

· 肿瘤专题研究 ·

# 微生物通过巨噬细胞 RIG-I 乳酸化修饰促进结直肠癌肝转移的机制研究

朱晓文, 岳磊, 赵文虎, 古鉴, 钱晓峰\*

南京医科大学第一附属医院普通外科, 江苏 南京 210029

**[摘要]** **目的:**探讨微生物在结直肠癌肝转移(colorectal cancer liver metastases, CRLM)的作用及潜在机制。**方法:**对结直肠癌肝转移患者的结肠肿瘤及肝脏肿瘤行16S rDNA测序分析。建立小鼠结直肠癌肝转移模型,分别用抗生素、大肠杆菌、乳酸脱氢酶抑制剂、氯膦酸盐脂质体处理,24 d后获取肝脏肿瘤组织行HE染色、免疫荧光染色、乳酸浓度及微生物丰度检测。将大肠杆菌与MC38细胞按100:1共培养,CCK8检测细胞增殖能力,Seahorse检测细胞外酸化率,比色法检测乳酸浓度。分别用乳酸、乳酸化修饰抗体、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor alpha, TNF- $\alpha$ )处理小鼠骨髓来源巨噬细胞,免疫荧光检测其CD206、iNOS的表达水平,qPCR检测其iNOS、CD86、CD163、ARG的水平,Western blot检测乳酸化修饰水平及核因子 $\kappa$ B(nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa$ B)的表达情况。**结果:**CRLM患者中结肠及肝脏肿瘤中存在微生物,优势物种相似。微生物促进小鼠CRLM,并发现肿瘤内巨噬细胞呈M2样极化,而清除巨噬细胞后肝转移瘤减少。微生物不能增强肿瘤细胞的增殖能力,但可升高肿瘤糖酵解及乳酸水平,同时抑制乳酸脱氢酶后小鼠肝转移瘤减少。乳酸可诱导巨噬细胞向M2极化及乳酸化修饰,并发现视黄酸诱导基因I(retinoic acid-inducible gene I, RIG-I)的去乳酸化可抑制乳酸对巨噬细胞的极化作用;RIG-I下游NF- $\kappa$ B的表达在乳酸处理后减弱;NF- $\kappa$ B激动剂TNF- $\alpha$ 可抑制巨噬细胞向M2极化。**结论:**微生物促进瘤内乳酸形成,通过对巨噬细胞RIG-I<sup>lys852</sup>乳酸化修饰诱导其极化为M2,调控结直肠癌肝转移。

**[关键词]** 微生物;乳酸化修饰;巨噬细胞;结肠癌肝转移**[中图分类号]** R735.37**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2022)12-1664-09**doi:** 10.7655/NYDXBNS20221204

## The mechanism of microbes promoting colorectal cancer liver metastases via macrophage RIG-I lactylation

ZHU Xiaowen, YUE Lei, ZHAO Wenhui, GU Jian, QIAN Xiaofeng\*

Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the role of microbes in colorectal cancer liver metastases (CRLM) and the underlying mechanisms. **Methods:** 16S rDNA sequencing was performed on colon tumors and liver tumors in CRLM patients. The mouse model of CRLM was established and treated with antibiotics, *Escherichia coli* (*E. coli*), lactate dehydrogenase inhibitor and clodronate liposome. After 24 days, the liver tumor tissues were obtained for HE staining, immunofluorescence staining and detection of lactate concentration and microbial abundance. *E. coli* and MC38 cells were co-cultured at 100:1. The cell proliferation, the extracellular acidification rate (ECAR) and concentration of lactate was determined by CCK8, Seahorse and colorimetry respectively. Macrophages (M $\emptyset$ ) derived from mouse bone marrow were treated with lactate, lactylation antibody and TNF- $\alpha$  respectively. The expression levels of CD206 and iNOS were detected by immunofluorescence; the mRNA levels of iNOS, CD86, CD163 and ARG were detected by qPCR; The lactylation level and NF- $\kappa$ B expression were detected by Western Blot. **Results:** There were microbes in colon and liver tumors in CRLM patients and the dominant species were similar. Microbiota promoted liver metastasis of colorectal cancer in mice and M $\emptyset$  was found to be M2-like polarized, while the liver metastases decreased after depletion of M $\emptyset$ . Microbiota could not enhance the proliferation of tumor cells, but could increase the level of tumor glycolysis and lactate and inhibition of lactate dehydrogenase could

**[基金项目]** 国家自然科学基金(82171759)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: xiaofeng\_qian\_doc@163.com

reduce liver metastases in mice. Lactate could induce M $\phi$  polarization to M2 and lactylation. RIG-I<sup>lys852</sup> was found to inhibit the polarization of M $\phi$  induced by lactate; the expression of NF- $\kappa$ B was decreased after macrophage treated with lactate; TNF- $\alpha$  could inhibit M $\phi$  polarization to M2. **Conclusion:** Microbes enhance the level of glycolysis and lactate in tumor and promote liver metastasis of colorectal cancer via macrophage RIG-I lactylation.

[Key words] microbiota; macrophage; lactylation; colorectal cancer liver metastasis

[J Nanjing Med Univ, 2022, 42(12): 1664-1672]

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是最常见的消化系统肿瘤之一,结直肠癌肝转移(colorectal cancer liver metastases, CRLM)是CRC最常见的转移方式,也是其致死的主要因素。研究已表明,15%~25%的CRC患者在确诊同时伴有肝转移,另有20%~30%的患者在原发灶切除术后出现肝转移;CRLM患者的5年生存率明显低于无转移的早期CRC患者<sup>[1]</sup>。在治疗方面,转移灶切除是治疗CRLM患者的唯一治愈手段,但超过75%的患者亦可出现术后复发<sup>[2]</sup>;现有的标准化疗方案使得部分患者受益,然而仍有部分患者会出现化疗耐药<sup>[3]</sup>;而新型靶向药物,免疫治疗等对提高患者长期存活效果不明显。因此,阐明CRLM发生发展的分子机制是CRLM治疗领域亟待解决的核心问题。

