

本文引文格式:王安民,念家辉,方全,等. IL-6介导 M2 型巨噬细胞促进肝癌 HepG2 细胞上皮间充质样改变[J]. 右江民族医学院学报, 2022, 44(3): 320-324.

【论著与临床报道】

## IL-6 介导 M2 型巨噬细胞促进肝癌 HepG2 细胞上皮间充质样改变

王安民<sup>1</sup>, 念家辉<sup>1</sup>, 方全<sup>1</sup>, 杨猛<sup>1</sup>, 黄佑冠<sup>1</sup>, 韦卿<sup>1</sup>, 浦涧<sup>2</sup>

(1. 右江民族医学院研究生学院, 广西 百色 533000;

2. 右江民族医学院附属医院, 广西 百色 533000)

**摘要:**目的 探索 M2 型巨噬细胞及其分泌因子白介素 6(IL-6)对 HepG2 肝癌细胞上皮间充质样改变的影响。方法 取人肝癌细胞株 HepG2 及由 THP-1 培养诱导成熟的 M2 型巨噬细胞、IL-6 抑制剂 Corylifol A 进行实验。实验分两部分进行,第一部分设实验组(HepG2 细胞株与 M2 型巨噬细胞共培组)及空白对照组(HepG2 无特殊处理组);第二部分用 HepG2 细胞株与 M2 型巨噬细胞共培,设实验组及对照组,分别加入 Corylifol A、无义溶剂。Western blot 检测两组人肝癌细胞上皮间充质样表型转变指标 E-钙黏蛋白(E-Cadherin)、N-钙黏蛋白(N-Cadherin)的蛋白表达水平。ELISA 测定两组上清液 IL-6 表达水平。结果 第一部分实验,与对照组相比,实验组 E-Cadherin 的 mRNA 表达及蛋白表达下降, M2 型巨噬细胞可以抑制 HepG2 的 E-Cadherin 表达;与对照组相比,实验组 N-Cadherin 的 mRNA 及蛋白表达升高, M2 型巨噬细胞可以促进 HepG2 的 N-Cadherin 表达。第二部分,与对照组相比,实验组 E-Cadherin 的蛋白表达升高, N-Cadherin 的蛋白表达下降, M2 型巨噬细胞分泌的 IL-6 抑制 HepG2 的 E-Cadherin 表达及促进 N-Cadherin 表达作用可被 IL-6 抑制剂抑制。结论 IL-6 介导 M2 型巨噬细胞促进肝癌 HepG2 细胞上皮间充质样改变。

**关键词:**巨噬细胞;白介素 6;肝肿瘤;上皮间充质转化

中图分类号:R735.7

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2022)03-0320-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2022.03.003

### IL-6 mediated M2 macrophages promote epithelial mesenchymal changes in HepG2 hepatoma cells

Wang Anmin<sup>1</sup>, Nian Jiahui<sup>1</sup>, Fang Quan<sup>1</sup>, Yang Meng<sup>1</sup>,

Huang Youguan<sup>1</sup>, Wei Qin<sup>1</sup>, Pu Jian<sup>2</sup>

(1. Graduate School, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000,

Guangxi, China; 2. The Affiliated Hospital of Youjiang Medical University

for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the effects of M2 macrophages and their secretory factor interleukin-6 (IL-6) on epithelial mesenchymal changes in HepG2 hepatoma cells. **Methods** This study selected human hepatoma cell line HepG2, mature M2 macrophages induced by THP-1 culture and IL-6 inhibitor Corylifol A for the experiment. The experiment was divided into two parts. In the first part, the experiment group (HepG2 cell line and M2 macrophage co-culture group) and the control group (HepG2 without special treatment group) were set up. In the second part, HepG2 cell line was co-cultured with M2 macrophages, and the experiment group and the control group were added with Corylifol A and nonsense solvent respectively. The protein expression levels of E-Cadherin and N-Cadherin, indicators of epithelial mesenchymal phenotypic trans-

基金项目:广西自然科学基金项目(2019JJA140069)

