

蟾毒灵抑制 M2 型巨噬细胞介导的结直肠癌 迁移和上皮间质转化

唐东豪^{1,2,3}, 陈进宝³, 贾琳琳³, 沈东晓³, 尚靖^{1,2,3}, 冯月娇^{1,2,3},
卢佳豪^{1,2,3}, 肖增友^{1,2,3}, 何钰洁³, 王杰^{1,2,3}

摘要 目的 探讨蟾毒灵(BU)抑制 M2 型巨噬细胞介导结直肠癌转移的作用。方法 用佛波酯(PMA)诱导人急性白血病单核细胞(THP-1)分化为 M0 型巨噬细胞,48h 后用含有白细胞介素-4(IL-4)和 IL-13 的培养基处理 M0 型巨噬细胞,通过酶联免疫吸附试验(ELISA)、形态学、实时荧光定量(RT-qPCR)实验观察其表面标志物和形态变化,RT-PCR 和 ELISA 实验检测 M2 型巨噬细胞的表面标志物转化生长因子- β (TGF- β)、IL-10。通过 ELISA 实验比较 M2 型巨噬细胞和结直肠癌细胞 HCT116 上清液中 IL-6 分泌水平,通过 Transwell 实验、划痕实验、RT-qPCR 和 Western blot 实验检测条件培养基对结直肠癌细胞 HCT116 的影响。在条件培养基中加入 BU 后,通过 Western blot、Transwell 实验、划痕实验、和 RT-qPCR 实验观察可以 HCT116 中 AKT/PI3K 蛋白以及迁移和上皮间质转化能力的变化。结果 将 THP-1 成功诱导成为 M2 型巨噬细胞。M2 型巨噬细胞通过分泌 IL-6 激活了 HCT116 中 AKT/PI3K 蛋白磷酸化,促进了其迁移和上皮间质转化能力。BU 可以抑制 M2 巨噬细胞介导的 HCT116 迁移和上皮间质转化。结论 M2 型巨噬细胞释放 IL-6 激活了结直肠癌细胞 AKT/PI3K 信号通路,促进了其迁移和上皮间质转化。此外,BU 可以抑制其促迁移和上皮间质化作用。

关键词 蟾毒灵;M2 型巨噬细胞;结直肠癌

中图分类号 R 735.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)02-0310-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.02.021

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是世界第三

大常见的恶性肿瘤,大多数结直肠癌患者的死亡是由于肿瘤转移至肝脏。全球范围内,每年诊断出约 140 万例新增结直肠癌病例,约 25% 的患者在诊断时出现肝转移^[1]。控制结直肠癌转移对于改善预后至关重要。很多报道^[2]表明肿瘤细胞与肿瘤微环境的相互作用是结直肠癌转移的重要因素。巨噬细胞作为肿瘤微环境的主要成分,其中 M2 型巨噬细胞高表达细胞因子白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)、转化生长因子- β (transforming growth factor-beta, TGF- β)等,通常以促进肿瘤的发展为导向^[3]。IL-6 是一种重要的促炎细胞因子,高表达的 IL-6 与 CRC 的不良预后相关^[4]。有研究^[5]表明 M2 型巨噬细胞释放 IL-6 可以促进肿瘤的发生发展。越来越多研究^[6]表明蛋白激酶 B(threonine-specific protein kinase, AKT)/磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphoinositide 3-Kinase, PI3K)是肿瘤发生上皮间质转化、促进肿瘤转移的重要因素之一。但关于 M2 型肿瘤相关巨噬细胞来源的 IL-6 对于 AKT/PI3K 信号通路的激活报道还比较少^[7]。蟾毒灵(bufoalin, BU)是临床用药华蟾素的主要活性成分,有促肿瘤细胞凋亡,抗血管生成,抑制转移的作用^[8]。该文旨在研究 BU 对于 M2 型巨噬细胞介导结直肠癌转移的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞株 人急性白血病单核细胞 THP-1、结直肠癌 HCT116 细胞株,从中国科学院上海细胞生物研究所购买。

1.2 试剂及耗材 RPMI1640 培养基、双抗、胰酶(Trypsin-EDTA)、胎牛血清购自美国 Gibco 公司;佛波酯(美国 SIGMA 公司);ELISA 试剂盒(BOSTER, 武汉);蟾毒灵购自成都瑞芬思生物科技有限公司。

1.3 细胞培养 结直肠癌 HCT116 细胞、人急性白血病单核细胞 THP-1 均含有 1% 青霉素/链霉素双抗溶液、10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液,置于细胞培养箱中进行恒温培养(37 °C、5% CO₂)。取生

