

论著·基础研究

Galectin-9 阳性肿瘤相关巨噬细胞在肌层浸润性膀胱癌中的表型、功能及临床治疗意义

戚扬扬¹, 熊 鹰²

1. 上海交通大学基础医学院免疫学与微生物学系, 上海市免疫学研究所, 上海 200025; 2. 复旦大学附属中山医院泌尿外科, 上海 200032

[摘要] **目的**·分析半乳糖凝集素9阳性肿瘤相关巨噬细胞 (galectin-9⁺ tumor-associated macrophages, galectin-9⁺TAMs) 在肌层浸润性膀胱癌 (muscle-invasive bladder cancer, MIBC) 组织中的表型特征, 探究 MIBC 微环境对 galectin-9⁺TAMs 的调控作用, galectin-9⁺TAMs 抑制 CD8⁺T 细胞反应的机制及其临床治疗意义。**方法**·通过流式细胞术检测 MIBC 与癌旁组织中 galectin-9⁺TAMs 的表型特征。利用 TCGA (The Cancer Genome Atlas) 数据库筛选与 *LGALS9* 和 *LGALS9* 巨噬细胞基因集显著相关的细胞因子。用人重组细胞因子体外刺激巨噬细胞, 分为人重组巨噬细胞集落刺激因子 (recombinant human macrophage-stimulating factor, rhM-CSF) 刺激组、人重组白介素-16 (recombinant human interleukin-16, rhIL-16) 刺激组和人重组干扰素 γ (recombinant human interferon- γ , rhIFN- γ) 刺激组, 并通过流式细胞术检测 3 组 galectin-9 表达情况。流式细胞术检测加入 rhM-CSF 和中性抗体后巨噬细胞表达 galectin-9 的情况。Anti-galectin-9 抗体处理 MIBC 单细胞悬液后, 通过流式细胞术检测 TAMs 的效应功能变化。分选癌与癌旁组织中 galectin-9⁺TAMs 和人外周血 CD8⁺T 细胞并进行体外共培养, 通过流式细胞术检测 CD8⁺T 细胞效应功能变化。采用 anti-galectin-9 抗体和程序性死亡受体 1 (programmed cell death protein 1, PD-1) 抗体单独及协同处理体外培养的肿瘤组织, 通过流式细胞术检测肿瘤细胞凋亡及 CD8⁺T 细胞效应功能变化。**结果**·Galectin-9⁺TAMs 高表达人类白细胞 DR 抗原 (human leukocyte antigen DR, HLA-DR)、CD86、CD206 和细胞程序性死亡-配体 1 (programmed cell death-ligand 1, PD-L1), 分泌 IL-10 和转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 增加, 分泌肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 减少。TCGA 数据库筛选结果显示, M-CSF、IL-16 和 IFN- γ 与 *LGALS9* 和 *LGALS9* 巨噬细胞基因集的相关性最显著。用 rhM-CSF、rhIL-16 和 rhIFN- γ 体外刺激巨噬细胞, rhM-CSF 刺激组中 galectin-9 的表达显著升高, 加入中和性抗体后表达显著下调。阻断 galectin-9 后, TAMs 表型从高表达抑制性分子向促炎症分子转换, 其表面表达 PD-L1 显著下降。体外共培养 galectin-9⁺TAMs 和 CD8⁺T 细胞后, galectin-9⁺TAMs 能够抑制 CD8⁺T 细胞的效应功能, 该作用部分依赖于 galectin-9。联合阻断 galectin-9 和 PD-1 后, 肿瘤细胞凋亡比例、CD8⁺T 细胞的增殖能力和效应分子的分泌与单独阻断 PD-1 相比, 均显著增多或增强。**结论**·Galectin-9⁺TAMs 具有免疫抑制表型和功能。肿瘤来源 M-CSF 诱导 TAMs 高表达 galectin-9。Galectin-9⁺TAMs 抑制 CD8⁺T 细胞功能从而促进 MIBC 免疫逃逸。联合阻断 galectin-9 和 PD-1 能够更有效地重激活 CD8⁺T 细胞功能。

[关键词] 半乳糖凝集素-9; galectin-9 阳性肿瘤相关巨噬细胞; 肌层浸润性膀胱癌; CD8⁺T 细胞; 免疫逃逸

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2022.12.003 **[中图分类号]** R392.12 **[文献标志码]** A

Phenotype, function and clinical significance of galectin-9 positive tumor-associated macrophages in muscle-invasive bladder cancer

QI Yangyang¹, XIONG Ying²

1. Department of Immunology and Microbiology, Shanghai Jiao Tong University College of Basic Medical Sciences, Shanghai Institute of Immunology, Shanghai 200025, China; 2. Department of Urology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

[Abstract] **Objective**·To explore the phenotype of galectin-9⁺ tumor-associated macrophages (galectin-9⁺TAMs) in muscle-invasive bladder cancer (MIBC). To clarify the regulation of galectin-9⁺TAMs in MIBC microenvironment, and elucidate the

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目 (81902563)。

[作者简介] 戚扬扬 (1995—), 女, 助理实验师, 硕士; 电子信箱: qiyangyang@shsmu.edu.cn。

[通信作者] 熊 鹰, 电子信箱: xiong.ying@zs-hospital.sh.cn。

[Funding Information] National Natural Science Foundation of China—Youth Fund Project (81902563).

[Corresponding Author] XIONG Ying, E-mail: xiong.ying@zs-hospital.sh.cn.

mechanism of galectin-9⁺TAMs inhibiting the effector function of CD8⁺T cells and its clinical therapeutic significance in MIBC. **Methods**·Phenotype of galectin-9⁺TAMs from MIBC peritumor and tumor tissues was detected by flow cytometry. TCGA (The Cancer Genome Atlas) database was used to sort out the cytokines most relevant to *LGALS9* and *LGALS9* macrophage gene set. Macrophages were stimulated by recombinant human cytokines *in vitro*, divided into recombinant human macrophage stimulating factor (rhM-CSF) stimulation group, recombinant human interleukin-16 (rhIL-16) stimulation group and recombinant human interferon- γ (rhIFN- γ) stimulation group. Expression level of galectin-9 among the three groups was verified by flow cytometry. Expression level of galectin-9 on macrophages was detected by flow cytometry after adding M-CSF neutralizing antibody. Effector functions of TAMs were detected by flow cytometry after treating MIBC single cell suspension with anti-galectin-9 antibody. Galectin-9⁺TAMs from peritumor and tumor tissues, and human peripheral blood CD8⁺T cells were sorted and co-cultured *in vitro*. Effector functions of CD8⁺T cells were detected by flow cytometry. Tumor tissues cultured *in vitro* were treated with anti-galectin-9 antibody and programmed cell death protein 1 (PD-1) antibody alone or in combination. Tumor cell apoptosis and effector function of CD8⁺T cells were detected by flow cytometry. **Results**·Galectin-9⁺TAMs exhibited the phenotype with high expression of human leukocyte antigen DR (HLA-DR), CD86, CD206 and programmed cell death-ligand 1 (PD-L1). Increased IL-10 and transforming growth factor- β (TGF- β) and decreased tumor necrosis factor- α (TNF- α) were secreted by itself. M-CSF, IL-16 and IFN- γ showed the significant difference with *LGALS9* and *LGALS9* macrophage gene set in TCGA database. Galectin-9 on macrophages increased significantly in rhM-CSF stimulated group and its expression decreased by adding neutralizing antibody. Galectin-9 inhibition switched the activation of TAMs from an immunosuppressive phenotype to a more inflammatory state and PD-L1 on its surface significantly decreased. After cultured *in vitro*, galectin-9⁺TAMs inhibited the effect of CD8⁺T cells in a partly galectin-9-dependent manner. Compared with applying PD-1 inhibitor alone, percentage of tumor cell apoptosis, the proliferation of CD8⁺T cells and its effector molecules were significantly enhanced or increased in both galectin-9 and PD-1 blockade. **Conclusion**·Galectin-9⁺TAMs exhibit an immunosuppressive phenotype and function. Tumor-derived M-CSF induced TAMs to express galectin-9. Galectin-9⁺TAMs inhibit the function of CD8⁺T cells to promote the immune escape of MIBC. Galectin-9 and PD-1 blockade can reactivate the function of CD8⁺T cells more effectively and synergistically.

