

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

赵慧咏 魏 昇 杨茗皓 郭子成 刘永凡 崔 笑

摘要 目的 探索巨噬细胞在肝癌炎症微环境中通过炎症趋化因子(C-X-C 基序)配体 1(CXCL1)调控肝癌细胞系 Huh7 进展。方法 筛选肿瘤临床数据库 TISIDB,分析 CXCL1 与肝癌患者预后的关系。免疫组化、免疫荧光染色验证肿瘤巨噬细胞与 CXCL1 的关系。通过佛波酯(PMA)诱导人单核细胞(THP-1)获得未分化的巨噬细胞(M0),建立与肝癌细胞共培养模型,实时荧光定量 PCR 法检测巨噬细胞表型的改变;细胞克隆形成实验、台盼蓝细胞活率检测肝癌细胞的增殖能力;肝癌细胞的迁移及侵袭能力使用 Transwell 实验检测;肝癌细胞 Huh7 中 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 的蛋白表达水平使用蛋白印迹法检测;酶联免疫吸附实验(ELISA 法)检测细胞培养液中目标蛋白的表达。结果 CXCL1 高表达与肝癌患者不良预后有关,并且高表达 CXCL1 的肝癌组织具有更多的巨噬细胞富集。在巨噬细胞-肝癌细胞共培养模型中,两种细胞 CXCL1 的表达水平及共培养液中 CXCL1 浓度均增加。巨噬细胞 M2 型标志物 CD163、CD206 mRNA 表达水平升高。肝癌细胞 Huh7 的增殖、迁移及侵袭能力增强。结论 巨噬细胞-肝癌细胞共培养增加肿瘤相关巨噬细胞 CXCL1 表达,促进肝癌细胞系 Huh7 进展。

关键词 肝癌;肿瘤相关巨噬细胞;肿瘤微环境;CXCL1;上皮细胞-间充质转化

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)03-0398-07
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.03.009

原发性肝癌在我国居民恶性肿瘤中发病率居第四位,病死率居第二位(以下简称肝癌)^[1]。在我国乙型肝炎基础上发生的肝硬化是肝癌的最主要病因,肝脏炎症环境与肝癌发生的病理生理过程相关。在肝脏炎症微环境中肿瘤相关性巨噬细胞(Tumor-

associated macrophages, TAMs)^[2-3],通过影响炎症微环境发挥着调控肿瘤免疫和生长的作用。大量临床和实验研究证明 TAMs 数目与肿瘤的进展呈正相关,是肿瘤侵袭性的重要因素之一^[4-5]。

肝脏炎症病变中,趋化因子 CXC 亚群配体 1(CXC-chemokine ligand 1, CXCL1)被发现在乙肝、丙肝及非病毒肝炎的炎性损伤过程中发挥重要作用。CXCL1 在多种肿瘤中被证实具有促进肿瘤生长和转移的作用。本研究探讨 TAMs 是否通过调控趋化因子 CXCL1 的表达从而改变肝癌细胞 Huh7 的生物学行为^[6-8]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人肝癌细胞株 Huh7 及人单核细胞株 THP-1 均购于中国科学院细胞库。

1.1.2 主要试剂与仪器 DMEM 高糖培养基购于美国 Hyclone 公司、RPMI 1640 培养基购于上海源培公司,胎牛血清购自美国 Gibco 公司,Transwell 嵌套小室(8 μm)、共培养小室(0.1 μm)购自美国康宁公司,BCA 试剂盒、4% 多聚甲醛、青/链霉素、0.25% 胰酶、结晶紫购自北京碧云天生物技术公司,ELISA 试剂盒购自武汉华美,重组蛋白 CXCL1 购自上海 MCE 公司,一抗购自 Cell Signaling Technology 公司,二抗购自北京中杉金桥有限公司,引物由新贝(上海)生物科技有限公司设计。主要仪器有细胞培养箱(Thermo Fisher) 荧光倒置显微镜、荧光正置显微镜(ZEISS) KHB 酶标仪(上海科华生物)。

1.2 方法

1.2.1 TISIDB 数据库分析 利用 TISIDB 基因表达数据库进行肝癌患者生存分析。观察不同表达程度的 CXCL1 与肝癌患者预后间的相关性。

1.2.2 细胞培养 使用 DMEM 培养基培养人肝癌细胞 Huh7,使用 RPMI 1640 培养基培养人单核细胞 THP-1。培养基中含有 10% 胎牛血清和 1% 青/链霉素,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。采用离心方式对 THP-1 细胞进行收集、传代;采用 0.25% 胰蛋

2022-08-29 接收

基金项目:安徽高等学校自然科学基金项目(编号:KJ2017A825);安徽省自然科学基金项目(编号:1808085MH270、2008085QH406)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院普外科,合肥 230601

作者简介:赵慧咏,女,硕士研究生;

崔 笑,男,副主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: cx_2077@bjmu.edu.cn

