

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2025.01.017

论著·基础

# 依托咪酯调控 miR-204-5p/HOXC8 轴对胃癌细胞增殖、凋亡及侵袭的影响

刘艳,李俊,周民,夏天,夏甘霖



基金项目:湖北省卫健委自然科学基金科研项目(WJ2019AB008)

作者单位:430081 武汉科技大学附属普仁医院麻醉科(刘艳、李俊、周民),普外科(夏甘霖);441000 湖北医药学院附属襄阳市第一人民医院普外科(夏天)

通信作者:夏天,E-mail:404025960@qq.com

**【摘要】目的** 探讨依托咪酯(Eto)调节微小 RNA(miR)-204-5p/同源盒基因 C8(HOXC8)轴对人胃癌细胞增殖、凋亡及侵袭的影响。**方法** 2023 年 4 月—2024 年 4 月于武汉科技大学实验室进行实验,将胃癌细胞 MKN45 分为对照(Ctrl)组、低剂量 Eto 组(Eto-L, 5  $\mu\text{mol/L}$ )、中剂量 Eto 组(Eto-M, 10  $\mu\text{mol/L}$ )、高剂量 Eto 组(Eto-H, 20  $\mu\text{mol/L}$ )、Eto-H + miR-inhibitor-NC、Eto-H + miR-204-5p inhibitor 组。CCK-8 法、集落形成实验检测细胞增殖情况,流式细胞术检测 MKN45 细胞凋亡情况,Transwell 实验检测细胞侵袭能力;qRT-PCR 检测细胞中 miR-204-5p 和 HOXC8 mRNA 表达水平;双荧光素酶实验检测 miR-204-5p 和 HOXC8 之间的靶向关系。**结果** 与 Ctrl 组比较,Eto-L 组、Eto-M 组、Eto-H 组、Eto-H + miR-inhibitor-NC 组、Eto-H + miR-204-5p inhibitor 组 MKN45 细胞存活率、集落形成率、细胞侵入率、HOXC8 mRNA 水平均显著降低( $F/P = 33.391/ < 0.001, 29.646/ < 0.001, 44.814/ < 0.001, 45.485/ < 0.001$ ),细胞凋亡率和 miR-204-5p 水平显著升高( $F/P = 78.091/ < 0.001, 22.665/ < 0.001$ );与 Eto-H + miR-inhibitor-NC 组比较,Eto-H + miR-204-5p inhibitor 组 MKN45 细胞存活率、集落形成率、细胞侵入率、HOXC8 mRNA 水平均显著升高( $q/P = 8.099/ < 0.001, 7.587/ < 0.001, 7.768/ < 0.001, 11.162/ < 0.001$ ),细胞凋亡率和 miR-204-5p 水平显著降低( $q/P = 10.254/ < 0.001, 8.596/ < 0.001$ );与 HOXC8-WT 和 miR-NC 共转染细胞比较,HOXC8-WT 和 miR-204-5p mimic 共转染的 MKN45 细胞中相对荧光酶活性显著降低( $t/P = 5.770/ < 0.001$ )。**结论** Eto 可能通过上调 miR-204-5p、下调 HOXC8,减弱胃癌细胞 MKN45 增殖和侵袭能力,促进细胞凋亡。

**【关键词】** 胃癌;依托咪酯;微小 RNA-204-5p/同源盒基因 C8 轴;作用机制**【中图分类号】** R735.2;R971 **【文献标识码】** A

**The effects of etomidate on the proliferation, apoptosis, and invasion of gastric cancer cells by regulating the miR-204-5p/HOXC8 axis** Liu Yan\*, Li Jun, Zhou Min, Xia Tian, Xia Ganlin. \*Department of Anesthesiology, Affiliated Puren Hospital of Wuhan University of Science and Technology, Hubei, Wuhan 430081, China

Funding program: Natural Science Foundation Research Project of Hubei Provincial Health Commission(WJ2019AB008)

Corresponding author: Xia Tian, E-mail: 404025960@qq.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the effects of etomidate (Eto) on the proliferation, apoptosis, and invasion of human gastric cancer cells by regulating the microRNA (miR)-204-5p/homologous box gene C8 (HOXC8) axis. **Methods** Experiments were conducted in the Laboratory of Wuhan University of Science and Technology in April 2023 to April 2024. Gastric cancer cells MKN45 were separated into control (Ctrl) group, low-dose Eto group (Eto-L, 5  $\mu\text{mol/L}$ ), medium-dose Eto group (Eto-M, 10  $\mu\text{mol/L}$ ), high-dose Eto group (Eto-H, 20  $\mu\text{mol/L}$ ), Eto-H + miR inhibitor NC, and Eto-H + miR-204-5p inhibitor group. CCK-8 method and colony formation assay were applied to detect cell proliferation. Flow cytometry was applied to detect apoptosis in MKN45 cells. Transwell assay was applied to detect cell invasion ability. QRT-PCR was applied to detect the mRNA levels of miR-204-5p and HOXC8 in cells. Dual luciferase assay was applied to detect the targeting relationship between miR-204-5p and HOXC8. **Results** Compared with the control group, the survival rate of MKN45 cells ( $F/P = 33.391/ < 0.001$ ), colony formation rate ( $F/P = 29.646/ < 0.001$ ), cell invasion rate ( $F/P = 44.814/ < 0.001$ ), and HOXC8 mRNA level ( $F/P = 45.485/ < 0.001$ ) in Eto-L, Eto-M, and Eto-H groups were greatly lower while the apoptosis rate ( $F/P = 78.091/ < 0.001$ ) and miR-204-5p level ( $F/P = 22.665/ < 0.001$ ) were greatly higher. Compared with the Eto-H group and Eto-H

