[文章编号] 1671-587X(2024)04-0881-10 DOI:10.13481/j.1671-587X.20240401

基于M2型巨噬细胞来源的Siglec15对食管鳞癌细胞恶性生物学行为影响的生物信息学分析及实验验证

任祎琳[1]，臧翌辰[1]，薛乐乐[1]，杨凯歌[1]，陈素芳[1]，王魏楠[1]，罗成华[1]，梁伟华[1]，王良海[1]，李 锋[1]，胡建明[1,2]
（1.石河子大学第一附属医院病理科，新疆 石河子 832002；2. 石河子大学医学院病理学系，新疆 石河子 832002）

[摘 要] **目的：**采用生物信息学方法分析M2型肿瘤相关巨噬细胞（M2-TAMs）来源唾液酸结合免疫球蛋白样凝集素15（Siglec15）促进食管鳞状细胞癌（ESCC）恶性生物学行为的作用，并通过细胞实验对其进行验证。**方法：**应用肿瘤免疫评价资源（TIMER）数据库分析Siglec15在泛癌和癌旁正常组织中的表达差异及免疫浸润情况，实时荧光定量PCR（RT-qPCR）法检测M2-TAMs和ESCC EC109及KYSE150细胞中Siglec15 mRNA表达水平。在M2-TAMs与ESCC细胞非接触性共培养基础上，分别设置EC109/KYSE150组、EC109/KYSE150＋si-NC组（转染si-NC序列）和EC109/KYSE150＋si-Siglec15组（分别转染si-Siglec15#1和si-Siglec15#2序列），采用CCK-8法检测各组细胞增殖活性，细胞划痕实验检测各组细胞划痕愈合率，Transwell小室实验检测各组细胞中迁移和侵袭细胞数，流式细胞术检测各组细胞凋亡率。**结果：**生物信息学分析，与癌旁正常组织比较，食管癌、结肠癌和头颈部鳞状细胞癌等泛癌组织中Siglec15 mRNA表达水平升高（$P<0.05$或$P<0.01$），且食管癌组织中Siglec15 mRNA表达水平与巨噬细胞浸润呈明显正相关关系（$P<0.05$）；与EC109细胞和KYSE150细胞比较，M2-TAMs中Siglec15 mRNA表达水平明显升高（$P<0.01$）。EC109/KYSE150组、EC109/KYSE150＋si-NC组和EC109/KYSE150＋si-Siglec15组细胞增殖率比较差异均无统计学意义（$P>0.05$）。与EC109/KYSE150组比较，24和48 h时EC109/KYSE150＋si-NC组细胞划痕愈合率升高（$P<0.01$），迁移和侵袭细胞数增加（$P<0.05$），细胞凋亡率降低（$P<0.01$）；与EC109/KYSE150＋si-NC组比较，EC109/KYSE150＋si-Siglec15#1组和EC109/KYSE150＋si-Siglec15#2组细胞划痕愈合率降低（$P<0.05$），迁移和侵袭细胞数减少（$P<0.05$），细胞凋亡率差异无统计学意义（$P>0.05$）。**结论：**M2-TAMs来源Siglec15可能是促进ESCC细胞迁移和侵袭的关键因子。

[关键词] 食管鳞状细胞癌；唾液酸结合免疫球蛋白样凝集素15；肿瘤相关巨噬细胞；细胞迁移；细胞侵袭
[中图分类号] R735.1；Q811.4 [文献标志码] A

Bioinformatics analysis based on effect of M2 macrophage-derived Siglec15 on malignant biological behaviour of esophageal squamous cell carcinoma cells and its experimental validation

REN Yilin[1], ZANG Yichen[1], XUE Lele[1], YANG Kaige[1], CHEN Sufang[1], WANG Weinan[1], LUO Chenghua[1], LIANG Weihua[1], WANG Lianghai[1], LI Feng[1], HU Jianming[1,2]
(1. Department of Pathology, First Affiliated Hospital, Shihezi University, Shihezi 832002, China;

[收稿日期] 2023-09-01
[基金项目] 国家自然科学基金项目（81960435）；新疆生产建设兵团指导性科技计划项目（2022DZ003）
[作者简介] 任祎琳（1996－），女，陕西省延安市人，医学硕士，主要从事肿瘤微环境和免疫方面的研究。
[通信作者] 胡建明，教授，硕士研究生导师（E-mial：jianming.120@163.com）

2. Department of Patholegy, School of Medical Sciences, Shihezi University, Shihezi 832002, China)

ABSTRACT **Objective**: To discuss the effect of sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin-15 (Siglec15) derived from M2 tumor-associated macrophages (M2-TAMs) on promoting the malignant biological behavior of the esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) through bioinformatics analysis, and to validate the findings through cell experiment. **Methods**: The Tumor Immune Estimation Resource (TIMER) online Database was used to analyze the expression differences and immune infiltration of Siglec15 in pan-cancer and adjacent normal tissues. Real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the expression levels of Siglec15 mRNA in M2-TAMs and ESCC EC109 and KYSE150 cells. Based on the non-contact co-culture of M2-TAMs and ESCC cells, the following groups were set up, such as EC109/KYSE150 group, EC109/KYSE150+si-NC group (transfected with si-NC sequence), and EC109/KYSE150+si-Siglec15 group (transfected with si-Siglec15#1 and si-Siglec15#2 sequences). CCK-8 method was used to detect the proliferation activities of the cells in various groups; wound healing assay was used to detect the wound healing rates of the cells in various groups; Transwell chamber assay was used to detect the numbers of migration and invasion cells in various groups; flow cytometry was used to detect the apoptotic rates of the cells in various groups. **Results**: The bioinformatics analysis results showed that compared with adjacent normal tissue, the expression levels of Siglec15 mRNA in pan-cancer tissues such as esophageal cancer, colon cancer, and head and neck squamous cell carcinoma tissues were increased ($P<0.05$ or $P<0.01$), and the expression level of Siglec15 mRNA in esophageal cancer tissue was significantly positively correlated with the infiltration of the macrophages ($P<0.05$). Compared with the EC109 cells and KYSE150 cells, the expression level of Siglec15 mRNA in M2-TAMs was significantly increased ($P<0.01$). There was no significant difference in the proliferation rate of the cells among EC109/KYSE150 group, EC109/KYSE150+si-NC group, and EC109/KYSE150+si-Siglec15 group ($P>0.05$). Compared with EC109/KYSE150 group, after treated for 24 and 48 h, the wound healing rate of the cells in EC109/KYSE150+si-NC group was increased ($P<0.01$), the numbers of migration and invasion cells were increased ($P<0.05$), and the apoptotic rate was decreased ($P<0.01$). Compared with EC109/KYSE150+si-NC group, the wound healing rates of the cells in EC109/KYSE150+si-Siglec15#1 group and EC109/KYSE150+si-Siglec15#2 group were decreased ($P<0.05$), the numbers of migration and invasion cells were decreased ($P<0.05$), and the apoptotic rates of the cells had no significant difference ($P>0.05$). **Conclusion**: Siglec15 derived from M2-TAMs may be a key factor in promoting the migration and invasion of the ESCC cells.

