

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2024.11.008

· 基础研究 ·

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

谭东明¹, 谢奇¹, 丁旭¹, 张艳军¹, 尹红英²(1. 江苏护理职业学院 中医药学院, 江苏 淮安 223003; 2. 淮安市第五人民医院暨扬州大学附属淮安医院 肿瘤科, 江苏 淮安 223300)

[摘要] **目的:** 探究三七总皂苷(PNS)通过 JAK2/STAT3 通路调控巨噬细胞极化对小鼠黑色素瘤 B16-F10 细胞的活力的影响。**方法:** 常规培养 B16-F10 细胞和巨噬细胞 RAW264.7, MTT 法检测不同浓度 PNS 对 RAW264.7 或 B16-F10 细胞存活率的影响。实验分为空白组(仅 B16-F10 细胞)、对照组(B16-F10 细胞与 RAW264.7 细胞共培养)、不同浓度(50、100、200 $\mu\text{g/mL}$) PNS 组(B16-F10 细胞与 RAW 264.7 细胞共培养)及 200 $\mu\text{g/mL}$ PNS + colivelin[(B16-F10 细胞与 RAW264.7 细胞共培养, 0.5 $\mu\text{mol/L}$ colivelin JAK2/STAT3 通路激活剂)]组, MTT 法、流式细胞术检测各组共培养细胞的存活率和凋亡率, 显微镜观察巨噬细胞形态变化; ELISA 实验检测上清液中相关细胞因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的水平, qPCR 法检测巨噬细胞极化相关基因诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、IL-12、CD206、精氨酸酶-1(Arg-1)mRNA 表达, WB 法检测细胞中 JAK2、STAT3 蛋白磷酸化水平。**结果:** 不同浓度 PNS 对单独培养的 RAW264.7、B16-F10 细胞的存活率均无明显影响(均 $P > 0.05$)。与对照组相比, PNS 呈浓度依赖性地促进共培养细胞凋亡、IL-6、TNF- α 、IL-1 β 蛋白和 IL-12、iNOS mRNA 表达水平均显著增加(均 $P < 0.05$), 降低共培养细胞的存活率、JAK2 与 STAT3 蛋白磷酸化水平(均 $P < 0.05$), PNS 对共培养细胞的作用部分被 colivelin 抑制。**结论:** PNS 通过抑制 JAK2/STAT3 通路促进 M1 巨噬细胞极化进而抑制小鼠黑色素瘤 B16-F10 细胞的活力。

[关键词] 三七总皂苷; 黑色素瘤; B16-F10 细胞; 巨噬细胞极化; JAK2/STAT3 通路

[中图分类号] R739.5; R730.52; R732.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024) 11-1109-07

Panax notoginseng saponins inhibit the viability of mouse melanoma B16-F10 cells by regulating macrophage polarization via JAK2/STAT3 pathway

TAN Dongming¹, XIE Qi¹, DING Xu¹, ZHANG Yanjun¹, YIN Hongying²(1. School of Traditional Chinese Medicine, Jiangsu College of Nursing, Huai'an 223003, Jiangsu, China; 2. Department of Oncology, the Fifth People's Hospital of Huai'an & Huai'an Hospital Affiliated to Yangzhou University, Huai'an 223300, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of total panax notoginseng saponin (PNS) on the survival of mouse melanoma B16-F10 cells by regulating macrophage polarization through JAK2/STAT3 pathway. **Methods:** B16-F10 cells and macrophage RAW264.7 were cultured regularly. The effects of different concentrations of PNS on the survival rate of RAW264.7 or B16-F10 cells were detected by MTT assay. The experiment was divided into the following groups: blank group (B16-F10 cells only), control group (B16-F10 cells co-cultured with RAW264.7 cells), PNS groups of various concentrations (B16-F10 cells co-cultured with RAW 264.7 cells, treated with 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ PNS), and PNS + colivelin [B16-F10 cells co-cultured with RAW264.7 cells, 200 $\mu\text{g/mL}$ PNS, 0.5 $\mu\text{mol/L}$ colivelin (JAK2/STAT3 pathway activator)] group. MTT assay and flow cytometry were applied to detect the survival rate and apoptosis rate of co-cultured cells in each group, and the morphological changes of macrophages were observed under a microscope. ELISA was applied to detect the levels of cytokines TNF- α , IL-6 and IL-1 β in the supernatant. qPCR was applied to detect the mRNA expression of macrophage polarization-related genes, inducible nitric oxide synthase (iNOS), IL-12, CD206, and arginase-1 (Arg-1). Western blotting was applied to detect the phosphorylation levels of JAK2 and STAT3 proteins pathway in cells. **Results:** PNS of different concentrations did not significantly affect the viability of RAW264.7 cells or B16-F10 cells cultured alone (all $P > 0.05$). Compared with the control group, PNS significantly promoted cell apoptosis, protein levels of IL-6, TNF- α , IL-1 β , and mRNA levels of IL-12 and iNOS in a concentration-dependent manner (all $P < 0.05$); additionally, PNS reduced the survival rate of co-cultured cells and the phosphorylation levels of JAK2 and STAT3 proteins (all $P < 0.05$). These effects of PNS on co-cultured cells were partially inhibited by

