

方药纵横

引用:王佳勇,朱晓俊,王素娴,等.黄精多糖调控巨噬细胞极化抑制食管癌细胞 Eca109 迁移侵袭的作用机制[J].现代中医药,2024,44(6):88-95.

黄精多糖调控巨噬细胞极化抑制食管癌 细胞 Eca109 迁移侵袭的作用机制^{*}

王佳勇 朱晓俊 王素娴 高薇 严自强^{**}

(海军军医大学附属长海医院,上海 200433)

摘要:目的 探究黄精多糖(Polygonatum sibiricum polysaccharides, PSP)调控巨噬细胞极化对食管癌细胞 Eca109 侵袭迁移的影响及作用机制。方法 采用细胞计数试剂盒(Cell Counting Kit-8, CCK-8)法检测 PSP 对巨噬细胞 RAW264.7 存活率的影响;白细胞介素 4(Interleukin 4, IL-4)(20 ng · mL⁻¹)/白细胞介素 13(Interleukin 13, IL-13)(20 ng · mL⁻¹)诱导 RAW264.7 细胞极化为 M2 型巨噬细胞,并给予 PSP 低、中、高(50、100、200 μg · mL⁻¹)干预 24 h,并收集细胞培养上清制备条件培养基。采用反转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测 M2 型巨噬细胞标志物精氨酸酶-1(Arginase-1, Arg-1)、甘露糖受体 1(mannose receptor 1, CD206)、类几丁质酶 3 样分子 3(Chitinase 3-like 3, Ym-1)mRNA 的水平;采用流式细胞术检测 M2 型巨噬细胞表面抗原 CD206 的表达;划痕实验检测条件培养基对 Eca109 细胞迁移能力的影响;Transwell 实验检测条件培养基对 Eca109 细胞侵袭能力的影响;采用 Western blot 实验检测细胞内蛋白酪氨酸激酶 3(Janus kinase 3, JAK3)、磷酸化蛋白酪氨酸激酶 3(Phospho-Janus kinase 3, p-JAK3)、信号转导及转录激活蛋白 6(Signal transducer and activator of transcription 6, STAT6)、磷酸化信号转导及转录激活蛋白 6(Phospho-signal transducer and activator of transcription 6, p-STAT6)蛋白的表达。结果 PSP 在浓度低于 200 μg · mL⁻¹ 时,对 RAW264.7 细胞存活率没有显著影响($P \geq 0.05$)。PSP(50、100、200 μg · mL⁻¹)呈剂量依赖降低 CD206⁺ 细胞比例,减少 Arg-1、CD206、Ym-1 mRNA 的水平($P < 0.05$)。PSP 巨噬细胞条件培养基显著抑制 Eca109 细胞的侵袭迁移能力。PSP(50、100、200 μg · mL⁻¹)明显降低 p-JAK3/JAK3 和 p-STAT6/STAT6 的蛋白表达比值($P < 0.05$)。结论 PSP 可以调控巨噬细胞 M2 极化抑制食管癌细胞 Eca109 侵袭迁移,其作用机制可能与抑制 JAK3/STAT6 信号通路有关。

关键词:黄精多糖;食管癌;肿瘤相关巨噬细胞极化;侵袭;迁移

中图分类号:R571 文献标识码:A

文章编号:1672-0571(2024)06-0088-08

DOI:10.13424/j.cnki.mtem.2024.06.016

Mechanism of Polygonatum Sibiricum Polysaccharides Regulating Macrophage Polarization and Inhibiting Migration and Invasion of Esophageal Cancer Cell Line Eca109

WANG Jiayong ZHU Xiaojun WANG Suxian GAO Wei YAN Ziqiang

(Naval Medical University Affiliated Changhai Hospital, Shanghai 200433, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect and mechanism of Polygonatum sibiricum polysaccharides (PSP) on macrophage polarization and invasion and migration of esophageal cancer cell line Eca109. **Methods** The Cell Counting Kit-

^{*} 基金项目:国家自然科学基金项目(81703882);上海市药学会项目(2019-YY-09)

^{**} 通讯作者:严自强,主管药师。E-mail:yan-ziqiang@163.com

8 (CCK-8) assay was used to detect the effect of PSP on the survival rate of RAW264.7 macrophages; Interleukin-4 (IL-4) ($20\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)/interleukin-13 (IL-13) ($20\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) induced polarization of RAW264.7 cells into M2 macrophages, and PSP low, medium, and high ($50, 100, 200\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) interventions were administered for 24 hours. Cell culture supernatant was collected to prepare conditioned medium. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the mRNA levels of M2 macrophage markers Arginase-1 (Arg-1), mannose receptor 1 (CD206), and Chitinase 3-like 3 (Ym-1); Use flow cytometry to detect the expression of M2 macrophage surface antigen CD206; The effect of scratch test conditions and culture medium on the migration ability of Eca109 cells; Transwell experiment detects the effect of conditioned medium on the invasive ability of Eca109 cells; Western blot assay was used to detect the expression of protein tyrosine kinase 3 (JAK3), phosphorylated protein tyrosine kinase 3 (p-JAK3), signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6), and phosphorylated signal transducer and activator of transcription 6 (p-STAT6) proteins in cells. **Results** The results showed that PSP had no significant effect on the survival rate of RAW264.7 cells at concentrations below $200\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($P \geq 0.05$). PSP ($50, 100, 200\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) showed a dose-dependent decrease in the proportion of CD206+ cells and reduced the levels of Arg-1, CD206, and Ym-1 mRNA ($P < 0.05$). PSP macrophage conditioned medium significantly inhibits the invasion and migration ability of Eca109 cells. PSP ($50, 100, 200\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) significantly reduced the protein expression ratios of p-JAK3/JAK3 and p-STAT6/STAT6 ($P < 0.05$). **Conclusion** PSP can regulate macrophage M2 polarization and inhibit the invasion and migration of esophageal cancer cell line Eca109, and its mechanism of action may be related to the inhibition of the JAK3/STAT6 signaling pathway.

