

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2026.04.003

· 基础研究 ·

蟾毒灵通过抑制TAM介导的STAT3磷酸化降低结直肠癌细胞PD-L1表达

路畅^{1,2}, 尚靖³, 陈进宝⁴, 朱媛², 钟佳妮², 殷佩浩^{1,5} (1. 安徽医科大学第五临床医学院, 安徽合肥 230022; 2. 上海中医药大学附属普陀医院普外科, 上海 200062; 3. 上海中医药大学附属普陀医院放射科, 上海 200062; 4. 上海中医药大学附属普陀医院中医肿瘤科, 上海 200062; 5. 同济大学附属普陀人民医院普外科, 上海 200061)

[摘要] **目的:** 探讨蟾毒灵(BU)对肿瘤相关巨噬细胞(TAM)介导的结直肠癌(CRC)细胞程序性死亡蛋白-配体1(PD-L1)表达的调控作用及其分子机制。**方法:** 采用HCT116细胞与THP-1来源巨噬细胞构建体外共培养体系。佛波酯(PMA)诱导THP-1细胞分化为M0型巨噬细胞, 进一步以HCT116细胞条件培养基(CM)刺激形成TAM样细胞。流式细胞术检测CD11b、CD206表达, 以评价巨噬细胞极化水平; RT-qPCR及WB法检测TGF- β 、IL-10、STAT3/p-STAT3及PD-L1表达变化; 慢病毒转染构建STAT3敲低细胞系HCT116^{sh-STAT3}, 结合BU干预验证STAT3/PD-L1信号通路作用。**结果:** HCT116细胞CM可诱导巨噬细胞向M2表型极化, 表现为CD11b⁺CD206⁺细胞比例升高($P < 0.01$)及TGF- β 、IL-10表达增加(均 $P < 0.001$)。TAM条件培养基可显著促进HCT116细胞STAT3磷酸化($P < 0.001$)并上调PD-L1 mRNA及蛋白表达水平($P < 0.001$ 或 $P < 0.01$)。BU干预后, TAM介导的STAT3磷酸化水平明显下降, PD-L1表达同步下调(均 $P < 0.01$)。STAT3敲低可降低PD-L1表达, 其作用趋势与BU一致。**结论:** BU可通过抑制TAM介导的STAT3信号激活, 下调CRC细胞PD-L1表达, 提示其在肿瘤免疫微环境调控中具有潜在的应用价值。

[关键词] 结直肠癌; 肿瘤相关巨噬细胞; 程序性死亡配体1; HCT116细胞

[中图分类号] R735.3; R730.51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2026)04-0373-06

Bufalin reduces PD-L1 expression in colorectal cancer cells through suppressing TAM-mediated STAT3 phosphorylation

LU Chang^{1,2}, SHANG Jing³, CHEN Jinbao⁴, ZHU Yuan², ZHONG Jiani², YIN Peihao^{1,5} (1. The Fifth Clinical Medical College, Anhui Medical University, Hefei 230022, Anhui, China; 2. Department of General Surgery, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China; 3. Department of Radiology, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China; 4. Department of Traditional Chinese Medicine Oncology, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China; 5. Department of General Surgery, Putuo People's Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai 200061, China)

[Abstract] Objective: To investigate the regulatory effect of bufalin (BU) on tumor-associated macrophage (TAM)-mediated programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression in colorectal cancer (CRC) cells and to elucidate the underlying molecular mechanism. **Methods:** An *in vitro* co-culture system was established using HCT116 cells and THP-1-derived macrophages. THP-1 cells were differentiated into M0 macrophages by PMA treatment and further stimulated with HCT116-conditioned medium (CM) to generate TAM-like cells. Flow cytometry was used to detect CD11b and CD206 expressions and assess macrophage polarization level. The changes in the expression levels of TGF- β , IL-10, STAT3/p-STAT3, and PD-L1 were detected by RT-qPCR and WB assay. A STAT3 knockdown cell line (HCT116^{sh-STAT3}), constructed by lentiviral transduction, was combined with BU treatment to verify the role of the STAT3/PD-L1 signaling pathway. **Results:** HCT116-derived CM induced macrophage polarization toward the M2 phenotype, as evidenced by an increased proportion of CD11b⁺CD206⁺ cells ($P < 0.01$) and elevated expression of TGF- β and IL-10 (both $P < 0.001$). TAM-conditioned medium significantly promoted STAT3 phosphorylation ($P < 0.001$) and upregulated PD-L1 expression at both mRNA and protein levels in HCT116 cells ($P < 0.001$ or $P < 0.01$). BU treatment markedly suppressed TAM-mediated STAT3 phosphorylation and concomitantly reduced PD-L1 expression (both $P < 0.01$). STAT3 knockdown decreased PD-L1 expression,