[基金项目] 江苏省卫生健康委医学科研指导性项目(No. 272)

[作者简介] 谭东明(1985—),男,硕士,副教授,主要从事肿瘤学基础研究。E-mail: tandongming8566@163.com

[通信作者] 尹红英, E-mail: jpgiwy@163.com

colivelin. **Conclusion:** PNS inhibits the viability of mouse melanoma B16-F10 cells by promoting the polarization of M1 macrophages via inhibiting JAK2/STAT3 pathway.

[Key words] panax notoginseng saponins (PNS); melanoma; B16-F10 cell; macrophage polarization; JAK2/STAT3 pathway

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(11): 1109-1115. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.11.008]

黑色素瘤是黑色素细胞恶性转化产生的一种罕见的异质性疾病,属于最致命的皮肤癌。原发性黑色素瘤可以通过手术成功切除,但肿瘤一旦扩散,患者5年存活率相对较低,因此需要寻找新的治疗药物以提高患者预后^[1-2]。巨噬细胞是固有免疫系统的组成部分,能分泌炎症细胞因子,如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6),从而清除细菌和病毒,在癌症中起着重要作用^[3]。三七是一种传统中药,在滋补品和许多中药复方制剂,尤其是心脑血管疾病治疗中应用广泛^[4]。三七总皂苷 (panax notoginseng saponin, PNS) 是三七的主要活性物质,可促进肿瘤细胞凋亡和抑制其转移等,并被证明可调节巨噬细胞分泌细胞因子而发挥免疫作用^[5-6]。STAT3 调节肿瘤发生发展中的重要基本生物学过程,包括细胞增殖、分化、血管生成和免疫功能系统, JAK2/STAT3 通路包括黑色素瘤在内的许多肿瘤中异常活跃,成为治疗黑色素瘤的关键机制^[7]。本研究将探究 PNS 通过 JAK2/STAT3 通路调控巨噬细胞极化对小鼠黑色素瘤细胞的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂和仪器

小鼠黑色素瘤细胞 B16-F10、巨噬细胞 RAW264.7 均购自上海生命科学研究院细胞资源中心。PNS (纯度 > 98.0%) 购自上海一飞生物科技有限公司, JAK2/STAT3 通路激活剂 (colivelin) 购自南京肽业生物科技有限公司, iScript cDNA 合成试剂盒购自 Bio-Rad 公司, TNF- α 酶联检测试剂盒购自苏美克生物技术有限公司, IL-6、IL-1 β 酶联检测试剂盒均购自酶联生物科技公司, 兔抗 JAK2、STAT3、p-JAK2、p-STAT3 一抗均购自 Abcam 公司, 细胞凋亡检测试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司。CKX53 倒置相差显微镜购自日本奥林巴斯公司, EpcH2 酶标仪购自美国 Biotek 公司, 5702 低速台式离心机购自德国艾本德有限公司。

1.2 细胞培养、处理与分组和观察

B16-F10 细胞和 RAW264.7 在含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养基中, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中进行常规培养。将对数生长期的 B16-F10 细胞和 RAW 264.7 细胞经胰蛋白酶消化后接种于 6 孔板中, 分为空白组 (仅有 B16-F10 细胞)、对照组 (RAW 264.7 细胞与 B16-F10 细胞共培

养)、不同质量浓度 (50、100、200 μ g/mL) PNS 组 (RAW264.7 细胞与 B16-F10 细胞共培养), 以及 200 μ g/mL PNS + 0.5 μ mol/L colivelin^[8] 组 (RAW 264.7 细胞与 B16-F10 细胞共培养), 处理 24 h 后在光学显微镜下观察各组细胞的形态变化并拍照, 最后进行后续实验。

1.3 MTT 法检测不同剂量 PNS 对 RAW264.7 和 B16-F10 细胞存活率的影响

将对数生长期的 B16-F10 细胞和 RAW264.7 细胞接种于 96 孔板 (5×10^3 个/孔) 中, 然后用不同剂量 (50、100、200 μ g/mL) PNS 处理细胞 24 h^[9]。每个孔中加入 100 μ L MTT (500 μ g/mL) 溶液, 在 37 °C 下继续培养 4 h。弃去上清液, 每个孔中加入 150 μ L DMSO 溶液。用酶标仪检测 450 nm 处的光密度 (D) 值, 按公式“(实验组 D 值 - 空白组 D 值) / (对照组 D 值 - 空白组 D 值) \times 100%”计算细胞存活率。