2024-01-16 接收

基金项目:国家自然科学基金面上项目(编号:81973625);上海市启明星项目(编号:22YF1441400);安徽医科大学研究生科研与实践创新项目资助(编号:YJS20230098);上海市中医医院第三届中医传承人才项目(编号:2023zycc02)

作者单位:¹ 安徽医科大学上海普陀中心临床学院普外科,上海 200062

² 安徽医科大学第五临床医学院,合肥 230032

³ 上海中医药大学附属普陀医院普外科,上海 200062

作者简介:唐东豪,男,硕士研究生;

王杰,男,博士,副主任医师,副教授,责任作者, E-mail: wangjie4177@126.com

长状态良好(对数生长期)的细胞进行后续实验。

1.4 条件培养基(condition medium, CM)收集

取对数生长期的 THP-1 细胞铺板于 6 孔板,每孔种植 1×10^6 个细胞,加入 IL-4 和 IL-13。待分化为 M2 型巨噬细胞后弃去培养基,无血清培养基添加 2 ml/孔,48 h 后收取上清液,离心 800 r/min,10 min,获得 CM。

1.5 荧光定量 PCR 实验 提取细胞 RNA 根据艾科瑞生物试剂盒说明书去操作,逆转录按照试剂盒的说明书。PCR 反应组分:2 × SYBR 5 μl Template 1 μl, Primer F 0.2 μl, Primer R 0.2 μl RNase free water 3.6 μl;参照仪器操作手册设置反应条件。见表 1。

表 1 PCR 引物序列

编号	基因	序列(5'-3')
1	MMP2-Forward	CTTCAAGGCTGCCTATTACCTG
2	MMP2-Reverse	CTCAGCAGCCTAGCCAGTCG
3	TGF-β-Forward	GGGACTATCCACCTGCAAGA
4	TGF-β-Reverse	CCTCCTTGGCGTAGTAGTCG
5	IL-10-Forward	TGCCTTCAGCAGAGTGAAGA
6	IL-10-Reverse	GGTCTTGGTTCTCAGCTTGG
7	β-actin-Forward	ATTGCCGACAGGATGCAGAA
8	β-actin-Reverse	GCTGATCCACATCTGCTGGAA
9	MMP9-Forward	TGCAACGTGAACATCTTCGAC
10	MMP9-Reverse	AGAATCGCCAGTACTTCCC
11	E-Cadherin-Forward	ACCATTTCAGTACAACGACCCA
12	E-Cadherin-Reverse	TCACCCACCTCTAAGGCCAT
13	N-Cadherin-Forward	AATTGGACCATCACTCGGCTT
14	N-Cadherin-Reverse	GCAAACCTTCACACGCAGGA

1.6 CCK-8 实验 HCT116 到对数生长期,胰酶消化,计数板计数后调整细胞浓度为 10^5 个/ml,100 μl 细胞悬液加入到 96 孔板的每个孔中。第二天细胞贴壁后,去除培养基,根据实验需要对细胞进行不同浓度的 BU 或条件培养基处理,培养箱中孵育 48 h。配制对 CCK-8 反应液,具体条件为 CCK-8: 无血清培养基 = 1 : 9(避光条件下)。去掉原先孔中培养基,将 100 μl 配制好的反应液加入到每孔中,于 37 °C 恒温培养箱孵育 1 ~ 2 h。通过酶标仪进行吸光值检测,一般为 450 nm 波长处,进而计算细胞存活率,采用 Graphpad8 软件作图。

1.7 单核细胞诱导分化 对人急性白血病单核细胞 THP-1 进行细胞计数,接种 1×10^6 个单核细胞于 6 孔板中,加入 IL-4 和 IL-13 刺激。IL-4 和 IL-13 浓度均为 20 μg/ml。确定 IL-4 和 IL-13 刺激时间 2 d 时用 ELISA、荧光定量 PCR 检测表面分子标志物的表达。结果显示,单核细胞表面 IL-10 和 TGF-β 的表达在 IL-4 和 IL-13 刺激 2 d 后明显增加。

1.8 ELISA 实验 根据 ELISA 试剂盒的说明,用人源 IL10、TGF-β 的试剂盒,测出巨噬细胞 TGF-β、IL10 的水平。

1.9 Western blot 实验 弃掉培养皿的上清液,加入 PBS 溶液清洗,加入裂解液,于冰上静置 15 min 后,使用细胞刮刀收取悬液放入 EP 管,使用超声振荡后进行定量,再进行金属浴。之后上样、电泳和转膜。封闭后将抗体进行稀释 Beta Actin (鼠 1 : 3 000)、PI3K (兔 1 : 1 000)、P-PI3K (兔 1 : 1 000)、AKT (兔 1 : 1 000)、P-AKT (兔 1 : 2 000)、MMP9 (兔 1 : 1 000)、MMP2 (兔 1 : 1 000)、E-Cadherin (兔 1 : 1 000)、N-Cadherin (兔 1 : 1 000)。4 °C 过夜,次日用二抗孵育 1 h,最后去显影。