KEYWORDS Esophageal squamous cell carcinoma; Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin-15; Tumor-associated macrophage; Cell migration; Cell invasion

食管癌是一种常见的消化道恶性肿瘤，每年发病人数达60.4万，在所有癌症中位居第7位，其死亡率位居第6位[1]，我国食管癌最常见的组织学类型为食管鳞状细胞癌（esophageal squamous cell carcinoma，ESCC）[2]。肿瘤相关巨噬细胞（tumor-associated macrophages，TAMs）是肿瘤患者体内最重要的固有免疫细胞，具有明显的抗炎促癌特征，其表型与M2型巨噬细胞表型较为一致[3-4]。唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素15（sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin-15，Siglec15）与B7家族的同源性高达30%，表明其具有相似的免疫调节功能，并且在某种程度上可以互相促进[5]。Siglec15在正常组织和免疫细胞中表达量极低，但在巨噬细胞和肿瘤细胞中高表达，并具有明显的免疫抑制作用[6]。研究[7-9]显示：Siglec15在乳腺癌、肺癌和结肠癌组织中表达水平明显高于癌旁组织，并与肿瘤进展及免疫靶向治疗有密切关联。但ESCC中Siglec15的表达与调控作用尚未见报道。本研究旨在通过检测Siglec15在ESCC及M2型TAMs（M2-like TAMs，M2-TAMs）中表达情况，并建立M2-TAMs与ESCC细胞共培养模型，探讨M2-TAMs来源Siglec15对ESCC细胞恶性生

物学行为的影响，为ESCC的分子靶向治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 数据库分析 利用肿瘤免疫评价资源（Tumor Immune Estimation Resource，TIMER）2.0数据库（http://timer.cistrome.org/）分析Siglec15在泛癌组织和正常组织中的表达水平，通过TIMER数据库（https://cistrome.shinyapps.io/timer/）“Gene”模块分析食管癌组织中主要免疫细胞如CD8＋T细胞、巨噬细胞和树突状细胞（dendritic Cells，DCs）等的免疫细胞浸润情况。

1.2 细胞、主要试剂和仪器 人ESCC EC109细胞购自中国医学科学院基础医学研究所，人ESCC KYSE150细胞购自上海复祥生物科技有限公司，人单核细胞白血病THP-1细胞购自中科院上海细胞库。青-链霉素双抗、1640培养基和β-巯基乙醇购自美国Gibco公司，胰酶-EDTA购自北京Solarbio公司，佛波酯（phorbol-12-myristate-13-acetate，PMA）购自北京四正柏生物科技有限公司，胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）购自德国BI公司，白细胞介素4（interleukin-4，IL-4）和白细胞介素13（interleukin-13，IL-13）购自美国Peprotech公司，逆转录试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司，实时荧光定量PCR（real-time fluorescence quantitative PCR，RT-PCR）检测试剂盒购自天根生化科技（北京）有限公司，CCK-8试剂盒购自日本同仁化学研究所，Matrigel基质胶购自美国BD Biosciences公司，Annexin Ⅴ-FITC/PI凋亡检测试剂盒购自杭州联科生物技术股份有限公司，Siglec15、Siglec15阴性对照序列（si-NC）和siRNA序列（si-Siglec15#1及si-Siglec15#2）由上海吉玛制药技术有限公司设计并制备。BD FACSAria Ⅲ流式细胞仪购自美国BD Biosciences公司，超净工作台购于新加坡ESCO公司，紫外分光光度仪购自美国赛默飞世尔科技公司，倒置显微镜购于日本奥林巴斯公司，荧光定量PCR仪购自美国ABI公司，－20 ℃冰箱购自海尔集团公司。

1.3 细胞培养 采用含有10％ FBS和1％青-链霉素双抗的1640培养基培养贴壁生长的EC109和KYSE150细胞及悬浮生长的THP-1细胞。在1640培养基体系中加入0.82％ β-巯基乙醇，所有细胞均置于37 ℃、5％ CO_2恒温孵育箱中培养。显微镜下观察细胞形态表现和密度，背景干净无污染，细胞生长处于对数生长期时即可进行传代。

1.4 M2-TAMs条件培养基收集 取对数生长期THP-1细胞进行诱导。6孔细胞培养板中每孔接种细胞1.5×10^6个，PMA 20 μL，每孔补足2 mL细胞培养液，置于培养箱中继续培养；24 h后换液分别添加20 $\mu g\cdot L^{-1}$ IL-4和IL-13继续诱导48 h，获得M2-TAMs。48 h后收集细胞培养上清液，1 000 $r\cdot min^{-1}$离心5～8 min，收集上层的培养基置于新的管中（弃去细胞沉淀）。此上清即为M2-TAMs条件培养基。

1.5 M2-TAMs中si-Siglec15转染及分组 分别将si-NC、si-Siglec15#1和si-Siglec15#2按照转染说明书对已诱导获得的M2-TAMs进行转染，采用RT-qPCR法检测，细胞转染成功。在M2-TAMs与ESCC细胞非接触性共培养基础上进行分组：EC109组、KYSE150组、EC109＋si-NC组（转染si-NC序列）、KYSE150＋si-NC（转染si-NC序列）、EC109＋si-Siglec15组和KYSE150＋si-Siglec15组（分别转染si-Siglec15#1和si-Siglec15#2序列）。

