

유세포 분석기를 이용한 galectin-3에 의해 유도된 흉선세포의 apoptosis 분석

김 태 중 · 우 회 중

서울대학교 수의과대학
(1999년 12월 8일 접수)

Flow cytometric analysis of apoptosis in mouse thymocytes by galectin-3

Tae-jung Kim, Hee-jong Woo

*Laboratory of Immunology, Department of Microbiology,
College of Veterinary Medicine, Seoul National University*

(Received Dec 8, 1999)

Abstract : Galectin-3 plays an important role in cell development, differentiation and cancer metastasis, including cell-cell/extracellular matrix (ECM) interactions and is supposed to have an effect of apoptosis on T-cells in thymic clonal selection. In this study, to know the effect of galectin-3 on thymocyte development, we used recombinant human galectin-3 (rHgal-3) from *Escherichia coli*, JM105, which was inserted with human gal-3 gene-transformed plasmid vector (prGal-3) to express human galectin-3. Expressed rHgal-3 was confirmed by western blot using the culture supernatant of hybridoma (M3/38) producing monoclonal antibody to human galectin-3. Sepharose gel affinity chromatography was used to purify the expressed rHgal-3. Thymocytes and hepatocytes from 6-week-old male BALB/c mice were incubated with rHgal-3 and showed marked increase of apoptotic population on analysis using flow cytometry with 7-AAD in a dose-dependent manner. However, rHgal-3 failed to induce apoptosis on hepatocytes. Interestingly, this apoptotic effect was not inhibited by lactose, a specific lectin domain inhibitor. From these results, we concluded that extrinsic galectin-3 induces apoptosis on mouse thymocytes, and galectin-3 may have an apoptotic effect on T-cells in thymic clonal selection.

Key words : galectin-3, apoptosis, thymocytes, negative selection, FACS.

서 론

Galectin은 family를 이루고 있는 S-type β -galactosyl binding lectin으로서 세포성장, 부착 및 이동에 관여한다 (Barondes *et al*, 1994). Galectin의 기본구조는 해면체에 서부터 사람을 포함한 포유류에 이르기까지 진화상 매우 잘 보존되어 있다. Galectin family 중에서 gal-3는 carbohydrate binding protein 35(CBP-35), a low affinity IgE binding protein 그리고 Mac-2 등으로 불려졌으며 thioglycolate로 유도된 macrophage(Ho and Springer, 1982)에서 처음 분리되었으며 세포와 세포 그리고 세포와 세포간 기질과의 상호작용, 종양화, 암 전이에 중요한 역할을 하며 최근에는 prion mRNA에 결합하는 단백질임이 밝혀졌다. 또한 signal sequence없이 핵, 세포질, 세포외강에서 발현되며 분자수준에서 보면 쥐, mouse, hamster 그리고 사람간에 80% 이상의 homology가 있다(Mehul *et al*, 1994). Gal-3은 두 개의 큰 domain으로 나뉘는데 C-terminal half는 galectin family의 공통적인 부분으로 galactose 잔기에 결합하는 특성(carbohydrate binding domain, CBD)이 있고 N-terminal half는 proline, glycine이 많은 구조로 nuclear ribonucleoprotein(hnRNP) complex와 구조가 비슷하다.

Gal-3은 macrophages, dendritic cells, alveolar cells, Kuffler cells(Liu *et al*, 1993; Flotte *et al*, 1983; Haines *et al*, 1983; Nabarra and Papiernik, 1988) 같은 탐식세포 및 장, 신장, 폐 및 흉선상피에서 발현된다(Oda *et al*, 1993; Brassart *et al*, 1992; Lotz *et al*, 1993; Lindstedt *et al*, 1993; Huflejt *et al*, 1997).

