

# 华蟾素通过调控 M2 型巨噬细胞极化抑制结直肠癌转移

尚靖<sup>1</sup>,王云<sup>2</sup>,陈进宝<sup>1</sup>,唐东豪<sup>3</sup>,贾琳琳<sup>3</sup>,李炜<sup>3</sup>,于宏杰<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨华蟾素通过调控 M2 型巨噬细胞极化抑制结直肠癌转移的作用。方法 将 THP-1 诱导成 M0 型巨噬细胞,收集 HCT116 细胞的条件培养基,刺激 M0 型巨噬细胞,通过流式细胞术、RT-qPCR、ELISA 实验观察 M2 型巨噬细胞极化状态;收集 M0 型巨噬细胞和 HCT116-M $\phi$  细胞的条件培养基,刺激 HCT116 细胞,通过划痕实验和 Transwell 实验观察迁移和侵袭能力;用 CCK-8 实验检测华蟾素对 HCT116 细胞活力的影响;收集 HCT116 和 HCT116 + 华蟾素的条件培养基,刺激 M0 型巨噬细胞,通过流式细胞术、RT-qPCR、ELISA 实验观察 M2 型巨噬细胞极化状态;收集 HCT116-M $\phi$  细胞和 (HCT116 + 华蟾素)-M $\phi$  细胞的条件培养基,刺激 HCT116 细胞,通过划痕实验和 Transwell 实验观察迁移和侵袭能力的改变。结果 M0 型巨噬细胞在 HCT116 细胞的条件培养基刺激后,形态变成梭形的细胞,CD11b<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup> 细胞比例增高,M2 型巨噬细胞标志物白细胞介素-10(IL-10)及转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )表达升高;HCT116 细胞在 HCT116-M $\phi$  细胞的条件培养基刺激后,细胞迁移和侵袭能力明显增强;加入华蟾素之后,不仅 M2 型巨噬细胞极化比例降低,M2 型巨噬细胞介导的促转移效应也受到抑制。结论 HCT116 细胞可以诱导 M2 型巨噬细胞极化,而华蟾素可通过抑制 M2 型巨噬细胞极化,进而抑制 M2 型巨噬细胞介导的肿瘤转移。

**关键词** 华蟾素;结直肠癌;肿瘤相关巨噬细胞;转移

**中图分类号** R 735.3

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2024)02-0224-06  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.02.007

结直肠癌(colorectal cancer,CRC)是常见的消化道肿瘤,发病率在世界范围内呈上升趋势<sup>[1]</sup>。肿瘤转移是 CRC 患者死亡的主要原因<sup>[2-3]</sup>。肿瘤相

关巨噬细胞(tumor-associated macrophages,TAMs)是肿瘤微环境(tumor microenvironment,TME)的主要组成部分,通常表现为促肿瘤的 M2 样表型,与肿瘤转移密切相关<sup>[4-5]</sup>。华蟾素是干蟾皮提取物,目前广泛应用于抗恶性肿瘤治疗,对多种癌症均有明显的治疗作用。研究<sup>[6]</sup>显示华蟾素可以通过调节 M2 型 TAMs 的极化发挥抗肿瘤作用。因此,该研究旨在探索华蟾素能否通过调控 M2 型巨噬细胞极化进而发挥抑制结直肠癌转移的作用。

## 1 材料与方法

**1.1 主要试剂** RPMI-1640 培养基、双抗(青霉素/链霉素)溶液和胰蛋白酶均购自美国 Gibco 公司;胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)和佛波酯(phorbol myristate acetate,PMA)购自美国 Sigma 公司;CD11b-PE 抗体和 CD206-FITC 抗体购自美国 BD Pharmingen 公司;RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒和实时定量聚合酶链反应(real-time quantitative polymerase chain reaction,RT-qPCR)试剂盒购自扬州艾瑞克生物科技有限公司;白细胞介素-10(interleukin-10,IL-10)和转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ ,TGF- $\beta$ )酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司;华蟾素注射液(国药准字 Z34020273)购自淮北华润金蟾药业股份有限公司;CCK-8 试剂盒购自东仁化学科技(上海)有限公司;BD Matrigel 基质胶购自美国 BD 公司。

**1.2 细胞培养** RPMI-1640 完全培养基(含 10% FBS 和 1% 双抗)培养人结直肠癌细胞 HCT116 和人单核细胞白血病细胞 THP-1,在含有 5% CO<sub>2</sub> 的 37℃ 恒温恒湿培养箱中培养。