+ miR inhibitor NC group, the survival rate of MKN45 cells ( $q/P = 8.099/ < 0.001$ ), colony formation rate ( $q/P = 7.857/ < 0.001$ ), cell invasion rate ( $q/P = 7.768/ < 0.001$ ), and HOXC8 mRNA level ( $q/P = 11.162/ < 0.001$ ) in Eto-H + miR-204-5p inhibitor group were greatly higher ( $P < 0.05$ ), while the apoptosis rate ( $q/P = 10.254/ < 0.001$ ) and miR-204-5p level ( $q/P = 8.596/ < 0.001$ ) were greatly lower. Compared with co transfected cells with HOXC8-WT and miR-NC, the relative luciferase activity of MKN45 cells co transfected with HOXC8-WT and miR-204-5p mimic was greatly lower ( $t/P = 5.770/ < 0.001$ ). **Conclusion**

Eto may weaken the proliferation and invasion abilities of gastric cancer cells, and promote cell apoptosis by upregulating miR-204-5p and downregulating HOXC8.

**【Key words】** Gastric cancer; Etomidate; microRNA-204-5p/homologous box gene C8 axis; Mechanism

胃癌在全球常见的癌症中排名第五且在死亡率排名中位列第三,导致胃癌发生的因素主要包括年龄增长、日常饮食中盐摄入量高、膳食纤维摄入量少、幽门螺杆菌感染等<sup>[1-2]</sup>,其中幽门螺杆菌感染是非贲门性胃癌最常见的危险因素<sup>[3]</sup>。虽然近几年胃癌相关研究不断出现新进展,但大多数胃癌细胞对免疫检查点抑制剂单药治疗不敏感的问题并未解决<sup>[2]</sup>,胃癌相关免疫治疗方案的制定仍有较大困难。依托咪酯(Etomidate, Eto)是一种短效非巴比妥类催眠药和静脉麻醉药物,作用于 $\gamma$ -氨基丁酸 A 型受体,与其他药物比较,可以稳定心血管并减少呼吸抑制,功效与异丙酚相似。有研究表明,异丙酚对多种癌症显示出强大的抗肿瘤作用<sup>[4-5]</sup>,而 Eto 表现出更强的免疫保护和抗肿瘤能力。据报道,Eto 可减少肺和脑肿瘤细胞的增殖,增加癌细胞凋亡<sup>[6]</sup>。微小 RNA(microRNA, miRNA)是一种由内源性基因编码的非编码 RNA,是可以致癌或抑癌的因子<sup>[7]</sup>。据报道,miR-204-5p 是一种抑癌基因,其上调可有效抑制骨肉瘤细胞生长,诱导细胞凋亡<sup>[7-8]</sup>。同源盒基因 C8 (homologous box gene C8, HOXC8)参与诸多细胞生命过程,包括胚胎发育、细胞增殖和分化<sup>[9]</sup>。有报道称,HOXC8 在胃癌组织中表达水平较高,而在正常组织或细胞系中通常不表达<sup>[10]</sup>。本研究前期发现 Eto 对胃癌细胞增殖具有抑制作用,又通过数据筛选发现 miR-204-5p 与 HOXC8 具有靶向结合位点,但 Eto 对二者的调控作用尚不明确。因此,本研究基于 miR-204-5p/HOXC8 轴探讨 Eto 对胃癌细胞的影响,以期丰富胃癌潜在的治疗靶点,为临床使用 Eto 治疗胃癌提供理论依据,报道如下。

## 1 材料与方法

1.1 材料 (1)细胞:人胃癌细胞 MKN45 细胞系购自上海青旗生物技术有限公司。(2)主要试剂:Eto 购自上海翌圣生物科技有限公司(货号:57905ES01);细胞凋亡检测试剂盒购自德国 Sigma-Aldrich 公司(货号:20TST);miR-204-5p 模拟物(miR-204-5p mimics)及其阴性对照(miR-NC)、miR-204-5p 抑制剂(miR-204-5p inhibitor)及其阴性对照(miR-inhibitor-NC)均

由江苏赛索飞生物科技有限公司构建合成;Lipofectamine™ 2000 Reagent 购自 Invitrogen 公司(货号:11668019);Pierce™ 海肾—萤火虫荧光素酶双检测试剂盒购自美国 Thermo-Fisher 公司(货号:16185)。(3)仪器设备:酶标仪(SpectraMax i3x)购自美国 Molecular Devices 公司;加湿培养箱(HF-90)购自中国力康生物医疗科技有限公司;生物安全柜购自江苏安泰空气技术有限公司(BSC-1004);光学显微镜购自日本奥林巴斯公司(IX73);离心机购自北京大龙兴创实验仪器(D1008E);水浴锅购自天根生化科技有限公司(OSE-DB-01);流式细胞仪购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司(Attune CytPix);荧光定量 PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司(CFX96Touch)。

1.2 实验方法 2023 年 4 月—2024 年 4 月于武汉科技大学实验室进行。MKN45 细胞的完全培养基:89% DMEM 培养基、10% 胎牛血清和 1% 100 × 青霉素—链霉素。MKN45 细胞于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱中培养,每 2 ~ 3 d 换液 1 次,以 1:3 进行传代。根据实验需要,将 MKN45 细胞分为 Ctrl 组、低剂量 Eto 组(Eto-L, 5 μmol/L)、中剂量 Eto 组(Eto-M, 10 μmol/L)、高剂量 Eto 组(Eto-H, 20 μmol/L)、Eto-H + miR-inhibitor-NC 组和 Eto-H + miR-204-5p inhibitor 组。Eto-H + miR-inhibitor-NC 组和 Eto-H + miR-204-5p inhibitor 组细胞在高剂量 Eto 培养前 48 h 分别转染 miR-inhibitor-NC 和 miR-204-5p inhibitor。