한편 galectin family 중에서 galectin-1은 활성화된 T-세포와 흉선세포의 apoptosis를 유도하는 것으로 알려져 있고(Perillo *et al*, 1995, 1997), galectin-9도 흉선세포의 apoptosis를 유도하는 것으로 밝혀졌다(Wada *et al*, 1997). 그러나 이들과 유사한 구조를 지닌 gal-3는 이러한 현상을 일으키지 못하고 오히려 apoptosis를 억제하는 경향이 있는 것으로 생각되어 왔으나 흥미롭게도 이러한 연구에서는 *in vitro* 상에서 외부에서 투여한 galectin-1과 -9가 T-세포의 apoptosis를 유도하였던 것이기에 galectin의 paracrine으로써의 작용을 추정한 것이었고, anti-apoptosis의 기능을 보인 gal-3는 세포 내에서 과발현시켜 관찰한 결과이었기에 이러한 결과는 gal-3의 종양세포 내에서의 intracrine 또는 autocrine의 방식으로 작용하는 것으로 보

인다. 이러한 현상은 bcl-2의 BH1 domain에 있는 NWGR motif와 gal-3의 C-terminus와의 homology로서도 설명되어 왔다. 이에 본 실험은 지금까지의 galectin-1과 -9의 경우와 마찬가지로 recombinant gal-3을 *in vitro* 상에서 흉선세포에 투여함으로써 gal-3가 paracrine으로써 흉선세포에 미치는 영향을 알아보고자 수행되었다. 본 실험에서의 정량적 분석을 위하여 flow cytometry를 이용하여 흉선세포의 apoptosis 분석에 사용되는 7-amino actinomycin D(7-AAD)를 활용하였다(Donner *et al*, 1999; Schmid *et al*, 1994).

재료 및 방법

rHgal-3의 발현 및 정제 : Gal-3의 mRNA로부터 만들어진 cDNA를 증폭시키면서 EcoRI과 HindIII 절단부위를 갖게 하고 두 개의 효소로 자른 다음 prokaryotic expression vector인 pTrc99A에 삽입한 후 Ausubel *et al*(1995)에 준하여 heat shock이 방법으로 template *E coli* JM105에 transformation 시켰다(prGal-3).

prGal-3을 100 μ g/ml의 ampicillin이 함유된 LB agar plate (2% agar가 첨가된 LB broth)에서 overnight/37 $^{\circ}$ C 배양 후 5ml의 LB broth에서 증식시키고 마지막으로 이것을 500 ml의 broth에서 배양하여 600nm에서의 흡광도가 0.5에 이를 때까지 더 배양하고 isopropyl-1-thio- β -D-galactopyroside (IPTG, BIO-RAD)를 1mM 농도로 첨가후 4시간 더 배양하였다. 배양액을 원심분리 후 pellet을 4 $^{\circ}$ C의 PBS로 3회 washing 하고 30ml의 lysis buffer(Ochieng *et al*, 1993; 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% SDS, 50mM Tris, pH 8.0, 0.241 unit/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml pepstatin, 0.2 mM PMSF, 2mM DTT)를 첨가후 현탁시켰다. 현탁액을 probe-type ultrasonicator(Vibra-cell, Sonics and Materials)를 이용하여 총 3분간 충격을 가해 세포용해를 시키고 이를 20,000g/30min으로 원심분리하여 상층액을 사용하였다. 상층액을 affinity column을 이용하여 gal-3만을 분리하는데 column은 asialofetuin을 cyanogen bromide-activated Sepharose 4B(Sigma)에 결합시킨 것을 사용하였다. Column에 binding한 gal-3은 10배 volume의 phosphate buffer로 2번 washing 후 0.4M lactose와 2mM DTT가 첨가된 PBS로 elution 하고 protein assay kit(BIO-RAD)를 이용하여 protein의 농도를 측정하고 순도를 SDS-PAGE와 western blotting을 이용하여 측정하였다. 이 sample을 10⁶ volume의 증류수

그리고 10 volume의 RPMI-1640으로 4℃에서 투석하여 실험에 사용하였다.

한편 negative control로서의 vehicle은 실험에 사용한 gal-3 시료에서 immunoaffinity chromatography를 이용하여 특이적으로 gal-3을 제거한 sample을 사용하였다. Immunoaffinity chromatography를 위하여서는 protein A/G affinity column(BioRad)에 anti-rHgal-3 단클론항체를 결합한 후 여기에 준비된 sample을 통과시켜 gal-3을 제거시킨 것을 사용하였고 경우에 따라서는 적정농도의 BSA를 첨가하여 protein 농도에 대한 control로서 사용하였다(Kim and Woo, 1997).