**1.3 条件培养基(conditioned medium,CM)** 将 HCT116 细胞培养基更换为无血清 RPMI-1640 培养基,48 h 后获得 CM<sub>HCT116</sub>;用华蟾素处理 HCT116 细胞 24 h 后,更换为无血清 RPMI-1640 培养基,48 h 后获得 CM<sub>HCT116 + 华蟾素</sub>;THP-1 细胞用 RPMI-1640 完全培养基(含 400 ng PMA)培养 48 h 获得贴壁的 M0 细胞;用 CM<sub>HCT116</sub> 和 CM<sub>HCT116 + 华蟾素</sub> 分别处理 M0

2023-10-19 接收

基金项目:上海市启明星项目(扬帆专项)(编号:22YF1441400);上海市普陀区临床特色专病建设项目(编号:2020tszb03);上海中医药大学附属普陀医院百人计划(领航计划)(编号:2022-RCLH-03);成都中医药大学“杏林学者”学科人才科研提升计划(编号:YYZX2020121)

作者单位:上海中医药大学附属普陀医院<sup>1</sup> 肿瘤科、<sup>2</sup> 血液科、<sup>3</sup> 普外科,上海 200062

作者简介:尚靖,男,硕士,住院医师;

于宏杰,男,硕士,主治医师,责任作者,E-mail: setymulder@126.com

细胞 48 h 后,获得 HCT116-M $\phi$  细胞和(HCT116 + 华蟾素)-M $\phi$  细胞;将培养基更换为无血清 RPMI-1640 培养基,48 h 后分别获得 CM<sub>HCT116-M $\phi$</sub>  和 CM<sub>(HCT116+华蟾素)-M $\phi$</sub> ;CM 用 0.22  $\mu$ m 滤器过滤,存放在 -20  $^{\circ}$ C 冰箱备用。

**1.4 流式细胞术** M0 细胞用不同 CM(含 10% FBS)培养 48 h 并收集,取  $1 \times 10^6$  个细胞,加入 CD11b-PE 抗体和 CD206-FITC 抗体各 10  $\mu$ l,室温避光孵育 25 min 后,用流式仪器检测。

**1.5 RT-qPCR** M0 细胞用不同 CM(含 10% FBS)培养 48 h,提取细胞总 RNA,逆转录获得 cDNA,通过 RT-qPCR 反应,以  $\beta$ -actin 作为内参,用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 IL-10 和 TGF- $\beta$  的相对表达水平,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	序列(5'-3')
IL-10	Forward: TGCCTTCAGCAGAGTGAAGA
	Reverse: GGTCTTGGTCTCAGCTTGG
TGF- $\beta$	Forward: GGGACTATCCACCTGCAAGA
	Reverse: CCTCCTTGGCGTAGTAGTCG
$\beta$ -actin	Forward: ATTGCCGACAGGATGCAGAA
	Reverse: GCTGATCCACATCTGCTGGAA

**1.6 ELISA** M0 细胞用不同 CM(含 10% FBS)培养 48 h,收集 CM,用 ELISA 试剂盒检测 IL-10 和 TGF- $\beta$  水平。酶标板孔加 100  $\mu$ l 样品,37  $^{\circ}$ C、90 min;加抗体,37  $^{\circ}$ C、60 min;加亲和素-过氧化物酶复合物,37  $^{\circ}$ C、30 min;加显色液,37  $^{\circ}$ C、25 min;加终止液,在 450 nm 处测吸光度。

**1.7 划痕实验** HCT116 细胞接种于 12 孔板( $5 \times 10^5$  个),待细胞汇合,用枪头划出直线,PBS 清洗,加入 CM,分别于 0 h 和 24 h 拍照,用 ImageJ 软件分析实验结果。

**1.8 迁移实验** HCT116 细胞接种于 6 孔板( $4 \times 10^5$  个),培养过夜,用 CM(含 10% FBS)培养 48 h,收集细胞并用无血清 RPMI-1640 培养基重悬,上室加入  $2 \times 10^4$  个细胞,下室加入 700  $\mu$ l 含 20% FBS 的 RPMI-1640 培养基,48 h 后进行固定、结晶紫染色、清洗和拍照,用 ImageJ 软件分析实验结果。

**1.9 侵袭实验** 预先用基质胶包被 Transwell 上室的底膜,并按照 1.8 的方法完成侵袭实验。

**1.10 CCK-8 实验** HCT116 细胞接种于 96 孔板( $1.5 \times 10^4$  个),培养过夜,用含不同浓度华蟾素的新鲜培养基刺激 24 h 后,每孔加入 CCK-8 溶液 10  $\mu$ l,孵育 30 min 后在 450 nm 处检测吸光度值。

**1.11 统计学处理** 每个实验均重复 3 次,结果用  $\bar{x} \pm s$  表示,用 GraphPad Prism 作图,采用非配对  $t$  检验进行统计分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 HCT116 细胞使 M0 细胞形态发生变化** 用 THP-1 细胞经过 PMA 刺激后获得贴壁的 M0 细胞,M0 细胞经过 CM<sub>HCT116</sub> 刺激 48 h 获得 HCT116-M $\phi$  细胞,形态变为梭形贴壁细胞(图 1)。