1.4 流式细胞术检测各组 RAW264.7 和 B16-F10 细胞的凋亡水平

收集按 1.2 节中方法处理的各组细胞, 将各组细胞悬浮于 400 μ L 结合缓冲液中, 加入 5 μ L Annexin V 和 5 μ L PI, 混匀后在 37 °C 下避光处理 30 min, 用流式细胞仪检测细胞凋亡情况并计算细胞凋亡率。

1.5 ELISA 实验检测各组细胞上清液中相关细胞因子的水平

收集按 1.2 节中方法处理的各组细胞的上清液, 按照试剂盒操作指南检测各组细胞上清液中 IL-6、TNF- α 及 IL-1 β 的水平。

1.6 qPCR 法检测各组 RAW264.7 细胞中极化相关基因 mRNA 的表达

使用 TRIzol 试剂提取各组细胞的总 RNA, 用 iScript cDNA 合成试剂盒将其逆转录为 cDNA 后在 Mx 3000P 实时定量 PCR 系统进行 PCR 反应。PCR 反应参数: 95 °C 5 min, 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 40 个循环。以 β -actin 为内参基因, 用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法计算各目的基因 mRNA 的相对表达水平。诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 的正向引物: 5'-GTTCTCAGCCCAACAATACAAGA-3', 反向引物: 5'-GTGGACGGGTCGATGTCAC-3'; IL-12 的正向引物: 5'-AGTGACATGTGGAATGGCGT-3', 反向引物: 5'-CAGTTCAATGGGCAGGGTCT-3'; CD206 正向引物: 5'-CCTATGAAAATTGGGCTTACGG-3', 反向引物: 5'-CTGACAAATCCA

GTTGTTGAGG-3'; 精氨酸酶-1 (arginase-1, Arg-1) 正向引物: 5'-TATCTTGCTTTTCAGCCACGGGC-3', 反向引物: 5'-GTCACAACCGGTAGGAT-3', β -Actin 正向引物: 5'-AAGCAGCCATTCCTAAGCTTCTT-3', 反向引物: 5'-GGCGTTCGGGAATCGCACGGATT-3'。

1.7 WB 法检测各组细胞中 JAK2/STAT3 通路相关蛋白的表达水平

收集各组细胞, 用预冷的 RIPA 裂解缓冲液提取各组细胞中的总蛋白并测定其纯度和浓度。将各组蛋白变性后进行 PAGE 分离、转膜和封闭后, 在膜上滴加抗 JAK2、STAT3、p-JAK2、p-STAT3 一抗 (均以 1:1 000 稀释), 4 °C 下处理过夜。次日, 加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (1:5 000 稀释) 室温下处理 1 h, 最后通过增强化学发光法对印迹进行可

视化, 用 Image J 软件定量分析。

1.8 统计学处理

所有实验均独立重复 3 次。采用 SPSS 26.0 软件对实验数据进行统计分析。符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 并进一步行 SNK-*q* 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同剂量 PNS 对 RAW264.7 和 B16-F10 细胞的存活率均无明显影响

MTT 法检测结果 (图 1) 显示, 不同质量浓度 PNS 对 RAW264.7 和 B16-F10 细胞的存活率均无明显影响 (图 1, 均 $P > 0.05$)。