1.6 RT-qPCR法检测M2-TAMs和EC109及KYSE150细胞中Siglec15 mRNA表达水平 TRIzol法分别提取M2-TAMs、EC109和KYSE150细胞RNA并验证纯度为1.8～2.2，按照逆转录试剂盒说明操作逆转录为cDNA，使用SYBR green Master Mix进行RT-qPCR扩增。以GAPDH为内参，采用$2^{-\triangle\triangle Ct}$法分别计算不同细胞中Siglec15 mRNA表达水平。引物序列：Siglec15，上游引物5′-TACTTCTGCCGCGTGGAGTT-3′，下游引物5′-CAGCACCGAGATGTTGACGA-3′；GAPDH，上游引物5′-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3′，下游引物5′-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3′。

1.7 CCK-8法检测各组细胞增殖活性 细胞分组方法见“1.5”。采用25T培养瓶培养ESCC细胞，消化后计数。向每个实验孔中加入3 000个细胞，每组设置5个复孔。4～5 h待其贴壁，弃掉原培养基，按照实验分组，将si-NC、si-Siglec15#1和si-Siglec15#2依次加入所需培养基。每孔总体积为200 μL，置于37 ℃培养箱培养。分别在0、48和72 h取出96孔细胞培养板，向实验孔中加入CCK-8试剂（培养体系10％），避免产生气泡影响吸光度（A）值，置于37 ℃培养箱孵育2～5 h，全程注意避光操作。孵育完成后取出96孔细胞培养板，置于暗盒中上机检测。采用酶标仪于450 nm波长处

检测每孔细胞A值，以A值代表各组细胞增殖活性。

1.8 细胞划痕实验检测各组细胞划痕愈合率 细胞分组方法见“1.5”。在6孔细胞培养板中每孔铺1×10^6个细胞，置于37 ℃培养箱中培养6～8 h，待其贴壁过夜后融合率为100%。细胞贴壁后去除原培养基，用尺比对后采用100 μL移液器吸头保持力度一致，垂直于孔板划直线，每孔平行划取3条竖直线。PBS缓冲液缓慢洗涤3次，避免冲散单层贴壁细胞，分别按照分组方法加入新鲜无血清的培养基培养48 h。在划痕结束后立即在显微镜下拍照，记为0 h的图像。分别在6、24和48 h再次拍照。每孔每次至少拍取3个固定位置，采用Image J软件测定划痕面积，计算划痕愈合率。划痕愈合率=（起始划痕面积－迁移后划痕面积）/起始划痕面积×100%。

1.9 Transwell小室实验检测各组细胞中迁移细胞数和侵袭细胞数 细胞分组方法见“1.5”。提前12 h饥饿处理25T培养瓶培养的ESCC细胞，消化后计数。向24孔细胞培养板中每个孔的上室（8 μm孔径）加入细胞悬液和培养基，总体积为200 μL。下室加入480 μL 1640原液和120 μL血清。每孔细胞数为10 000个，每组设置3个复孔。将铺好的24孔细胞培养板置于37 ℃培养箱中培养24 h。将小室从24孔细胞培养板中取出，PBS缓冲液漂洗3次。在24孔细胞培养板中加入4% 多聚甲醛（每孔600 μL），将小室浸泡于多聚甲醛中20 min，防止细胞形态改变。再次取出小室，用PBS缓冲液漂洗3次，倒扣晾干。将结晶紫用双蒸水稀释为0.1%浓度（现配现用），加入24孔小室中（每孔600 μL），将晾干的小室浸泡于结晶紫中，避光染色20 min。将小室取出，用PBS缓冲液浸洗，用棉签擦去小室内未迁移的细胞，倒扣晾干，置于显微镜下观察并计数细胞数，即迁移细胞数。侵袭实验需将Martrigel基质胶用1640原液按1∶8稀释后均匀铺放到24孔小室的上层，总体积为每孔50 μL，其余步骤同上。

1.10 流式细胞术检测各组细胞凋亡率 细胞分组法见“1.5”。采用无EDTA胰酶处理后贴壁细胞可被快速离心，从而获取细胞悬浮液。收集未经处理的贴壁/悬浮细胞至少每管1×10^6个，按照实验所需抗体标记，分别准备空白管（仅有未经处理细胞）、单标阳性管（仅含有一种抗体标记）和混染管（含有标记所有抗体）。收集各组细胞，在含1×10^7个细胞样本的FACS管中添加50 μL流式缓冲剂Buffer，并根据凋亡检测试剂盒说明书添加10 μL的PI和5 μL Annexin Ⅴ-FITC，室温下避光孵育15～20 min。孵育结束后，直接加入300～500 μL流式Buffer重悬细胞，采用流式细胞术检测各组细胞凋亡率。细胞凋亡率=右上象限细胞百分率+右下象限细胞百分率。