1.10 划痕实验 将细胞消化后离心,按照 1×10^6 个/ml 放入 6 孔板中,待细胞贴壁占据 90% 面积。取 6 孔板内最大直径,用 200 μl 枪头沿着直尺快速划下,清洗 2 次,在倒置显微镜下进行拍照。

1.11 Transwell 实验 将细胞制成悬液,并计数 2.5×10^5 个/ml。在 24 孔板的下方加入 700 μl 含有 20% FBS 的培养基,用枪头将小室放入培养基上方。加入 300 μl 细胞悬液到小室。2 d 后,将上清液吸出,在空白孔内加入 500 μl 结晶紫,将小室放入后清洗 3 次,清洗完毕使用固定液固定 20 min,用棉签轻轻擦拭掉小室内壁的细胞,在倒置显微镜下进行拍照。

1.12 统计学处理 采用 Graphpad Prism 8 软件对相关数据进行分析,实验结果为正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。方差齐时,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。检验标准为 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 M2 型巨噬细胞的鉴定 THP-1 细胞被 PMA 诱导 48 h 成为 M0 型肿瘤相关巨噬细胞(Tumor-associated macrophages, TAM),然后被 IL-4 和 IL-13 诱导 48 h 成为 M2-TAM,可以观察到细胞由圆饼形状转变成梭形(图 1A、B),RT-qPCR 实验检测巨噬细胞中 M2 型巨噬细胞相关标志物表达,结果表明,与 M0 巨噬细胞相比,诱导的 M2 型巨噬细胞极化标志物 IL10、TGF-β 升高(图 1C, $t_{IL-10} = 19.39$, $P < 0.01$; $t_{TGF-\beta} = 17.13$, $P < 0.01$)。此外,ELISA 实验检测巨噬细胞上清液中 M2 型巨噬细胞相关标志物也发生了同样改变。(图 1D, $t_{IL-10} = 42.56$, $P < 0.01$;

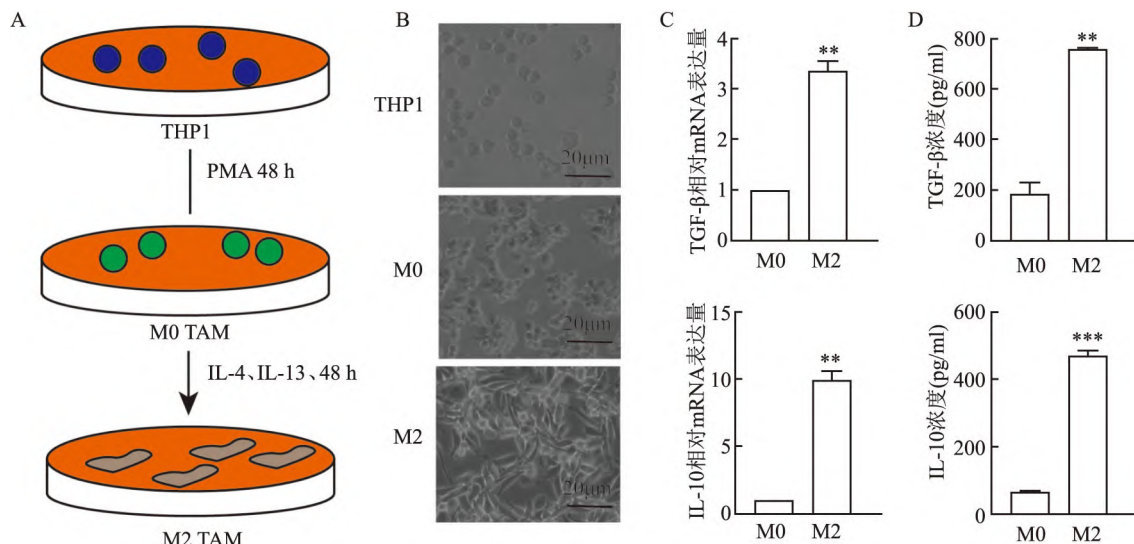


图1 M2型巨噬细胞的鉴定

A: M2型巨噬细胞诱导流程图; B: 形态学观察; 显微镜拍摄 $\times 400$; C: RT-qPCR检测 M0-TAM和 M2-TAM中的相关 M2巨噬细胞标志物; D: ELISA检测 M0-TAM和 M2-TAM中的相关 M2巨噬细胞标志物; 与 M0-TAM比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$

