率以及c-myc、CyclinD1、XIAP、Bcl-2蛋白水平,升高AO/EB双染凋亡率、Annexin V-FITC/PI双染凋亡率,且具有剂量依赖性。其中,Ki-67表达直接反映细胞增殖活性;c-Myc是原癌基因编码的关键转录因子,参与调控多个细胞生物过程;CyclinD1可推动细胞向S期进展^[11-12]。XIAP蛋白和Bcl-2蛋白则是抗凋亡相关因子^[13]。上述结果表明,瑞马唑仑通过抑制膀胱癌细胞增殖、解除抗凋亡机制等多重途径,发挥对膀胱癌的抑制作用,且高剂量的瑞马唑仑抗癌效果更显著。此外,EMT相关指标检测结果显示,下调E-cadherin蛋白水平可通过削弱胞间连接离散细胞,Claudins表达改变影响紧密连接完整性,而Fibronectin主要在细胞外基质中积累,为细胞转移提供支架,三者协同驱动细胞获得间质特性,参与EMT进程^[14-15]。瑞马唑仑处理后,BIU-87细胞中E-cadherin和Claudins表达上调,Fibronectin表达下调,表明细胞间质化程度降低,并且向着上皮细胞表型转变,提示瑞马唑仑能够抑制膀胱癌细胞的EMT过程。

HMGB1-RAGE通路在肿瘤中发挥重要作用, HMGB1作为一种损伤相关分子,在肿瘤微环境中被释放,通过结合RAGE激活下游的NF- κ B等信号通路(p-p65/p65是关键激活指标),促进肿瘤细胞增殖和转移^[16]。研究显示,在乳腺癌中,阻断HMGB1-RAGE通路可抑制肿瘤细胞生长和迁移^[17]。本研究结果与之相似,随着瑞马唑仑浓度增加,BIU-87细胞HMGB1、RAGE蛋白水平以及p-p65/p65值也随之降低,且高剂量瑞马唑仑抑制效果最佳,提示瑞马唑仑抑制BIU-87细胞中HMGB1-RAGE通路激活。为了进一步验证该通路在瑞马唑仑抗癌中的作用机制,在高剂量瑞马唑仑干预的前提下补充rHMGB1激活HMGB1-RAGE通路,结果证实,rHMGB1能够逆转瑞马唑仑对BIU-87细胞增殖和EMT的抑制作用,并拮抗其促凋亡效应,这充分表明瑞马唑仑通过抑制HMGB1-RAGE通路激活调控膀胱癌增殖、凋亡和EMT进程。

综上,本研究首次证实瑞马唑仑通过抑制HMGB1-RAGE通路激活进而有效抑制膀胱癌细胞增

殖和EMT,诱导细胞凋亡。这一发现为临床上膀胱癌的治疗开辟了新思路。后续需进一步开展动物实验和临床试验来验证瑞马唑仑在体内的抗肿瘤效果以及安全性,为膀胱癌的精准治疗提供有效支持。

参考文献 (References)

- [1] SIEGEL R L, KRATZER T B, GIAQUINTO A N, et al. Cancer statistics, 2025 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2025, 75(1): 10-45.
- [2] CAO K, SHI H, WU B, et al. Identification of ECM and EMT relevant genes involved in the progression of bladder cancer through bioinformatics analysis [J]. *Am J Clin Exp Urol*, 2024, 12(4): 183-93.
- [3] AMORNSUPAK K, THONGCHOT S, THINYAKUL C, et al. HMGB1 mediates invasion and PD-L1 expression through RAGE-PI3K/AKT signaling pathway in MDA-MB-231 breast cancer cells [J]. *BMC Cancer*, 2022, 22(1): 578-90.
- [4] LEE Y H, WU R C, MAI H C, et al. The regulatory role of nuclear respiratory factor 1 in bladder cancer cells [J]. *Anticancer Res*, 2023, 43(4): 1521-31.
- [5] BARBOSA E C, ESPÍRITO SANTO P A, BARALDO S, et al. Remimazolam versus propofol for sedation in gastrointestinal endoscopic procedures: a systematic review and meta-analysis [J]. *Br J Anaesth*, 2024, 132(6): 1219-29.
- [6] RYU K H, LEE S H, SHIM J G, et al. Comparative study on the impact of remimazolam and sevoflurane on quality of recovery after transurethral resection of bladder tumor: a randomized controlled noninferiority study [J]. *Medicine*, 2024, 103(31): e38962.
- [7] 蔡玉红, 李辉, 毛远兴, 等. 瑞马唑仑调节Wnt/ β -Catenin信号通路对喉鳞状细胞癌细胞恶性生物学行为的影响 [J]. *中国老年学杂志*(CAI Y H, LI H, MAO Y X, et al. Effects of remimazolam regulating Wnt/ β -Catenin signaling pathway on malignant biological behavior of laryngeal squamous cell carcinoma cells [J]. *Chinese Journal of Gerontology*), 2025, 25(13): 3200-4.
- [8] LOPEZ-BELTRAN A, COOKSON M S, GUERCIO B J, et al. Advances in diagnosis and treatment of bladder cancer [J]. *BMJ*, 2024, 384(21): e076743.
- [9] 贾磊, 张超, 陈俊如, 等. 基于Bax、Cleaved-Caspase-3蛋白表达探讨大蒜素对膀胱癌细胞增殖、凋亡、迁移、侵袭的作用 [J]. *中国老年学杂志*(JIA L, ZHANG C, CHEN J R, et al. Effects of allicin on proliferation, apoptosis, migration and invasion of bladder cancer cells based on Bax and Cleaved-Caspase-3 protein expression [J]. *Chinese Journal of Gerontology*), 2024, 44(3): 637-40.
- [10] LIU Y, WANG S, YANG W. Inhibiting the proliferation of colorectal cancer cells by reducing TSPO/VDAC expression [J]. *Iran J Public Health*, 2023, 52(7): 1378-89.
- [11] WANG T, WANG G, SHAN D, et al. ACAT1 promotes proliferation and metastasis of bladder cancer via AKT/GSK3 β /c-Myc signaling pathway [J]. *J Cancer*, 2024, 15(11): 3297-312.
- [12] ZHANG W, LIU Q, ZHANG J, et al. FBXO45 knockdown restrains the progression of bladder cancer via the ERK/Cyclin D1/CDK4 pathway [J]. *Arch Esp Urol*, 2024, 77(7): 796-804.
- [13] HIRUMA K, BILIM V, KAZAMA A, et al. Acidic microenvironment enhances cisplatin resistance in bladder cancer via Bcl-2 and XIAP [J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2025, 47(1): 43-59.
- [14] SARKAR S, KANDASAMY T, GHOSH S S. Inhibition of the MLL1-WDR5 interaction modulates epithelial to mesenchymal transition and metabolic pathways in triple-negative breast cancer cells [J].

- Biochem Biophys Res Commun, 2025, 755(21): 151559-69.
- [15] LIU Z, CHEN Z, YANG H, et al. miR-944 inhibits malignant progression of bladder cancer through ATIC/AKT/FOXO3A axis mediated by SHMT1 [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2025, 61(6): 656-68.
- [16] GAO T, HUANG Z. Effects of isoflurane on the cell pyroptosis in the lung cancer through the HMGB1/RAGE pathway [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2024, 196(7): 3786-99.
- [17] YUSEIN-MYASHKOVA S, VLADIMIROVA D, GOSPODINOV A, et al. Metformin inhibits cell motility and proliferation of triple-negative breast cancer cells by blocking HMGB1/RAGE signaling [J]. *Cells*, 2025, 14(8): 590-615.