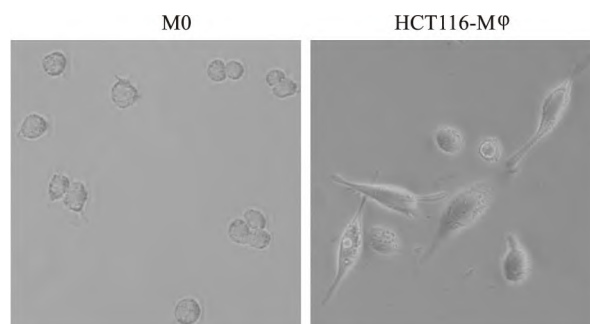


图 1 HCT116 细胞使 M0 细胞形态发生变化  $\times 200$

**2.2 HCT116 细胞促进 M2 型巨噬细胞极化** 为了观察 HCT116 细胞对 M2 型巨噬细胞极化的影响,用 CM<sub>HCT116</sub> 刺激 M0 细胞 48 h 获得 HCT116-M $\phi$  细胞,收集细胞进行流式实验和 RT-qPCR 实验,收集上清液进行 ELISA 实验。流式实验结果如图 2A 所示,与 M0 相比,HCT116-M $\phi$  细胞中 CD11b<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup> 细胞(M2 型巨噬细胞)比例明显上升( $t = 14.85, P < 0.001$ )。RT-qPCR 实验结果如图 2B 所示,与 M0 相比,HCT116-M $\phi$  细胞中 M2 型巨噬细胞的生物标志物 IL-10 和 TGF- $\beta$  的 mRNA 水平明显升高( $t_{IL-10} = 10.27, t_{TGF-\beta} = 8.694, P < 0.001$ )。ELISA 实验(图 2C)也进一步验证了该结果( $t_{IL-10} = 7.072, t_{TGF-\beta} = 7.085, P < 0.01$ )。以上结果表明 HCT116 细胞可以促进 M2 型巨噬细胞极化。

**2.3 M2 型巨噬细胞促进 HCT116 细胞转移** 为了观察 M2 型巨噬细胞对 HCT116 细胞转移能力的影响,分别收集 CM<sub>M0</sub> 和 CM<sub>HCT116-M $\phi$</sub> ,刺激 HCT116 细胞后进行划痕实验和 Transwell 实验。划痕实验结果如图 3A 所示,与 CM<sub>M0</sub> 组相比,CM<sub>HCT116-M $\phi$</sub>  处理的 HCT116 细胞的平均划痕愈合率明显升高( $t = 5.367, P < 0.01$ )。Transwell 迁移实验(图 3B)也验证了 M2 型巨噬细胞促进 HCT116 细胞迁移能力( $t = 9.871, P < 0.001$ )。Transwell 侵袭实验结果如图 3C 所示,与 CM<sub>M0</sub> 组相比,CM<sub>HCT116-M $\phi$</sub>  处理的 HCT116