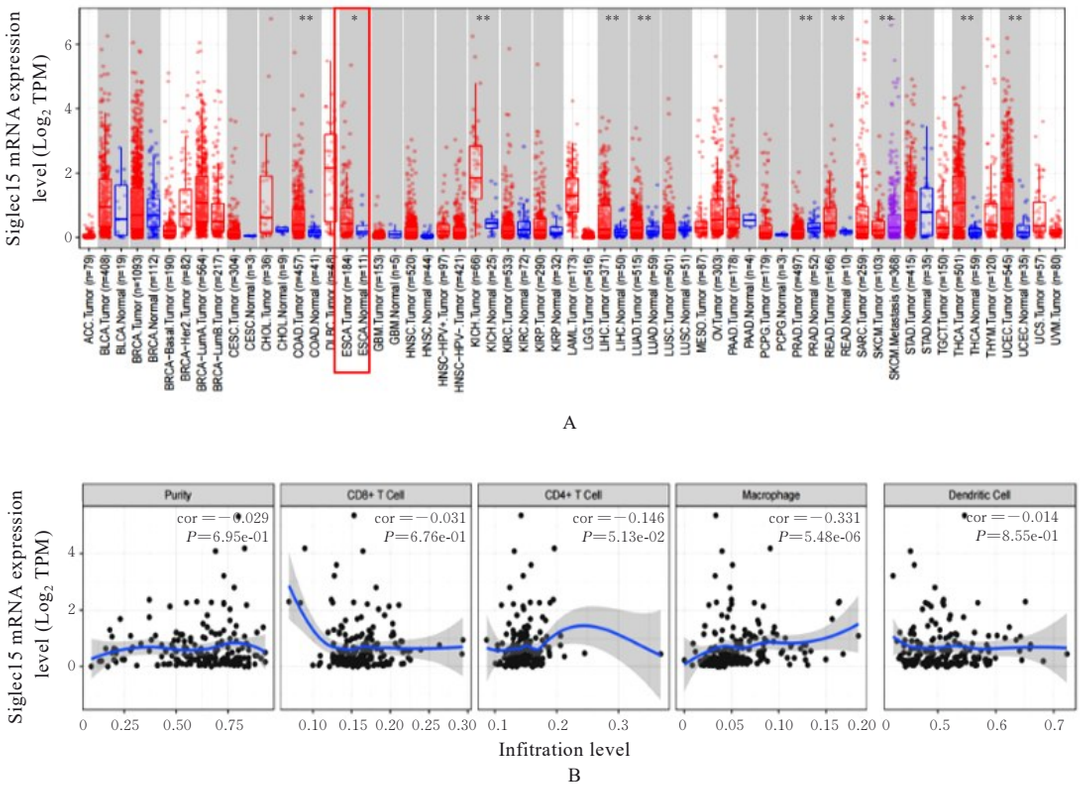
1.11 统计学分析 采用SPSS 26.0和GraphPad prism 9.0统计软件进行统计学分析。每个实验均独立且重复3次。各组细胞中Siglec15 mRNA表达水平、细胞增殖活性、划痕愈合率、迁移细胞数、侵袭细胞数和细胞凋亡率均符合正态分布，以$\bar{x}\pm s$表示，多组间样本均数比较采用单因素方差分析，组间样本两两比较采用LSD-t检验。以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同组织和细胞中Siglec15 mRNA表达水平及其与免疫细胞浸润的相关性 多种肿瘤组织中均有Siglec15 mRNA表达，且食管癌、结肠癌和头颈部鳞状细胞癌等泛癌组织中Siglec15 mRNA表达水平明显高于癌旁正常组织（$P<0.05$或$P<0.01$）（图1A）。免疫细胞浸润分析显示：食管癌组织中Siglec15 mRNA表达水平与巨噬细胞浸润呈明显正相关关系（$P<0.05$）（图1B）。悬浮生长的THP-1细胞经PMA、IL-4和IL-13处理后诱导为贴壁生长的M2-TAMs，M2-TAMs中白细胞介素10（interleukin-10，IL-10）和精氨酸酶1（arginase-1，Arg-1）表达水平明显升高。采用RT-qPCR法检测M2-TAMs、EC109和KYSE150细胞中Siglec15 mRNA表达水平，结果显示：与M2-TAMs（0.947 64±0.0184 67）比较，EC109和KYSE150细胞中Siglec15 mRNA表达水平（0.165 70±0.063 91和0.051 67±0.029 96）降低（$P<0.05$），提示ESCC肿瘤微环境中Siglec15可能主要来源于M2-TAMs。

2.2 各组细胞增殖活性 按不同分组方法处理各组细胞，分别共培养24、48和72 h，不同时间点各组细胞增殖活性比较差异均无统计学意义（$P>0.05$），提示M2-TAMs中的Siglec15不影响ESCC细胞增殖活性。见图2。

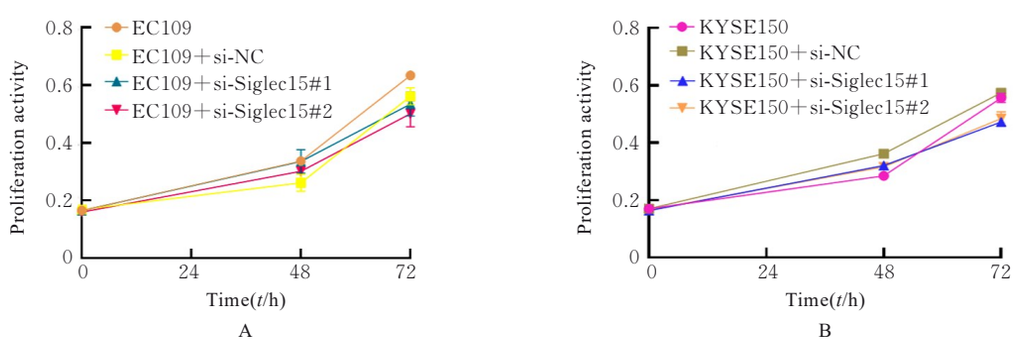
2.3 各组细胞划痕愈合率、迁移细胞数和侵袭细胞数 与EC109/KYSE150组比较，24和48 h时



A：Analysis on expression of Siglec15 mRNA in adjacent tissue and cancer tissue in TIMER2.0 Database；B：Relationship between Expression of Siglec15 mRNA in esophageal cancer tissue and invasion of macrophages. $^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$ *vs* adjacent normal tissue.

图1 不同组织中Siglec15 mRNA表达水平及其与免疫细胞浸润的相关性

Fig. 1 Expression levels of Siglec15 mRNA in different tissues and its correlation with immune cell infiltration



A：EC109 cells；B：KYSE150 cells.