[Key words] galectin-9; galectin-9⁺tumor-associated macrophages (galectin-9⁺TAMs); muscle-invasive bladder cancer (MIBC); CD8⁺T cells; immune evasion

膀胱癌具有较高的发病率和复发率,预后较差,治疗成本较高^[1]。肌层浸润性膀胱癌(muscle-invasive bladder cancer, MIBC)是指肿瘤入侵肌层(T2)、膀胱周围组织(T3)和邻近器官(T4),主要治疗方法是根治性膀胱切除术和淋巴结清扫^[2]。MIBC患者的5年癌症特异性死亡率在过去的30年间基本没有改变,侧面反映出治疗手段的局限性^[3]。因此,需要更行之有效的针对MIBC患者的治疗策略。

免疫治疗逐渐成为膀胱癌主流治疗手段之一^[2]。免疫检查点抑制剂(immune-checkpoint inhibitors, ICIs)可应用于对化学治疗(化疗)产生抵抗及晚期MIBC患者。然而,并不是所有患者都能够从中获益。研究数据显示,仅有不到20%的患者对ICIs表现出持续反应,仅30%的患者在接受治疗的半年后持续生存^[4]。因此,在现有治疗手段的基础上,需要探索更精确的预测性生物标志,以指导个体化肿瘤免疫治疗,提高治疗应答率。

肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAMs)在肿瘤微环境中发挥抑制作用。TAMs的浸润在多种癌症中与不良预后有关,包括膀胱癌^[5]。TAMs与肿瘤浸润淋巴细胞的高比率与膀胱癌患者特

异性死亡率降低有关^[6]。在膀胱癌中,M2型巨噬细胞(CD204⁺TAMs、CD163⁺TAMs)预示不良预后,而M1型巨噬细胞的高浸润与改善的临床结局相关^[7]。一项研究^[8]发现,免疫抑制性肿瘤相关髓系细胞(主要是骨髓来源的抑制性细胞和M2型巨噬细胞)的浸润增加与ICIs的治疗抵抗有关,找到能靶向抑制性肿瘤相关髓系细胞的分子,并结合ICIs的治疗,也许能够克服这种抵抗。这提示探索能更精准预测预后和开发药物靶点的巨噬细胞亚群是必要的。

半乳糖凝集素-9(galectin-9)作为 β -半乳糖苷结合蛋白家族的一员,能够促进或者抑制肿瘤活动,其与T细胞、抗原提呈细胞或肿瘤细胞表面的不同配体结合发挥作用。肿瘤来源的galectin-9可预测多种实体肿瘤的良好预后^[9],但在肾透明细胞癌中与不良预后有关^[10]。然而,目前的研究越来越多地关注到galectin-9⁺巨噬细胞的功能。例如,LI等^[11]发现在乙型肝炎病毒相关肝癌患者中,galectin-9⁺Kupffer细胞和TIM-3⁺T细胞浸润程度高的患者预后较差,这与激活TIM-3/galectin-9信号通路有关。在肺腺癌患者中也有类似的发现^[12]。然而,galectin-9⁺树突样巨噬细胞的浸润增加与IV期黑色素瘤患者的生存期延长和

化疗获益相关^[13]。这些结果表明,这种巨噬细胞亚群在癌变过程中起着至关重要的作用。前期研究^[14]发现,高浸润 galectin-9⁺肿瘤相关巨噬细胞(galectin-9⁺ tumor-associated macrophages, galectin-9⁺TAMs)与MIBC患者不良预后显著相关,且与促肿瘤的免疫微环境有关。然而,在MIBC中,该巨噬细胞亚群的表型、功能以及临床治疗意义尚不清楚。

本研究以 galectin-9⁺TAMs 为研究对象,分析其在MIBC微环境中的表型特征,探究免疫微环境对其的调控作用,以及 galectin-9⁺TAMs 抑制 CD8⁺T 细胞反应的机制,评估联合免疫治疗的价值。

1 材料与方法

1.1 MIBC 数据来源及筛选标准

从TCGA(The Cancer Genome Atlas)数据库(<https://portal.gdc.cancer.gov>)下载获得MIBC患者转录组数据以及临床资料,下载日期截至2018年5月。纳入标准如下:①随访信息可以获得。②肿瘤侵袭(T)分期(pT)≥2。③没有合并症。④术前检查没有远处转移,且没有接受过任何治疗措施。⑤术后病理诊断为MIBC。最终总共纳入研究的病例为391例。

1.2 TCGA 数据库处理及分析

1.2.1 基因表达差异分析 转录组数据经标准化校正、正态分布转化后用于研究。本研究涉及的巨噬细胞基因集(macrophage gene set),参考DAVOLI等^[15]的研究,将其中的基因(*CD5L*、*FCGR3A*、*ITGB5*、*MERTK*、*PILRA*、*CCL8*、*CIQC*、*CIQB*、*CIQA*)按照表达水平进行几何平均数计算,根据日本研究团队的E-S-T-I-M-A-T-E指数方法进行校正,消除偏倚^[16]。*LGALS9*巨噬细胞基因集(*LGALS9* macrophage gene set)是将*LGALS9*和macrophage gene set进行几何平均计算,校正消除偏倚后得到。*LGALS9*和*LGALS9*巨噬细胞基因集均以中位数(11.302和2.379)各自分为高表达组和低表达组。肿瘤来源的细胞因子差异基因包括集落刺激因子1、2、3,白介素(interleukin, IL)家族(IL-1-38),肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α),转化生长因子-β1、2、3和干扰素γ(interferon-γ, IFN-γ)。用火山图直观展示高低表达2组间细胞因子基因

表达的差异。横轴代表差异表达倍数,用log₂ fold change表示;纵轴代表差异显著性,用-log₁₀校正后的P值(adjusted P value)表示。筛选 adjusted P value < 0.05 即 -log₁₀ adjusted P value > 1.301 且 log₂ fold change 绝对值 > 1 的基因为差异表达基因。

1.2.2 基因富集分析 采用肿瘤基因富集分析(Gene Set Enrichment Analysis, GSEA)进行通路分析,采用其中C2、C5基因谱,参数设置为特征谱基因数大于15、1 000次随机重新排序^[17]。错误发现率(false discovery rate, FDR) < 0.05的结果有统计学意义。

1.3 组织样本、试剂及仪器

1.3.1 组织样本 选取10例MIBC患者肿瘤组织及配对的癌旁组织,以及另外10例MIBC患者肿瘤组织,即癌组织20例、癌旁组织10例;选取前述20例患者中的3例对其进行外周血取样。上述样本均来自复旦大学附属中山医院。纳入标准参照“1.1”。

1.3.2 主要试剂 Liberase DH消化酶、DNA酶I和透明质酸酶购自瑞士Roche公司;DMEM培养基、磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)、佛波酯(Phorbol-12-myristate-13-acetate, PMA)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和青霉素/链霉素双抗溶液购自美国Gibco公司;rhM-CSF、rhIL-16、rhIFN-γ、rh粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)、M-CSF ELISA Kit和anti-human M-CSF购自美国R&D公司;纯化anti-human galectin-9抗体购自美国Biolegend公司。