전기영동 및 Western blotting : SDS-PAGE는 12% polyacrylamide separating gel과 3% stacking gel을 사용하였고 5× sample buffer(2% SDS, 14.4mM 2-Mercaptoethanol, 25% glycerol, 60mM Tris, 0.1% bromophenol blue)를 첨가 5분간 가열후 loading 하였다. 전기영동후 gel은 PVDF membrane으로 transfer 시켰고 blocking solution(PBS, 3% BSA)으로 2시간처리 후 1차항체에 2시간 그리고 3회 washing 후 2차 항체(peroxidase-conjugated goat anti-rat IgG, Pierce)로 1시간처리 후 0.03% H₂O₂, 0.06% diaminobenzidine를 함유한 50mM Tris(pH 7.6) 용액으로 발색하였다.

1차 항체로서는 gal-3에 대한 단클론항체를 생산하는 M3/38 hybridoma의 배양상층액을 사용하였다.

흉선세포와 간세포의 rHgal-3 처리후 apoptosis 측정: 6주령의 BALB/c mice(Charles-River, Korea)를 희생시켜 흉선세포와 간세포를 얻었다. 흉선세포에 rHgal-3을 1, 2, 4, 8μM 농도로 첨가후 12시간 배양하고 DNA-staining fluorescein dye인 7-AAD를 1μg/ml농도로 첨가후 30분/4℃ 배양하였다. 염색된 세포들은 flow cytometry (FACSCalibur, Becton-Dickinson)를 이용하여 7-AAD의 형광을 채널2에서 측정함으로써 apoptosis를 측정하였고, apoptosis의 정량적 분석을 위하여 Cell Quest program (Becton-Dickinson)을 이용하였다.

한편 4μM rHgal-3을 첨가한 sample에 galectin family CBD에 특이적 inhibitor인 lactose(10, 20, 40, 80mM)를 첨가하여 apoptosis 유도효과에 대한 competitive inhibition test를 행하였다. Control로서는 rHgal-3 대신에 4μM BSA를 첨가하여 사용하였다.

결 과

발현된 rHgal-3는 asialofetuin affinity chromatography를 이용하여 정제하였다. rHgal-3은 생리적 gal-3가 보여주는 특징적인 double band를 보이면서 30kDa 부근에서 발견되었고, immunoaffinity chromatography를 이용하여 rHgal-3을 제거시킨 negative control에서는 특이적 band가 관찰되지 않았다(Fig 1).

Fig 1. rHgal-3 expression on transformed *E coli* JM 105. Western blot with anti-gal-3 monoclonal antibody. Lane 1 molecular weight marker(arrow; 30kDa), lane 2: *E coli* extracts for rHgal-3, lane 3; elutes of immunoaffinity chromatography using *E coli* extracts from asialofetuin column.

이렇게 작성한 rHgal-3을 1, 2, 4, 8μM의 농도로 mouse 흉선세포에 투여하고 12시간 배양후 7-AAD를 이용하여 DNA를 염색하여 apoptosis 정도를 측정하였다. Fig 2에서 보는 바와 같이 7-AAD의 농도의 변화에 수반되어 흉선세포에서 초기 apoptotic distribution이 증가하다가 고농도에서는 후기 apoptotic distribution으로 변화함을 볼 수 있었다. 하지만 흉선세포만을 배양한 것(a)과 vehicle control(b)에서는 이러한 변화를 볼 수 없었다.