白酶消化方式对 Huh7 进行收集、传代。

1.2.3 实验分组与处理 本研究分为对照组: 正常培养的肝癌细胞系 Huh7; 实验组: 肝癌细胞-巨噬细胞共培养(细胞比例为 1:1 是模拟肝癌环境中巨噬细胞与肿瘤细胞数目比例); CXCL1 干预组: 在正常培养基的基础上添加重组蛋白 CXCL1。共培养方案如下: 使用佛波酯(phorbol-12-myristate-13-acetate, PMA) 100 ng/ml 作用 THP-1 悬液得到的贴壁 M0 巨噬细胞。用 PBS 漂洗去除培养基中含有的 PMA, 并将 0.1 μm PET 膜六孔板细胞培养小室(购自美国康宁公司)置于已接种肝癌细胞 Huh7 的六孔板进行共培养^[3]。收集共培养 48 h 后的细胞培养液和各组贴壁细胞以备后续实验。

1.2.4 克隆形成实验 将肝癌细胞 Huh7 接种于六孔板中, 1 000 个/孔。以 1.2.3 项的实验方案培养对照组和实验组细胞, 待成团细胞数有半数时(14 d)用 4% 多聚甲醛固定 30 min, 使用结晶紫染色 15 min, 拍照。成团细胞数使用 Image-J 软件分析。

1.2.5 台盼蓝细胞活率检测 分别消化收集各分组肝癌细胞, 将收集的细胞悬液 1 500 r/min 离心, 弃上清液, 用 1 ml 重悬液重悬细胞。用等量台盼蓝染色液加入细胞悬液, 混匀, 染色 3 min, 使用细胞计数仪计算细胞存活率。

1.2.6 Transwell 迁移和侵袭实验 将各组细胞消化并用 RPMI 1640 无血清培养基重悬, 迁移实验为 4×10^4 细胞/孔, 侵袭实验为 1×10^5 细胞/孔重悬于 100 μl 培养基接种于 Transwell 小室上室(8 μm 聚碳酸酯膜), 其中侵袭实验中预先对上室铺放基质胶稀释液置于培养箱过夜凝固。下室加入含 30% 胎牛血清的培养基, 继续培养 36 h。取出小室清洗、固定、染色。于倒置显微镜下拍照, 使用 Image-J 软件计算迁移和侵袭细胞数。

1.2.7 实时荧光定量 PCR 用 Trizol 法提取总 RNA, 并测定 RNA 浓度。根据逆转录试剂盒说明书按照 10 μl 反应体系逆转录成 cDNA 后以 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, 扩增条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 循环 40 次。每个反应设置 3 个复孔, 以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值作为相对表达量, 以 GAPDH 为内参, 主要引物序列如下: GAPDH-F: 5'-GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG-3', R: 5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA-3'; CXCL1-F: 5'-TGCTGAACAGTGACAAATCCAAC-3', R: 5'-TGGGG-TTGACATTTCAAAAAGAA-3'; CD68-F: 5'-CTTCTCT-CATTCCCCTATGGACA-3', R: 5'-GAAGGACACATT-

GTACTCCACC-3'; CD206-F: 5'-TTCGGACACCCAT-CGGAATTT-3', R: 5'-CACAAGCGCTGCGTGGAT-3'

1.2.8 Western blot 将蛋白裂解液(RIPA 裂解液: 蛋白酶抑制剂: 磷酸酶抑制剂 = 100:1:1)加入各组细胞, 裂解 30 min 后收集所有液体在 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心机中以 13 200 r/min 离心 30 min, 收集上清液并按照 BCA 试剂盒说明书测定蛋白浓度。蛋白于 100 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min。后续 SDS-PAGE 凝胶对提取的蛋白进行电泳 2 h, 转膜 1.5 h, 封闭液封闭后相应一抗(CST)孵育过夜, TBST 洗膜后孵育二抗, 显影。蛋白条带的结果分析采用 Image-J 进行灰度值测定。

1.2.9 酶联免疫吸附(ELISA)实验 收集各组细胞培养液离心, 取上清液, 按照试剂盒说明书进行铺板、洗涤、样本孵育、抗体孵育、显色、终止显色等测定培养液 CXCL1 浓度。

1.2.10 免疫组化和免疫荧光实验 收集自 2010 年 6 月—2020 年 6 月在安徽医科大学第二附属医院因肝炎相关性肝癌行肝脏切除术, 术后病理诊断为肝癌的病例。将收集病例的癌和癌旁非癌组织分别进行石蜡和冰冻切片, 获得 3 μm 切片, 按照既往实验方案进行染色。在正置显微镜下观察组织中相关指标表达。

1.2.11 MTT 实验 将肝癌细胞以 2 500 细胞/孔接种于 96 孔板内。待细胞贴壁后更换为 100 μl /孔正常培养基(对照组)、含不同浓度重组蛋白(0、50、100 ng/ml)的培养基培养不同时间, 加入 MTT 溶液 10 μl , 培养 4 h 后加入 150 μl 异丙醇振荡 10 min, 酶标仪分别检测波长 570 nm 和 630 nm 处测定吸光度(optical density, OD)值, 两者差值反映细胞活力。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 9.0 对实验数据进行统计学分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 *t* 检验分析两组间的差异, 多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。所有实验重复 3 次, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CXCL1 水平与肝癌患者不良预后相关 使用 TISIDB 网站统计, 发现高水平表达 CXCL1 的肝癌患者预后较低, 表达 CXCL1 的患者预后差。另外, 对肝癌患者癌组织及癌旁非癌组织免疫组化定量分析 CXCL1 的表达, 发现癌组织中 CXCL1 为高表达, 癌旁非癌组织中 CXCL1 为低表达。免疫荧光定性分析癌组织中 CXCL1 与巨噬细胞(CD68)之间的关系, 可以发现在巨噬细胞 CD68 高表达的区域同样