[基金项目] 上海市卫生健康系统重点学科(2024ZDXK0044, 2024ZDXK0046); 上海市普陀区卫生健康系统科技创新项目 (ptkwws202409); 上海市第六人民医院联合共建科学研究基金(23-LY-03); 安徽医科大学研究生科研与实践创新项目(YJS20240117)

[作者简介] 路畅, 硕士生

[通信作者] 殷佩浩(扫码获取作者通信方式)



showing a similar trend to BU treatment. **Conclusion:** BU downregulates PD-L1 expression in CRC cells by inhibiting TAM-mediated STAT3 signal activation, suggesting its potential application value in regulating the tumor immune microenvironment.

[Key words] colorectal cancer (CRC); tumor-associated macrophage (TAM); programmed death-ligand 1 (PD-L1); HCT116 cell

[Chin J Cancer Biother, 2026, 33(4): 373-378. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2026.04.003]

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是全球发病率和病死率均位居前列的恶性肿瘤,易发生转移,总体预后不佳^[1-2]。肿瘤免疫逃逸是肿瘤发生发展的关键机制之一,严重影响CRC患者的治疗反应与生存结局。肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophage, TAM)在肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)中大量富集,并倾向于向抑制炎症的M2表型极化,从而促进肿瘤生长并抑制抗肿瘤免疫应答^[3-5]。程序性死亡配体1(programmed death-ligand 1, PD-L1)是肿瘤细胞实现免疫逃逸的关键因子^[6],其异常高表达与CRC的不良预后显著相关^[7]。研究^[8-9]发现,TAM可通过激活信号转导及转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)信号通路上调肿瘤细胞中PD-L1表达,进而增强免疫抑制效应。因此,干预TAM介导的STAT3信号激活、抑制PD-L1表达,可能成为改善肿瘤免疫微环境的重要策略。蟾毒灵(bufalin, BU)是从中药蟾酥中提取的天然活性成分,已被证实具有多种抗肿瘤作用,包括促进凋亡、抑制血管生成等^[10]。近年来的研究提示,BU可能通过调节TME发挥抗肿瘤作用。然而,BU能否通过调控TAM介导的STAT3信号通路激活继而影响CRC细胞PD-L1表达水平,仍有待进一步研究。基于上述背景,本研究提出假设:BU或可通过抑制TAM介导的STAT3磷酸化,降低CRC细胞PD-L1表达,从而减轻肿瘤免疫逃逸。为验证该假设,本研究构建TAM与CRC细胞共培养体系,并结合STAT3敲低,系统评估BU对TAM极化状态、STAT3信号激活及PD-L1表达的调控作用,旨在为靶向肿瘤免疫微环境的治疗策略提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂

CRC细胞HCT116和人单核细胞白血病细胞THP-1均购自中国科学院上海生命科学研究院。

BU(粉剂,纯度>98%)购自成都瑞芬斯德丹生物科技有限公司,RPMI 1640培养基、胎牛血清、双抗(青霉素/链霉素)和胰蛋白酶均购自Gibco公司,佛波酯(PMA)购自MCE公司,CD11b-PE抗体和CD206-FITC抗体购自BD Pharmingen公司,RNA提取试剂盒、逆转录试剂盒和RT-qPCR试剂盒均购自艾科瑞生物科技有限公司,蛋白样品制备及SDS-PAGE电泳相关试剂购自苏州新赛美生物技术有限公司,PD-L1抗体、STAT3抗体及p-STAT3抗体购自Abcam公司,

β -actin抗体、山羊抗小鼠二抗、山羊抗兔二抗、免疫荧光二抗工作液、嘌呤霉素均购自武汉赛维尔生物科技有限公司。STAT3干扰慢病毒购自上海和元生物技术股份有限公司。TGF- β 、PD-L1、STAT3及IL-10引物均定制自广州白雪生物科技有限公司。

1.2 细胞培养

HCT116细胞在1%双抗及10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中培养;THP-1细胞在1%双抗和20%胎牛血清的RPMI 1640培养基中培养。将细胞置于37℃、5%CO₂的培养箱中恒温培养。THP-1细胞以1×10⁶个/孔的密度接种于6孔板,并使用含200 ng/mL PMA的完全培养基刺激48 h,以诱导为贴壁的未活化巨噬细胞(M0 macrophage, M0)。

