

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.07.006

· 基础研究 ·

## TIM-3 配体 galectin-9 诱导 NK/T 细胞淋巴瘤细胞的凋亡及其机制

姜霖峰, 刘传绪, 李高扬, 陶荣(上海交通大学医学院附属新华医院 血液内科, 上海 200092)

**[摘要]** **目的:** 观察 TIM-3 在 NK/T 细胞淋巴瘤(natural killer/T cell lymphoma, NK/TCL)细胞株中的表达及其配体 galectin-9 (GAL-9)诱导瘤细胞凋亡的作用及其部分机制。**方法:** Western blotting 测定 NK/TCL 细胞株 SNK-1、SNK-6、SNT-8 和健康人外周血 NK 细胞中 TIM-3 的表达;采用不同质量浓度重组人 GAL-9(rhGAL-9)作用于 NK/TCL 细胞株 24 h 后,通过 CCK-8 法检测细胞增殖活性;流式细胞术 Annexin-V/PI 双染法检测瘤细胞凋亡;Western blotting 检测 caspase-3、PARP 及其剪切体和 MAPK 信号通路蛋白磷酸化表达水平变化。**结果:** NK/TCL 细胞株 SNK-1、SNK-6 和 SNT-8 的 TIM-3 表达较健康人外周血 NK 细胞显著增高,其中 SNK-1、SNK-6 细胞株与对照组相比差异具有统计学意义( $P < 0.05$ );CCK-8 检测结果显示, rhGAL-9 对 NK/TCL 细胞增殖活力具有明显抑制作用,并有浓度依赖性;流式细胞术检测显示, rhGAL-9 可诱导 3 种 NK/TCL 细胞株凋亡;Western blotting 结果显示, cleaved-caspase-3、cleaved-PARP 蛋白表达量增高, MAPK 通路中 JNK 蛋白磷酸化水平升高。**结论:** TIM-3 在 NK/TCL 细胞株中异常高表达,其配体 GAL-9 可诱导细胞凋亡,其机制可能与 JNK 磷酸化水平升高相关。

**[关键词]** NK/T 细胞淋巴瘤; T 细胞免疫球蛋白黏蛋白分子-3; Galectin-9; 细胞凋亡

**[中图分类号]** R733.4; R730.51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)07-0693-05

## Preliminary investigation of TIM-3 ligand galectin-9 inducing apoptosis of NK/T cell lymphoma cells

JIANG Jifeng, LIU Chuanxu, LI Gaoyang, TAO Rong (Department of Hematology, Xinhua Hospital, Affiliated to School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200092, China)

**[Abstract]** **Objective:** To identify the expression pattern of TIM-3 in natural killer/T-cell lymphoma (NK/TCL) cell lines, and to investigate the effect and mechanism of its ligand galectin-9 (GAL-9) inducing apoptosis of NK/TCL cell lines. **Methods:** Expression of TIM-3 in NK cell of peripheral blood from healthy donors and NK/TCL cell lines (SNK-1、SNK-6、SNT-8) was detected by Western blotting. After being treated with rhGAL-9 at various concentrations for 24h, the cell proliferation ability was analyzed with CCK-8 assay. Apoptosis ratio of the cells was determined by flow cytometry. Expressions of caspase-3, PARP and their cleavages were detected by Western blotting; moreover, phosphorylation levels of proteins in MAPK signaling pathway were also detected by Western blotting. **Results:** The expression of TIM-3 in SNK-1, SNK-6 and SNT-8 cell lines was significantly higher than that of NK cells from healthy donors ( $P < 0.05$ ). CCK-8 result showed that rhGAL-9 obviously inhibited the proliferation of NK/TCL cell lines in a concentration dependent manner. Flow cytometry showed that rhGAL-9 induced the apoptosis of NK/TCL cells; and Western blotting proved that the expression of cleaved caspase-3, cleaved-PARP, and p-JNK in MAPK signaling pathway were significantly elevated. **Conclusion:** TIM-3 was over-expressed in NK/TCL cell lines, and its ligand galectin-9 induced cell apoptosis probably through the activation of JNK kinase pathways.

