DOI:10.16016/j.2097-0927.202209246

肿瘤相关巨噬细胞 MGLL 缺失促进免疫抑制和结直肠癌细胞腹腔种植转移

袁 静,缪洪明 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)基础医学院生物化学与分子生物学教研室

[摘要] **目的** 探究单酰甘油脂肪酶(monoacylglycerol lipase,MGLL)在肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages,TAMs)中调节结直肠癌腹腔种植转移(colorectal cancer peritoneal metastases,CRC-PM)的效应和机制。**方法** 首先构建了巨噬细胞 MGLL 特异性敲除(conditional knockout,cKO)小鼠,并进一步构建 CRC-PM 模型,最后结合细胞生物学和高通量测序等方法探究肿瘤相关巨噬细胞 MGLL 在小鼠结直肠癌细胞腹腔种植转移中的效应和机制。**结果** 相较于对照组小鼠,特异性敲除巨噬细胞 MGLL 小鼠的生存期显著缩短($P<0.05$),腹腔肿瘤重量显著增加($P<0.05$),同时肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)中 T 细胞占比显著减少($P<0.01$)而 M2 型巨噬细胞占比显著增加($P<0.05$),并且 RNA-seq 结果显示 MGLL 特异性敲除巨噬细胞的 TRLs、PD-1/PDL-1 以及 HIF-1 等信号通路发生显著改变。**结论** 在结直肠癌腹腔种植转移中,肿瘤相关巨噬细胞 MGLL 缺失促使 TAMs 向 M2 型极化,进而抑制基于 T 细胞的抗肿瘤免疫,最终促进结直肠癌的腹腔种植转移。其机制可能与 TRLs、PD-1/PDL-1 以及 HIF-1 等信号通路的改变相关。

[关键词] 肿瘤相关巨噬细胞;MGLL;结直肠癌;腹腔种植转移

[中图法分类号] R392.3; R73-37; R735.35 [文献标志码] A

MGLL deficiency in tumor-associated macrophages promotes immunosuppression and colorectal peritoneal metastases in mice

YUAN Jing, MIAO Hongming Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects and mechanisms of monoacylglycerol lipase (MGLL) in tumor-associated macrophages (TAMs) for the progression of colorectal cancer peritoneal metastases (CRC-PM). **Methods** After macrophage MGLL conditional knockout (cKO) mice was constructed, a CRC-PM model was established in these cKO mice. The effects and mechanism of MGLL deficiency on TAMs were studies with cell biological and RNA-Seq assays. **Results** Compared with the control mice, macrophage MGLL deficiency significantly shortened the survival time of CRC-PC mice ($P<0.05$), increased the weight of peritoneal tumor masses ($P<0.05$), diminished the percentage of T cells in the tumor microenvironment ($P<0.01$), while elevated the percentage of M2 macrophages in cKO mice ($P<0.05$). And the results of RNA-seq showed that TRLs, PD-1/PDL-1, and HIF-1 signal pathways were significantly changed in MGLL deficiency macrophages. **Conclusion** In the process of CRC-PC, MGLL deficiency leads to macrophage activation towards an M2-type phenotype and further destroys T cell-based anti-tumor immunity capacity, and ultimately promotes the progression of CRC-PC. The mechanisms may be due to the changes in TRLs, PD-1/PDL-1, and HIF-1 signal pathways.

[**Key words**] tumor-associated macrophages; monoacylglycerol lipase; colorectal cancer; peritoneal metastases

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (82173134). Corresponding author: MIAO Hongming, E-mail: hongmingmiao@sina.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82173134)

[通信作者] 缪洪明,E-mail:hongmingmiao@sina.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

结直肠癌是临床常见的恶性肿瘤之一,近年来发病率和死亡率持续攀升[1]。肿瘤转移是结直肠癌患者致死的主要原因。据统计,在每年新增肠癌患者中,约20%患者已经发生转移,还有约25%的肠癌患者在确诊后发生肿瘤转移。结直肠癌的转移形式包括血行转移、淋巴转移和腹腔种植转移。其中,腹腔种植转移(colorectal cancer peritoneal metastases,CRC-PM)约占结直肠癌死亡患者的80%[2],然而,临床暂无有效的CRC-PC防治策略[3]。因此,探究结直肠癌的转移机制具有重要意义。

肿瘤微环境(tumor microenvironment,TME)是肿瘤组织的重要组成部分,由免疫细胞、基质细胞等构成。TME可以通过抑制基于T细胞的抗肿瘤免疫,诱导免疫抑制,促使肿瘤细胞发生免疫逃逸,导致肿瘤转移[4]。肿瘤相关巨噬细胞(tumor associated macrophages,TAMs)是肿瘤微环境中数量最多的免疫细胞,对肿瘤的恶性进展发挥重要调控作用[5]。TAMs对肿瘤调控作用依赖于其异质性,现认为,巨噬细胞可分为M1型和M2型,其中M1型巨噬细胞主要通过分泌IL-1β、IL-6、TNFα和ROS等促炎因子,放大免疫反应,进而发挥抑瘤作用;而M2型巨噬细胞主要通过分泌IL-10、IL-13和TGF-β等抗炎因子,介导免疫抑制,发挥促瘤作用,并且二者间可以相互转化。因此,通过干预巨噬细胞的极化进而抑制肿瘤的恶性进展是潜在针对肿瘤转移的治疗策略。但是,TAMs极化的调控机制不清。

代谢重编程是巨噬细胞功能转换的重要方式,我们课题组前期研究发现,脂肪分解代谢中的单酰甘油脂肪酶(monoacylglycerol lipase,MGLL)介导的脂质堆积参与了TAMs的功能转化,并在肿瘤的恶性进展中发挥关键作用[6-7]。然而,巨噬细胞MGLL在腹腔种植转移中的效应和机制不清。因此,本研究构建了特异性敲除巨噬细胞MGLL小鼠,并利用其进一步构建结直肠癌腹腔种植转移模型,最后结合细胞生物学和高通量测序等方法探究巨噬细胞MGLL在小鼠结直肠癌细胞腹腔种植转移中的效应和机制。研究结果将为基于巨噬细胞的结直肠癌腹腔种植转移防治策略提供新的理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验用Neo delete阳性杂合子($MGLL^{flox/+}$)小鼠和组织特异性表达Cre(Lyz-Cre)小鼠,由广州赛业生物科技有限公司在C57BL/6品系基础上进行构建,两种小鼠各交付8周龄一雄一雌2只老鼠,饲养于陆军军医大学实验动物中心SPF级环境。