1.3.3 主要仪器 超净工作台(Thermo Fisher Scientific, 美国),二氧化碳培养箱(Thermo Fisher Scientific, 美国),台式微量冷冻离心机(Beckman, 美国),光学显微镜(Nikon, 日本),紫外分光光度计(NanoDrop, 美国),MiniMACS磁珠分选器(Miltenyi, 德国),BD Celesta流式分析仪(BD Biosciences, 美国),Moflo XDP分选仪(Beckman, 美国)。

1.4 实验方法

1.4.1 组织处理 将手术后新鲜癌与癌旁组织置于组织保存液中,在超净台中将剪碎的组织放入15 mL离心管,加入消化液(7 mL DMEM培养基+

10%FBS+Liberase DH 消化酶+0.02%透明质酸酶+0.004% DNA 酶 I), 放入二氧化碳培养箱(37 °C, 120 min)中。消化充分后用70 μm滤网过滤悬液, 4 °C、500×g离心5 min; 弃上清液后PBS重悬, 即得到单细胞混悬液。

1.4.2 流式染色 混悬液中加入红细胞裂解液, 于冰上裂解10 min, 4 °C、500×g离心5 min, 弃上清后PBS重悬。在显微镜下计数, 每管浓度控制在10⁶个(每100 μL)。将染色抗体加入细胞悬液中, 若表面染色, 4 °C避光孵育30 min。若胞内染色, 则在表面染色后的细胞沉淀中加入破膜固定剂20 min, 缓冲液洗涤抗体。加入胞内抗体, 4 °C避光孵育45 min。染色结束后加入缓冲液洗涤细胞, 4 °C、500×g离心5 min, 缓冲液洗涤抗体, 将沉淀重悬于200 μL缓冲液后上机检测。

1.4.3 细胞分选

(1) 外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)制备 患者外周血1:1加入生理盐水混匀, 置于15 mL离心管中, 加入lymphoprep分离液, 400×g离心15 min。离心后呈现梯度分明的液层, 缓慢吸取中间白色浑浊液层, 将吸出液体置于15 mL离心管中, 400×g离心10 min, 将细胞沉淀置于RPMI-1640培养基中, 即获取患者的PBMC。

(2) 外周血CD8⁺T细胞分离 收集10⁷个PBMC, 将其离心重悬于40 μL细胞缓冲液中, 加入10 μL CD8分选磁珠, 混合均匀, 4 °C, 10 min。将染好的细胞悬液涂在组装好的磁柱上, 用500 μL细胞缓冲液反复3次洗脱磁柱上的细胞, 收集洗出的细胞悬液, 将其重悬离心于RPMI-1640培养基中, 即得到人血液CD8⁺T淋巴细胞。

(3) 外周血巨噬细胞分离 参考上述步骤, 洗脱的单细胞悬液重悬离心于RPMI-1640培养基中培养4 d, 加入0.1% β-巯基乙醇、50 U/mL rhGM-CSF和40 μmol/L PMA以获取培养皿中的贴壁细胞。通过流式仪检测表型为CD14⁺CD68⁺CD11b⁺细胞, 即为患者PBMC来源的巨噬细胞。分选的细胞经流式检测, 活力>90%, 细胞纯度>95%。

(4) 流式分选 将MIBC患者癌与癌旁组织消化成单细胞悬液, 标记出galectin-9⁺TAMs(galectin-9⁺CD45⁺CD68⁺cells), 将染色后的细胞用分选仪进行分选。

1.4.4 酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

(1) 癌组织培养上清(tumor tissue culture supernatant, TTS)和癌旁组织培养上清(peritumor tissue culture supernatant, PTS)制备 组织培养上清的处理方式参考相关文献^[18]。将MIBC患者癌与癌旁组织切成约1 cm×1 cm的组织块, 置于1 mL RPMI-1640培养基中(24孔板)24 h, 于37 °C下孵育。收集上清, 4 °C、800×g离心20 min。将离心后的上清平均分装于EP管中, 置于-20 °C冰箱中备用。

(2) 检测M-CSF的浓度 按照试剂盒说明调节细胞培养上清液浓度, 建立空白对照孔、阳性对照孔及样品检测孔, 依次加入一抗、二抗, 最后显色; 每孔加入100 μL 停止反应溶液, 用酶标仪在450 nm波长处读取吸光度值, 根据标准曲线推算M-CSF的浓度。癌与癌旁组织中M-CSF的浓度采用BCA法检测。

1.4.5 Galectin-9 阳性巨噬细胞的刺激诱导与培养

将分选后患者PBMC来源的巨噬细胞悬液加入TTS中, 并补充RPMI-1640培养基至200 μL。将细胞分为3组, 分别为rhM-CSF刺激组、rhIL-16刺激组和rhIFN-γ刺激组, 分别以10、50和100 ng/mL的浓度刺激24 h, 流式细胞术检测galectin-9表达情况。Isotype采用IgG2b Isotype Control。将患者PBMC来源的巨噬细胞悬液加入RPMI-1640培养基(Medium)和TTS中培养24 h, 并在TTS中加入antiM-CSF, 流式细胞术检测galectin-9表达情况。

1.4.6 细胞体外共培养实验 将分选得到的癌与癌旁组织的galectin-9⁺TAMs, 以10⁵个细胞/mL置于6孔细胞培养板的RPMI-1640培养基中, 加入1 ng/mL rhGM-CSF, 37 °C二氧化碳细胞培养箱培养24 h。人外周血CD8⁺T细胞也置于上述培养基和培养箱中, 并加入说明书推荐剂量(1:40)人CD3/CD28/CD2 T细胞激活剂、100 U/mL rhIL-2和20 U/mL rhIL-7。期间不更换培养基, 视情况添加RPMI-1640培养基, 共培养4 d后进行流式检测。

1.4.7 细胞体外干预实验 配置方法参考相关文献^[19]。在RPMI 1640培养基中加入2%基质胶、50 U/mL rhGM-CSF、100 U/mL rhIL-2、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL链霉素和10%FBS。将MIBC单细胞悬液分为4组: isotype组(Human IgG4κ)、PD-1抑制剂(派姆单抗, pembrolizumab)组、anti-

galectin-9组和pembrolizumab+anti-galectin-9组, 分别加入对应抗体培养12 h后进行流式检测。

1.5 统计学分析

使用Graphpad Prism7.0和IBM 22.0 SPSS统计软件作图和统计分析。2组间比较采用Student's *t* 检验或者Mann-Whitney *U* 检验; 多组间比较采用非参数Kruskal-Whitney *U* 检验。相关分析采用Spearman相关性分析。数据均采用mean ± SEM表示。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Galectin-9⁺TAMs在MIBC患者中的表型特征

将galectin-9⁺CD45⁺CD68⁺的细胞群定义为galectin-9⁺TAMs (图1A)。运用流式细胞术检测癌与癌旁组织中galectin-9⁺TAMs的共刺激分子表达、细胞因子分泌和免疫检查点分子的表达情况。共刺激分子检测结果显示: 与癌旁组织相比, 癌组织中galectin-9⁺TAMs表达共刺激分子HLA-DR和CD86的比例显著升高, 表达M2型巨噬细胞的经典分子CD206比例显著升高, 表达CD80的比例在2组间的差异无统计学意义 (图1B)。细胞因子检测结果显示: 与癌旁组织相比, 癌组织中galectin-9⁺TAMs分泌IL-10和TGF- β 含量显著增加, 分泌TNF- α 含量减少, 而白介素-12 (interleukin-10, IL-12) 分泌水平在2组间差异无统计学意义 (图1C)。免疫检查点分子的检测发现: 与癌旁组织相比, 癌组织中galectin-9⁺TAMs细胞表面表达PD-L1的比例显著升高; 而PD-1和细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, CTLA-4) 的表达在2组间差异无统计学意义 (图1D)。这些结果说明galectin-9⁺TAMs在MIBC患者中具有免疫抑制的表型。

