Galectin-3在大肠癌组织中的表达及其临床意义

张 楠,丁彦青,梁 莉(南方医科大学病理学教研室,广东 广州 510515)

摘要:目的 研究Galectin-3在大肠癌组织、癌旁组织及转移组织中的表达,初步探讨其与大肠癌发生发展,侵袭转移的关系。**方法** (1)用SP免疫组化法检测158例临床石蜡组织标本(癌旁组织30例,腺瘤组织25例,大肠癌组织65例,淋巴结转移性大肠癌38例)中的 Galectin-3蛋白的表达。(2)用RT-PCR法分析Galectin-3 mRNA在31对新鲜大肠癌组织及相应癌旁组织中的表达情况。**结果** (1)Galectin-3蛋白在大肠癌组织、癌旁组织及腺瘤中的表达具有明显差异($P<0.001$);在浸润程度深、分化程度低及发生淋巴结转移的大肠癌组织中的表达明显高于浸润程度浅、分化程度高及未发生淋巴结转移的大肠癌组织($P<0.05$)。(2)在31对大肠癌组织中浸润程度深、分化程度低及发生淋巴结转移的组织中的表达明显高于浸润程度浅、分化程度高及未发生淋巴结转移的组织,其表达量的平均倍比关系分别为2.67、1.98、1.91。**结论** Galectin-3的差异表达,可能与大肠癌的发生发展及转移有关。

关键词:大肠癌;Galectin-3;转移;侵袭

中图分类号:R735.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4254(2006)12-1685-05

Association of galectin-3 expression with biological behaviors of human colorectal carcinoma

ZHANG Nan, DING Yan-qing, LIANG Li

Department of Pathology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To investigate the association between galectin-3 expression and biological behaviors of human colorectal carcinoma. **Methods** SP immunohistochemistry was used to detect the expression of galectin-3 in 158 cases of paraffin-embedded specimens (including 30 normal mucosa, 25 adenoma, 65 carcinoma and 38 metastatic tumor speciemns). Real-time RT-PCR was performed to detect galectin-3 mRNA expression in 31 pairs of fresh carcinoma and corresponding adjacent normal mucosa specimens. **Results** The expression levels of galectin-3 was significantly different between normal mucosa and adenoma tissues ($P<0.001$), and moderately or well differentiated colorectal carcinomas showed significantly lower expression of the galectin-3 than the poorly differentiated carcinomas ($P=0.03$). Invasive carcinomas exhibited higher galectin-3 expression levels than non-invasive ones ($P<0.001$), and galectin-3 expression in the colorectal carcinomas was significantly related with the lymph node metastasis ($P<0.001$). Galectin-3 mRNA expression in poorly differentiated colorectal carcinomas was about 1.98 times that in moderately or well differentiated colorectal carcinomas ($P=0.03$), and in invasive carcinomas, galectin-3 mRNA expression was 1.67 times higher than that in non-invasive ones ($P<0.001$). Galectin-3 mRNA expression in tumors with lymph node metastasis was 1.91 times that in non-metastatic tumors ($P=0.013$). **Conclusion** Galectin-3 expression is positively correlated with and invasion, poor differentiation and metastasis of colorectal carcinoma.

Key words: colorectal carcinomas; galectin-3; metastasis; invasion

大肠癌是严重危害人类健康的常见消化道恶性肿瘤。近年来,我国大肠癌的发病率及死亡率呈逐年上升的趋势,在恶性肿瘤发病率中排第四位。因此大肠癌的发生发展机制越来越引起人们的重视。为了研究探索与大肠癌发生发展相关蛋白的功能机制,本实验室利用2-DE和MALDI-TOF-MS技术,从来源于同一亲本但转移能力不同的细胞株SW 620和SW 480中初步筛选得到与Galectin家族高度匹配的蛋白质。

Galectins(β-半乳糖苷结合蛋白)是生物体内广泛存在的一大类结合蛋白,属于凝集素家族。Galectin-3(M_r 31000)是Galectin家族的重要成员之一,广泛表达于上皮细胞和免疫细胞,其存在于细胞质及胞核内,参与多种生物学过程,如调节细胞-细胞、细胞-基质的相互作用,参与细胞的增殖、分化、局部免疫调节和凋亡等,与肿瘤的转移、浸润、生长和粘附有关。但是近期尚无人从蛋白水平及mRNA水平对Galectin-3的异常表达与大肠癌的关系进行研究。