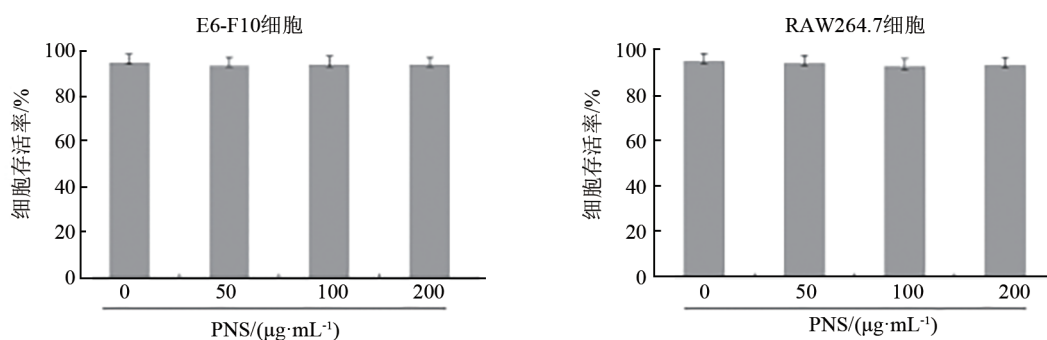


图1 不同质量浓度 PNS 对 RAW264.7、B16-F10 细胞的存活率影响

2.2 PNS 处理明显抑制共培养细胞的活力而 colivelin 可部分逆转这种作用

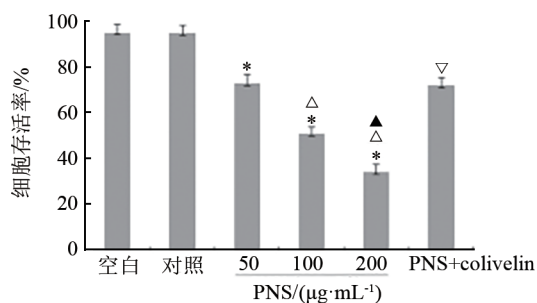
MTT 法检测结果 (图 2) 显示, 与空白组、对照组相比, 不同质量浓度 (50、100、200 μg/mL) PNS 处理的共培养细胞的存活率均明显下降 (均 $P < 0.05$), 且呈剂量依赖性 ($P < 0.05$); 与 200 μg/mL PNS 组相比, 200 μg/mL PNS + colivelin 组共培养细胞的存活率显著增加 ($P < 0.05$)。实验结果说明, PNS 可呈剂量依赖性地抑制共培养细胞的增殖活性, 这种抑制作用可被 colivelin 部分逆转。

2.3 PNS 可促进共培养细胞的凋亡而 colivelin 可部分逆转这种作用

流式细胞术检测结果 (图 3) 显示, 与空白组、对照组相比, 不同质量浓度 PNS 组共培养细胞凋亡率均显著增加 (均 $P < 0.05$), 且呈现出剂量依赖性; 与 200 μg/mL PNS 组相比, 200 μg/mL PNS + colivelin 组共培养细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$)。实验结果说明, PNS 可促进共培养细胞的凋亡, 而 colivelin 则可部分逆转这种作用。

2.4 PNS 可明显刺激 RAW264.7 细胞使其形态发生变化但可被 colivelin 部分抑制

光学显微镜观察结果 (图 4) 显示, 与对照组比较, PNS 处理各组 RAW264.7 细胞出现胞体变大, 伸出伪足, 其中以 200 μg/mL PNS 处理的细胞最为显著, 但加入 colivelin 联合处理后, 细胞形态与 50 μg/mL PNS 处理类似。实验结果说明, colivelin 可部分抑制 PNS 引起的 RAW264.7 细胞形态学改变。



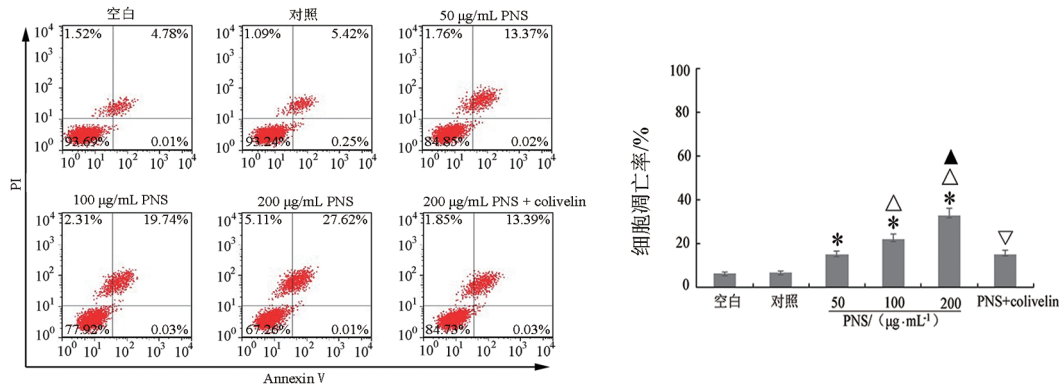
与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 50 μg/mL PNS 组比较, Δ $P < 0.05$; 与 100 μg/mL PNS 组比较, ▲ $P < 0.05$; 与 200 μg/mL PNS 组比较, ▽ $P < 0.05$ 。

图2 PNS 对共培养 RAW264.7、B16-F10 细胞存活率的影响

2.5 PNS 可提高 RAW264.7 细胞中 IL-12 和 iNOS mRNA 表达而 colivelin 则可部分抑制这种作用

qPCR 法检测结果(图 5)显示,与对照组相比,不同质量浓度 PNS 组 RAW264.7 细胞中 IL-12、iNOS mRNA 的表达水平均显著增加(均 $P < 0.05$),且呈现剂量依赖性,Arg-1、CD206 mRNA 表达均无明显变化(均 $P > 0.05$);与 200 $\mu\text{g/mL}$ PNS 组相比,

200 $\mu\text{g/mL}$ PNS + colivelin 组 RAW264.7 细胞中 IL-12、iNOS mRNA 的表达水平均显著降低(均 $P < 0.05$),Arg-1、CD206 mRNA 的表达水平均无明显变化($P > 0.05$)。实验结果说明,PNS 处理可明显提高 RAW264.7 细胞中 IL-2 和 iNOS mRNA 的表达,而 colivelin 可部分抑制 PNS 的作用。