Key words: Polygonatum sibiricum polysaccharide; Esophageal cancer; Tumor associated macrophage polarization; Attack; Transfer

食管癌是消化系统常见的恶性肿瘤之一,其5年生存率约为10%~15%^[1]。我国是食管癌高发地区,其发病率与死亡率分别位居第四位和第五位,严重威胁我国人民生命健康^[2-4]。食管癌的治疗策略主要包括手术、化疗、放疗和靶向治疗等全身治疗^[5-8]。然而,化疗、靶向治疗易出现耐药现象导致疗效降低,而且食管癌容易复发、转移。因此,亟需更多针对食管癌侵袭迁移的治疗方案。

传统中草药可以调节肿瘤微环境发挥显著的抗肿瘤作用^[9-10]。黄精多糖(Polygonatum sibiricum polysaccharides, PSP)是传统中药黄精的主要活性成分之一^[11-12],现代药理研究显示其具有保肝、抗氧化、调节免疫、抗肿瘤降糖、抗衰老,调节肠道菌群等作用^[13-17]。XIAO等^[18]研究显示,PSP可以通过NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NL- RP3)/成孔蛋白D(Gasdermin D, GSDMD)信号抑制细胞焦亡保护脓毒性急性肝损伤;LIU等^[19]研究显示,PSP可以通过TOLL样受体4(Toll Like Receptor 4, TLR4)/髓分化因子88(Myeloid Differentiation Factor 88, Myd88)/核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)途径抑制炎症反应治疗LPS诱导的急性肺损伤;LONG等^[20]研究显示,PSP可以通过TOLL

样受体4(Toll Like Receptor 4, TLR4)-有丝分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)/核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)信号通路增强免疫抑制肺癌;尽管,PSP已被报道可通过不同的分子机制发挥抗肿瘤作用,但其是否抑制食管癌细胞的侵袭迁移及作用机制尚不清楚。因此,本研究探讨PSP对Eca109细胞侵袭迁移的影响及可能的作用机制。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 SCZ-4A1型生物安全柜(博科干细胞应用研究院);CCL-170B CO₂细胞培养箱(新加坡ES-CO);FACSVerse流式细胞仪(美国BD公司);SpectraMax iD3多功能酶标仪(美国MD公司);Chemi-DocTM MP化学发光成像系统(美国Bio-Rad公司);QuantStudio3型实时荧光定量PCR仪(美国AB公司);5810R高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司);XSP-10C型倒置显微镜(德国徕卡公司)。

1.2 试剂 黄精多糖(扬州博睿糖公司,批号:BRT58,纯度95%);RPMI 1640培养基、PBS、CCK8试剂盒(批号分别为:MA0215、MA0015、MA0218),均购于大连美仑公司;青霉素-链霉素、胰酶(批号分别为:10378016、25200072),均购于美国Gibco公司;BCA试剂盒(批号:UI289351),购于美国Thermo

公司;基质胶、Transwell 小室(批号分别为:356234、3422),均购于美国 Corning 公司;胎牛血清、cDNA 反转录试剂盒、实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)(批号分别为:40130ES76、H1125080、184ES08),均购于上海翌圣公司;JAK3、p-JAK3、STAT6、p-STAT6、GAPDH 抗体和辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔二抗(批号分别为:8827、5031、5397、56554、5174、7074),均购于美国 CST 公司;APC-CD206 抗体(批号:abs180055),购于上海优宁维公司。小鼠巨噬细胞 RAW264.7(SCSP-5036)购自中科院细胞库、人食管癌细胞 Eca109(货号:CL-0077),购自武汉普诺赛公司。

2 方法

2.1 细胞培养与分组 小鼠巨噬细胞 RAW264.7 和人食管癌细胞 Eca109 培养于 RPMI 1640 完全培养基中(包含 10% FBS 和 1% 青霉素-链霉素),置于 37 ℃、5% CO₂ 的恒湿培养箱中培养,2~3 d 换液,细胞汇合度达到 80%~90% 时进行胰酶消化传代。选取处于对数期生长状态良好的细胞进行实验,分为空白组和 PSP 低、中、高剂量组(50、100、200 μg·mL⁻¹)。

2.2 CCK-8 法检测细胞存活率 取对数增殖期生长状态良好的 RAW264.7 细胞,胰酶消化成单细胞悬液,调整细胞密度,以 6×10³ 个细胞/100 μL 接种于 96 孔板。待细胞贴壁状态恢复良好后,弃去培养基,换成终浓度为(3.125、6.25、12.5、25、50、100、200、400 μg·mL⁻¹)的 PSP 培养基处理细胞 48 h,每个浓度 3 个复孔。24 h 后每孔细胞加入 10 μL CCK-8 试剂,继续培养 2 h,于酶标仪 450 nm 处读取吸光度值 A,并计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{A_{\text{药物}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}} \times 100\%$$