第一作者简介:王安民(1994-),男,在读硕士研究生,研究方向:肝胆基础疾病与临床研究, E-mail:741696195@qq.com

通讯作者简介:浦涧(1966-),男,医学硕士,教授,硕士研究生导师,研究方向:肝脏肿瘤基础与临床研究, E-mail:pujianym@

formation, were detected by Western blot, and the expression level of IL-6 in supernatant of the two groups was determined by ELISA. **Results** In the first part of the experiment, compared with those of the control group, the mRNA and protein expression of E-Cadherin in the experiment group decreased. M2 macrophages could inhibit the expression of E-Cadherin in HepG2; compared with those of the control group, the mRNA and protein expression of N-Cadherin in the experiment group increased. M2 macrophages could promote the expression of N-Cadherin in HepG2. In the second part, compared with those of the control group, the protein expression of E-Cadherin increased and the protein expression of N-Cadherin decreased in the experiment group. IL-6 secreted by M2 macrophages could inhibit E-Cadherin expression and promote N-Cadherin expression in HepG2, which can be inhibited by IL-6 inhibitors. **Conclusion** IL-6 mediates M2 macrophages to promote epithelial mesenchymal changes of HepG2 hepatoma cells.

**Key words:** macrophages; interleukin-6; hepatoma; epithelial mesenchymal transformation

原发性肝癌(primary hepatic carcinoma, HCC)是我国最常见的恶性肿瘤之一,病死率极高,在癌症死亡率排行中位列第二<sup>[1]</sup>。由于大量患者初诊时已经是晚期,错过了手术的最佳时间,且术后肿瘤复发转移率高,目前化疗是中晚期肝癌患者最主要的治疗手段。介于肿瘤微环境的存在,化疗及靶向治疗对于肝癌细胞的抑制仍然存在很大的限制。

肿瘤微环境是由成纤维细胞、免疫细胞、细胞外基质、内皮细胞、细胞因子及趋化因子等组成<sup>[2]</sup>。巨噬细胞是肿瘤微环境中最主要的免疫细胞群,而在实体瘤中巨噬细胞占的细胞比例更是高达 50%<sup>[3]</sup>。巨噬细胞具有很强的异质性和可塑性,会根据肿瘤微环境的刺激从而进行特异性分化。根据分化后的功能和作用主要分为两种亚型:经典活化 M1 型和替代活化 M2 型<sup>[4]</sup>。M1 型主要参与促炎反应、抗肿瘤免疫和病原体清除。M2 型主要参与抗炎反应、伤口愈合和促肿瘤作用<sup>[5]</sup>。随着对肝癌肿瘤微环境的研究发现, M2 型巨噬细胞会分泌大量因子来促进肝癌细胞的上皮间充质转化从而发生侵袭和转移。E-钙黏蛋白(E-Cadherin)表达的减少或缺失,同时 N-钙黏蛋白(N-Cadherin)表达的升高是肝癌细胞发生上皮间充质转化的标志。在 M2 型分泌的众多因子中,IL-6 就是其一<sup>[6]</sup>。但是 M2 型巨噬细胞和 IL-6 在肝癌细胞发生上皮细胞间充质转化(EMT)的功能需要进一步探讨。本研究发现 M2 型巨噬细胞可以促进肝癌细胞 HepG2 上皮间充质转化,并且 IL-6 可以介导 M2 型巨噬细胞促进肝癌 HepG2 细胞上皮间充质样改变。

## 1 材料与方 法

1.1 材料 人单核细胞白血病 THP-1(上海中科院细胞库);人肝癌细胞 HepG2(右江民族医学院肝癌重点实验室);无血清培养基 RPMI-1640、胎牛血清(美国 gibco 公司);高糖培养基 DMEM、胎牛血清(美国 gibco 公司);PCR 试剂盒 ELISA 酶联免疫吸附剂测定试剂、逆转录细胞试剂盒、IL-4、IL-13(赛默飞公

司);Transwell 小室、PET 膜 0.4  $\mu\text{m}$ (corning 公司);佛波酯 PMA、IL-6 抑制剂 Corylifol A(MCE 公司);N-Cadherin、E-Cadherin 引物合成(上海生工);RIPA 裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒(雅酶);ECL 化学发光试剂盒(碧云天);内参抗体 GAPDH、 $\beta$ -actin、E-Cadherin 抗体、N-Cadherin 抗体(武汉三鹰公司);逆转录细胞试剂盒(赛默飞公司);SYBRGreenPCR Master-Mix(上海翊圣)。

