

Galectin-3 抑制剂体外筛选方法的建立及评价

马春晓¹, 邢肖伟¹, 侯少聪¹, 何淑旺², 颜世强², 李平平^{1*}

(1. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050;

2. 山东达因海洋生物制药有限公司, 山东 威海 264333)

摘要: 半乳糖凝集素-3 (galectin-3, Gal-3) 属于 β 半乳糖苷酶结合凝集素家族, 具有特异性结合半乳糖的特性。通过 C 端糖蛋白结合区 (carbohydrate recognition domain, CRD), Gal-3 可结合糖基化胰岛素受体 (insulin receptor, IR) 的半乳糖苷链, 从而抑制 IR 信号通路, 导致胰岛素抵抗, 被视为治疗胰岛素抵抗和 2 型糖尿病的潜在药物作用靶点。本研究根据 Gal-3 结合糖基化蛋白半乳糖苷链的特性, 设计了一种简便的 Gal-3 抑制剂筛选模型。在大肠杆菌表达 Gal-3 蛋白, 经纯化后, 用异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 修饰, 获得 Gal-3-FITC。Gal-3-FITC 自发绿色荧光, 与表面表达有大量糖蛋白的人胰腺癌细胞 (PANC-1) 孵育后, PANC-1 细胞带有荧光信号。若待测化合物有 Gal-3 抑制活性, 则该化合物可降低 Gal-3-FITC 与细胞的结合, 从而降低 PANC-1 细胞荧光信号。通过荧光信号变化可评价 Gal-3 抑制剂的抑制强度。进一步研究表明, 该筛选模型简易稳定, 具有良好重复性, Z' 因子在 0.7 和 0.85 之间。本研究采用 FITC 标记 Gal-3 的方式在 PANC-1 细胞上用荧光强度反映 Gal-3 和糖蛋白的结合水平, 构建了 Gal-3 抑制剂的高通量筛选模型。

关键词: 半乳糖凝集素-3; 糖基化; 筛选; 慢性炎症; 异硫氰酸荧光素

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)01-0156-06

Establishment and evaluation of *in vitro* galectin-3 inhibitor screening model

MA Chun-xiao¹, XING Xiao-wei¹, HOU Shao-cong¹, HE Shu-wang², YAN Shi-qiang²,
LI Ping-ping^{1*}

(1. State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 2. Shandong DYN Marine Biopharmaceutical Co., Ltd., Weihai 264333, China)

Abstract: Galectin-3 (Gal-3) belongs to the galectin family and is specific in binding β -galactoside. Through its C-terminal domain, Gal-3 binds to the galactoside group of the glycosylated insulin receptor (IR) and inhibits IR signaling pathway, which leads to the insulin resistance. Thus, Gal-3 is a potential therapeutic target for the treatment of insulin resistance and type 2 diabetes. Here we report a simple Gal-3 screening model based on the property that Gal-3 binds to the galactoside. We expressed and purified human Gal-3 in *Escherichia coli* (*E. coli*), and labeled it with fluorescein isothiocyanate (FITC) *in vitro*. After incubating FITC labeled Gal-3 (Gal-3-FITC) with PANC-1 cells, which express glycosylated membrane protein, PANC-1 cells started to show green fluorescent signal due to the Gal-3-FITC binding to the glycosylated membrane protein. Gal-3 inhibitor disrupts the binding of Gal-3-FITC and PANC1 cells, subsequently leads to the decrease of the fluorescent signal in PANC-1 cells. We can

收稿日期: 2022-03-21; 修回日期: 2022-05-19.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81770800); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程 (2021-I2M-1-016); 中国医学科学院中央级公益性科研院所基本科研业务费 (2018RC350004); 北京高校卓越青年科学家计划项目 (BJJWZYJH01201910023028).

