

二甲双胍脂质体靶向增强TAMs糖摄取对B16-TAMs共培养体系糖分布的影响

郭婉^{1,2} 秦文涛¹ 贝云成¹ 张冬梅^{1*}

(¹南京大学生命科学学院, 南京 210023; ²中国药科大学天然药物活性组分与药效国家重点实验室, 南京 210009)

摘要 该文探讨了二甲双胍脂质体(metformin liposome, Met-lipo)通过靶向增强肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAMs)的葡萄糖摄取以改变小鼠黑色素瘤细胞株B16与TAMs共培养体系中葡萄糖分布, 以及抑制B16细胞增殖与迁移的可能性。利用2-NBDG作为葡萄糖类似物模拟细胞对葡萄糖的摄取; 接着通过2-NBDG摄取实验、葡萄糖/乳酸试剂盒检测二甲双胍(metformin, Met)对TAMs葡萄糖摄取的影响, 以及经Met预处理的TAMs改变B16-TAMs共培养体系中葡萄糖分布的能力。用细胞划痕实验、细胞增殖实验、q-PCR实验评价Met预处理的TAMs抑制B16细胞增殖与迁移的能力。同时, 通过硫酸铵梯度法制备了Met-lipo, 并对其粒径、电势、稳定性、包封率进行表征。通过2-NBDG摄取实验、细胞划痕实验、细胞增殖实验、q-PCR实验检测Met-lipo改变B16-TAMs接触共培养体系中葡萄糖分布的能力和其抗肿瘤效果。结果显示, Met(10 mmol/L)的处理能够有效增强TAMs的糖摄取效率, 并实现对B16细胞的葡萄糖剥夺。而制备得到的Met-lipo能特异性地增强B16-TAMs共培养体系中TAMs的糖摄取能力, 并展示出远强于游离Met的抗肿瘤效应。综上, Met-lipo能够靶向增强TAMs葡萄糖摄取从而改变B16-TAMs共培养体系的葡萄糖分布, 导致B16增殖与迁移能力的下降。

关键词 肿瘤相关巨噬细胞; 二甲双胍; 糖摄取; 脂质体

Metformin Liposome Specifically Enhanced Glucose Uptake of TAMs for the Alteration of Glucose Distribution in B16-TAMs Co-Culture System

GUO Wan^{1,2}, QIN Wentao¹, BEI Yuncheng¹, ZHANG Dongmei^{1*}

(¹College of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210023, China; ²State Key Laboratory of Natural Medicines, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract This study investigated the possibility that Met-lipo (metformin liposome) altered glucose distribution within B16-TAMs co-culture system and inhibited the growth of B16 cells by specifically enhancing glucose uptake of TAMs (tumor-associated macrophages). 2-NBDG was used as glucose analogue to simulate glucose uptake of cells. The effect of Met (metformin) on glucose uptake of TAMs was detected by 2-NBDG uptake assay and glucose/lactate kits. The ability of Met-treated TAMs to alter glucose distribution within B16-TAMs co-culture system was also evaluated. Wound healing assay, cell proliferation assay and q-PCR were used to assess the ability

收稿日期: 2021-12-01 接受日期: 2022-02-24

江苏省重点研发计划(社会发展项目)(批准号: BE2020687)和中国药科大学天然药物活性组分与药效国家重点实验室开放课题(批准号: SKLNMKF202109)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13770502498, E-mail: zdm@nju.edu.cn

Received: December 1, 2021 Accepted: February 24, 2022

This work was supported by the Key Research and Development Program of Jiangsu Province, China-Social Development Projects (Grant No.BE2020687) and the Open Project of State Key Laboratory of Natural Medicines (Grant No.SKLNMKF202109)

*Corresponding author. Tel: +86-13770502498, E-mail: zdm@nju.edu.cn

of Met-treated TAMs to inhibit the proliferation and migration of B16 cells. Meanwhile, Met-lipo was prepared by ammonium sulfate gradient method and particle size, zeta potential, stability and drug-loading efficiency of liposome were detected by DLS and HPLC. Furthermore, the antitumor effect and ability of Met-lipo to alter glucose distribution within B16-TAMs contact co-culture system was also evaluated by 2-NBDG uptake assay, wound healing assay, cell proliferation assay and q-PCR analysis. Results showed that the treatment of Met (10 mmol/L) could effectively enhance the glucose uptake efficiency of TAMs, which could deprive the glucose B16 cells needed. Notably, the prepared Met-lipo could specifically enhance the glucose uptake of TAMs in B16-TAMs co-culture system and exhibited more prominent antitumor effect than free Met. In conclusion, Met-lipo could specifically enhance glucose uptake of TAMs and alter the glucose distribution within B16-TAMs co-culture system, and then inhibit the proliferation and migration of B16 cells.

Keywords tumor-associated macrophages; metformin; glucose uptake; liposome

代谢重编程作为恶性肿瘤的重要标志之一,在癌症的诊断、监测以及抗癌药物的开发方面有着重要的应用价值^[1]。相较于正常细胞,肿瘤细胞葡萄糖代谢的改变尤为显著,也受到许多研究者的关注。研究表明,肿瘤细胞具有“葡萄糖成瘾性”特点,其葡萄糖摄取能力显著提高^[2]。高效的糖摄取为肿瘤细胞的增殖、转移及其治疗耐受提供了物质基础和能量保障^[3]。同时,除了自身代谢改变外,肿瘤细胞还会直接或间接地影响肿瘤微环境中免疫细胞的代谢形式,削弱它们对葡萄糖摄取的能力^[4],造成肿瘤微环境中葡萄糖分布发生改变,从而进一步满足其对葡萄糖极高的需求。

目前,针对肿瘤的葡萄糖代谢过程,人们已开发了以“饥饿疗法”为主的多种肿瘤治疗策略,如利用葡萄糖转运体抑制剂^[5]和抗肿瘤血管生成药物^[6]对肿瘤细胞进行糖剥夺,或向肿瘤组织内递送葡萄糖氧化酶(glucose oxidase, GOx)^[7-8]来清除肿瘤微环境中的葡萄糖。但是,人们对这类“饥饿疗法”的应用仍存在一定的担忧:抗血管生成治疗易导致肿瘤组织进一步乏氧^[9],这会潜在地增强肿瘤的侵袭、转移和耐药能力^[10]。同时,抗血管生成和葡萄糖转运体抑制剂的处理造成的肿瘤组织营养物质的匮乏同样不利于微环境内免疫细胞的生存,阻碍了机体抗肿瘤免疫的激活和对肿瘤的长期控制^[11]。而GOx的酶活又容易受到外界因素的影响,导致药效的不稳定。而且在递送过程中,载体包载的GOx会不可避免地发生泄漏,这将造成血糖骤降,增加安全隐患^[12]。因此,在这里,我们希望能通过药物干预,提高肿瘤微环境中葡萄糖在非肿瘤细胞上的分配比例,从而竞争性抢占肿瘤细胞的葡萄糖以实现对其糖剥夺。

黑色素瘤是一种恶性程度高、转移能力强的肿瘤类型,其临床治疗极具挑战性;研究表明,黑色素瘤的高增殖性、侵袭性可能使其更依赖于糖代谢,对葡萄糖剥夺更加敏感^[13-14]。二甲双胍(metformin, Met)是临床上被广泛用于治疗二型糖尿病的降血糖药物,被证明能潜在地增加外周组织对葡萄糖的摄取和利用^[15-16]。利用这个性质,在这项研究中,我们探究并证明了Met增强肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAMs)糖摄取能力的可能性;同时,为了使得Met能更加特异性地作用于巨噬细胞,我们用硫酸铵梯度法制备了二甲双胍脂质体(metformin liposome, Met-lipo)纳米粒。鉴于巨噬细胞对纳米颗粒具有更强的摄取能力, Met-lipo靶向增强了TAMs的葡萄糖摄取能力,改变了B16-TAMs共培养体系的葡萄糖分布状态,从而实现了黑色素瘤细胞的糖剥夺并有效抑制了其增殖与迁移。因此,我们的工作为改变肿瘤微环境的葡萄糖分布提供了新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 小鼠巨噬细胞RAW264.7、小鼠黑色素瘤细胞B16、小鼠乳腺癌细胞4T1、小鼠结直肠癌细胞CT26、小鼠肺癌细胞LLC均购自中国科学院上海细胞库。

1.1.2 主要试剂 高糖DMEM培养基、RPMI 1640培养基与RPMI 1640无糖培养基均购自上海源培生物科技有限公司;胎牛血清购自以色列Biological Industries公司;盐酸二甲双胍购自美国Sigma公司;CellTrace™ CFSE、0.25%胰蛋白酶、青霉素、链霉素、