2.3 RT-PCR 法检测 M2 型巨噬细胞相关基因 mRNA 表达 取对数增殖期生长状态良好的 RAW264.7 细胞,胰酶消化成单细胞悬液,调整细胞密度,以 2.5×10⁵ 个细胞/接种于 6 孔板中,待细胞贴壁后,将细胞分为空白组、M2 型巨噬细胞模型组和 PSP 低、中、高剂量(50、100、200 μg·mL⁻¹)干预组,M2 型巨噬细胞模型组给予 IL-4(20 μg·L⁻¹)和 IL-13(20 μg·L⁻¹)处理 24 h,PSP 低、中、高剂量(50、100、200 μg·mL⁻¹)干预组细胞同时给予 IL-4(20 μg·L⁻¹)和 IL-13(20 μg·L⁻¹)和不同浓度的 PSP 处理 24 h。用 TriZol 提取细胞总 RNA 并测定其纯度和浓度,根

据逆转录试剂盒和 RT-qPCR 说明书逆转录成 cDNA 并设置 RT-qPCR 反应体系,测定 Ct 值。以 GAPDH 作为内参,并根据 2^{-ΔCt} 计算 M2 型巨噬细胞标志物 Arg-1、CD206、Ym-1 的 mRNA 水平。基因引物有上海生工合成,引起系列如下。Arg-1 上游:5'-GGAC-CTGCCCTTTGCTGACA-3', Arg-1 下游:5'-AGGCT-GATTCTTCCGTTCTTCTTG-3'; CD206 上游:5'-ACT-GGGCAGAAGGAGTAACC-3', CD206 下游:5'-AATC-CTCCGGACATTTGGGT-3'; Ym-1 上游:5'-TCACAG-GTCTGGCAATTCTTCTG-3', Ym-1 下游:5'-TTTGTC-CTTAGGAGGGCTTCCTC-3'; GAPDH 上游:5'-CAG-GAGGCATTGCTGATGAT-3', GAPDH 下游:5'-GAAGGCTGGGGCTCA TTT-3'。

2.4 流式细胞术检测 M2 型巨噬细胞表面 CD206 的表达 按照“2.3 项”分组、给药处理 RAW264.7 细胞,弃去培养基,PBS 洗 2 遍,用胰酶消化细胞并制成单细胞悬液,与适量的 CD206 抗体混匀后避光孵育 30 min。离心弃去上层液体,用 PBS 洗一遍,在把细胞重悬与 PBS 溶液中,上机进行流式细胞仪检测。

2.5 RAW264.7 条件培养基的获取 取对数增殖期生长状态良好的 RAW264.7 细胞,胰酶消化成单细胞悬液传代培养,待细胞贴壁后,将细胞分为空白组、M2 型巨噬细胞模型组和 PSP 低、中、高剂量(50、100、200 μg·mL⁻¹)干预组,M2 型巨噬细胞模型组给予 IL-4(20 μg·L⁻¹)和 IL-13(20 μg·L⁻¹)处理 24 h,PSP 低、中、高剂量(50、100、200 μg·mL⁻¹)干预组细胞同时给予 IL-4(20 μg·L⁻¹)和 IL-13(20 μg·L⁻¹)和不同浓度的 PSP 处理 24 h。收集各组培养基,离心去除沉淀,保存于-80℃冰箱用于后续细胞划痕及迁移分析。

2.6 划痕实验检测细胞迁移能力 取对数增殖期生长状态良好的人食管癌细胞 Eca109,胰酶消化成单细胞悬液,调整细胞密度,以 1×10⁶ 个细胞/接种于 6 孔板中(6 孔板预先在底部用 marker 笔划一黑线),待细胞过夜贴壁后,用 200 μL 黄枪头沿标记线进行划痕,并用 PBS 清洗 2 次去除漂浮细胞。并分别加 2 mL 2.5 项下制备的条件培养基,显微镜拍照后放培养箱继续培养,并再次于 24 h 拍照。

2.7 Transwell 检测细胞侵袭能力 将基质胶从冰箱取出室温放置 30 min,然后用无血清培养基稀释

(1:8),取 50 μL 稀释后的基质胶于 Transwell 小室底部的上室面,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中 4 h 使基质胶聚合成凝胶。取对数增殖期生长状态良好的人食管癌细胞 Eca109,胰酶消化后用无血清的培养基制成单细胞悬液并调整细胞密度,以 2×10^4 个细胞/ $200\text{ }\mu\text{L}$ 加入上室,下室分别加入 $600\text{ }\mu\text{L}$ 2.5 项下制备的条件培养基,于培养箱中继续培养 24 h。甲醇固定后用 0.1% 结晶紫染色,并于棉签小心擦拭小室上面没有穿膜的细胞,荧光显微镜拍照。