1.2 细胞培养 HepG2 细胞用高糖 DMEM 完全培养基,在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养。等待细胞生长达到培养瓶底部 80%时,消化离心后按 1:2 进行传代培养。THP-1 为悬浮细胞,用含 10%胎牛血清的 1640 培养液在 5%  $\text{CO}_2$ 、37  $^{\circ}\text{C}$  饱和湿度条件下进行传代培养,静置沉淀后镜下细胞浓度在  $(2\sim 4)\times 10^5$  进行传代培养时按 1:2 或 1:3 传代。

1.3 M2 型巨噬细胞诱导及实验分组 THP-1 细胞按照  $1\times 10^6$  浓度接种于 Transwell 上室,加入 2 mL 含有 320 nm PMA 的 RPMI-1640 完全培养液诱导 24 h 得到初始巨噬细胞 M0。24 h 后舍弃上清液,加入 2 mL 含有 20 ng/mL IL-4、IL-13 的 RPMI-1640 完全培养基继续诱导 72 h 后得到 M2 型巨噬细胞。此时舍弃上室培养液,换成 DMEM 完全培养液,并在下室接种浓度为  $1\times 10^5$  的 HepG2 细胞,构建成 M2 型巨噬细胞和 HepG2 细胞共培养体系。因实验需要把细胞分为两组:第一组, M2+ HepG2 共培组、HepG2 单独培养组。第二组, M2+ HepG2+ IL-6 抑制剂组、M2+ HepG2+ 没有意义的溶媒。

1.4 RNA 提取和 PCR 检测 利用 3 mL 巴氏吸管吸尽下室上清液,加入 PBS 清洗 3 遍,利用 Trizol 法提取 RNA,进行逆转录。配制相应的反应体系用 cDNA 上机,设置 3 个平行复孔,以 94  $^{\circ}\text{C}$  5 min、94  $^{\circ}\text{C}$  5 s、60  $^{\circ}\text{C}$  10 s、72  $^{\circ}\text{C}$  30 s、72  $^{\circ}\text{C}$  5 min、45 个循环为标准进行扩增。以 GAPDH 为参考,采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法测定各基因相对表达量,重复实验 3 次。引物序列, GAP-

DH;上游 5'-GGACCTGACCTGCCGTCTAG-3'下游 5'-GTAGCCCAGGATGCCCTTGA-3'; E-Cadherin: 上游 5'-CGAGAGCTACACGTTACGG-3'下游 5'-GGGTGTCGAGGGAAAAATAGG-3'; N-Cadherin: 上游 5'-AGCCAACCTTAACTGAGGAGT-3'下游 5'-GGCAAGTTGATTGGAGGGATG-3'。

1.5 蛋白提取和 Western blot 测定 共培组中舍弃上室,用 3 mL 巴氏吸管吸尽下室培养液,用 PBS 清洗两遍,最后加入 1 mL PBS 收集细胞与 EP 管中。在 4 °C 离心机 5000 r,离心 10 min。加入 60  $\mu$ L RIP 裂解液和蛋白酶抑制剂,4 °C 在摇床上剧烈震荡 1 h。最后 140 000 r,20 min,4 °C 离心收集上清。测定蛋白浓度,上样、电泳、转膜、孵育一二抗。用 ECL 显色试剂得到蛋白条带并用 Image J 软件进行灰度值计算。

1.6 ELISA 试剂盒测定 IL-6 表达水平,舍弃共培

养组上室,用巴氏吸管吸取下室细胞上清与 EP 管中,按照试剂盒说明进行测定。

1.7 统计学方法 使用 SPSS 19.0 统计软件,采用 GraphPadPrism 7 进行作图,计量资料结果以  $(\bar{x} \pm s)$  表示,两组基因表达量比较用秩和检验,蛋白相对表达量采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 M2 型巨噬细胞诱导 THP-1 细胞常规为圆形,半透明悬浮细胞(见图 1)。按照诱导 M2 型巨噬细胞的公认标准在 Transwell 上室用含有 320 nm 佛波酯的 1640 培养基诱导 THP-1 细胞 24 h,细胞变大变圆并且贴壁,即为原始巨噬细胞 M0(见图 2),吸尽上清加入 20 ng/mL IL-4 及 20 ng/mL IL-13 的 1640 培养基,继续培养 72 h M0 伸出大量伪足变为 M2 型巨噬细胞(见图 3)。