*通讯作者 Tel: 86-10-50927273, E-mail: lipp@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0342

evaluate the inhibitory efficiency of Gal-3 inhibitors through measurement of the fluorescent signal. Further studies show this model is simple, stable, and repeatable with a Z' factor between 0.7 and 0.85. In sum, we have successfully established an *in vitro* high-throughput screening model for Gal-3 inhibitors.

Key words: galectin-3; glycosylation; screening; chronic inflammation; fluorescein isothiocyanate

肥胖导致的胰岛素抵抗是代谢综合征最重要的病理症状^[1]。胰岛素抵抗使胰岛素靶器官对胰岛素的敏感性下降,胰岛素无法维持糖脂代谢平衡^[2],从而导致糖尿病、高血脂等代谢性疾病的发生。目前认为,慢性炎症是连接肥胖和胰岛素抵抗的重要因素。肥胖状态下,胰岛素靶器官如脂肪组织中巨噬细胞浸润远高于正常情况^[3],这些巨噬细胞在脂肪酸、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 等刺激下分泌 MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1)、IL (interleukin)-1 β 和 IL6 等细胞因子引起局部慢性炎症^[4]。慢性炎症导致胰岛素抵抗的发生^[5]。Li 等^[6]发现巨噬细胞分泌的半乳糖凝集素-3 (galectin-3, Gal-3) 是导致胰岛素抵抗的关键分子,可直接结合胰岛素受体 (insulin receptor, IR) 并改变 IR 的信号通路。

Gal-3 属于凝集素家族,拥有 C 端糖蛋白结合区 (carbohydrate recognition domain, CRD), 可特异性结合含有半乳糖苷的糖链^[7]。糖基化的 IR 与 Gal-3 结合后,磷酸化受到抑制,导致 IR 下游的 Akt (protein kinase B) 磷酸化水平降低,细胞利用葡萄糖的能力下降。在高脂饮食喂养诱发的胰岛素抵抗肥胖小鼠中, Gal-3 的表达水平显著提高,敲除 Gal-3 可改善小鼠的糖代谢及胰岛素抵抗。这说明 Gal-3 除了提供炎症环境募集巨噬细胞外^[8],还可直接通过与 IR 的结合促进胰岛素抵抗,是一个潜在的治疗胰岛素抵抗新靶点。抑制 Gal-3 和 IR 的结合可直接改善胰岛素抵抗,并有望改善小鼠体内的炎症环境^[9]。

Kakehi 等^[10]建立了一种 Gal-3 筛选模型,根据其结合半乳糖苷的特性,设计了共价结合异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 的糖链分子探针^[11]。小分子的 FITC 糖链探针不具有各向异性。当 Gal-3 和糖链探针结合时, Gal-3-探针复合物的分子质量远大于 FITC 糖链探针,在溶液中的自旋速度变慢,从而具有了各向异性,在荧光偏振实验中表现较高的 mP (millipolarization units) 值。若化合物阻断 Gal-3 与荧光糖链探针的结合,则糖链分子各向异性降低,荧光偏振实验中的 mP 值也会下降,根据荧光偏振的变化即可筛选 Gal-3 抑制剂。但此方法有一定局限性,如 FITC 糖链探针的合成较难、荧光偏振检测需具有偏振光路的酶标仪,限制了这一筛选方法的广泛使用。

本研究建立了一种新的 Gal-3 抑制剂筛选方法,纯化表达了 Gal-3 蛋白并标记 FITC,获得了带有绿色荧光的 Gal-3 (Gal-3-FITC)。Gal-3-FITC 与细胞表面糖蛋白结合,采用酶标仪即可检测到细胞绿色荧光信号的升高。细胞经待测化合物处理后,若细胞绿色荧光信号下降,则表明该化合物可能为 Gal-3 抑制剂。