与对照组比较,* $P < 0.05$;与 50 $\mu\text{g/mL}$ PNS 组比较, $\Delta P < 0.05$;与 100 $\mu\text{g/mL}$ PNS 组比较, $\Delta P < 0.05$;与 200 $\mu\text{g/mL}$ PNS 组比较, $\nabla P < 0.05$ 。

图 3 PNS 对共培养 RAW264.7、B16-F10 细胞凋亡的影响

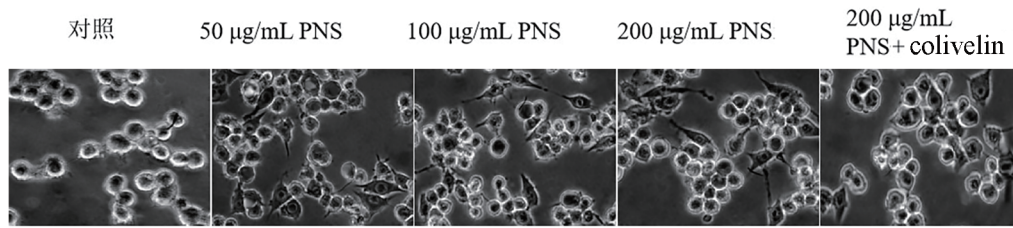
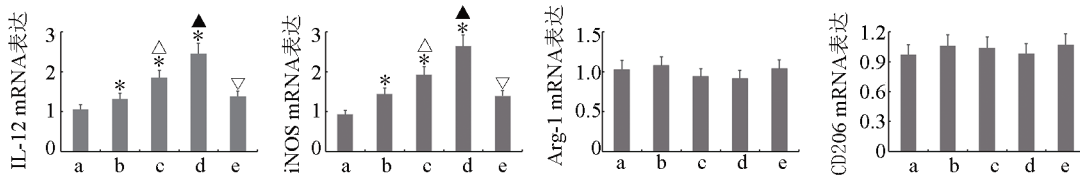


图 4 PNS 处理对 RAW264.7 细胞形态的影响($\times 400$)



a: 对照组;b: 50 $\mu\text{g/mL}$ PNS 组;c: 100 $\mu\text{g/mL}$ PNS 组;d: 200 $\mu\text{g/mL}$ PNS 组;e: 200 $\mu\text{g/mL}$ PNS + colivelin 组。与对照组比较,* $P < 0.05$;与 50 $\mu\text{g/mL}$ PNS 组比较, $\Delta P < 0.05$;与 100 $\mu\text{g/mL}$ PNS 组比较, $\Delta P < 0.05$;与 200 $\mu\text{g/mL}$ PNS 组比较, $\nabla P < 0.05$ 。

图 5 qPCR 法检测各组 RAW264.7 细胞中 IL-12、iNOS、Arg-1、CD206 mRNA 的表达

2.6 PNS 可明显促进 RAW264.7 细胞分泌 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 蛋白而 colivelin 可部分逆转这种作用

ELISA 法检测结果(图 6)显示,与对照组相比,不同质量浓度 PNS 组 RAW264.7 细胞培养上清液中 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 蛋白水平均显著增加(均 $P < 0.05$),且呈现剂量依赖性;与 200 $\mu\text{g/mL}$ PNS

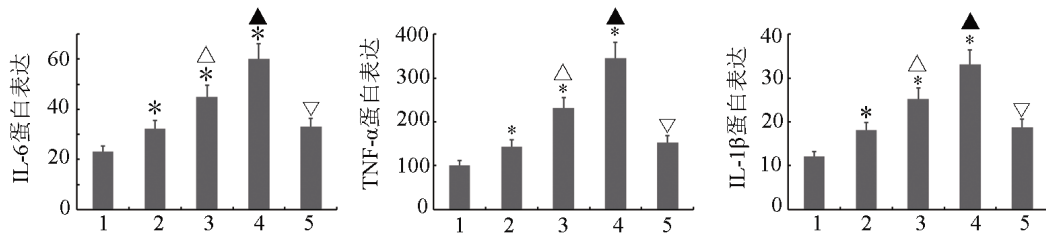
组相比,200 $\mu\text{g/mL}$ PNS + colivelin 组 RAW264.7 细胞上清液中 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 蛋白水平均显著降低(均 $P < 0.05$)。实验结果说明,PNS 可明显促进 RAW264.7 细胞分泌 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 蛋白,而 colivelin 可部分抑制 PNS 的作用。