**[Key words]** Natural killer/T-cell lymphoma; T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3; Galectin-9; Cell apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(7): 693-697. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.07.006]

NK/T 细胞淋巴瘤(natural killer/T cell lymphoma, NK/TCL)通常具有 NK 细胞或细胞毒性 T 细胞表型,好发于上呼吸道及消化道,呈高度侵袭性,其在中国人中相对高发,约占非霍奇金淋巴瘤的 11%<sup>[1]</sup>。近期, FENG 等<sup>[2]</sup>报道了 NK/TCL 肿瘤组织标本 TIM-3 表达比例高达 95%。然而,目前尚无研究报道 TIM-3 对 NK/TCL 细胞功能的调控作用。Galectin-9(GAL-9)是 TIM-3 的配体之一,其对 NK 细胞具

有抑制作用<sup>[3]</sup>。此外,有研究<sup>[4]</sup>报道, GAL-9 可直接诱

**[基金项目]** 上海市教育委员会高原高峰学科建设计划(20152219)。Project supported by the Shanghai Municipal Education Commission-Gaofeng Medicine Grant (20152219)

**[作者简介]** 姜霖峰(1990-),男,硕士生,主要从事 NK/T 细胞淋巴瘤的应用基础研究, E-mail: jifengj@126.com

**[通信作者]** 陶荣(TAO Rong, Corresponding author),主任医师,硕士生导师,主要从事 NK/T 细胞淋巴瘤的应用基础研究, E-mail: taorong@xinhuaemed.com.cn

导慢性髓系白血病、多发性骨髓瘤、肝细胞肝癌等多种肿瘤细胞株凋亡。上述研究提示 GAL-9 对 NK/TCL 也可能发挥上述效应。鉴于 NK/TCL 自身可表达 TIM-3, 探索 TIM-3 及其配体 GAL-9 对 NK/TCL 调控作用, 对于免疫治疗的应用和探索新的治疗靶点均具有一定意义。本研究观察了 TIM-3 在 NK/TCL 细胞株表达情况及其配体 GAL-9 诱导 NK/TCL 凋亡的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂及仪器

AIM-V 培养基、AB 型人血清购自美国 Invitrogen 公司, 人重组白细胞介素 2(IL-2) 购自美国 Peprotech 公司, 重组人 GAL-9(rhGal-9) 购于 R&D Systems 公司[溶于 500  $\mu$ l 杜氏磷酸缓冲液(DPBS)中, 工作质量浓度为 100  $\mu$ g/ml, 于 -20  $^{\circ}$ C 储存], CCK-8 试剂盒购买自日本同仁化学研究所, Annexin V/PI 细胞凋亡流式细胞术检测试剂盒购买自美国 BD 公司, RIPA 裂解液、蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒购于碧云天生物技术公司, 蛋白检测抗体均购于 CST 公司。流式细胞仪购自 BD FACS-Calibur 公司。

### 1.2 细胞培养及处理

NK/TCL 细胞株 SNK-1、SNK-6 和 SNT-8 由日本东京医科和牙科大学 Shimizu 教授赠送。SNK-1、SNK-6 及 SNT-8 细胞具有 NK 细胞及细胞毒性 T 细胞表型, 均为 EB 病毒阳性细胞株。细胞在含 10% 热灭活人血清和 400 U/ml IL-2 的 AIM-V 培养基中, 培养条件为 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度, 每 2 d 换液 1 次, 细胞处于对数生长期时进行实验。

### 1.3 磁珠分选人外周血 NK 细胞

人外周血来源为成年健康志愿者, 本人均知情同意, 符合伦理要求。外周血经 DPBS 1:1 稀释后缓慢加入至等体积的 Ficoll 淋巴细胞分离液面上, 经密度梯度离心收集白膜层单个核细胞, 制成  $1 \times 10^7$ /ml 细胞悬液, 离心取上清, 加入 80  $\mu$ l 分选缓冲液, 然后加入 20  $\mu$ l 人抗 CD56 磁珠, 充分混匀后置于 4  $^{\circ}$ C 冰箱孵育 15 min。每  $1 \times 10^5$  个细胞加入 2 ml 缓冲液, 4  $^{\circ}$ C 300 $\times$ g 离心 10 min, 充分洗涤。弃上清后, 加入 500  $\mu$ l 缓冲液重悬, 经 MACS 磁性分离柱流下后, 加入 500  $\mu$ l 缓冲液洗柱 3 次, 取下分离柱置于离心管, 经活塞吹洗获得 CD56<sup>+</sup> 细胞。