高表达 CXCL1 两者之间具有正相关性,见图 1。

2.2 巨噬细胞 - 肝癌细胞共培养诱导巨噬细胞向 M2 型 TAMs 极化 对 PMA 诱导 THP-1 获得的未分化的巨噬细胞 (M0) 进行检测,显示 CD68 与 CD14(巨噬细胞特征型标志) mRNA 表达均明显上调 (CD68: $t = 20.01, P < 0.001$; CD14: $t = 13.10, P < 0.001$) 达到诱导分化成巨噬细胞效果。将诱导后

巨噬细胞与肝癌细胞构建共培养体系,检测共培养到共培养后巨噬细胞的促癌 M2 型标志物 CD206 与 CD163 mRNA (CD206: $t = 9.367, P < 0.05$; CD163: $t = 7.092, P < 0.05$) 表达量较对照组上升,差异均有统计学意义。见图 2。

2.3 巨噬细胞 - 肝癌细胞共培养上调 CXCL1 的表达 分别提取正常培养的对照组及肝癌 - 巨噬细

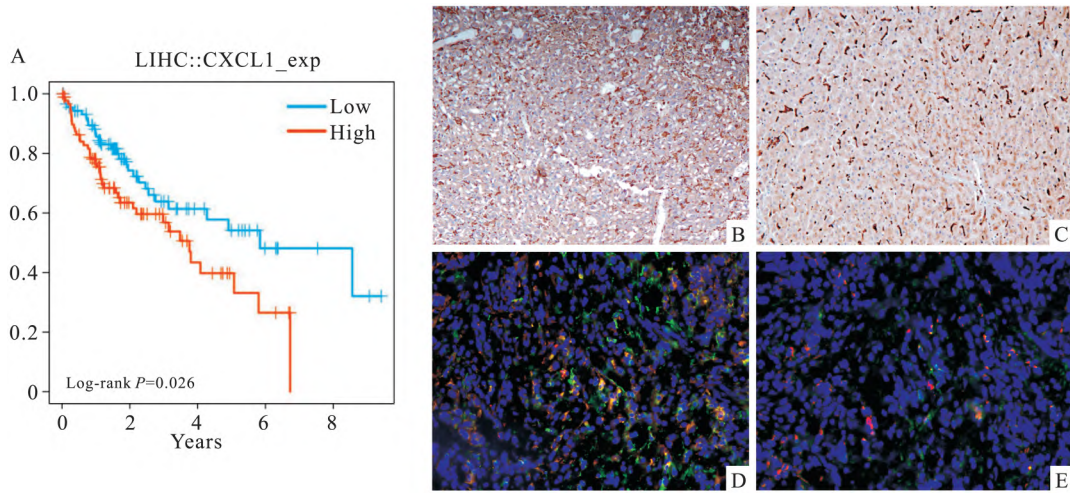


图1 CXCL1 与肝癌患者临床病理特征间的关系

A: TISIDB 网站分析 CXCL1 表达水平与肝癌患者预后的关系; B: 癌组织 CXCL1 免疫组化图 SP × 100; C: 癌旁非癌组织 CXCL1 免疫组化图 SP × 100; D: CXCL1 高表达与巨噬细胞 CD68 共染荧光图 SP × 100; E: CXCL1 低表达与巨噬细胞 CD68 共染荧光图 SP × 100; 蓝光: DAPI; 红光: CXCL1; 绿光: CD68; 橙光: CD68 + CXCL1