材料与方法

试剂与耗材 DMEM 培养基、RPMI-1640 培养基、胎牛血清 (16000-044) (Gibco 公司); Gal-3 抑制剂 Cpd47 (1,4-disubstituted triazoles, Merck 公司); 异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG)、二硫苏糖醇 (DTT) (上海捷瑞生物工程有限公司); Hoechst 33342 染色液、卡那霉素 (北京索莱宝科技有限公司); 乳糖、Na₂CO₃、NaHCO₃、NH₄Cl (国药集团化学试剂有限公司); DMSO (Sigma 公司); 96 孔黑色底透细胞培养板 (3603, Corning 公司); 凝胶层析脱盐柱 (GE Healthcare PD-10, GE 公司)。

仪器 荧光显微镜 (Zeiss 公司, Vert A1); 细胞培养箱 (Panasonic 公司, MCO-170AICUVL-PC); 多功能酶标仪 (Biotek 公司, Synergy H1); 恒温振荡器 (精骐公司, IS-RDD3); 手持超声破碎仪 (美国 Sonic & Materials, Inc. 公司)。

细胞、质粒与菌株 PANC-1 和 AsPC-1 细胞购自 ATCC 细胞库,培养于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中,并进行传代。PANC-1 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM。AsPC-1 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640。人源 Gal-3 基因由细胞 cDNA 中克隆得到,克隆号为 3958。pET28a 空表达载体由中国医学科学院卢多实验室赠予。BL21 (DE3) pLysS 空表达菌株购自天根公司。

Gal-3 的表达和纯化 采用大肠杆菌表达系统胞内表达 Gal-3,按照文献^[12]方法进行纯化。将 pET28a+hGal3 质粒载体转化到 BL21 (DE3) pLysS 大肠杆菌,获得表达菌株。在 25 °C 培养条件下,用 0.8 mmol·L⁻¹ IPTG 诱导 Gal-3 蛋白,表达 20 h。

收集菌体并超声破碎大肠杆菌细胞,离心收集含 Gal-3 的上清液至新离心管。由于有活性的 Gal-3 可特异性结合乳糖,因此采用乳糖-琼脂微球亲和层析方法纯化 Gal-3 蛋白,获得折叠为正确结构并拥有结合乳糖

活性的Gal-3。用含5%甘油的磷酸盐缓冲液(PBS)清洗微球后,用含0.1 mol·L⁻¹乳糖的PBS将Gal-3洗脱下来,透析除去乳糖,浓缩蛋白保存于-80℃备用。

制备FITC标记的Gal-3 按照每毫克蛋白加入20 μg FITC的比例在0.1 mol·L⁻¹ Na₂CO₃/NaHCO₃缓冲液(pH 9.6)中加入纯化的Gal-3蛋白和1 mg·mL⁻¹的FITC-DMSO溶液,4℃过夜反应后,加入50 mmol·L⁻¹ NH₄Cl溶液终止反应。用凝胶层析脱盐柱除去未结合在蛋白上的FITC。标记FITC的Gal-3蛋白呈黄绿色。取1 μL检测蛋白溶液在280 nm的吸光度(A₂₈₀)值,根据Gal-3蛋白分子质量(26 152 g·mol⁻¹)和消光系数(35 870 L·mol⁻¹·cm⁻¹),按公式(1)计算蛋白浓度。

$$\text{蛋白浓度} = A_{280} \times (26\ 152\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}) / (35\ 870\ \text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}) \quad (1)$$

Gal-3抑制剂筛选方法建立 将PANC-1细胞按每孔2×10⁴个铺于96孔板中。以0.01% DMSO为阴性对照,0.1 mol·L⁻¹乳糖或10 μmol·L⁻¹ Gal-3抑制剂Cpd47为阳性对照,加入细胞孔孵育过夜。每孔加入终浓度为2 μmol·L⁻¹的Gal-3-FITC,于37℃、5% CO₂培养箱孵育2、3 h后用PBS洗3次,于酶标仪读取490 nm/525 nm荧光值。PANC-1细胞膜表面蛋白糖基化程度高,可作为Gal-3结合的底物。在抑制剂存在时,Gal-3-FITC优先与抑制剂结合,从而无法结合在细胞上,在PBS清洗过程中被洗去。根据公式(2)计算化合物抑制率。

$$\text{化合物抑制率}(\%) = 1 - (F_{\text{化合物}} - F_{\text{乳糖}}) / (F_{\text{DMSO}} - F_{\text{乳糖}}) \quad (2)$$