CRLM的发生机制主要包括肿瘤的器官倾向性、上皮间质转化、血管生成及肿瘤微环境<sup>[4]</sup>。近年来研究发现微生物存在于肿瘤微环境中,并是其重要组成部分。微生物主要通过诱导基因突变、调节致癌基因和免疫系统来促进肿瘤进展<sup>[5]</sup>。已有报道证实微生物参与调控CRC发生发展,如Liu等<sup>[6]</sup>报道肿瘤内微生物群的异质性直接与CRC的发生相关;CRC内微生物可通过干扰素基因刺激因子(stimulator of interferon genes, STING)信号调控抗肿瘤治疗效果<sup>[7]</sup>;Triner等<sup>[8]</sup>证实中性粒细胞通过限制微生物抑制小鼠结肠癌肿瘤生长。此外,在CRC中,细菌还可以突破肠道血管屏障定植到肝脏,招募先天免疫细胞如巨噬细胞,创造促肿瘤炎症环境,形成有利于癌细胞播种的转移前生态位,促进了CRLM的形成<sup>[9]</sup>。

巨噬细胞是肿瘤微环境中最丰富的浸润性免疫细胞,可极化为M1和M2两种细胞表型,M1以促炎为主,具有抗菌和免疫刺激特性;而M2以抑炎为主,具有抑制T细胞反应,促进肿瘤细胞生长、侵袭和转移的功能。肿瘤微环境代谢中调节巨噬细胞的主要是乳酸和腺苷。乳酸(lactate, Lac)是糖酵解的最终产物,积累的Lac与多种细胞过程密切相关,

例如血管生成、缺氧、细菌刺激、巨噬细胞极化和T细胞活化等,同时也与多种疾病有紧密联系,包括肿瘤形成、败血症和自身免疫性疾病等。Lac主要通过其代谢功能发挥作用,如Lac可以被肿瘤细胞吸收转运至线粒体进行氧化磷酸化并提供能量;但近期研究报道组蛋白赖氨酸乳酸化修饰作为Lac的非代谢功能参与感染、肿瘤发生发展等病理过程<sup>[10]</sup>,如组蛋白H3K18的乳酸化修饰通过调控YTH结构域家族蛋白2(YTH domain-containing family protein 2, YTHDF2)的表达促进眼黑色素瘤的发生与发展<sup>[11]</sup>。本研究旨在探讨微生物对CRLM的影响及机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

结肠肿瘤及肝脏肿瘤组织样本来自南京医科大学第一附属医院因同时性结肠癌肝转移行结肠癌根治术及肝部分切除术的患者,获取组织并标记好患者信息,在液氮中冷冻转运,放置于-80℃深低温冰箱长期保存。

本研究使用的6~8周雄性C57BL/6小鼠,饲养条件为22℃恒温恒湿,12 h/12 h昼夜交替光照,饲养笼独立通风,饮食水不限。

DMEM细胞培养基, RPMI细胞培养基,胎牛血清,青霉素-链霉素双抗(Gibco公司,美国);巨噬细胞集落刺激因子(macrophage-stimulating factor, M-CSF)、脂多糖、Lac、氯膦酸二钠脂质体(clodronate liposome, Clod-Lip)(Sigma公司,美国);乳酸脱氢酶抑制剂(lactate dehydrogenase inhibitor, LDHi)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor alpha, TNF- $\alpha$ )(Med Chem Express公司,美国);大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)(河北北纳生物公司);iNOS、CD206等PCR引物(Invitrogen公司,美国);HE染色试剂盒、免疫组化试剂盒、DAB显色试剂盒(浙江迈新公司);RNA逆转录试剂盒、SYBR<sup>®</sup>Premix Ex Taq<sup>™</sup>(南京诺唯赞生物公司);蛋白裂解液、蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂、聚丙烯酰胺凝胶配置试剂盒(南通碧云

天生物公司);Lac 测定试剂盒(南京建成公司);BCA 蛋白定量试剂盒(Biosharp 公司,中国);NF- $\kappa$ B (AF5006)兔单抗、羊抗兔多克隆 IgG(#S0001)(Affinity Biosciences 公司,美国)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 16S rDNA 测序

取 40~70 mg 肿瘤组织,CTAB 法提取总 DNA 后用 Qubit 检查基因组 DNA 的质量和浓度。对 16 S rRNA 基因的可变区 V2、V3、V5、V6、V8 进行多重扩增,在 Illumina Novaseq 6000 平台进行测序,最后使用 QIIME 软件处理测序数据。

### 1.2.2 小鼠 CRLM 模型建立及分组

取 6~8 周雄性 C57BL/6 小鼠,麻醉后行左上腹横行切口,打开腹腔,于腹外侧游离并显露脾脏,用 1 mL 注射器从脾下极平行进针约 3 mm,注入 MC38 肿瘤细胞悬液至脾被膜下,肿瘤细胞悬液浓度为  $1 \times 10^6$  个/mL,每只注入 0.1 mL,见注射部位脾被膜发白肿胀后拔出针头,压迫止血 2 min,逐层关腹。共分为 5 组:①对照组(Con 组);②抗生素组(Abx 组):将抗生素复合物(氨苄青霉素 1 g/L,万古霉素 500 mg/L,新霉素 1 g/L,甲硝唑 1 g/L)放入小鼠饮用水中混匀,持续饮用至建模结束;③*E.coli*组:建模第 11~15 天抗生素处理(同上)后,第 19~21 天 *E.coli* ( $1 \times 10^9$  CFU/mL) 100  $\mu$ L 灌胃;LDHi 组:④第 7 天开始按照 6 mg/kg 予以灌胃,持续至建模结束;⑤ Clod-Lip4 组:建模前 1 d 腹腔注射 200  $\mu$ L,后间隔 3 d 给药,直至建模结束。第 24 天处死小鼠,收集肝脏组织,每个实验组的样本量为 5。计算肝表面转移结节体积[用直尺测量肿瘤的长径和短径(cm),代入公式计算肿瘤体积: $V(\text{cm}^3)=0.5 \times \text{长径} \times \text{短径}^2$ ],并将转移肝组织做病理切片及 HE 染色。