2.2 MIBC微环境对galectin-9⁺TAMs的调控作用

2.2.1 TCGA数据库筛选与galectin-9显著相关的细胞因子 为探究MIBC微环境对galectin-9⁺TAMs的调控作用, 运用TCGA数据库进行GSEA分析, 结果显示: galectin-9高表达与细胞因子-细胞因子受体相互作用 ($N=2,231$, $P < 0.001$) 呈正相关 (图2A)。进一步探究细胞因子对TAMs表达galectin-9的影响, 利用

TCGA数据库分别筛选LGALS9高表达和低表达2组之间以及LGALS9 macrophage gene set高表达和低表达2组之间有差异表达的肿瘤来源的细胞因子。火山图结果显示: 在LGALS9高表达组和LGALS9 macrophage gene set高表达组中, M-CSF (CSF-1)、IL-16和IFN- γ 在表达倍数和显著性方面均为差异最显著的3个上调表达基因 (图2B)。

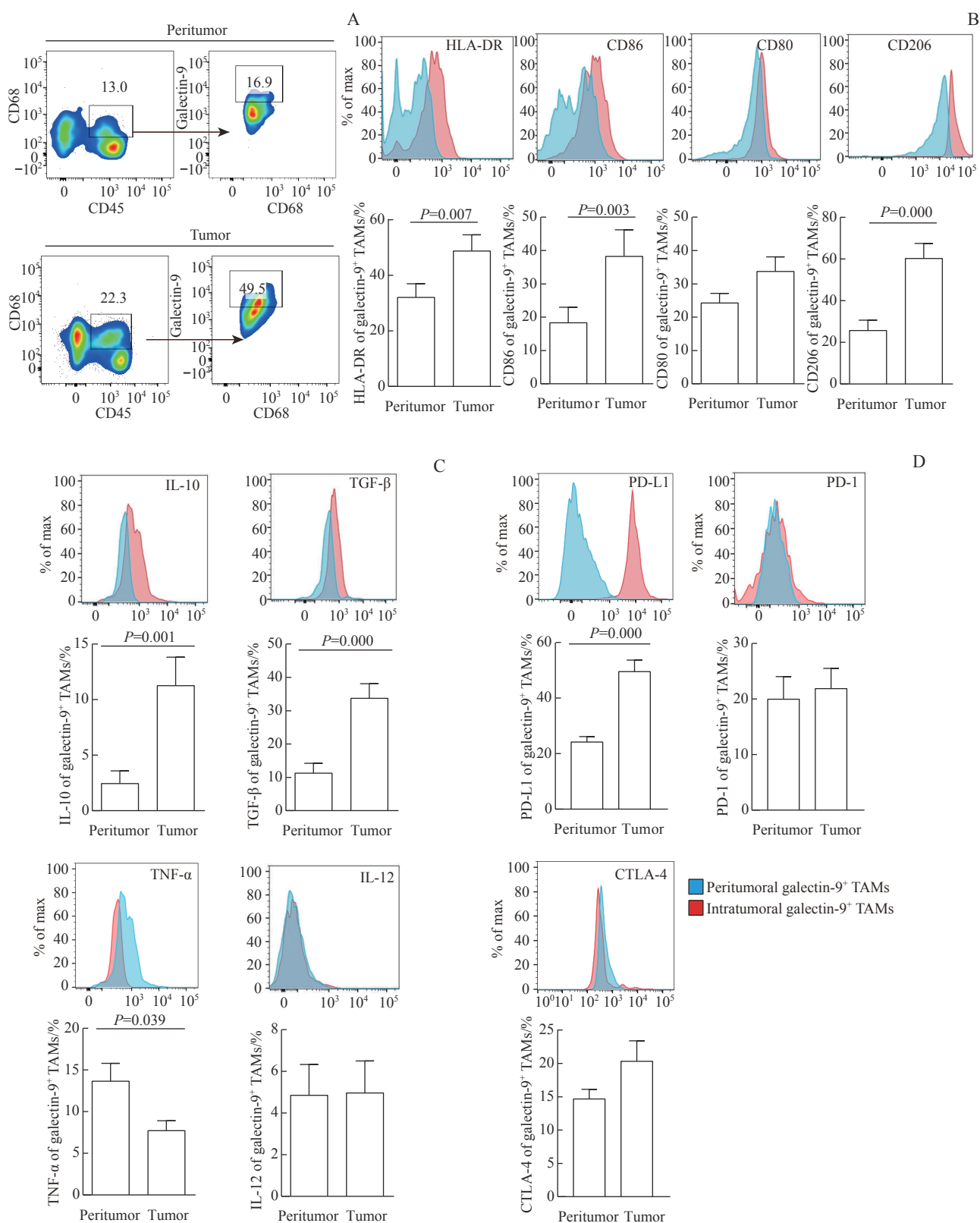
2.2.2 IFN- γ 、M-CSF和IL-16对巨噬细胞表达galectin-9的影响 为了验证上述3个细胞因子对巨噬细胞表达galectin-9的影响, 在体外用rhIFN- γ 、rhM-CSF和rhIL-16刺激患者PBMC来源的巨噬细胞, 流式细胞术检测其表面galectin-9的表达。结果显示: 与isotype相比, rhM-CSF刺激组的巨噬细胞表面galectin-9的表达水平随刺激浓度的增加显著升高, 且与rhIL-16和rhIFN- γ 刺激组比较差异显著 (图3A)。用ELISA法检测MIBC患者膀胱癌组织中M-CSF的表达水平, 结果显示: 癌组织中M-CSF的表达水平显著高于癌旁组织; 同样地, TTS中M-CSF的表达水平显著高于PTS (图3B)。相关性分析结果显示: 癌组织中galectin-9⁺TAMs的比例与M-CSF表达水平呈正相关 (图3C)。进一步在TTS中加入M-CSF和中性抗体后进行流式检测, 结果显示巨噬细胞表面galectin-9的表达显著下降 (图3D)。以上结果表明, M-CSF刺激巨噬细胞galectin-9表达水平升高。

2.3 阻断galectin-9对TAMs的表型及功能影响

为进一步探究galectin-9对TAMs的表型及功能影响, 用anti-galectin-9抗体体外干预MIBC单细胞悬液。流式检测结果显示: 用anti-galectin-9抗体阻断后, TAMs的表型从高表达免疫抑制性分子CD206 (M2样巨噬细胞表面分子) 向促炎症分子HLA-DR (M1样巨噬细胞表面分子) 转换 (图4A、B)。阻断galectin-9后抑制性细胞因子IL-10、TGF- β 含量显著下降, 促炎症细胞因子TNF- α 含量显著上升, IL-12含量在2组间的差异无统计学意义 (图4C), 免疫抑制性分子PD-L1的表达水平显著下调 (图4C)。以上实验结果显示, 阻断galectin-9改变了TAMs的表型及其效应功能。