本实验中我们采用免疫组织化学技术和荧光定量多聚酶链式反应对大肠癌组织中Galectin-3在蛋白及mRNA水平进行定性、定量研究,探讨其与大肠癌组织分化、侵袭和转移的关系,为阐明大肠癌转移分子机制提供新的线索。

收稿日期:2006-05-10

基金项目:国家自然科学基金(30170423),广东省自然科学基金重点项目(5200512),广东省科技计划重大专项(2003A308401)

Supported by National Natural Science Foundation of China (30170423), Natural Science Foundation of Guangdong Province (5200512) and Key Research Project of Guangdong Province (2003A308401)

作者简介:张 楠(1980-),男,硕士研究生,E-mail:zhangnan48@163.com

通讯作者:丁彦青,教授,E-mail:dyq@fimmu.com

1 材料与方法

1.1 组织标本来源

收集南方医院病理科 2005 年间大肠癌病例石蜡标本 158 例,其中癌旁组织(距癌变边缘 15 cm)30 例,腺瘤组织 25 例,大肠癌组织 65 例,淋巴结转移癌 38 例,切 4 μm 切片做免疫组化。收集南方医院外科新鲜手术标本共 31 例,其中每例分别取肿瘤组织和癌旁组织(距癌变边缘 15 cm),其中浸润深肌层或全层的 25 例,浸润浅肌层或粘膜层的 6 例;低分化的 11 例,高或中分化的 20 例;未发生淋巴结转移的大肠癌组织 17 例,发生淋巴结转移的大肠癌组织 14 例。每个标本的组织学类型及浸润、转移情况以常规病理诊断为依据。取材后液氮保存。

1.2 免疫组化

鼠抗人 Galectin-3 单克隆抗体、免疫组化染色试剂盒 SP-9000 购自北京中杉公司。石蜡切片脱蜡至水,蒸馏水冲洗 3 次,3% H_2O_2 覆盖 10 min,灭活内源性过氧化物酶,PBS 漂洗 5 min×3 次,用枸橼酸钠进行抗原修复 20 min,PBS 漂洗 3×5 min 次,滴加 10% 正常山羊血清孵育 30 min,封闭非特异性抗原。滴加鼠抗人 Galectin-3 抗体(1∶200)37 ℃孵育 2 h,PBS 漂洗 5 min×3 次。滴加羊抗鼠二抗 37 ℃孵育 15 min,PBS 漂洗 5 min×3 次,滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液 37 ℃孵育 15 min,PBS 漂洗 5 min×3 次,滴加 DAB,显微镜观察显色,蒸馏水洗中止,切片苏木素复染,分化返蓝,脱水封片。

1.3 免疫组化结果判断

光镜下半定量结果判断标准[1]。按细胞着色评分:棕褐色 3 分;棕黄色 2 分;淡黄色 1 分;无着色 0 分。按着色细胞的数量评分:一个视野内着色细胞>75% 4 分;51%-75% 3 分;11%-50% 2 分;≤10% 1 分;阴性 0 分。最后两者相乘:0-3 分 阴性表达(-);4-6 分 弱阳性表达(+);7-9 分 较强阳性表达(++);9-12 分 强阳性表达(+++)。

1.4 Real-time PCR 检测大肠癌组织中 Galectin-3 的表达

1.4.1 RNA 的制备

TRIZol 试剂(Invitrogen 公司)法提取细胞总 RNA:取新鲜组织(每例标本约 100 mg)置匀浆器(180 ℃干烤 8 h),加 TRIZol 1 ml,冷冻匀浆,置 Eppendorf 管,室温孵育 5 min。加入 0.2 ml 氯仿摇匀 15 s,室温孵育 2-3 min,4 ℃ 12 000 r/min 离心 15 min。小心吸取上清液至新的 Eppendorf 管,加异丙醇 0.5 ml,室温孵育 10 min,4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min。弃上清液,加入 1 ml 75% 乙醇充分洗涤沉淀,4 ℃ 7500 r/min 离心 5 min。弃上清液,真空干燥 5-10 min,DEPC 水溶解 RNA,-80 ℃保存备用。