### 1.2.3 骨髓来源巨噬细胞(bone marrow derived macrophages, BMDM)培养及分组

脱颈处死小鼠,分离股骨和胫骨。剥除骨骼上附着组织,用 DMEM 完全培养基将骨髓冲入 50 mL 离心管,1 250 r/min,离心 5 min。加入红细胞裂解液混匀,再次离心,加入含有 M-CSF 的 DMEM 完全培养液,以  $1 \times 10^6$  个/mL 密度铺在 6 孔板上,添加培养基,置于 37  $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱内培养,第 4 天换液,第 7 天观察细胞形态及贴壁情况。根据已发表文献结合 String 数据库查找与巨噬细胞有关的乳酸化位点并定制抗体 RIG-I<sup>lys852</sup> Ab、HMGB1<sup>lys88</sup> Ab 和 HMGB1<sup>lys114</sup> Ab。处理分为 6 组:①对照组(Con);②乳酸组(15 mmol/L Lac);③ RIG-I<sup>lys852</sup> Ab 组 (15 mmol/L Lac + RIG-I<sup>lys852</sup> Ab

3.7 mg/mL);④ HMGB1<sup>lys88</sup> Ab 组 (15 mmol/L Lac + HMGB1<sup>lys88</sup> Ab 3.8 mg/mL);⑤ HMGB1<sup>lys114</sup> Ab 组 (15 mmol/L Lac + HMGB1<sup>lys114</sup> Ab 1.6 mg/mL);⑥ TNF- $\alpha$  组 (15 mmol/L Lac + 50 ng/mL TNF- $\alpha$ )。置于 37  $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱内培养 24 h 后收集细胞蛋白或 RNA 进行下一步实验。

### 1.2.4 细菌感染 MC38 细胞模型

用 RPMI 完全培养基培养 MC38 细胞,根据细胞数量,调整细菌与 MC38 细胞之比为感染复数=100:1,在 37  $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱内,*E.coli* 与 MC38 细胞共培养。

### 1.2.5 CCK8 实验

将 MC38 细胞接种于 96 孔板上,每孔加入 100  $\mu$ L 细胞悬液(细胞数约  $5 \times 10^3$  个)。按上述建立 *E.coli* 感染 MC38 细胞共培养模型为实验组,以无细菌感染 MC38 细胞为对照组,每组设立 5 个复孔,每孔加入 10  $\mu$ L CCK8 检测液,孵育 2 h,酶标仪在 450 nm 处检测吸光值。

### 1.2.6 细胞外酸化率(extracellular acidification rate, ECAR)

将上述共培养细胞制成细胞悬液,每孔接种 80  $\mu$ L(细胞数约  $1 \times 10^4$  个)至 Seahorse 专用 96 孔板。室温静置 1 h,放入培养箱继续培养 23 h。分别向探针板 A、B 和 C 孔加入葡萄糖、寡霉素和 2-脱氧核糖各 25  $\mu$ L,校正探针板后,加入细胞培养板检测。

### 1.2.7 Lac 浓度的测定

将肿瘤组织制备成组织匀浆,按照说明书配置酶工作液、显色剂。依次在酶标板上加入样本、酶工作液、显色剂,37  $^{\circ}$ C 孵育 10 min,随后加入终止剂终止反应。取反应液 250  $\mu$ L,设置酶标仪波长 530 nm,读数。

### 1.2.8 组织病理学分析

切除肝脏组织后,将其固定在 10% 的福尔马林缓冲液中,随后包埋在石蜡中。肝肿瘤组织切片用 HE 染色。

### 1.2.9 免疫荧光检测 CD206、iNOS 的表达

肝脏肿瘤标本石蜡切片脱蜡、抗原修复、血清封闭后,与一抗 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜,再加对应的 HRP 标记的二抗室温孵育 50 min。PBS 洗涤 3 次后滴加 TSA,避光室温孵育 10 min, TBST 洗涤 3 次。滴加 DAPI 复染,封片,于荧光显微镜下观察并采集图像。

### 1.2.10 细胞免疫荧光检测

将细胞悬液接种的 6 孔板中,培养过夜后用 PBS 冲洗 2 次,加入 4% 多聚甲醛溶液固定 15 min。



再加入0.3% Triton 通透 10 min, PBS 冲洗后血清封闭 30 min, 再次 PBS 冲洗。与一抗 4 °C 孵育过夜, PBS 冲洗 3 次; 与二抗室温孵育 2 h, PBS 冲洗 3 次; DAPI 染核后行荧光检测。

### 1.2.11 qPCR 检测

收集经处理的各组细胞, 提取 RNA, 使用 Nano-Drop 检测 RNA 的浓度及纯度。将其逆转录为 cDNA 后, 按照纯水: SYBR mix: 前引物: 后引物: cDNA=3.6: 5.0: 0.2: 0.2: 1.0 比例避光配置 q-PCR 体系 (10  $\mu$ L), 行 qPCR 检测。反应结束后, 拷贝数据进行后续分析。

### 1.2.12 Western blot 实验

收集经处理的各组细胞, 加入 RIPA 裂解液提取总蛋白, BCA 法进行定量。取等量蛋白进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、5% 脱脂奶粉溶液封闭 1 h, 加入一抗 NF- $\kappa$ B (1: 1 000), 于 4 °C 孵育过夜, 清洗后加入 HRP 标记的兔二抗 (1: 200) 室温孵育 2 h, 清洗后加入 ECL 发光剂于暗室中显影、曝光。

### 1.3 统计学方法

实验数据用均值 $\pm$ 标准误 ( $\bar{x} \pm S_x$ ) 表示。两组间比较用 *t* 检验, 多组比较先用单因素方差分析 (ANOVA), 后用 LSD 法进行两两比较。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 微生物促进结直肠癌肝转移