其中, $F_{\text{化合物}}$ 、 $F_{\text{乳糖}}$ 、 F_{DMSO} 分别为加入待测化合物的细胞孔、加入乳糖或其他抑制剂的细胞孔、加入DMSO阴性对照的细胞孔的荧光信号。

Z'因子评价筛选模型 Z'因子反映筛选信号的动态范围和数据的离散程度,能反映筛选方法的可靠性,按照公式(3)计算。

$$Z' \text{因子} = 1 - 3 \times (\sigma_{\text{阳性对照}} + \sigma_{\text{阴性对照}}) / |\mu_{\text{阳性对照}} - \mu_{\text{阴性对照}}| \quad (3)$$

其中, σ 为标准差, μ 为平均值。当Z'因子在0.5~1时,说明筛选方法可靠。

统计学分析 数据均以均值±标准误($\bar{x} \pm \text{SEM}$)表示,采用t-检验进行显著性检验。以 $P < 0.05$ 为具有统计学差异。

结果

1 人Gal-3蛋白的表达与纯化

纯化蛋白的分子质量约为27 kD(图1A),与文献^[12]中Gal-3的大小一致。将细菌裂解液、糖结合柱洗脱液和纯化Gal-3浓缩液进行SDS-PAGE(sodium dodecyl

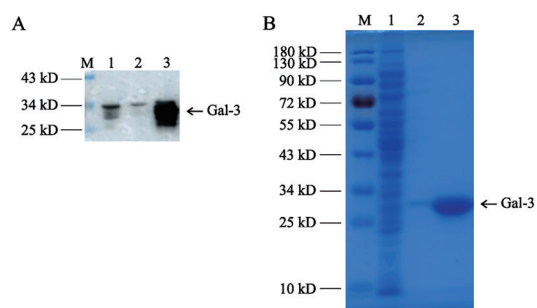


Figure 1 The expression and purification of human galectin-3 (Gal-3). A: The purified protein of Gal-3 is confirmed by Western blot assay; B: The Coomassie blue-staining. 1: *Escherichia coli* (*E. coli*) lysates with Gal-3 over-expression lysates; 2: The wash buffer of Gal-3 binding agarose beads; 3: Gal-3 after lactose elution; M: Marker

sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) 凝胶电泳,考马斯亮蓝染色后,用ImageJ软件进行灰度分析(图1B),Gal-3纯度为92%。

2 确定荧光蛋白Gal-3-FITC的最佳反应浓度

为探索最适Gal-3-FITC浓度,进行了Gal-3-FITC浓度梯度实验。PANC-1细胞铺板后,分别加入0.25、0.5、1、2 μmol·L⁻¹的Gal-3-FITC,于细胞培养箱孵育2 h后,使用多功能酶标仪测定结合在细胞表面的Gal-3-FITC的荧光值。在0.25和0.5 μmol·L⁻¹ Gal-3-FITC孵育下,FITC的荧光信号增加约3~5倍。当Gal-3-FITC的浓度高于1 μmol·L⁻¹时,结合在细胞表面的Gal-3-FITC荧光值显著升高,其中1 μmol·L⁻¹ Gal-3-FITC使PANC1细胞荧光信号增强约10倍;2 μmol·L⁻¹ Gal-3-FITC使PANC1细胞荧光信号增强约20倍(图2A、B)。

