

# 半乳糖凝集素 3 在糖尿病足溃疡患者中的表达

邹译娴<sup>1</sup>, 李国庆<sup>2</sup>, 汤参娥<sup>3</sup>, 孟莉娟<sup>4</sup>

1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007; 2. 南华大学药学与生物科学学院, 湖南省分子靶标新药研究协同创新中心; 3. 中南大学湘雅医院医学科学研究中心; 4. 南华大学附属第二医院

**摘要:** **目的** 探讨糖尿病足溃疡(diabetic foot ulcer, DFU)患者伤口和血清中半乳糖凝集素 3(galectin-3)的表达,以期阐明 galectin-3 和 DFU 的关系。**方法** 选取 2015 年 1 月-2016 年 3 月 Wanger 1、2 级的糖尿病足患者 50 例,另选取同期血糖正常的外伤患者 20 例为对照,分别取其足部伤口边缘组织及血清。对所有入选对象均行 ELISA 检测血清 galectin-3 浓度,Western-blot 法检测伤口边缘组织 galectin-3 的表达水平。**结果** ELISA 结果显示 DFU 组血清 galectin-3 水平高于外伤对照组[(5.66±2.76) vs (4.25±1.94) ng/ml] ( $P=0.04$ ),Western-blot 结果显示 galectin-3 在 DFU 组伤口边缘组织表达增强。**结论** galectin-3 在 DFU 患者中高表达,galectin-3 的高表达可能参与了糖尿病足的进展。

**关键词:** galectin-3; 血清; 糖尿病足

**中图分类号:** R587.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2018)06-0649-03 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2018.06.003

## Expression of galectin-3 in patients with diabetic foot ulcer

ZOU Yi-xian\*, LI Guo-qing, TANG Can-e, MENG Li-juan

\*The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China

Corresponding author: LI Guo-qing, E-mail: nhulgq@126.com

**Abstract:** **Objective** To investigate the expression of galectin-3 in wounds and sera of patients with diabetic foot ulcer(DFU) so as to clarify the correlation between galectin-3 and DFU. **Methods** Fifty DFU patients with Wagner 1-2 stages and 20 wounded patients with normal blood glucose level (serving as the control group) were enrolled to obtain their tissues from the edge of the foot wound and sera from January 2015 to March 2016. The serum concentration of galectin-3 was detected by ELISA, and the expression of galectin-3 in the tissues was detected by Western-blot. **Results** ELISA results showed that the serum concentration of galectin-3 was higher in the DFU group than in the wounded control group ((5.66±2.76) ng/mL vs. (4.25±1.94) ng/mL,  $P=0.04$ ). Western-blot results indicated that the expression of galectin-3 in tissues from wound edge of the DFU group was enhanced. **Conclusions** Galectin-3 is highly expressed in the patients with DFU, and its high expression may contribute to the development of DFU.

**Key words:** galectin-3; serum; diabetic foot ulcer

糖尿病足溃疡(diabetic foot ulcer, DFU)是 2 型糖尿病中较为严重的一类并发症。由长期高血糖引起的外周神经及血管病变、上皮细胞功能、炎症反应及生长因子功能障碍,与 DFU 密切相关,但是其分子病理机制仍相当匮乏<sup>[1-2]</sup>。

半乳糖凝集素 3(galectin-3, Gal-3)是  $\beta$ -半乳糖凝集素家族的重要一员,是一个与肿瘤、炎症以及心血管疾病密切相关的蛋白,能与细胞表面糖蛋白相互作用,影响药物对患者的治疗<sup>[3-5]</sup>。本研究采用 ELISA 和 Western-blot 分析 galectin-3 在糖尿病足溃疡患者