图2 不同时间点各组细胞增殖活性

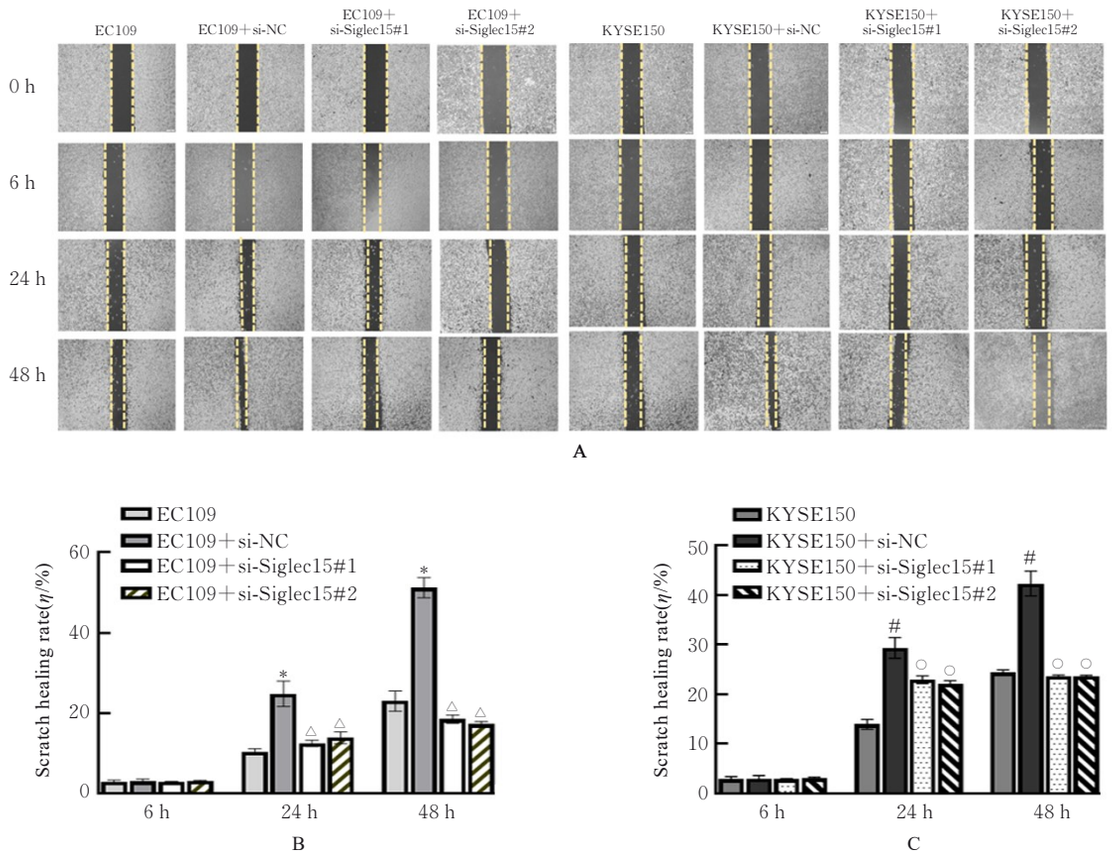
Fig. 2 Proliferation activities of cells in various groups at different time points

EC109/KYSE150+si-NC组细胞划痕愈合率升高（$P<0.01$），细胞中迁移细胞数和侵袭细胞数增多（$P<0.05$）；与EC109/KYSE150+si-NC组比较，EC109/KYSE150+si-Siglec15#1组和EC109/KYSE150+si-Siglec15#2组细胞划痕愈合率降低（$P<0.05$），细胞中迁移细胞数和侵袭细胞数减少（$P<0.05$）。见图3～5和表1。

2.4 各组细胞凋亡率 与EC109/KYSE150组比较，EC109/KYSE150+si-NC组细胞凋亡率降低（$P<0.01$）；与EC109/KYSE150+si-NC组比较，EC109/KYSE150+si-Siglec15#1组和EC109/KYSE150+si-Siglec15#2组细胞凋亡率差异无统计学意义（$P>0.05$）。见图6和7。

3 讨 论

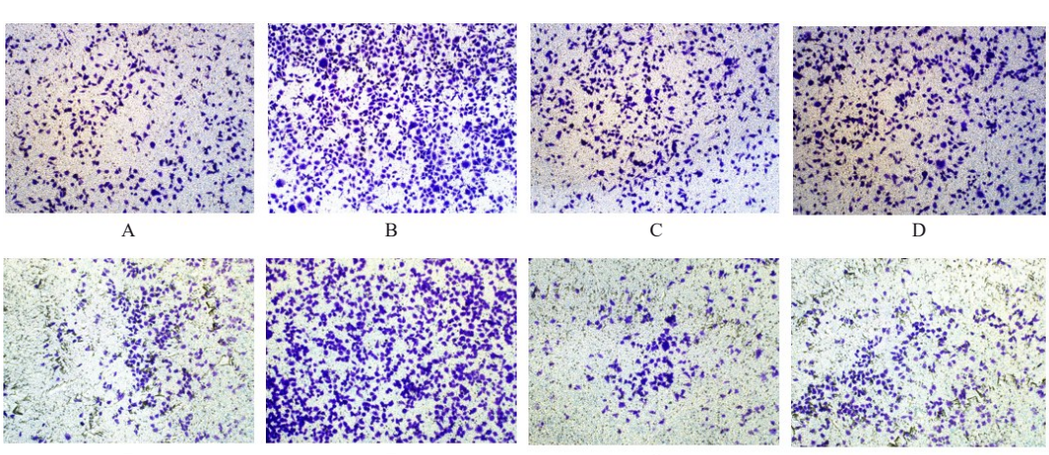
ESCC是全球常见的恶性肿瘤之一，大多数患



A：Scratch healing of cells in various groups（×200）；B，C：Scratch healing rates of cells in various groups. $^{*}P<0.01$ *vs* EC109 group；$^{\triangle}P<0.05$ *vs* EC109+si-NC group；$^{\#}P<0.01$ *vs* KYSE150 group；$^{\bigcirc}P<0.01$ *vs* KYSE150+si-NC group.