2.4 Galectin-9⁺TAMs对CD8⁺T细胞的抑制作用

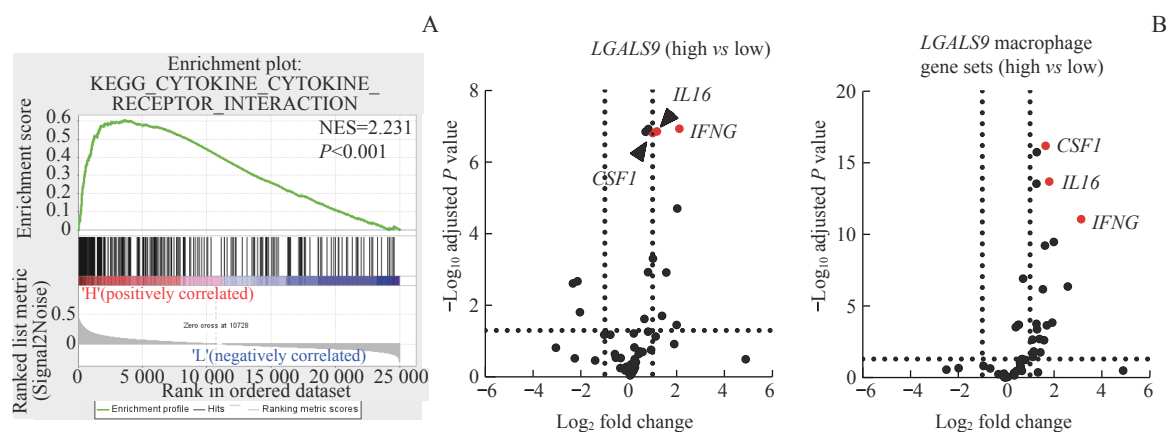
为深入探讨galectin-9⁺TAMs对于CD8⁺T细胞的作用, 将galectin-9⁺TAMs和患者外周血CD8⁺T细胞



Note: A. Representative flow cytometric plots of galectin-9⁺TAMs (galectin-9⁺CD45⁺CD68⁺ cells) from peritumor and tumor tissues. B. Expression of HLA-DR, CD86, CD80 and CD206 on peritumoral and intratumoral galectin-9⁺TAMs. C. Immunosuppressive cytokines (IL-10 and TGF-β) and pro-inflammatory cytokines (TNF-α and IL-12) secreted by peritumoral and intratumoral galectin-9⁺TAMs. D. Expression of immune checkpoint molecules (PD-L1, PD-1 and CTLA-4) on peritumoral and intratumoral galectin-9⁺TAMs. Flow cytometry charts and statistical analysis are included in B-D (n=10).

图1 Galectin-9⁺TAMs在MIBC患者中的表型特征

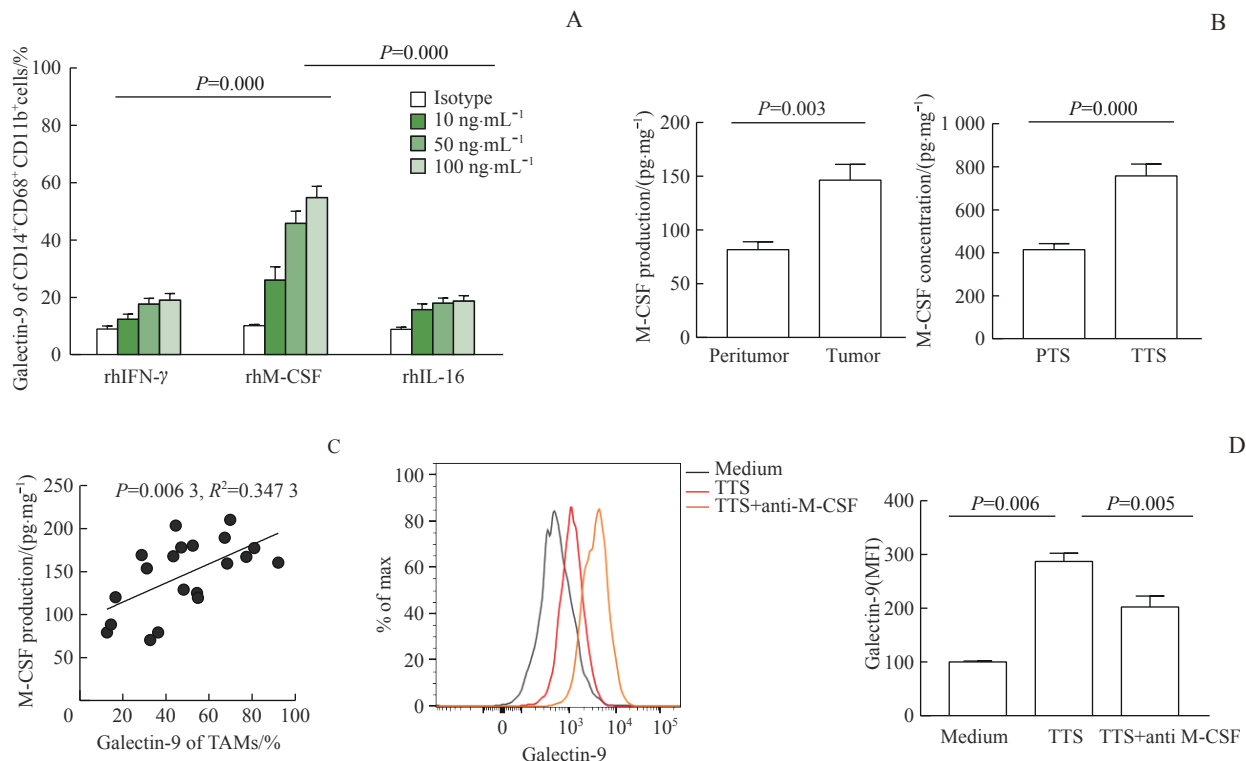
Fig 1 Phenotype of galectin-9⁺TAMs in MIBC patients



Note: A. GSEA analysis uncovered an enrichment of cytokine-cytokine receptor interaction involved in galectin-9 high tumors. NES, non-enrichment score. B. Volcano plots of the top three upregulated cytokines genes related to *LGALS9* high and *LGALS9* macrophage gene set high group. Log₂ fold change and -Log₁₀ adjusted P value were written in sequence. *LGALS9* (high vs low): *CSF-1*: 1.001, 6.821; *IL-16*: 1.181, 6.859; *IFNG*: 2.112, 6.934. *LGALS9* macrophage gene set (high vs low): *CSF-1*: 1.652, 16.192; *IL-16*: 1.795, 13.691; *IFNG*: 3.131, 11.069.

图2 TCGA数据库筛选与galectin-9显著相关的细胞因子

Fig 2 Screening for cytokines significantly related to galectin-9 in TCGA database