### 1.4 CCK-8 法检测 rhGAL-9 对 SNK-1、SNK-6 和 SNT-8 细胞增殖活力的影响

取对数生长期 SNK-1、SNK-6 和 SNT-8 细胞, 制成密度为  $4 \times 10^5$ /L 的细胞悬液, 实验组按终质量浓度 1.0、2.5、5.0  $\mu$ g/ml 加入 rhGAL-9, 对照组加入等体积

DPBS 溶液, 并设置空白对照组(仅接种培养基), 每组均设 3 个复孔。于 37  $^{\circ}$ C 培养箱培养 24 h 后, 向各孔加入 CCK-8 试剂 10  $\mu$ l, 置于 37  $^{\circ}$ C 培养箱避光孵育 2 h, 通过酶标仪检测 450 nm 处光密度(D)值。细胞增殖率(%) =  $(D_{\text{实验组}} - D_{\text{空白对照组}}) / (D_{\text{对照组}} - D_{\text{空白对照组}}) \times 100\%$ 。

### 1.5 流式细胞术检测 rhGAL-9 对 SNK-1、SNK-6 和 SNT-8 细胞凋亡的影响

取对数生长期 SNK-1、SNK-6 和 SNT-8 细胞, 制成  $2 \times 10^5$ /L 的细胞悬液, 接种于 6 孔板, 实验组加入 rhGAL-9, 终质量浓度为 1.0、2.5  $\mu$ g/ml, 对照组加入等体积 DPBS。于 37  $^{\circ}$ C 细胞培养箱培养 24 h, 收集实验组及对照组细胞, 用预冷 DPBS 洗涤细胞, 300 $\times$ g 离心 5 min, 共 2 次。加入 200  $\mu$ l 1 $\times$ Binding-Buffer 重悬细胞, 加入 5  $\mu$ l Annexin V-FITC 染料轻轻吹打混匀后, 室温条件下避光孵育 15 min, 再加入 5  $\mu$ l PI 室温避光孵育 5 min, 最后加入 400  $\mu$ l Binding-Buffer, 上流式细胞仪检测。

### 1.6 Western blotting 法检测 rhGAL-9 对凋亡相关蛋白表达的影响

收集各实验组和对照组细胞, 经 DPBS 洗涤 2 次后, 加入 100  $\mu$ l 由蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物配制的 RIPA 裂解液, 经超声仪进一步裂解后, 冰上孵育 20 min, 离心收集上清并测定蛋白浓度, 加入 25  $\mu$ l 5 $\times$  SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液, 置于 100  $^{\circ}$ C 金属浴锅 10 min。蛋白样本进行 SDS-PAGE, 转印至 NC 膜, 经 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 加入一抗后放入 4  $^{\circ}$ C 冰箱过夜。置于摇床, 加入 TBST 洗膜 10 min, 共 3 次, 加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗, 室温孵育 1 h 后, 重复上述洗膜步骤, 加入 ECL 进行化学发光显影。上述实验均重复 3 次。

### 1.7 统计学处理

应用 SPSS v22.0 进行统计分析, Western blotting 条带灰度值、CCK-8 和流式细胞术结果等计量资料均采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用 *t* 检验或单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 TIM-3 在 NK/TCL 细胞株中高表达

Western blotting 检测健康人外周血 NK 细胞、SNK-1、SNK-6 和 SNT-8 细胞株 TIM-3 蛋白表达情况(图 1)显示, 健康人 NK 细胞低表达 TIM-3 蛋白, 3 株细胞均表达 TIM-3, 且相对健康人外周血 NK 细胞表达量更高, 其中 SNK-1、SNK-6 细胞株与对照组相比, 差异具有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。

### 2.2 rhGAL-9 可抑制 NK/TCL 细胞增殖活力

CCK-8 检测不同浓度 rhGAL-9 对 NK/TCL 细胞

株增殖活力的影响, 结果(图2)显示, rhGAL-9 对 SNK-1、SNK-6 和 SNT-8 细胞株细胞活力均有明显的抑制作用。2.5  $\mu\text{g/ml}$  rhGAL-9 作用于 SNK-1、SNK-6 和 SNT-8 株细胞后 24 h, 各细胞株增殖率均明显下降 [(49.80 $\pm$ 7.91)%、(74.09 $\pm$ 9.04)%和(36.05 $\pm$ 4.64)% vs 100%, 均  $P<0.01$ ]。