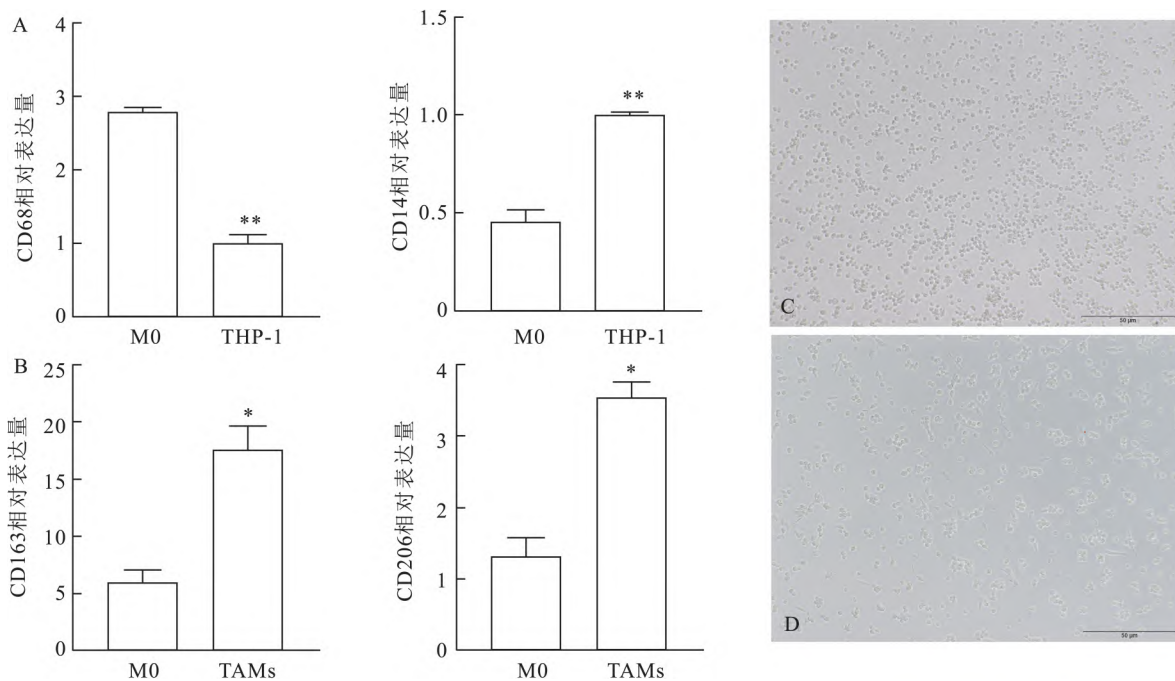


图2 与肝癌细胞共培养后巨噬细胞表型变化

A: qRT-PCR 检测细胞 CD68(巨噬细胞表面标记物)、CD14(单核细胞表面标记物) mRNA 水平表达量; B: qRT-PCR 检测细胞 M2 型巨噬细胞表面标记物 mRNA 水平表达量; M0: PMA 处理 THP-1 获得的未分化的巨噬细胞; TAMs: M0 与肝癌细胞共培养后获得的肿瘤相关巨噬细胞; C: THP-1 经 PMA 处理后形态; D: M0 与肝癌细胞共培养后巨噬细胞形态 SP × 100; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

胞共培养的实验组肝癌细胞和巨噬细胞总 RNA, PCR 检测 CXCL1 的相对表达量(肝癌细胞中 CXCL1: $t = 36.89$, $P < 0.001$; 巨噬细胞中 CXCL1: $t = 7.355$, $P < 0.05$)。对不同分组培养液使用 ELISA 法测定 CXCL1 的浓度。相对于对照组细胞,共培养可以刺激巨噬细胞和肿瘤细胞在 mRNA 水平上调 CXCL1 表达,增加共培养液中 CXCL1 浓度 [Huh7 培养液: $(1\ 288 \pm 88)$, M0 培养液: $(1\ 536 \pm 54)$, 共培养液: $(2\ 080.5 \pm 19.5)$, $F = 44.66$, $P < 0.01$], 见图 3。

2.4 巨噬细胞-肝癌细胞共培养增强肝癌细胞系 Huh7 的增殖能力 在该研究中,肿瘤细胞-巨噬细胞共培养可以获得表型倾向于 M2 型的肿瘤相关巨噬细胞(TAMs), TAMs 显著的促癌作用已经被大量研究证实。本研究克隆形成实验结果可以得到类似的结果,与肿瘤相关巨噬细胞共同培养的肝癌细胞相比于对照组,细胞克隆形成数增加,差异具有统计学意义 [Huh7 组: 67.5 ± 10.5 , Co-Huh7 组: 70 ± 18 ; $t = 5.098$, $P < 0.05$], 见图 4。

2.5 巨噬细胞-肝癌细胞共培养增强肝癌细胞系 Huh7 的迁移、侵袭能力 Transwell 实验检测肝癌细胞系 Huh7 的迁移和侵袭能力。结果表明共培养组中肝癌细胞发生迁移和侵袭的数目多于对照组(迁移组: $t = 7.499$, $P < 0.05$; 侵袭组: $t = 8.161$, $P < 0.05$), 见图 5。另外,用 qRT-PCR 和 Western blot 检测共培养对肝癌细胞 EMT 作用发现,共培养组肝癌细胞上皮细胞表型标志分子 E-cadherin 表达减少(蛋白水平: $t = 5.824$, $P < 0.01$; mRNA 水平: $t = 17.84$, $P < 0.0001$), 反之增加 N-cadherin、Vimentin 的表达,见图 5。

2.6 重组蛋白 CXCL1 增强肝癌细胞系 Huh7 的增殖能力、促进其迁移和侵袭能力 在体外实验正常培养的肝癌细胞中加入不同浓度(0、50、100 ng/ml)的重组蛋白 CXCL1, 观察对细胞增殖、迁移及侵袭能力的影响: 重组蛋白 CXCL1 浓度增加,肝癌细胞系 Huh7 的增殖、迁移和侵袭能力同样增强(迁移组: $F = 99.65$, $P < 0.001$; 侵袭组: $F = 169$, $P < 0.001$), 见图 6。