群落 Bar 图显示 CRLM 患者的肝肿瘤与结肠肿瘤样本中存在微生物, 同一个患者中肝转移瘤和结肠肿瘤菌群相似, 但不同患者之间菌群丰度存在差异 (图 1A), 提示微生物可能参与 CRLM 的发展。建立小鼠 CRLM 模型, 分别用抗生素 (抑制菌群生长) 和 *E. coli* (加重菌群负荷) 处理。相较于 Con 组, *E. coli* 组肝转移瘤明显增多, 体积增大, 瘤内微生物浓度升高, HE 染色显示肿瘤细胞失去正常肝小叶结构, 异型性更加明显, 细胞形态紊乱, 核深染。而抗生素处理后的 Abx 组肝转移瘤明显少于 Con 组, 体积明显减少 (图 1B~D), 提示微生物促进 CRLM 的发展。由于肝内存在大量巨噬细胞, 其极化为 M2 可促进肿瘤增殖转移<sup>[12]</sup>, 本研究运用免疫荧光染色分析了肿瘤内巨噬细胞的极化情况, 发现 *E. coli* 组中 CD206 表达相较于 Con 组明显增强, 而 Abx 组表达减弱 (图 1E), 提示微生物促进肿瘤内巨噬细胞 M2 极化。

### 2.2 微生物通过影响巨噬细胞促进结直肠癌肝转移

为了验证微生物是否通过巨噬细胞来影响

CRLM 发展, 在 CRLM 模型中将 Clod-Lip 注射到小鼠体内, 其可被巨噬细胞吞噬, 在细胞内代谢成不可水解的 ATP 类似物, 抑制线粒体中的 ADP/ATP 转运机制, 阻断线粒体呼吸链诱导巨噬细胞凋亡 (图 2A), 结果显示耗竭巨噬细胞后肝转移瘤体积相较于 *E. coli* 组显著减小 (图 2B), 说明微生物通过调控巨噬细胞来影响 CRLM。

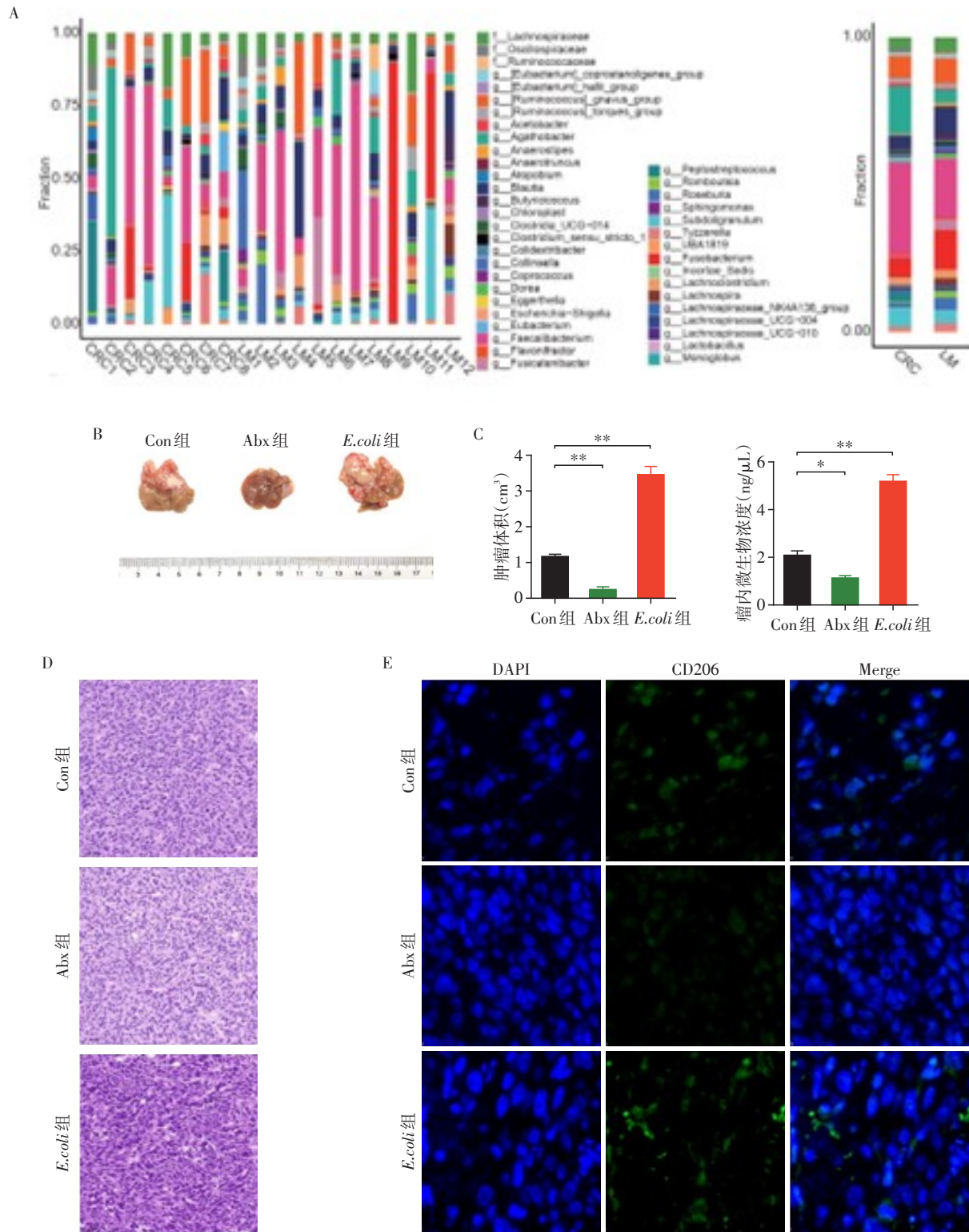
### 2.3 微生物影响肿瘤细胞糖酵解水平促进结直肠癌肝转移

为了探究微生物对肿瘤细胞的影响, 将 *E. coli* 与肠癌细胞 MC38 共培养, 发现与对照组相比, *E. coli* 处理后 MC38 的增殖率变化无明显差异 ( $P=0.795$ ), 但其细胞外酸化率值及 Lac 水平显著高于 Con 组 (图 3A)。LDHi 可抑制糖酵解过程中限速反应的关键分子乳酸脱氢酶 (LDH), 使丙酮酸不能转化为 Lac。用 LDHi 进行体内实验, 结果显示抑制 LDH 后, 肿瘤内 Lac 水平及肝转移瘤体积均低于 *E. coli* 组 (图 3B), 提示微生物通过提高肿瘤细胞的糖酵解及 Lac 水平来影响 CRLM。