2.7 PNS 可明显降低 RAW264.7 细胞中 JAK2/

STAT3 通路磷酸化水平而 colivelin 可部分抑制这种作用

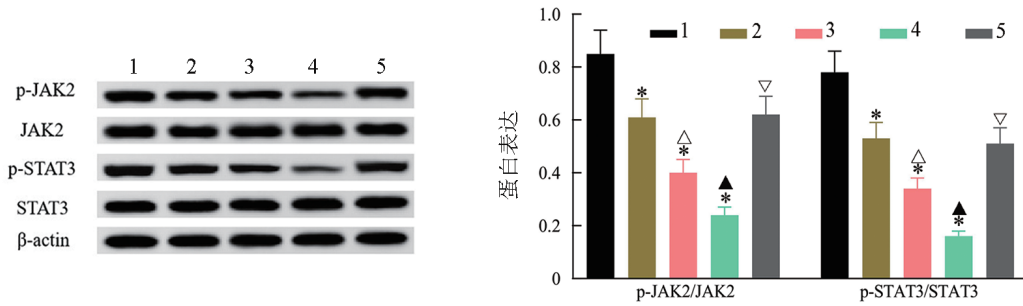
WB 法检测结果(图7)显示,与对照组相比,不同剂量 PNS 组 RAW264.7 细胞中 p-JAK2、p-STAT3 表达水平均显著降低(均 $P < 0.05$),且呈现出剂量

依赖性特征;与 200 $\mu\text{g/mL}$ PNS 组相比,200 $\mu\text{g/mL}$ PNS + colivelin 组 RAW264.7 细胞中 p-JAK2、p-STAT3 表达水平均显著升高(均 $P < 0.05$)。实验结果说明, PNS 可明显降低 RAW264.7 细胞中 JAK2、STAT3 蛋白的磷酸化水平而 colivelin 可部分抑制这种作用。



1: 对照组; 2: 50 $\mu\text{g/mL}$ PNS 组; 3: 100 $\mu\text{g/mL}$ PNS 组; 4: 200 $\mu\text{g/mL}$ PNS 组; 5: 200 $\mu\text{g/mL}$ PNS + colivelin 组。与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 50 $\mu\text{g/mL}$ PNS 组比较, $\Delta P < 0.05$; 与 100 $\mu\text{g/mL}$ PNS 组比较, $\blacktriangle P < 0.05$; 与 200 $\mu\text{g/mL}$ PNS 组比较, $\nabla P < 0.05$ 。

图6 ELISA 法检测各组 RAW264.7 细胞培养上清液中 IL-6、TNF- α 以及 IL-1 β 蛋白水平



1: 对照组; 2: 50 $\mu\text{g/mL}$ PNS 组; 3: 100 $\mu\text{g/mL}$ PNS 组; 4: 200 $\mu\text{g/mL}$ PNS 组; 5: 200 $\mu\text{g/mL}$ PNS + colivelin 组。与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 50 $\mu\text{g/mL}$ PNS 组比较, $\Delta P < 0.05$; 与 100 $\mu\text{g/mL}$ PNS 组比较, $\blacktriangle P < 0.05$; 与 200 $\mu\text{g/mL}$ PNS 组比较, $\nabla P < 0.05$ 。

图7 WB 法检测各组 RAW264.7 细胞中 JAK2/STAT3 通路的磷酸化水平

3 讨论

黑色素瘤是最致命的皮肤癌,表现为黑色素细胞的恶性转化,其发病率在世界范围内不断上升,尽管大多数病例在早期被发现,但即使是早期恶性黑色素瘤也可能转移^[10]。肿瘤疫苗的介入在一定程度上改善了黑色素瘤的治疗效果,但由于成本较高、制备时间较长等^[11],使其应用受限,因此开发更经济有效的方案对治疗黑色素瘤至关重要。

在各种传统中药中, PNS 因其效果显著而成为治疗心脑血管疾病最常用的药物之一。此外,其在肿瘤治疗中的应用也逐渐受到人们的关注^[12-13]。据报道^[14], PNS 具有多靶点抗肿瘤活性,可通过诱导肿瘤细胞凋亡和分化、提高机体免疫能力,抑制癌细胞生长等,在宫颈癌、胃癌、神经胶质瘤及白血病中发挥抑制作用。黑色素瘤作为典型的免疫原性肿瘤,免疫细胞浸润和预后之间的相关性取决于肿瘤微环境中募集的免疫细胞的存在和性质,而肿瘤相关巨噬细胞在肿瘤微环境中发挥着重要作用,且在许多实