的血清和伤口边缘皮肤组织中的变化,旨在为糖尿病的临床治疗和病变的分子机制研究提供参考依据。

### 1 对象与方法

**1.1 研究对象** 选取 2015 年 1 月-2016 年 3 月湖南中医药大学第一附属医院诊断为 Wanger 1、2 级的糖尿病足患者 50 例,其中男 28 例,女 22 例;年龄 57~75 岁,平均年龄(67±5)岁;糖尿病病程 5~16 年,按照世界卫生组织(WHO)和世界糖尿病联盟(IDF)糖尿病的诊断和分型,排除合并其他疾病的影响;其他疾病包括严重心、肝、肾功能不全,恶性肿瘤,近 6 个月有脑出血、脑梗死、急性心肌梗死发作史,急性感染。另选取同期年龄性别相匹配的血糖正常的外伤患者 20 例为对照。根据文献报道的成熟方法,刮取患者包含 1 cm

**基金项目:**国家自然科学基金(81570776)

**作者简介:**邹译娴(1980-),硕士,主治医师,主要从事糖尿病的诊断与治疗方面的研究工作。

**通信作者:**李国庆, E-mail: nhulgq@126.com。

左右伤口边缘的皮肤组织,立即置于液氮中保存。同时清晨采集各观察对象静脉血 5 ml,分离血清-80℃保存备用。所有标本获取前,均获得患者或家属知情同意。

**1.2 试剂** 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺购自美国 Sigma 公司;二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒为 Pierce 公司产品;鼠抗人 galectin-3 抗体为美国 Proteintech 公司产品;western-blotting 化学发光检测试剂盒购自美国 Bio-Rad 公司,酶联免疫试剂盒购自 Elab-science Biotechnology 公司。

**1.3 酶联免疫吸附法检测** galectin-3 浓度:为了检测 galectin-3 在糖尿病足患者血清中的差异,采用酶联免疫吸附法检测 50 例糖尿病足和 20 例正常对照人血清 galectin-3 浓度,按照试剂盒说明书进行操作。Tecan 酶标仪 450 nm 处读取吸光度值,最终根据标准曲线计算 galectin-3 含量。

**1.4 蛋白抽提** 剪碎收集的伤口处的组织,加入适量的 RIPA 蛋白抽提裂解液[150 mmol/L NaCl, 50 mM Tris-Cl (pH8.0), 0.1% SDS, 1 μg/ml Aprotinin, 100 μg/ml PMSF, 0.5% Na-deoxycholate, 1% Nonidet P-40 or Triton X-100],裂解 30 min,每隔 5 min 漩涡震荡,细胞总蛋白为 15 000 g, 4℃离心 30 min 后所得到的上清液体。测定蛋白质的浓度采用 BCA 蛋白质定量试剂盒。

**1.5 Western-blot 分析** 采用 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶分离蛋白质。每个凝胶泳道孔上样 50 μg 蛋白,电泳分离电压为 100 V 恒压,按照凝胶面积以 0.65 mA/cm<sup>2</sup>恒电流转移 1.5 h 将蛋白从 SDS-聚丙烯酰胺凝胶转印至 PVDF 膜。采用脱脂奶粉(5%)室温封闭 2 h 后,加入 1:1 000 稀释的鼠抗人 galectin-3 一抗 4℃孵育摇床振荡过夜,封闭液充分漂洗干净后加入 1:2 000 稀释的二抗(辣根过氧化物酶标记山羊抗小

鼠)室温孵育 1 h,漂洗后 ECL 检测,曝光、显影。内参对照采用 β-actin 蛋白表达水平。实验重复三次。

**1.6 统计学分析** 利用 GraphPad Prism 建立数据库,并对数据进行统计分析。计量资料采用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )进行统计描述,采用 *t* 检验检测两组方差齐的数据。检验水准  $\alpha = 0.05$  (双侧)。

## 2 结果

**2.1 血清 galectin-3 浓度比较** 对 50 例 DFU 患者和 20 例健康体检者血清 galectin-3 含量采用 ELISA 法进行测定,单个样本结果见散点图,其中健康对照组 galectin-3 含量的平均值为  $(4.25 \pm 1.94)$  ng/ml,而糖尿病足患者血清 galectin-3 含量的平均值为  $(5.66 \pm 2.76)$  ng/ml,糖尿病足患者血清 galectin-3 水平均显著高于对照组,两组间差异有统计学意义( $P = 0.04$ ),见图 1。