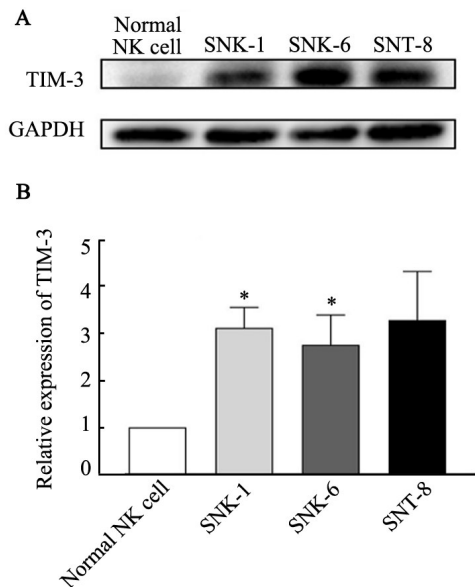
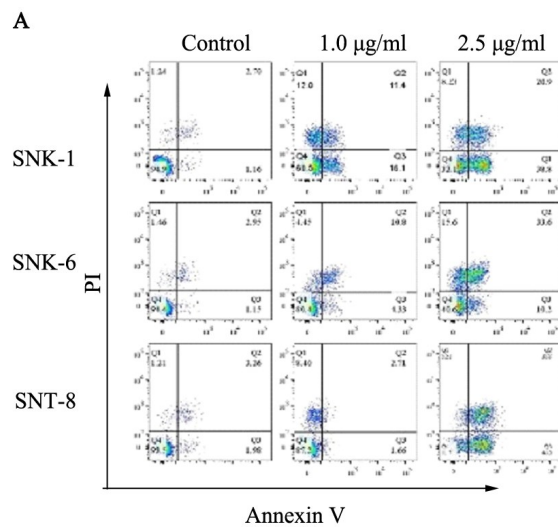


图1 TIM-3在NK/TCL细胞中的表达  
Fig.1 Expression of TIM-3 in NK/TCL cell lines

2.3 rhGAL-9 明显诱导 NK/TCL 细胞凋亡  
通过流式细胞术采用 Annexin-V/PI 双染法检测不同质量浓度 (1.0、2.5  $\mu\text{g/ml}$ ) rhGAL-9 作用 NK/TCL



\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs control;  $\Delta\Delta P<0.01$  vs 1.0  $\mu\text{g/ml}$

图3 不同质量浓度 rhGAL-9 处理 NK/TCL 细胞 24 h 后的凋亡率

Fig.3 Apoptotic rate of NK/TCL cell lines treated with rhGAL-9 at various mass concentrations for 24 h

2.4 rhGAL-9 对 NK/TCL 细胞 MAPK 信号转导通路的影响

细胞株 24 h 后的凋亡情况, 结果(图3)显示, 与对照组相比, 2.5  $\mu\text{g/ml}$  rhGAL-9 作用后, SNK-1、SNK-6 和 SNT-8 细胞凋亡率明显增加 [(58.57 $\pm$ 2.15)% vs (4.43 $\pm$ 0.70)% ( $P<0.01$ )、(42.43 $\pm$ 0.69)% vs (4.67 $\pm$ 0.43)% ( $P<0.01$ )、(76.07 $\pm$ 6.97)% vs (4.07 $\pm$ 1.20)% ( $P<0.05$ )]。其中, rhGAL-9 对 SNK-1、SNK-6 细胞株致凋亡作用具有浓度依赖性, 该结果与 CCK-8 检测结果相符合。

相同方法处理 3 种细胞株后, Western blotting 检测 caspase-3 和 PARP 等凋亡相关蛋白变化情况, 结果(图4)显示, caspase-3 和 PARP 剪切蛋白表达水平随 rhGAL-9 剂量增加而升高, 与流式细胞术检测结果一致。