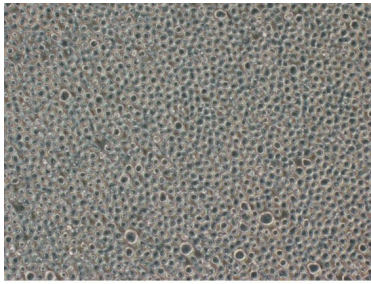


图 1 THP-1 常规形态( $\times 200$ )

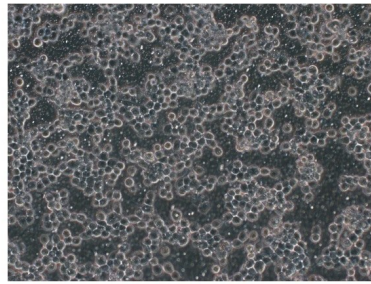


图 2 贴壁以后 M0 巨噬细胞( $\times 200$ )

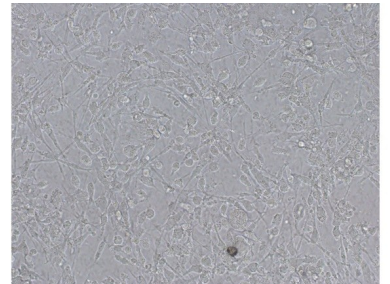
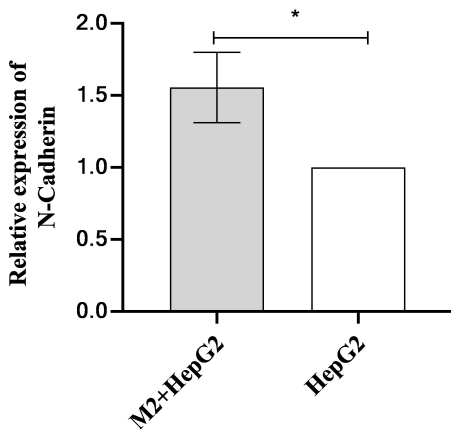


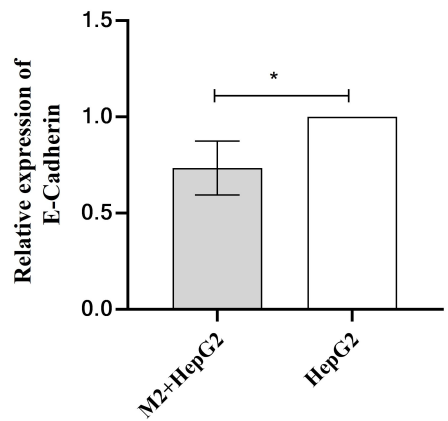
图 3 伸出大量伪足的 M2 型巨噬细胞( $\times 200$ )

2.2 RT-qPCR 测定 用 RT-qPCR 测定 M2 + HepG2 共培组、HepG2 单独培养组中 HepG2 肝癌细胞 N-Cadherin、E-Cadherin 相对表达量,结果显示共培组 HepG2 细胞中 N-Cadherin 比单独培养组相对表达量显著升高,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),见图 4。而共培组 HepG2 细胞中 E-Cadherin 比单独培养组相对表达量显著降低 ( $P < 0.05$ ),见图 5。