图 3 细胞划痕实验检测不同时间点各组细胞划痕愈合情况

Fig. 3 Scratch healing of cells in various groups at different time points detected by cell scratch assay

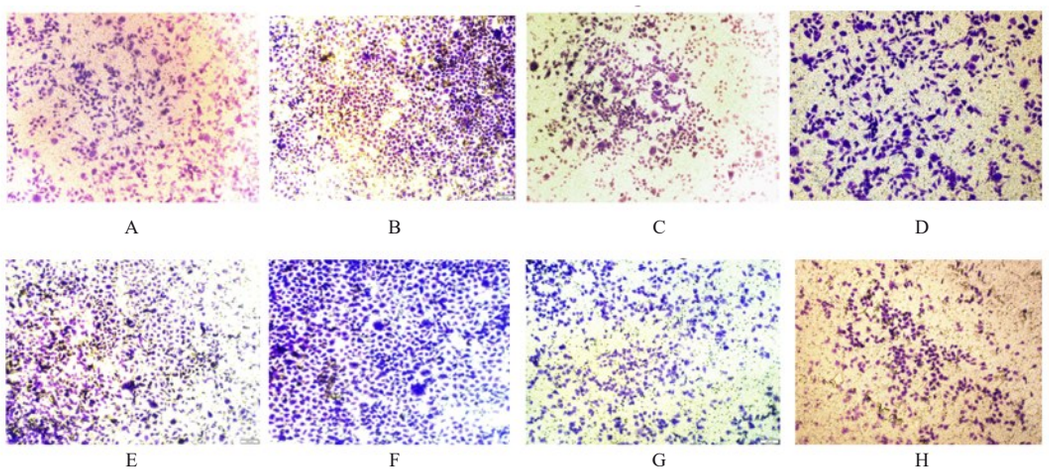


A：EC109 group；B：EC109+si-NC group；C：EC109+si-Siglec15#1 group；D：EC109+si-Siglec15#2 group；E：KYSE150 group；F：KYSE150+si-NC group；G：KYSE150+si-Siglec15#1 group；H：KYSE150+si-Siglec15#2 group.

图 4 Transwell小室实验检测各组细胞迁移情况（结晶紫，×200）

Fig. 4 Migration of cells in various groups deteeted by Transwell chamber assay（Crystal violet，×200）

者在发现时已进入中晚期，预后较差[10-11]。免疫靶向治疗为许多肿瘤患者带来福音，随着免疫治疗的发展，进展期ESCC患者采用免疫靶向治疗有良好的疗效，《中国食管癌放射治疗指南（2021年版）》已经推荐部分药物作为二线及以上治疗的选择，但仍然存在疗效不佳和免疫耐药的情况[12-13]。肿瘤免



A：EC109 group；B：EC109＋si-NC group；C：EC109＋si-Siglec15#1 group；D：EC109＋si-Siglec15#2 group；E：KYSE150 group；F：KYSE150＋si-NC group；G：KYSE150＋si-Siglec15#1 group；H：KYSE150＋si-Siglec15#2.

图5 Transwell小室实验检测各组细胞侵袭情况(结晶紫，×200)

Fig. 5 Invasion of cells in various groups detected by Transwell chamber assay(Crystal violet，×200)

表1 各组细胞中迁移细胞数和侵袭细胞数

Tab. 1 Numbers of migration and invasion cells in various groups ($n=3$，$\bar{x}\pm s$)

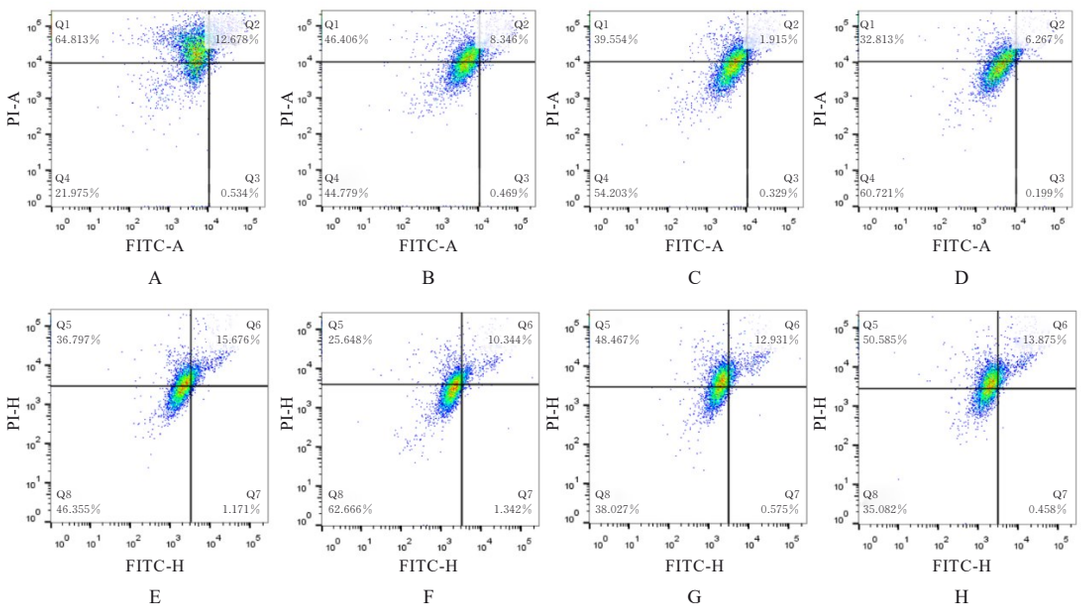
Group	Number of migration cells	Number of invasion cells
EC109	175.750±7.349	123.330±6.743
EC109＋si-NC	234.870±9.523*	186.330±5.163*
EC109＋si-Siglec15#1	178.850±6.246△	103.420±2.165△
EC109＋si-Siglec15#2	163.560±5.566△	112.650±5.443△
KYSE150	216.410±4.685	212.470±4.694
KYSE150＋si-NC	345.350±4.654#	325.350±8.789#
KYSE150＋si-Siglec15#1	194.850±2.253○	193.870±4.767○
KYSE150＋si-Siglec15#2	187.450±6.378○	199.750±8.773○

*$P<0.05$ *vs* EC109 group；△$P<0.05$ *vs* EC109＋si-NC group；#$P<0.05$ *vs* KYSE150 group；○$P<0.05$ *vs* KYSE150＋si-NC group.