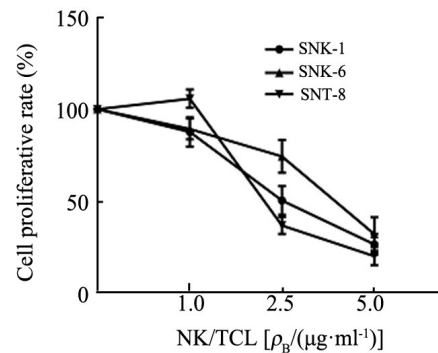
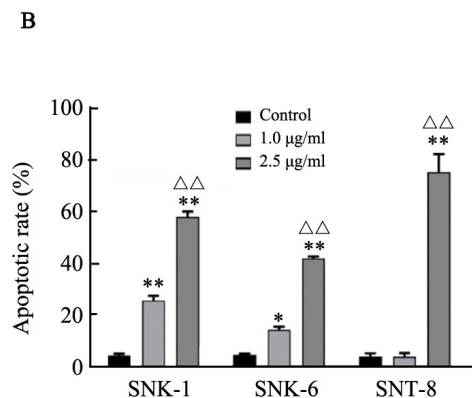


图2 不同质量浓度 rhGal-9 处理 NK/TCL 细胞 24 h 后的细胞增殖率

Fig.2 Proliferative rate of NK/TCL cell lines treated with rhGAL-9 at various mass concentrations for 24 h



应用 2.5  $\mu\text{g/ml}$  rhGAL-9 处理 SNK-1、SNK-6 和 SNT-8 细胞株 15、30 和 60 min 后, 通过 Western blot-



ting 方法检测 JNK 通路蛋白磷酸化水平变化, 结果(图5)显示, 作用 15 min 时, 3 种细胞株 JNK 蛋白磷酸化水平均明显增加。

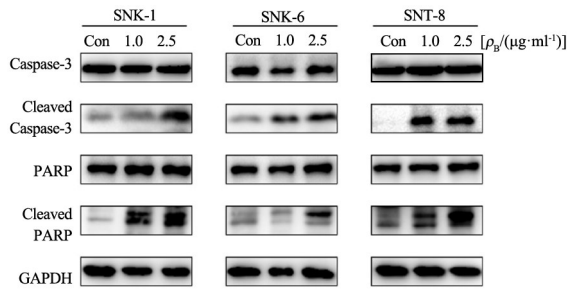


图4 rhGAL-9对NK/TCL细胞株 Cleaved-Caspase3 和 Cleaved-PARP 表达的影响

Fig.4 Expression of Cleaved-Caspase-3, Cleaved-PARP in NK/TCL cell lines treated with rhGAL-9 at various mass concentrations for 24 h

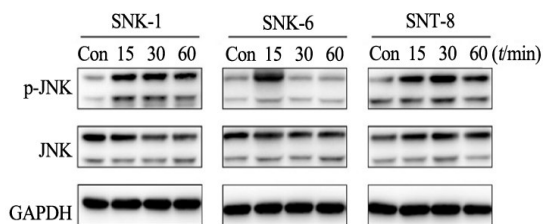


图5 rhGAL-9对NK/TCL细胞中 JNK 磷酸化蛋白的影响  
Fig.5 The effect of rhGAL-9 on phosphorylation JNK protein in NK/TCL cell lines

### 3 讨论

本课题发现, NK/TCL 细胞株 SNK-1、SNK-6 和 SNT-8 可表达 TIM-3, 且表达量较健康人外周血 NK 细胞显著升高。FENG 等<sup>[2]</sup>报道了在 NK/TCL 肿瘤组织中 TIM-3 表达比例高达 95%, 且与预后不良相关。上述结果提示 NK/TCL 可能普遍存在 TIM-3 高表达, 但其发生机制和生物学意义目前仍不明确。对于正常 NK 细胞 TIM-3 表达调控和生物学功能研究较多。NDHLOV 等<sup>[5]</sup>报道了 TIM-3 在健康人外周血 NK 细胞表达水平不一, 但外周血 NK 细胞经白介素-2(IL-2)刺激后, TIM-3 表达水平可上升。多项研究<sup>[6-7]</sup>显示, TIM-3 在健康人外周血 NK 细胞表达量较低, 在病毒感染和肿瘤患者中表达量可增高。NK/TCL 呈激活的 NK 细胞及细胞毒性 T 细胞表型, 且存在 EB 病毒感染<sup>[2]</sup>。这些因素均可能导致 TIM-3 在 NK/TCL 中的表达升高, TIM-3 的高表达与 NK 细胞清除 EB 病毒是否有关目前尚不清楚。已有研究<sup>[8-10]</sup>报道, TIM-3 对 NK 细胞的生物学功能有多种影响, 包括促进细胞因子分泌、诱导免疫耐受和细胞凋亡。TIM-3 在肿瘤