乳糖是Gal-3的天然抑制分子,高浓度乳糖可竞争结合于Gal-3的CRD,从而破坏Gal-3和糖蛋白的结合。用0.1 mol·L⁻¹乳糖孵育细胞后,分别加入1和2 μmol·L⁻¹ Gal-3-FITC进行孵育,检测细胞荧光强度(图2C)。结果表明,0.1 mol·L⁻¹乳糖对1、2 μmol·L⁻¹的Gal-3-FITC都有很强抑制作用。计算单独加入Gal-3-FITC和同时加入乳糖的荧光强度比值,发现1 μmol·L⁻¹ Gal-3-FITC实验组的乳糖抑制效果更好(图2D)。镜下观察可看到,在加入乳糖后,细胞表面结合的Gal-3-FITC大幅下降(图2E)。因此,最终将Gal-3-FITC的筛选浓度定为1 μmol·L⁻¹。

3 Gal-3抑制剂Cpd47抑制Gal-3-FITC与PANC-1细胞的结合

Cpd47是一个含有半乳糖苷的寡糖化合物,具有较高的Gal-3抑制活性,其与Gal-3的 K_d 为0.029 μmol·L⁻¹^[13]。如图3所示,PANC-1细胞与Cpd47孵育后,再加入Gal-3-FITC,Cpd47处理组荧光信号显著下降,荧光显微镜