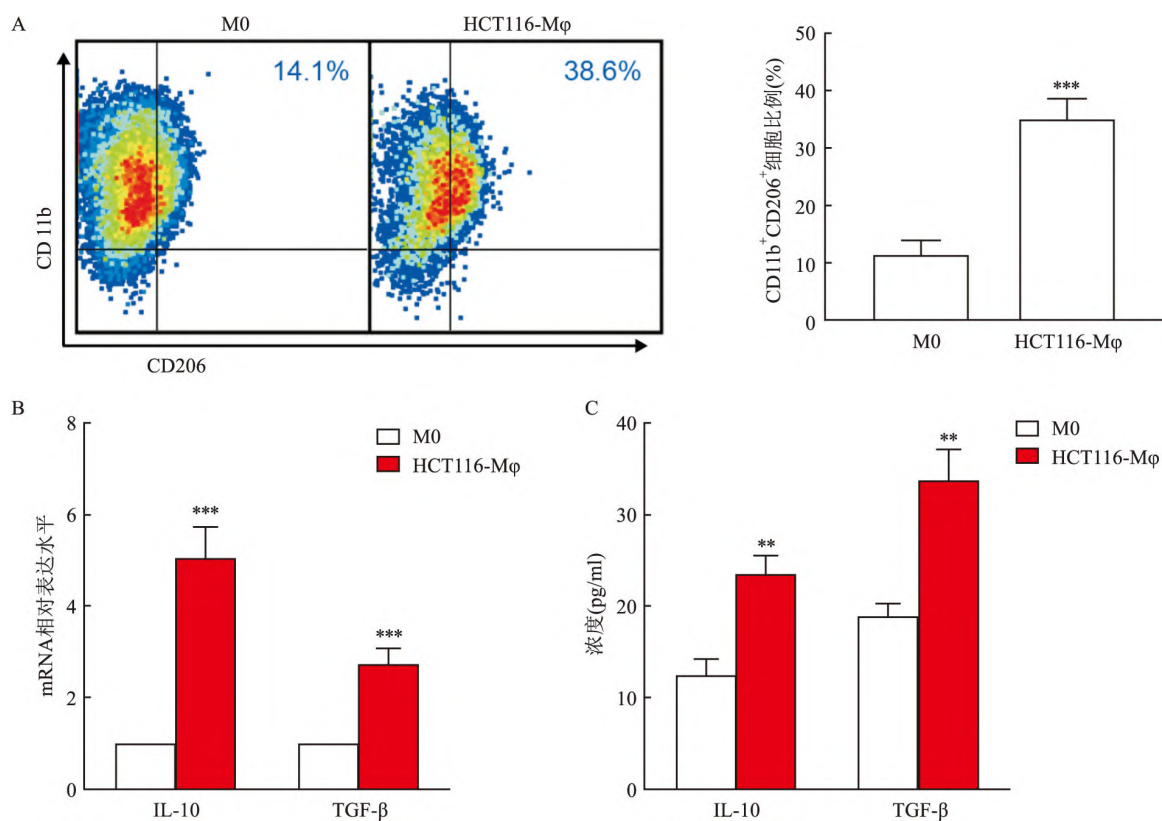


图2 HCT116 细胞促进 M2 型巨噬细胞极化

A: 流式实验检测 M2 型巨噬细胞比例; B: 实时定量 PCR 检测 IL-10 和 TGF-β 的 mRNA 表达水平; C: ELISA 实验检测 IL-10 和 TGF-β 水平; 与 M0 组比较: \*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$

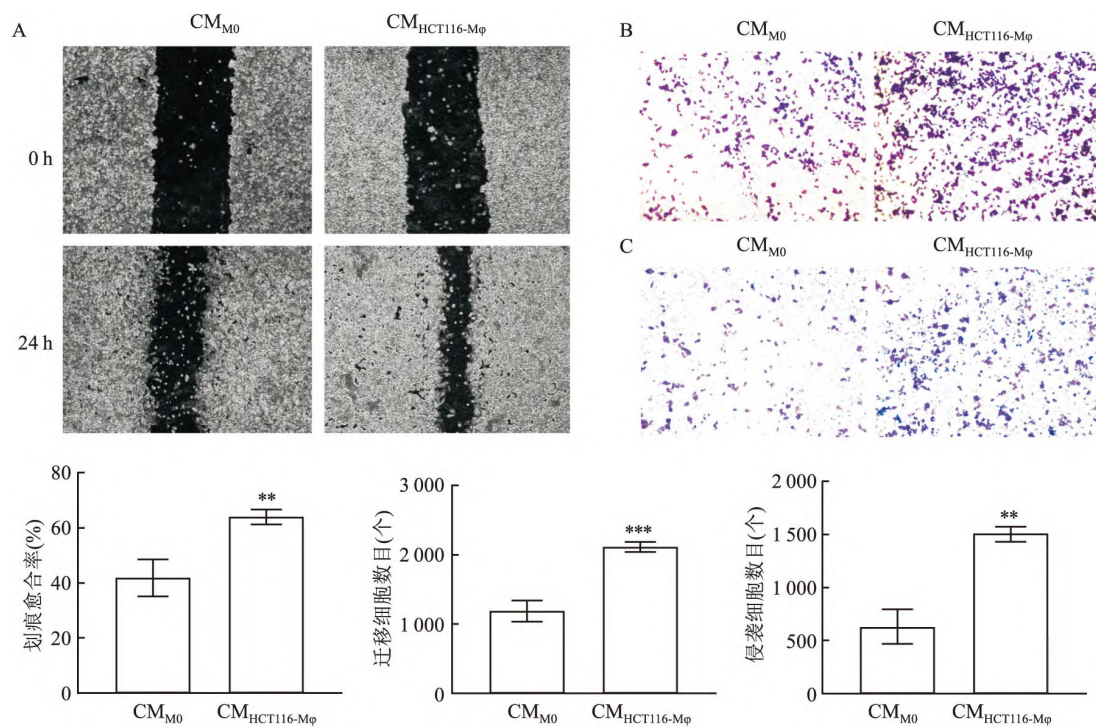


图3 M2 型巨噬细胞促进 HCT116 细胞转移 ×100

A: 划痕实验结果图; B: 迁移实验结果图; C: 侵袭实验结果图; 与 CM<sub>M0</sub> 组比较: \*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$



