

文章编号: 1005-8982(2007)13-1585-03

· 论著 ·

Galectin-3 在不同病理分期大肠癌中的 差异表达研究

程变巧, 龚伟, 耿炎, 陈琳, 武金宝, 姜泊
(南方医科大学南方医院 消化研究所, 广东 广州 510515)

摘要: 目的 探讨 galectin-3 在三种不同病理分期的大肠癌细胞中的差异表达, 及其表达与大肠癌病理特征的关系。方法 体外培养 SW1116、W480 和 LOVO 3 种不同病理分期大肠癌细胞株, 用 RT-PCR 方法研究 galectin-3 在 mRNA 水平的表达; Western-blot 方法研究 galectin-3 在蛋白水平的表达, 用免疫细胞化学方法对 galectin-3 进行细胞定位研究。结果 galectin-3 主要表达在大肠癌细胞浆中, 在细胞膜也有少量表达。在 Duck's 分期依次为 A 期 - D 期的三种大肠癌细胞株: SW1116- SW480- LOVO 细胞中, galectin-3 的表达在 mRNA 水平和蛋白水平都依次增强, 各组间都有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 galectin-3 主要表达在大肠癌细胞浆和胞质中, Galectin-3 在大肠癌细胞中的表达与大肠癌细胞的恶性程度有关, 可作为大肠癌转移的指标。

关键词: galectin-3; 大肠癌; 病理分期; 差异表达

中图分类号: R735.8

文献标识码: A

Study of relationship between expression of galectin-3 and malignant degree of colorectal cancer in differential pathologic stage

CHENG Bian-qiao, GONG Wei, GEN Yan, CHEN Lin, WU Jin-bao, JIANG Bo
(Institute of Digestive Diseases, Na fang Hospital, Southern Medical University,
Guangzhou 510515, P.R.China)

Abstract: **Objective】** To investigate the differential expression of Galectin-3 in three differential pathologic colorectal cancer and the relationship between its expression and colorectal cancer pathology character. **Methods】** SW1116, W48, and LOVO were incubated exo, studied the expression of galectin-3 in mRNA level and in albumen level were studied with RT-PCR and Western-blot, studied orientation of galectin-3 in cell with immunocytochemistry. **Results】** Galectin-3 was mostly expressed in cytoplasm of colorectal cancer cell, but a litter in membrane. On the basis the stage of Duck's, from A to D, the expression level of galectin-3 both mRNA and albumen were increased, and there was statistics significance in differential groups. **Conclusions】** Galectin-3 is mostly expressed in cytoplasm, its expression in colorectal cancer is related with differentiation degree, and is regarded as a maker of the metastasis.

Key words: Galectin-3; colorectal cancer; pathologic stage; differential expression

大肠癌是常见的消化道恶性肿瘤之一。在我国, 大肠癌发病率逐年增高, 且死亡率在所有消化道肿瘤中上升最快, 但多数发展较慢, 无论从正常黏膜发展到腺瘤再到癌或者是从目前争论较多的直接从正

常黏膜发展到癌也就是最新发现的 De novo 途径^[1], 都需要至少几年甚至十几年时间, 能否在这一时间内有效的抑制大肠癌的发展, 一直是国内外学者研究重点所在。我们大肠癌试验组在前期的工作中,

收稿日期: 2007-01-20

[通讯作者] 姜泊, E-mail: drjing@163.com

通过蛋白质组学筛选出与大肠癌发展密切相关的蛋白质之一 Galectin-3, 是目前认为与大肠癌发展关系比较密切的基因^[1], 目前在大肠癌中的研究还少有报道。本文比较 Galectin-3 在 3 种不同临床病理分期的大肠癌细胞株的差异表达, 揭示 Galectin-3 与大肠癌病理特征的关系。

1 材料与方法

1.1 细胞株

SW1116 (Duke's A 期) 细胞株为香港大学所赠, SW480 和 Lovo 细胞株均来自 ATCC (美国组织培养保藏中心), 由中国科学院上海细胞生物学研究所提供, 分别为 Duke's B 期, Duke's D 期。