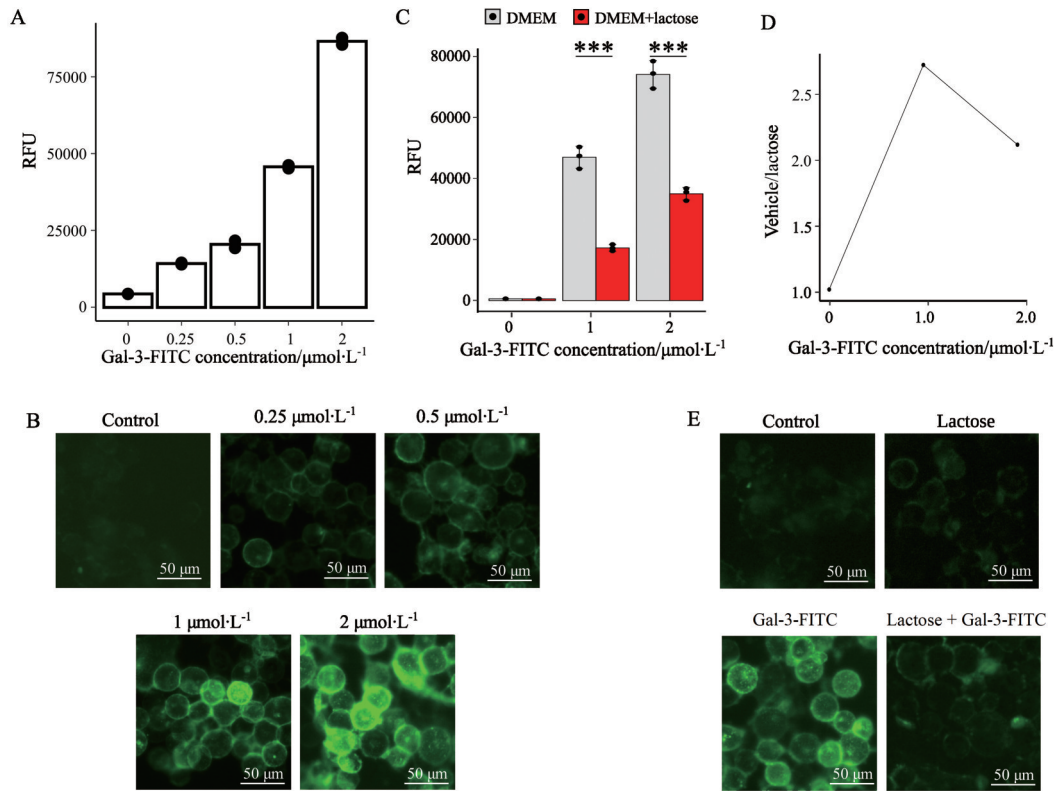


Figure 2 Dose dependent effect of Gal-3-fluorescein isothiocyanate (FITC) on the fluorescence in PANC-1 cells. A: The fluorescence of PANC-1 cells incubated with Gal-3-FITC (0–2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 2 h; B: The fluorescent image of PANC-1 cells incubated with Gal-3-FITC (0–2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 2 h; C: The fluorescence of PANC-1 incubated with Gal-3-FITC (0–2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of lactose; D: The ratio of fluorescence between vehicle and 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ lactose in PANC-1 with Gal-3-FITC treatment (0, 1 and 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); E: The fluorescent image of PANC-1 treated with control, 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ lactose, 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Gal-3-FITC, and both. Scale bar: 50 μm . $n = 2-3$, $\bar{x} \pm$ standard error of the mean (SEM). *** $P < 0.001$. RFU: Relative fluorescence units

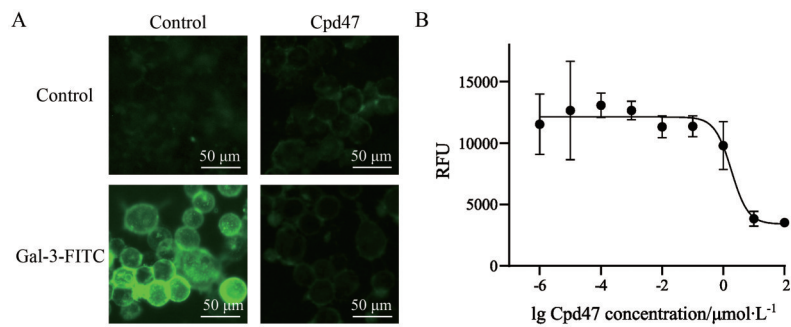


Figure 3 Gal-3 inhibitor 1,4-disubstituted triazoles (Cpd47) impaired the binding of Gal-3 with glycosylated proteins in PANC-1 cells. A: Fluorescence of Gal-3-FITC in PANC-1 cells with 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of Cpd47 treatment; B: The inhibition curve of Cpd47 in PANC-1 cells. Scale bar: 50 μm . $n = 3$, $\bar{x} \pm$ SEM

下观察发现细胞上的绿色荧光明显降低(图3A),说明Cpd47抑制了Gal-3-FITC与PANC-1细胞的结合。采用不同浓度的Cpd47处理细胞后,荧光信号的强度和Cpd47的浓度呈反比(图3B)。根据抑制率计算Cpd47的 IC_{50} 为0.82 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。以上结果说明,结合Gal-3-FITC后的细胞荧光强度可反映抑制剂的抑制效果,该模型适合Gal-3抑制剂的筛选。

4 Gal-3抑制剂筛选模型的评价

为了评价该筛选方法的可靠性,计算Z'因子。以Cpd47为阳性对照,0.01% DMSO为阴性对照,分别计算阳性对照和阴性对照的抑制率、组内平均值和标准差,得到Z'因子。采用此筛选方法进行了25次平行实验,将每次的阳性对照和阴性对照进行统计分析和计算,发现Z'因子分布在0.7~0.85(图4A),提示此筛选