细胞发生侵袭的细胞数目明显增多( $t = 8.557, P < 0.01$ )。这些结果表明 M2 型巨噬细胞可以促进 HCT116 细胞转移。

**2.4 华蟾素可以抑制 M2 型巨噬细胞极化** 为了研究华蟾素对 M2 型巨噬细胞极化的影响,选用非杀伤浓度 5 mg/ml(图 4A)作为干预浓度。流式实验结果如图 4B,与 HCT116-M $\phi$  细胞相比,(HCT116 + 华蟾素)-M $\phi$  细胞中 CD11b<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup> 细胞(M2 型巨噬细胞)比例明显下降( $t = 4.151, P < 0.05$ )。RT-qPCR 实验结果如图 4C,与 HCT116-M $\phi$  细胞相比,(HCT116 + 华蟾素)-M $\phi$  细胞中 M2 型巨噬细胞的生物标志物 IL-10 和 TGF- $\beta$  的 mRNA 水平明显下降( $t_{IL-10} = 11.88, t_{TGF-\beta} = 14.15, P < 0.001$ )。ELISA 实验(图 4D)也具有同样的趋势( $t_{IL-10} = 7.09, t_{TGF-\beta} = 5.567, P < 0.01$ )。以上结果表明华蟾素可以抑制 HCT116 细胞介导的 M2 型巨噬细胞极化。

**2.5 华蟾素可以抑制 M2 型巨噬细胞介导的 HCT116 细胞转移** 分别收集 CM<sub>HCT116-M $\phi$</sub>  和 CM<sub>(HCT116 + 华蟾素)-M $\phi$</sub> ,刺激 HCT116 细胞后进行划痕实验和 Transwell 实验。划痕实验结果如图 5A 所示,与 CM<sub>HCT116-M $\phi$</sub>  组相比,CM<sub>(HCT116 + 华蟾素)-M $\phi$</sub>  处理的

HCT116 细胞的平均划痕愈合率明显下降( $t = 3.8, P < 0.05$ )。Transwell 迁移实验(图 5B)亦有同样趋势( $t = 3.505, P < 0.05$ )。Transwell 侵袭实验结果如图 5C 所示,与 CM<sub>HCT116-M $\phi$</sub>  组相比,CM<sub>(HCT116 + 华蟾素)-M $\phi$</sub>  处理的 HCT116 细胞发生侵袭的细胞数目明显减少( $t = 3.540, P < 0.05$ )。这些结果表明华蟾素可以抑制 M2 型巨噬细胞介导的 HCT116 细胞转移。

### 3 讨论

越来越多的证据<sup>[7]</sup>表明,TAMs 作为 TME 中丰富且活跃的浸润性炎症细胞,不仅在 CRC 的生长和转移中起着至关重要的作用,而且与患者的预后不良密切相关。TAMs 可以极化为 M1 型巨噬细胞和 M2 型巨噬细胞,M1 型巨噬细胞可以通过产生促炎细胞因子和激活肿瘤免疫反应发挥抗肿瘤作用,M2 型巨噬细胞通过促进血管生成、产生免疫抑制效应、诱导乏氧 TME、促进肿瘤细胞增殖和转移发挥促肿瘤作用,而 TAMs 通常被肿瘤细胞诱导极化为 M2 型巨噬细胞。例如,Cai et al<sup>[8]</sup>研究发现,TAMs 分泌的 TGF- $\beta$  一旦在与 CRC 细胞上的受体结合,就会