疫微环境的异质性是免疫治疗的主要挑战之一，近年来研究[14-16]显示：肿瘤微环境中巨噬细胞、DCs和CD4＋T淋巴细胞等免疫细胞会逐渐极化或分化为促进肿瘤进展的M2-TAMs、耐受性DCs和调节性CD4＋T细胞，免疫细胞之间的相互作用更加速了肿瘤免疫逃逸的发生。通过对ESCC关键免疫细胞分布和功能的研究及对其在不同肿瘤微环境中动态变化的分析，可以更好地了解关键的免疫细胞在ESCC发生发展中的作用，为其有效的免疫治疗提供参考。

TAMs是肿瘤患者体内最重要的固有免疫细胞，具有明显的抗炎促癌特征，表型倾向M2巨噬细胞表型，因此针对其表型转换的肿瘤免疫治疗取得了良好的效果[17]。肿瘤组织中高密度的M2-TAMs诱导免疫抑制，参与组织重塑和促血管生成，是导致多种肿瘤预后差的独立危险因素[18]。CD47在多种肿瘤细胞中表达水平较高，且可与巨噬细胞表面抗人信号调节蛋白α（signal regulatory protein alpha，SIRPα）跨膜蛋白结合，形成CD47-SIRPα复合物，有效抑制巨噬细胞的吞噬作用，有助于肿瘤的生长和扩散[19-20]。M2-TAMs分泌的趋化因子主要参与肿瘤的免疫抑制、基质重塑、血管生成、细胞侵袭和迁移[21]。

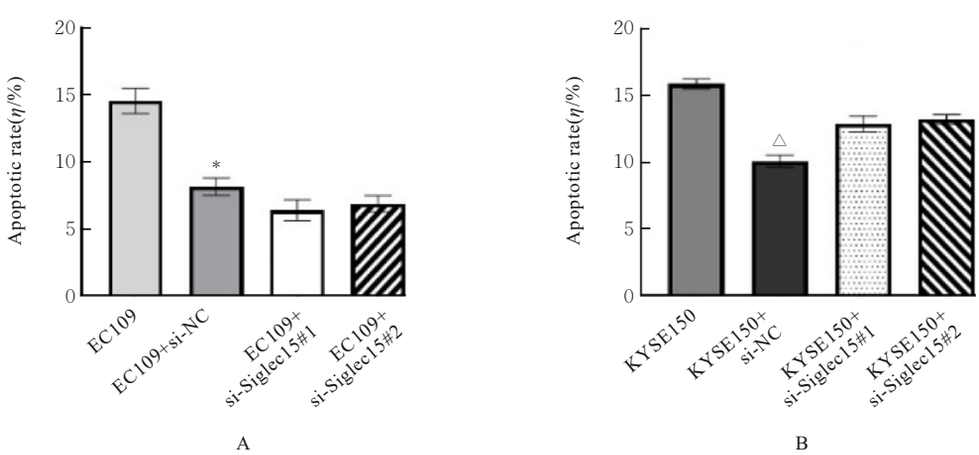
最初研究[6]显示：Siglec15与破骨细胞分化、骨重塑和微生物感染有关。一项关于膀胱癌的研究[22]表明：大多数高Siglec15水平的膀胱癌患者主要组织相容性复合体（major histocompatibility complex，MHC）分子水平明显降低，导致其抗原呈递和处理能力有所降低，因此膀胱癌患者可能成为抗Siglec15免疫治疗的最佳选择。一项关于高通



A：EC109 group；B：EC109＋si-NC group；C：EC109＋si-Siglec15#1 group；D：EC109＋si-Siglec15#2 group；E：KYSE150 group；F：KYSE150＋si-NC group；G：KYSE150＋si-Siglec15#1 group；H：KYSE150＋si-Siglec15#2 group.

图 6 流式细胞术检测各组细胞凋亡率

Fig. 6 Apoptotic rates of cells in various groups detected by flow cytometry



A：EC109 cells；B：KYSE150 cells. $^{*}P<0.05$ *vs* EC109 group；$^{\triangle}P<0.05$ *vs* KYSE150 group.

图 7 各组细胞凋亡率

Fig. 7 Apoptotic rates of cells in various groups

量筛选人跨膜蛋白质组中调节 T 淋巴细胞活性靶点的研究[23]显示：Siglec15 可能作为免疫调节因子参与 T 淋巴细胞功能。进一步研究[24]显示：Siglec15 可能主要表达于髓系细胞表面，参与透明细胞肾细胞癌、骨肉瘤、肺腺癌等实体肿瘤的发生发展。Siglec15 在 ESCC 中的表达情况研究较少，且其在 ESCC 中的作用尚未明确。

为了更深入地研究肿瘤微环境中巨噬细胞或肿瘤细胞源性 Siglec15 对 ESCC 细胞恶性生物学行为的影响，本研究首先进行生物信息学分析，结果显示：Siglec15 在食管癌组织中高表达，并与巨噬细胞浸润呈明显正相关关系。本研究对 ESCC 细胞系和 M2-TAMs 中 Siglec15 mRNA 表达情况进行检测，结果显示：M2-TAMs 中 Siglec15 mRNA 表达水平明显高于 ESCC 细胞，提示 Siglec15 可能是 ESCC 肿瘤微环境中 M2-TAMs 产生的重要细胞因子，与 ZHOU 等[25]的一项关于 ESCC 患者队列分析的研究结果一致。本研究构建了 Siglec15 敲降的 M2-TAMs模型，采用 PMA、IL-4 和 IL-13 孵育刺激 THP-1 单核细胞，成功获得 M2-TAMs，并采用了

KELLER等[26]的转染方法进一步探讨M2-TAMs源性Siglec15对肿瘤细胞恶性生物学行为的影响，结果显示：Siglec15敲低后M2-TAMs并未对ESCC细胞增殖产生影响，但与M2-TAMs共培养后ESCC细胞的迁移和侵袭能力明显增强，Siglec15敲低后ESCC细胞的迁移和侵袭能力则明显受到抑制，提示M2-TAMs来源的Siglec15可增强ESCC的迁移和侵袭能力，该结论也在骨肉瘤中得到证实[27]。肿瘤的发生发展与肿瘤细胞凋亡有密切关联[28]，本研究采用流式细胞术检测各组细胞凋亡的情况，结果显示：M2-TAMs共培养后的ESCC细胞抗凋亡能力明显增强，而Siglec15敲低后ESCC细胞的凋亡能力无明显改善，提示M2-TAMs来源Siglec15可能并未参与ESCC抗凋亡的调控。

综上所述，肿瘤微环境中M2-TAMS可能是Siglec15主要来源的免疫细胞，Siglec15可能是参与TAMs促进ESCC细胞迁移和侵袭的关键细胞因子。

利益冲突声明：

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明：

任祎琳参与选题、数据收集整理和论文撰写，臧翌辰、薛乐乐和杨凯歌参与实验操作过程，陈素芳和王魏楠参与论文中数据的统计学分析，罗成华和梁伟华参与论文审校，王良海、李锋和胡建明参与指导论文撰写。

[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] 地力亚尔·吾斯曼江，王 岩，张玉俊，等. 2006—2020年中国食管癌死亡趋势及其年龄-时期-队列模型分析[J]. 现代肿瘤医学, 2023, 31(7): 1323-1329.