2.8 Western blot 检测相关蛋白的表达 取对数增殖期生长状态良好的 RAW264.7 细胞,胰酶消化成单细胞悬液,调整细胞密度,以 2.5×10^5 个细胞/接种于 6 孔板中,待细胞贴壁后,将细胞分为空白组、IL-4/IL-13 诱导的 M2 型巨噬细胞模型组和 PSP 低、中、高剂量 (50 、 100 、 $200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 干预组,M2 型巨噬细胞模型组细胞给予 IL-4 ($20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 IL-13 ($20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理 24 h,PSP 低、中、高剂量 (50 、 100 、 $200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 干预组细胞同时给予 IL-4 ($20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 IL-13 ($20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 和不同浓度的 PSP 处理 24 h。吸去培养基 PBS 洗一遍,加入 RIPA 裂解液(添加蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂)于冰上裂解 30 min,离心 ($10000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,10 min) 取上清收集细胞总蛋白。BCA 法测定蛋白浓度并用 loading buffer 于金属浴 ($100\text{ }^{\circ}\text{C}$) 变性 10 min。30 μg 总蛋白 SDS-PAGE 凝胶电泳分离后转移至 PVDF 膜上,封闭 1 h (5% 脱脂牛奶),于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜孵育相应的一抗 (1:1000 稀释),于室温孵育二抗 (1:4000 稀释) 2 h,采用 ECL 发光液,Bio-Red 凝胶成像系统成像,并于 Image J 软件计算灰度值。

2.9 统计学方法 所有数据均以均数 \pm 标准差表

述($\bar{x}\pm s$),GraphPad 软件进行分析,组间比较采用标准 t 检验和单因素方差分析, $P<0.05$ 表述差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 黄精多糖对 RAW264.7 细胞存活率的影响 图 1 结果显示,黄精多糖浓度为 $400\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,RAW264.7 细胞存活率显著降低($P<0.05$),而黄精多糖浓度低于 $200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,对 RAW264.7 细胞存活率没有显著影响($P\geq 0.05$)。故选择 50 、 100 、 $200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度作为黄精多糖的低、中、高实验浓度进行后续实验。

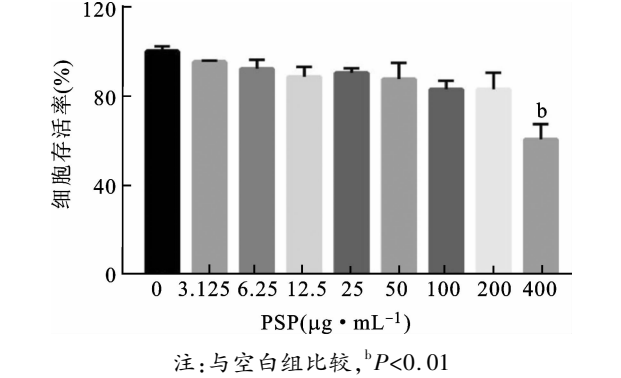


图 1 黄精多糖对 RAW264.7 细胞存活率的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

3.2 黄精多糖对 M2 型巨噬细胞标志物 Arg-1、CD206、Ym-1 mRNA 水平的影响 如图 2 所示,RAW264.7 巨噬细胞经 IL-4/IL-13 刺激后,M2 型巨噬细胞标志物 Arg-1、CD206、Ym-1 的 mRNA 水平均显著升高($P<0.01$),表明 RAW264.7 巨噬细胞极化为 M2 型模型建立成功,而黄精多糖 (50 、 100 、 $200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 显著降低 Arg-1、CD206、Ym-1 的 mRNA 水平($P<0.05$),而且呈现剂量依赖性,结果见图 2。

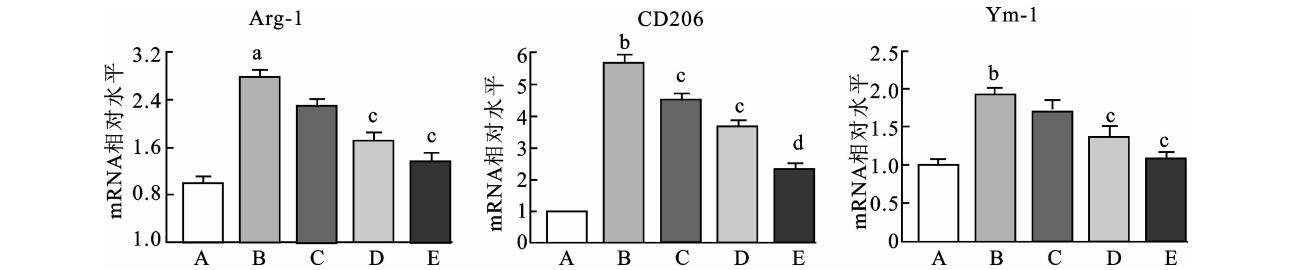
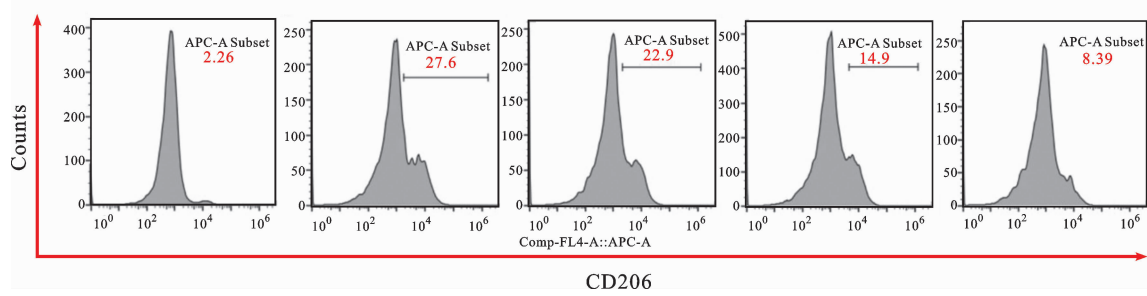