### 2.4 Lac 通过 RIG-I<sup>lys852</sup> 乳酸化修饰促进巨噬细胞 M2 极化并降低线粒体抗病毒信号蛋白 (mitochondrial antiviral signaling protein, MAVS) 及其下游 NF- $\kappa$ B 活化

为了探讨 Lac 对巨噬细胞是否有调控作用, 用 15 mmol/L Lac 处理小鼠 BMDM, 免疫荧光检测发现 Lac 组 CD206 表达增多, iNOS 表达减少 (图 4A); qPCR 显示 Lac 组 CD163 和 ARG 的 mRNA 转录水平显著高, iNOS 和 CD86 的 mRNA 转录水平显著降低 (图 4B), 说明 Lac 可直接促进巨噬细胞极化为 M2 细胞。Western blot 检测显示不同浓度的 Lac 刺激巨噬细胞后, 蛋白的泛乳酸化水平上升, 其上升程度与 Lac 浓度成正比, 存在剂量依耐性 (图 4C)。将其与 Lac、巨噬细胞共培养 24 h, 免疫荧光检测显示相较于 Lac 组, RIG-I<sup>lys852</sup> Ab 处理后巨噬细胞的 CD206 表达降低, iNOS 表达升高; 而 HMGB1<sup>lys88</sup>, HMGB1<sup>lys114</sup> 处理后巨噬细胞 CD206 及 iNOS 表达均比 Con 组高 (图 4D), 提示 RIG-I<sup>lys852</sup> 是决定巨噬细胞极化方向的乳酸化修饰位点。为了探讨视黄酸诱导基因 I (RIG-I) 的乳酸化修饰是否影响下游通路, 运用分子模拟预测发现 RIG-I 的乳酸化修饰可导致原阳离子- $\pi$  (CATION- $\pi$ ) 键的丢失, 降低了 MAVS 的活化 (图 4E); Western blot 显示 RIG-I-MAVS 下游核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 在 Lac 处理巨噬细胞后表达明显减弱 (图 4F), 提示 RIG-I 的乳酸化修饰可降低 NF- $\kappa$ B 的表达。用 NF-





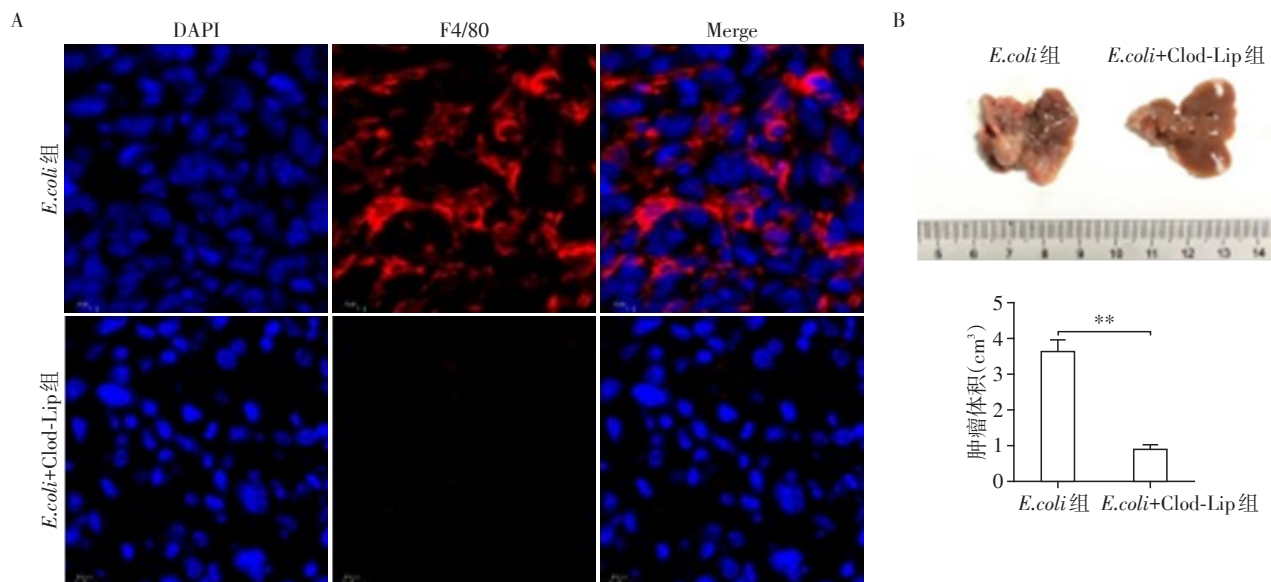
A: 16S rDNA 检测分析 CRLM 患者的结肠和肝脏肿瘤内微生物的情况; B: 小鼠肝脏肿瘤大体观察代表图; C: 小鼠肝脏肿瘤体积及其内微生物浓度; D: Con 组、Abx 组、*E.coli* 组小鼠肝脏肿瘤的 HE 染色 (×200); E: 免疫荧光染色检测肿瘤内 CD206 的表达 (×400)。两组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  ( $n=5$ )。