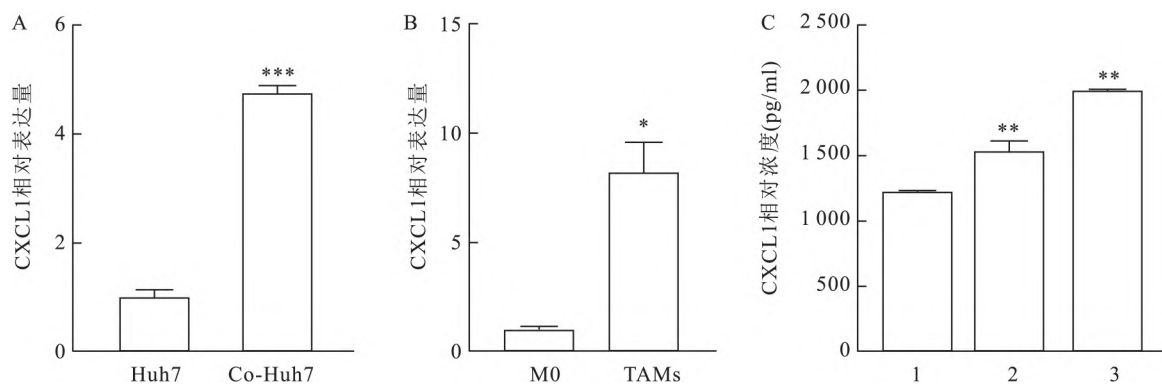


图3 共培养体系中各细胞及培养液 CXCL1 相对表达量

A: 对照组和共培养组中肝癌细胞 CXCL1 的表达量; 与对照组比较: *** $P < 0.01$; B: 对照组和共培养组中巨噬细胞(M0 为 PMA 诱导 THP-1 得到的巨噬细胞; TAMs 为 M0 与肝癌细胞 Huh7 共培养得到的巨噬细胞) CXCL1 的表达量; 与对照组比较: * $P < 0.01$; C: 各培养液中 CXCL1 的表达量; 1: Huh7 培养液; 2: M0 培养液; 3: 共培养液; 与对照组比较: ** $P < 0.01$

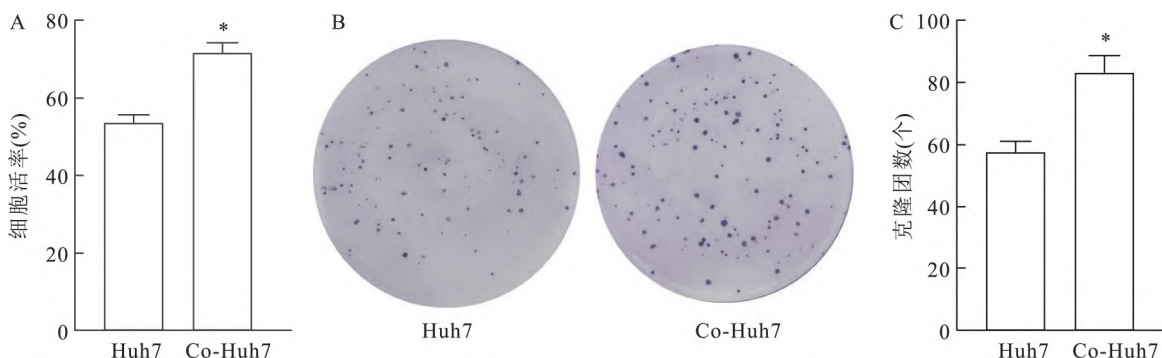


图4 TAMs 对肝癌细胞生长能力的影响

A: 台盼蓝检测细胞活性; B-C: 细胞克隆形成集落计数; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