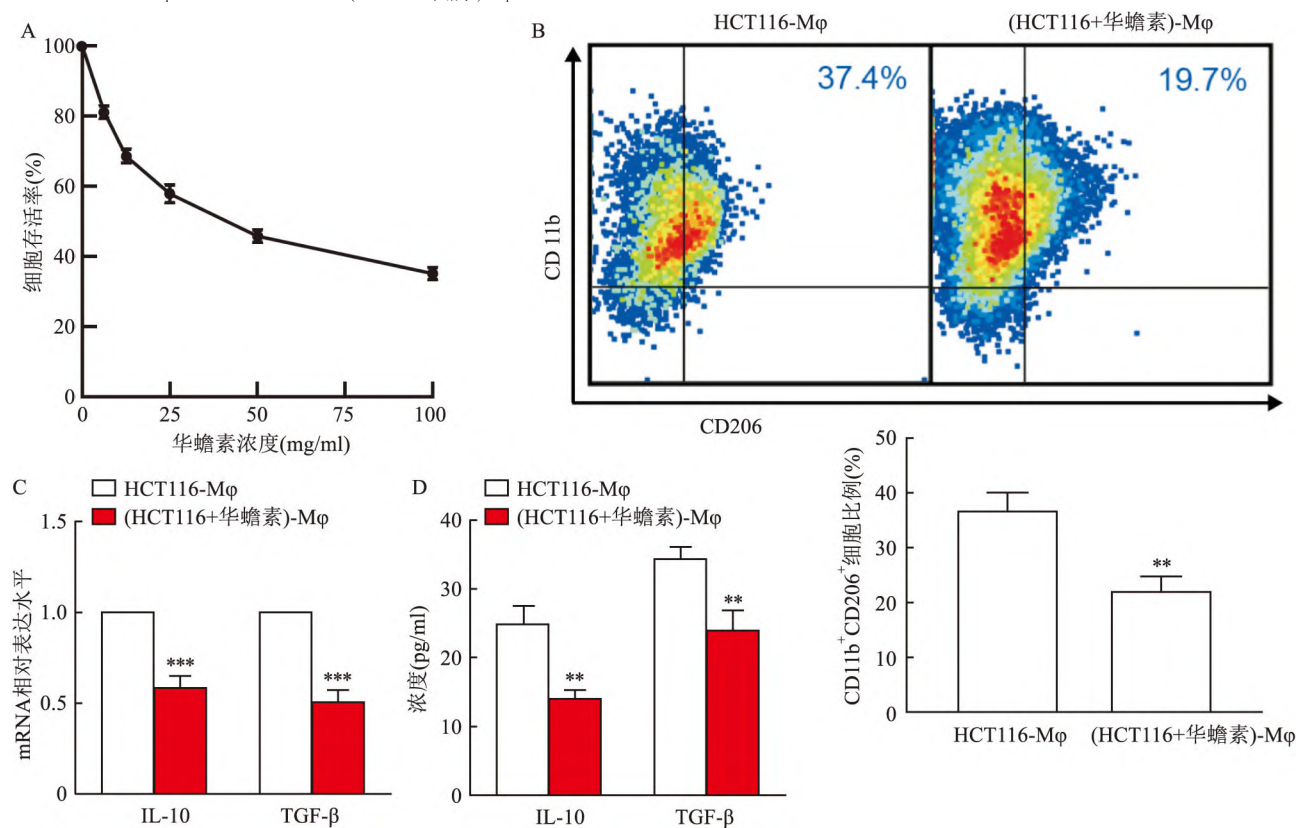


图4 华蟾素可以抑制 M2 型巨噬细胞极化

A:用华蟾素处理 HCT116 细胞 24 h 后的细胞存活率;B:流式实验检测 M2 型巨噬细胞比例;C:RT-qPCR 检测 IL-10 和 TGF- $\beta$  的 mRNA 表达水平;D:ELISA 实验检测 IL-10 和 TGF- $\beta$  水平;与 HCT116-M $\phi$  组比较: \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$