将HCT116细胞以4×10⁵个/孔的密度接种于6孔板中,培养24 h后更换为无血清RPMI 1640培养基进行饥饿处理,48 h后收集相应的条件培养基(conditioned medium, CM)。将THP-1细胞以1×10⁶/孔的密度接种于6孔板,使用含200 ng/mL PMA的完全培养基刺激48 h,诱导分化为贴壁的M0。将M0细胞的培养基更换为含20%胎牛血清的CM(HCT116),刺激48 h后得到相应的巨噬细胞(M ϕ): M ϕ (HCT116)和M ϕ (HCT116^{sh-STAT3})。随后,再次用无血清RPMI 1640培养基饥饿处理M0或M ϕ 细胞48 h,收集相应的CM:CM-M0、CM-M ϕ (HCT116)及CM-M ϕ (HCT116^{sh-STAT3})。将上述收集的CM加入10%胎牛血清后用于培养HCT116细胞,并根据不同CM及处理分为CM-M0组、CM-M ϕ (HCT116)组、CM-M ϕ (HCT116^{sh-STAT3})组和BU+CM-M ϕ (HCT116)组。BU+CM-M ϕ (HCT116)组是在HCT116细胞培养时加入BU(10 ng/mL)和CM-M ϕ (HCT116)。

1.3 慢病毒转染建立STAT3敲低细胞系

将对数生长期的HCT116细胞按适当密度接种于96孔或24孔板中,待细胞汇合度达30%~40%时,加入慢病毒进行感染。感染12~16 h后更换为新鲜完全培养基。继续培养48 h后加入5 μ g/mL嘌呤霉素筛选48 h,持续培养直至获得稳定表达的空载体对照细胞系HCT116^{sh-NC}及STAT3敲低细胞系HCT116^{sh-STAT3}。

1.4 流式细胞术检测M ϕ 极化情况

消化并收集各组M ϕ ,用PBS洗涤后重悬。取1×10⁶个细胞,加入CD11b-PE和CD206-FITC流式抗体,4℃下避光作用30 min。洗涤后,重悬于200 μ L PBS中,上流式细胞仪进行检测分析。

1.5 RT-qPCR 法检测 STAT3、PD-L1、IL-10 和 TGF- β 基因的表达水平

采用 TRIzol 法提取各组细胞总 RNA, 并逆转录为 cDNA。RT-qPCR 反应采用 SYBR Green 法, 反应程序为: UDG 处理 (37 °C 2 min), 预变性 (95 °C 3 min), 循环扩增 (95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火/延伸 30~34 s, 40 个循环)。反应结束后进行熔解曲线分析, 由仪器自动程序完成, 以验证扩增特异性。引物序列如下: PD-L1 正向引物为 5'-AGCACACTGAGAATCAACACA-3', 反向引物为 5'-TGACCAATTCAGCTGTATGGTT-3'; STAT3 正向引物为 5'-CGGCGTCCAGTTCCTACTACTA-3', 反向引物为 5'-CGTCCCAGAGTCTTTGTC-3'; IL-10 正向引物为 5'-TGCCTTCAGCAGAGTGAAGA-3', 反向引物为 5'-GGTCTTGGTTCTCAGCTTGG-3'; TGF- β 正向引物为 5'-GGGACTATCCACCTGCAAGA-3', 反向引物为 5'-CCTCCTTGCGTAGTAGTCG-3'。以 GAPDH 为内参, 按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因 mRNA 的相对表达水平。

1.6 WB 法检测 HCT116 细胞中 p-STAT3、STAT3、PD-L1 蛋白的表达水平

选取各组细胞, 弃去 6 孔板上清液, PBS 清洗后使用加入 1% 蛋白酶抑制剂和 1% 磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 冰上裂解 15 min。收集裂解液, 超声破碎, BCA 法定量后金属浴变性。蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳分离、转膜、5% 脱脂奶粉封闭后, 加入稀释比例均为 1:1 000 的 p-STAT3、STAT3、PD-L1 和稀释比例 1:3 000 的 β -actin 一抗, 4 °C 培养过夜。次日, 在稀释比例 1:20 000 的山羊抗小鼠/抗兔二抗中处理 1 h 后, 采用 ECL 发光法显影, 使用 ImageJ 软件分

析蛋白质条带的灰度值。

1.7 免疫荧光法检测 HCT116 细胞中 PD-L1 表达水平

将 HCT116 细胞以 2×10^5 个/孔的密度接种于放置有圆形载玻片的 24 孔板中, 培养 24 h。PBS 清洗后, 更换为含 10% 血清的不同 CM。继续培养 48 h 后收集细胞爬片, PBS 清洗 3 次, 4% 多聚甲醛固定 15 min, 0.3% Triton 通透 15 min。在 2% BSA 中封闭 30 min 后 PBS 清洗, 滴加适量的一抗工作液, 4 °C 孵育过夜。弃去一抗, PBS 清洗 3 次 (5 min/次), 滴加荧光二抗工作液 (1:400), 37 °C 湿盒避光孵育 30 min。清洗后, DAPI 染核 5 min, 再次清洗后, 抗荧光淬灭剂封片。于荧光显微镜下观察并采集图像。