한편 이러한 rHgal-3에 의한 흉선세포에서의 apoptosis 유도가 특이적인 것임을 확인하기 위하여 시료의 비특이적 삼투효과에 대한 검증을 위하여 BSA를 protein control로 사용하였고 또한 간 실질세포를 같은 조건에서 실험하여 gal-3에 의한 apoptosis가 유도되지 않음을 확인함으로써 gal-3의 apoptosis는 흉선세포 특이적임을 확인한 결과는 Fig 3에서 보여주고 있다. 본 실험에서는 BSA를 rHgal-3와 같은 농도인 4μM의 농도로 첨가하여 rHgal-

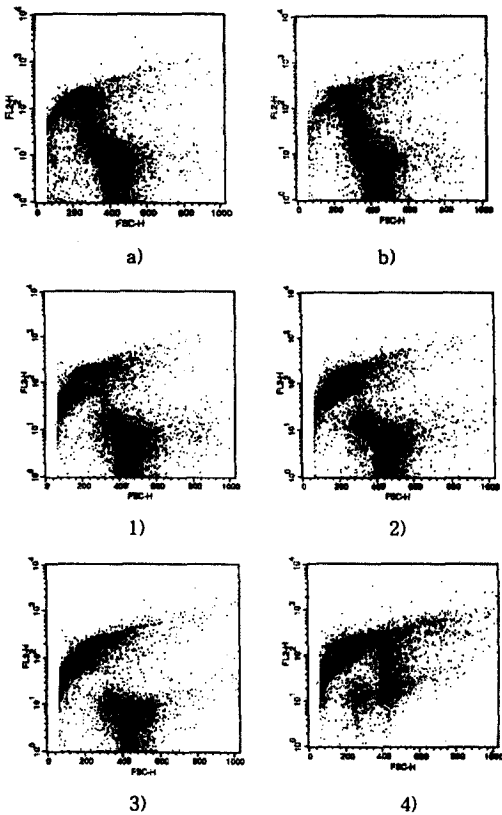


Fig 2. Dose-dependent apoptosis of thymocytes by gal-3. Thymocytes were incubated with rHgal-3 for 12hr. a) thymocytes, b) vehicle control, 1-4) with 1, 2, 4, 8 μ M of rHgal-3 each.

3으로 처리할 때와 같은 방법으로 apoptosis 유도여부를 측정하였으나 BSA로는 예상한 바와 같이 apoptosis가 유도되지 않았으며 동일조건에서 간세포에서도 apoptosis가 거의 유도되지 않아 rHgal-3에 의한 흉선세포에서의 apoptosis는 특이적인 반응임을 시사하였다.

이러한 결과와 더불어 흉선세포에서의 apoptosis가 gal-3의 어느 부분에 의한 것인지를 알아보기 위하여 4 μ M의 rHgal-3을 첨가후 lactose를 첨가하였으나 apoptosis에 대한 억제효과는 관찰되지 않아 본 실험에서 보여주는 gal-3의 thymocyte에 대한 apoptosis 유도는 gal-3의 lectin domain에 의한 것이 아님을 알 수 있었다.

고찰

지금까지 외인성 galectin-1과 -9는 흉선세포에 대해 apoptosis를 유도할 수 있음이 밝혀졌으나 내인성으로 종양세

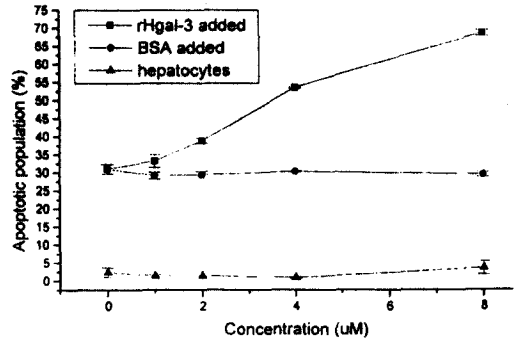


Fig 3. Control experiments of gal-3 effects. Same number of hepatocytes were used for the cell type control, and BSA was added to thymocytes for the protein control. Cells were incubated for 12h at 4 $^{\circ}$ C.