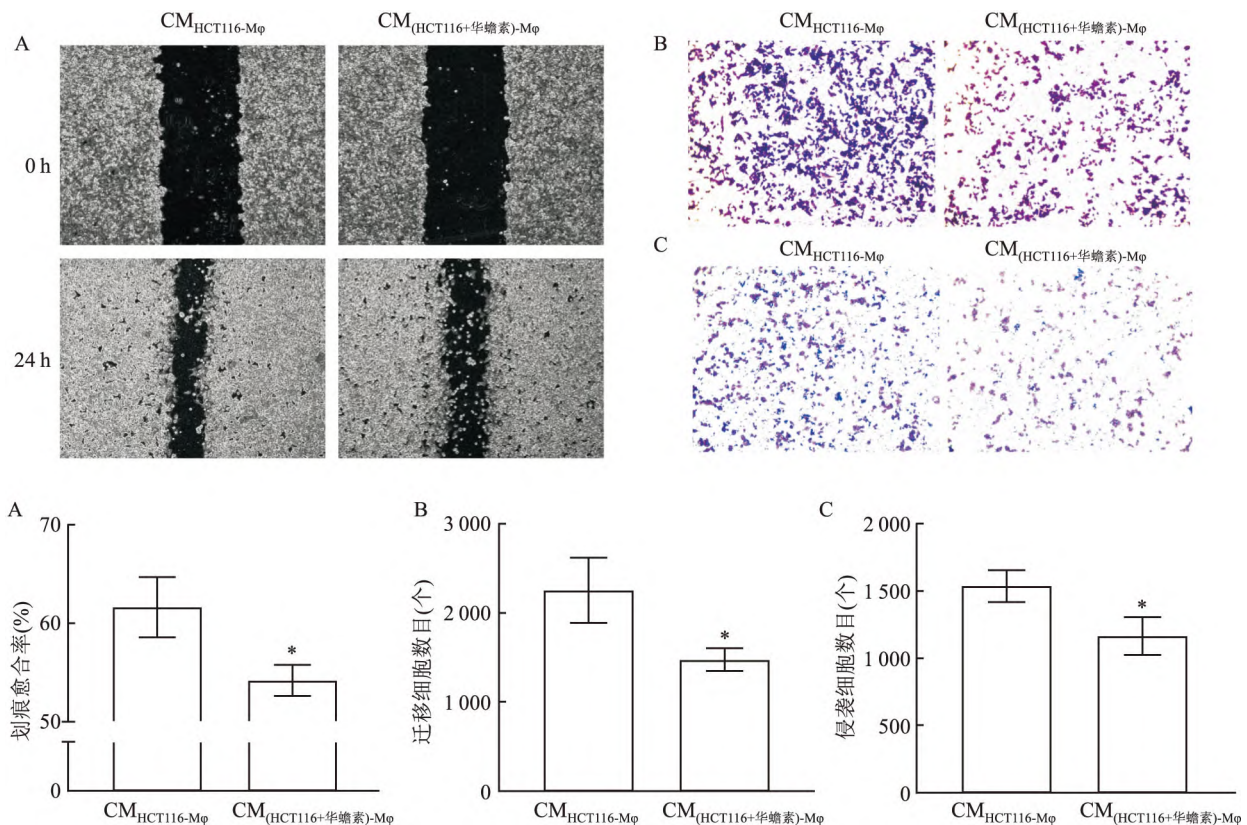


图5 华蟾素可以抑制 M2 型巨噬细胞介导的 HCT116 细胞转移 ×100

A: 划痕实验结果; B: 迁移实验结果; C: 侵袭实验结果; 与 CM<sub>HCT116-Mφ</sub> 组比较: \*  $P < 0.05$

激活 Smads/Snail 信号通路,促进 CRC 的上皮间充质转化进程,从而促进转移。不仅如此,TAMs 还通过促进肿瘤细胞内渗进入血管、促进血液循环中的肿瘤细胞存活、促进肿瘤外渗迁移到血管外组织和参与转移前生态位的形成等方式,促进肿瘤转移和侵袭<sup>[9-10]</sup>。本研究用 CM<sub>HCT116</sub> 刺激 M0 巨噬细胞后,得到梭形的 HCT116-Mφ 细胞,流式细胞术检测显示 HCT116-Mφ 细胞中的 CD11b<sup>+</sup> CD206<sup>+</sup> 细胞比例明显增多,PCR 和 ELISA 实验显示 HCT116-Mφ 细胞中 IL-10 和 TGF-β 的水平明显升高,表明 HCT116 细胞能促进 M2 型巨噬细胞极化。用 CM<sub>M0</sub> 和 CM<sub>HCT116-Mφ</sub> 刺激 HCT116 细胞后进行的划痕实验和 Transwell 实验表明,M2 型巨噬细胞能显著提高 HCT116 细胞的转移能力。

中医药作为治疗 CRC 的有效手段之一,在改善手术、化疗、放疗、靶向治疗和免疫治疗引起的毒副作用的同时,可以通过抑制增殖、诱导凋亡、促进自噬、抑制血管生成等途径发挥抗肿瘤作用,并延长患者的生存时间<sup>[11]</sup>。此外,中医药还能通过调节 TME 发挥抗肿瘤作用,例如调节 TAMs 的极化。华蟾素作为传统中药,已广泛用于癌症治疗和基础研究,包

括 CRC<sup>[12-14]</sup>。Wang et al<sup>[15]</sup> 研究表明华蟾素在体外可以有效抑制结肠癌细胞增殖、迁移和侵袭,在体内可以有效抑制肿瘤转移,其机制可能与抑制上皮间质转化和抑制 Wnt/β-catenin 信号通路激活有关。本研究进一步探索了华蟾素是否通过调节 M2 型巨噬细胞极化来抑制转移,通过流式细胞术、PCR 和 ELISA 实验表明华蟾素能明显抑制 M2 型巨噬细胞极化。并通过划痕和 Transwell 实验表明,华蟾素可以抑制 M2 型巨噬细胞介导的 HCT116 细胞转移。

### 参考文献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68 (6): 394-424.
- [2] Dou R, Liu K, Yang C, et al. EMT-cancer cells-derived exosomal miR-27b-3p promotes circulating tumour cells-mediated metastasis by modulating vascular permeability in colorectal cancer [J]. Clin Transl Med, 2021, 11(12): e595.
- [3] Siegel R L, Miller K D, Goding Sauer A, et al. Colorectal cancer statistics, 2020 [J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(3): 145-64.
- [4] Wei C, Yang C, Wang S, et al. Crosstalk between cancer cells