结果以  $n = 3$  个独立实验的  $(\bar{x} \pm s)$  表示, \*  $P < 0.05$ 。

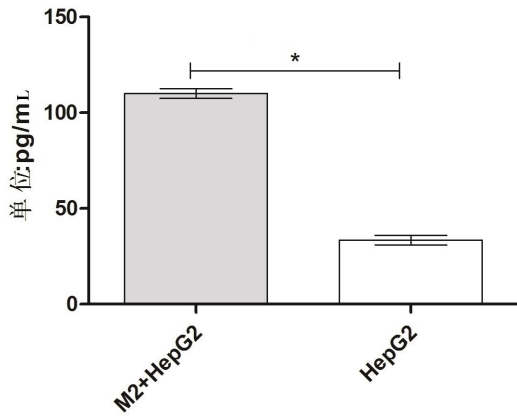
图 4 N-Cadherin 的 mRNA 相对表达量



结果以  $n = 3$  个独立实验的  $(\bar{x} \pm s)$  表示, \*  $P < 0.05$ 。

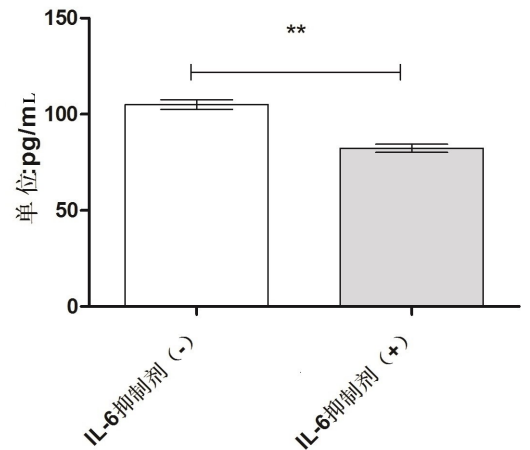
图 5 E-Cadherin 的 mRNA 相对表达量

2.3 ELISA 定量检测 ELISA 分别定量检测 M2 + HepG2 共培组、HepG2 单独培养组、加 IL-6 抑制剂共培组、不加 IL-6 抑制剂共培组的 IL-6 含量。结果显示共培组中 IL-6 的含量明显高于单独培养组 ( $P < 0.01$ )。而加 IL-6 抑制剂共培组中 IL-6 的含量也明显低于不加抑制剂共培组,证明 IL-6 抑制剂抑制效果成功 ( $P < 0.01$ ),见图 6、图 7。