DMSO均购自上海碧云天生物科技有限公司; 葡萄糖/乳酸检测试剂盒、吉姆萨染液均购自南京建成生物有限公司; 葡萄糖类似物2-NBDG购自美国MCE公司; TRIzol™ Reagent购自南京诺唯赞生物科技有限公司; 逆转录试剂盒购自加拿大ABM公司; MTT、大豆软磷脂、胆固醇均购自北京索莱宝科技有限公司; 氯仿、异丙醇、磷酸二氢钾、氯化钠、磷酸氢二钠、高氯酸均购自国药集团药业股份有限公司; 小鼠APC-F4/80流式抗体购自美国Biolegend公司; 无菌细胞培养板、滤器、Transwell共培养小室均购自广州杰特生物技术有限公司; 细胞培养皿购自Nest公司; q-PCR引物均由金斯瑞生物技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 小鼠肺癌细胞LLC与小鼠巨噬细胞系RAW264.7用含10% FBS的DMEM进行培养; 小鼠结肠癌细胞CT26、乳腺癌细胞4T1和黑色素瘤细胞B16用含10% FBS的RPMI 1640培养基进行培养; 以上完全培养基中皆添加100 U/mL的青/链霉素。

1.2.2 细胞糖摄取能力测定 将葡萄糖类似物2-NBDG用无糖完全培养基配置成终浓度为100 μmol/L的工作液, 37 °C培养箱避光孵育1 h。吸去待测细胞培养基, PBS清洗2遍, 在12孔板中每孔加入300 μL的2-NBDG工作液, 37 °C避光孵育30 min, 后于流式细胞仪检测细胞摄取2-NBDG的能力^[17]。在RAW264.7与B16的接触共培养体系里, 2-NBDG孵育后用小鼠F4/80流式抗体标记RAW264.7, 以此区分RAW264.7与B16。

1.2.3 肿瘤条件培养基(tumor conditioned medium, TCM)制备 将小鼠黑色素瘤细胞B16按照1×10⁶个/只接种于若干只C57BL/6小鼠后背部左侧皮下, 3周后将小鼠安乐死(伦理号为IACUC-2109010, 由南京大学实验动物福利伦理审查委员会批准), 无菌条件下取出肿瘤块并剪成小块, 按照10 mL培养基/g肿瘤培养肿瘤组织, 24 h后收集的培养上清即为TCM^[18]。

1.2.4 CFSE染色检测细胞增殖 CFSE为5-羧基二乙酰化荧光素琥珀酰亚胺酯, 是一种可对活细胞进行荧光标记的染料。其在穿透细胞膜后可快速水解, 同时与胞内蛋白发生共价结合, 并发出绿色荧光。在细胞增殖过程中, CFSE标记的荧光可平均分配至两个子代细胞中, 并且荧光强度减弱一半。用无血清培养基将CFSE原液按照1:1 000稀释成浓度为5 μmol/L的工作液, 37 °C避光孵育10 min备用; 吸

出待测小鼠肿瘤细胞原培养基, PBS清洗1遍后加入适量的CFSE工作液, 37 °C培养箱避光孵育30 min, 染色结束后用PBS清洗3遍, 再根据组别进行不同的加药处理, 收集细胞, 进行流式检测。

1.2.5 细胞克隆形成实验 将充分吹打成单个的小鼠肿瘤细胞B16、4T1、CT26按照100个/孔分别铺入6孔板, 在浓度为2.5、5、10 mmol/L葡萄糖培养基中培养7~10天, 直至能在显微镜下观察到长出明显的细胞克隆后, 用4%多聚甲醛固定, 吉姆萨染液室温染色30 min后洗净风干, 拍照记录克隆形成数量。

1.2.6 总RNA提取及q-PCR检测 Trizol法提取共培养体系中各组B16的总RNA, 测量浓度后, 取2 μg RNA反转录为cDNA, 通过q-PCR测量增殖相关基因*ADRA1A*、*CHRNA2*、*ANGPT1*、*PRKCQ*、*LEP*、*IL31RA*的表达, 用*GAPDH*与*18SrRNA*作为内参进行归一化处理。

1.2.7 细胞划痕实验 将B16细胞按3×10⁵个/孔均匀铺入12孔板, 当汇合度达到80%时, 吸去培养基, 在细胞板的内底部划出两条平行的直线, 使得细胞产生宽度一致的划痕, 再加入新鲜培养基, 在0 h于显微镜下拍照记录划痕初始宽度; 在Transwells共培养小室中加入经过不同处理后的RAW264.7, 待共培养36 h后, 于显微镜下拍照记录划痕宽度的变化。

1.2.8 Met及Met-lipo的制备 称取0.165 6 g盐酸Met粉末溶解于1 mL PBS中, 得到浓度为1 mol/L的Met母液, 于-20 °C保存备用; 给药时直接用DMEM稀释到所需浓度。Met-lipo采用硫酸铵置换法制备^[19], 大豆卵磷脂与胆固醇作为成膜材料。将氯仿:甲醇按照3:1混合, 称取大豆卵磷脂200 mg、胆固醇40 mg溶于4 mL氯仿-甲醇溶液中, 40 °C旋转蒸发至挥干后继续真空干燥4 h, 加入3 mL的250 mmol/L硫酸铵, 在37 °C以220 r/min转速混匀成淡黄色混合物, 冰水浴超声10 min后过0.22 μm滤器, 在0.9%的NaCl溶液中透析过夜后制成中性脂质体, 将脂质体与1mol/L的Met溶液按照1:1混合, 在37 °C水浴中孵育3 h, 最后在PBS中4 °C透析4 h除去游离盐酸Met, 即可得到Met-lipo。

1.2.9 Met-lipo粒径及稳定性的测定 将Met-lipo稀释10 000倍, 再吸取1 mL稀释后的溶液至石英管中, 利用粒径分析仪(ZEN3600, Malvern)检测脂质体的粒径分布。在测量Met-lipo的稳定性时, 分别在4 °C保存条件下的第0、1、3、5、7、13、21、30天检

测其粒径分布并对其进行统计, 以此反映Met-lipo的稳定性。

1.2.10 Met-lipo电势的测定 将Met-lipo稀释10 000倍, 再吸取1 mL稀释后的溶液至石英管中, 利用粒径分析仪(ZEN3600, Malvern)检测脂质体的电极电势。

1.2.11 Met-lipo包封率的测定 取1 mL的Met-lipo, 加入1 mL的氯仿对其进行破乳处理, 12 000 r/min离心15 min得到上层的Met溶液。用HPLC检测包封率, 准备AgilentTC-C18反相色谱柱, 使用的Met标准品浓度为165 mg/mL, 在pH3的0.01 mol/L磷酸二氢钾溶液的流动相中检测, 计算峰面积得到Met-lipo的包封率。

1.2.12 统计学分析 各实验均独立重复3次, 数据统计学分析均使用Graphpad Prism 8.0.1, 定量结果数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两组数据间显著差异分析使用 t 检验, 两组以上则使用单因素ANOVA分析显著性差异(* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$; **** $P<0.0001$)。

2 结果

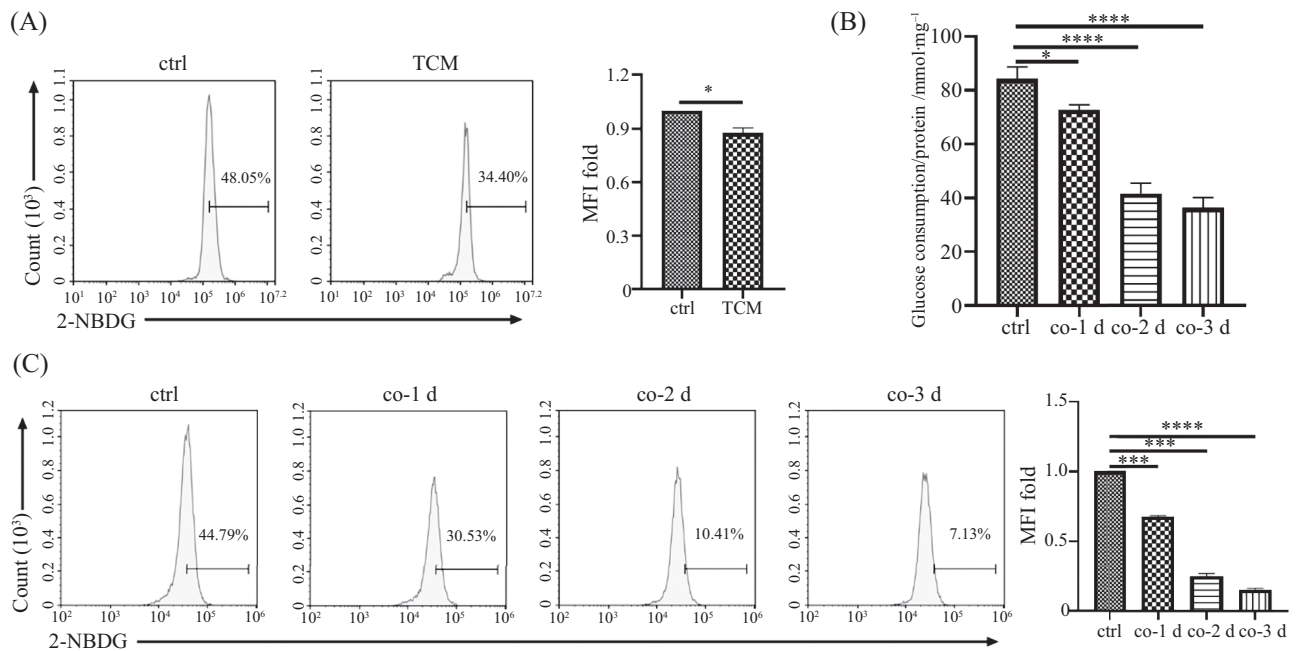
2.1 TAMs糖摄取能力降低

将小鼠骨髓来源巨噬细胞(bone marrow derived

macrophages, BMDMs)在TCM中培养72 h, 将其诱导成为TAMs, 并通过流式细胞术检测其糖摄取能力的变化, 图1A表明与对照组相比, TAMs的糖摄取能力降低($P<0.05$)。接着将RAW264.7与B16通过Transwells分别共培养1~3天, 结果表明, 随着共培养时间的增加, RAW264.7的葡萄糖消耗速率与葡萄糖摄取能力逐渐降低(图1B和图1C)($P<0.001$, $P<0.0001$), 说明TAMs在肿瘤细胞代谢的影响下糖摄取能力下降。