$t_{\text{TGF-}\beta} = 16.87, P < 0.001$)。

2.2 M2型巨噬细胞的 IL-6 分泌 在肿瘤微环境中, M2型巨噬细胞通常会分泌 IL-6, ELISA实验表明了 HCT116和 M2型巨噬细胞的 IL-6水平(图3, $t = 42.69, P < 0.05$)。

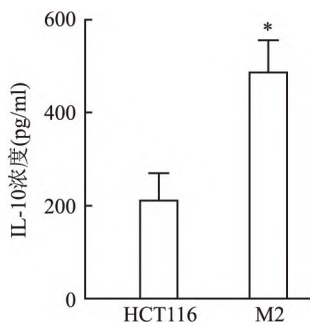


图2 两组细胞分泌 IL-6 水平
与 HCT116 比较: * $P < 0.05$

2.3 M2型巨噬细胞上清液促进 HCT116 迁移, 促进结直肠癌细胞 AKT/PI3K 磷酸化表达 将 HCT116 分为两组, 一组普通培养基培养作为对照, 另外一组加 M2型巨噬细胞上清液培养。Transwell 实验、Western blot 实验、划痕实验、RT-qPCR 实验显示 M2型巨噬细胞上清液培养的 HCT116 迁移能力增强(图3A、B, $t_{\text{划痕}} = 113.8, P < 0.01$; $t_{\text{Transwell}} = 30.13, P < 0.05$), Western blot 实验显示条件培养基作用于 HCT116 后 MMP9、MMP2、N-Cadherin 蛋白水平上升, E-Cadherin 蛋白水平下降(图3C)。

MMP9、MMP2、N-Cadherin mRNA 水平上升, E-Cadherin mRNA 水平下降(图3D, $t_{\text{MMP9}} = 9.356, P < 0.05$; $t_{\text{MMP2}} = 11.45, P < 0.01$; $t_{\text{E-Cadherin}} = 12.00, P < 0.05$; $t_{\text{N-Cadherin}} = 5.973$)。此外, Western blot 实验显示条件培养基作用于 HCT116 激活了 AKT/PI3K 磷酸化表达。这部分的实验结果证明了 M2型巨噬细胞上清液可以促进 HCT116 的迁移, 在这个过程中激活了 AKT/PI3K 的磷酸化(图3E)。

2.4 BU 对 HCT116 细胞活性的增殖影响 CCK-8 实验观察 BU 对 HCT116 细胞作用 48 h 后增殖活性的影响, BU 对 HCT116 细胞的增殖活性具有抑制作用, 且有浓度依赖性, 本实验采用 BU 的非杀伤浓度 12.5 nmol/L (IC_{50}) (图4, $F = 922.1, P < 0.001$)。

2.5 BU 可以调节 AKT/PI3K 蛋白磷酸化抑制 HCT116 迁移能力 将 HCT116 分为 2 组, 一组加 M2型巨噬细胞上清液作为对照, 另外一组 M2型巨噬细胞上清液加 BU (12.5 nmol/L) 培养。Transwell 实验、Western blot 实验、划痕实验、RT-qPCR 实验显示 BU 可以抑制 M2型巨噬细胞上清液促进 HCT116 迁移的效应(图5A、B, $t_{\text{划痕}} = 72.63, P < 0.01$; $t_{\text{Transwell}} = 26.38, P < 0.05$), Western blot 实验从蛋白水平验证 BU 可以减弱 HCT116 的上皮间质化能力, MMP9、MMP2、N-Cadherin 蛋白水平降低, E-Cadherin 蛋白水平上升(图5C)。同时 RT-qPCR 实验表明 MMP9、MMP2、N-Cadherin 基因水平下降, E-Cadherin 基因水平升高(图5D, $t_{\text{MMP9}} = 100.01, P < 0.0001$; $t_{\text{MMP2}} = 11.45, P < 0.01$; $t_{\text{E-Cadherin}} = 32.98$,