1.2 主要仪器及试剂

低温高速离心机(Thermo);PCR仪(BIO-RAD);水平电泳仪(BIO-RAD);流式细胞仪(Beckman);琼脂糖(LONZA);胰岛素注射器(BD);细胞培养瓶(康宁);DMEM基础培养基(Viva Cell);胎牛血清(BI);蛋白酶抑制剂(Roche);BCA检测试剂盒(碧云天);WB预制胶(ACE);MGLL抗体(Santa);TRIzon裂解液(康为世纪);巯基乙酸(北京奥博星);流式抗体(Biolegend)。

1.3 方法

1.3.1 MGLL敲除小鼠的构建及鉴定 由Neo delete阳性杂合子(flox/+)自交得到Neo delete阳性纯合子($MGLL^{flox/flox}$),将$MGLL^{flox/flox}$小鼠与组织特异性表达Cre小鼠(Lyz-Cre)进行杂交,获得$MGLL^{flox/flox}$-Lyz-Cre小鼠。对$MGLL^{flox/flox}$-Lyz-Cre小鼠进行繁殖。实验以$MGLL^{flox/flox}$小鼠为对照组,$MGLL^{flox/flox}$-Lyz-Cre小鼠为实验组。

待小鼠长到3~4周龄,取小鼠尾部1~2 mm,每个样本添加变性裂解液(NaOH,50 mmol/L)300 μL后放置于96 ℃金属浴中加热1~2 h,待鼠尾融化后从金属浴中取出,每个样品中加入Tris-Hcl(1 mol/L,pH=6.8)30 μL,混匀后作为PCR模板备用。用该DNA模板进行PCR反应后再进行琼脂糖凝胶电泳,最后根据电泳结果判断小鼠基因型。

1.3.2 PCR及琼脂糖凝胶电泳 用1.3.1中快速提取的DNA作为模板,按照25 μL的体系进行配制(表1)。$MGLL^{flox/flox}$和Lyz-Cre基因型鉴定体系(表2)分别如下:

表1 各基因型鉴定体系

基因型	$MGLL^{flox/flox}$	Lyz-Cre
ddH_2O/ uL	8	8.5
PremixTaq/μL	12.5	12.5
Mgll-F 或 Cre-F/μL	1	1
Mgll-R 或 Cre-R/μL	1	1
模板/μL	2.5	2
总体积/μL	25	25

表2 MGLL敲除小鼠基因型鉴定PCR扩增引物序列

编号	名称	序列(5′→3′)	产物长度/bp
1	Mgll-F	TGGAACAGAACAGAGCAAGCCAAAG	MT:434
	Mgll-R	GCACATCAACATCCCCACACACATA	WT:321
2	Cre-F	CATATTGGCAGAACGAAAACGC	Cre:413
	Cre-R	CCTGTTTCACTATCCAGGTTACGG	

上述体系加不同引物分别进行PCR反应。$MGLL^{flox/flox}$基因型反应程序为:94 ℃ 3 min;(94 ℃ 30 s,60 ℃ 35 s,72 ℃ 35 s)×33 cycles;72 ℃ 5 min;12~

16 ℃ forever。Lyz-Cre 基因型反应程序为:94 ℃ 3 min;(94 ℃ 30 s,56 ℃ 35 s,72 ℃ 35 s)×33 cycles;72 ℃ 5 min;12~16 ℃ forever。PCR 反应完成后,对反应产物进行琼脂糖凝胶电泳,并在凝胶成像系统中进行统计分析。

1.3.3 结直肠癌腹腔种植转移模型的构建 将小鼠结直肠癌 MC-38-luciferase 细胞复苏扩大培养,用胰酶消化,离心,弃上清后用 PBS 重悬,计数,冰上放置备用。用胰岛素注射器吸取 MC-38-luciferase(1×10^6 个细胞/只)细胞分别腹腔注射 $MGLL^{flox/flox}$ 组和 $MGLL^{flox/flox}$-Lyz-Cre 组小鼠后放置于原 SPF 级环境中饲养(自由取食,昼夜节律各 12 h),每 3 d 更换一次垫料、水和饲料。

1.3.4 动物活体成像技术 将腹腔种植转移造模小鼠在不同时间点从动物房中取出,按照说明书,腹腔注射配制好的荧光素酶底物(现配现用),待 5~8 min,将小鼠放置于活体成像配套气体麻醉仪中,小鼠麻醉后将小鼠腹部向上放置于活体成像检测仪载物台上,水平放置后选择适宜的程序采集并分析图像。

1.3.5 蛋白免疫印记实验(western blot) 将小鼠巨噬细胞取出后,PBS 洗 2 次,弃上清,加入含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液,冰上放置 10 min 使其充分裂解,离心取上清。用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度并标化后加入 loading buffer,将样品放置于 100 ℃金属浴中变性 10 min,备用。通过聚丙烯酰胺凝胶电泳将目的蛋白分开后,取出凝胶放置于活化的 PVDF 膜(0.22 μm)上,按照“三明治”结构将膜海绵、滤纸、凝胶、PVDF 膜、滤纸、海绵夹好,250 mA 恒流转膜 90 min,取出 PVDF 膜,封闭,一抗和二抗孵育完成后,滴加 ECL 显色液,在化学发光仪中显影分析。

1.3.6 原代腹腔巨噬细胞诱导和提取 小鼠腹腔注射 3%巯基乙酸 3 mL,4 d 后,腹腔巨噬细胞诱导成功。在超净台中提取腹腔巨噬细胞,并放置于含有适量完全培养基的 90 mm 细胞培养皿中,37 ℃ 5%CO_2 培养箱中培养 0.5~1 h,弃上清,用无菌 PBS 左右摇晃清洗 2 次,培养皿底部的贴壁细胞为腹腔巨噬细胞。

1.3.7 脂肪组织免疫细胞的提取及流式细胞术 将荷瘤小鼠颈椎脱臼处死并取出腹腔内脏脂肪,用剪刀将脂肪剪成 1 mm^3 左右的块状后放置于含有血清、Ⅳ胶原酶、透明质酸酶和 DNase 的 DMEM 基础培养基中,放置于磁力搅拌器上,在 37 ℃孵箱中消化至无颗粒状组织为止。终止消化,PBS 清洗,裂红,离心,弃上清后用 FCAS Buffer 重悬,冰上放置备用。

将小鼠脂肪组织中的免疫细胞制备成单细胞悬液,按照免疫细胞的标志物对不同类型的免疫细胞进行染色。染色终止后,用流式细胞仪检测,并使用 FlowJo 软件进行统计分析。