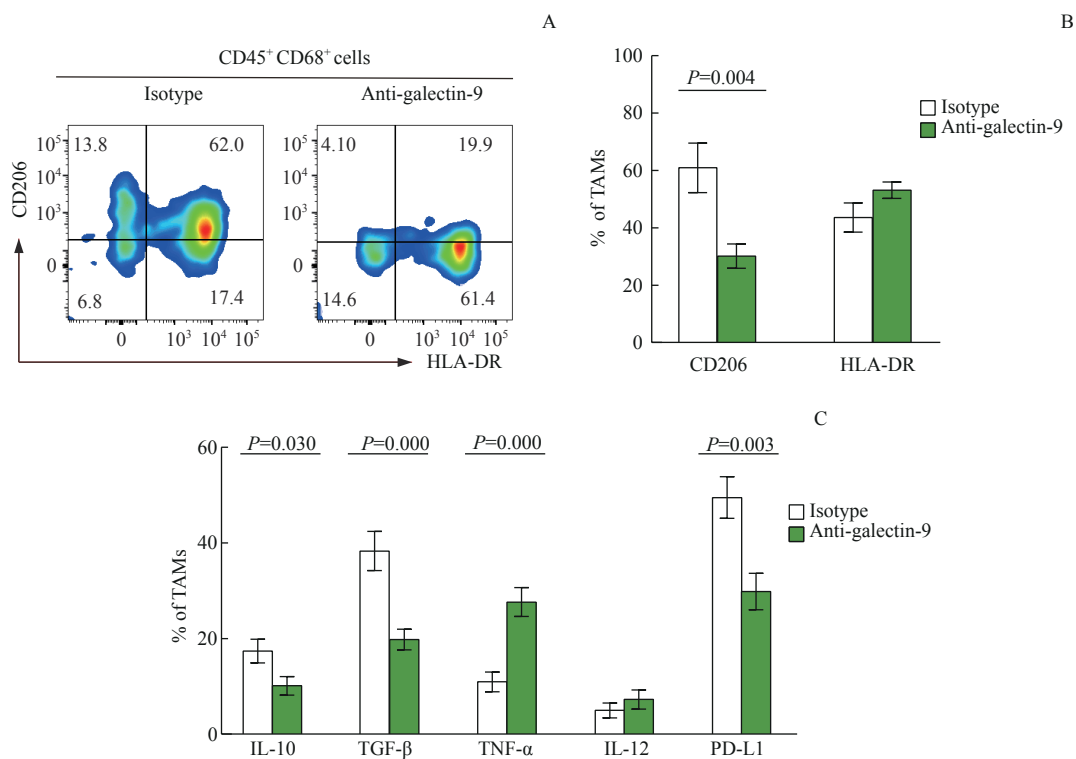
Note: A. Galectin-9 expression on macrophages induced from patient PBMCs after stimulation with rhIFN-γ, rhM-CSF and rhIL-16 by flow cytometry ($n=3$). B. M-CSF concentration between tumor and peritumor tissues or between PTS and TTS ($n=10$). C. Correlation between M-CSF concentration and percentage of galectin-9⁺TAMs in MIBC tumors ($n=20$). D. Galectin-9 expression on macrophages induced from patient PBMCs exposed to TTS with anti-M-CSF for 24 h by flow cytometry ($n=3$).

图3 IFN-γ、M-CSF和IL-16对巨噬细胞表达galectin-9的影响

Fig 3 Effect of IFN-γ, M-CSF and IL-16 on expression of galectin-9 in macrophages

进行体外共培养, 流式细胞术检测 CD8⁺T 细胞的增殖与效应分子的变化情况。结果显示: 与癌旁组织相比, 膀胱癌组织中 galectin-9⁺TAMs 能够显著抑制 CD8⁺T 细胞的增殖, 并且分泌效应分子 IFN-γ、GZMB 的含量显著降低 (图 5A、B)。阻断 galectin-9

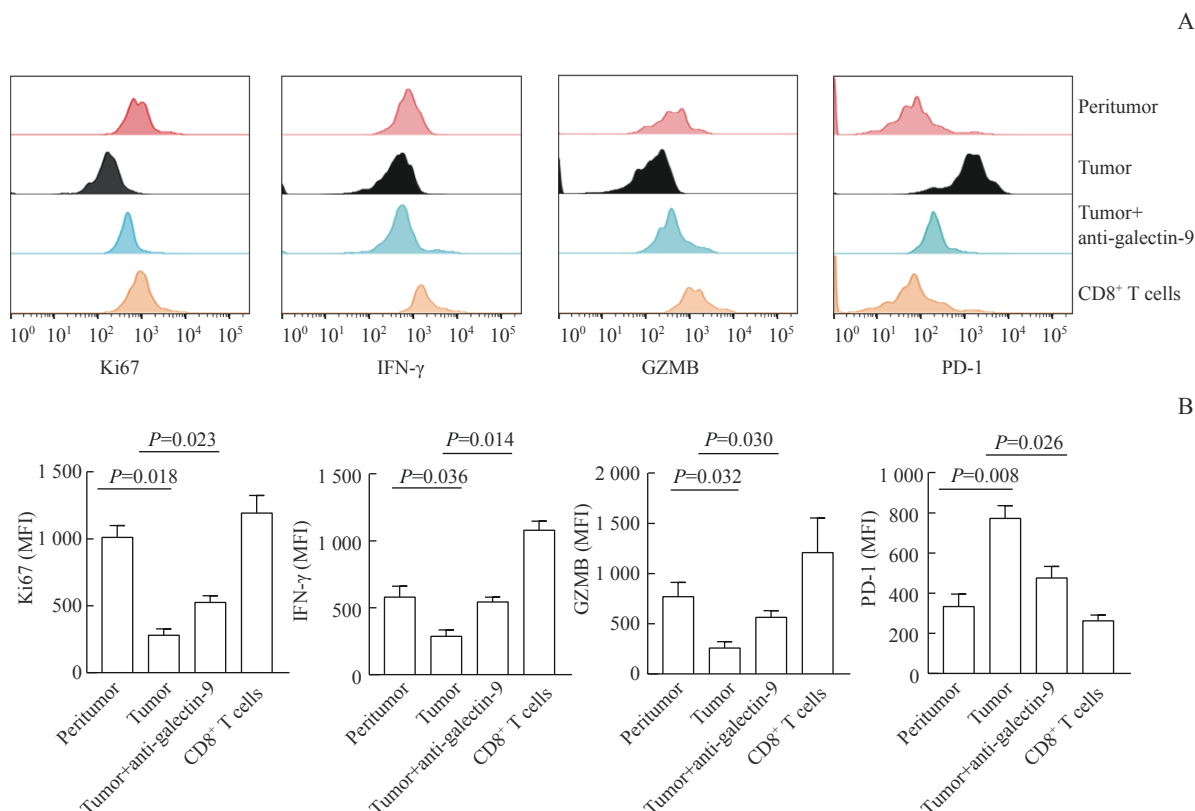
后, CD8⁺T 细胞的增殖能力显著增强, 分泌效应分子 IFN-γ 和 GZMB 的含量显著增加, 而 PD-1 的表达则显著下降 (图 5A、B)。该结果提示 Galectin-9⁺TAMs 对 CD8⁺T 细胞有抑制作用, 且该作用部分依赖于 galectin-9。



Note: A/B. Flow cytometry images (A) and quantification of CD206 and HLA-DR (B) within TAMs (CD45⁺CD68⁺ cells), $n=10$. C. Quantification of IL-10, TGF- β , TNF- α , IL-12 and PD-L1 within TAMs, $n=10$.

图4 阻断 galectin-9 对 TAMs 的表型及功能影响

Fig 4 Effects of galectin-9 blockade on phenotype and function of TAMs



Note: A. Flow cytometry charts. B. Statistical analysis ($n=3$).