2.2 低浓度Met增强TAMs糖摄取与糖酵解

临床上接受Met治疗的糖尿病患者具有更低的肿瘤负荷^[20], 它们体内的药物浓度在10 mmol/L以内^[21-22], 而Met对肿瘤细胞的体外抑制浓度需达至30~100 mmol/L。鉴于TAMs在实体瘤中广泛存在较高的占比, 我们猜测, 低浓度Met是否可能通过增强TAMs葡萄糖摄取能力以重塑肿瘤微环境中的糖分布状态, 从而竞争性剥夺肿瘤的葡萄糖摄取, 以达到对肿瘤细胞的抑制。首先分别用1.0、2.5、10.0 mmol/L的Met刺激TAMs, 24 h后通过流式检测其糖摄取能力, 结果表明(图2A与图2B), 随着Met浓度的增加, TAMs糖摄取能力显著增强($P<0.001$)。鉴于10 mmol/L的



A: 流式检测BMDMs在TCM中诱导72 h后的糖摄取能力(左)与其统计学差异分析(右); B: RAW264.7与B16分别共培养1~3天后, 撤去B16细胞并更换等量培养基, 24 h后检测上清葡萄糖含量, 并用细胞总蛋白对葡萄糖的消耗量进行归一化; C: 流式检测RAW264.7与B16分别共培养1~3天后的糖摄取能力(左)与其统计学差异分析(右)。* $P<0.05$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ 。

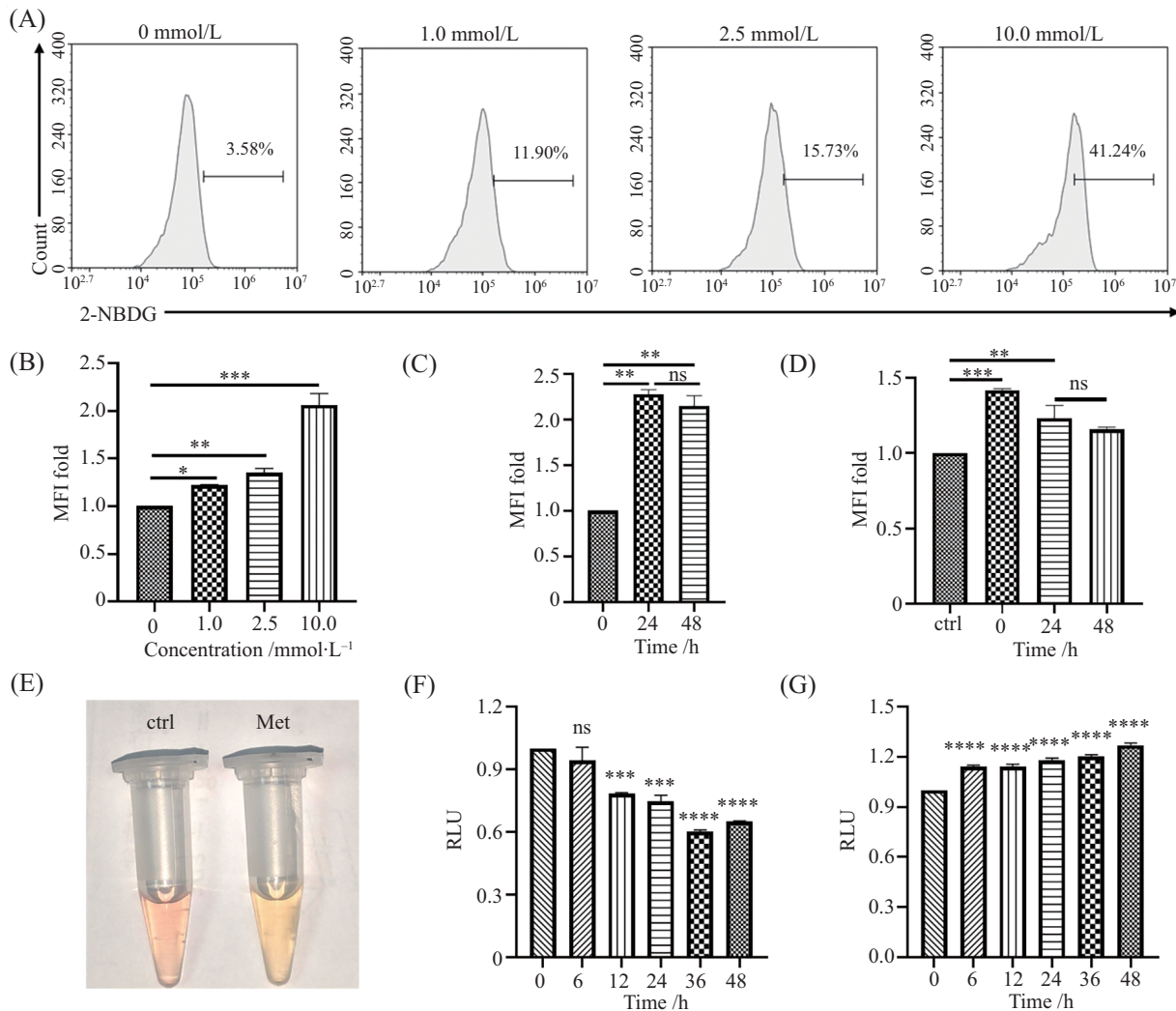
A: the glucose uptake of BMDMs in TCM for 72 h detected by flow cytometry; B: the glucose consumption rate in the medium supernatant of RAW264.7 after co-incubating with B16 for different days; C: the glucose uptake of RAW264.7 after co-incubating with B16 for different days detected by flow cytometry. * $P<0.05$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ 。

图1 TAMs糖摄取能力降低

Fig.1 The decline of glucose uptake ability of TAMs

Met改善TAMs糖摄取能力最佳,与对照组相比提高了将近40%,因此将该浓度用于后续的实验。为了探究Met增强TAMs葡萄糖摄取能力的效应与孵育时间的相关性,我们接下来用10 mmol/L Met分别处理了TAMs 24 h和48 h,结果(图2C)表明不论处理4 h还是48 h都可显著增强TAMs的糖摄取能力($P<0.01$),这并不会随着处理时间的增加而增强。为了探究Met介导的TAMs糖摄取增强效应能维持多久,我们在Met(10 mmol/L)刺激TAMs 24 h后撤去,并分别检测

了药物撤去后0 h、24 h、48 h的TAMs的糖摄取能力。结果(图2D)显示,当Met撤去后, Met介导的TAMs糖摄取增强效应逐渐降低,这说明该效应并非持续性的。此外,我们注意到, Met(10 mmol/L)处理后的TAMs于新鲜培养基中培养24 h后,其培养基颜色与对照组相比明显变黄(图2E),我们猜测这可能是由于处理组细胞产生了更多的乳酸,导致了培养基pH的降低。为了验证这一猜测,我们进一步测定Met分别处理0 h、6 h、12 h、24 h、36 h、48 h后培养上清中



A: 流式检测TAMs分别在1.0、2.5、10.0 mmol/L Met刺激24 h的糖摄取能力; B: 对图A的统计学差异分析; C: TAMs被10 mmol/L Met分别刺激24 h、48 h后糖摄取能力的统计学差异分析; D: TAMs被10 mmol/L Met刺激24 h后,撤去药物,流式检测0 h、24 h、48 h糖摄取能力的统计学差异分析; E: 10 mmol/L Met预处理TAMs 24 h后,更换等量新鲜培养基,24 h后培养上清的颜色对比; F、G: 10 mmol/L Met分别处理0 h、6 h、12 h、24 h、48 h后培养上清的葡萄糖(F)与乳酸(G)的浓度变化。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$, ns表示无显著差异。

A: the glucose uptake of TAMs treated with various concentrations of Met (1.0, 2.5, 10.0 mmol/L) for 24 h detected by flow cytometry; B: the quantification of glucose uptake based on Figure A; C: the glucose uptake of TAMs treated with 10 mmol/L Met for 24 h and 48 h; D: the glucose uptake ability of TAMs at various incubation times after Met (10 mmol/L) treatment; E: 10 mmol/L Met-treated TAMs after 24 h incubation, the medium color of TAMs; F,G: TAMs were incubated with Met for different time, then the ratio of supernatant glucose (F) and lactic acid (G) to control group was detected. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$, ns indicates no significant difference.