1.3.8 统计学分析 将需要分析数据导入 Graphpad prism 8.0 软件中,根据样品类型选择合适的分析方法,用 t 检验、ANOVA 方差分析或生存期等统计方法对数据进行统计分析。$P<0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

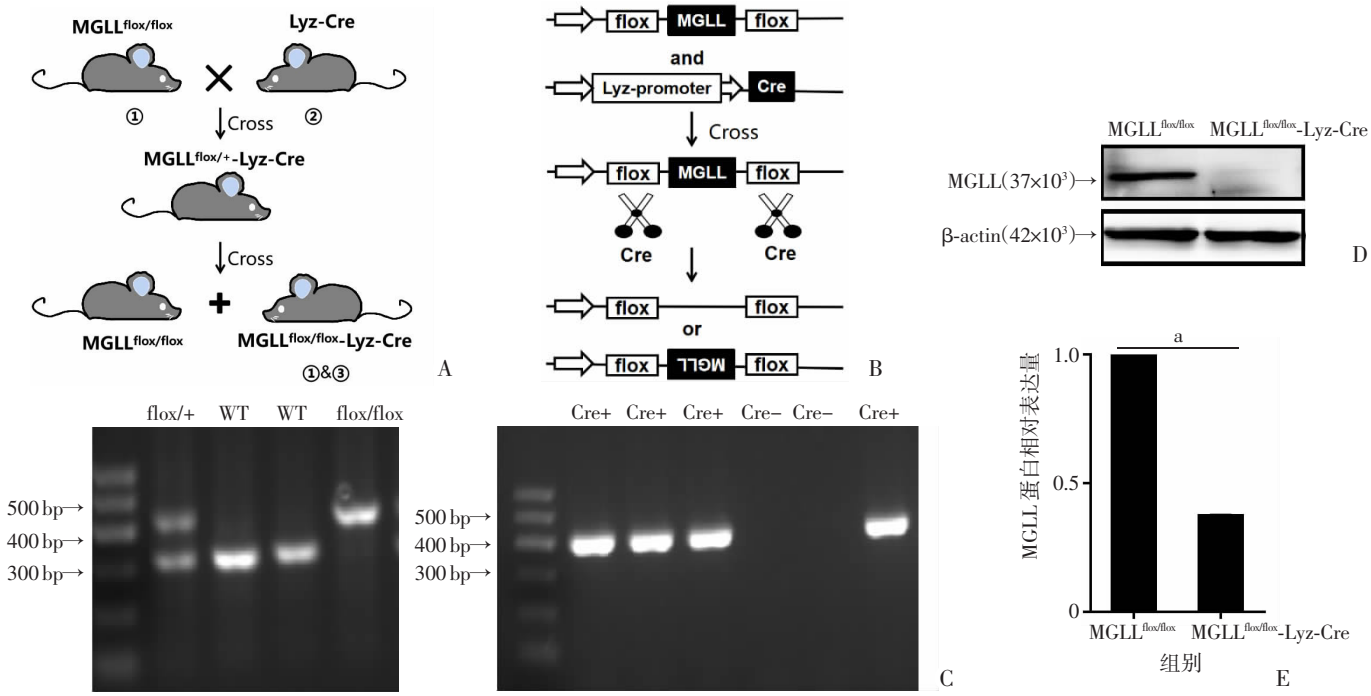
2 结果

2.1 巨噬细胞 MGLL 特异性敲除小鼠的构建和鉴定

首先构建了 C57BL/6 背景的 $MGLL^{flox/+}$ 小鼠,并将其与 Lyz-Cre 小鼠进行杂交繁殖,直至获得纯合 $MGLL^{flox/flox}$-Lyz-Cre 小鼠,繁殖策略及其基因型见图 1A~B。为了验证子代小鼠的基因型和检测巨噬细胞中 MGLL 的表达情况,利用 PCR 和球脂糖凝胶电泳实验对小鼠基因型进行鉴定(引物见表 2),结果显示:按照上述繁殖策略,可获得 $MGLL^{flox/flox}$ 及 $MGLL^{flox/flox}$-Lyz-Cre 小鼠(图 1C)。然后,我们分别提取 $MGLL^{flox/flox}$ 及 $MGLL^{flox/flox}$-Lyz-Cre 小鼠的腹腔巨噬细胞,并利用 western blot 检测 MGLL 表达情况,结果显示:相较于 $MGLL^{flox/flox}$ 小鼠巨噬细胞,$MGLL^{flox/flox}$-Lyz-Cre 小鼠巨噬细胞 MGLL 蛋白表达缺失(图 1D~E)。这些结果表明巨噬细胞 MGLL 特异性敲除小鼠构建成功。