1.2.1 CCK-8 法检测细胞增殖毒性:将 MKN45 细胞接种到 96 孔板中按 1.2 分组培养,24 h 后弃去上清液,向孔中加入含 10% CCK-8 的完全培养基;孵育 3 h 后,酶标仪检测 450 nm 处的吸光度。细胞存活率(%) = [(对照组 OD - 实验组 OD) / (对照组 OD - 空白组 OD)] × 100%。

1.2.2 集落形成实验评估细胞增殖能力:将各组 MKN45 细胞以 5 × 10<sup>2</sup> 个细胞/孔的浓度接种于 6 孔板中,于二氧化碳加湿培养箱中培养 14 d;用 10% 甲醛室温固定 30 min 后,0.5% 结晶紫染色 5 min,并进行计数。集落形成率(%) = (实验组集落数/对照组

集落数) × 100%。

1.2.3 流式细胞术实验检测细胞凋亡情况:将各组 MKN45 细胞接种到 6 孔板中,培养 24 h 后,收集细胞, PBS 缓冲液洗涤 1 遍;透膜液重悬,加入 Annexin V-FITC 和 PI 染色液,室温避光孵育 15 min;透膜液洗涤 1 遍并重悬,用筛网过滤后,使用流式细胞仪进行检测。激发波长 488 nm,发射波长 525 nm 和 630 nm 分别检测 Annexin V-FITC 和 PI 荧光信号, Kaluza Analysis 软件进行结果分析。

1.2.4 Transwell 实验检测细胞侵袭能力:将 1.2 中各组 MKN45 细胞接种到含有基质胶的 Transwell 上腔室中,下腔室补充完全培养基,培养 24 h 后,将侵入下腔室细胞用 Giemsa 溶液室温染色 15 min;光学显微镜拍照记录入侵细胞的数量,并使用 ImageJ 进行定量。侵袭率(%) = (侵袭细胞数/接种细胞数) × 100%。

1.2.5 qRT-PCR 实验检测 RNA 表达情况:将 MKN45 细胞接种到 6 孔板中,按 1.2 的分组处理细胞,48 h 后收集细胞,提取细胞 RNA,反转录为 cDNA;以 cDNA 为模版,加入上游引物(forward primer, F)、下游引物(reverse primer, R)、水和定量酶,通过 qPCR 扩增 miR-204-5p、U6、HOXC8 和 GAPDH 序列。采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算 miR-204-5p 和 HOXC8 mRNA 水平。引物序列见表 1。

表 1 miR-204-5p、U6、HOXC8 和 GAPDH 引物序列

Tab. 1 Primer sequences for miR-204-5p, U6, HOXC8, and GAPDH

基 因	上游引物	下游引物
miR-204-5p	5'-GACGCTTTCCTTTGTC-ATCCT- 3'	5'-GTGCAGGGTCCGAGG-TATTC- 3'
U6	5'-ATTGGAACGATACAGA-GAAG- 3'	5'-GGAACGCTTCACGAA-TTTG- 3'
HOXC8	5'-TCAAAACCTCGTCTCCC-AGCC- 3'	5'-TTCCAAGGTCTGATAC-CGGC- 3'
GAPDH	5'-CAAGCAACTGTCCTT-GAG- 3'	5'-TAGACAGAAGGTGGC-ACA- 3'

1.2.6 双荧光素酶报告基因实验测定靶向关系:将 MKN45 细胞接种到 96 孔板中,24 h 后,将构建的 HOXC8 野生型质粒和突变型质粒分别与 miR-204-5p mimic、miR-NC 共转染到 MKN45 细胞中培养,48 h 后,弃去上清并加入细胞溶解缓冲液(含蛋白酶抑制剂),摇床摇动 15 min,确认细胞完全裂解;将细胞裂解液加入黑色 96 孔板中,加入工作液;分别以使用(535 ± 20) nm 和 613 nm 滤光片检测绿色海肾和红色萤火虫荧光信号,并读取数值进行分析。

1.3 统计学方法 采用 Graphpad Prism 7.0 软件统

计分析数据。符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,2 组间数据分析采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 Tukey's 检验。 $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结 果

2.1 Eto 对 MKN45 细胞增殖能力的影响 与 Ctrl 组比较,Eto-L 组、Eto-M 组、Eto-H 组和 Eto-H + miR-inhibitor-NC 组、Eto-H + miR-204-5p inhibitor 组 MKN45 细胞存活率均降低( $F/P = 33.391 / < 0.001$ );与 Eto-H + miR-inhibitor-NC 组比较,Eto-H + miR-204-5p inhibitor 组细胞存活率升高( $q/P = 8.099 / < 0.001$ ),见表 2。

表 2 各组 MKN45 细胞存活率比较 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

Tab. 2 Comparison of survival rates of MKN45 cells in various groups

组 别	<i>n</i>	细胞存活率
Ctrl 组	6	100.00 ± 0.00
Eto-L 组	6	89.36 ± 8.95 <sup>a</sup>
Eto-M 组	6	72.34 ± 7.26 <sup>ab</sup>
Eto-H 组	6	59.04 ± 6.01 <sup>abc</sup>
Eto-H + miR-inhibitor-NC 组	6	60.13 ± 7.53 <sup>ab</sup>
Eto-H + miR-204-5p inhibitor 组	6	83.14 ± 8.06 <sup>acd</sup>

注:与 Ctrl 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 Eto-L 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 Eto-M 组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ ;与 Eto-H + miR-inhibitor-NC 组比较,<sup>d</sup> $P < 0.05$ 。