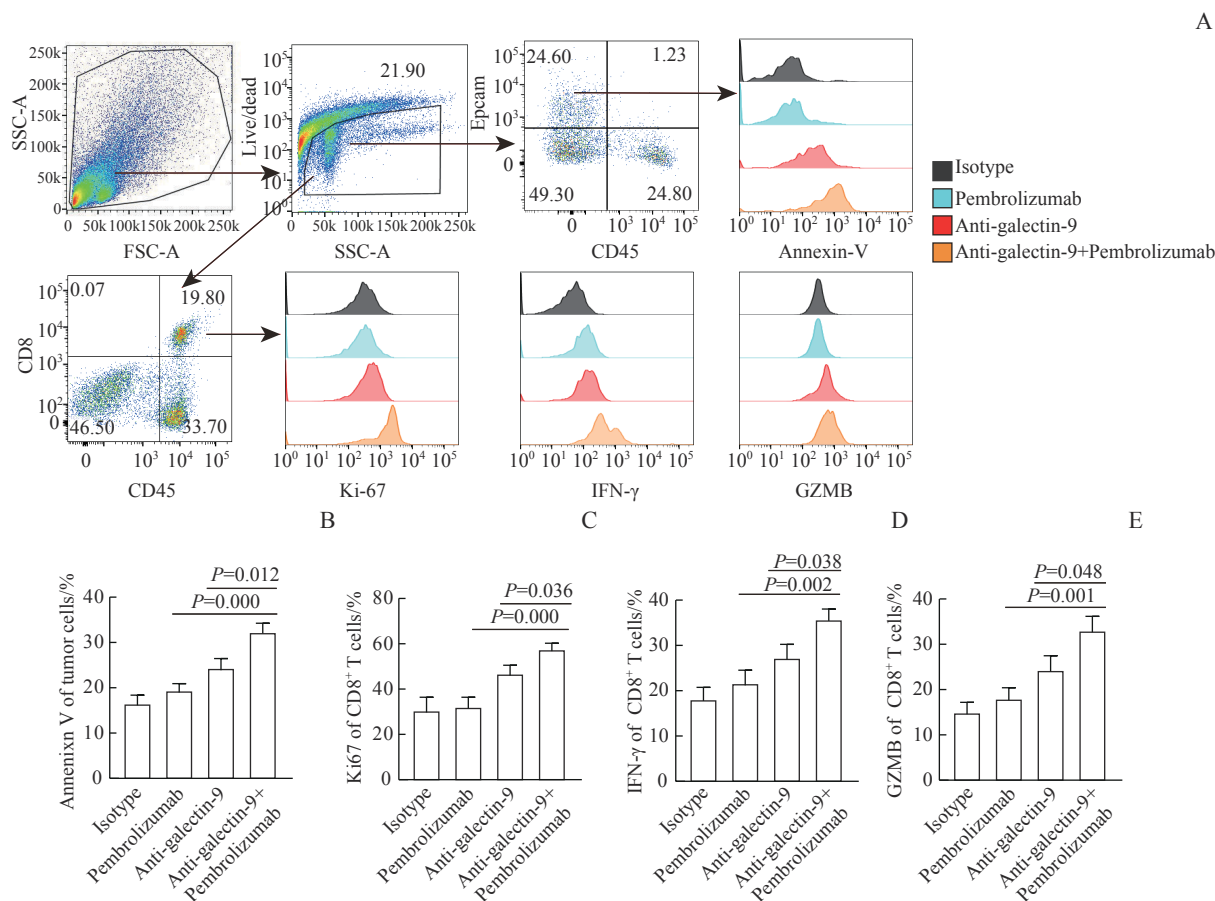
图5 膀胱癌组织中 galectin-9⁺TAMs 对 CD8⁺T 细胞增殖和功能的影响

Fig 5 Effect of galectin-9⁺TAMs on proliferation and function of CD8⁺T cells in MIBC tumor tissues

2.5 Galectin-9与PD-1的协同效应

Galectin-9⁺TAMs与PD-L1-PD-1信号通路诱导CD8⁺T细胞失活有关。为进一步探索galectin-9和PD-1在MIBC治疗中的协同效果,体外培养MIBC患者肿瘤细胞悬液,单独或协同使用anti-galectin-9抗体和PD-1抑制剂(pembrolizumab)进行干预,运用流式细胞术检测肿瘤细胞凋亡情况以及CD8⁺T细胞功能及增殖情况(图6A)。结果显示:Pembrolizumab组中

CD8⁺T细胞的增殖能力、效应分子分泌以及肿瘤细胞凋亡比例与isotype组相比,差异均无统计学意义;Anti-galectin-9+pembrolizumab组中,肿瘤细胞凋亡比例、CD8⁺T细胞的增殖能力和效应分子的分泌与anti-galectin-9组和pembrolizumab相比,均有显著增强或增多(图6B~E)。该结果提示,阻断galectin-9能够协同PD-1抑制剂更有效激活CD8⁺T细胞的效应功能。



Note: A. Flow cytometry charts of CD8⁺T cells and tumor cells (Epcam⁺CD45⁺). B. Quantification of Annexin V within tumor cells. C-E. Quantification of Ki67 (C), IFN-γ (D) and GZMB (E) within CD8⁺T cells. Tumor cell suspensions were treated with isotype group, anti-galectin-9 antibody group, pembrolizumab group and anti-galectin-9+pembrolizumab group for 12 h (n=8-10).

图6 Galectin-9与PD-1的协同效应

Fig 6 Synergistic effect of galectin-9 and PD-1

3 讨论

Galectin-9作为一种串联重复的半乳糖凝集素,在肿瘤生物学行为中起到重要的作用。编码galectin-9的基因LGALS9定位于人类染色体17q11.1,编码相对分子质量34 000~39 000的蛋白,含有2个同源的糖识别结构域,由一条肽链将两者相连。Galectin-9广泛分布于各种细胞表面和细胞基质,如淋巴细胞、胶质细胞、巨噬细胞、内皮细胞、肿瘤细胞、肥大细

胞、树突状细胞、T细胞、嗜酸性粒细胞和成纤维细胞等,参与调控多种肿瘤生物学过程^[20],如调控细胞周期、细胞凋亡、细胞黏附、迁移,参与肿瘤免疫逃逸和肿瘤血管生成等。前期研究^[14]表明,MIBC患者与肝癌患者相似,galectin-9主要表达在巨噬细胞表面。本研究发现,galectin-9⁺TAMs在MIBC中具有免疫抑制的表型,高表达抑制性分子CD206。相似的结果,在转移性黑色素瘤患者中也被证实^[21]。

通过体外实验证明,MIBC肿瘤来源的M-CSF能

够促进 TAMs 表面高表达 galectin-9。M-CSF 在多种实体瘤中能够通过配体 M-CSFR 促进巨噬细胞的增殖,并使其向抑制性巨噬细胞方向分化^[22]。比利时的研究^[23]也发现,肿瘤来源的 M-CSF 能够引起 TAMs 的表型转变。MIBC 微环境中, galectin-9⁺TAMs 被证实是一群活化的具有抑制性功能的细胞亚群。这说明肿瘤能够利用相互关联的免疫调节通路,促使抑制性通路占优势,从而形成耐受的 MIBC 微环境。但 M-CSF 通过何种机制诱导 TAMs 表面高表达 galectin-9,仍有待探讨。

TAMs 能够抑制 T 细胞的活动,阻止 T 细胞向肿瘤中浸润^[22]。前期研究^[14]发现,高浸润 galectin-9⁺TAMs 与 CD8⁺T 细胞功能受抑制有关。本研究发现,阻断 galectin-9 不仅能够将 TAMs 的表型由 M2 转为 M1,还能重激活 CD8⁺T 细胞的杀伤能力。体外共培养实验证实了 galectin-9⁺TAMs 对 CD8⁺T 细胞的抑制作用,这种作用是 galectin-9 依赖性的,进一步提示了将 galectin-9 作为治疗靶点的潜力。

ICIs 已经成为膀胱癌目前主要的治疗方法之一,尤其是对于那些对化疗产生抵抗的患者。然而,大部分患者对于 ICIs,如治疗膀胱癌的 PD-1 抑制剂反应率不足 30%^[24]。如何提高患者对 ICIs 的应答率,成为亟待解决的问题。这些 ICIs 主要目标之一是“解禁”效应性 CD8⁺T 细胞,恢复其抗肿瘤免疫功能^[25-26]。然而,T 细胞在效应功能发挥上不具有自主性,维持和发生 T 细胞反应以及记忆性 T 细胞发育过程主要依赖于固有免疫反应,并且肿瘤激活的固有免疫细胞参与 T 细胞对抗肿瘤的所有过程,包括肿瘤特异性 T 细胞的启动、扩张和肿瘤部位的浸润等。以上结果提示,联合探究固有免疫细胞和 CD8⁺T 细胞的相关靶点,可以为肿瘤免疫疗法提供新的思路。本研究发现阻断 galectin-9 后,作为固有免疫细胞之一的 TAMs,其表面 PD-L1 的表达显著下降,且 CD8⁺T 细胞的杀伤功能恢复。而单独使用 PD-1 抑制剂时,CD8⁺T 细胞的抗肿瘤免疫效应未恢复,这体现出 galectin-9 作为联合免疫治疗靶点的潜力。从进化的观点看,在抑制肿瘤免疫逃逸方面,联合靶向治疗比

单一治疗更有效^[27]。

本研究主要探究了表达在巨噬细胞表面的 galectin-9,而 galectin-9 在多种细胞的表面或者内部均有差异性表达,如肿瘤细胞、树突状细胞、T 细胞、肥大细胞等。还需要对这些细胞进行更深入的研究,以阐明 galectin-9 在 MIBC 中的生物学功能。

综上所述,本研究以 galectin-9⁺TAMs 为研究对象,阐述了其在 MIBC 微环境中的表型、MIBC 微环境对其的调控作用,以及其抑制 CD8⁺T 细胞效应功能的机制,评估其联合治疗的潜力,希冀为 MIBC 的肿瘤免疫治疗提供新思路。

利益冲突声明/Conflict of Interests

所有作者声明不存在利益冲突。

All authors disclose no relevant conflict of interests.