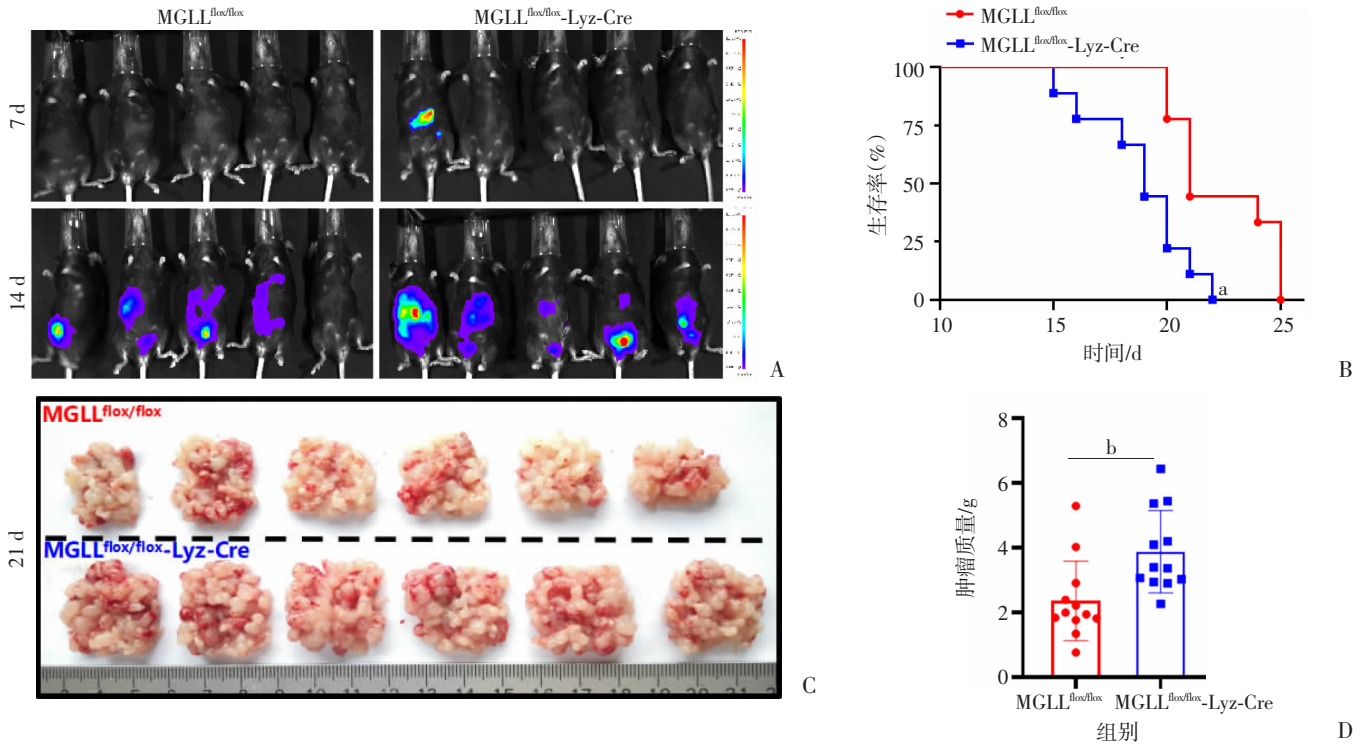
2.2 巨噬细胞 MGLL 缺失促进小鼠结直肠癌腹腔种植转移

为探究巨噬细胞 MGLL 缺失对小鼠 CRC-PM 的影响,分别在 $MGLL^{flox/flox}$ 和 $MGLL^{flox/flox}$-Lyz-Cre 小鼠上,通过腹腔注射 MC-38-luciferase 细胞以构建小鼠 CRC-PM 模型。然后,分别在 7 和 14 d,利用动物活体成像技术检测腹腔种植转移情况。结果显示:与 $MGLL^{flox/flox}$ 小鼠相比,$MGLL^{flox/flox}$-Lyz-Cre 小鼠腹腔荧光强度明显增高(图 2A)。同时观察记录小鼠死亡时间并进行生存期统计,结果显示:$MGLL^{flox/flox}$-Lyz-Cre 小鼠较 $MGLL^{flox/flox}$ 小鼠生存期显著缩短(图 2B)。最后,腹腔注射造模 21 d 后取腹腔内所有肿瘤进行大体观测(图 2C)并统计两组小鼠腹腔内肿瘤质量(图 2D)。结果显示:与 $MGLL^{flox/flox}$ 小鼠相比,$MGLL^{flox/flox}$-Lyz-Cre 小鼠腹腔内肿瘤重量显著增加($P<0.05$)。这些结果表明巨噬细胞 MGLL 缺失促进结直肠癌细胞腹腔种植转移。



A~B:MGLL$^{flox/flox}$-Lyz-Cre 和 MGLL$^{flox/flox}$ 小鼠繁殖策略及基因型示意图;C:小鼠基因型电泳结果　flox/+为 Neo delete 阳性杂合子,WT 为野生型,flox/flox 为 Neo delete 阳性纯合子,Cre+为携带 Cre 基因,Cre-为不携带 Cre 基因;D~E:MGLL$^{flox/flox}$-Lyz-Cre 和 MGLL$^{flox/flox}$ 小鼠巨噬细胞 MGLL 蛋白水平及相对表达量　a:$P<0.01$

图 1　巨噬细胞 MGLL 特异性敲除小鼠的构建和鉴定



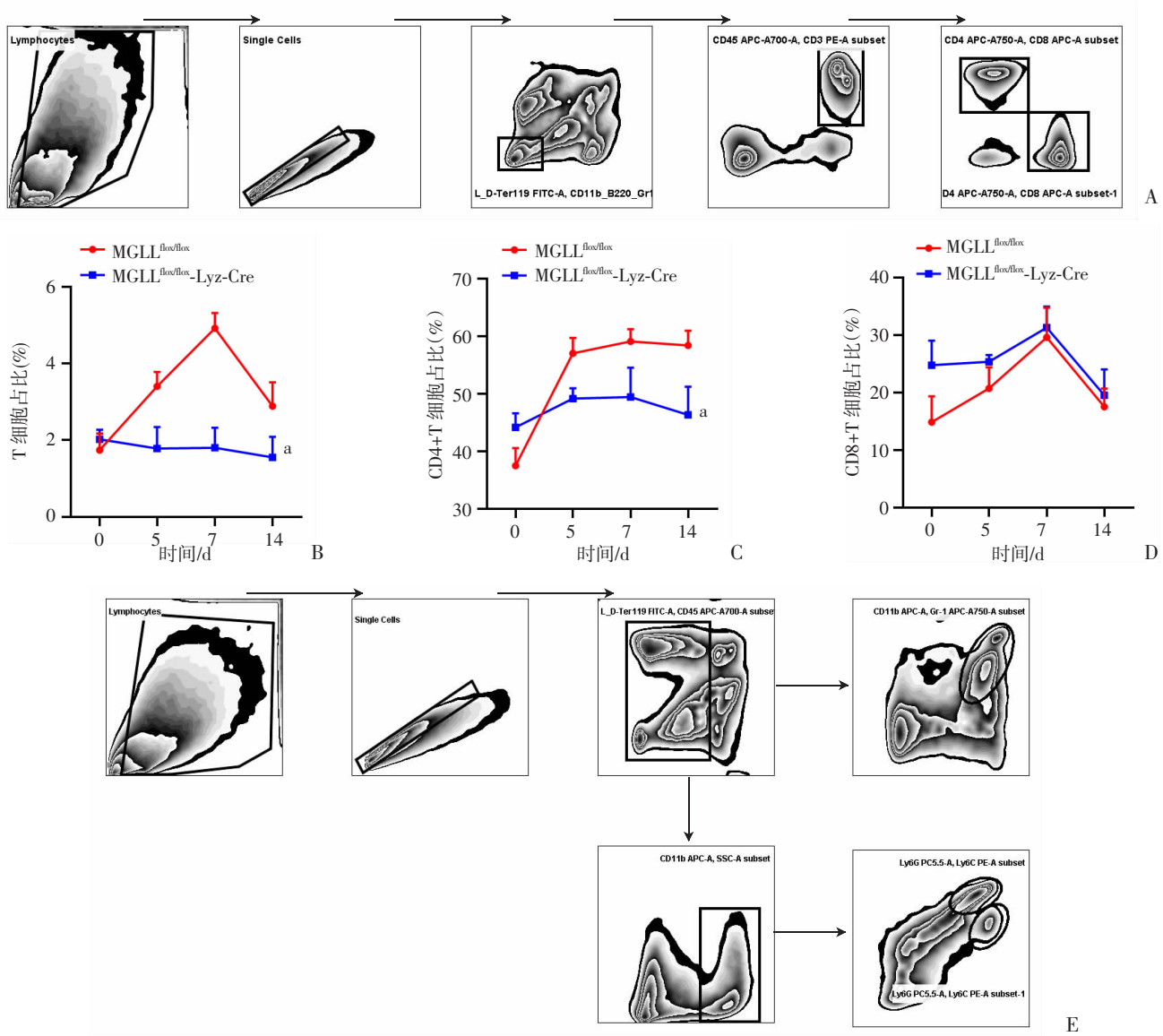
a:$P<0.01$,与 MGLL$^{flox/flox}$ 组比较;b:$P<0.05$