1.4.2 cDNA 第 1 链的合成

反应总体系为 20 μl,其中样品总 RNA 1 μl,10×逆转录缓冲液 2 μl,$MgCl_2$ 4 μl,AMV 逆转录酶 1.5 μl,dNTPs 8 μl,Rnasin 0.5 μl,OligdT 2 μl,DEPC 水 1 μl。42 ℃反应 1 h,95 ℃灭活逆转录酶 5 min。

1.4.3 相对定量荧光定量 PCR

由于实验选取的标本为新鲜组织,因此在取材时很难做到每例样品的初始浓度一致,所以我们采用了分管看家基因 β-actin 作内部参比,通过相对定量荧光定量 PCR 方法,同时对 Galectin-3 和 β-actin 进行检测,计算出不同样本 Galectin-3 mRNA 的相对表达量。采用 Primer 5.0 设计引物,Galectin-3 的上游引物为 5'-GCCACTGATTGTGCCTTAT-3',下游引物为 5'-AAACCGACTGTCTTTCTTCC-3',产物长度为 233 bp;β-actin 的上游引物为 5'-TCGTCCTCATACTGCTCA-3',β-actin 的下游引物为 5'-GAAACTACCTTCAACTCC-3,产物长度为 268 bp。退火温度为 55 ℃,PCR 体系 20 μl,含 ExTaq 2× 10 μl(内含 TaKaRa Ex Taq HS,dNTP Mixture,Mg^{2+},SYBP Green Ⅰ 等),Dye Ⅱ 0.4 μl(用于 Mx3000P 等机型,以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差),cDNA 1 μl,上下游引物(25 μmol/L)各 0.2 μl,ddH_2O 8.2 μl。应用 Mx3000P 定量 PCR 仪(Stratagene)进行 RT-PCR 实验,检测各模版的 Ct 值,所有实验均重复 3 次,阴性对照不加模版。以 $Folds=2^{-\Delta\Delta Ct}$[2]表示实验组与对照组目的基因表达的倍比关系,公式如下 $\Delta\Delta Ct=(Ct_{target\,gene}-Ct_{\beta\text{-}actin})$癌组织 $-(Ct_{target\,gene}-Ct_{\beta\text{-}actin})$相应癌旁组织。重复 3 次实验,计算平均值。

1.5 统计学方法

统计软件为 SPSS11.5,免疫组化结果采用秩和检验,RT-PCR 结果采用单样本 t 检验和独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 Galectin-3 的免疫组织化学检测结果

2.1.1 Galectin-3 蛋白在正常大肠粘膜、大肠腺瘤、大肠癌及淋巴结转移癌组织中的表达

Galectin-3 蛋白在正常大肠粘膜、大肠腺瘤、大肠癌及淋巴结转移癌组织中均有表达但表达强度依次增加。4 种组织之间阳性表达率有显著性差异(表 1)。

2.1.2 Galectin-3 蛋白在不同大肠癌组织中的表达及其关系

Galectin-3 蛋白在不同大肠癌组织中均有表达。其中浸润程度深的表达明显高于浸润程度浅的大肠癌组织,分化程度低的表达明显高于分化程度高的大肠癌组织,发生淋巴结转移的明显高于未发生淋巴结转移的癌组织(表 2、图 1-6)。

表 1 Galectin-3 在正常粘膜、腺瘤、大肠癌及淋巴结转移癌中的表达

Tab.1 Expression of galectin-3 in normal colonic epithelium, adenoma, colorectal carcinoma, and tumors with lymphatic metastasis

Groups	Cases	-(%)	+(%)	++(%)	+++(%)	Mean Rank
Normal mucosa	30	6(20)	23(77)	1(3)	0(0)	26.37
Adenoma	25	1(4)	15(60)	5(20)	4(16)	50.44
Carcinoma	65	0(0)	5(8)	12(18)	48(74)	101.58
Metastatic tumors	38	0(0)	3(8)	6(16)	29(76)	102.80

Kruskal-Wallis Test: χ^2=90.236, P<0.001

表 2 Galectin-3 在不同浸润程度、分化程度、转移情况的大肠癌中的表达

Tab.2 Expression of galectin-3 in colorectal carcinoma with differentiation grades and behaviors of invasion and metastasis