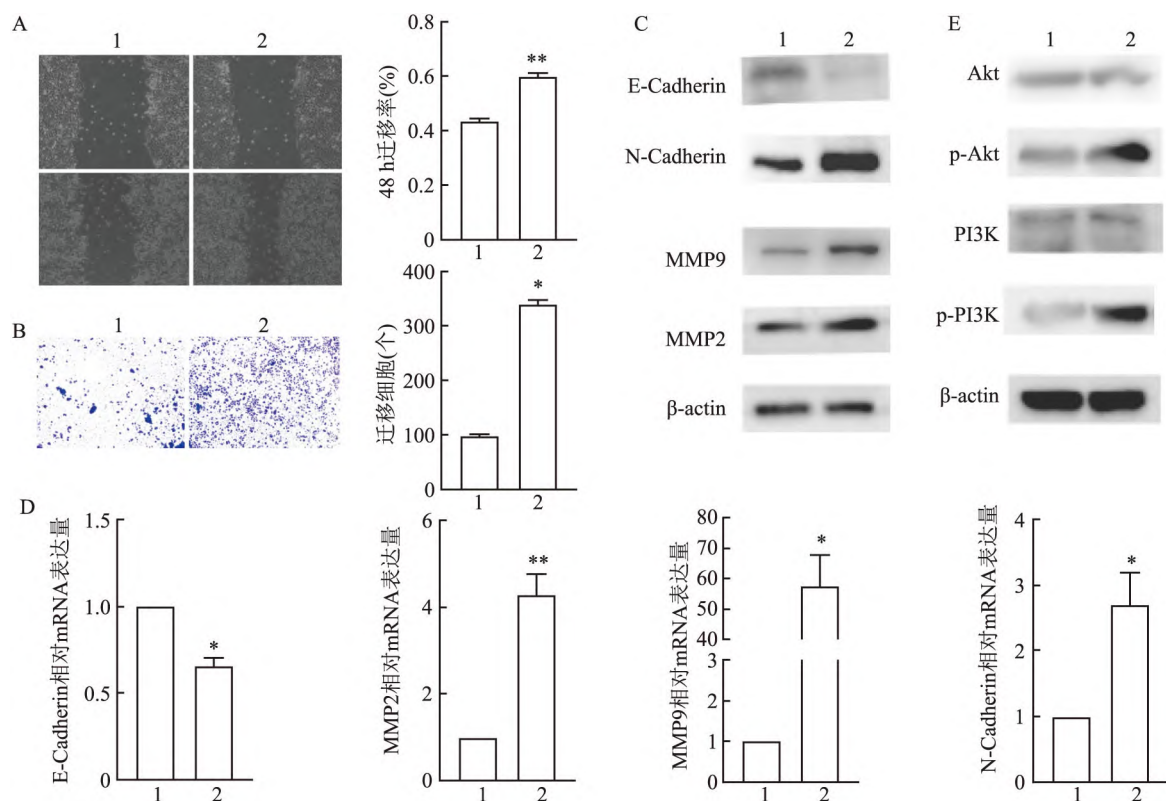


图3 M2型巨噬细胞上清液通过 AKT/PI3K 磷酸化促进 HCT116 迁移

A: 划痕实验 $\times 100$ 及其半定量结果; B: Transwell 实验结晶紫染色 $\times 100$ 及其半定量结果; C: HCT116 接受 M2 型细胞上清液刺激后 MMP9、MMP2、E-Cadherin、N-Cadherin 的蛋白免疫印迹; D: RT-qPCR 实验观察 HCT116 接受 M2 型细胞上清液刺激后 MMP9、MMP2、E-Cadherin、N-Cadherin mRNA 的表达; E: HCT116 接受 M2 型细胞上清液刺激后 AKT、P-AKT、PI3K、P-PI3K 的蛋白免疫印迹; 1: 正常培养基组; 2: M2 型巨噬细胞上清液组; 与正常培养基组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