体瘤存在(包括黑色素瘤),与肿瘤免疫逃逸、生长和转移、血管生成息息相关^[15]。研究^[16]表明,巨噬细胞在不同环境因素的刺激下可以极化成 M1 免疫激活型和 M2 免疫抑制表型,其中 IL-12、iNOS 是 M1 型巨噬细胞的特征性表面分子,而 CD206、Arg-1 是 M2 型巨噬细胞的表面标志物。在动脉粥样硬化研究中, PNS 可通过调控巨噬细胞极化抑制炎症反应,减轻动脉粥样硬化斑块的形成进而发挥抗动脉粥样硬化作用^[17]。本研究发现, PNS 对巨噬细胞、B16-F10 细胞活力无显著影响,但可显著抑制与 RAW264.7 细胞共培养的 B16-F10 细胞存活,诱导其凋亡,提示 PNS 可能通过调控巨噬细胞促进黑色素瘤细胞凋亡并抑制其活性。本研究通过显微镜观察巨噬细胞形态,结果发现, PNS 处理后,细胞胞体增大并有伪足出现,提示巨噬细胞呈现 M1 表型;同时经过对 M1 型巨噬细胞相关分子 IL-12、iNOS 及 M2 型巨噬细胞相关分子 CD206、Arg-1 进行检测,结果发现, CD206、Arg-1 表达无显著变化, IL-12、iNOS 表达显著上调,进一步表明 PNS 可能通过调控巨噬细胞向 M1 型极化进而抑

制黑色素瘤细胞活力。研究^[18]发现, M1型巨噬细胞产生促炎细胞因子IL-6、TNF- α 及IL-1 β , 参与炎症反应并抑制癌症进展和转移。与RAW264.7细胞共培养的B16-F10细胞经PNS处理后, IL-6、TNF- α 及IL-1 β 水平显著增加, 表明PNS可促进巨噬细胞向M1型极化, 产生分泌因子进而杀伤肿瘤细胞, 抑制其活性。

JAK2是细胞因子受体信号转导的关键, JAK2可使STAT3激酶磷酸化, STAT3是人类癌症中最常见的癌基因之一, 在多种癌症中JAK2/STAT3信号通路异常表达, 其过度激活导致信号通路紊乱, 破坏下游基因, 从而导致肿瘤发生发展^[19]。肿瘤发展又与巨噬细胞极化有关, STAT3通路激活诱导巨噬细胞极化, 从而加重肿瘤发生发展^[20]。抑制JAK2/STAT3通路可以抑制M2型巨噬细胞的极化, 促进M1型巨噬细胞的极化并减缓癌症的进展^[21]。本研究发现, 不同质量浓度PNS处理后, RAW264.7细胞中p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3表达显著下调, 细胞向M1极化, 炎性分泌因子增加, 促进肿瘤细胞凋亡, 抑制其增殖, 提示PNS可通过抑制JAK2/STAT3通路促进RAW264.7细胞向M1极化, 进而抑制黑色素瘤细胞存活。最后, 实验以JAK2/STAT3通路激活剂colivelin进行反向验证, 结果发现colivelin逆转了PNS对黑色素瘤细胞的抑制作用, 表明PNS抑制小鼠黑色素瘤细胞恶性发展, 可能与抑制JAK2/STAT3通路进而促进M1型巨噬细胞极化有关。

综上所述, PNS通过抑制JAK2/STAT3通路促进M1型巨噬细胞极化进而抑制小鼠黑色素瘤细胞恶性发展, 但PNS作用靶点较多, 后续该机制仍需继续验证。

[参考文献]