细胞中也可发挥多种效应, TIM-3/GAL-9 自分泌环路可促进骨髓系白血病干细胞自我更新和白血病进展<sup>[11]</sup>。YU 等<sup>[12]</sup>报道了结直肠癌细胞株可表达 TIM-3, 敲除 TIM-3 后肿瘤细胞增殖和侵袭能力均下降。上述结果提示, TIM-3 对 NK/TCL 的发生发展可能发挥一定生物学作用。

本研究应用 TIM-3 配体 GAL-9, 探索 TIM-3 在 NK/TCL 中的生物学作用。结果显示, GAL-9 可显著抑制三种 NK/TCL 细胞株细胞增殖活力, 并诱导其凋亡。ZHU 等<sup>[13]</sup>最早报道了 GAL-9 通过结合 TIM-3, 促进钙离子内流、诱导 Th1 细胞凋亡。在表达 TIM-3 的 CD8<sup>+</sup>T 细胞中同样发现 GAL-9 促凋亡效应, 并可由 TIM-3 阻断性抗体逆转<sup>[14]</sup>。此外, 也有研究<sup>[15]</sup>显示, GAL-9 可不依赖 TIM-3 受体直接诱导多种肿瘤细胞凋亡。近期, 研究<sup>[16-17]</sup>报道了 GAL-9 可直接诱导胰腺癌和食管腺癌细胞系凋亡, 其机制为 GAL-9 可调控多种 microRNA 表达, 并经线粒体途径诱导凋亡。故本研究中, GAL-9 可能通过直接结合 TIM-3 后间接诱导 NK/TCL 凋亡。

本研究显示, GAL-9 作用 NK/TCL 细胞株 15 min 后, JNK 磷酸化水平显著增加。LI 等发现 GAL-9 与 TIM-3 结合后, 可引起外周血 NK 细胞中 JNK 磷酸化水平增加, 调控 NK 细胞功能。而 KOBAYASHI 等<sup>[18]</sup>则报道了 GAL-9 可直接诱导多种多发性骨髓瘤细胞株凋亡, 其中伴随 JNK 通路的激活, 应用 JNK 小分子抑制剂后上述效应可被部分逆转。JNK 通路活化后通过线粒体途径激活 caspase-9 及下游 caspase-3 诱导凋亡作用已在多项研究中得到证实<sup>[19]</sup>。尽管本研究未采用 JNK 小分子抑制剂加以验证, 但结合上述文献提示在 galectin-9 作用下 NK/TCL 发生凋亡可能与 JNK 活化有关。

综上, 本研究发现 NK/TCL 细胞株中存在 TIM-3 表达, 其配体 GAL-9 可诱导细胞凋亡, 其机制可能部分与 JNK 激活相关。这些结果为 TIM-3 阻断性抗体应用于此类肿瘤提供参考。此外 TIM-3 配体 GAL-9 诱导 NK/TCL 细胞凋亡作用明显, 为探索治疗 NK/TCL 潜在靶点提供了新的思路。

### [参考文献]

[1] SUN J, YANG Q, LU Z, et al. Distribution of lymphoid neoplasms in China: analysis of 4,638 cases according to the World Health Organization classification[J]. *Am J Clin Pathol*, 2012, 138(3): 429-434. DOI:10.1309/ajcp7yltqpusdq5c.

[2] FENG Y, ZHONG M, LIU Y, et al. Expression of TIM-3 and LAG-3 in extranodal NK/T cell lymphoma, nasal type[J]. *Histol Histopathol*, 2017, 11931. DOI:10.14670/hh-11-931.