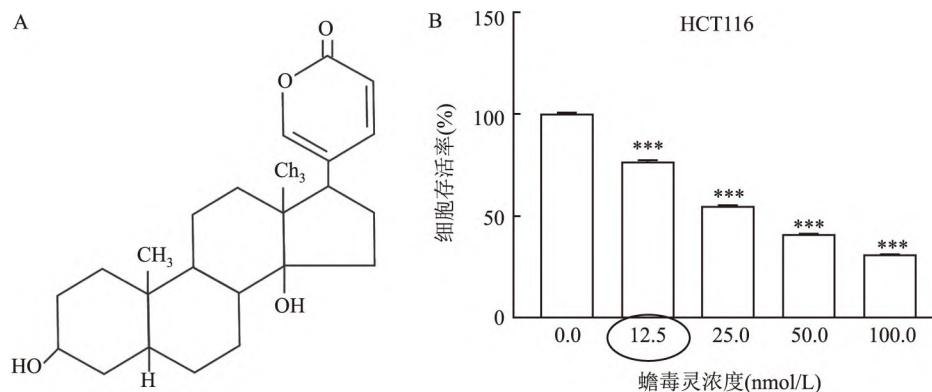


图4 BU对HCT116的增殖活性影响

A: BU 分子结构示意图; B: BU 对 HCT116 的增殖活性影响; 与 0 浓度组比较: *** $P < 0.001$

$P < 0.001$; $t_{\text{N-Cadherin}} = 5.973$, $P < 0.01$;)。设置普通培养基培养、巨噬细胞上清液、M2 型巨噬细胞上清液加 BU 组验证 BU 抑制 AKT/PI3K 的磷酸化的作用。这部分的实验结果证明 BU 可以抑制 HCT116 迁移, 抑制 AKT/PI3K 磷酸化。(图 5E)。

3 讨论

CRC 是全世界癌症相关死亡的主要原因之一,

CRC 作为一种常见的恶性肿瘤, 虽然治疗上有很大的进步, 但 CRC 远处转移仍是患者病死率居高不下的罪魁祸首。肿瘤微环境主要是指成纤维细胞、巨噬细胞等非肿瘤细胞之间相互影响的场所, 是肿瘤发生和发展的局部病理环境^[9]。大量研究显示, 肿瘤的发生和发展与 M2 型巨噬细胞等肿瘤微环境密切相关。肿瘤细胞通常可以通过重塑其肿瘤微环境, 从而避开免疫系统, 侵入底层间质, 在恶劣的循