2.2 Eto 对 MKN45 细胞集落形成的影响 与 Ctrl 组比较,Eto-M 组、Eto-H 组、Eto-H + miR-inhibitor-NC 组、Eto-H + miR-204-5p inhibitor 组 MKN45 细胞集落数量减少,细胞集落形成率均显著降低( $F/P = 29.646 / < 0.001$ ),见图 1;与 Eto-H + miR-inhibitor-NC 组比较,Eto-H + miR-204-5p inhibitor 组细胞集落数量增加,细胞集落形成率显著升高( $q/P = 7.587 / < 0.001$ ),见表 3。

表 3 各组 MKN45 细胞集落形成率比较 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

Tab. 3 Comparison of colony formation rates of MKN45 cells in various groups

组 别	<i>n</i>	集落形成率
Ctrl 组	6	89.35 ± 9.13
Eto-L 组	6	86.24 ± 9.34
Eto-M 组	6	63.15 ± 6.85 <sup>ab</sup>
Eto-H 组	6	50.78 ± 5.64 <sup>abc</sup>
Eto-H + miR-inhibitor-NC 组	6	51.64 ± 6.01 <sup>abc</sup>
Eto-H + miR-204-5p inhibitor 组	6	75.08 ± 7.63 <sup>d</sup>

注:与 Ctrl 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 Eto-L 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 Eto-M 组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ ;与 Eto-H + miR-inhibitor-NC 组比较,<sup>d</sup> $P < 0.05$ 。

2.3 Eto 对 MKN45 细胞凋亡的影响 与 Ctrl 组比较, Eto-L 组、Eto-M 组、Eto-H 组、Eto-H + miR-inhibitor-NC 组、Eto-H + miR-204-5p inhibitor 组 MKN45 细胞凋亡率均显著升高 ( $F/P = 78.091 / < 0.001$ ); 与 Eto-H + miR-inhibitor-NC 组比较, Eto-H + miR-204-5p inhibitor 组细胞凋亡率显著降低 ( $q/P = 10.254 / < 0.001$ ), 见图 2、表 4。

2.4 Eto 对 MKN45 细胞侵袭能力的影响 与 Ctrl 组比较, Eto-L 组、Eto-M 组、Eto-H 组、Eto-H + miR-inhibitor-NC 组、Eto-H + miR-204-5p inhibitor 组 MKN45 细胞侵入率均显著降低 ( $F/P = 44.814 / < 0.001$ ); 与 Eto-H + miR-inhibitor-NC 组比较, Eto-H + miR-204-5p inhibitor 组细胞侵入率显著升高 ( $q/P = 7.768 / < 0.001$ ), 见图 3、表 5。

表 4 各组 MKN45 细胞凋亡情况比较 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

Tab. 4 Comparison of apoptosis in MKN45 cells among different groups

组别	n	细胞凋亡率
Ctrl 组	6	2.32 ± 0.63
Eto-L 组	6	8.72 ± 0.96 <sup>a</sup>
Eto-M 组	6	13.54 ± 1.57 <sup>ab</sup>
Eto-H 组	6	18.35 ± 2.30 <sup>abc</sup>
Eto-H + miR-inhibitor-NC 组	6	18.13 ± 2.32 <sup>abc</sup>
Eto-H + miR-204-5p inhibitor 组	6	11.06 ± 1.63 <sup>ad</sup>

注: 与 Ctrl 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 Eto-L 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与 Eto-M 组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 与 Eto-H + miR-inhibitor-NC 组比较, <sup>d</sup> $P < 0.05$ 。

2.5 Eto 对 MKN45 细胞 miR-204-5p 和 HOXC8 mRNA 水平的影响 与 Ctrl 组比较, Eto-M 组、Eto-H 组、Eto-H + miR-inhibitor-NC 组、Eto-H + miR-204-5p

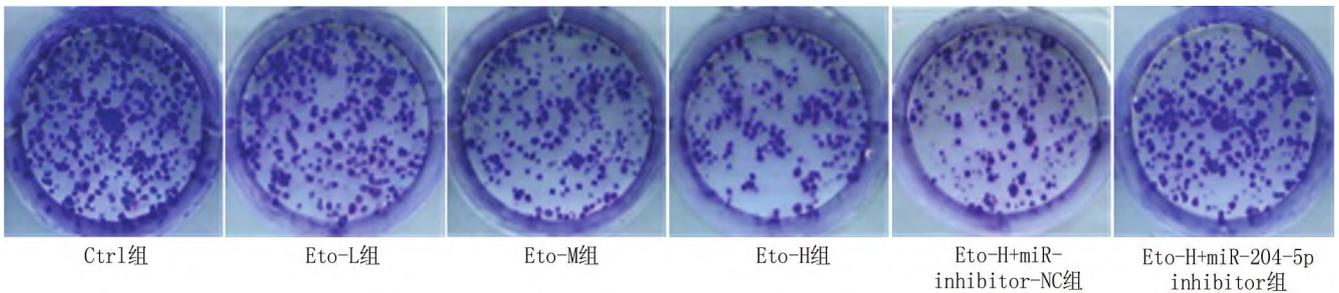


图 1 集落形成实验检测各组 MKN45 细胞增殖情况

Fig. 1 Colony formation experiment detects the proliferation of MKN45 cells in each group