[3] GALLOIS A, SILVA I, OSMAN I, et al. Reversal of natural killer cell exhaustion by TIM-3 blockade[J/OL]. *Oncoimmunology*, 2014, 3(12):

- e946365[2018-02-22]. <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/21624011.2014.946365>. DOI:10.4161/21624011.2014.946365.
- [4] FUJIHARA S, MORI H, KOBARA H, et al. Galectin-9 in cancer therapy[J]. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov*, 2013, 7(2): 130-137. DOI:10.2174/1872214811307020006.
- [5] NDHLOVU L C, LOPEZ-VERGES S, BARBOUR J D, et al. Tim-3 marks human natural killer cell maturation and suppresses cell-mediated cytotoxicity[J]. *Blood*, 2012, 119(16): 3734-3743. DOI: 10.1182/blood-2011-11-392951.
- [6] GOLDEN-MASON L, WAASDORP HURTADO C E, CHENG L, et al. Hepatitis C viral infection is associated with activated cytolytic natural killer cells expressing high levels of T cell immunoglobulin - and mucin-domain-containing molecule-3[J]. *Clin Immunol*, 2015, 158(1): 114-125. DOI:10.1016/j.clim.2015.03.008.
- [7] DA SILVA I P, GALLOIS A, JIMENEZ-BARANDA S, et al. Reversal of NK-cell exhaustion in advanced melanoma by Tim-3 blockade[J]. *Cancer Immunol Res*, 2014, 2(5): 410-422. DOI: 10.1158/2326-6066.cir-13-0171.
- [8] GLEASON M K, LENVIK T R, MCCULLAR V, et al. Tim-3 is an inducible human natural killer cell receptor that enhances interferon gamma production in response to galectin-9[J]. *Blood*, 2012, 119(13): 3064-3072. DOI:10.1182/blood-2011-06-360321.
- [9] LI Y, ZHANG J, ZHANG D, et al. Tim-3 signaling in peripheral NK cells promotes maternal-fetal immune tolerance and alleviates pregnancy loss[J]. *Sci Signal*, 2017, 10(498). pii: eaah4323. DOI: 10.1126/scisignal.aah4323.
- [10] TANG ZH, LIANG S, POTTER J, et al. Tim-3/galectin-9 regulate the homeostasis of hepatic NKT cells in a murine model of nonalcoholic fatty liver disease[J]. *J Immunol*, 2013, 190(4): 1788-1796. DOI: 10.4049/jimmunol.1202814.
- [11] KIKUSHIGE Y, MIYAMOTO T, YUDA J, et al. A TIM-3/Gal-9 autocrine stimulatory loop drives self-renewal of human myeloid leukemia stem cells and leukemic progression[J]. *Cell stem cell*, 2015, 17(3): 341-352. DOI:10.1016/j.stem.2015.07.011.
- [12] YU M, LU B, LIU Y, et al. Tim-3 is upregulated in human colorectal carcinoma and associated with tumor progression[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(2): 689-695. DOI:10.3892/mmr.2016.6065.
- [13] ZHU C, ANDERSON A C, SCHUBART A, et al. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity [J]. *Nat Immunol*, 2005, 6(12): 1245-1252. DOI:10.1038/ni1271.
- [14] KANG C W, DUTTA A, CHANG L Y, et al. Apoptosis of tumor infiltrating effector TIM-3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells in colon cancer[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 15659. DOI:10.1038/srep15659.
- [15] FUJITA K, IWAMA H, OURA K, et al. Cancer therapy due to apoptosis: galectin-9[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(1): 74. DOI: 10.3390/ijms18010074.
- [16] TADOKORO T, FUJIHARA S, CHIYO T, et al. Induction of apoptosis by Galectin-9 in liver metastatic cancer cells: In vitro study [J]. *Int J Oncol*, 2017, 51(2): 607-614. DOI:10.3892/ijo.2017.4053.
- [17] AKASHI E, FUJIHARA S, MORISHITA A, et al. Effects of galectin-9 on apoptosis, cell cycle and autophagy in human esophageal adenocarcinoma cells [J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(1): 506-514. DOI: 10.3892/or.2017.5689.
- [18] KOBAYASHI T, KURODA J, ASHIHARA E, et al. Galectin-9 exhibits anti-myeloma activity through JNK and p38 MAP kinase pathways [J]. *Leukemia*, 2010, 24(4): 843-850. DOI: 10.1038/leu.2010.25.
- [19] DAVIS R J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases [J]. *Cell*, 2000, 103(2): 239-252. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)00116-1.

[收稿日期] 2018-03-04

[修回日期] 2018-05-09

[本文编辑] 韩丹, 阮芳铭