A:MGLL$^{flox/flox}$ 和 MGLL$^{flox/flox}$-Lyz-Cre 小鼠 CRC-PM 模型活体成像图(7、14 d);B:MGLL$^{flox/flox}$ 和 MGLL$^{flox/flox}$-Lyz-Cre 小鼠 CRC-PM 模型生存期统计图;C:MGLL$^{flox/flox}$-Lyz-Cre 和 MGLL$^{flox/flox}$ 小鼠 CRC-PM 模型肿瘤大体图;D:肿瘤质量统计图

图 2　巨噬细胞 MGLL 缺失促进结直肠癌细胞腹腔种植转移

2.3 巨噬细胞 MGLL 缺失抑制抗肿瘤免疫能力

肿瘤微环境对肿瘤恶性进展起至关重要的作用。其中重要的效应细胞包括 T 细胞和骨髓来源的免疫抑制(MDSCs)细胞。且研究表明,内脏脂肪是 CRC-PM 的重要靶组织。因此,为探究 T 细胞和 MDSCs 是否参与巨噬细胞 MGLL 缺失介导的促 CRC-PM 效应,分别在模型构建 0、5、7 和 14 d,利用流式细胞术检测小鼠内脏脂肪血管基质组分(stromal vascular fraction,SVF)中 T 细胞(图 3A)和 MDSCs(图 3E)占比变化情况,结果显示:与 $MGLL^{flox/flox}$ 小鼠相比,$MGLL^{flox/flox}$-Lyz-Cre 小鼠脂肪 SVF T 细胞总量占比显著降低($P<0.05$,图 3B),CD4+T 细胞亚型占比也显著降低($P<0.05$,图 3C),而 CD8+T 细胞无显著性差异($P>0.05$,图 3D)。与此同时,相较于 $MGLL^{flox/flox}$ 小鼠,$MGLL^{flox/flox}$-Lyz-Cre 小鼠内脏脂肪 MDSCs 总量及亚型占比无显著变化($P>0.05$,图 3F~H)。上述结果表明巨噬细胞 MGLL 缺失会降低肿瘤微环境中 T 细胞及其亚型 CD4+T 细胞占比,抑制抗肿瘤免疫。

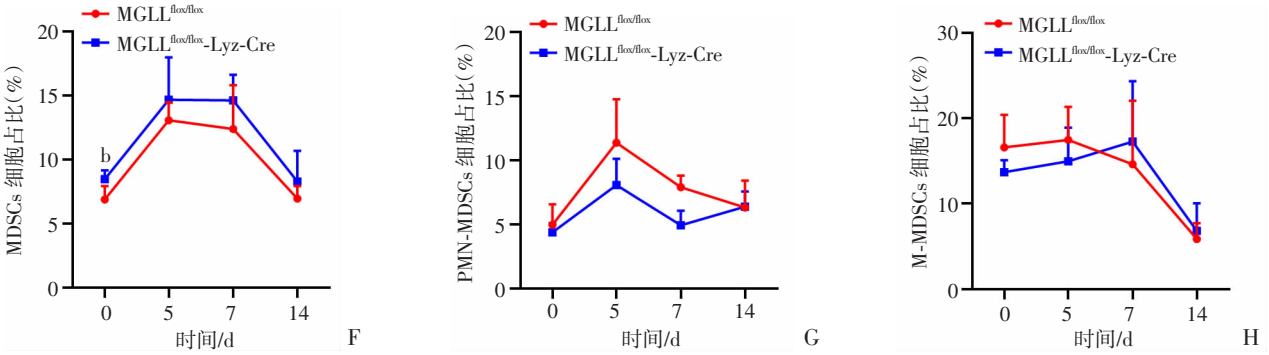


a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与 $MGLL^{flox/flox}$ 组比较

A:小鼠脂肪 SVF 流式细胞术检测 T 细胞分析策略;B~D:小鼠 CRC-PM 模型不同时间点脂肪 SVF T 细胞(CD45+CD3+)、CD4(CD45+CD3+CD4+)和 CD8(CD45+CD3+CD8+)亚型占比;E. 小鼠脂肪 SVF 流式细胞术检测 MDSCs 细胞分析策略