Groups	Cases	+(%)	++(%)	+++(%)	Kruskal-Wallis Test
Invasion					
Superficial layer	10	4(40)	4(40)	2(20)	χ^2= 18.904
Deep layer	55	1(2)	8(15)	46(83)	P<0.001
Differentiation					
Poor	25	1(4)	3(12)	21(84)	χ^2= 10.723
Well or Moderate	40	4(10)	9(23)	27(67)	P= 0.03
Metastasis					
Non-metastatic	27	4(15)	10(37)	13(48)	χ^2= 16.349
Metastatic	38	1(3)	2(5)	35(92)	P<0.001

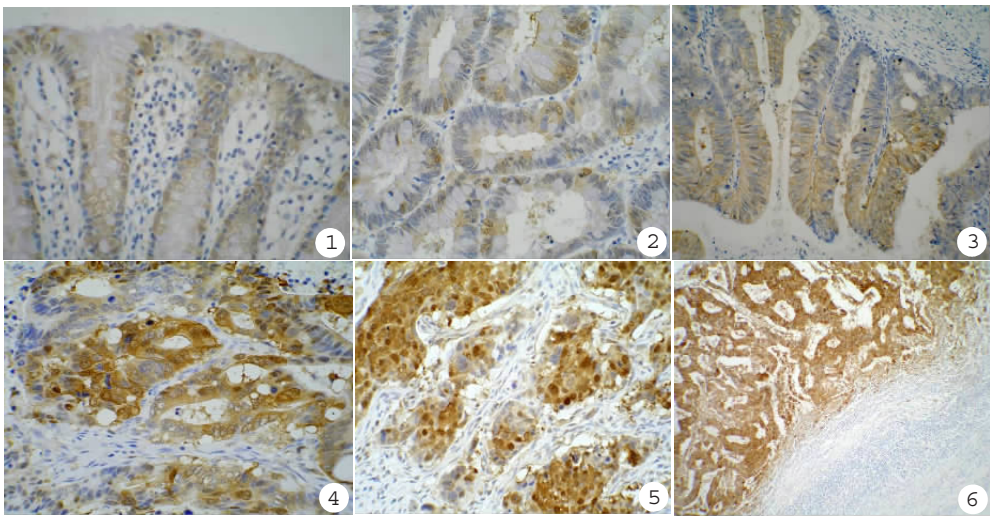

图 1 Galectin-3 在正常粘膜组织中的表达

Fig.1 Galectin-3 expression in normal colonic epithelium adjacent to the carcinoma (SP, original magnification: ×200)

图 2 Galectin-3 在腺瘤中的表达

Fig.2 Expression of galectin-3 in an adenoma specimen (SP, original magnification: ×200)

图 3 Galectin-3 在高分化腺癌中的表达

Fig. 3 Galectin-3 expression in well differentiated colorectal carcinoma (SP, original magnification: ×400)

图 4 Galectin-3 在中分化腺癌中的表达

Fig. 4 Galectin-3 expression in moderately differentiated colorectal carcinoma (SP, original magnification: ×200)

图 5 Galectin-3 在低分化腺癌中的表达

Fig. 5 Galectin-3 expression in poorly adenocarcinoma (SP, original magnification: ×200)

图 6 Galectin-3 在淋巴结转移灶中的表达

Fig.6 Galectin-3 expression in a lymphatic metastatic tumor focus (SP, original magnification: ×100)

2.2 Galectin-3 的 Real time-PCR 检测结果

新鲜组织总 RNA 琼脂糖凝胶电泳可见清晰的 18 S、28 S 条带(图 7)。

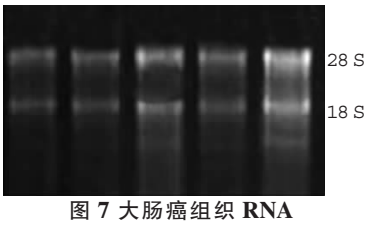

图 7 大肠癌组织 RNA

Fig.7 Electrophoresis of the RNA in colorectal tissue

组织总 mRNA 经逆转录成 cDNA 后，进行荧光实时定量 PCR 检测,从融解曲线上未见到杂峰,说明扩增产物单一,没有非特异性扩增(图 8)。从扩增曲线可见所有样品均已进入扩增的平台期,说明反应条件设定准确(图 9)。产物鉴定的琼脂糖电泳结果显示(图 10),5 个不同的样品扩增得到的产物单一，符合引物设计时的扩增长度(233 bp)。通过对获得的样本 Ct值进行相对定量计算分析,31 例大肠癌组织中浸润程度深的大肠癌相对浸润程度浅的大肠癌,其 Galectin-3 mRNA 的表达水平的平均倍比关系约是