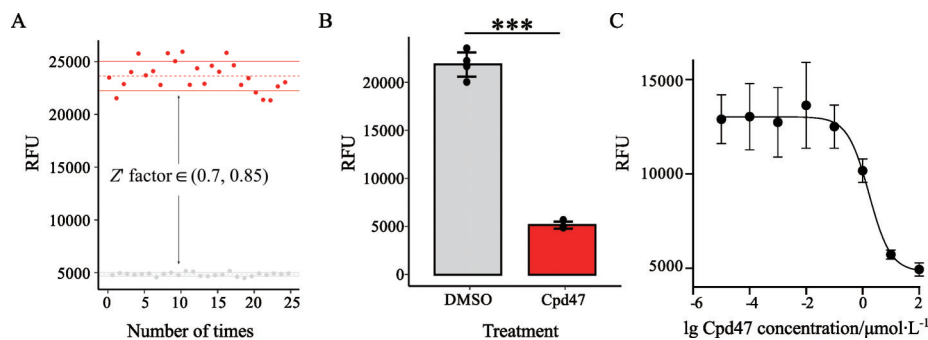


Figure 4 Evaluation of Gal-3 inhibitor screening model. A: Z' factor of Gal-3 inhibitor screening model in PANC-1 cells; B: Cpd47 ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) inhibited the binding of Gal-3-FITC and AsPC-1 cells; C: The inhibition curve of Cpd47 in AsPC-1 cells. $n = 4$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$. *** $P < 0.001$

模型具有良好的重复性。

在本筛选模型中, PANC-1 细胞为糖基化蛋白的供体。本研究还采用另一种细胞系人转移腺癌细胞 (AsPC-1) 进行了实验, Cpd47 也同样抑制 Gal-3-FITC 和 AsPC-1 的结合 (图 4B), AsPC-1 细胞荧光值与 Cpd47 浓度成反比 (图 4C), Cpd47 的 IC_{50} 为 $1.699 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。这一结果与在 PANC-1 细胞上的结果近似。以上结果表明本筛选模型可灵活运用于多种细胞。

讨论

本研究建立了一个新的 Gal-3 抑制剂筛选模型。该筛选模型利用 Gal-3 可特异性结合糖基化蛋白上的半乳糖苷糖基链的特性进行设计, 基于抑制剂可打断 Gal-3-FITC 和糖基化蛋白结合, 从而改变荧光信号强度的原理来筛选化合物。

目前基于蛋白质相互作用的高通量筛选方法众多, 如 FRET^[14] 或 Biacore^[15] 等方法评价小分子或大分子与靶蛋白的相互作用, 这些方法的前提是获得有活性的蛋白质。就 Gal-3 而言, 其表达和纯化方法成熟, 但 Gal-3 的结合蛋白均为糖基化蛋白, 在原核表达系统无法完成蛋白糖基化过程, 故获得有活性的 Gal-3 结合蛋白难度增大。真核细胞能完成蛋白糖基化并转运到相应部位如细胞膜。本筛选方法利用这一特点, 直接在细胞系上筛选抑制 Gal-3 与糖基化蛋白结合的化合物。在这种情况下, 只要膜上蛋白有半乳糖苷糖链就能与 Gal-3 结合, 因此本筛选模型简单且并不局限于某一特定的靶蛋白。同时, 该筛选模型可在 PANC-1 和 AsPC-1 细胞上展开, 提示该方法灵活且可扩展到多种细胞系。

为定量分析 Gal-3 与受体蛋白的结合, 对 Gal-3 进行了 FITC 修饰, 使得修饰后的 Gal-3 能带有自发绿色荧光。当 Gal-3-FITC 结合在细胞表面时, 其所发出荧光信号即可通过酶标仪定量。细胞表面的荧光信号和 Gal-3-FITC 的浓度呈正相关, Gal-3 的抑制剂剂量依赖

性降低细胞表面的荧光信号, 说明该筛选方法能分析 Gal-3 和糖基化蛋白的结合程度, 符合筛选要求。而且根据不同筛选目的, 该方法还适用于高内涵筛选。但需要注意的是, 进行高内涵筛选时, 在读取信号前, 应彻底清洗没有结合在细胞表面的 Gal-3-FITC, 避免假阴性。

综上所述, Gal-3 是潜在的药物靶点, 现有的 Gal-3 筛选模型均基于荧光小分子被蛋白大分子结合后荧光偏振增大这一原理设计。由于荧光偏振的检测需特殊的荧光光路、被 Gal-3 结合的荧光小分子不易得到等原因, 这种筛选方法的应用推广受到了很多限制。因此为了克服上述方法的局限, 本研究用细胞系建立了通过检测普通荧光信号的 Gal-3 抑制剂筛选模型, 该方法简便易行, 适用 96 孔板操作, 重复性好, 结果可靠。