1.2 主要试剂及材料

1.2.1 细胞培养 RPMI-1640, 新生牛血清, 青链霉素, 胰酶均由广州威佳公司提供。

1.2.2 RT-PCR Trizol 和 RT-PCR 试剂盒 (日本 TAKARA), DNAmaker, 2% 琼脂糖 (sigma, 美国), Galectin-3 引物片段和 β -actin 引物片段分别参照基因文库 NM_002306 序列和 NM_001101 自行设计, 由上海博亚基因技术有限公司合成, 扩增片段分别为: 308 bp 和 546 bp。galectin-3 序列, 上游为: 5'-GGC GCC TAC CAT GGA GCA CCT-3', 下游: 5'-AAG AGT GGG TTT AAG TGG AAG GCA-3'。

β -actin 序列上游: 5'-AGC ACG GCA TCA TCG TCA CCA ACT-3', 下游: 5'-TGG CGT ACT GGT CTT TGC GGA T-3'。

1.2.3 蛋白提取及 Western-blot 蛋白裂解液 (碧云天, 中国); 半干电转仪 (Bio-Rad, 美国), PVDF 膜 (Bio-Rad, 美国), ECL 化学发光试剂盒 (Pharmacia, 美国); 胶片, Galectin-3 人抗大鼠 (Santa Cruz); 羊抗大鼠 IgG-FITC (博士德, 中国); Bradford 试剂盒 (博士德, 中国)。

1.2.4 免疫细胞化学 免疫组化 sp 法超敏试剂盒 (迈新, 中国); 多聚赖氨酸 (博士德, 中国), Triton-100 (博士德, 中国), 4% 多聚甲醛 (博士德, 中国), DAB 显色试剂 (迈新, 中国)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 3 种大肠癌细胞株均在 37 $^{\circ}$ C、5% 二氧化碳条件下, 培养于含 10 mL/L 新生牛血清、100 KU/L 青霉素、100 mg/L 链霉素的 RPMI-1640 中, 根据生长情况传代。

1.3.2 总 RNA 的提取 贴壁培养细胞弃培养液,

预冷的 PBS 液反复冲洗 3 次, 按每 10 cm² 培养瓶体积加 1 mL Trizol。反复吹打, 室温下静置 5 min, 后按照 Trizol 试剂说明书进行。真空干燥后用无 RNA 酶的水溶解沉淀。2% 琼脂糖凝胶电泳检测 mRNA 完整性, 核酸蛋白分析仪测定其浓度和纯度。

RT-PCR: cDNA 合成和 PCR 扩增目的基因片段均按照 RT-PCR 试剂盒说明书进行。cDNA 合成反应参数设置: 30 $^{\circ}$ C 10 min, 42 $^{\circ}$ C 30 s, 94 $^{\circ}$ C 5 min, 5 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 反应参数: 94 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 32 个循环完毕, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 4 $^{\circ}$ C 中止反应。PCR 扩增产物测序交上海博亚基因技术有限公司完成。

1.3.3 胞浆蛋白提取 取 4 种大肠癌细胞株, 在室温下用 1 \times PBS 冲洗 3 次, 收集细胞。2 000 r/min 离心后加入蛋白裂解液 200 μ L, 100 mmol/L PMSF 20 μ L 匀浆, 冰上膨胀 60 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 分装后 -20 $^{\circ}$ C 保存。采用 Bradford 法在紫外分光光度仪上绘制蛋白标准曲线, 检测蛋白浓度。

Western-blot: 取 20 μ g 胞浆蛋白以 12% SAD-PAGE 凝胶电泳分离。半干电转移至 PVDF, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 加入一抗 galectin-3 单克隆抗体 (稀释浓度为 1:4 000), 于 40 $^{\circ}$ C 封闭袋中摇床上过夜。二抗 (HRP) 标记的羊抗大鼠 (1:10 000) 室温封闭 1 h, Ecl 法显色结果, 压片曝光。凝胶图像分析系统检测蛋白质印记条带灰度。