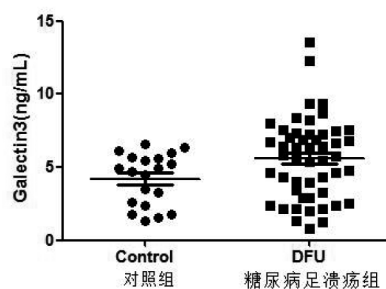
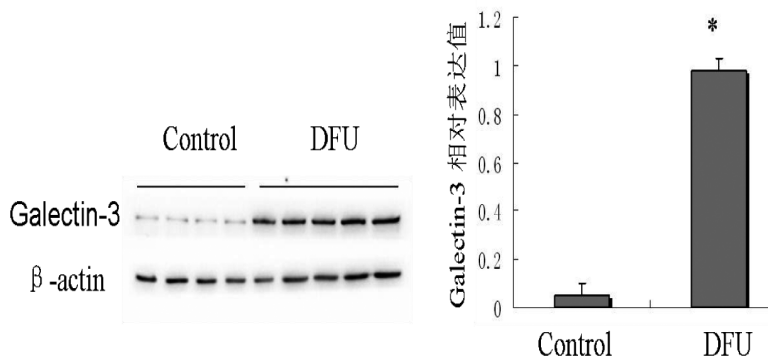


图 1 ELISA 法检测 galectin-3 的血清浓度散点图

**2.2 伤口处组织 galectin-3 水平比较** 对糖尿病足患者与外伤患者伤口处组织 galectin-3 表达水平进行 Western-blot 检测,β-actin 为上样内参。结果显示,糖尿病足患者伤口处的 galectin-3 的表达水平明显高于外伤对照组,见图 2。



注:control 为外伤对照组,DFU 为糖尿病足组,β-actin 为上样内参。

图 2 western-blot 法检测糖尿病组织及外伤对照组织中 galectin-3 的表达代表图

### 3 讨论

根据世界卫生组织(WHO)估计,2014 年全世界的糖尿病患者已达 4.22 亿,占全球总人口的 8.5%,每年导致 150 万人死亡;我国糖尿病患者占我国人口的 9.4%,每年导致 9.3 万人死亡;糖尿病的并发症包括神经损伤、肾功能衰竭、心脏病发作、中风、视力减退和下肢截肢等<sup>[6]</sup>。长期血糖升高将会引起外周神经及血管病变、上皮细胞功能、炎症反应及生长因子功能障碍,最终导致糖尿病足溃疡(diabetic foot ulcer, DFU)<sup>[7]</sup>。糖尿病足根据伤口严重程度按 Wanger 分为 6 级,1、2 级的临床症状相对较轻,1 级:表面溃疡,无感染;2 级:较深的溃疡,常合并软组织炎,无脓肿或骨等深度感染。本研究为排除感染等因素的影响,选取无感染或轻度感染的 1~2 级 DFU 患者。

半乳糖凝集素(galectin)是  $\beta$ -半乳糖苷特异结合凝集素超级家族中的一个家族,已经发现 15 个家族成员,它们在免疫系统、炎症反应、伤口愈合、肿瘤发生发展及心血管病等的生理和病理过程中发挥重要的作用<sup>[8]</sup>。galectin-3 作为半乳糖凝集素家族成员之一,在细胞内外发挥非常重要的生物学作用,但是其信号通路及配体研究还不明了<sup>[3]</sup>。galectin-3 可以作为一些疾病如冠状动脉粥样硬化、胃癌、结肠癌的血清生物标志物<sup>[9-11]</sup>。结肠癌外周血中 galectin-3 水平与细胞免疫、炎症和营养参数密切相关<sup>[10]</sup>。