图1 微生物促进结肠癌肝转移

Figure 1 Microbes promote liver metastasis of colorectal cancer

κB 激动剂 TNF-α 与乳酸一同处理巨噬细胞, qPCR 显示 TNF-α 处理后巨噬细胞 ARG 和 CD163 的

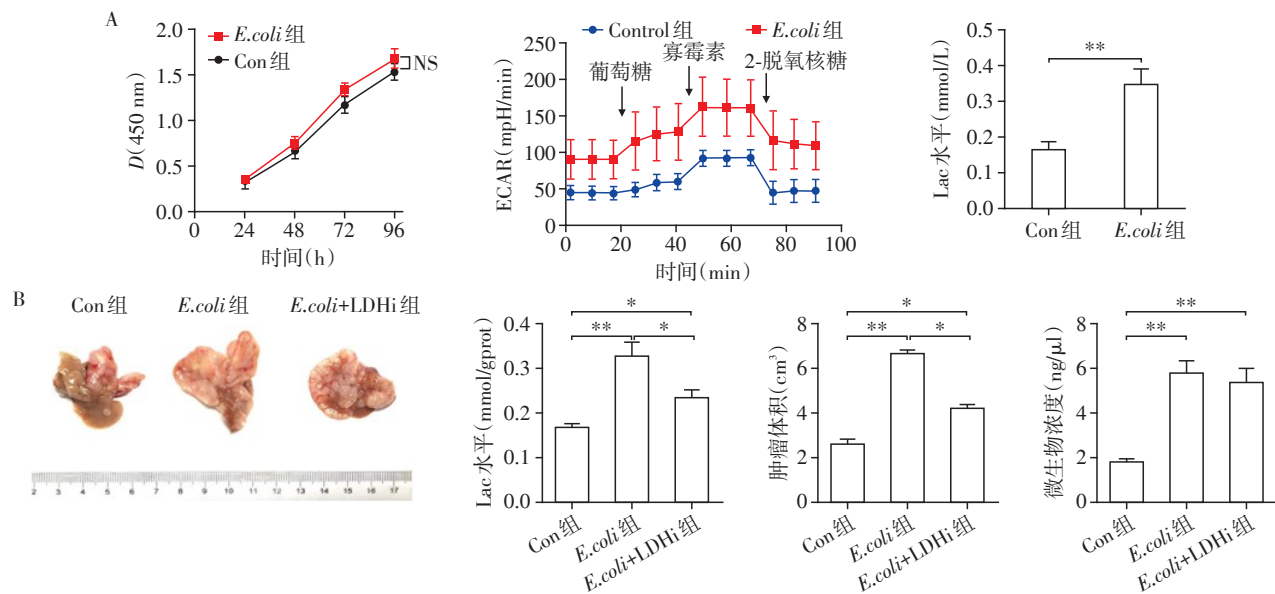
mRNA 转录水平较 Lac 组降低 (图 4G), 表明 NF-κB 可抑制巨噬细胞 M2 极化。综上, 乳酸通过 RIG-I<sup>lys852</sup>



A: 免疫荧光检测其CD2C6的表达水平( $\times 400$ ); B: 小鼠肝脏肿瘤大体观察代表图, 计算肿瘤体积。与 *E.coli* 组比较,  $^{**}P < 0.01 (n=5)$ 。

图2 微生物通过影响巨噬细胞促进小鼠结直肠癌肝转移

Figure 2 Microbes promote liver metastasis of colorectal cancer in mice through macrophage



A: 肠癌细胞 MC38 与 *E.coli* 共培养 24 h 后, CCK8 检测 MC38 的增殖能力, Seahorse 检测 ECAR, 比色法检测 Lac 水平; B: 小鼠肝脏肿瘤大体观察代表图, 计算肿瘤体积, 检测其乳酸水平及微生物浓度。两组比较,  $^{*}P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01 (n=5)$ 。

图3 微生物影响肿瘤细胞糖酵解水平促进结直肠癌肝转移

Figure 3 Microbes promote liver metastasis of colorectal cancer in mice through affecting tumor cellular glycolysis