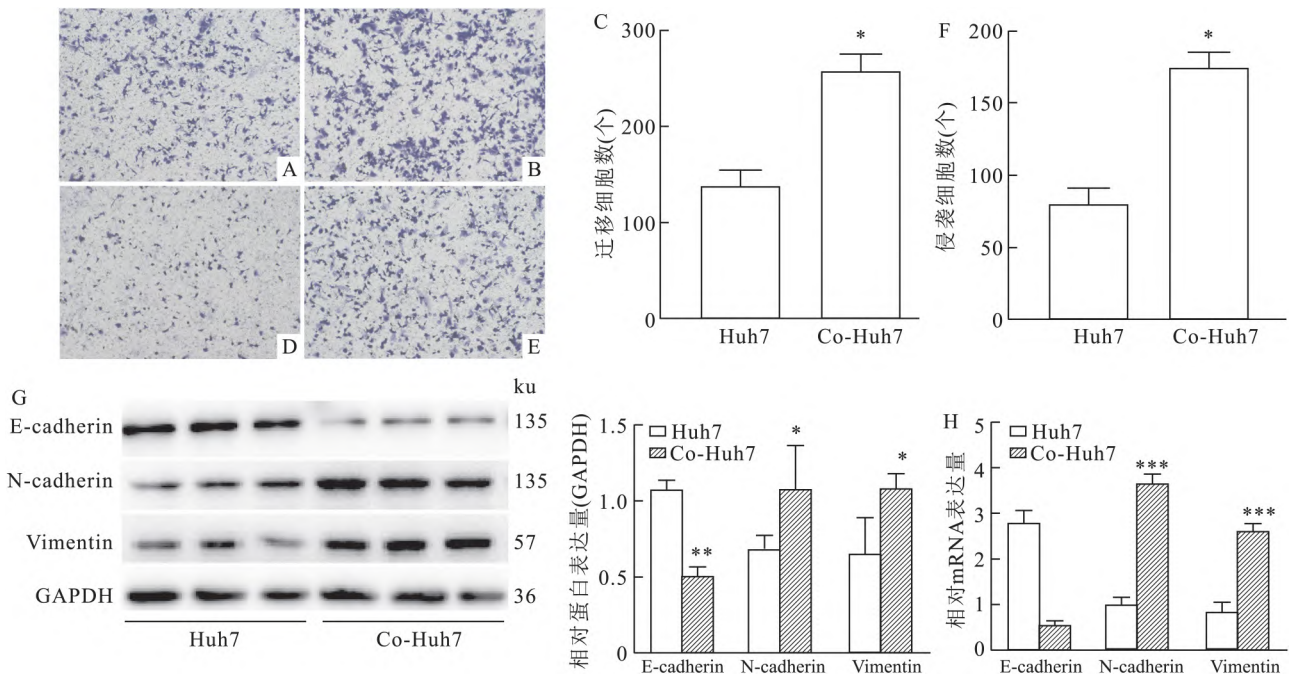


图5 TAMs对肝癌细胞迁移、侵袭能力的影响

A - C: Transwell 实验, 对照组 (A) 和共培养组 (B) 肝癌细胞 Huh7 迁移细胞数 SP × 100, 与对照组比较: * P < 0.05; D - F: Transwell 实验, 对照组 (D) 和共培养组 (E) 肝癌细胞 Huh7 侵袭细胞数 SP × 100, 与对照组比较, * P < 0.05; G - H: 肝癌细胞 Huh7 中 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 在蛋白水平 (G) 和 mRNA 水平 (H) 变化; 与对照组比较: * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, **** P < 0.0001

3 讨论

肝癌的发生及进展与肝脏炎症背景息息相关^[9-10]。作为肿瘤炎症微环境中的重要组成部分, 巨噬细胞既受微环境的影响分化为抗肿瘤 M1 型和促肿瘤 M2 型, 又反向调控肿瘤细胞的生物学行为^[2], 在肿瘤细胞 - 巨噬细胞反馈作用中扮演桥梁作用的是细胞因子和趋化因子^[2-4]。本课题组对临床标本的检测发现, 在 CXCL1 高表达肝癌组织中, 巨噬细胞数目增多较为明显。而在单核及巨噬细胞表面发现 CXCL1 受体 CXCR2 显著富集^[8, 11-12]。因此肝癌微环境中 CXCL1 与巨噬细胞两者之间可能存在某些关联。为验证这一临床现象, 本课题组通过实验检测巨噬细胞 - 肝癌细胞共培养后 M2 型肿瘤相关巨噬细胞表型 CD163、CD206 表达, 检测共培养体系中培养液、肿瘤细胞、巨噬细胞的 CXCL1 表达, 结果均显著增加。

CXCL1 作为 CXC 亚群中重要因子之一, 不仅来源于常见的巨噬细胞, 肿瘤细胞中也同样分泌, 在肿瘤的免疫微环境中发挥双向调控作用^[2]。它能够在肿瘤进展期间从单核细胞中大量分泌从而诱导 M1 型向 M2 型的转化, 形成 M2 型的诱导剂从而参

与肿瘤的生长和侵袭^[3]。为了验证 CXCL1 对肝癌细胞的促癌作用, 应用不同浓度 CXCL1 作用于肝癌细胞, 本课题组发现, 随着 CXCL1 浓度的升高, 肝癌生长和迁移、侵袭能力不断增强。肿瘤相关巨噬细胞在肿瘤微环境中通过炎症介质的作用可以促进肿瘤的迁移、侵袭和上皮 - 间质转化 (EMT) 能力^[3, 13-14]。而肿瘤细胞 EMT 作用增强将活化下游炎症细胞因子, 如 CXCL1、CXCL10、CCL2、IL-6 和 IL-18 等表达, 募集更多巨噬细胞并促进其向 M2 型极化, 强化促癌炎症微环境^[2, 4, 6, 15]。

肿瘤微环境构成了肿瘤细胞生长和免疫逃逸的生态环境^[3-4], 而巨噬细胞则在肿瘤微环境不同细胞因子 (如趋化因子、IL-4、IL-10、TGF-β、IL-1、干扰素等) 诱导下, 表现为抗肿瘤或促肿瘤表型^[2-3]。在其中, 以 EMT 表型为例, 它不仅是肿瘤进展的重要标志, 还是微环境生态变化的重要驱动因素。EMT 表型转变的肝癌细胞可以释放出促癌型细胞因子, 募集巨噬细胞到肿瘤微环境并向促癌型极化, 促癌型巨噬细胞能进一步推动肿瘤细胞的 EMT 状态和肿瘤进展^[8, 15]。整个炎症微环境以正反馈的形式不断促进肿瘤细胞的生长、迁移和浸润。