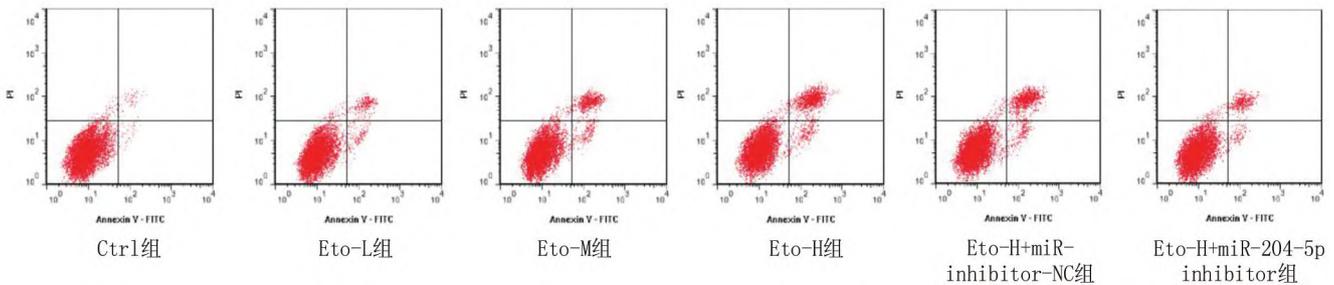


图 2 流式细胞术检测各组 MKN45 细胞凋亡情况

Fig. 2 Flow cytometry detection of apoptosis in MKN45 cells in each group

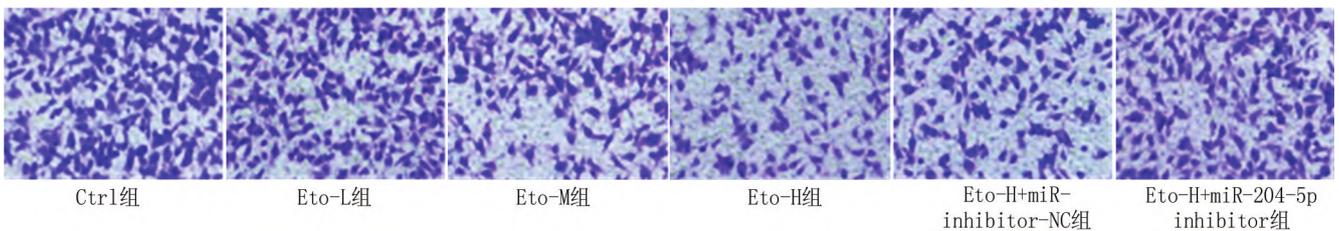


图 3 Transwell 实验检测 MKN45 细胞侵袭情况 (×200)

Fig. 3 Transwell experiment detection of MKN45 cell invasion (×200)

inhibitor 组 MKN45 细胞中 miR-204-5p 水平显著升高 ( $F/P = 22.665 / < 0.001$ ), HOXC8 mRNA 水平显著降低 ( $F/P = 45.485 / < 0.001$ ); 与 Eto-H + miR-inhibitor-NC 组比较, Eto-H + miR-204-5p inhibitor 组 miR-204-5p 水平显著降低 ( $q/P = 8.596 / < 0.001$ ), HOXC8 mRNA 水平显著升高 ( $q/P = 11.162 / < 0.001$ ), 见表 6。

表 5 各组 MKN45 细胞侵入率比较 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

Tab. 5 Comparison of invasion rates of MKN45 cells in different groups

组别	n	细胞侵入率
Ctrl 组	6	90.34 ± 9.01
Eto-L 组	6	72.19 ± 8.03 <sup>a</sup>
Eto-M 组	6	57.54 ± 6.18 <sup>ab</sup>
Eto-H 组	6	43.26 ± 5.12 <sup>abc</sup>
Eto-H + miR-inhibitor-NC 组	6	42.42 ± 4.97 <sup>abc</sup>
Eto-H + miR-204-5p inhibitor 组	6	63.58 ± 5.69 <sup>ad</sup>

注: 与 Ctrl 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 Eto-L 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与 Eto-M 组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 与 Eto-H + miR-inhibitor-NC 组比较, <sup>d</sup> $P < 0.05$ 。

表 6 各组 MKN45 细胞 miR-204-5p 和 HOXC8 mRNA 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 6 Comparison of miR-204-5p and HOXC8 mRNA levels in MKN45 cells of various groups

组别	n	miR-204-5p	HOXC8
Ctrl 组	6	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
Eto-L 组	6	1.14 ± 0.11	0.87 ± 0.11
Eto-M 组	6	1.30 ± 0.14 <sup>ab</sup>	0.68 ± 0.07 <sup>ab</sup>
Eto-H 组	6	1.61 ± 0.16 <sup>abc</sup>	0.51 ± 0.08 <sup>abc</sup>
Eto-H + miR-inhibitor-NC 组	6	1.59 ± 0.17 <sup>abc</sup>	0.49 ± 0.06 <sup>abc</sup>
Eto-H + miR-204-5p inhibitor 组	6	1.13 ± 0.13 <sup>ad</sup>	0.83 ± 0.08 <sup>ad</sup>

注: 与 Ctrl 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 Eto-L 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与 Eto-M 组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 与 Eto-H + miR-inhibitor-NC 组比较, <sup>d</sup> $P < 0.05$ 。

2.6 miR-204-5p 与 HOXC8 之间的靶向关系 预测 miR-204-5p 和 HOXC8 3'-UTR 之间的结合位点结果见图 4; 与 HOXC8-WT 和 miR-NC 共转染细胞比较, HOXC8-WT 和 miR-204-5p mimic 共转染的 MKN45 细胞中相对荧光酶活性降低 ( $t/P = 5.770 / < 0.001$ ), 见表 7。