2.67; 低分化的大肠癌相对高分化的大肠癌,其 Galectin-3mRNA 的表达水平的平均倍比关系约是 1.98;发生淋巴结转移的大肠癌组织相对未发生淋巴结转移的大肠癌组织,其 Galectin-3mRNA 的表达水平的平均倍比关系约是 1.91(表 3)。

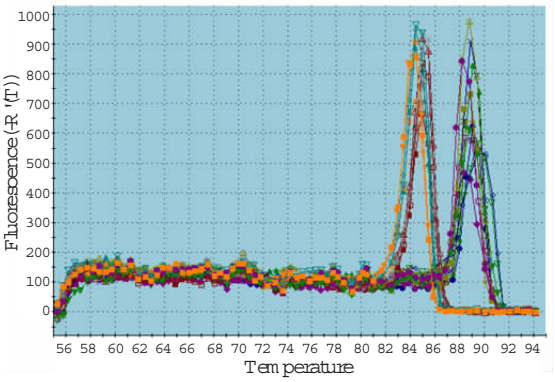

图 8 荧光定量 PCR 融解曲线

Fig.8 Dissociation curve of PCR

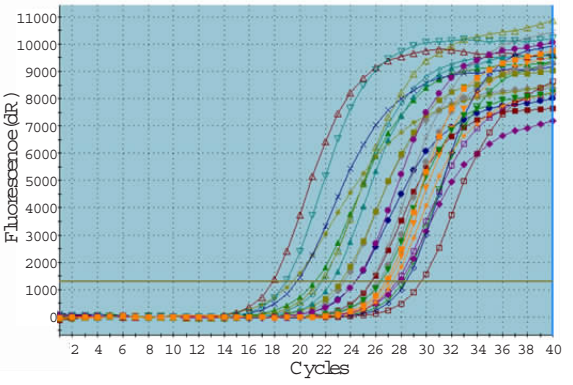

图 9 荧光定量 PCR 扩增曲线

Fig.9 PCR amplification plots of

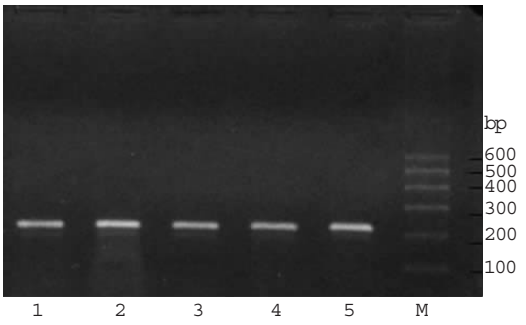

图 10 荧光定量 PCR 产物

M:PCR marker, 1-5:galectin-3 扩增产物 (233 bp)

Fig.10 Electrophoresis of the PCR products for galectin-3

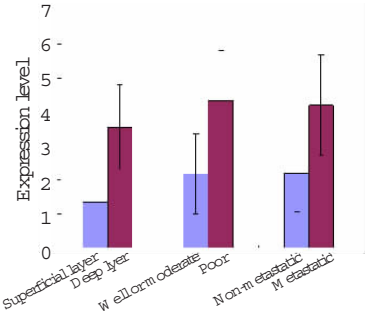

图 11 实时荧光定量 PCR 检测 Galectin-3 在大肠癌及癌旁组织中的表达

Fig.11 Galectin-3 expression in normal colonic mucosa and carcinoma assayed by quantitative real-time PCR

表 3 实时荧光定量 PCR 检测 Galectin-3 在大肠癌及癌旁组织中的表达

Tab.3 Galectin-3 expression in normal colonic mucosa and carcinoma assayed by quantitative real time PCR