作者贡献: 马春晓负责筛选模型的建立和评测、数据整理和论文撰写; 邢肖伟完成了蛋白纯化和 FITC 标记; 侯少聪负责论文修改; 何淑旺和颜世强提供实验所需化合物; 李平平指导实验设计及论文撰写与修改。

利益冲突: 全体作者声明不存在任何利益冲突。

References

- [1] Ahmed B, Sultana R, Greene MW. Adipose tissue and insulin resistance in obese [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 137: 111315.
- [2] Wang K, Liu XF, Li PP. Advances in molecular mechanisms for enhanced hepatic lipogenesis in insulin resistance [J]. *Acta Pharm Sin (药学期刊)*, 2020, 55: 189-194.
- [3] Wentworth JM, Naselli G, Brown WA, et al. Pro-inflammatory CD11c⁺CD206⁺ adipose tissue macrophages are associated with insulin resistance in human obesity [J]. *Diabetes*, 2010, 59: 1648-1656.
- [4] Guzik TJ, Skiba DS, Touyz RM, et al. The role of infiltrating immune cells in dysfunctional adipose tissue [J]. *Cardiovasc Res*, 2017, 113: 1009-1023.
- [5] Menini S, Iacobini C, Blasetti Fantauzzi C, et al. Role of galectin-3 in obesity and impaired glucose homeostasis [J]. *Oxid Med*

- Cell Longev, 2016, 2016: 9618092.
- [6] Li P, Liu S, Lu M, et al. Hematopoietic-derived galectin-3 causes cellular and systemic insulin resistance [J]. Cell, 2016, 167: 973-984.e12.
- [7] Zhang Z, Miller MC, Xu X, et al. NMR-based insight into galectin-3 binding to endothelial cell adhesion molecule CD146: evidence for noncanonical interactions with the lectin's CRD β -sandwich F-face [J]. Glycobiology, 2019, 29: 608-618.
- [8] MacKinnon AC, Farnworth SL, Hodgkinson PS, et al. Regulation of alternative macrophage activation by galectin-3 [J]. J Immunol, 2008, 180: 2650-2658.
- [9] Johnson AMF, Hou S, Li P. Inflammation and insulin resistance: new targets encourage new thinking: galectin-3 and LTB₄ are pro-inflammatory molecules that can be targeted to restore insulin sensitivity [J]. Bioessays, 2017, 39: 1700036.
- [10] Kakehi K, Oda Y, Kinoshita M. Fluorescence polarization: analysis of carbohydrate-protein interaction [J]. Anal Biochem, 2001, 297: 111-116.
- [11] Sörme P, Kahl-Knutsson B, Huflejt M, et al. Fluorescence polarization as an analytical tool to evaluate galectin-ligand interactions [J]. Anal Biochem, 2004, 334: 36-47.
- [12] Hsu DK, Zuberi RI, Liu FT. Biochemical and biophysical characterization of human recombinant IgE-binding protein, an S-type animal lectin [J]. J Biol Chem, 1992, 267: 14167-14174.
- [13] Salameh BA, Cumpstey I, Sundin A, et al. 1*H*-1,2,3-Triazol-1-yl thiodigalactoside derivatives as high affinity galectin-3 inhibitors [J]. Bioorg Med Chem, 2010, 18: 5367-5378.
- [14] Liao J, Madahar V, Dang R, et al. Quantitative FRET (qFRET) technology for the determination of protein-protein interaction affinity in solution [J]. Molecules, 2021, 26: 6339.
- [15] Douzi B. Protein-protein interactions: surface plasmon resonance [J]. Methods Mol Biol, 2017, 1615: 257-275.