图2 低浓度Met促进TAMs糖摄取与糖酵解

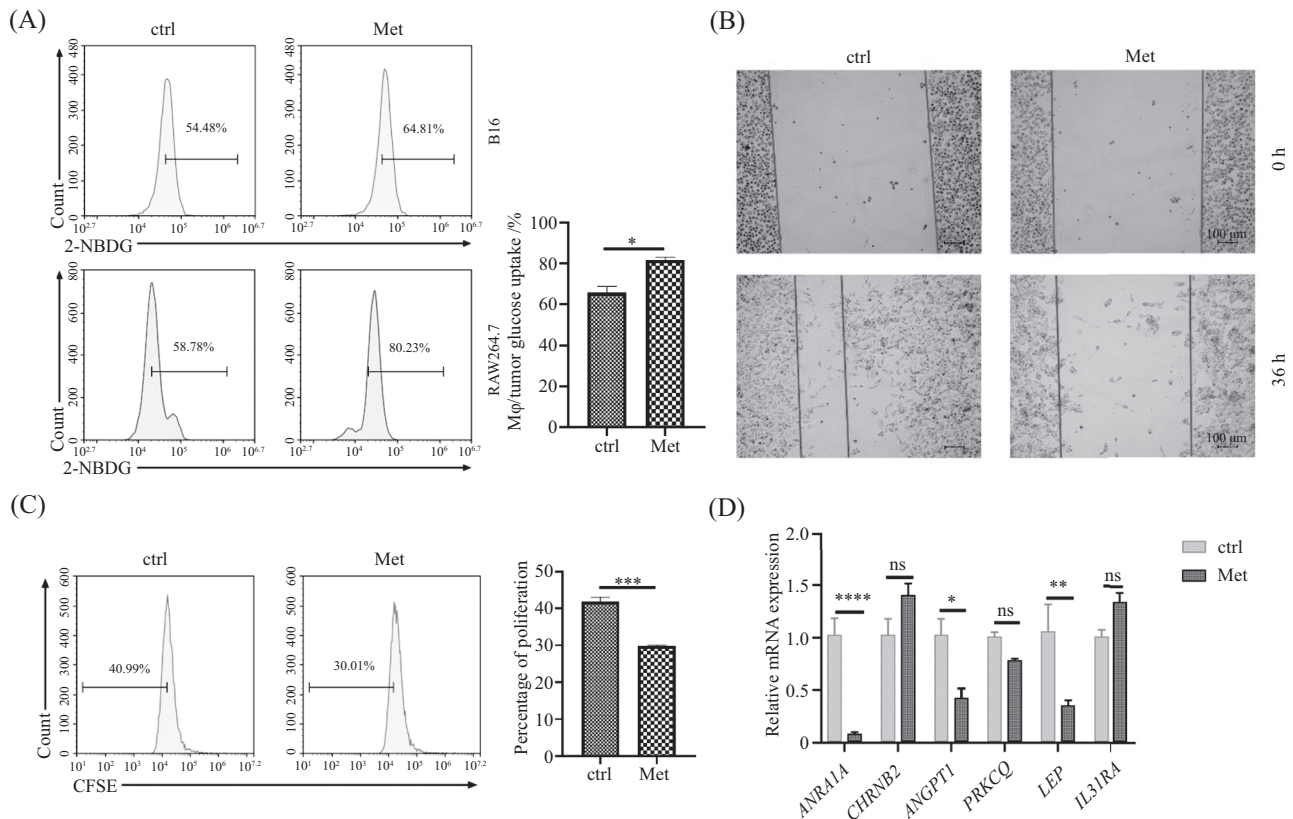
Fig.2 Low concentrations of Met promotes glucose uptake and glycolysis of TAMs

葡萄糖与乳酸浓度的变化,结果(图2F与图2G)显示与对照组相比, Met处理组上清葡萄糖浓度显著降低,乳酸浓度显著增加($P<0.001$ 、 $P<0.0001$)。由于乳酸是衡量细胞糖酵解通量变化的一个有效指标^[23],因此,这些结果说明,低浓度的Met能有效增强TAMs的糖摄取能力,并可能导致了其糖酵解通量的增加。

2.3 Met预处理改变B16-TAMs共培养体系糖分布且抑制B16生长

肿瘤细胞的“Warburg effect”使其对葡萄糖的需求增加^[24],因此在肿瘤微环境中,肿瘤细胞对葡萄糖摄取占有绝对的优势,而肿瘤中浸润的巨噬细胞因糖摄取减少导致代谢表型的改变,从而被诱导成促瘤的TAMs。若能通过增加TAMs糖摄取以改变肿瘤微环境中的葡萄糖分布,实现对肿瘤细胞的糖剥夺,

是否能潜在地抑制肿瘤细胞的生长?为了证明该猜想的可行性,我们用经10 mmol/L Met预处理后的RAW264.7与B16进行接触共培养。24 h后,收集细胞,利用F4/80流式抗体标记共培养体系中的RAW264.7,并通过流式检测RAW264.7与B16对2-NBDG的摄取能力。结果(图3A)表明,与对照组相比, Met处理组中RAW264.7的糖摄取能力显著高于B16,这提示Met预处理的TAMs能通过摄取更多的葡萄糖来改变B16-TAMs共培养体系中葡萄糖的分布($P<0.05$)。为了进一步探究培养基中糖分布的改变是否对B16的生长产生抑制,我们分别通过细胞划痕实验(图3B)、CFSE增殖实验(图3C)、q-PCR实验(图3D)检测了Met预处理后B16-TAMs共培养体系中B16迁移与增殖能力的变化,结果表明, Met预处理的TAMs



A: RAW264.7经10 mmol/L Met预处理后,与B16接触共培养24 h, F4/80标记巨噬细胞,通过流式检测共培养体系中RAW264.7与B16的糖摄取能力(左)并对其进行统计学差异分析(右); B: 将经10 mmol/L Met预处理后的TAMs与B16细胞共培养,通过细胞划痕法检测共培养36 h后B16的迁移情况并拍照处理; C、D: 将经10 mmol/L Met预处理后的TAMs与B16细胞共培养24 h后,收集B16细胞,并用CFSE法(C)与q-PCR法(D)检测其增殖速率和增殖相关基因的表达。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$, ns表示无显著差异。

A: the glucose uptake of B16 and Met-treated RAW264.7 cells in direct contact culture system, respectively, Met (10 mmol/L); B: *in vitro* scratch assay of B16 cells co-incubated with Met-treated TAMs cells for 36 h; C: the proliferation rate of B16 cells co-incubated with Met-treated TAMs for 24 h detected by flow cytometry; D: the expression of proliferation related genes of B16 cells co-incubated with met-treated TAMs for 24 h detected by q-PCR. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$, ns indicates no significant difference.

图3 Met预处理改变B16-TAMs共培养体系糖分布且抑制B16生长

Fig.3 Pretreatment of Met alters glucose distribution of B16-TAMs co-culture system and inhibites growth of B16

使得B16迁移能力减弱、增殖速率以及增殖相关基因的表达降低 ($P<0.01$ 、 $P<0.001$), 说明Met预处理 TAMs能够抑制B16-TAMs共培养体系中B16的生长。