### 3 讨论

胃癌是全世界所关心的健康问题, 由于诊断出胃癌时患者往往处于晚期, 所以胃癌病死率较高<sup>[2]</sup>。幽门螺杆菌感染是导致胃癌最常见的危险因素, 由幽门螺杆菌感染引起的胃癌与细菌的毒力、宿主的基因组和环境有巨大关联<sup>[11]</sup>, 大约 10% 的胃癌病例表现出家族聚集性<sup>[12]</sup>, 大多数感染者无症状。近些年来, 胃癌诊断和治疗有较大进展, 数字图像分析和液体活检诊断方法是一种趋势, 当化疗治疗效果不佳时则需要



图 4 预测 miR-204-5p 和 HOXC8 3'-UTR 之间的结合位点  
Fig. 4 Prediction of binding sites between miR-204-5p and HOXC8 3'-UTR

表 7 MKN45 细胞中相对荧光酶活性比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 7 Comparison of relative luciferase activity in MKN45 cells

MKN45	n	miR-NC	miR-204-5p mimic
HOXC8-WT	6	1.03 ± 0.11	0.53 ± 0.14 <sup>a</sup>
HOXC8-MUT	6	1.06 ± 0.12	0.98 ± 0.13

注: 与 miR-NC 共转染比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

免疫疗法, 寻找对应的免疫治疗靶点<sup>[2]</sup>。目前有多项胃癌相关基础研究与信号通路相关。比如, 肌松酮通过 PI3K/AKT 通路调控 MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达来抑制 SGC-7901 和 MGC-803 细胞的侵袭和迁移<sup>[13]</sup>; 保守序列 FAM117B 通过激活 KEAP1/NRF2 信号通路, 促进胃癌细胞的生长并增加癌细胞的化疗耐药性<sup>[14]</sup>; 具有乳酸转移酶活性的 AARS1 可以激活 YAP-TEAD 复合物介导的 Hippo 通路乳酸化, 促进胃癌细胞增殖<sup>[15]</sup>。

Eto 是一种用于麻醉诱导的催眠剂, 它通过  $\gamma$ -氨基丁酸 A 型受体上的正变构调节而产生效果, 增强了抑制性神经递质  $\gamma$ -氨基丁酸的效果, 是一种受体激动剂, 用于诱导全身麻醉和镇静<sup>[16]</sup>。Eto 的功效与巴比妥酸酯和异丙酚相似, 能迅速产生催眠作用而无镇痛效果, 已被用作异丙酚的替代品<sup>[17]</sup>。Eto 在麻醉诱导期间保持血液动力学稳定性<sup>[18]</sup>, 对全身血压和心率影响较小, 所以适用于血流动力学不稳定、心脏病, 甚至失血性休克患者<sup>[19]</sup>。同时, Eto 是癌症手术可优先选择的麻醉药物之一。研究发现, Eto 可作为 JAK2 抑制剂, 破坏 JAK2/STAT3 信号通路, 抑制肝癌细胞的恶性行为<sup>[20]</sup>; Eto 可通过下调 WWP2 影响 PI3K/AKT 信号通路相关的磷酸化蛋白水平, 抑制 A549 非小细胞肺癌细胞增殖并诱导细胞凋亡<sup>[21]</sup>。此外, 国内有研究报告, Eto 可以通过调节 Hippo 信号通路抑制鼻咽癌细胞的侵袭和迁移<sup>[22]</sup>。由此可见, Eto 可以通过多种信号通路调节癌细胞的恶性生物学行为, 增加 Eto 相关信号通路的研究, 可以完善 Eto 发挥治疗作用的分子过程, 增加对 Eto 的了解。本研究结果表明, Eto 处理胃癌 MKN45 细胞后, 细胞存活率、集落形成率、细胞侵入率降低, 细胞凋亡率升高, 表明 Eto 能通过促进胃癌

细胞凋亡而抑制胃癌细胞的增殖和侵袭能力。

miRNA 是一种小的 RNA 分子,通过与靶 mRNA 结合,在基因转录和蛋白表达的调控中发挥重要作用<sup>[23]</sup>。miRNA 与靶 mRNA 的 3'-UTR 结合,通过抑制翻译或降解 mRNA 来调节基因表达<sup>[7]</sup>。越来越多的证据表明,许多生理过程和病理结果(包括癌症)高度依赖于 miRNA。基于过表达或抑制 miRNA 表达的治疗具有巨大潜力,可通过控制 miRNA 基因表达调节一系列生物学功能,包括细胞生长、增殖、迁移、凋亡等细胞生命过程<sup>[24]</sup>。miR-204-5p 作为 miRNA 家族的成员,可在一些疾病中发挥相关功能,包括肺动脉高压、糖尿病和各种类型的癌症<sup>[7]</sup>。有研究表明,miR-204 可以与 TPT1 相互作用抑制 KGN 细胞活力并诱导细胞凋亡和细胞周期停滞,是多囊卵巢综合征的潜在靶点<sup>[21]</sup>。有报道称,miR-204-5p 是神经胶质瘤中的抑癌基因,miR-204-5p 可以调节 Bcl-2,控制神经胶质瘤发展<sup>[25]</sup>;miR-204-5p 也可通过阻止 NF-κB 信号传导抑制前列腺癌细胞的侵袭和迁移<sup>[26]</sup>。另有研究表明,宫颈癌组织中 miR-204-5p 水平降低,升高 miR-204-5p 水平后,癌细胞的增殖、迁移可受到抑制,并促进了细胞凋亡<sup>[27]</sup>。此外,HOXC8 在宫颈癌中高表达,miR-23a 可以通过下调 HOXC8 抑制宫颈癌细胞的增殖能力<sup>[28]</sup>。在本研究结果中,与 Ctrl 组比较,Eto 处理各组 MKN45 细胞中 miR-204-5p 水平显著升高,HOXC8 mRNA 水平显著降低,说明 Eto 可以促进抑癌分子 miR-204-5p 表达,下调癌症中高表达的 HOXC8;随后在 Eto 培养的基础上加入 miR-204-5p 抑制剂发现,Eto 对胃癌细胞恶性生物学行为的抑制作用被逆转,且通过双荧光素酶报告基因实验进一步证实了 miR-204-5p 可以靶向调节 HOXC8。由此提示 Eto 在胃癌细胞中可能通过上调 miR-204-5p 并下调 HOXC8,促进 MKN45 细胞凋亡,进而抑制其增殖和侵袭。