[3] ANDERSON N R, MINUTOLO N G, GILL S, et al. Macrophage-based approaches for cancer immunotherapy[J]. Cancer Res, 2021, 81(5): 1201-1208.

[4] LI M J, HE L Y, ZHU J, et al. Targeting tumor-associated macrophages for cancer treatment[J]. Cell Biosci, 2022, 12(1): 85.

[5] CAO X, ZHOU Y D, MAO F, et al. Identification and characterization of three Siglec15-related immune and prognostic subtypes of breast-invasive cancer[J]. Int Immunopharmacol, 2022, 106: 108561.

[6] FAN M K, ZHANG G C, XIE M F, et al. Siglec-15 as a new perspective therapy target in human giant cell tumor of bone[J]. Curr Oncol, 2022, 29(10): 7655-7671.

[7] MUTKA M, JOENSUU K, HEISKALA M, et al. Core needle biopsies alter the amounts of CCR5, Siglec-15, and PD-L1 positivities in breast carcinoma[J]. Virchows Arch, 2023, 483(2): 215-224.

[8] LIANG H F, CHEN Q, HU Z C, et al. Siglec15 facilitates the progression of non-small cell lung cancer and is correlated with spinal metastasis[J]. Ann Transl Med, 2022, 10(6): 281.

[9] DU H, TANG J L, LI X Y, et al. Siglec-15 is an immune suppressor and potential target for immunotherapy in the pre-metastatic lymph node of colorectal cancer[J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 691937.

[10] ROGERS J E, SEWASTJANOW-SILVA M, WATERS R E, et al. Esophageal cancer: emerging therapeutics[J]. Expert Opin Ther Targets, 2022, 26(2): 107-117.

[11] RUSTGI A K, EL-SERAG H B. Esophageal carcinoma[J]. N Engl J Med, 2014, 371(26): 2499-2509.

[12] SALMI S, SIISKONEN H, SIRONEN R, et al. The number and localization of $CD68^+$ and $CD163^+$ macrophages in different stages of cutaneous melanoma[J]. Melanoma Res, 2019, 29(3): 237-247.

[13] PETRILLO A, SMYTH E C. Immunotherapy for squamous esophageal cancer: a review[J]. J Pers Med, 2022, 12(6): 862.

[14] QI L, YU H Q, ZHANG Y, et al. IL-10 secreted by M2 macrophage promoted tumorigenesis through interaction with JAK2 in glioma[J]. Oncotarget, 2016, 7(44): 71673-71685.

[15] BOSTEELS C, NEYT K, VANHEERSWYNGHELS M, et al. Inflammatory type 2 cDCs acquire features of cDC1s and macrophages to orchestrate immunity to respiratory virus infection[J]. Immunity, 2020, 52(6): 1039-1056.e9.

[16] TOOR S M, MURSHED K, AL-DHAHERI M, et al. Immune checkpoints in circulating and tumor-infiltrating $CD4^+$ T cell subsets in colorectal cancer patients[J]. Front Immunol, 2019, 10: 2936.

[17] QUARANTA V, SCHMID M C. Macrophage-mediated subversion of anti-tumour immunity[J]. Cells, 2019, 8(7): 747.

[18] HUANG R L, WANG S Q, WANG N, et al. CCL5

derived from tumor-associated macrophages promotes prostate cancer stem cells and metastasis via activating β-catenin/STAT3 signaling[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(4): 234.

[19] MATLUNG H L, SZILAGYI K, BARCLAY N A, et al. The CD47-SIRPα signaling axis as an innate immune checkpoint in cancer[J]. Immunol Rev, 2017, 276(1): 145-164.

[20] JIA X, YAN B J, TIAN X Q, et al. CD47/SIRPα pathway mediates cancer immune escape and immunotherapy[J]. Int J Biol Sci, 2021, 17(13): 3281-3287.

[21] 汪 鹏, 仇建南, 王忠夏, 等. 肝癌微环境中肿瘤相关巨噬细胞的研究进展[J]. 临床肝胆病杂志, 2023, 39(5): 1212-1218.

[22] HU J, YU A Z, OTHMANE B, et al. Siglec15 shapes a non-inflamed tumor microenvironment and predicts the molecular subtype in bladder cancer[J]. Theranostics, 2021, 11(7): 3089-3108.

[23] CHEN J, TAN Y, SUN F H, et al. Single-cell transcriptome and antigen-immunoglobin analysis reveals the diversity of B cells in non-small cell lung cancer[J]. Genome Biol, 2020, 21(1): 152.

[24] LIU W T, JI Z, WU B R, et al. Siglec-15 promotes the migration of liver cancer cells by repressing lysosomal degradation of CD44[J]. FEBS Lett, 2021, 595(17): 2290-2302.

[25] ZHOU S, WANG Y T, ZHANG R, et al. Association of sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin 15 with phenotypes in esophageal squamous cell carcinoma in the setting of neoadjuvant chemoradiotherapy [J]. JAMA Netw Open, 2023, 6(1): e2250965.

[26] KELLER A A, MAEß M B, SCHNOOR M, et al. Transfecting macrophages [J]. Methods Mol Biol, 2018, 1784: 187-195.

[27] ZHENG B X, SONG K L, SUN L L, et al. Siglec-15-induced autophagy promotes invasion and metastasis of human osteosarcoma cells by activating the epithelial-mesenchymal transition and Beclin-1/ATG14 pathway[J]. Cell Biosci, 2022, 12(1): 109.

[28] 张绍谨, 闫泽晨, 李 腾, 等. 长链非编码RNA SNHG15对肾细胞癌细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响[J]. 郑州大学学报(医学版), 2023, 58(6): 781-785.