图 3 巨噬细胞 MGLL 缺失抑制肿瘤免疫

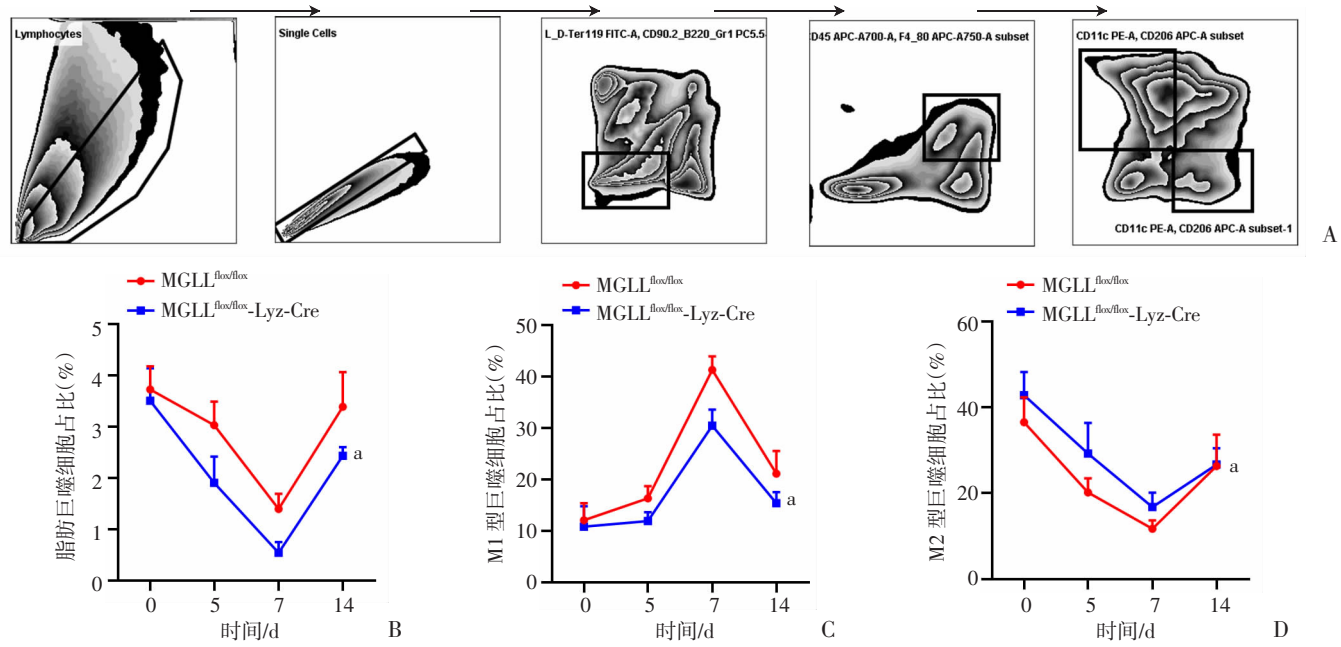
(图 3F、G、H 续下页)



a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与 MGLL$^{flox/flox}$ 组比较

F~H:小鼠 CRC-PM 模型不同时间点 MDSCs(CD45+Gr1+CD11b+)细胞、PMN-MDSCs(CD45+CD11b+Ly6G+)和 M-MDSCs(CD45+CD11b+Ly6C^{hig})亚型占比统计

续图 3 巨噬细胞 MGLL 缺失抑制肿瘤免疫



A:小鼠脂肪 SVF 流式细胞术检测巨噬细胞分析策略;B~D:小鼠 CRC-PM 模型不同时间点脂肪 SVF 巨噬细胞(CD45+F4/80+)、M1(CD45+F4/80+CD11c+)和 M2(CD45+F4/80+CD206+)亚型占比 a:$P<0.05$,与 MGLL$^{flox/flox}$ 组比较

图 4 MGLL 缺失促进巨噬细胞向 M2 极化

2.4 MGLL 缺失促进 TAMs 向 M2 型极化

巨噬细胞异质性参与 T 细胞数量及功能调控。为了进一步探究巨噬细胞 MGLL 缺失如何介导 T 细胞的改变,在腹腔注射结直肠癌细胞后 0、5、7 和 14 d 后,利用流式细胞术检测小鼠内脏脂肪 SVF 中巨噬细胞极化情况(图 4A),结果显示:较 MGLL$^{flox/flox}$ 小鼠相比,MGLL$^{flox/flox}$-Lyz-Cre 小鼠腹腔脂肪中的 M1 型巨噬细胞占比显著降低($P<0.05$,图 4B~C),而 M2 型巨噬细胞占比显著增高($P<0.05$,图 4D)。这些结果表明巨噬细胞 MGLL 缺失促进 TAMs 向 M2 型极化。

2.5 MGLL 缺失促进 TAMs 向 M2 型极化的分子机制

为了解析 MGLL 缺失促进 TAMs 向 M2 型极化的具体分子机制,分别提取 MGLL$^{flox/flox}$ 和 MGLL$^{flox/flox}$-Lyz-Cre 小鼠腹腔巨噬细胞,进行 RNA-Seq 高通量测序。结果显示:两组小鼠巨噬细胞间差异基因共 257 个,与 MGLL$^{flox/flox}$ 小鼠相比,MGLL$^{flox/flox}$-Lyz-Cre 小鼠腹腔巨噬细胞上调 176 个基因,下调 81 个基因(图 5A)。进一步对两组小鼠巨噬细胞间差异基因进行 GO 及 KEGG 分析(图 5B~C)均提示 TLRs 信号通路,特别是其下游的 NFκ-B 信号通路显著改变,这与我们的前期

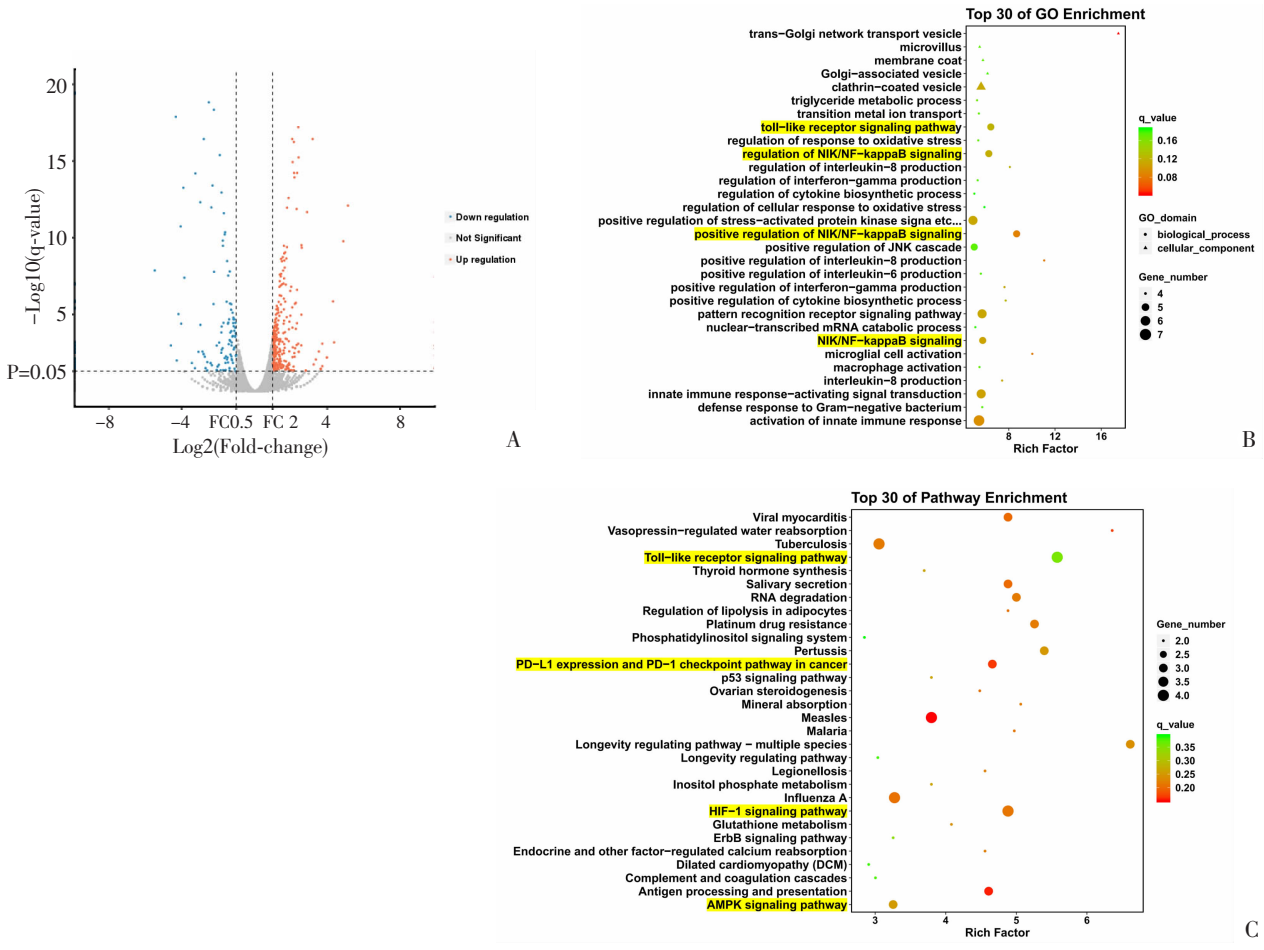
研究相一致。同时,KEGG 分析提示:PD-1/PDL-1、HIF-1 以及 AMPK 等信号通路也发生显著改变。