Groups	Cases	Folds (*Mean*±*SD*)	*t*	*P*
Invasion				
Deep layer	25	3.56±2.37	4.592	*P*<0.001
Superficial layer	6	1.33±0.19		
Differentiation				
Poor	11	4.33±2.70	2.447	*P*=0.03
Well or Moderat	20	2.18±1.45		
Metastasis				
Non-metastatic	17	2.20±1.73	2.643	*P*=0.013
Metastatic	14	4.21±2.47		

3 讨论

Galectin-3 是一种细胞内和细胞外凝集素, 包括三个结合域:NH2 末端结合域, 一个糖结构识别域和一个特有的富含甘氨酸、脯氨酸和酪氨酸重复序列的结构域。Galectin-3 广泛分布于正常细胞和肿瘤组织中,如单核细胞和巨噬细胞、正常胃黏膜及胃癌、结肠黏膜及结肠癌、乳腺上皮及乳腺癌、前列腺及前列腺癌、间变型大细胞淋巴瘤、甲状腺癌、卵巢癌及黑色素瘤等[3-14]。目前认为 Galectin-3 可能在以下几个方面促进肿瘤的形成和转移:(1)Galectin-3 的糖亲和性促进血管内皮细胞和平滑肌细胞的有丝分裂及参与肿瘤形成中的血管生成[15]。(2)Galectin-3 是基质金属蛋白酶 (MMP)-2 和 (MMP)-9 的底物,MMP 将 Galectin-3 分解后产生一个相对分子质量为 22×10^3 的糖识别域和一个相对分子质量为 9×10^3 的氨基酸残基组成 Galectin-3 末端片段 [16]。目前已经明确 MMP, 特别是 MMP-2 的表达增高与肿瘤的演进相关,这样裂解的 Galectin-3 可能在肿瘤的转移、侵袭这一步具有一定的作用。(3)肿瘤的转移需要肿瘤细胞与内皮细胞粘附,进一步形成细胞游走,Galectin-3 在炎症反应中参与炎症细胞的游走,因此认为肿瘤细胞表面的 T 抗原和内皮细胞表面的 Galectin-3 在肿

瘤细胞粘附内皮细胞方面起着重要的作用[17]。(4) Galectin-3 能阻止细胞的凋亡[18,19], Galectin-3 的过度表达可使细胞逃脱同其他的凋亡刺激所引起的巢式凋亡[19-21],因而认为,Galectin-3 在肿瘤细胞中的表达增强了肿瘤细胞的转移潜能。综合而言,肿瘤细胞表面 Galectin-3 表达升高通过增加细胞的聚集和提高与内皮细胞的亲和性而增大肿瘤的转移潜能。

本研究为了探讨 Galectin-3 在大肠癌发生发展中的作用, 以石蜡组织及新鲜大肠癌组织为研究对象,应用免疫组化技术、荧光实时定量 RCR,从蛋白与 mRNA 水平检测 Galectin-3 在大肠癌组织中的表达情况。我们的免疫组化检测结果显示 Galectin-3 在大肠癌组织中的表达明显高于相应的癌旁组织;在浸润程度深、分化程度低及发生淋巴结转移的组织中的表达明显高于浸润程度浅、分化程度高及未发生淋巴结转移的组织。这些结果提示 Galectin-3 的高表达与大肠癌细胞的癌变、高侵袭能力、低分化趋向有一定相关性。Real time-PCR 检测结果表明大肠癌组织中 Galectin-3mRNA 的表达明显高于相应的癌旁组织。在浸润程度深、分化程度低及发生淋巴结转移的组织中的表达明显高于浸润程度浅、分化程度高及未发生淋巴结转移的组织。Galectin-3mRNA 水平的检测与蛋白水平的检测结果一致, 说明大肠癌组织中 Galectin-3 表达的增强是由于基因转录水平上调的结果。

根据这些实验结果说明无论在蛋白水平还是 mRNA 水平,Galectin-3 的异常表达与肿瘤的侵袭能力和转移能力有密切的相关性,可作为一个潜在的大肠癌发病与转移的观察指标。但是 Galectin-3 的生物学功能依然没有明确,阐明它的功能有待进一步的研究。

参考文献:

[1] 许良中,杨文涛.免疫组织化学反应结果的判断标准[J].中国癌症杂志,1996,6(4):229-31.