1.8 统计学处理

以上主要实验均独立重复 3 次。采用 GraphPad Prism 软件对实验数据进行分析并绘图。符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用非配对 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HCT116 细胞促使 M ϕ 向促癌表型极化

RT-qPCR 法检测 M0 和 M ϕ (HCT116) 细胞中 M2 型标志物 TGF- β 和 IL-10 mRNA 表达水平。结果 (图 1A) 显示, 与 M0 相比, M ϕ (HCT116) 细胞中 TGF- β 和 IL-10 mRNA 的表达水平均显著升高 (均 $P < 0.001$)。流式细胞术检测结果 (图 1B) 显示, M ϕ (HCT116) 细胞中的 CD11b⁺CD206⁺ 占比显著高于 M0 ($P < 0.01$)。结果表明, HCT116 细胞可通过分泌相关因子促使 M ϕ 向 M2 型极化。

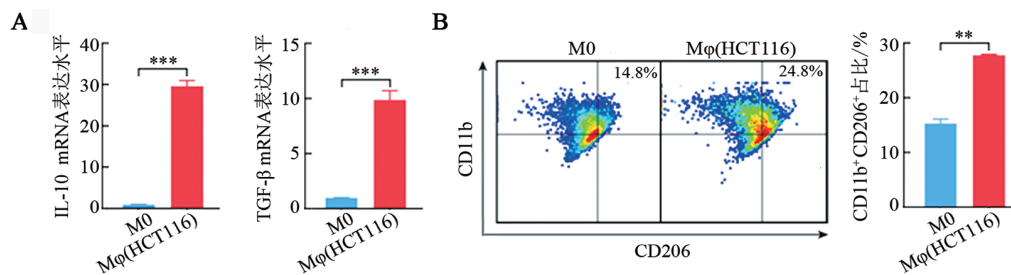


图 1 RT-qPCR 法检测 M0 和 M ϕ (HCT116) 细胞中 M2 型 M ϕ 标志物 IL-10 及 TGF- β mRNA 的相对表达量; B: 流式细胞术检测肿瘤细胞 CM 刺激后 M ϕ 的极化水平。* $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 1 HCT116 细胞促使 M ϕ 向促癌表型极化

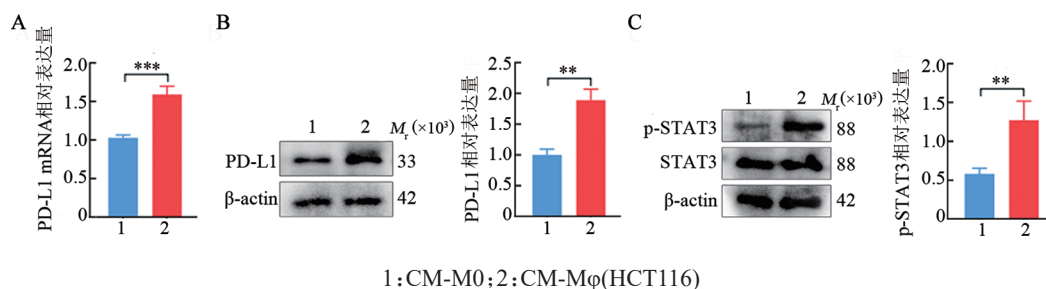
2.2 TAM 上调 HCT116 细胞的 PD-L1 水平

免疫逃逸是肿瘤的重要特征, PD-L1 在 CRC 的免疫逃逸中发挥重要作用。经不同的 M ϕ CM 培养 HCT116 细胞后, RT-qPCR 和 WB 法检测结果 (图 2A、B) 显示, 与 CM-M0 组比较, CM-M ϕ (HCT116) 组中 HCT116 细胞的 PD-L1 mRNA 和蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。进一步 WB 法检测结果 (图 2C) 发现, TAM 的 CM 显著促

进了 HCT116 细胞中 STAT3 磷酸化 ($P < 0.01$)。结果表明, TAM 可通过激活 STAT3 信号通路上调 HCT116 细胞 PD-L1 的表达。