研究表明,在肺癌中,PDL-1 表达水平升高促进巨噬细胞向 M2 极化,导致肿瘤细胞免疫逃逸。此外,人前列腺肿瘤细胞通过上调巨噬细胞 HIF-1α 表达水平促进其向 M2 极化。AMPK 作为调控能量稳态的重要激酶,与脂质代谢密切相关。在肺癌中,通过阻断巨噬细胞中的 AMPK 信号可以抑制巨噬细胞向 M2 型极化。因此推测:MGLL 缺失可能通过调控 PD-1/PDL-1、HIF-1 以及 AMPK 信号通路进而促进 TAMs 向 M2 型极化。

3 讨论

结直肠癌是危害人类健康的重大疾病,而结直肠癌的腹腔种植转移在临床上被认为是结直肠癌的晚期阶段,目前尚无有效的防治策略。研究表明肿瘤微环境在肿瘤的恶性进展中起重要作用[4]。TAMs 作为肿瘤微环境中数量最多的免疫细胞,与肿瘤的转移密切相关[8]。而其功能又依赖于异质性,不同亚型的巨噬细胞在肿瘤转移中发挥不同的作用[9]。因此,通过调控不同亚型巨噬细胞间的功能转化可以成为潜在的肿瘤转移治疗策略,然而巨噬细胞功能转换的机制尚不清楚。

代谢重编程可以调控巨噬细胞的功能转化[10]。研究表明:在肥胖小鼠模型中,葡萄糖-6-磷酸脱氢酶介导的糖代谢重编程调控巨噬细胞功能[11]。在肝癌中,色氨酸含量变化介导的氨基酸代谢重编程可通过诱导 TAMs 产生大量的吲哚胺 2,3-双加氧酶(indoleamine-2,3-dioxygenase, IDO),进而抑制 T 细胞功能[12]。此外,研究也表明:脂质代谢重编程参与肿瘤相关巨噬细胞的极化,特别是 M2 型巨噬细胞的极化[13-15]。在败血症中,巨噬细胞信号素 7A(semaphorin 7A, Sema7A)通过激活 mTOR 和 AKT2 信号通路介导脂质代谢重编程进而促进其向 M2 极化[16]。但是在结肠癌腹腔种植转移中,脂质代谢重编程在巨噬细胞中的效应有待揭示。



A:火山图;B:GO 分析;C:KEGG 分析

图 5 MGLL 缺失促进巨噬细胞向 M2 极化机制的初步分析

MGLL 是脂肪酸分解代谢中的重要酶,其主要生理功能是将单酰甘油脂肪分解为游离脂肪酶和甘油及水解 2-花生四烯酸甘油(2-arachidonoylglycerol, 2-AG),为机体供能和调节体内大麻素系统信号转导[17]。肿瘤细胞的 MGLL 表达水平与其活性与肿瘤转移也密切相关。如在人前列腺癌中,MGLL 的激活促进人前列腺癌细胞的侵袭[18];在鼻咽癌和在黑色素瘤中,MGLL 表达水平增加均可促进癌细胞的转移[19-20]。机制研究表明,MGLL 在肿瘤中主要发挥代谢酶的功能,可通过其水解产物-游离脂肪酸来维持肿瘤细胞中不同致癌脂质信号水平,如 LPA、PEG2 和溶血磷脂酰胆碱等,最终促进肿瘤的侵袭和转移[17, 21]。此外,课题组前期的研究表明,在结直肠癌皮下荷瘤和血行转移模型中,MGLL 表达抑制介导的巨噬细胞脂质代谢重编程可促进结直肠癌的转移[5]。这些证据表明,MGLL 介导的脂质代谢在肿瘤恶性进展中确实发挥重要作用。

本研究发现,在结直肠癌腹腔种植转移中,巨噬细胞 MGLL 表达缺失促进结直肠癌的腹腔种植转移。进一步研究发现,与 MGLL 直接影响肿瘤活性不同,巨噬细胞 MGLL 缺失会降低肿瘤微环境中 T 细胞及其亚型 CD4+T 细胞占比进而抑制抗肿瘤免疫。而这可能与巨噬细胞 MGLL 缺失促进了 TAMs 向 M2 型分化相关。为进一步探索巨噬细胞 MGLL 缺失促进肿瘤相关巨噬细胞向 M2 极化的具体机制,随后进行的 RNA-Seq 高通量测序分析提示:MGLL 缺失可能通过调控 PD-1/PDL-1、HIF-1 以及 AMPK 信号通路进而促进脂肪巨噬细胞向 M2 极化[22-24],这进一步细化了 MGLL 作用机制。

同时,本研究也存在不足之处,虽然对巨噬细胞 MGLL 敲除后促进结直肠腹腔种植转移的具体机制进行了测序分析,但尚未对测序结果进行实验验证,下一步将结合文献提示和测序结果分析对测序结果进行验证。其次,由于目前的实验结果仅在小鼠上得到证明,需进一步在临床标本上验证关键靶点与通路。

参考文献:

[1] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, *et al*. Cancer statistics, 2022[J]. CA Cancer J Clin, 2022, 72(1): 7-33. DOI: 10.3322/caac.21708.