图 2 黄精多糖对 Arg-1、CD206、Ym-1 mRNA 水平的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

3.3 黄精多糖对 M2 型巨噬细胞表面抗原 CD206 表达的影响 如图 3 所示,与对照组细胞比较,

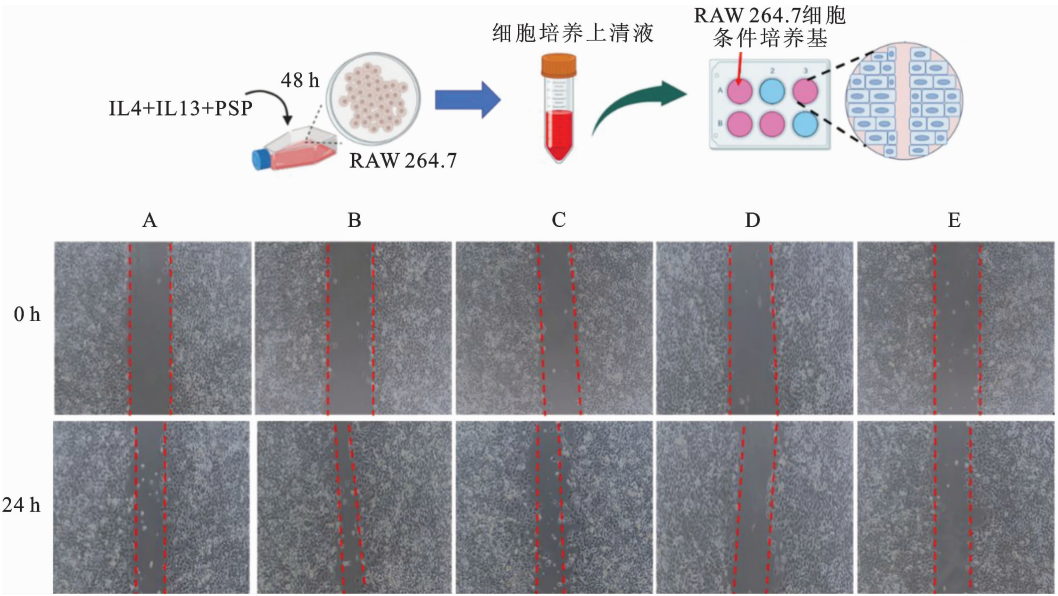
RAW264.7 巨噬细胞经 IL-4/IL-13 刺激后的 M2 模型组中 CD206⁺ 细胞比例显著增加 (27.6% vs.

2.26%), 而黄精多糖 (50、100、200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 处理后, CD206⁺ 细胞比例分别下降至 22.9%、14.9%、8.39%。以上结果表明, 黄精多糖可以抑制巨噬细胞 M2 极化。



注: A. 对照组; B. M2 模型组; C. PSP 低剂量组; D. PSP 中剂量组; E. PSP 高剂量组
图 3 黄精多糖对 M2 型巨噬细胞表面抗原 CD206 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

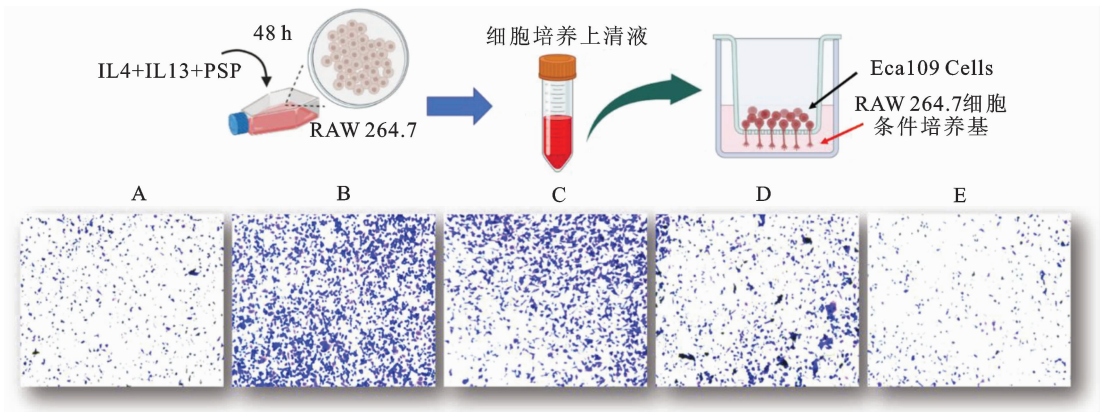
3.4 黄精多糖巨噬细胞条件培养基对食管癌细胞 Eca109 迁移能力的影响 如图 4 所示, 与空白组比较, IL-4/IL-13 刺激的 M2 型巨噬细胞条件培养基明显促进 Eca109 细胞迁移, 24 h 划痕面积明显减少。



注: A. 对照组条件培养基; B. M2 模型组条件培养基; C. PSP 低剂量组条件培养基; D. PSP 中剂量组条件培养基; E. PSP 高剂量组条件培养基
图 4 黄精多糖巨噬细胞条件培养基对食管癌细胞 Eca109 迁移能力的影响