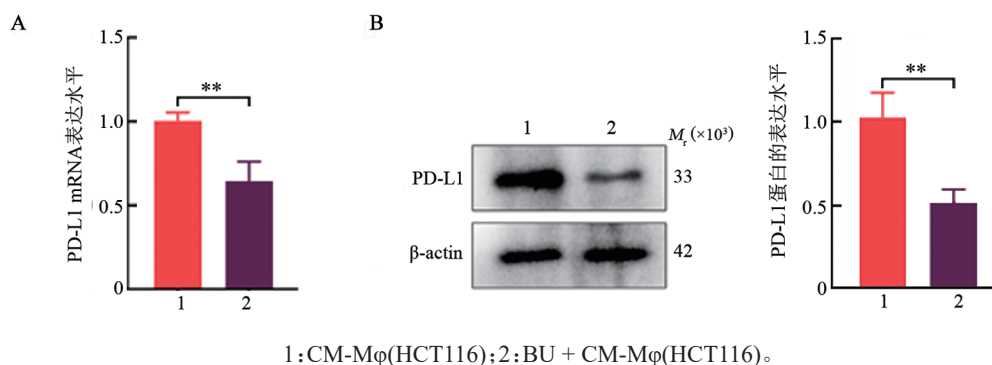
2.3 BU 抑制 TAM 介导的 HCT116 细胞 PD-L1 水平

RT-qPCR 和 WB 法的检测结果 (图 3A、B) 表明, 在 CM-M ϕ (HCT116) 中加入非杀伤浓度的 BU 后, PD-L1 的 mRNA 及蛋白表达均显著下降 (均 $P < 0.01$)。结果表明, BU 能够抑制 TAM 介导的 PD-L1 上调效应。



1: CM-M0; 2: CM-Mφ(HCT116)
A: RT-qPCR 法检测不同 CM 刺激后 HCT116 细胞中 PD-L1 mRNA 表达水平; B: WB 法检测不同 CM 对 HCT116 细胞中 PD-L1 蛋白表达的影响; C: WB 法检测不同 CM 对 HCT116 细胞中 STAT3 磷酸化水平的影响。* $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ 。

图2 TAM上调HCT116的PD-L1表达及STAT3磷酸化水平



1: CM-Mφ(HCT116); 2: BU + CM-Mφ(HCT116)。
A: RT-qPCR 法检测 BU 对 Mφ 介导的 HCT116 细胞 PD-L1 mRNA 表达水平的影响; B: WB 法检测 BU 对 Mφ 介导的 HCT116 细胞 PD-L1 蛋白表达的影响。* $P < 0.01$ 。

图3 BU抑制TAM介导的HCT116细胞PD-L1水平

2.4 BU 通过抑制 TAM 介导的 STAT3 磷酸化降低 HCT116 细胞 PD-L1 表达

RT-qPCR 及 WB 法检测结果(图 4A、B)证实,慢病毒转染可成功敲低 HCT116 细胞中 STAT3 表达水平($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。进一步 WB 法检测结果(图 4C)显示,STAT3 敲低可显著降低 PD-L1 蛋白表达水平($P < 0.05$);而 BU 处理可抑制 STAT3 磷酸化水平($P < 0.01$),同时降低 PD-L1 表达($P < 0.01$)。免疫荧光结果(图 4D)显示,STAT3 敲低或 BU 干预均能显著降低 PD-L1⁺细胞的数量($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。结果表明,BU 能够通过抑制 TAM 介导的 STAT3 磷酸化,从而降低 CRC 细胞的 PD-L1 表达水平。

3 讨论

CRC 是全球发病率和病死率均位居前列的恶性肿瘤。尽管近年来筛查技术和综合治疗手段不断进步,其总体生存率仍未得到显著改善。免疫治疗虽在多种肿瘤中展现出显著疗效,但多数 CRC 患者属于微卫星稳定型,对免疫治疗反应不佳^[11-12]。在众多影响免疫治疗应答的因素中,TME 中免疫细胞构成及功能状态尤为重要。其中,以 M2 型 TAM 大量富集为主要特征的免疫抑制性 TME 形成被证明是推动 CRC 恶性进展的重要驱动力^[13]。M2 型 TAM 能够分

泌 TGF-β、IL-10 等免疫抑制性因子,从而促进肿瘤进展和免疫逃逸^[14]。鉴于 TAM 在 TME 中的核心地位,深入解析其调控途径并探索可干预手段,将为改善 CRC 免疫治疗应答开辟重要方向。