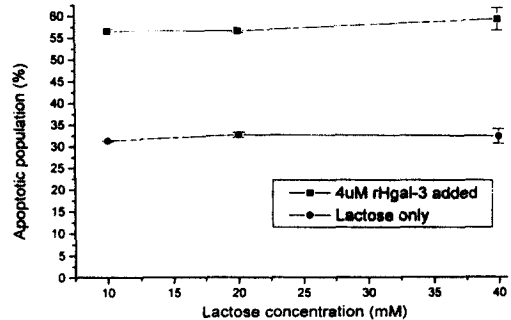


Fig 4. Lactose inhibition of gal-3 in apoptosis of thymocytes. Each concentration of lactose were added to the hHgal-3(4 μ M) treated thymocytes.

포주 내에서 과발현시킨 gal-3은 apoptosis를 억제함이 보고되어 있다. 그러나 본 연구에서는 외부로부터의 gal-3의 작용양상을 확인하기 위하여 유전자재조합 gal-3을 외부로부터 첨가하여 처리한 mouse 흉선세포로부터 galectin-1이나 -9의 경우와 마찬가지로 apoptosis가 유도되는 것을 flow cytometry를 통한 분석으로 관찰할 수 있었다. Galectin family간의 CBD의 homology를 고려해 볼 때 내인성 과발현이 아닌 외부에서 투여된 gal-3이 다른 galectin family member들처럼 흉선세포에서 apoptosis를 유도함은 family 내에서의 homology를 고려할 때 놀라운 사실은 아닌 것으로 판단된다.

또한 gal-3이 BH-1 domain의 NWGR motif 뿐만 아니라 hnRNP와의 homology가 있음을 볼 때 gal-3의 세포질 내에서의 기능이나 효과는 mRNA의 degradation과 관련된 것으로 생각할 수 있다. 예를 들어 gal-3은 pre-mRNA

substrate와 PrP mRNA splicing에 관여하며(Schröder *et al*, 1994; Dagher *et al*, 1995), HeLa 세포의 핵추출물에서 pre-mRNA와 복합체를 형성함이 밝혀져 있다(Dagher *et al*, 1995). Gal-3의 anti-apoptosis 효과는 지금까지 C-terminus의 NWGR motif와 BCL-2의 BH-1 domain의 NWGR motif와의 homology로 설명되어 왔다(Yang *et al*, 1996). 뿐만 아니라 이러한 점은 gal-3의 mutagenesis study로부터 gal-3도 bcl-2나 ced-9처럼 anti-apoptosis의 효과가 NWGR motif 내의 glycine 잔기에 의해 조절됨이 보고되어 있어서 이러한 사실을 더욱 강력히 뒷받침하고 있다(Akahani *et al*, 1997). 그러나 NWGR motif 만을 놓고 볼 때 이것은 anti-apoptosis 물질로 잘 알려진 bcl-2 family member 중의 하나이면서 apoptosis를 유도하는 물질인 Bax에서도 공통적으로 나타나는 부분이다. 결국 NWGR motif와의 homology는 최소한 이러한 motif를 지닌 물질들이 apoptosis에 관련된 물질임을 시사하는 것으로서 apoptosis의 증가 및 억제 그 어느 방향으로 작용할 것인지에 대한 예측과는 별도의 것임을 시사한다. 따라서 본 실험의 결과도 동일물질이 어떠한 microenvironments에서 작용하는가에 따라 그 생리작용은 달리 나올 수 있음을 보여주는 결과로 생각한다. 이러한 생리물질에서는 특정 microenvironments 상태에서 결합하는 ligands가 무엇이나에 따라 나타나는 생리적 결과가 다를 수 있는 것으로 예상되고 있다. 이러한 것을 고려할 때 세포막, 세포질, 핵에 존재하는 gal-3은 multifunctional molecule인 IL-1과 마찬가지로 특징적인 signal peptides 없이도 세포 바깥으로 분비되는 점이 특징적이다(Woo, 1993).