[2] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the -2△△CT method [J]. Methods, 2001, 25:402-8.

[3] Van Den Brule FA, Buicu C, Berchuck A, et al. Expression of the 67-kD laminin receptor, galectin-1, and galectin-3 in advanced human uterine adenocarcinoma[J]. Hum Pathol, 1996, 27:1185-91.

[4] Liu FT, Hsu DK, Zuberi RI, et al. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages[J]. Am J Pathol, 1995, 147(4):1016-28.

[5] Lotan R, Ito H, Yasui W, et al. Expression of a 31-kDa lactoside-binding lectin in normal human gastric mucosa and in primary and metastatic gastric carcinomas[J]. Int J Cancer, 1994, 56(4):474-80.

[6] Nagy N, Legendre H, Engels O, et al. Refined prognostic evaluation in colon carcinoma using immunohistochemical galectin fingerprinting[J]. Cancer, 2003, 97(8):1849-58.

[7] Schoeppner HL, Raz A, Ho SB, et al. Expression of an endogenous galactose-binding lectin correlates with neoplastic progression in the colon[J]. Cancer, 1995, 75(12):2818-26.

[8] O Driscoll L, Linehan R, M-Kennedy S, et al. Lack of prognostic significance of survivin, survivin-deltaEx3, surviving-2B, galectin-3, bag-1, bax-alpha and MRP-1 mRNA sin breast cancer[J]. Cancer Lett, 2003, 201(2):225-36.

[9] Ellerhorst JA, Stephens LC, Nguyen T, et al. Effects of galectin-3 expression on growth and tumorigenicity of the prostate cancer cell line LNCaP[J]. Prostate, 2002, 50(1):64-70.

[10] Konstantinov KN, Robbins BA, Liu FT. Galectin-3, a beta-galactoside-binding animal lectin, is a marker of anaplastic large-cell lymphoma[J]. Am J Pathol, 1996, 148(1):25-30.

[11] Mollenhauer J, Deichmann M, Helmke B, et al. Frequent down-regulation of DMBT1 and galectin-3 in epithelial skin cancer[J]. Int J Cancer, 2003, 105(2):149-57.

[12] Gillenwater A, Xu XC, el-Naggar AK, et al. Expression of galectins in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Head Neck, 1996, 18(5):422-32.

[13] Baldus SE, Zirbes TK, Weingarten M, et al. Increased galectin-3 expression in gastric cancer: correlations with histopathological subtypes, galactosylated antigens and tumor cell proliferation [J]. Tumour Biol, 2000, 21(5):258-66.

[14] Woo HJ, Joo HG, Song SW, et al. Immunohistochemical detection of galectin-3 in canine gastric carcinomas[J]. J Comp Pathol, 2001, 124(2-3):216-8.

[15] Nangia-Makker P, Honjo Y, Sarvis R, et al. Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis[J]. Am J Pathol, 2000, 156(3):899-909.

[16] Ochieng J, Fridman R, Nangia-Makker P, et al. Galectin-3 is a novel substrate for human matrix metalloproteinases-2 and -9 [J]. Biochemistry, 1994, 33(47):14109-14.

[17] Glinsky VV, Glinsky GV, Rittenhouse-Olson K, et al. The role of Thomsen-Friedenreich antigen in adhesion of human breast and prostate cancer cells to the endothelium [J]. Cancer Res, 2001, 61(12):4851-7.

[18] Matarese P, Fusco O, Tinari N, et al. Galectin-3 overexpression protects from apoptosis by improving cell adhesion properties [J]. Int J Cancer, 2000, 85:545-54.

[19] Kim HR, Lin HM, Biliran H, et al. Cell cycle arrest and inhibition of anoikis by galectin-3 in human breast epithelial cells [J]. Cancer Res, 1999, 59:4148-54.

[20] Yoshii T, Fukumori T, Honjo Y, et al. Galectin-3 phosphorylation is required for its anti-apoptotic function and cell cycle arrest [J]. J Biol Chem, 2002, 277:6852-7.

[21] Akahani S, Nangia-Makker P, Inohara H, et al. Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BHI (nwgr) domain of Bcl-2 family[J]. Cancer Res, 1997, 57:5272-6.