结果以  $n=3$  个独立实验的  $(\bar{x} \pm s)$  表示, \*  $P < 0.01$ 。

图 6 IL-6 在共培组和单独培养组的含量

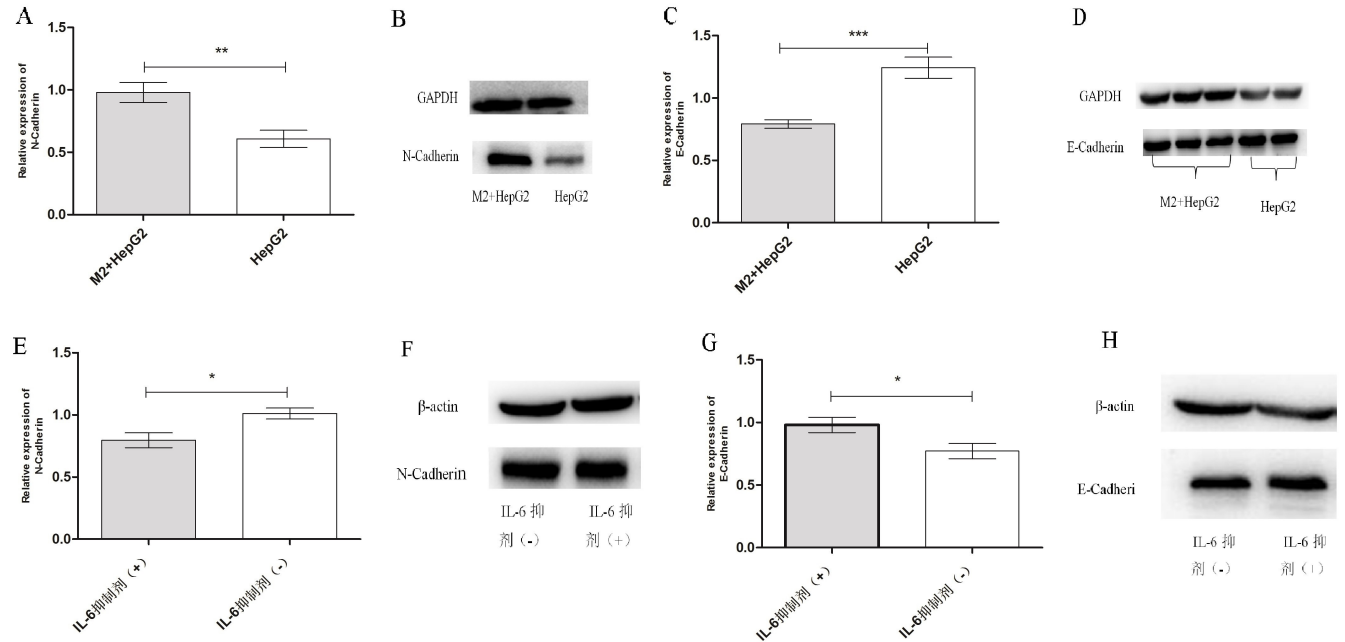


结果以  $n=3$  个独立实验的  $(\bar{x} \pm s)$  表示, \*\*  $P < 0.01$ 。

图 7 IL-6 在加抑制剂的共培组和不加抑制剂共培组的含量

2.4 Western blot Western blot 分别检测 M2 + HepG2 共培组、HepG2 单独培养组、加 IL-6 抑制剂共培组、不加 IL-6 抑制剂共培组的 N-Cadherin 和 E-Cadherin 蛋白相对表达量。结果显示共培组中 N-Cadherin 蛋白表达量明显高于单独培养组 ( $P < 0.01$ ), 见图 8A、图 8B。而 E-Cadherin 蛋白表达量显著低于单独培养组 ( $P < 0.01$ ), 见图 8C、图 8D。加

IL-6 抑制剂共培组的 N-Cadherin 相对表达量低于不加 IL-6 抑制剂组, 说明 IL-6 可以介导 M2 型巨噬细胞促进 HepG2 肝癌细胞 N-Cadherin 表达升高 ( $P < 0.05$ ), 见图 8E、图 8F。加 IL-6 抑制剂共培组的 E-Cadherin 相对表达量高于不加 IL-6 抑制剂组, 说明 IL-6 可以介导 M2 型巨噬细胞使得 HepG2 肝癌细胞 E-Cadherin 表达减少 ( $P < 0.05$ ), 见图 8G、图 8H。



A~D: 共培组和单独培养组 Western blot 检测 N-Cadherin 和 E-Cadherin 蛋白相对表达量。结果以  $n=3$  个独立实验的  $(\bar{x} \pm s)$  表示, \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ 。E~H: 共培组加入 IL-6 抑制剂和不加抑制剂共培组 Western blot 测定 N-Cadherin 和 E-Cadherin 蛋白表相对表达量。结果以  $n=3$  个独立实验的  $(\bar{x} \pm s)$  表示, \*  $P < 0.05$ 。

图 8 IL-6 可以介导 M2 型巨噬细胞促进肝癌 HepG2 细胞上皮间充质样改变

### 3 讨论

在肿瘤微环境中, M2 型巨噬细胞通过多种机制来实现肿瘤免疫抑制作用, 例如直接参与 T 细胞抑制和

凋亡, 抑制巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬作用等, 协助肿瘤细胞完成免疫逃逸。M2 型巨噬细胞还能通过各种分子机制来促进 EMT, 从而促进肿瘤的侵袭和转移。

肿瘤血管生成被认为是肿瘤进展中极为关键的步骤。它提供了肿瘤细胞生长所必须的氧气和营养。在肝癌细胞中, M2 型巨噬细胞分泌的相关因子促进了肝癌细胞的血管生成<sup>[7-8]</sup>。化疗药物在肝癌临床上的应用, 基于肿瘤微环境的存在, 同样面临着耐药性这一严重问题<sup>[9]</sup>。这不得不使研究者的目光再次聚集于肿瘤本身的治疗, 其中重要的一个环节就是其微环境中的肿瘤相关巨噬细胞。肿瘤相关巨噬细胞与肝细胞癌上皮间充质转化的关系密切, 但是机制不明, 成为亟待解决的科学问题<sup>[10-12]</sup>。