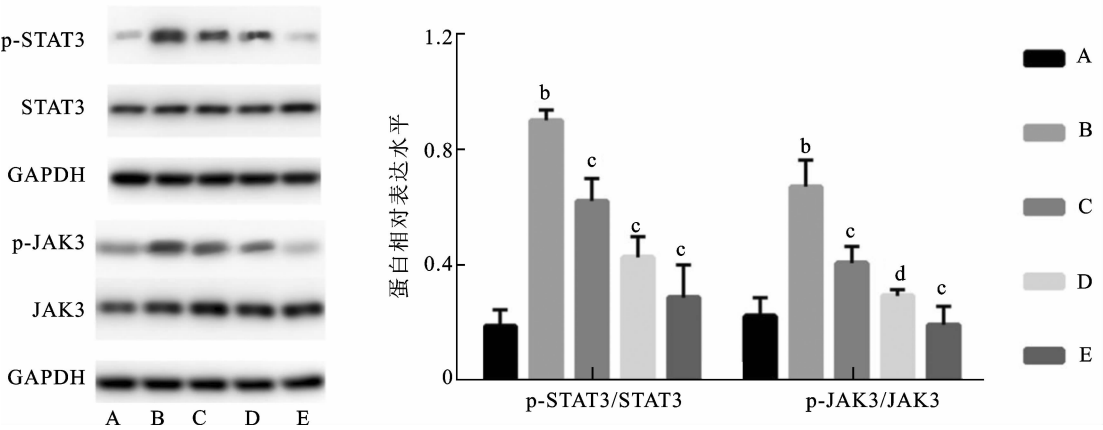
3.5 黄精多糖巨噬细胞条件培养基对食管癌细胞 Eca109 侵袭能力的影响 如图 5 所示, 与空白组比较, IL-4/IL-13 刺激的 M2 型巨噬细胞条件培养基明显促进 Eca109 细胞侵袭。与 M2 型巨噬细胞条件培养基组比较, 黄精多糖 (50、100、200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 条件培养基组侵袭细胞数明显降低, 且呈现剂量依赖现象, 表明细胞侵袭能力下降。

3.6 黄精多糖对巨噬细胞 JAK3/STAT6 信号通路的影响 如图 6 所示, 与空白组比较, RAW264.7 巨噬细胞经 IL-4/IL-13 刺激成 M2 型巨噬细胞 p-JAK3/JAK3 和 p-STAT6/STAT6 的蛋白表达比值显著升高 ($P < 0.05$), 而黄精多糖 (50、100、200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 干预的 M2 型巨噬细胞 p-JAK3/JAK3 和 p-STAT6/STAT6 的蛋白表达比值明显降低, 且呈现剂量依赖 ($P < 0.05$)。以上结果表明, 黄精多糖能够抑制 JAK3/STAT6 信号通路抑制 M2 型巨噬细胞极化。



注:A. 对照组条件培养基;B. M2 模型组条件培养基;C. PSP 低剂量组条件培养基;D. PSP 中剂量组条件培养基;E. PSP 高剂量组条件培养基

图 5 黄精多糖巨噬细胞条件培养基对食管癌细胞 Eca109 侵袭能力的影响



注:A. 对照组;B. M2 模型组;C. PSP 低剂量组;D. PSP 中剂量组;E. PSP 高剂量组;与对照组比较,^b $P<0.01$;与 M2 模型组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$

图 6 黄精多糖对巨噬细胞 JAK3/STAT6 信号通路的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

4 小结与讨论

侵袭转移是食管癌死亡的主要原因^[21-22]。食管癌具有快速进展和不良预后的特征,其早期往往无症状或不典型,诊断时通常处于晚期或转移阶段^[23]。尽管近年来西医大幅提高了食管癌的治疗效果,但其预后远不能令人满意,其 5 年生存率大约为 15% ~ 25%^[24]。而中医药对肿瘤的侵袭转移及预后的调整具有突出的优势^[25]。因此,从传统中药中寻找安全、有效的治疗药物,改善患者的生存质量具有重要意义。PSP 是中药黄精的主要活性成分,具有抗衰老、抗炎、调节免疫,抗肿瘤等作用,本研究发现 PSP 能够抑制食管癌的侵袭转移,是一种良好的抗肿瘤药物。

由于高复发率和转移,食管癌的预防和治疗策略受到限制。文献报道,肿瘤相关巨噬细胞(Tumor-associated macrophages, TAM),尤其是 M2 型巨噬细

胞促进肿瘤的侵袭转移,TAMs 是肿瘤微环境中数量最多的免疫细胞,参与了肿瘤的恶性发展^[26-28]。巨噬细胞浸润肿瘤后,优先分化为 M2 样 TAMs,并通过抗肿瘤免疫消除,促进 Th2 抗炎细胞因子(如 IL-4, IL-10 等)的释放,促进肿瘤的侵袭转移^[29-30]。肿瘤发生过程中癌细胞与不同肿瘤微环境成分的相互作用形成了 TAMs 的生理和表型,从而促进肿瘤的产生。IL-4/IL-13 已被证明是 M2 样巨噬细胞极化的强诱导剂^[31]。因此我们用 IL4/IL-13 刺激 RAW264.7 极化为 M2 型巨噬细胞。结果显示,IL4/IL13 诱导 RAW264.7 细胞极化为 M2 表型,其细胞表面抗原 CD206 的表达与 M2 标志物基因 Arg-1, Ym-1 的 mRNA 水平明显升高,而 PSP 处理后,CD206 的表达和 Arg-1, Ym-1 的 mRNA 水平显著降低;而且流式结果也显示,CD206⁺细胞群在 PSP 处理后明显减少。这些结果说明 PSP 能够抑制巨