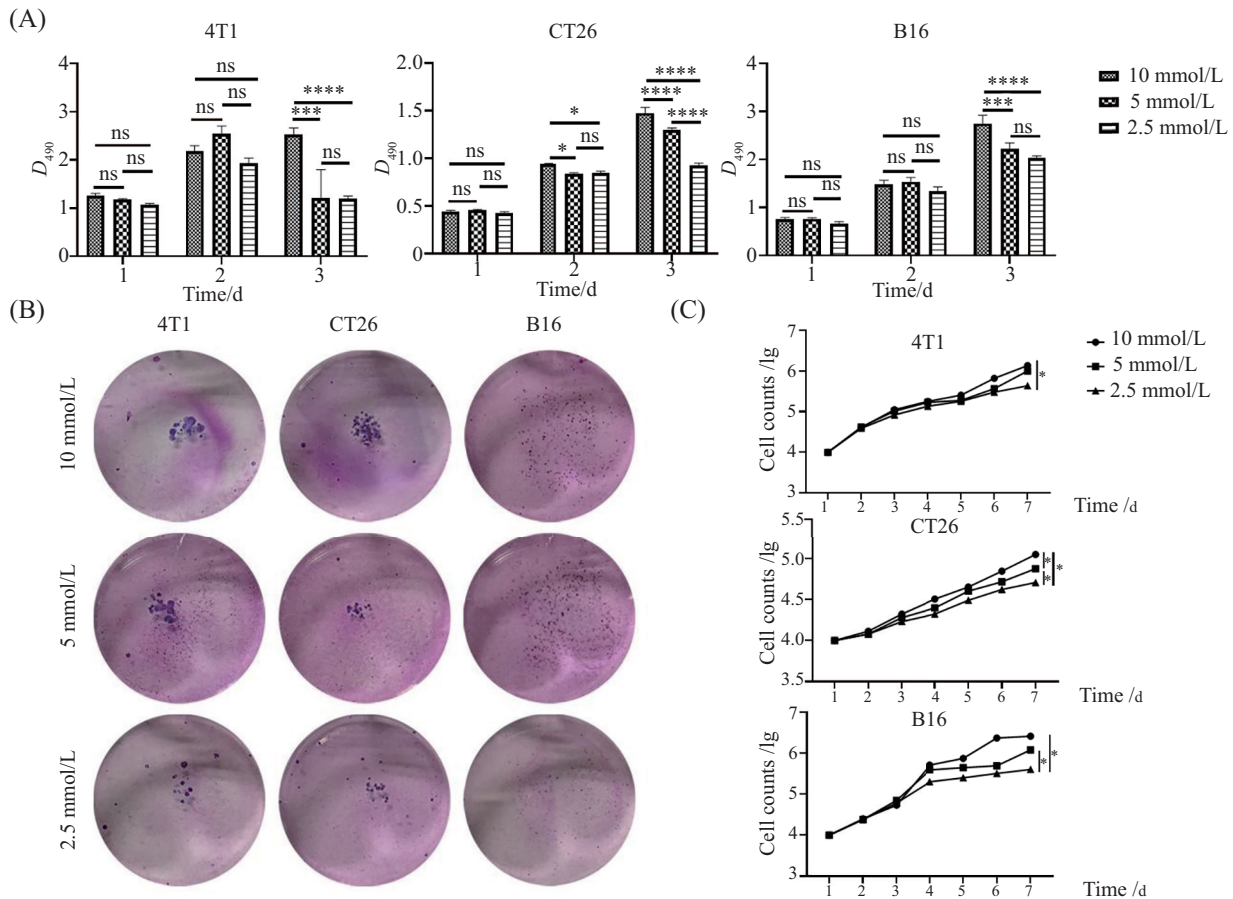
2.4 葡萄糖剥夺抑制肿瘤细胞增殖

为了探究经Met预处理的TAMs抑制肿瘤细胞增殖与迁移是否是由于Met处理增强了巨噬细胞的抗肿瘤作用, 我们接下来对Met预处理后的TAMs的吞噬能力、极化表型、代谢表型、ROS、PD-L1表达进行了测定, 结果显示皆无明显差异(此部分数据未展示), 这说明10 mmol/L Met处理并未改变巨噬细胞的抗肿瘤活性。接下来, 我们进一步确定了葡萄糖的剥夺对肿瘤细胞增殖的影响。我们分别在三种

小鼠肿瘤细胞系(4T1、CT26、B16)中用葡萄糖浓度为2.5、5、10 mmol/L的培养基模拟对肿瘤细胞糖剥夺的程度。通过MTT实验(图4A)、克隆形成实验(图4B)以及对细胞计数绘制生长曲线(图4C)检测不同程度的葡萄糖剥夺对肿瘤细胞增殖的影响, 结果显示, 随着培养基中葡萄糖浓度的下降, 三种肿瘤细胞的增殖都受到明显抑制($P<0.05$ 、 $P<0.001$ 、 $P<0.0001$), 且克隆形成的速率显著下降。其中, 我们发现B16细胞对葡萄糖剥夺作用最为敏感。以上结果表明, 葡萄糖剥夺会显著抑制肿瘤细胞的增殖。

2.5 Met-lipo的制备与表征

由于Met可能也会增强肿瘤细胞的糖摄取能力, 这潜在地影响了Met在实体肿瘤中的实际应用。鉴



A: 4T1、CT26、B16在葡萄糖浓度分别为2.5、5、10 mmol/L的培养基中培养24 h、48 h、72 h, MTT法检测三种细胞的增殖情况并进行统计差异分析; B: 4T1、CT26、B16分别以100个/孔接种于6孔板, 分别在葡萄糖浓度为2.5、5、10 mmol/L的培养基中培养, 观察克隆形成情况, 并用吉姆萨染液进行染色并拍照; C: 4T1、CT26、B16分别以10⁴个/孔接种于12孔板, 分别在葡萄糖浓度为2.5、5、10 mmol/L的培养基中培养, 连续7天对细胞进行计数, 绘制生长曲线并进行统计差异分析。* $P<0.05$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$, ns表示无显著差异。

A: the proliferation of 4T1, CT26 and B16 cells in culture medium containing various concentrations of glucose (2.5, 5 and 10 mmol/L); B: the clone forming of 4T1, CT26 and B16 cells incubated with various concentrations of glucose. C: the growth curves of 4T1, CT26 and B16 cells incubated with various concentrations of glucose in 7 days. * $P<0.05$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$, ns indicates no significant difference.

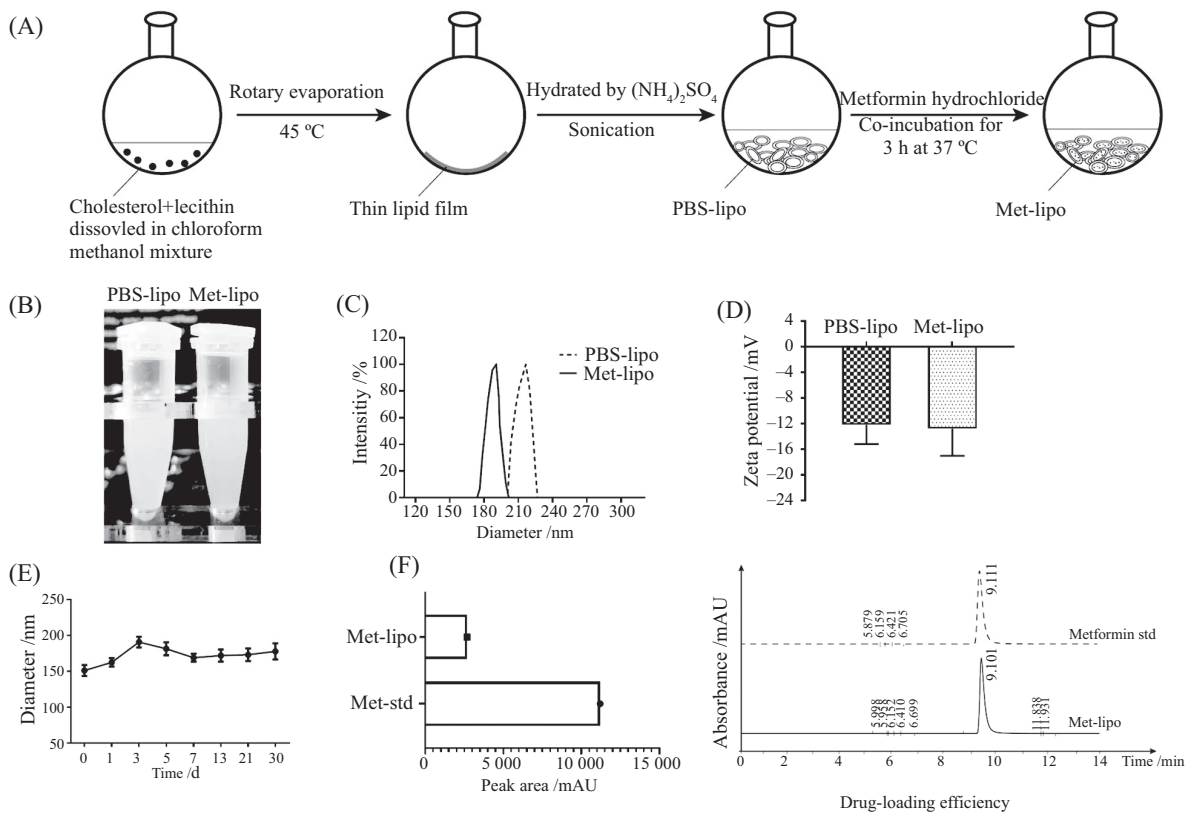
图4 葡萄糖剥夺抑制肿瘤细胞增殖

Fig.4 Glucose deprivation inhibits tumor cell proliferation

于TAMs会更倾向于吞噬纳米尺寸的颗粒(如脂质体纳米粒)^[25], 因此为了让Met能够靶向作用于巨噬细胞, 我们通过硫酸铵梯度法制备了Met-lipo纳米粒(图5A), 以增强巨噬细胞对Met的摄取。图5B显示, 所制备得的Met-lipo和PBS-lipo能均匀分散在水溶液中, 并呈现乳白色和较好的透光性。动态光散射检测结果表明, 两种纳米粒的粒径分别为190 nm和210 nm左右(图5C), 电极电势为-16 mV和-18 mV(图5D)。为了评估Met-lipo的稳定性, 我们将Met-lipo分散在去离子水中, 并保存于4 °C下, 结果(图5E)显示, 脂质体能在30天内不聚沉, 且保持粒径的稳定。这些结果为Met-lipo纳米粒的体内应用提供了保障。此外, 高效液相色谱检测结果(图5F)表示, Met-lipo的包封率约为40%。总之, 这些结果表明我们成功制备出了稳定包封Met的脂质体纳米粒, 且能适用于后续的实验。