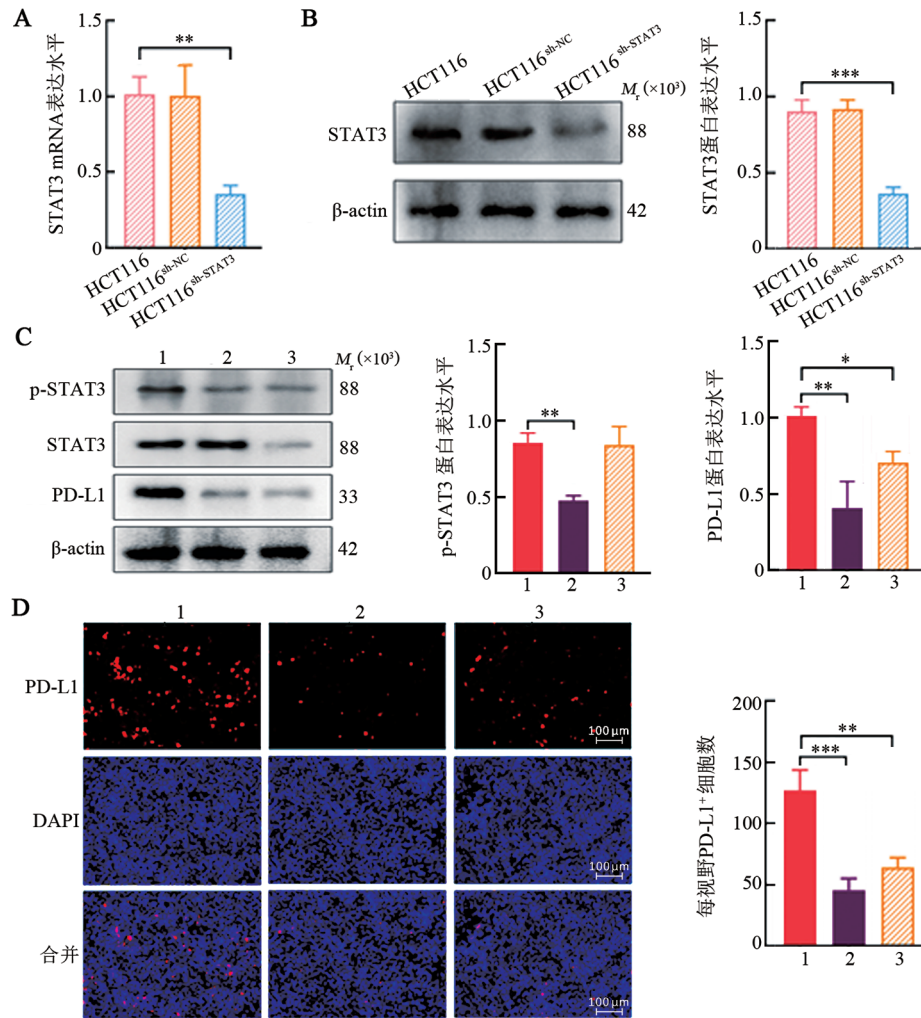
本研究首先通过 HCT116 细胞 CM 诱导 THP-1 来源的 M0 极化为 M2 型 TAM 样细胞,并验证了其极化表型和功能特征。CM(HCT116)可显著上调 CD206 阳性细胞比例,增强 TGF-β 与 IL-10 的表达。这一结果提示,CRC 细胞能够促进免疫抑制性微环境的建立。

作为免疫逃逸的重要机制之一,CRC 细胞能够高表达 PD-L1 等免疫抑制分子。PD-L1 的主要功能是通过与其受体 PD-1 结合,从而在 TME 中诱导细胞毒性 T 淋巴细胞的耗竭^[15-16]。以往的研究^[8,17]发现,TAM 的极化状态与肿瘤细胞 PD-L1 的表达水平存在一定关联。本研究发现,CRC 细胞诱导的 TAM,其 CM 能够显著上调 HCT116 细胞的 PD-L1 表达,提示 M2 型 TAM 能够直接调控 CRC 细胞的免疫表型。

研究^[18]证实,STAT3 信号通路与 PD-L1 在多种肿瘤中均存在密切的正向调控关系。STAT3 作为多种促炎与免疫抑制信号的整合枢纽,同时也调控 PD-L1 等免疫检查点分子的表达,因此其活化水平与免疫逃逸程度密切相关^[19]。激活型 STAT3 主要表现为 Tyr705 位点的

磷酸化。由于 M2 型 TAM 大量分泌 IL-10, 后者是 STAT3 相关信号通路最重要的激活因子之一, 推测 TAM 或可通过激活 CRC 细胞 STAT3 信号通路, 从而上调 PD-L1 表达水平。在常规的 TME 相关研究中, 肿瘤细胞对 M ϕ 的影响广受关注, 而 M ϕ 对肿瘤细胞本身的作用鲜少被

关注。为验证 TAM 对 CRC 细胞本身的影响, 本研究 WB 实验结果证实 CM-M ϕ (HCT116) 可显著上调 HCT116 细胞中 STAT3 的磷酸化水平, 提示 M2 型 TAM 可能通过 STAT3/PD-L1 轴调控 CRC 细胞 PD-L1 的表达。