已有研究认为 galectin-3 可以作为糖尿病前期及糖尿病的候选生物标志物,患者血清中 galectin-3 表达升高与 2 型糖尿病的并发症心力衰竭、肾功能衰竭、外周动脉疾病等密切相关<sup>[12-13]</sup>。糖尿病患者血清 galectin-3 水平增高并导致胰岛素抵抗<sup>[14]</sup>。在本研究中,针对糖尿病并发症糖尿病足溃疡患者血清和伤口处组织中 galectin-3 水平进行研究,尚未见文献报道。本研究中,糖尿病足患者血清和伤口处组织中 galectin-3 水平显著高于对照组,表明高浓度的 galectin-3 可能诱导或促进糖尿病足的发生。

galectin-3 为凝集素家族蛋白的一种,多是由巨噬细胞分泌,能够促进血管新生及内皮细胞分化,参与外周动脉疾病及神经性病变的形成<sup>[15]</sup>,推测通过此参与糖尿病足的发生,患者长期处于高糖环境,galectin-3 参与炎症反应,促进巨噬细胞分泌,从而能够促进血管新生及内皮细胞分化,参与外周动脉疾病的形成,导致

伤口生长缓慢,不易愈合。但糖尿病足患者是否随 Wagner 临床分级变化与血清 galectin-3 水平也变化相关还有待进一步验证。

### 参考文献

- [1] Jhamb S, Vangaveti VN, Malabu UH. Genetic and molecular basis of diabetic foot ulcers: clinical review[J]. J Tissue Viability, 2016, 25(4):229-236.
- [2] Yang W, Lu J, Weng J, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China[J]. N Engl J Med, 2010, 362(12):1090-1101.
- [3] Saccon F, Gatto M, Ghirardello A, et al. Role of galectin-3 in autoimmune and non-autoimmune nephropathies[J]. Autoimmun Rev, 2017, 16(1):34-47.
- [4] Wang L, Guo XL. Molecular regulation of galectin-3 expression and therapeutic implication in cancer progression[J]. Biomed Pharmacother, 2016, 78:165-171.
- [5] Chin CW, Djohan AH, Lang CC. The role of cardiac biochemical markers in aortic stenosis[J]. Biomarkers, 2016, 21(4):316-327.
- [6] Organization WH. Global report on diabetes[J]. Working Papers, 2016.
- [7] Prompers L, Huijberts M, Apelqvist J, et al. High prevalence of ischemia, infection and serious co-morbidity in patients with diabetic foot disease in Europe: baseline results from the Eurodiale Study[J]. Diabetologia, 2007, 50(1):18-25.
- [8] van der Hoeven NW, Hollander MR, Yildirim C, et al. The emerging role of galectins in cardiovascular disease[J]. Vasc Pharmacol, 2016, 81:31.
- [9] Tas F, Bilgin E, Tastekin D, et al. Clinical significance of serum galectin-3 levels in gastric cancer patients[J]. J Gastrointest Cancer, 2016, 47(2):182-186.
- [10] Shimura T, Shibata M, Gonda K, et al. Association between circulating galectin-3 levels and the immunological, inflammatory and nutritional parameters in patients with colorectal cancer[J]. Biomed Reports, 2016, 5(2):203-207.
- [11] Aksan G, Gedikli Ö, Keskin K, et al. Is galectin-3 a biomarker, a player-or both-in the presence of coronary atherosclerosis? [J]. J Investig Med, 2016, 64(3):764-770.
- [12] Yilmaz H, Cakmak M, Inan O, et al. Increased levels of galectin-3 were associated with prediabetes and diabetes: new risk factor? [J]. J Endocrinol Invest, 2015, 38(5):527-533.
- [13] Jin QH, Lou YF, Li TL, et al. Serum galectin-3: a risk factor for vascular complications in type 2 diabetes mellitus[J]. Chinese Med J-Peking, 2013, 126(11):2109-2115.
- [14] Li P, Liu S, Lu M, et al. Hematopoietic-derived galectin-3 causes cellular and systemic insulin resistance[J]. Cell, 2016, 167(4):973.
- [15] Pugliese G, Iacobini C, Ricci C, et al. galectin-3 in diabetic patients [J]. Clin Chem Lab Med, 2014, 52(10):1413-1423.

收稿日期:2017-10-09