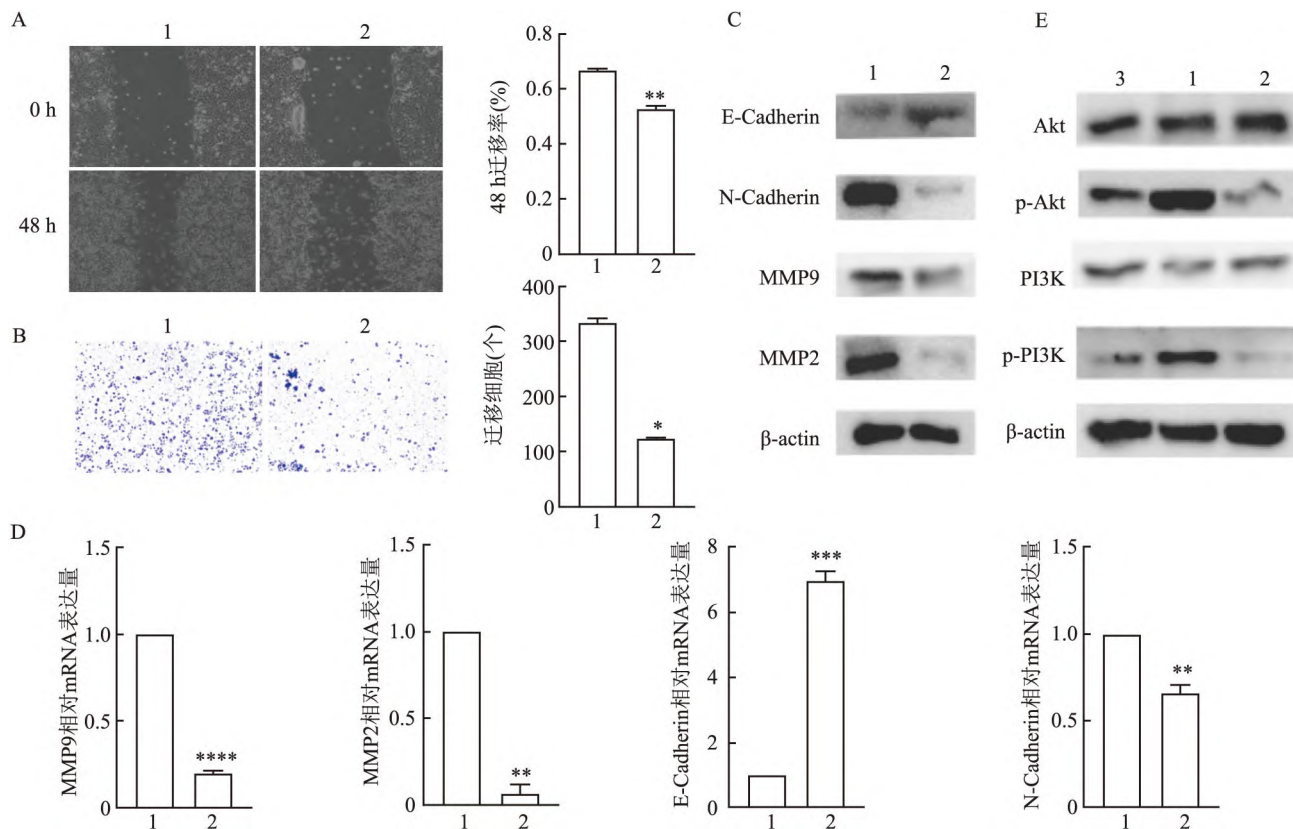


图5 BU通过AKT/PI3K磷酸化抑制HCT116迁移

A: 划痕实验 $\times 100$ 及其半定量结果; B: Transwell 实验结果结晶紫染色 $\times 100$ 及其半定量结果; C: 两组细胞 MMP9、MMP2、N-Cadherin 和 E-Cadherin 的蛋白免疫印迹; D RT-qPCR 实验观察 MMP9、MMP2、E-Cadherin、N-Cadherin mRNA 的表达; E: 3 组细胞 AKT、P-AKT、PI3K、P-PI3K 的蛋白免疫印迹; 1: M2 型巨噬细胞上清液组; 2: BU 加 M2 型巨噬细胞上清液组; 3: 普通培养基; 与 M2 型巨噬细胞上清液组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

环环境中存活, 渗入其他人体的器官, 塑造适合肿瘤生长的微环境, 最后, 长成临床可检测的转移病灶, 而 M2 型巨噬细胞就参与了这一过程^[10]。BU 是我国已临床使用的华蟾素注射液的主要功效成分, 目前临床上已经使用华蟾素来全身治疗多种肿瘤^[11]。研究^[12]显示 BU 在抑制迁移和侵袭、逆转多药耐药、诱导细胞凋亡、抑制血管生成等抗肿瘤作用中发挥着至关重要的作用。

本研究中, 将 THP-1 用试剂诱导成 M2 型巨噬细胞, Transwell、划痕实验和 RT-qPCR 实验显示结直肠癌细胞迁移和上皮间质转化能力增加。IL-6 通过其受体 IL-6R 对许多细胞发挥作用, 在维持慢性炎症中起主要作用^[13], 此外, 有研究^[14]表明 IL-6 作为一种促癌因子, 促进肿瘤发展, 并有助于 CRC 中慢性炎症和致瘤性微环境的形成。另外有研究^[15]报道 IL-6 参与了 AKT/PI3K 信号通路的磷酸化过程。ELISA 实验显示 M2 型巨噬细胞分泌 IL-6 水平显著高于 HCT116。Western blot 实验中, M2 巨噬细胞上清液可以激活 HCT116 中 AKT/PI3K 蛋白磷

酸化, 促进 HCT116 迁移和上皮间质转化。将 BU 加入 M2 巨噬细胞上清液培养 HCT116, 结果 BU 逆转了 M2 型巨噬细胞诱导的结直肠癌细胞迁移和上皮间质转化, 并且减少了 AKT/PI3K 蛋白磷酸化。

综上所述, M2 型巨噬细胞可以通过分泌 IL-6 使结直肠癌细胞 HCT116 迁移和上皮间质转化, 并促进 AKT/PI3K 通路磷酸化, 而 BU 能够抑制 M2 型巨噬细胞诱导的 HCT116 AKT/PI3K 通路磷酸化。

参考文献

- [1] Aquina C T, Brown Z J, Beane J D, et al. Disparities in care access to liver-directed therapy among medicare beneficiaries with colorectal cancer liver metastasis[J]. Ann Surg Oncol, 2023, 30(1): 335-44
- [2] He Y, Han Y, Fan A-H, et al. Multi-perspective comparison of the immune microenvironment of primary colorectal cancer and liver metastases[J]. J Transl Med, 2022, 20(1): 454.
- [3] Chen Y, Zhang S, Wang Q, et al. Tumor-recruited M2 macrophages promote gastric and breast cancer metastasis via M2 macrophage-secreted CHI3L1 protein[J]. J Hematol Oncol, 2017, 10