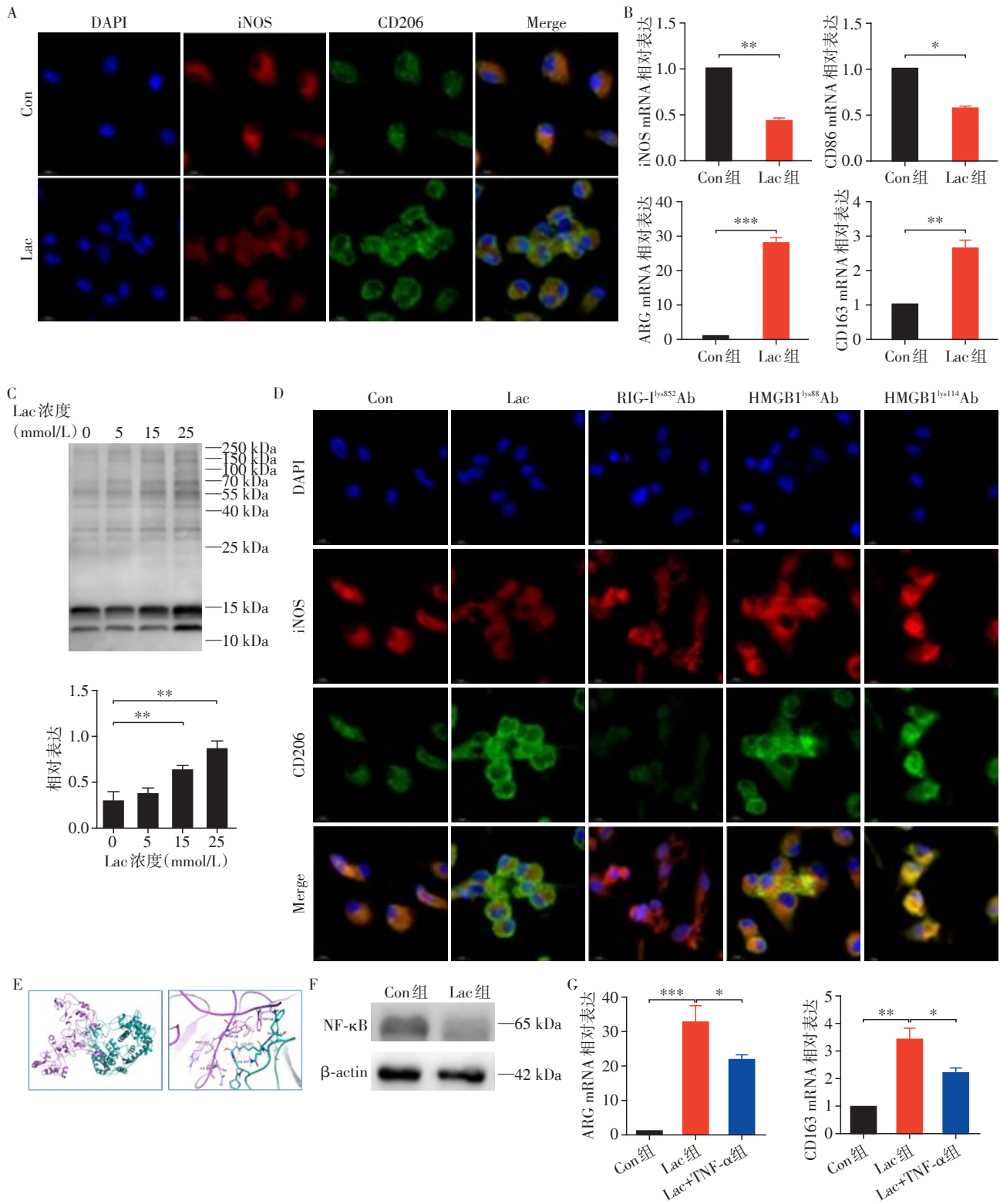
乳酸化修饰下调 NF- $\kappa$ B 调控巨噬细胞极化。

### 3 讨论

肝脏因其独特的解剖学位置和免疫抑制环境, 使得肝外肿瘤易于转移播种至肝脏形成肝转移瘤, 最常见的原发性肿瘤是 CRC, 高达 60% 的患者在 5 年内发生远处转移。当转移到远处器官时, 患者的 5 年生存率由 64.9% 下降至 12.5%<sup>[13]</sup>。近年来, 越来越

多研究报道微生物组已成为许多消化道恶性肿瘤(包括喉癌、食道癌、胃癌和 CRC)、胰腺癌、原发性肝癌的致癌因素<sup>[14]</sup>。但微生物在 CRLM 中的作用尚不明确。

为研究微生物是否促进 CRLM, 课题组在前期运用 16S rDNA 测序研究了同步发生肝转移的 CRC 患者临床切除样本中的肿瘤微生物组成, 发现 CRLM 患者的肝肿瘤与结肠肿瘤样本中均存在微生物



A: 免疫荧光检测巨噬细胞 iNOS、CD206 的表达( $\times 400$ ); B: qPCR 检测 iNOS、CD86、ARG、CD163 的 mRNA 转录水平; C: Western blot 检测显示乳酸化修饰的蛋白翻译水平; D: 免疫荧光检测巨噬细胞 iNOS、CD206 的表达( $\times 400$ ); E: 运用分子模拟预测 RIG-I 的乳酸化修饰后下游 MAVS 的活化情况; F: Western blot 检测 NF- $\kappa$ B 的蛋白的表达; G: qPCR 检测 ARG、CD163 的 mRNA 转录水平。两组比较,  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$  ( $n=3$ )。

图4 乳酸通过 RIG-I<sup>lys852</sup> 乳酸化修饰促进巨噬细胞 M2 极化并降低 MAVS 及其下游 NF- $\kappa$ B 活化

Figure 4 Lactate promoted M2 polarization of macrophages and decreased the activation of MAVS and NF- $\kappa$ B through RIG-I<sup>lys852</sup> lactylation



物,且组成相似。然后进一步在小鼠模型上验证,结果发现大肠杆菌处理后肿瘤内微生物含量显著升高,肿瘤体积增大,肿瘤细胞异型性更为明显;而抗生素治疗减少肠道微生物负荷后发现肿瘤减少。在肿瘤的发生及恶性进展中,Warburg效应(有氧糖酵解)是其关键代谢特征之一,指肿瘤细胞在有氧条件下,葡萄糖通过糖酵解产生Lac。既往研究表明糖酵解关键酶GLUT1的高表达可促进肿瘤的有氧糖酵解和转移<sup>[15]</sup>。另有报道实体肿瘤中的Lac水平与肿瘤远处转移的发生率呈正相关<sup>[16]</sup>。本研究发现,微生物可提升其糖酵解和Lac水平;同时小鼠模型中LDHi灌胃可通过抑制Lac形成影响肿瘤进展,说明微生物通过提升肿瘤细胞糖酵解水平产生Lac来影响CRLM。巨噬细胞是肿瘤微环境中最常见的免疫细胞,微环境中的多种因素如Lac、缺氧、淋巴细胞衍生因子、纤维化可诱导巨噬细胞表现出不同的表型<sup>[17]</sup>。小鼠CRLM模型中,大肠杆菌处理后的小鼠肝转移瘤内M2样巨噬细胞明显增多,此外运用Clod-Lip耗竭体内巨噬细胞可废除微生物对肿瘤大小的影响,提示微生物调控巨噬细胞来促进CRLM,但其否通过乳酸直接调控巨噬细胞尚不明确。

在体外实验中Lac刺激巨噬细胞后,巨噬细胞M2相关基因表达增加,泛乳酸化抗体检测验证了乳酸化修饰存在于Lac对巨噬细胞的极化调控过程。组蛋白的赖氨酸乳酸化是一种全新表观遗传修饰,是Lac发挥功能的重要方式。目前研究已表明乳酸化修饰在炎症、纤维化、干细胞分化及肿瘤中起重要作用<sup>[10]</sup>。为进一步明确乳酸化修饰的位点,定制了不同乳酸化修饰位点的抗体并检测这些抗体对Lac调控巨噬细胞极化的影响,发现RIG-I<sup>lys852</sup>位点是决定巨噬细胞极化方向的乳酸化修饰位点。而在脓毒症中巨噬细胞是通过p300/CBP依赖性机制促进高迁移率族蛋白B1(high mobility group box 1, HMGB1)的乳酸化,加重疾病的进展<sup>[18]</sup>,提示Lac通过不同的乳酸化修饰位点影响疾病的进展。RIG-I样受体是DEXD/H盒RNA解旋酶家族,在识别病毒RNA启动并调节抗病毒免疫反应中起重要作用。RIG-I活化后,其构象发生改变,招募线粒体外膜的MAVS发生聚集,一方面引起下游干扰素调节因子3(interferon regulatory factor, IRF3)和IRF7磷酸化,驱动入核,促进I型干扰素的产生,另一方面通过肿瘤坏死因子受体相关因子2/6(TNF receptor associated factor, TRAF2/6)招募核因子 $\kappa$ B激酶抑制剂(inhibitor

of kappa B kinase, IKK)复合物,磷酸化核因子 $\kappa$ B抑制剂(inhibitor of NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B)蛋白,释放NF- $\kappa$ B,发生二聚化入核,诱导促炎细胞因子的表达<sup>[19]</sup>。为了探讨RIG-I的乳酸化修饰是否影响下游通路,运用分子模拟显示RIG-I<sup>lys852</sup>位点乳酸化可降低其与MAVS的结合,并发现其下游NF- $\kappa$ B在Lac处理后巨噬细胞后表达明显减弱。此外,用NF- $\kappa$ B激动剂TNF- $\alpha$ 与Lac一同处理巨噬细胞后发现,巨噬细胞M2标志物转录水平下降,提示乳酸通过RIG-I<sup>lys852</sup>乳酸化修饰下调NF- $\kappa$ B调控巨噬细胞极化。