Gal-3은 탐식세포 및 상피세포에서 분비되는 것으로 보아(Liu *et al*, 1995; Flotte *et al*, 1983; Haines *et al*, 1983; Nabarra and Papiernik, 1988) paracrine으로서의 기능이 예상되고 있으며 본 실험에서의 연구는 이러한 부분을 밝히는 일환이 될 수 있다. 본 실험에서의 연구결과에 이어서 필요한 다음 연구로는 이렇듯 외인성으로 첨가된 paracrine으로서의 gal-3의 apoptosis 유도기전을 밝히는 것이 될 것이다. 특히 이 작용이 표적세포의 세포막에 있는 특이적인 ligand와 결합후 2차적인 신호전달 체계를 자극하여 일어나는 것인지 아니면 비특이적인 pore-like channel을 형성하는 것인가에 대하여 검토되어야 될 것이다. 이러한 실험과 더불어 gal-3과 결합하는 특이적인 ligands를 밝히는 것도 필요하다.

지금까지 밝혀진 gal-3의 ligand들은 대부분 CBD와 관

련이 있는 laminin(Woo *et al*, 1991), lysosome-associated membrane proteins 1 및 2(Inohara and Raz, 1994), Mac-2-binding protein(Inohara *et al*, 1996) 그리고 carcinoembryonic antigen(Ohannesian *et al*, 1995) 등이었으며 이들의 결합은 CBD에 특이적인 lactose에 의해 결합이 억제되었다. 그러나 본 실험에는 lactose에 의하여 흉선세포에 대한 apoptosis가 영향을 받지 않았기에 이러한 효과는 gal-3의 CBD에 의한 것이 아니고 N-terminus와 같은 다른 domain에 의한 것임을 알 수 있었다. 이와같은 관찰로서 Wells와 Mallucci는 mouse β -galactoside-binding protein (gal-1)에 의한 mouse embryonic fibroblast cells에 대한 cytostatic effect가 lactose에 의해 차단되지 않음을 보고하였고, galectin family에서의 CBD 이외의 다른 domain의 기능 및 효과에 대한 가능성이 현재 검토되고 있다(Mey A *et al*, 1996).

본 연구에서는 apoptosis analysis에 사용한 DNA staining dye로써 7-AAD를 사용하였다(Donner *et al*, 1999). 7-AAD는 그 크기가 정상적인 세포막을 통과하기에는 너무 크지만 apoptosis 등으로 세포막에 변화가 있어 세포막이 열리면 세포내의 DNA의 G-C base pair와 결합을 할 수 있고 그러므로써 세포의 형광도를 증가시키는데 이는 주로 apoptosis나 세포괴사일 때 관찰이 된다(Schmid *et al*, 1994). 그리고 최근에는 초기 apoptosis와 후기 apoptosis를 규정하기 위해 Annexin-V와 7-AAD 또는 Annexin-V와 PI를 혼합하여 반응시킴으로써 apoptosis에 대한 더 정확한 분석을 실시하고 있기에 본 연구에서의 apoptosis 결과는 이와같이 two dye double staining에 의하여 좀더 자세히 분석될 수 있을 것으로 판단된다.

본 실험에서의 결과로부터 외인성 gal-3이 mouse 흉선 세포에 대해 apoptosis를 유도하며 이러한 효과는 CBD에 의한 것이 아님을 알 수 있었고 이는 흉선에서의 T-cell education 과정에서의 gal-3의 기능에 대하여 시사하는 바가 크다. 흉선에서의 T-cell education 과정 중에서 thymic selection에 대한 분자수준에서의 설명은 아직 미비한 상황이지만, 본 실험의 결과는 흉선 상피세포나 탐식세포 또는 dendritic cells 등에서 분비되거나 세포 표면에 제시된 thymic gal-3이 흉선세포에 대한 negative selection에 기여하는 물질일 수 있음을 시사하고 있으며, 이러한 가능성은 앞으로 gal-3에 대한 ligands 규명 등의 실험을 통하여 밝혀져야 할 것이다.

결 론

1. 외인성 gal-3은 농도의존적으로 흉선세포에서 특이적인 apoptosis를 유도한다.
2. 이러한 흉선세포에서의 apoptosis는 gal-3의 lectin domain에 의해 유도되지 않음이 시사되었다.
3. 이러한 결과는 흉선에서 gal-3이 T-cell education 과정 중 negative selection에 관여할 것임을 시사하고 있다.