噬细胞的 M2 极化。

上皮-间充质转化 (Epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是肿瘤侵袭转移的重要过程^[32-34]。TAMs 是诱导 EMT 的重要介质,其分泌的许多物质刺激肿瘤细胞的增殖和转移^[35-36]。肿瘤微环境中往往存在两种不同的活化巨噬细胞亚群,经典活化巨噬细胞 (M1 型) 和替代激活巨噬细胞 (M2 型)。M1-TAMs 释放大量的促炎细胞因子,如白细胞介素 6 (Interleukin 6, IL-6)、白细胞介素 1 β (Interleukin 1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (Tumor necrosis factor α , TNF- α) 和活性氮, M2-TAMs 参与基质发育、免疫抑制和肿瘤生长,具有抗炎和促进肿瘤的作用^[37]。传统中草药可以通过靶向肿瘤微环境发挥显著的抗肿瘤作用。本研究发现, PSP 可以调控巨噬细胞的 M2 极化,抑制肿瘤细胞的划痕愈合及穿膜能力,抑制肿瘤细胞的侵袭迁移。

巨噬细胞极化是受多种分子机制及信号因子调控的一个复杂过程。JAK3/STAT6 信号通路是调控基因表达的关键通路,细胞因子受体结合 JAK3 蛋白,导致 JAK3 的酪氨酸残基激活并磷酸化; STAT6 通过酪氨酸磷酸结合 Src 同源 2 结构域 (Src Homology 2 domain, SH2) 结构域被招募到复合物中,其自身被磷酸化激活,磷酸化的 STAT6 易形成同源或异源二聚体,进入细胞核,结合 DNA 反应元件,调控基因的转录表达^[25]。有报道, IL-4 是巨噬细胞活化的内源性细胞因子,主要通过 JAK3/STAT6 信号通路,调控 Arg-1、Ym-1 等多种 M2 巨噬细胞标志物基因表达活性巨噬细胞^[26]。因此,干预 JAK3/STAT6 信号通路调控巨噬细胞 M2 极化是食管癌侵袭转移的关键因素。本研究发现, PSP 能够抑制 JAK3 和 STAT6 的磷酸化,抑制 JAK3/STAT6 信号通路激活,从而调控巨噬细胞 M2 极化。

综上,本研究发现中药黄精的主要活性成分 PSP,可以抑制食管癌的侵袭转移。其作用机制可能与抑制 JAK3/STAT6 信号通路激活调控巨噬细胞 M2 极化有关。

参考文献

[1] NAGATA Y, YAMAMOTO S, KATO K. Immune checkpoint inhibitors in e-sophageal cancer: clinical development and perspectives [J]. Human vaccines & Immunotherapeutics, 2022, 18(6): 2143177.
[2] 刘宇英, 魏君丽, 江柔, 等. 食管癌的流行病学及筛查研究进展 [J]. 中华疾病控制杂志, 2022, 26(7): 839-844.

[3] 赫捷, 陈万青, 李兆申, 等. 中国食管癌筛查与早诊早治指南 (2022, 北京) [J]. 中国肿瘤, 2022, 31(6): 401-436.
[4] 郑玉玲, 张亚玲. 《中西医结合食管癌治疗方案专家共识》(2021 年版) 解读 [J]. 现代中医药, 2021, 41(6): 11-15.
[5] TSUCHIYA N, KUNISAKI C, SATO S, et al. Chemoradiotherapy for locally advanced esophageal squamous cell carcinoma [J]. Langenbeck, sArchives of Surgery, 2022, 407(5): 1911-1921.
[6] YANG YM, HONG P, XU WW, et al. Advances in targeted therapy for e-sophageal cancer [J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2020, 5: 229.
[7] 韩天赐, 刘斌, 张亮. 食管癌新辅助免疫治疗研究进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2024, 32(13): 2460-2464.
[8] 刘前林, 周俊东. 食管癌放疗联合免疫治疗的研究进展 [J]. 中国临床新医学, 2024, 17(5): 590-594.
[9] ZHAO B, HUI XD, WANG J, et al. Matrine suppresses lung cancer me-tastasis via targeting M2-like tumour-associated-macrophages polarization [J]. American Journal of Cancer Research, 2021, 11(9): 4308-4328.
[10] 旦增旺姆, 韩广素, 李晨露, 等. 中药调节肿瘤免疫微环境发挥抗肿瘤作用研究进展 [J]. 中西医结合研究, 2023, 15(6): 410-414.
[11] 杨迎, 侯婷婷, 王威, 等. 黄精多糖的药理作用研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2022, 37(3): 659-665.
[12] 权利娜, 王露, 王嘉雯, 等. 多花黄精总皂苷的提取工艺及体外抗氧化研究 [J]. 现代中医药, 2022, 42(5): 47-51.
[13] 罗婷, 罗丹, 甘露. 黄精多糖的现代药理作用研究进展 [J]. 临床合理用药, 2023, 16(2): 177-180.
[14] 边金煊, 杜李继, 王子丽, 等. 黄精多糖与积雪草苷对糖尿病斑马鱼尾鳍再生的药效学研究 [J]. 中国药理学杂志, 2023, 58(7): 592-598.
[15] 龙杰凤, 陈文经, 李金巧. 黄精多糖提取工艺及降糖活性研究 [J]. 亚太传统医药, 2024, 2(4): 49-53.
[16] 李佳纯, 刘继业. 黄精多糖抗衰老的研究进展 [J]. 实用老年医学, 2024, 38(4): 334-337.
[17] 丛悦, 李莉, 关佳莉, 等. 黄精多糖对 X 射线辐射损伤小鼠外周血象及肠道菌群的影响研究 [J]. 现代中药研究与实践, 2024, 38(1): 24-29.
[18] XIAO LX, QI L, ZHANG GZ, et al. Polygonatum sibiricum polysaccharides attenuate lipopoly-saccharide-induced septic liver injury by suppression of pyroptosis via NLRP3/GSDMD signals [J]. Molecules, 2022, 27(18): 5999.
[19] LIU TY, ZHAO LL, CHEN SB, et al. polygonatum sibiricum polysaccharides prevent LpS-induced acute lung injury by inhibiting inflammation via the TLR4/Myd88/NF-KB pathway [J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2020, 20(4): 3733-3739.
[20] LONG TT, LIU ZJ, SHANG JC, et al. polygonatum sibiricum polysaccharides play anti-cancer effect through TLR4-MAPK/NF-