2.6 Met-lipo靶向增强TAMs糖摄取而改变糖分布

为了验证Met-lipo增强TAMs糖摄取能力是否能与游离Met保持一致, 我们分别用Met、PBS-lipo以及Met-lipo(Met浓度为10 mmol/L)处理了TAMs, 并通过流式细胞术检测不同处理下, TAMs的糖摄取能力的变化。结果(图6A)显示, 经Met-lipo处理后TAMs糖摄取能力的增加与游离Met处理一致, 并与对照组以及PBS-lipo组存在显著差异($P < 0.01$)。接下来, 我们试图探究Met-lipo处理是否能改变B16-TAMs直接接触共培养体系的葡萄糖分布。由于在之前的实验中, 肿瘤细胞都是与经Met预处理后的TAMs共孵育, 并未直接接触到Met, 因此我们首先验证了10 mmol/L Met是否会对肿瘤细胞产生杀伤作用。我们通过MTT法检测Met与Met-lipo对四种小鼠肿瘤细胞株的半数抑制浓度(IC₅₀), 结果(图6B)显示, Met对四种肿瘤细胞的IC₅₀分别是23.10 mmol/L(LLC)、18.86 mmol/L(CT26)、



A: Met-lipo的制备过程示意图; B: PBS-lipo(左)与Met-lipo(右)图; C、D: PBS-lipo与Met-lipo的粒径分布(C)与电极电势(D); E: Met-lipo在制备完成后的第1、3、5、7、13、21、30天的粒径分布统计; F: Met-lipo的HPLC检测图谱。9.1 min为Met的保留时间(右)与峰面积统计图(左)。

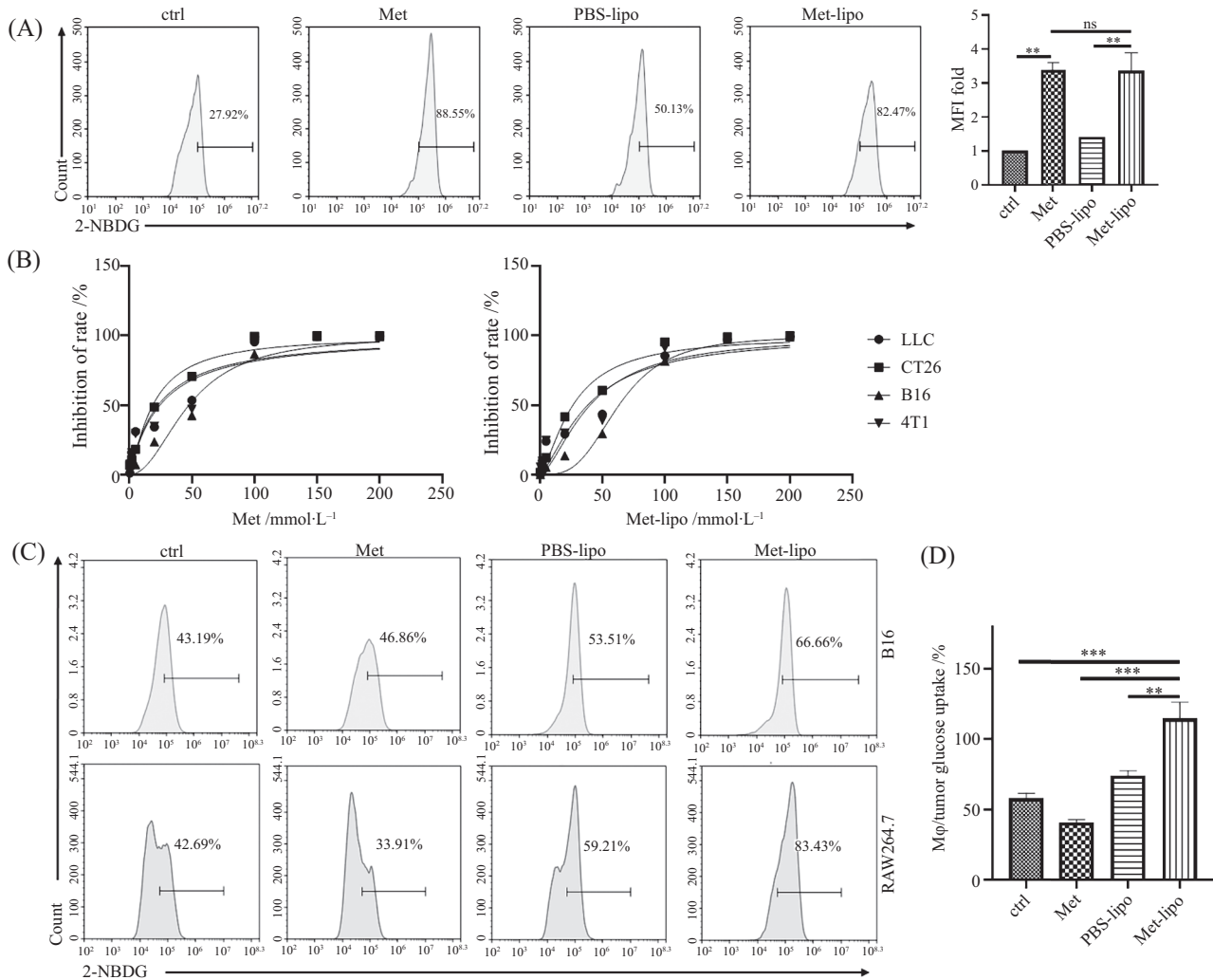
A: schematic diagram of PBS-lipo and Met-lipo preparation process; B: the pictures of PBS-lipo and Met-lipo nanoparticles dispersing in H₂O; C,D: average hydrodynamic size and zeta potential of PBS-lipo and Met-lipo; E: the change of particle size of Met-lipo incubated in H₂O at 4 °C for different days; F: HPLC analysis of Met-lipo. 9.1 min was the retention time of Met (right) and statistical diagram of peak area of Met in Met-lipo (left).

图5 Met-lipo的制备与表征

Fig.5 Preparation and characterization of Met-lipo

47.74 mmol/L(B16)、24.60 mmol/L(4T1), Met-lipo对四种肿瘤细胞的IC₅₀分别是38.42 mmol/L(LLC)、26.57 mmol/L(CT26)、63.41 mmol/L(B16)、40.31 mmol/L(4T1), 皆大于10 mmol/L, 其中Met与Met-lipo对B16细胞的IC₅₀分别达到47.74 mmol/L与63.41 mmol/L, 因此可以看出, 不论是Met还是Met-lipo, 在给药浓度为10 mmol/L时, 对B16细胞均无明显杀伤作用。于是, 我们将RAW264.7与B16进行接触共培养, 并分别用10 mmol/L Met、PBS-lipo、10 mmol/L Met-

lipo处理, 共孵育24 h后, 通过流式细胞术检测B16与RAW264.7的糖摄取能力, 以指征共培养体系中的糖分布情况。结果(图6C)显示, 与对照组相比, 游离Met的处理并未增强TAMs的葡萄糖摄取和改变培养基中的糖分布状态, 这应该与Met能同样增强B16细胞的糖摄取能力有关。但是, 有意思的是, 我们的结果显示, 在Met-lipo组中, RAW264.7的糖摄取能力明显高于B16($P<0.001$), 这说明Met-lipo特异性地提高了TAMs的葡萄糖摄取能力, 并有效改变了培养体



A: 流式检测TAMs分别在10 mmol/L Met、PBS-lipo、10 mmol/L Met-lipo刺激下糖摄取能力的变化(左)及其统计学差异分析(右); B: MTT检测Met与Met-lipo对LLC、CT26、B16、4T1四种肿瘤细胞的半数抑制浓度; C: 在RAW264.7与B16的接触共培养体系中, 分别加入10 mmol/L Met、PBS-lipo、10 mmol/L Met-lipo处理24 h, 用F4/80标记RAW264.7, 流式检测RAW264.7与B16的糖摄取能力; D: 对图C的统计学差异分析。 ** $P<0.001$, *** $P<0.001$, ns表示无显著差异。

A: the glucose uptake of TAMs after treatments of Met, PBS-lipo and Met-lipo (10 mmol/L); B: the viability of LLC, CT26, B16 and 4T1 cells treated by various concentrations of Met or Met-lipo; C: detect glucose uptake of B16 and RAW264.7 in direct contact culture system after treatments of PBS, Met, PBS-lipo and Met-lipo by flow cytometry, respectively; D: the quantification of flow cytometry images in Figure C. ** $P<0.001$, *** $P<0.001$, ns indicates no significant difference.