- [1] SHAO H S, TERAMAE D, WELLS A. Axl contributes to efficient migration and invasion of melanoma cells[J/OL]. *PLoS One*, 2023, 18(3): e0283749[2024-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10057740/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0283749.
- [2] GIUNTINI G, COPPOLA F, FALSINI A, *et al.* Role of the hedgehog pathway and CA VII in controlling melanoma cell migration and invasion in hypoxia[J/OL]. *Cancers*, 2022, 14(19): 4776[2024-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9563772/>. DOI: 10.3390/cancers14194776.
- [3] PERRY C J, MUÑOZ-ROJAS A R, MEETH K M, *et al.* Myeloid-targeted immunotherapies act in synergy to induce inflammation and antitumor immunity[J]. *J Exp Med*, 2018, 215(3): 877-893. DOI: 10.1084/jem.20171435.
- [4] WU L F, SONG H Q, ZHANG C, *et al.* Efficacy and safety of *Panax notoginseng* saponins in the treatment of adults with ischemic stroke in China: a randomized clinical trial[J/OL]. *JAMA Netw Open*, 2023, 6(6): e2317574[2024-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10282883/>. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2023.17574.
- [5] HAWTHORNE B, LUND K, FREGGIARO S, *et al.* The mechanism of the cytotoxic effect of *Panax notoginseng* extracts on prostate cancer cells[J/OL]. *Biomedicine Pharmacother*, 2022, 149: 112887[2024-08-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35367754/>. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.112887.
- [6] 狄显希, 包宇杰, 刘杨添一, 等. 三七总皂苷对巨噬细胞M1极化的影响及机制初探[J]. *中国药理学杂志*, 2023, 58(7): 576-583. DOI: 10.11669/cpj.2023.07.004.
- [7] SINGHAL S S, MOHANTY A, KULKARNI P, *et al.* RLIP depletion induces apoptosis associated with inhibition of JAK2/STAT3 signaling in melanoma cells[J]. *Carcinogenesis*, 2021, 42(5): 742-752. DOI: 10.1093/carcin/bgab016.
- [8] 丁勇平, 缪华媛, 郭小红, 等. 鸦胆子油乳注射液可能通过调节JAK2/STAT3信号通路抑制胰腺癌AsPC-1细胞上皮-间质转化[J]. *中国细胞生物学学报*, 2023, 45(9): 1302-1311. DOI: 10.11844/cjcb.2023.09.0002.
- [9] 冯彬彬, 毛勇坡, 牛小花, 等. 三七总皂苷调控巨噬细胞对乳腺癌细胞MDA-MB-231侵袭迁移影响[J]. *中国医院药学杂志*, 2022, 42(22): 2325-2330. DOI: 10.13286/j.1001-5213.2022.22.03.
- [10] REBECCA V W, SOMASUNDARAM R, HERLYN M. Pre-clinical modeling of cutaneous melanoma[J/OL]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 2858[2024-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7275051/>. DOI: 10.1038/s41467-020-15546-9.
- [11] 潘宇晨, 李京蔓, 李丹, 等. 鹿血晶增强巨噬细胞抗黑色素瘤作用及其机制研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36(8): 939-943. DOI: 10.3969/j.issn.1000-484X.2020.08.009.
- [12] LIU T S, WANG Y, ZHANG M F, *et al.* The optimization design of macrophage membrane camouflaging liposomes for alleviating ischemic stroke injury through intranasal delivery[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(5): 2927[2024-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10931763/>. DOI: 10.3390/ijms25052927.
- [13] LI Q Q, ZHANG Y S, YANG Y F, *et al.* *Panax notoginseng* saponins reduces the cisplatin-induced acute renal injury by increasing HIF-1 α /BNIP3 to inhibit mitochondrial apoptosis pathway[J/OL]. *Biomedicine Pharmacother*, 2021, 142: 111965[2024-08-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34385105/>. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111965.
- [14] 公为亮, 庄海涛. 三七总皂苷抗肿瘤作用的研究进展[J]. *药学研究*, 2022, 41(3): 183-186. DOI: 10.13506/j.cnki.jpr.2022.03.011.
- [15] ADAMS R, OSBORN G, MUKHIA B, *et al.* Influencing tumor-associated macrophages in malignant melanoma with monoclonal antibodies[J/OL]. *Oncoimmunology*, 2022, 11(1): 2127284[2024-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9543025/>. DOI: 10.1080/2162402X.2022.2127284.
- [16] 张云超, 马金昀, 程晓东. 红花多糖诱导巨噬细胞M1型极化及抑制黑色素瘤细胞侵袭迁移的实验研究[J]. *免疫学杂志*, 2021, 37(5): 380-389. DOI: 10.13431/j.cnki.immunol.j.20210053.
- [17] 魏玥, 付长庚, 李洪峥, 等. 三七总皂苷对动脉粥样硬化小鼠M1型、M2型巨噬细胞极化的影响[J]. *环球中医药*, 2023, 16(11): 2171-2178. DOI: 10.3969/j.issn.1674-1749.2023.11.003.
- [18] AZUMI J, TAKEDA T, SHIMADA Y, *et al.* Organogermanium THGP induces differentiation into M1 macrophages and suppresses the proliferation of melanoma cells via phagocytosis[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(3): 1885[2024-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10931763/>. DOI: 10.3390/ijms25052927.

- gov/pmc/articles/PMC9915250/. DOI: 10.3390/ijms24031885.
- [19] WANG P P, TAO L Q, YU Y D, *et al.* Oral squamous cell carcinoma cell-derived GM-CSF regulates PD-L1 expression in tumor-associated macrophages through the JAK2/STAT3 signaling pathway[J/OL]. *Am J Cancer Res*, 2023, 13(2): 589-601[2024-08-10]. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9989602/>.
- [20] MU G G, ZHU Y J, DONG Z H, *et al.* Calmodulin 2 facilitates angiogenesis and metastasis of gastric cancer *via* STAT3/HIF-1A/VEGF-A mediated macrophage polarization[J/OL]. *Front Oncol*, 2021, 11: 727306[2024-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8479158/>. DOI: 10.3389/fonc.2021.727306.
- [21] 董晶, 张远, 徐振华, 等. 散结片联合立体定向放射治疗对肝癌大鼠肿瘤组织中 PKM2/STAT3 通路及巨噬细胞极化的影响[J]. *中西医结合肝病杂志*, 2023, 33(12): 1092-1096. DOI: 10.3969/j.issn.1005-0264.2023.012.009.
- [收稿日期] 2024-08-20 [修回日期] 2024-10-17
- [本文编辑] 向正华