KBsignaling pathways[J]. International Journal of Biological Macromolecules,2018,111:813-821.

[21] BETANCOURT-CUELLAR SL, BENVENISTE MFK, PALACIO DP, et al. Esophageal cancer; tumor-node-metastasis staging[J]. Radiologic clinics of North America,2021,59(2):219-229.

[22] 齐义军,朱亚飞,李思民. 食管癌转移的表观遗传学改变研究进展[J]. 食管疾病,2021,3(1):58-63.

[23] PENMAN ID, HENRY E. Advanced esophageal cancer[J]. Gastrointestinal Endoscopy clinics of North America,2005,15(1):101-116.

[24] YAMAMOTO S, KATO K. pembrolizumab for the treatment of esophageal cancer[J]. Expert opinion on Biological Therapy,2020,20(10):1143-1150.

[25] 杨慧超,荀敬,姜晓琳,等. 中医药治疗食管癌的作用机制研究进展[J] 中国中西医结合外科杂志,2024,30(3):419-423.

[26] XU F, SHANGGUAN X, PAN JH, et al. HoXD13 suppresses prostate cancer metastasis and BMP4-induced epithelial-mesenchymal transition by inhibiting SMAD1[J]. International Journal of cancer,2021,148(12):3060-3070.

[27] 何伟,胡勇,佟雅婧. 肿瘤免疫抑制及炎性微环境的中医病机[J]. 现代中医药,2022,42(6):1-5.

[28] 柴国静,帖彦清,赵海利. 肿瘤相关巨噬细胞对肿瘤转移的影响及靶向治疗的研究进展[J]. 中国医药,2024,19(4):638-640.

[29] LIN YX, XU JX, LAN HY. Tumor-associated macrophages in tumor metastasis; biological roles and clinical therapeutic applications[J]. Journal of Hematology & oncology,2019,12(1):76.

[30] 魏晓环,单前前,朱军. LPS 诱导巨噬细胞 M1 型极化对肿瘤生长的影响[J]. 中国现代医生,2024,62(3):54-59.

[31] GENIN M, CLEMENT F, FATTACCIOLI A, et al. M1 and M2 macrophages derived from THp-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide[J]. BMC cancer,2015,15:577.

[32] BHAT AA, NISAR S, MAACHA S, et al. cytokine-chemokine network driven metastasis in esophageal cancer; promising avenue for targeted therapy[J]. Molecular cancer,2021,20(1):2.

[33] 陈吉豪,唐佳佳,陈晓钢,等. LGR4 通过调控上皮-间充质转化促进宫颈癌转移[J]. 中国细胞生物学学报,2022,44(3):413-420.

[34] 卢洪胜,於樱枝,牟樱红,等. FOXK1 通过上皮间充质转化促进胃癌浸润转移研究[J]. 现代实用医学,2018,30(4):436-438,416.

[35] HUANG RL, WANG SQ, WANG N, et al. ccL5 derived from tumor-associated macrophages promotes prostate cancer stem cells and metastasis via activating β -catenin/STAT3 signaling[J]. Cell Death & Disease,2020,11(4):234.

[36] YANG C, DOU R, XIONG B, et al. Tumor-derived exosomal microRNA-106b-5p activates EMT-cancer cell and M2-subtype TAM interaction to facilitate CRC metastasis[J]. Mol Ther,2021,29(6):2088-2107.

[37] BOUTILIER AJ, ELSAWA SF. Macrophage polarization states in the tumor microenvironment[J]. International Journal of Molecular Sciences,2021,22(13):6995.

[38] YU T, GAN SC, ZHU QC, et al. Modulation of M2 macrophage polarization by the crosstalk between Stat6 and Trim24[J]. Nature communications,2019,10:4353.

[39] HUANG CY, WANG J, LIU HB, et al. Ketone body β -hydroxybutyrate ameliorates colitis by promoting M2 macrophage polarization through the STAT6-dependent signaling pathway[J]. BMC Medicine,2022,20(1):148.

[40] QUERO L, HALL J, KYBURZ D, et al. miR-221-3p Drives the Shift of M2-Macrophages to a Pro-Inflammatory Function by Suppressing JAK3/STAT3 Activation[J]. Front Immunol,2020,10:3087.

(修回日期:2023-05-30 编辑:崔春利)