伦理批准和知情同意/Ethics Approval and Patient Consent

本研究涉及的所有实验均已通过复旦大学附属中山医院伦理委员会的审核批准(审批号:B2022-114R)。研究遵循《赫尔辛基宣言》原则。纳入研究的患者在手术前均签署知情同意书,同意将组织样本及随访数据在匿名的情况下用于研究和发表。TCGA 数据已经得到公开授权,并按照要求使用有关数据。

This study was approved by the Clinical Research Ethics Committee of Zhongshan Hospital, Fudan University (No. B2022-114R). This study was performed following the ethical principles of *Helsinki declaration*. Patients included in the study signed informed consent forms before surgery that permitted the usage of specimens and clinical data for research and publication under the condition of anonymity. TCGA data had been publicly authorized and used as required.

作者贡献/Authors' Contributions

戚炆炆参与实验设计,负责实验实施、总结数据以及论文写作和修改;熊鹰负责实验指导与课题资助。所有作者均阅读并同意最终稿件的提交。

The study was designed by QI Yangyang. The experiment was conducted, the data was summarized and the manuscript was drafted and revised by QI Yangyang. The research was guided and funded by XIONG Ying. Both authors have read the last version of paper and consented for submission.

• Received: 2022-09-19

• Accepted: 2022-11-18

• Published online: 2022-12-28

参·考·文·献

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for

36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.

- [2] WITJES J A, BRUINS H M, CATHOMAS R, et al. European association of urology guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer: summary of the 2020 guidelines[J]. *Eur Urol*, 2021, 79(1): 82-104.
- [3] TRAN L, XIAO J F, AGARWAL N, et al. Advances in bladder cancer biology and therapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, 21(2): 104-121.
- [4] FLAIG T W, SPIESS P E, AGARWAL N, et al. Bladder cancer, version 3. 2020, NCCN clinical practice guidelines in oncology[J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2020, 18(3): 329-354.
- [5] WANG Y, YAN K, WANG J, et al. M2 macrophage co-expression factors correlate with immune phenotype and predict prognosis of bladder cancer[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 609334.
- [6] SUN M, ZENG H, JIN K, et al. Infiltration and polarization of tumor-associated macrophages predict prognosis and therapeutic benefit in muscle-invasive bladder cancer[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2022, 71(6): 1497-1506.
- [7] BRUNI D, ANGELL H K, GALON J. The immune contexture and immunoscore in cancer prognosis and therapeutic efficacy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2020, 20(11): 662-680.
- [8] DE HENAU O, RAUSCH M, WINKLER D, et al. Overcoming resistance to checkpoint blockade therapy by targeting PI3K γ in myeloid cells[J]. *Nature*, 2016, 539(7629): 443-447.
- [9] ZHOU X, SUN L, JING D, et al. Galectin-9 expression predicts favorable clinical outcome in solid tumors: a systematic review and meta-analysis[J]. *Front Physiol*, 2018, 9: 452.
- [10] JIKUYA R, KISHIDA T, SAKAGUCHI M, et al. Galectin-9 expression as a poor prognostic factor in patients with renal cell carcinoma[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2020, 69(10): 2041-2051.
- [11] LI H, WU K, TAO K, et al. Tim-3/galectin-9 signaling pathway mediates T-cell dysfunction and predicts poor prognosis in patients with hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2012, 56(4): 1342-1351.
- [12] KRATOCHVILL F, NEALE G, HAVERKAMP J M, et al. TNF counterbalances the emergence of M2 tumor macrophages[J]. *Cell Rep*, 2015, 12(11): 1902-1914.
- [13] MELIEF S M, VISCONTI V V, VISSER M, et al. Long-term survival and clinical benefit from adoptive T-cell transfer in stage IV melanoma patients is determined by a four-parameter tumor immune signature[J]. *Cancer Immunol Res*, 2017, 5(2): 170-179.
- [14] QI Y, CHANG Y, WANG Z, et al. Tumor-associated macrophages expressing galectin-9 identify immunoevasive subtype muscle-invasive bladder cancer with poor prognosis but favorable adjuvant chemotherapeutic response[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2019, 68(12): 2067-2080.
- [15] DAVOLI T, UNO H, WOOTEN E C, et al. Tumor aneuploidy correlates with markers of immune evasion and with reduced response to immunotherapy[J]. *Science*, 2017, 355(6322): eaaf8399.
- [16] YOSHIHARA K, SHAHMORADGOLI M, MARTÍNEZ E, et al. Inferring tumour purity and stromal and immune cell admixture from expression data[J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 2612.
- [17] SUBRAMANIAN A, TAMAYO P, MOOTHA V K, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles[J]. *PNAS*, 2005, 102(43): 15545-15550.
- [18] LV Y, ZHAO Y, WANG X, et al. Increased intratumoral mast cells foster immune suppression and gastric cancer progression through TNF- α -PD-L1 pathway[J]. *J Immunother Cancer*, 2019, 7(1): 54.
- [19] FU Q, XU L, WANG Y, et al. Tumor-associated macrophage-derived interleukin-23 interlinks kidney cancer glutamine addiction with immune evasion[J]. *Eur Urol*, 2019, 75(5): 752-763.
- [20] HEUSSCHEN R, GRIFFIOEN A W, THIJSEN V L. Galectin-9 in tumor biology: a jack of multiple trades[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1836(1): 177-185.
- [21] ENNINGA E A L, CHATZOPOULOS K, BUTTERFIELD J T, et al. CD206-positive myeloid cells bind galectin-9 and promote a tumor-supportive microenvironment[J]. *J Pathol*, 2018, 245(4): 468-477.
- [22] DEMARIA O, CORNEN S, DAËRON M, et al. Harnessing innate immunity in cancer therapy[J]. *Nature*, 2019, 574(7776): 45-56.
- [23] VAN OVERMEIRE E, STIJLEMANS B, HEYMANN F, et al. M-CSF and GM-CSF receptor signaling differentially regulate monocyte maturation and macrophage polarization in the tumor microenvironment[J]. *Cancer Res*, 2016, 76(1): 35-42.
- [24] ZIBELMAN M, RAMAMURTHY C, PLIMACK E R. Emerging role of immunotherapy in urothelial carcinoma-Advanced disease[J]. *Urol Oncol*, 2016, 34(12): 538-547.
- [25] CHEN D S, MELLMAN I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point[J]. *Nature*, 2017, 541(7637): 321-330.
- [26] PIO R, AJONA D, ORTIZ-ESPINOSA S, et al. Complementing the cancer-immunity cycle[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 774.
- [27] HANAHAN D. Hallmarks of cancer: new dimensions [J]. *Cancer Discov*, 2022, 12(1): 31-46.

[本文编辑] 吴 洋