1: CM-M ϕ (HCT116); 2: BU + CM-M ϕ (HCT116); 3: sh-STAT3 + CM-M ϕ (HCT116)。

A: RT-qPCR 验证 STAT3 敲低细胞的构建; B: WB 验证 STAT3 敲低细胞的构建; C: STAT3 敲低或 BU 对 TAM 介导的 HCT116 细胞 PD-L1 蛋白表达水平的改变; D: 免疫荧光结果检测不同处理后 HCT116 细胞 PD-L1 表达水平。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图4 BU通过抑制TAM介导的STAT3磷酸化降低HCT116细胞PD-L1表达

近年来, 中药成分对 TME, 尤其是 TAM 的调控作用正不断得到研究^[20-21]。BU 是中药蟾酥的主要活性单体, 其能通过多种机制发挥抗肿瘤作用, 同时还能调节 TME^[22]。BU 作为天然小分子化合物, 自身具有多种抗肿瘤特性, 在体内具有较好的药代动力学特征, 具有与免疫治疗等手段联合应用的潜力^[23]。课题组以往的研究^[24]发现, BU 无法直接改变 TAM 的极化, 但能够影响 CRC 细胞的相关信号通路, 间接调控 TAM 的极化。进一步研究^[25]发现, BU 能通过这一间接调节机制扭转 TME 中细胞毒性 T 淋巴细胞的耗竭。然而, BU 间接调控的 TAM 是否反向影响 CRC 细胞的免疫抑制特性, 尚待明

确。本实验发现, BU 处理能够显著逆转由 TAM 诱导的 HCT116 细胞 PD-L1 上调效应, 从而证实 BU 对 CRC 细胞与 TAM 之间相互作用的调控作用。

鉴于 HCT116 细胞诱导的 TAM 能够通过激活 STAT3 相关信号通路上调 PD-L1 的表达水平, 据此推测 TAM 所介导的 CRC 细胞 STAT3 磷酸化或可被 BU 干预所抑制, 从而进一步降低 PD-L1 表达水平。为验证这一推论, 本研究构建并验证了 STAT3 敲低的 HCT116 细胞系, 进一步实验结果证实, BU 抑制 TAM 介导的 STAT3 磷酸化与直接敲低 STAT3 效果一致, 均可下调 HCT116 细胞 PD-L1 表达。

上述结果表明, M2型极化的TAM能够通过激活CRC细胞的STAT3信号通路上调PD-L1表达水平。BU抑制TAM介导的STAT3磷酸化, 进而下调CRC细胞PD-L1表达。

综上所述, 本研究证实CRC细胞可诱导TAM向M2型表型极化, 进而通过激活STAT3信号通路上调PD-L1表达。中药单体BU能够重塑肿瘤免疫微环境并逆转这一过程, 从而间接增强抗肿瘤免疫反应。这一发现为BU在CRC免疫治疗中的联合应用提供了理论依据和实践方向。