综上所述,Eto 可能通过调控 miR-204-5p/HOXC8 轴抑制胃癌细胞增殖和侵袭能力,促进胃癌细胞凋亡。但本研究仅在细胞水平上验证了 Eto 通过 miR-204-5p 与 HOXC8 相互作用对 MKN45 细胞产生了影响,并未解释清楚该过程中 miR-204-5p/HOXC8 轴所涉及的其他相关通路,后续将会进一步对此进行研究,进而发现其在体内的影响。

**利益冲突:**所有作者声明无利益冲突

**作者贡献声明**

刘艳:提出研究思路,撰写论文;李俊:可行性分析,实验操作;周氏:实验操作、数据收集;夏天:研究指导,论文撰写;夏甘霖:实验操作,统计学处理

## 参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3):209-249. DOI:10.3322/caac.21660.
- [2] Smyth EC, Nilsson M, Grabsch HI, et al. Gastric cancer[J]. Lancet, 2020, 396(10251):635-648. DOI:10.1016/S0140-6736(20)31288-5.
- [3] Hatakeyama M. Malignant helicobacter pylori-associated diseases; Gastric cancer and MALT lymphoma[J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1149:135-149. DOI:10.1007/5584\_2019\_363.
- [4] Gao Y, Zhou Y, Wang C, et al. Propofol mediates pancreatic cancer cell activity through the repression of ADAM8 via SP1[J]. Oncol Rep, 2021, 46(6):249. DOI:10.3892/or.2021.8200.
- [5] Zhao A, Liu Y. Propofol suppresses colorectal cancer development by the circ-PABPN1/miR-638/SRSF1 axis[J]. Anal Biochem, 2021, 631:114354. DOI:10.1016/j.ab.2021.114354.
- [6] Chu CN, Wu KC, Chung WS, et al. Etomidate suppresses invasion and migration of human A549 lung adenocarcinoma cells[J]. Anticancer Res, 2019, 39(1):215-223. DOI:10.21873/anticancer.13100.
- [7] Gu Y, Zhang X, Li Y, et al. MiR-204-5p-targeted AP1S2 is necessary for papillary thyroid carcinoma[J]. Mol Cell Endocrinol, 2023, 574:111993. DOI:10.1016/j.mce.2023.111993.
- [8] Qu L, Li Z, Liu P. mir-204-5p acts as a tumor suppressor by targeting DNM2 in osteosarcoma cells[J]. J Health Eng, 2022, 2022:8944588. DOI:10.1155/2022/8944588.
- [9] Brotto DB, Siena ADD, de Barros II, et al. Contributions of HOX genes to cancer hallmarks; Enrichment pathway analysis and review[J]. Tumour Biol, 2020, 42(5):1010428320918050. DOI:10.1177/1010428320918050.
- [10] Tsai CY, Liao JB, Lee YC, et al. HOXC8 mediates osteopontin expression in gastric cancer cells[J]. J Cancer, 2023, 14(13):2552-2561. DOI:10.7150/jca.84460.
- [11] Kumar S, Metz DC, Ellenberg S, et al. Risk factors and incidence of gastric cancer after detection of helicobacter pylori infection; A large cohort study[J]. Gastroenterology, 2020, 158(3):527-536. e7. DOI:10.1053/j.gastro.2019.10.019.
- [12] Choi JJ, Kim CG, Lee JY, et al. Family history of gastric cancer and helicobacter pylori treatment[J]. N Engl J Med, 2020, 382(5):427-436. DOI:10.1056/NEJMoa1909666.
- [13] Gao F, Yan S, Sun Z, et al. Muscone suppresses gastric cancer via regulation of miRNA-145[J]. Food Sci Nutr, 2021, 9(9):4711-4721. DOI:10.1002/fsn3.2269.
- [14] Zhou Y, Chen Y, Shi Y, et al. FAM117B promotes gastric cancer growth and drug resistance by targeting the KEAP1/NRF2 signaling pathway[J]. J Clin Invest, 2023, 133(3):e158705. DOI:10.1172/JCI158705.
- [15] Ju J, Zhang H, Lin M, et al. The alanyl-tRNA synthetase AARS1 moonlights as a lactyltransferase to promote YAP signaling in gastric cancer[J]. J Clin Invest, 2024, 134(10):e174587. DOI:10.1172/JCI174587.
- [16] Valk BI, Struys MMRF. Etomidate and its analogs; A review of pharmacokinetics and pharmacodynamics[J]. Clin Pharmacokinet, 2021,