1.3.4 免疫细胞化学 多聚赖氨酸包被盖玻片, 至于六孔培养板中。消化传代的细胞悬液滴加至上述六孔培养板中, 待细胞在盖玻片上贴壁。多聚甲醛固定细胞 30 min, 3% H₂O₂ 消除内源性过氧化物酶的活性, 37 $^{\circ}$ C 孵育 10 min, 3% Triton-100 增加细胞膜的通透性, 室温孵育 30 min, 滴加正常非免疫动物血清, 室温下孵育 30 min。除去血清, 滴加 galectin-3 一抗 (1:200, 抗体稀释液稀释), 用 1 \times PBS 做阴性对照放入湿盒内 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。滴加生物素标记的第二抗体 (1:150), 室温下孵育 30 min, 滴加链霉素抗生物素 - 过氧化物酶溶液, 室温下孵育 10 min, 后进行 DAB 显色, 盐酸酒精分化, 苏木素复染, 氨水返蓝。梯度酒精脱水, 中性树脂胶封固。

1.4 统计学分析

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 10.0 版软件进行方差分析, 组间比较用 LSD 法, 以 P < 0.05 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 Galectin-3 在大肠癌细胞中的表达部位

免疫细胞化学方法结果显示, galectin-3 表达在大肠癌细胞胞质与胞浆中, 在 3 种大肠癌细胞中从 sw1116, sw480 到 LOVO 细胞中, galectin-3 的染色

强度依次加深。结果见图 1。

2.2 Galectin-3 在两种大肠癌细胞株中 mRNA 水平的表达情况

用 RT-PCR 方法对 Galectin-3 在 SW1116, SW480 和 LOVO 细胞中表达进行半定量分析显示, 在上述三种细胞中都有表达, 表达灰度值分别为

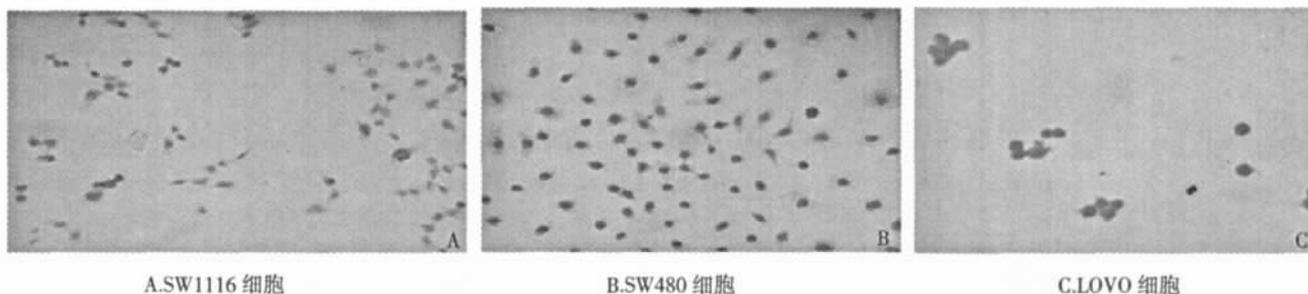


图 1 Galectin-3 在 SW1116, SW480 和 SW620 中的免疫细胞化学阳性染色 (DAB) × 200

4.811, 5.314 和 6.048, Galectin-3 与 β -actin 的相对灰度比分别为 (0.1580.08)、(0.1980.07) 和 (0.24740.11), F 值为 6.962 (P=0.013), 结果见图 2。

3 讨论

Galectin-3 是动物血凝素 Lectin 家族成员之一, 因与含 β -半乳糖苷残基的糖复合物具有很高的亲和力而得名^[2]。Galectin-3 的相对分子质量约 31×10^3 , 编码基因位于染色体 1p15 由 6 个外显子和 5 个内含子组成。Galectin-3 具有 Lectin 家族成员中共有的结构特征: C-末端为碳氢识别位点, 与不同的配体结合, 发挥不同的生物学功能。N-末端含有一个 9 个氨基酸的重复序列, 可作为基质蛋白酶结合的底物。因 galectin-3 在结构上缺乏转移到内质网的信号序列, 此结构具有传递信号的作用^[3]。