- (1): 36.
- [4] Thomas H. IL-6 drives niche formation in pancreatic cancer liver metastasis[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16(5): 263.
- [5] 李玮柏, 曹 娟, 郭 秀, 等. 肿瘤相关巨噬细胞来源 IL-6 通过上调肿瘤细胞中 LIF 表达对口腔鳞状细胞癌 Cal27 细胞侵袭和迁移的促进作用[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2022, 48(4): 946–53.
- [6] Zhou Y, Li S, Li J, et al. Effect of microRNA-135a on cell proliferation, migration, invasion, apoptosis and tumor angiogenesis through the IGF-1/PI3K/Akt signaling pathway in non-small cell lung cancer[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(4): 1431–46.
- [7] Rascio F, Spadaccino F, Rocchetti M T, et al. The pathogenic role of PI3K/AKT pathway in cancer onset and drug resistance: an updated review[J]. *Cancers*, 2021, 13(16): 3949.
- [8] Chen J, Wang H, Jia L, et al. Bufalin targets the SRC-3/MIF pathway in chemoresistant cells to regulate M2 macrophage polarization in colorectal cancer[J]. *Cancer Lett*, 2021, 513: 63–74.
- [9] Brodt P. Role of the microenvironment in liver metastasis: from pre- to prometastatic niches[J]. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*, 2016, 22(24): 5971–82.
- [10] Keirsse J, Vandamme H, Geeraerts X, et al. The role of hepatic macrophages in liver metastasis[J]. *Cell Immunol*, 2018, 330: 202–15.
- [11] Dai G, Yu L, Yang J, et al. The synergistic antitumor effect of cinobufagin and cisplatin in human osteosarcoma cell line in vitro and in vivo[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(49): 85150–68.
- [12] Jiang H Y, Zheng H M, Xia C, et al. The research progress of bufalin in the treatment of hepatocellular carcinoma [J]. *Onco Targets Ther*, 2022, 15: 291–8.
- [13] Park J B, Peters R, Pham Q, et al. Javamide-II inhibits IL-6 without significant impact on TNF-Alpha and IL-1beta in macrophage-like cells[J]. *Biomedicines*, 2020, 8(6): 138.
- [14] Knüpfner H, Preiss R. Serum interleukin-6 levels in colorectal cancer patients—a summary of published results [J]. *Int J Colorectal Dis*, 2010, 25(2): 135–40.
- [15] Shah A, Silverstein P S, Singh D P, et al. Involvement of metabotropic glutamate receptor 5, AKT/PI3K signaling and NF-KB pathway in methamphetamine-mediated increase in IL-6 and IL-8 expression in astrocytes[J]. *J Neuroinflammation*, 2012, 9: 52.

Inhibition of M2-type macrophage-mediated migration and epithelial mesenchymal transition in colorectal cancer by bufalin

Tang Donghao^{1,2,3}, Chen Jinbao³, Jia Linlin³, Shen Dongxiao³, Shang Jing^{1,2,3},
Feng Yuejiao^{1,2,3}, Lu Jiahao^{1,2,3}, Xiao Zengyou^{1,2,3}, He Yujie³, Wang Jie^{1,2,3}

(¹Dept of General Surgery, Shanghai Putuo Central School of Clinical Medicine, Anhui Medical University, Shanghai 200062; ²The Fifth School of Clinical Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230032;

³Dept of General Surgery, Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062)

Abstract Objective To investigate the role of bufalin (BU) in inhibiting M2-type macrophage-mediated colorectal cancer metastasis. **Methods** Human acute leukemia mononuclear cells (THP-1) were differentiated into M0 macrophages using phorbol ester induction (PMA) for 48 hours. The M0 macrophages were then treated with IL-4 and IL-13 medium. Surface markers and morphological changes were observed through ELISA, morphology, and RT-qPCR experiments. RT-PCR and ELISA experiments were conducted to detect the surface markers TGF- β and IL-10 of M2 macrophages. The secretion level of IL-6 in the supernatant of M2 macrophages and colorectal cancer cells HCT116 was compared using ELISA. Additionally, the effect of conditioned medium on colorectal cancer cell HCT116 was assessed through Transwell, Wound healing, RT-qPCR, and Western blot experiments. Subsequently, bufalin was added to the conditioned medium and the changes in AKT/PI3K protein, migration, and epithelial-mesenchymal transition ability in HCT116 were observed using Western blot, Transwell, Wound healing and RT-qPCR experiments. **Results** THP-1 were successfully differentiated into M2 macrophages. The activation of AKT/PI3K protein in HCT116 cells was induced by the secretion of IL-6 from M2 macrophages, which in turn promoted the migration and epithelial-mesenchymal transition ability of the HCT116 cells. The migration and epithelial-mesenchymal transition mediated by M2 macrophages in HCT116 cells were effectively inhibited by Bufalin. **Conclusion** The release of IL-6 from M2 macrophages activates the AKT/PI3K signaling pathway in colorectal cancer cells, thereby promoting their migration and epithelial-mesenchymal transition capacity. Moreover, bufalin exhibits inhibitory effects on this effect.

Key words bufalin; M2 macrophage; colorectal cancer