[2] KOPPE M J, BOERMAN O C, OYEN W J, *et al*. Peritoneal carcinomatosis of colorectal origin: incidence and current treatment strategies[J]. Ann Surg, 2006, 243(2): 212-222. DOI: 10.1097/01.sla.0000197702.46394.16.

[3] BREUER E, HEBEISEN M, SCHNEIDER M A, *et al*. Site of recurrence and survival after surgery for colorectal peritoneal metastasis[J]. J Natl Cancer Inst, 2021, 113(8): 1027-1035. DOI: 10.1093/jnci/djab001.

[4] WU T, DAI Y. Tumor microenvironment and therapeutic response[J]. Cancer Lett, 2017, 387: 61-68. DOI: 10.1016/j.canlet.2016.01.043.

[5] CIARDIELLO F, CIARDIELLO D, MARTINI G, *et al*. Clinical management of metastatic colorectal cancer in the era of precision medicine[J]. CA Cancer J Clin, 2022, 72(4): 372-401. DOI: 10.3322/caac.21728.

[6] XIANG W, SHI R C, KANG X, *et al*. Monoacylglycerol lipase regulates cannabinoid receptor 2-dependent macrophage activation and cancer progression[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 2574. DOI: 10.1038/s41467-018-04999-8.

[7] DI FRANCO S, BIANCA, SARDINA D S, *et al*. Adipose stem cell niche reprograms the colorectal cancer stem cell metastatic machinery[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 5006. DOI: 10.1038/s41467-021-25333-9.

[8] QIAN B Z, POLLARD J W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis[J]. Cell, 2010, 141(1): 39-51. DOI: 10.1016/j.cell.2010.03.014.

[9] GUERRIERO J L. Macrophages: the road less traveled, changing anticancer therapy[J]. Trends Mol Med, 2018, 24(5): 472-489. DOI: 10.1016/j.molmed.2018.03.006.

[10] BATISTA-GONZALEZ A, VIDAL R, CRIOLLO A, *et al*. New insights on the role of lipid metabolism in the metabolic reprogramming of macrophages[J]. Front Immunol, 2019, 10: 2993. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02993.

[11] HAM M, LEE J W, CHOI A H, *et al*. Macrophage glucose-6-phosphate dehydrogenase stimulates proinflammatory responses with oxidative stress[J]. Mol Cell Biol, 2013, 33(12): 2425-2435. DOI: 10.1128/MCB.01260-12.

[12] ZHAO Q Y, KUANG D M, WU Y, *et al*. Activated CD69+ T cells foster immune privilege by regulating IDO expression in tumor-associated macrophages[J]. J Immunol, 2012, 188(3): 1117-1124. DOI: 10.4049/jimmunol.1100164.

[13] KANG S J, NAKANISHI Y, KIOI Y, *et al*. Semaphorin 6D reverse signaling controls macrophage lipid metabolism and anti-inflammatory polarization[J]. Nat Immunol, 2018, 19(6): 561-570. DOI: 10.1038/s41590-018-0108-0.

[14] SU P, WANG Q, BI E G, *et al*. Enhanced lipid accumulation and metabolism are required for the differentiation and activation of tumor-associated macrophages[J]. Cancer Res, 2020, 80(7): 1438-1450. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-19-2994.

[15] MARTINEZ F O, GORDON S, LOCATI M, *et al*. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression[J]. J Immunol, 2006, 177(10): 7303-7311. DOI: 10.4049/jimmunol.177.10.7303.

[16] KÖRNER A, BERNARD A, FITZGERALD J C, *et al*.

Sema7A is crucial for resolution of severe inflammation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2021, 118(9): e2017527118. DOI: 10.1073/pnas.2017527118.

[17] GIL-ORDÓÑEZ A, MARTÍN-FONTECHA M, ORTEGA-GUTIÉRREZ S, *et al*. Monoacylglycerol lipase (MAGL) as a promising therapeutic target[J]. Biochem Pharmacol, 2018, 157: 18-32. DOI: 10.1016/j.bcp.2018.07.036.

[18] NOMURA D K, LOMBARDI D P, CHANG J W, *et al*. Monoacylglycerol lipase exerts dual control over endocannabinoid and fatty acid pathways to support prostate cancer[J]. Chem Biol, 2011, 18(7): 846-856. DOI: 10.1016/j.chembiol.2011.05.009.

[19] HU W R, LIAN Y F, PENG L X, *et al*. Monoacylglycerol lipase promotes metastases in nasopharyngeal carcinoma[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(7): 3704-3713.

[20] BABA Y, FUNAKOSHI T, MORI M, *et al*. Expression of monoacylglycerol lipase as a marker of tumour invasion and progression in malignant melanoma[J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2017, 31(12): 2038-2045. DOI: 10.1111/jdv.14455.

[21] NOMURA D K, LONG J Z, NIESSEN S, *et al*. Monoacylglycerol lipase regulates a fatty acid network that promotes cancer pathogenesis[J]. Cell, 2010, 140(1): 49-61. DOI: 10.1016/j.cell.2009.11.027.

[22] ZHANG Y, DU W W, CHEN Z L, *et al*. Upregulation of PD-L1 by SPP_1 mediates macrophage polarization and facilitates immune escape in lung adenocarcinoma[J]. Exp Cell Res, 2017, 359(2): 449-457. DOI: 10.1016/j.yexcr.2017.08.028.

[23] WU J Y, HUANG T W, HSIEH Y T, *et al*. Cancer-derived succinate promotes macrophage polarization and cancer metastasis *via* succinate receptor[J]. Mol Cell, 2020, 77(2): 213-227.e5. DOI: 10.1016/j.molcel.2019.10.023.

[24] XU F, CUI W Q, WEI Y, *et al*. Astragaloside IV inhibits lung cancer progression and metastasis by modulating macrophage polarization through AMPK signaling[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37(1): 207. DOI: 10.1186/s13046-018-0878-0.

(**收稿**:2022-09-26;**修回**:2022-10-13)

(编辑 刘秋池)