本课题组把 THP-1 细胞诱导为 M2 型巨噬细胞, 研究 M2 型巨噬细胞与肝癌细胞 EMT 的关系。通过 M2 型巨噬细胞和肝癌细胞的共培养构建, 得到 M2 型巨噬细胞可以促进肝癌细胞 HepG2 的 N-Cadherin 表达升高和 E-Cadherin 表达下降的结论。从而更加进一步说明 M2 型巨噬细胞可以促进肝癌细胞发生 EMT。M2 型巨噬细胞可以分泌很多细胞因子, 其中包括 IL-6 从而促进肿瘤的侵袭和转移。接着本课题组选用了促炎因子 IL-6, 探讨它在 M2 型巨噬细胞和 HepG2 细胞之间的作用。从检测 HepG2 细胞上清 IL-6 表达水平相关实验, 课题组更加证实了 M2 巨噬细胞可以分泌 IL-6 这一结论。同时从基因和蛋白水平得出结论: IL-6 可以介导 M2 型巨噬细胞促进肝癌 HepG2 细胞上皮间充质样改变。

本研究阐明了 M2 型巨噬细胞分泌的 IL-6 在肝癌细胞 HepG2 发生 EMT 中的作用, 揭示了 M2 型巨噬细胞通过分泌 IL-6 促进肝癌细胞 HepG2 上皮间充质转化, 为治疗肝癌的转移提供了新思路。由于 M2 型巨噬细胞分泌 IL-6 受到很多分子通路的共同作用, 具体的分子通路机制还需要进行更深入的研究。

#### 参考文献:

[1] SONG J N, ZHOU H Z, GU D Y, et al. Hepatocellular carcinoma differentiation: research progress in mechanism and treatment[J]. *Front Oncol*, 2022, 11: 790358.  
[2] DEL PRETE A, SCHIOPPA T, TIBERIO L, et al. Leukocyte trafficking in tumor microenvironment[J]. *Curr Opin*

*Pharmacol*, 2017, 35: 40-47.

- [3] ZHOU J W, TANG Z W, GAO S Y, et al. Tumor-associated macrophages: recent insights and therapies[J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 188.  
[4] YAO H C, TIAN L L, YAN B R, et al. LncRNA TP73-AS1 promotes nasopharyngeal carcinoma progression through targeting miR-342-3p and M2 polarization via exosomes[J]. *Cancer Cell Int*, 2022, 22(1): 16.  
[5] WANG J K, LI Y, ZHANG C, et al. Characterization of diagnostic and prognostic significance of cell cycle-linked genes in hepatocellular carcinoma[J]. *Transl Cancer Res*, 2021, 10(11): 4636-4651.  
[6] KASHFI K, KANNIKAL J, NATH N. Macrophage reprogramming and cancer therapeutics: role of inos-derived no[J]. *Cells*, 2021, 10(11): 3194.  
[7] FENG R, MORINE Y, IKEMOTO T, et al. Nrf2 activation drive macrophages polarization and cancer cell epithelial-mesenchymal transition during interaction [J]. *Cell Commun Signal*, 2018, 16(1): 54.  
[8] TOKUDA K, MORINE Y, MIYAZAKI K, et al. The interaction between cancer associated fibroblasts and tumor associated macrophages via the osteopontin pathway in the tumor microenvironment of hepatocellular carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2021, 12(4): 333-343.  
[9] HUANG A, YANG X R, CHUNG W Y, et al. Targeted therapy for hepatocellular carcinoma[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 146.  
[10] ARVANITAKIS K, KOLETSA T, MITROULIS I, et al. Tumor-associated macrophages in hepatocellular carcinoma pathogenesis, prognosis and therapy[J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(1): 226.  
[11] KONO H, FUJII H, FURUYA S, et al. Macrophage colony-stimulating factor expressed in non-cancer tissues provides predictive powers for recurrence in hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(39): 8779-8789.  
[12] 韩鑫鑫, 梁浩源, 唐玉莲, 等. 肿瘤微环境趋化因子通过与细胞因子受体互作参与 HCC 诱导的炎症反应[J]. *右江民族医学院学报*, 2019, 41(6): 610-613.

收稿日期: 2022-02-22; 修回日期: 2022-03-13