利益冲突声明: 所有作者声明无利益冲突。

【参 考 文 献】

- [1] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74(3): 229-263. DOI:10.3322/caac.21834.
- [2] SHIN A E, GIANCOTTI F G, RUSTGI A K. Metastatic colorectal cancer: mechanisms and emerging therapeutics[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2023, 44(4): 222-236. DOI:10.1016/j.tips.2023.01.003.
- [3] BILOTTA M T, ANTIGNANI A, FITZGERALD D J. Managing the TME to improve the efficacy of cancer therapy[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 954992. DOI:10.3389/fimmu.2022.954992.
- [4] HOU S Y, ZHAO Y C, CHEN J J, et al. Tumor-associated macrophages in colorectal cancer metastasis: molecular insights and translational perspectives[J]. *J Transl Med*, 2024, 22(1): 62. DOI: 10.1186/s12967-024-04856-x.
- [5] SAEED A F. Tumor-associated macrophages: polarization, immunoregulation, and immunotherapy[J]. *Cells*, 2025, 14(10): 741. DOI:10.3390/cells14100741.
- [6] GOU Q, DONG C, XU H H, et al. PD-L1 degradation pathway and immunotherapy for cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(11): 955. DOI:10.1038/s41419-020-03140-2.
- [7] WEN Z W, SUN H Y, ZHANG Z H, et al. High baseline tumor burden-associated macrophages promote an immunosuppressive microenvironment and reduce the efficacy of immune checkpoint inhibitors through the IGFBP2-STAT3-PD-L1 pathway[J]. *Cancer Commun*, 2023, 43(5): 562-581. DOI:10.1002/cac2.12420.
- [8] LIU C, YAO Z Y, WANG J N, et al. Macrophage-derived CCL5 facilitates immune escape of colorectal cancer cells *via* the p65/STAT3-CSN5-PD-L1 pathway[J]. *Cell Death Differ*, 2020, 27(6): 1765-1781. DOI:10.1038/s41418-019-0460-0.
- [9] CHEN S Y, WANG M N, LU T Q, et al. JMJD6 in tumor-associated macrophage regulates macrophage polarization and cancer progression *via* STAT3/IL-10 axis[J]. *Oncogene*, 2023, 42(37): 2737-2750. DOI: 10.1038/s41388-023-02781-9.
- [10] ZHANG X M, LU X N, SHI J, et al. Bufalin suppresses hepatocellular carcinogenesis by targeting M2 macrophage-governed Wnt1/ β -catenin signaling[J]. *Phytomedicine*, 2024, 126: 155395. DOI:10.1016/j.phymed.2024.155395.
- [11] FAN A H, WANG B D, WANG X, et al. Immunotherapy in colorectal cancer: current achievements and future perspective[J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(14): 3837-3849. DOI:10.7150/ijbs.64077.
- [12] GUVEN D C, KAVGACI G, ERUL E, et al. The efficacy of immune checkpoint inhibitors in microsatellite stable colorectal cancer: a systematic review[J]. *Oncologist*, 2024, 29(5): e580-e600. DOI:10.1093/oncolo/oyae013.
- [13] ZHU X D, LIANG R P, LAN T Y, et al. Tumor-associated macrophage-specific CD155 contributes to M2-phenotype transition, immunosuppression, and tumor progression in colorectal cancer[J]. *J Immunother Cancer*, 2022, 10(9): e004219. DOI: 10.1136/jitc-2021-004219.
- [14] VITALE I, MANIC G, COUSSENS L M, et al. Macrophages and metabolism in the tumor microenvironment[J]. *Cell Metab*, 2019, 30(1): 36-50. DOI:10.1016/j.cmet.2019.06.001.
- [15] LIN K X, ISTL A C, QUAN D, et al. PD-1 and PD-L1 inhibitors in cold colorectal cancer: challenges and strategies[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2023, 72(12): 3875-3893. DOI: 10.1007/s00262-023-03520-5.
- [16] YI M, NIU M K, XU L P, et al. Regulation of PD-L1 expression in the tumor microenvironment[J]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1): 10. DOI:10.1186/s13045-020-01027-5.
- [17] PU Y Z, JI Q. Tumor-associated macrophages regulate PD-1/PD-L1 immunosuppression[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 874589. DOI: 10.3389/fimmu.2022.874589.
- [18] PENNEL K A F, HATTHAKARNKUL P, WOOD C S, et al. JAK/STAT3 represents a therapeutic target for colorectal cancer patients with stromal-rich tumors[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2024, 43(1): 64. DOI:10.1186/s13046-024-02958-4.
- [19] 张玉杰, 李佳慧, 司宇光. 杨梅素调节 JAK-STAT-IRF1 信号通路对鼻咽癌细胞免疫逃逸的影响[J]. *河北医药*, 2023, 45(24): 3717-3721. DOI:10.3969/j.issn.1002-7386.2023.24.007.
- [20] 谭东明, 谢奇, 丁旭, 等. 三七总皂苷通过 JAK2/STAT3 通路调控巨噬细胞极化抑制小鼠黑色素瘤 B16-F10 细胞的活力[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2024, 31(11): 1109-1115. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.11.008.
- [21] 张美华, 赵文隄, 李康, 等. 茯苓酸通过调控 AKT/MDM2/p53 通路影响结肠癌 HCT116 细胞的恶性生物学行为[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2024, 31(3): 247-252. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2024.03.006.
- [22] YU Z, LI Y Y, LI Y, et al. Bufalin stimulates antitumor immune response by driving tumor-infiltrating macrophage toward M1 phenotype in hepatocellular carcinoma[J]. *J Immunother Cancer*, 2022, 10(5): e004297. DOI:10.1136/jitc-2021-004297.
- [23] SOUMOY L, GHANEM G E, SAUSSEZ S, et al. Bufalin for an innovative therapeutic approach against cancer[J]. *Pharmacol Res*, 2022, 184: 106442. DOI:10.1016/j.phrs.2022.106442.
- [24] CHEN J B, WANG H J, JIA L 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. DOI:10.1016/j.canlet.2021.05.008.
- [25] LU C, SHANG J, XIE M L, et al. Bufalin inhibits immune escape in metastatic colorectal cancer by regulating M2 macrophage polarization[J]. *Apoptosis*, 2025, 30(5): 1467-1481. DOI: 10.1007/s10495-025-02107-y.

[收稿日期] 2025-07-21

[修回日期] 2026-02-24

[本文编辑] 党瑞山