- and tumor associated macrophages is required for mesenchymal circulating tumor cell-mediated colorectal cancer metastasis [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 64.
- [5] 赵慧咏, 魏昇, 杨茗皓, 等. 肿瘤相关巨噬细胞及其分泌的CXCL1对肝癌细胞系Huh7生物学行为的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2023, 58(3): 398–404.
- [6] 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.
- [7] Wang H, Tian T, Zhang J. Tumor-associated macrophages (TAMs) in colorectal cancer (CRC): from mechanism to therapy and prognosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(16): 8470.
- [8] Cai J, Xia L, Li J, et al. Tumor-associated macrophages derived TGF- $\beta$ -induced epithelial to mesenchymal transition in colorectal cancer cells through Smad2, 3-4/Snail signaling pathway [J]. *Cancer Res Treat*, 2019, 51(1): 252–66.
- [9] 张小沛, 马方达, 隋爱霞, 等. 肿瘤相关巨噬细胞在恶性肿瘤侵袭和转移过程中的作用[J]. *癌症进展*, 2022, 20(12): 1205–7, 1218.
- [10] Zhao S, Mi Y, Guan B, et al. Tumor-derived exosomal miR-934 induces macrophage M2 polarization to promote liver metastasis of colorectal cancer [J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1): 156.
- [11] Chen J F, Wu S W, Shi Z M, et al. Traditional Chinese medicine for colorectal cancer treatment: potential targets and mechanisms of action [J]. *Chin Med*, 2023, 18(1): 14.
- [12] Wu Q, Wang S P, Sun X X, et al. HuaChanSu suppresses tumor growth and interferes with glucose metabolism in hepatocellular carcinoma cells by restraining Hexokinase-2 [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2022, 142: 106123.
- [13] Lan T, Chen H F, Zheng F, et al. Cinobufacini retards progression of pancreatic ductal adenocarcinoma through targeting YEATS2/TAK1/NF- $\kappa$ B axis [J]. *Phytomedicine*, 2023, 109: 154564.
- [14] Liu S, Zhang K, Hu X. Comparative efficacy and safety of Chinese medicine injections combined with capecitabine and oxaliplatin chemotherapies in treatment of colorectal cancer: A bayesian network meta-analysis [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1004259.
- [15] Wang J, Cai H, Liu Q, et al. Cinobufacini inhibits colon cancer invasion and metastasis via suppressing Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway and EMT [J]. *Am J Chin Med*, 2020, 48(3): 703–18.

## Cinobufacini inhibits the metastasis of colorectal cancer by regulating polarization of M2 macrophages

Shang Jing<sup>1</sup>, Wang Yun<sup>2</sup>, Chen Jinbao<sup>1</sup>, Tang Donghao<sup>3</sup>, Jia Linlin<sup>3</sup>, Li Wei<sup>3</sup>, Yu Hongjie<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Dept of Medical Oncology, <sup>2</sup>Dept of Hematology, <sup>3</sup>Dept of General Surgery,

Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062)

**Abstract Objective** To investigate the effect of cinobufacini on inhibiting colorectal cancer metastasis by regulating the polarization of M2 macrophages. **Methods** THP-1 was induced into M0 type macrophages. The conditioned medium of HCT116 cells was collected to stimulate M0 type macrophages. The polarization of M2 type macrophages was observed by flow cytometry, real-time quantitative PCR and ELISA experiments. The conditioned medium of M0 type macrophages and HCT116-M $\phi$  cells was collected to stimulate HCT116 cells. The ability of migration and invasion was observed by wound healing assay and Transwell assay. The effect of cinobufacini on the viability of HCT116 cells was detected by CCK-8 assay. The conditioned medium of HCT116 and HCT116 + cinobufacini was collected to stimulate M0 type macrophages. The polarization of M2 type macrophages was observed by flow cytometry, real-time quantitative PCR and ELISA experiments. The conditioned media of HCT116-M $\phi$  cells and (HCT116 + cinobufacini)-M $\phi$  cells were collected to stimulate HCT116 cells. The changes of migration and invasion ability were observed by wound healing assay and Transwell assay. **Results** After stimulation of M0 type macrophages in HCT116 cell conditioned medium, the morphology of M0 macrophages turned into fusiform cells, the proportion of CD11b<sup>+</sup> CD206<sup>+</sup> cells increased, and the expression of M2 macrophage markers IL-10 and TGF- $\beta$  increased. The migration and invasion ability of HCT116 cells were significantly enhanced after stimulation in the conditioned medium of HCT116-M $\phi$  cells. After the addition of cinobufacini, not only the polarization proportion of M2 macrophages decreased, but also the metastatic effect mediated by M2 macrophages was inhibited. **Conclusion**

HCT116 cells can induce the polarization of M2 macrophages, while cinobufacini can inhibit the tumor metastasis mediated by M2 macrophages by inhibiting the polarization of M2 macrophages.

**Key words** cinobufacini; colorectal cancer; tumor-associated macrophage; metastasis