- 60(10):1253-1269. DOI:10.1007/s40262-021-01038-6.
- [17] Park YJ, Cho E, Kim SH, et al. Determination of etomidate and etomidate acid in hair using liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Forensic Sci, 2022, 67(6): 2479-2486. DOI: 10.1111/1556-4029.15113.
- [18] Basciani RM, Rindlisbacher A, Begert E, et al. Anaesthetic induction with etomidate in cardiac surgery: A randomised controlled trial[J]. Eur J Anaesthesiol, 2016, 33(6): 417-424. DOI: 10.1097/EJA.0000000000000434.
- [19] Egan ED, Johnson KB. The influence of hemorrhagic shock on the disposition and effects of intravenous anesthetics: A narrative review[J]. Anesth Analg, 2020, 130(5): 1320-1330. DOI: 10.1213/ANE.0000000000004654.
- [20] Xu J, Zhang L, Li N, et al. Etomidate elicits anti-tumor capacity by disrupting the JAK2/STAT3 signaling pathway in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Lett, 2023, 552: 215970. DOI: 10.1016/j.canlet.2022.215970.
- [21] Li D, Zhang J, Yin L, et al. Etomidate inhibits cell proliferation and induces apoptosis in A549 non-small cell lung cancer cells via down-regulating WWP2[J]. Exp Ther Med, 2021, 22(5): 1254. DOI: 10.3892/etm.2021.10689.
- [22] 陈明明, 李克寒, 刘相乐, 等. 依托咪酯通过调节 Hippo 信号通路抑制鼻咽癌细胞 CNE-1 和 HNE-1 的侵袭迁移[J]. 广东药科大学学报, 2020, 36(6): 840-846. DOI: 10.16809/j.cnki.2096-3653.2020081203.
- [23] 杨思雨, 姜淮芜, 姚晖, 等. 胃癌患者血清 miR-369、miR-1323 水平及其临床意义[J]. 疑难病杂志, 2023, 22(5): 474-478, 493. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2023.05.006.
- [24] Sun X, Su S, Zhang G, et al. MiR-204 suppresses cell proliferation and promotes apoptosis in ovarian granulosa cells via targeting TPST1 in polycystic ovary syndrome[J]. Biochem Cell Biol, 2019, 97(5): 554-562. DOI: 10.1139/bcb-2019-0019.
- [25] Shen J, Xiong J, Shao X, et al. Knockdown of the long noncoding RNA XIST suppresses glioma progression by upregulating miR-204-5p[J]. J Cancer, 2020, 11(15): 4550-4559. DOI: 10.7150/jca.45676.
- [26] Wa Q, Huang S, Pan J, et al. miR-204-5p represses bone metastasis via inactivating NF- $\kappa$ B signaling in prostate cancer[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2019, 18: 567-579. DOI: 10.1016/j.omtn.2019.09.008.
- [27] 晁亚萍, 乔世萌, 华金凤. GNAS-AS1 靶向 miR-204-5p 对宫颈癌 SiHa 细胞活性凋亡和迁移的影响[J]. 中国优生与遗传杂志, 2021, 29(9): 1208-1212. DOI: 10.13404/j.cnki.cjhbh.20211201.010.
- [28] 秦智慧, 林楠, 李绪东, 等. MiR-23a 靶向 HOXC8 在黑龙江省宫颈癌人群中发生的作用分析[J]. 现代生物医学进展, 2020, 20(18): 3466-3469. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.18.014.

(收稿日期: 2024-09-19)

作者 · 编者 · 读者

## 撰写医学论文主体部分的要求

- 前言** 概述研究的背景、目的、研究思路、理论依据、研究方法、预期结果和意义等。仅提供与研究主题紧密相关的参考文献, 切忌写成文献综述。一般以 200~300 个汉字为宜, 占全文字数的 5% 左右。
- 资(材)料与方法** 实验研究论文常写成“材料与方法”, 临床研究论文常写成“资料与方法”。
  - 研究对象**: 研究对象为人, 需注明时间、地点、分组方法、一般情况、选择标准与排除标准等, 并说明经所在单位伦理委员会批准, 研究对象知情同意。研究对象为实验动物, 需注明动物的名称、种系、雌雄、年龄、饲养条件、健康状况及合格证号等。
  - 药品、试剂及仪器、设备**: 药品及化学试剂使用通用名称, 并注明剂量、单位、纯度、批号、生产单位及给药途径。仪器、设备应注明名称、型号、规格、生产单位、精密度或误差范围, 无须描述工作原理。
  - 观察指标与方法**: 选用相应观察指标, 详述新创的方法及改良方法的改进之处, 以备他人重复。采用他人方法, 以引用参考文献的方式给出即可。
  - 统计学方法** 说明所使用的统计学软件及版本, 明确资料的表达及统计学方法的选择。用  $\bar{x} \pm s$  表达服从或近似服从正态分布的计量资料, 可采用  $t$  检验、方差分析; 用  $M(Q_1, Q_3)$  表达呈偏态分布的计量资料或生存时间资料, 可采用秩和检验, 若考虑协变量的影响, 可采用协方差分析; 用频数或构成比(%)表达计数资料或等级资料, 可采用卡方检验或秩和检验。
- 结果** 是指与设计的观察指标相对应的实(试)验所得数据、观察记录, 经过综合分析和统计学处理的结果, 而不是原始数据, 更不是原始记录。按逻辑顺序在正文的文字、表格和图中描述所获得的结果。结果的叙述应实事求是, 简洁明了, 数据准确, 层次清楚, 逻辑严谨。以数据反映结果时, 应注意不能只描述导数(如百分数), 还应同时给出据以计算导数的绝对数。一般应对所得数据进行统计学处理, 并给出具体的统计检验值, 如:  $t=2.85, P<0.01$ 。
- 讨论** 是对研究结果的科学解释与评价, 是研究所形成的科学理论, 不必重述结果部分具体数据或资料。着重讨论研究结果的创新之处及从中导出的结论, 包括理论意义、实际应用价值、局限性, 及其对进一步研究的启示。应将本研究结果与其他有关的研究相比较, 并将本研究结论与目的联系起来讨论, 同时列出相关参考文献。
- 结论** 是对研究结果和论点的提炼与概括, 如果推导不出结论, 可在讨论中写一结束语。