图6 Met-lipo靶向增强TAMs糖摄取而改变糖分布

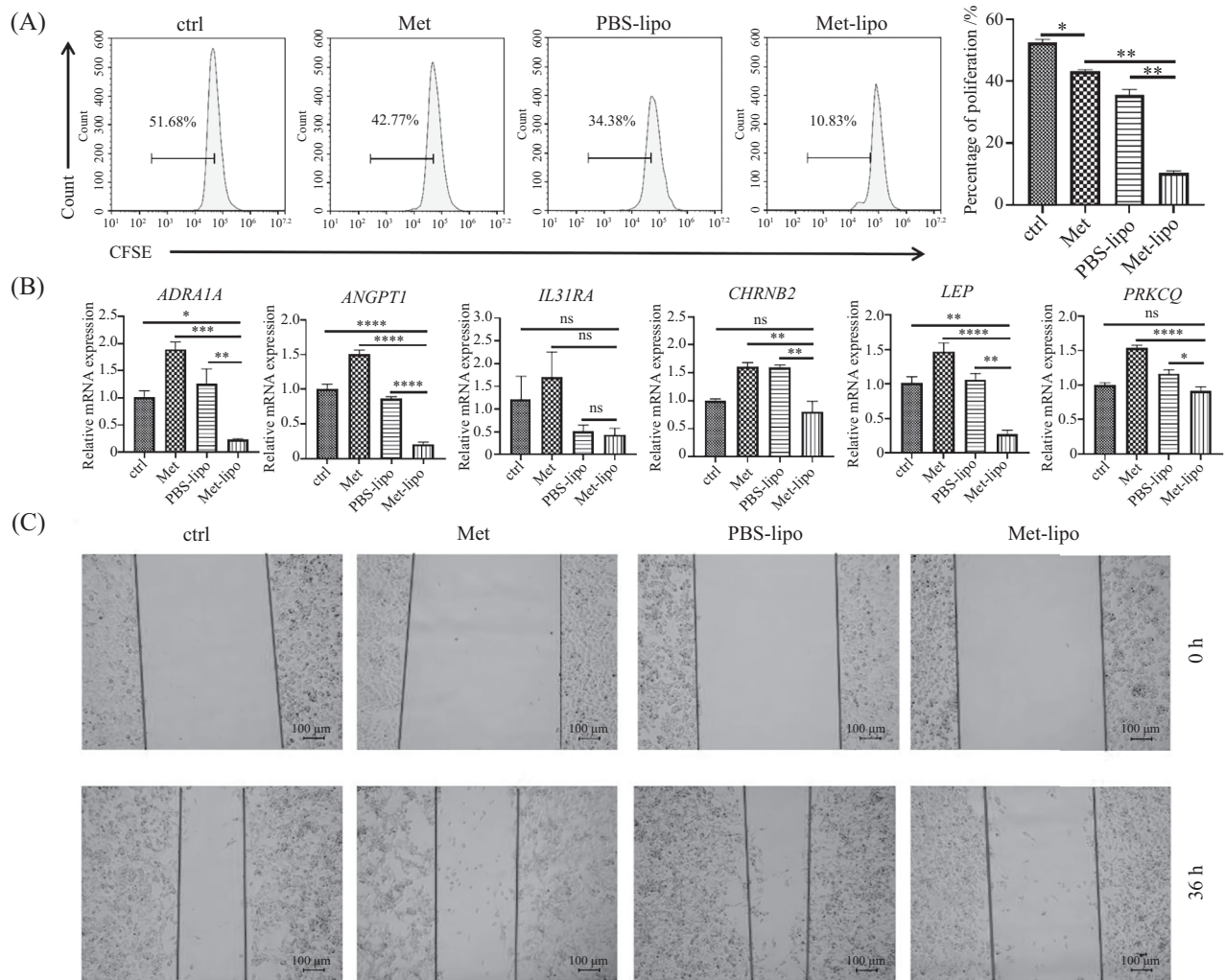
Fig.6 Met-lipo targeted to enhance TAMs glucose uptake and alter glucose distribution

系中的葡萄糖分布。以上结果说明, Met-lipo能够特异性增强TAMs的糖摄取且在一定程度上逆转B16-TAMs直接接触共培养体系的葡萄糖分布。

2.7 Met-lipo抑制B16增殖与迁移

鉴于Met-lipo与游离Met处理对接触共培养体系糖分布的不同影响, 我们进一步探究Met-lipo处理是否能抑制共培养体系中肿瘤细胞的增殖与迁移。与前文不同的是, Met-lipo直接作用于TAMs与B16

的接触共培养体系, 这更加符合肿瘤微环境的实际情况。通过CFSE增殖实验(图7A)、q-PCR实验(图7B)、细胞划痕实验(图7C)检测经10 mmol/L Met、PBS-lipo、10 mmol/L Met-lipo处理的RAW264.7与B16接触共培养体系中B16的增殖速率、增殖相关基因表达以及迁移速率, 结果显示, 当游离Met直接作用于共培养体系时, 其并未对B16的增殖与迁移展示明显的抑制作用, 这说明游离Met对培养体



A: 在RAW264.7与B16的接触共培养体系中, 分别加入10 mmol/L Met、PBS-lipo、10 mmol/L Met-lipo处理24 h, 用F4/80标记RAW264.7, CFSE法检测B16的增殖速率(左)并对其进行统计学差异分析(右); B: 将RAW264.7与B16进行非接触共培养, 在体系中分别加入10 mmol/L Met、PBS-lipo、10 mmol/L Met-lipo处理24 h, 收集B16细胞, q-PCR法检测增殖相关基因的表达; C: 将RAW264.7与B16进行非接触共培养, 在体系中分别加入10 mmol/L Met、PBS-lipo、10 mmol/L Met-lipo, 细胞划痕法检测36 h后B16的迁移情况并拍照处理。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, ns表示无显著差异。

A: the proliferation of B16 cells in B16-TAM direct-contact co-culture system after different treatments including PBS, Met, PBS-lipo, and Met-lipo (10 mmol/L); B: the expression of proliferation related genes of B16 in B16-TAM transwell co-culture after different treatments; C: *in vitro* scratch assay of B16 cells in B16-TAM transwell co-culture after different treatments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, ns indicates no significant difference.

图7 Met-lipo抑制B16增殖与迁移

Fig.7 Met-lipo inhibits proliferation and migration of B16

系糖分布的影响十分有限。但相对于对照组与游离Met处理组, Met-lipo处理后可对B16的增殖和迁移产生显著的抑制作用($P < 0.01$ 、 $P < 0.0001$), 这说明Met-lipo可以通过特异性增强共培养体系中TAMs的葡萄糖摄取能力, 从而对肿瘤细胞实现糖剥夺, 有效抑制肿瘤细胞的增殖。这些结果提示, Met-lipo能潜在地改变肿瘤微环境中葡萄糖的分布状态, 并扰乱肿瘤细胞的糖代谢过程, 且抑制其发生发展。

3 讨论

肿瘤细胞通过改变其自身代谢形式来获得充分的能量与原料以维持它的生长优势。相较于正常细胞, 其糖摄取能力显著增强(肿瘤细胞葡萄糖吸收速率是普通细胞的近30倍)^[26]。临床上的正电子发射断层扫描/X射线计算机断层成像(PET/CT)技术正是利用肿瘤细胞的“嗜糖性”来实现肿瘤部位可视化呈现^[27]。大量的葡萄糖摄入将导致更加活跃的糖酵解, 其能以最快的速度为肿瘤细胞提供ATP以及各种合成生物大分子的原料。同时, 糖酵解产生的大量代谢中间体, 也是维持肿瘤免疫抑制微环境的重要物质^[28]。研究表明, 肿瘤细胞糖酵解产生的乳酸不仅能诱导巨噬细胞向非炎性类型(M2)极化以抑制其抗肿瘤功能^[29], 还能被Treg细胞大量摄取用于维持其免疫抑制功能^[30]。此外, 肿瘤细胞还会通过各种途径来削弱周边免疫细胞的糖摄取能力, 剥夺免疫细胞营养, 导致其功能耗竭, 阻碍机体抗肿瘤免疫的激活。因此, 肿瘤细胞的糖代谢失调对开发肿瘤治疗策略意义重大^[3,31]。目前所流行的各类肿瘤“饥饿疗法”仍存在一定的问题。因此, 我们希望从另一个角度, 寻找一种方法, 能通过诱导肿瘤微环境中葡萄糖的再分配以对肿瘤细胞进行糖剥夺。鉴于肿瘤微环境中TAMs是主要浸润的免疫细胞(约50%), 且其具有很强的可塑性^[32], 因此我们将目标瞄准在了TAMs上。

Met能潜在地增强细胞的糖摄取能力, 并且在许多临床试验与临床前研究中发现, 其具有一定的抗肿瘤效果^[33-34]。但是, 在二维培养基中, Met抗肿瘤的起效浓度(可达到100 mmol/L)要远高于在动物或人体内所观察到的起效浓度^[35], 这表明Met在体内可能通过其他途径来抑制肿瘤生长。在这项研究中, 我们利用葡萄糖类似物(2-NBDG)来表征各类细胞的糖摄取能力。结果显示, Met能有效增强TAMs的

糖摄取能力, 并使其糖酵解通量增加(图2)。同时, 将Met预处理后的TAMs与肿瘤细胞共培养后, 可观察到TAMs摄取环境中葡萄糖的能力显著高于肿瘤细胞, 并有效抑制了肿瘤细胞的迁移与增殖(图3)。值得一提的是, 为了探究这种抗肿瘤效应是TAMs本身的抗肿瘤效应还是由肿瘤细胞的糖剥夺所导致, 我们比较Met处理前后, 巨噬细胞的吞噬能力、极化表型、代谢表型等情况。结果发现, Met处理后TAMs的极化类型并没有特定的改变, 且促炎因子的分泌与吞噬能力也无明显变化, 这进一步证明了Met通过改变肿瘤微环境的糖分布以抑制肿瘤生长方面的可行性。