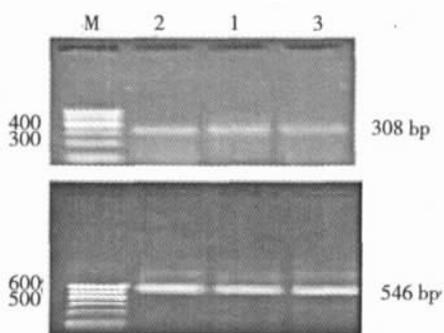
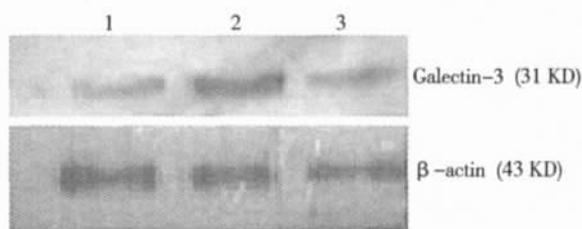


图 2 RT-PCR 法检测 Galectin-3 mRNA 表达水平

2.3 蛋白印记试验检测 galectin-3 在蛋白水平的表达

用凝胶分析系统对蛋白印记检测结果显示, Galectin-3 在 SW1116 SW480 和 LOVO 中的条带灰度值分别是 55.790、74.247 和 97.234, Galectin-3/ β -actin 灰度值分别为 0.646、0.796 和 0.923, 方差 $F=18.506$ (P=0.001), 表达见图 3。

Galectin-3 的生物学功能及在肿瘤形成中的作用还不是非常清楚。目前研究表明, Galectin-3 在细胞表面和细胞间隙的表达可以与表面配体结合发挥肿瘤的侵袭和转移。虽然已有研究报道 Galectin-3 表达水平和结肠癌有着直接的关系, 但 Galectin-3 在大肠癌中的生物学作用报答甚少^[4,5]。本试验通过免疫细胞化学方法研究了 galectin-3 在关系密切的分别为 Duck'SA, B 和 D 期的大肠癌细胞株 SW1116, SW480 及 LOVO 中的表达情况发现, Galectin-3 主要表达在细胞质和胞浆中, 染色深度从 SW1116, SW480 到 LOVO 逐步增强。运用 RT-PCR 方法和 Western-blot 方法在 mRNA 水平和蛋白水平对 Galectin-3 在上述两种细胞中的表达进行了半定量研究, 用凝胶灰度分析系统对 Galectin-3 在 SW1116, SW480 和 LOVO 3 种细胞系中的 mRNA 和蛋白水平表达灰度值分析结果平均



Lane1 :LOVO; Lane2: SW480; Lane3: SW1116

图 3 Western-Blot 检测 SW480 和 SW620 细胞株 Galectin-3 蛋白表达

(下转第 1591 页)

- tis B virus core antigen as vaccine carrier moiety. I. Presentation of foreign epitopes[J]. *Journal of Biotechnology*, 1996, 44: 91-96.
- [8] RANDALL G, GRAKOUT A, RICE CM. Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2003, 100: 235-240.
- [9] CERNY A, MCHUTCHISON JG, PASQUINELLI C, et al. Cytotoxic T lymphocyte response to hepatitis C virus-derived peptides containing the HLA-A2.1 binding motif[J]. *J Clin Invest*, 1995, 95(2): 521-530.
- [10] PUMPENS P, GRENS E. HBV core particles as a carrier for B cell/T cell epitopes[J]. *Intervirology*, 2001, 44(2-3): 98-114.
- [11] MILICH DR, PETERSON DL, SCHODEL F, et al. Preferential recognition of hepatitis B nucleocapsid antigens by Th1 or Th2 cells is epitope and major histocompatibility complex dependent [J]. *J Virol*, 1995, 69(5): 2776-2785.
- [12] FEHR T, SKRASTINA D, PUMPENS P, et al. T cell-independent type I antibody response against B cell epitopes expressed repetitively on recombinant virus particles[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(16): 9477-9481.
- [13] CLARKE BE, BROWN AL, GRACE KG, et al. Presentation and immunogenicity of viral epitopes on the surface of hybrid hepatitis B virus core particles produced in bacteria[J]. *Journal of Virology*, 1990, 71: 1109-1117.
- [14] CLARKE BE, NEWTON SE, CARROLL AR, et al. Improved immunogenicity of a peptide epitope after fusion to hepatitis B core protein[J]. *Nature*, 1987, 330: 381-384.
- [15] ULRICH R, KOLETZKI D, LACHMANN S, et al. New chimeric hepatitis B virus core particles carrying hantavirus (serotype Puumala) epitopes immunogenicity and protection against virus challenge[J]. *J Biotech*, 1999, 73: 141-153.
- [16] MILICH DR, HUGHES J, JONES J, et al. Conversion of poorly immunogenic malaria repeat sequences into a highly immunogenic vaccine candidate[J]. *Vaccine*, 2002, 20: 771-788.
- [17] VON BRUNN A, BRAND M, REICHHUBER C, et al. Principal neutralizing domain of HIV-1 is highly immunogenic when expressed on the surface of hepatitis B core particles [J]. *Vaccine*, 1993, 11: 817-824.
- [18] SCHODEL F, PETERSON D, MILICH D, et al. Hepatitis B virus core and e antigen: Immune recognition and use as a vaccine carrier moiety[J]. *Intervirology*, 1996, 39: 104-110.
- [19] SCHODEL F, PETERSON D, HUGHES J, et al. Hybrid hepatitis B virus core antigen as vaccine carrier moiety. I. Presentation of foreign epitopes[J]. *Journal of Biotechnology*, 1996, 44: 91-96.
- [20] BORISOVA G, BORSCHUKOVA O, SKRASTINA D, et al. Behavior of a short preS1 epitope on the surface of hepatitis B core particles[J]. *Biol Chem*, 1999, 380(3): 315-324.