참 고 문 헌

1. Akahani S, Nangia-Makker P, Inohara H, *et al.* Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family. *Cancer Res*, 57:5272-5276, 1997.
2. Ausbel F, Brent R, Kingston RE, *et al.* Introduction of plasmid DNA into cells, *Short protocols in molecular biology*, 3rd ed, Wiley, 1:21-23, 1995.
3. Barondes SH, Cooper DNW, Gitt MA, *et al.* Galectins, Structure and fuction of a large family of animal lectins. *J Biol Chem*, 269:20807-20810, 1994.
4. Dagher SF, Wang JL, Patterson RJ. Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92:1213-1217, 1995.
5. Donner KJ, Becker KM, Hissong BD, Ahmed SA. Comparison of multiple assays for kinetic detection of apoptosis in thymocytes exposed to dexamethasone or diethylstilbesterol. *Cytometry*, 35:80-90, 1999.
6. Harrison FL, Wilson TJG. The 14kDa β -galactose-binding lectin in myoblast and myotube culture: Localization by confocal microscopy. *J Cell Sci*, 101:635-646, 1992.
7. Ho MK, Springer TA. Mac-2, a novel 32,000Mr mouse macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies. *J Immunol*, 128:1221-1228, 1982.
8. Inohara H, Raz A. Idetification of human melanoma cellular and secreted ligands for galectin-3. *Biochem Biophysic Res Comm*, 201:1366-1375, 1994.
9. Inohara H, Akahani S, Kohts K, *et al.* Interactions between galectin-3 and Mac-2-binding protein mediate cell-cell adhesion. *Cancer Res*, 56:4530-4534, 1996.
10. Kim BG, Woo HJ. Expression and characterization of the recombinant human galectin-3. *Kor J Vet Res*, 37: 547-554, 1997.
11. Lindstedt R, Apodaca G, Barondes SH, *et al.* Apical secretion of a cytosolic protein by Mardin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem*, 286:11750-11757, 1993.
12. Liu FT, Hsu DK, Zuberi RI, *et al.* Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. *Am J Pathol*, 147:1016-1028, 1995.
13. Mehul B, Bawumia S, Martin SR, *et al.* Structure of baby hamster kidney carbohydrate-binding protein CBP 30, an S-type animal lectin. *J Biol Chem*, 189:18250-18258, 1994.
14. Mey A, Leffler H, Hmama Z, *et al.* The animal lectin galectin-3 interacts with bacterial lipopolysaccharides via two independent sites. *J Immunol*, 156:1572-1577, 1996.
15. Ohannesian DW, Lotan D, Thomas P, *et al.* Carcinoembryonic antigen and other glycoconjugates act as ligands for galectin-3 in human colon carcinoma cells. *Cancer Res*, 55:2129-2199, 1995.
16. Perillo NL, Pace KE, Seilhamer JJ, *et al.* Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature*, 378:736-739, 1995.
17. Perillo NL, Uittenbogaart CH, Nguyen JT, *et al.* Galectin-1, an endogenous lectin produced by thymic epithelial cells, induces apoptosis of human thymocytes. *J Exp Med*, 185:1851-1858, 1997.
18. Schmid I, Uittenbogaart CH, Keld B, *et al.* A rapid method for measuring apoptosis and dual-color immunofluorescence by single laser flow cytometry. *J Immunol Methods*, 170:145-157, 1994.
19. Wada J, Ota K, Kumar A, *et al.* Developmental regulation, expression, and apoptotic potential of galectin-9, a β -galactose binding lectin. *J Clin Invest*, 99: 2452-2461, 1997.
20. Woo HJ. Secretion of macrophage differentiation antigen, Mac-2. *Kor J Immunol*, 15:61-68, 1993.
21. Woo HJ, Korzellius CA, Steele GD, *et al.* Carbohydrate-

binding-protein 35 is the major cell-surface laminin-binding protein in colon carcinoma. *Arch Surg* , 126: 1498-1502, 1991.

22. Yang RY, Hsu DK, Liu FT. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* , 93:6737-6742, 1996.