近年来, 纳米技术在药物递送方面有着长足的发展; 纳米载体负载药物以后, 不仅能实现药物的“增溶”与“减毒”, 还能通过EPR效应或纳米粒表面修饰实现其在肿瘤组织的被动、主动蓄积^[36-37]。为了使Met能够靶向作用于巨噬细胞, 我们利用临床上成熟的硫酸铵梯度脂质体制备技术制备了Met-lipo纳米粒。由于巨噬细胞对纳米颗粒具有更强的摄取能力, 我们成功地将Met靶向递送给TAMs。在B16-TAMs接触共培养模型中, 我们发现, 当Met同时作用于TAMs与B16时, Met并不能特异性增强TAMs的糖摄取, 因此也无法改变共培养体系的糖分布, 肿瘤细胞增殖得不到抑制; 但是, 当给予Met-lipo后, TAMs的糖摄取增强效应显著高于肿瘤细胞, 且共培养体系中肿瘤细胞的增殖能力显著下降, 抑制率远高于游离的二甲双胍(图7)。这些结果证实, Met-lipo能更多地将Met递送至TAMs, 并更显著地增强其糖摄取能力, 在调节肿瘤微环境的糖分布方面有着强大的潜力。

综上所述, 本研究为靶向葡萄糖代谢的肿瘤治疗策略的开发提供了新的思路, 也为二甲双胍在肿瘤治疗领域赋予了新的应用价值。

参考文献 (References)

- [1] SUN L C, SUO C X, LI S T, et al. Metabolic reprogramming for cancer cells and their microenvironment: beyond the Warburg Effect [J]. *Bba-Rev Cancer*, 2018, 1870(1): 51-66.
- [2] GATENBY R A, GILLIES R J. Why do cancers have high aerobic glycolysis [J]? *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(11): 891-9.
- [3] PAVLOVA N N, THOMPSON C B. The emerging hallmarks of cancer metabolism [J]. *Cell Metab*, 2016, 23(1): 27-47.
- [4] O'SULLIVAN D, SANIN D E, PEARCE E J, et al. Metabolic interventions in the immune response to cancer [J]. *Nat Rev Im-*

- munol, 2019, 19(5): 324-35.
- [5] TILEKAR K, UPADHYAY N, IANCU C V, et al. Power of two: combination of therapeutic approaches involving glucose transporter (GLUT) inhibitors to combat cancer [J]. *Bba-Rev Cancer*, 2020, 1874(2): 188457.
- [6] JAIN R K. Antiangiogenesis strategies revisited: from starving tumors to alleviating hypoxia [J]. *Cancer Cell*, 2014, 26(5): 605-22.
- [7] ZHOU J, LI M, HOU Y, et al. Engineering of a nanosized biocatalyst for combined tumor starvation and low-temperature photothermal therapy [J]. *ACS Nano*, 2018, 12(3): 2858-72.
- [8] WANG M, WANG D, CHEN Q, et al. Recent advances in glucose-oxidase-based nanocomposites for tumor therapy [J]. *Small*, 2019, 15(51): e1903895.
- [9] JASZAI J, SCHMIDT M H H. Trends and challenges in tumor anti-angiogenic therapies [J]. *Cells*, 2019, 8(9): 1102.
- [10] GODET I, SHIN Y J, JU J A, et al. Fate-mapping post-hypoxic tumor cells reveals a ROS-resistant phenotype that promotes metastasis [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 4862.
- [11] CHAM C M, DRIESSENS G, O'KEEFE J P, et al. Glucose deprivation inhibits multiple key gene expression events and effector functions in CD8⁺ T cells [J]. *Eur J Immunol*, 2008, 38(9): 2438-50.
- [12] FU L H, QI C, LIN J, et al. Catalytic chemistry of glucose oxidase in cancer diagnosis and treatment [J]. *Chem Soc Rev*, 2018, 47(17): 6454-72.
- [13] KHAMARI R, TRINH A, GABERT P E, et al. Glucose metabolism and NRF2 coordinate the antioxidant response in melanoma resistant to MAPK inhibitors [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(3): 325.
- [14] KOCH A, LANG S A, WILD P J, et al. Glucose transporter isoform 1 expression enhances metastasis of malignant melanoma cells [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(32): 32748-60.
- [15] POLIANSKYTE-PRAUSE Z, TOLVANEN T A, LINDFORS S, et al. Metformin increases glucose uptake and acts renoprotectively by reducing SHIP2 activity [J]. *FASEB J*, 2019, 33(2): 2858-69.
- [16] FISCHER M, TIMPER K, RADIMERSKI T, et al. Metformin induces glucose uptake in human preadipocyte-derived adipocytes from various fat depots [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2010, 12(4): 356-9.
- [17] YAMADA K, SAITO M, MATSUOKA H, et al. A real-time method of imaging glucose uptake in single, living mammalian cells [J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(3): 753-62.
- [18] LUPU-HABER Y, BRONSHTEIN T, SHALOM-LUXENBURG H, et al. Pretreating mesenchymal stem cells with cancer conditioned-media or proinflammatory cytokines changes the tumor and immune targeting by nanoghosts derived from these cells [J]. *Adv Healthc Mater*, 2019, 8(10): e1801589.
- [19] SMITH L J, KUKANICH B K, KRUGNER-HIGBY L A, et al. Pharmacokinetics of ammonium sulfate gradient loaded liposome-encapsulated oxymorphone and hydromorphone in healthy dogs [J]. *Vet Anaesth Analg*, 2013, 40(5): 537-45.
- [20] CHEN G G, WOO P Y M, NG S C P, et al. Impact of metformin on immunological markers: implication in its anti-tumor mechanism [J]. *Pharmacol Ther*, 2020, 213: 107585.
- [21] GRAHAM G G, PUNT J, ARORA M, et al. Clinical pharmacokinetics of metformin [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2011, 50(2): 81-98.
- [22] SCHEEN A J. Clinical pharmacokinetics of metformin [J]. *Clin Pharmacokinet*, 1996, 30(5): 359-71.
- [23] KREIS F, WRIGHT A J, HESSE F, et al. Measuring tumor glycolytic flux *in vivo* by using fast deuterium MRI [J]. *Radiology*, 2020, 294(2): 289-96.
- [24] VANDER HEIDEN M G, CANTLEY L C, THOMPSON C B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation [J]. *Science*, 2009, 324(5930): 1029-33.
- [25] GUSTAFSON H H, HOLT-CASPER D, GRAINGER D W, et al. Nanoparticle uptake: the phagocyte problem [J]. *Nano Today*, 2015, 10(4): 487-510.
- [26] GATENBY R A, GILLIES R J. Why do cancers have high aerobic glycolysis [J]? *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(11): 891-9.
- [27] WALKER-SAMUEL S, RAMASAWMY R, TORREALDEA F, et al. *In vivo* imaging of glucose uptake and metabolism in tumors [J]. *Nat Med*, 2013, 19(8): 1067-72.
- [28] GARCIA-CANAVERAS J C, CHEN L, RABINOWITZ J D. The tumor metabolic microenvironment: lessons from lactate [J]. *Cancer Res*, 2019, 79(13): 3155-62.
- [29] MU X M, SHI W, XU Y, et al. Tumor-derived lactate induces M2 macrophage polarization via the activation of the ERK/STAT3 signaling pathway in breast cancer [J]. *Cell Cycle*, 2018, 17(4): 428-38.
- [30] WATSON M J, VIGNALI P D A, MULLETT S J, et al. Metabolic support of tumour-infiltrating regulatory T cells by lactic acid [J]. *Nature*, 2021, 591(7851): 645-51.
- [31] LI X, WENES M, ROMERO P, et al. Navigating metabolic pathways to enhance antitumour immunity and immunotherapy [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2019, 16(7): 425-41.
- [32] VITALE I, MANIC G, COUSSENS L M, et al. Macrophages and metabolism in the tumor microenvironment [J]. *Cell Metab*, 2019, 30(1): 36-50.
- [33] LORD S R, CHENG W C, LIU D, et al. Integrated pharmacodynamic analysis identifies two metabolic adaption pathways to metformin in breast cancer [J]. *Cell Metab*, 2018, 28(5): 679-88, e4.
- [34] MUNOZ L E, HUANG L, BOMMIREDDY R, et al. Metformin reduces PD-L1 on tumor cells and enhances the anti-tumor immune response generated by vaccine immunotherapy [J]. *J Immunother Cancer*, 2021, 9(11): e002614.
- [35] SAMUEL S M, VARGHESE E, KUBATKA P, et al. Metformin: the answer to cancer in a flower? Current knowledge and future prospects of metformin as an anti-cancer agent in breast cancer [J]. *Biomolecules*, 2019, 9(12): 846.
- [36] MIAO X, LENG X, ZHANG Q. The current state of nanoparticle-induced macrophage polarization and reprogramming research [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(2): 336.
- [37] FLORENCE A T. "Targeting" nanoparticles: the constraints of physical laws and physical barriers [J]. *J Control Release*, 2012, 164(2): 115-24.