(曾文军 编辑)

(上接第 1587 页)

为: 4.811、5.314、6.048 和蛋白水平表达量为: 55.790、74.247 和 97.234。LSD 统计分析结果各组均 $P < 0.05$ 。结果提示 galectin-3 在大肠癌中的表达与大肠癌的分化程度有关, 分化水平越低, 其表达量越高, 染色越深。H SCHOEPPNER^[6] 曾报道认为: Galectin-3 在高和中分化不良和早期浸润性癌中的表达水平显著高于在腺瘤中的表达水平, 在转移癌中的表达水平显著高于原发性癌中的表达。X SANJUAN^[7] 进一步研究证实了这一观点。他们研究认为, 在正常黏膜中 Galectin-3 表达在细胞核, 随着从正常黏膜-不典型增生-癌变这一演变过程, Galectin-3 逐渐从细胞核向细胞质中转移, 随着肿瘤分化程度的降低, 细胞质的表达量也越高。本试验从蛋白和核酸水平结果均提示与上述研究结果一致。这提示 Galectin-3 在大肠癌中的表达与大肠癌的分化程度有关。

从目前研究结果来看, Galectin-3 有望成为大肠癌浸润和转移的一个敏感指标。在此基础上, 本试验将在信号转导方面进一步探讨 Galectin-3 与大肠癌侵袭转移的关系, 以便进一步阐明其在肿瘤中转移的发病机制, 为大肠癌的治疗及预后提供一个

靶点。

参 考 文 献:

- [1] KUDO S, TAMURA S, HIROTA Y. The problem of de novo colorectal carcinoma[J]. *Eur J Cancer*, 1995, 31: 1118.
- [2] BARONDES SH, COOPER DNW, GITT MA, et al. Galectins: Structure and function of a large family of animal lectins [J]. *J. Biol. Chem*, 1994, 269: 20807-20810.
- [3] MENON RP, HUGHES RC. Determinants in the N-terminal domains of galectin-3 for secretion by a novel pathway circumventing the endoplasmic reticulum-Golgi complex[J]. *Eur. J. Biochem*, 1999, 264: 569-557.
- [4] YUKINORI T, HIDENORI I, TADASHI Y, et al. Malignant transformation of thyroid follicular cells by galectin-3[J]. *Cancer Letters*, 2003, 195: 118.
- [5] MIYAZAKI J, HOKARI R, KATO S, et al. Increased expression of galectin-3 in primary gastric cancer and the metastatic lymph nodes[J]. *Oncol Rep*, 2002, 9(6): 1307.
- [6] SCHOEPPNER HL, RAZ A, HO SB. Expression of an endogenous galactose-binding lectin correlates with neoplastic progression in the colon[J]. *Cancer*, 1995, 75(12): 2818-2826.
- [7] SANJUAN X, FERNANDEZ PL, CASTELLS A. Differential expression of galectin 3 and galectin 1 in colorectal cancer progression[J]. *Gastroenterology*, 1997, 113(6): 2003-2005.

(曾文军 编辑)