综上所述,本研究表明微生物促进CRLM,其可能机制是微生物促进瘤内糖酵解和Lac形成,Lac则通过RIG-I<sup>lys852</sup>乳酸化修饰降低MAVS及其下游NF- $\kappa$ B活化,诱导巨噬细胞发生M2样极化,发挥负性免疫调节作用促进肿瘤进展。本研究有助于进一步了解CRLM进展的相关机制,同时对乳酸化修饰调控巨噬细胞功能的病理生理机制进行深入挖掘,为临床相关疾病的预防、诊断和治疗提供新思路 and 理论依据。

#### [参考文献]

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6):394-424
- [2] REES M, TEKKIS P P, WELSH F K S, et al. Evaluation of long-term survival after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: a multifactorial model of 929 patients [J]. Ann Surg, 2008, 247(1):125-135
- [3] THERIZOLS G, BASH-IMAM Z, PANTHU B, et al. Alteration of ribosome function upon 5-fluorouracil treatment favors cancer cell drug-tolerance[J]. Nat Commun, 2022, 13(1):173
- [4] PRETZSCH E, BOSCH F, NEUMANN J, et al. Mechanisms of metastasis in colorectal cancer and metastatic organotropism: hematogenous versus peritoneal spread [J]. J Oncol, 2019, 2019:7407190
- [5] WONG-ROLLE A, WEI H K, ZHAO C, et al. Unexpected guests in the tumor microenvironment: microbiome in cancer[J]. Protein Cell, 2021, 12(5):426-435
- [6] LIU W, ZHANG X, XU H, et al. Microbial community heterogeneity within colorectal neoplasia and its correlation with colorectal carcinogenesis [J]. Gastroenterology, 2021, 160(7):2395-408
- [7] SHI Y, ZHENG W, YANG K, et al. Intratumoral accumulation of gut microbiota facilitates CD47-based immunotherapy via STING signaling [J]. J Exp Med, 2020, 217

(5):e20192282

[8] TRINER D, DEVENPORT S N, RAMAKRISHNAN S K, et al. Neutrophils restrict tumor-associated microbiota to reduce growth and invasion of colon tumors in mice [J]. *Gastroenterology*, 2019, 156(5): 1467-1482

[9] MUROTA Y, JOBIN C. Bacteria break barrier to promote metastasis [J]. *Cancer Cell*, 2021, 39(5): 598-600

[10] ZHANG D, TANG Z, HUANG H, et al. Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation [J]. *Nature*, 2019, 574(7779): 575-580

[11] YU J, CHAI P, XIE M, et al. Histone lactylation drives oncogenesis by facilitating mA reader protein YTHDF2 expression in ocular melanoma [J]. *Genome Biol*, 2021, 22(1): 85

[12] XIA Y, RAO L, YAO H, et al. Engineering macrophages for cancer immunotherapy and drug delivery [J]. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla)*, 2020, 32(40): e2002054

[13] FAVORITI P, CARBONE G, GRECO M, et al. Worldwide burden of colorectal cancer: a review [J]. *Updates Surg*, 2016, 68(1): 7-11

[14] PLOTTEL C S, BLASER M J. Microbiome and malignancy [J]. *Cell Host Microbe*, 2011, 10(4): 324-335

[15] 王克强, 戴文鹏, 黄湖南. FABP4通过上调GLUT1表达和有氧糖酵解促进肠癌细胞侵袭转移[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*. 2019, 39(2): 210-214

[16] WALENTA S, MUELLER-KLIESER W F. Lactate: mirror and motor of tumor malignancy [J]. *Semin Radiat Oncol*, 2004, 14(3): 267-274

[17] FU L Q, DU W L, CAI M H, et al. The roles of tumor-associated macrophages in tumor angiogenesis and metastasis [J]. *Cell Immunol*, 2020, 353: 104119

[18] YANG K, FAN M, WANG X, et al. Lactate promotes macrophage HMGB1 lactylation, acetylation, and exosomal release in polymicrobial sepsis [J]. *Cell Death Differ*, 2022, 29(1): 133-146

[19] LOO Y-M, GALE M. Immune signaling by RIG-I-like receptors [J]. *Immunity*, 2011, 34(5): 680-692

[收稿日期] 2022-06-27  
(本文编辑:唐震)

(上接第 1650 页)

[J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15760

[16] ZHANG C, KALLAKURY B V, ROSS J S, et al. The significance of TNFAIP8 in prostate cancer response to radiation and docetaxel and disease recurrence [J]. *Int J Cancer*, 2013, 133(1): 31-42

[17] TEO M Y, RATHKOPF D E, KANTOFF P. Treatment of advanced prostate cancer [J]. *Annu Rev Med*, 2019, 70: 479-499

[18] 李娜, 刘煜. 性激素与生物钟系统关系的研究进展 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2021, 41(5): 774-778

[19] 乔红霞, 黄国翔, 黄映辉, 等. 合成致死在精准肿瘤学中的应用 [J]. *科学通报*, 2018, 63(12): 1123, 1129

[20] NAGEL R, SEMENOVA E A, BERNS A. Drugging the addict: non-oncogene addiction as a target for cancer therapy [J]. *EMBO Rep*, 2016, 17(11): 1516-1531

[21] LORD C J, ASHWORTH A. PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic [J]. *Science (New York, NY)*, 2017, 355(6330): 1152-1158

[收稿日期] 2022-08-27  
(本文编辑:唐震)