本研究发现肝癌患者高表达 CXCL1 与预后不

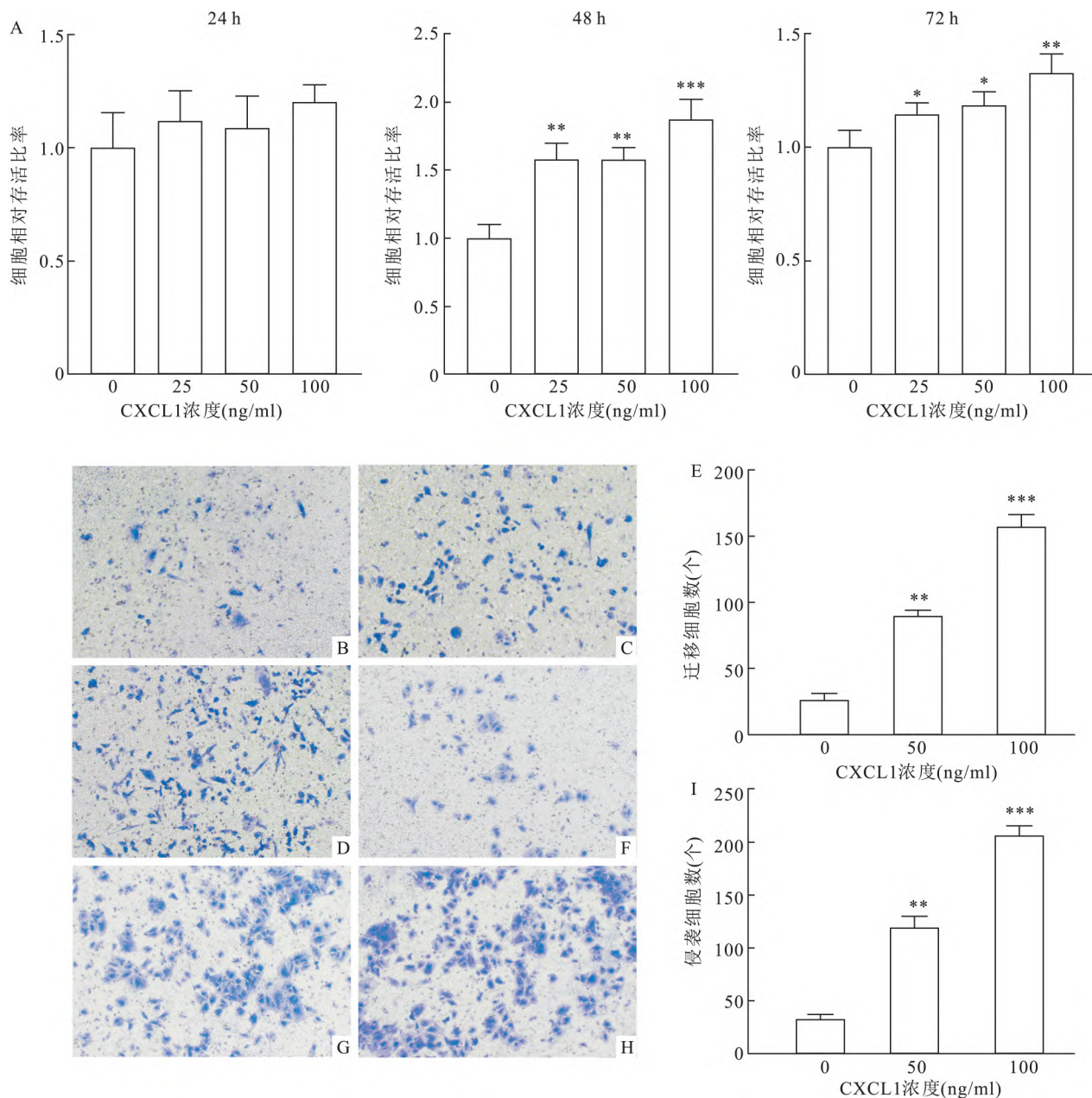


图6 重组蛋白CXCL1对肝癌细胞Huh7增殖、迁移及侵袭能力的影响

A: 不同浓度(0、50、100 ng/ml)重组蛋白CXCL1作用于肝癌细胞24、48、72 h细胞活力变化; B: 0 ng/ml重组蛋白CXCL1对肝癌细胞迁移能力的影响 SP×100; C: 50 ng/ml重组蛋白CXCL1对肝癌细胞迁移能力的影响 SP×100; D: 100 ng/ml重组蛋白CXCL1对肝癌细胞迁移能力的影响 SP×100; E: 细胞迁移数柱状图; F: 0 ng/ml重组蛋白CXCL1对肝癌细胞侵袭能力的影响 SP×100; G: 50 ng/ml重组蛋白CXCL1对肝癌细胞侵袭能力的影响 SP×100; H: 100 ng/ml重组蛋白CXCL1对肝癌细胞侵袭能力的影响 SP×100; I: 细胞侵袭数柱状图; 与对照组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

良之间的关联及CXCL1高表达与肿瘤相关巨噬细胞的关联现象。通过巨噬细胞-肝癌细胞体外共培养模型验证了肿瘤微环境促进肝癌细胞Huh7的生长、迁移与侵袭。在共培养体系中,CXCL1表达水平较单一细胞培养明显增加,促进了肝癌细胞EMT表型的增强和肿瘤的进展。以上结果为进一步理解

炎症反应趋化因子在肝癌进展中的作用探索了可能的机制。

参考文献

[1] Xia C, Dong X, Li H, et al. Cancer statistics in China and United

- States, 2022: profiles, trends, and determinants. *Chin Med J (Engl)* 2022, 135(5):584–90.
- [2] Petrick J L, Florio A A, Znaor A, et al. International trends in hepatocellular carcinoma incidence [J]. *Int J Cancer* 2020, 147(2):317–30.
- [3] Wu J, Gao W, Tang Q, et al. M2 macrophage-derived exosomes facilitate HCC metastasis by transferring $\alpha(M)\beta(2)$ integrin to tumor cells [J]. *Hepatology* 2021, 73(4):1365–80.
- [4] Yao R R, Li J H, Zhang R, et al. M2-polarized tumor-associated macrophages facilitated migration and epithelial-mesenchymal transition of HCC cells *via* the TLR4/STAT3 signaling pathway [J]. *World J Surg Oncol* 2018, 16(1):9.
- [5] Wang J, Wang Y, Chu Y, et al. Tumor-derived adenosine promotes macrophage proliferation in human hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatol* 2021, 74(3):627–37.
- [6] 吴婧婧, 孙婉弋. 肿瘤相关巨噬细胞在肝癌中的作用及靶向治疗研究进展 [J]. 2017, 52(12):1901–5.
- [7] Cao Z, Fu B, Deng B, et al. Overexpression of Chemokine (C-X-C) ligand 1 (CXCL1) associated with tumor progression and poor prognosis in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Cell Int* 2014, 14(1):86.
- [8] Cui X, Li Z, Gao J, et al. Elevated CXCL1 increases hepatocellular carcinoma aggressiveness and is inhibited by miRNA-200a. *Oncotarget* [J]. 2016, 7(40):65052–66.
- [9] Li L, Xu L, Yan J, et al. CXCR2-CXCL1 axis is correlated with neutrophil infiltration and predicts a poor prognosis in hepatocellular carcinoma [J]. *J Exp Clin Cancer Res* 2015, 34:129.
- [10] Kulik L, El-Serag H B. Epidemiology and Management of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* [J]. 2019, 156(2):477–91.
- [11] Cheng Y, Ma X L, Wei Y Q, et al. Potential roles and targeted therapy of the CXCLs/CXCR2 axis in cancer and inflammatory diseases [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 2019, 1871(2):289–312.
- [12] Cheng Y, Mo F, Li Q, et al. Targeting CXCR2 inhibits the progression of lung cancer and promotes therapeutic effect of cisplatin [J]. *Mol Cancer* 2021, 20(1):62.
- [13] Di Mitri D, Mirenda M, Vasilevska J, et al. Re-education of tumor-associated macrophages by CXCR2 blockade drives senescence and tumor inhibition in advanced prostate cancer [J]. *Cell Rep* 2019, 28(8):2156–68.
- [14] Natoli R, Fernando N, Madigan M, et al. Microglia-derived IL-1 β promotes chemokine expression by Müller cells and RPE in focal retinal degeneration [J]. *Mol Neurodegener* 2017, 12(1):31.
- [15] Yang C, Dou R, Wei C, et al. Tumor-derived exosomal miRNA-106b-5p activates EMT-cancer cell and M2-subtype TAM interaction to facilitate CRC metastasis [J]. *Mol Ther* 2021, 29(6):2088–107.

Effects of TAMs and CXCL1 on the biological behavior of hepatocellular carcinoma cell line Huh7

Zhao Huiyong, Wei Sheng, Yang Minghao, Guo Zicheng, Liu Yongfan, Cui Xiao

(Dept of General Surgery, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University Hefei 230001)

Abstract Objective To investigate the effects CXCL1 derived from TAMs on the progression of HCC by CXCL1 in tumor microenvironment (TME). **Methods** PMA induced human monocyte (THP-1) to obtain undifferentiated macrophages (M0) and then co-cultured with Huh 7 HCC cells. The biomarkers of macrophage phenotype and mRNA level of HCC were analysed by qRT-PCR. Colony formation assay, cell viability assay and transwell assay were performed to evaluate the biological alteration of HCC cells in TME. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) molecular genetics were detected using western blot. The levels of CXCL1 in TME were measured by ELISA assay. **Results** High CXCL1 expression in HCC patients predicted poor prognosis. Abundant macrophages were found in CXCL1 high expression HCC tissues. In macrophages and HCC co-cultured model, significantly increasing CXCL1 expression was detected in both two cells and the biomarkers of M2 macrophages, CD163 and CD206 were elevated. The growth and migration of HCC cells were promoted. **Conclusion** Co-culture of macrophages with HCC cells induces macrophages pro-tumor phenotype and CXCL1 secretion which promotes the progression of HCC. **Key words** hepatocellular carcinoma; tumor-associated macrophages; tumor microenvironment; CXCL1; epithelial-mesenchymal transition