

# LOX 在肿瘤中的研究进展

高国政 王瑞琳(审校)

作者单位:300051 天津市,天津市胸科医院病理科(高国政)

300211 天津市,天津医院病理科(王瑞琳)

肿瘤的浸润和转移是恶性肿瘤最主要的生物学特征,涉及肿瘤本身的生物学特性、宿主环境及基因变异等一系列复杂过程,直接影响肿瘤患者的预后。肿瘤转移是许多癌症患者死亡的主要原因,目前已证实缺氧与肿瘤转移密切相关,缺氧的肿瘤细胞具有高侵袭性、转移性及耐药性,导致转移性肿瘤难以治愈。赖氨酰氧化酶(lysyl oxidases, LOX)是一种能够催化细胞外基质(extracellular matrix, ECM)蛋白(如胶原蛋白和弹性蛋白)交叉连接的关键酶,能够增强组织的稳定。最新研究<sup>[1]</sup>表明,LOX 具有调控细胞的增殖和分化,调节细胞的黏附和趋化运动等新功能。而 LOX 在不同的肿瘤组织和肿瘤细胞株中的表达有着显著的差异,LOX 在不同的肿瘤中可能发挥不同的作用,其既是肿瘤抑制因子,也可能具有促进肿瘤侵袭和转移的作用。LOX 在肿瘤的进展中扮演着十分重要的角色。因此,进一步研究及阐明 LOX 的作用机制对揭示肿瘤生物学特性、提高肿瘤的治疗效果可能具有一定的帮助。本文就 LOX 在肿瘤中的研究进展作一综述。

## 1 LOX 的结构

自 1968 年一种被称为 LOX 的分泌性酶活性被首次公布后,便引起科学界对这种酶的极大兴趣。到目前为止,科学界已鉴定了 4 种人赖氨酰氧化酶样蛋白(human lysyl oxidase-like1, hLOXL),分别是 hLOXL1、hLOXL2、hLOXL3 和 hLOXL4,从而建立了含有 5 个成员(LOX, hLOXL1~hLOXL4)的 LOX 基因家族。这个酶家族成员都含有两个高度保守的区域(见图 1),第一个区域位于 N 末端,含有四个组氨酸,为铜结合部位;第二个区域位于 C 末端,含有酪氨酸残基,为催化区域,可以与赖氨酸残基一起参与形成赖氨酰酪氨酰基。LOX 基因家族成员都含有 N 末端的信号肽区域,对 LOX 的分泌起到非常重要的作用,这个区域是多变的。这种 N 末端的信号肽区域的差异决定了不同的 LOX 家族成员具有不同的功能和组织分布。

铜结合部位

催化区域

LOX WEVHWSCHQHYH.....DIDCQWIDHIVQPGNY

图 1 LOX 功能结构域

## 2 LOX 的生物学特性

LOX 最主要的功能是氧化交联细胞外胶原和弹性蛋白,并在衰老和疾病过程中修复 ECM。ECM 是存在于组织中,由细胞合成并分泌至胞外的成分,包括纤维性成分(胶原蛋白、弹性蛋白和网织蛋白)、连接蛋白(纤维黏连蛋白、层黏连蛋白)和空间填充分子(主要为糖胺聚糖)等,其对细胞增殖和分化发挥重要调控作用。胶原纤维和弹性蛋白可在 LOX 的作用下形成共价交联,交织成稳定的网状结构,抵抗非特异性的蛋白水解酶所引起的弹性蛋白分解和胶原溶解<sup>[2]</sup>。LOX 基因可抑制肿瘤转移,可能是通过直接促进 ECM 黏连,使肿瘤 ECM 僵化变硬,阻止肿瘤细胞向周围组织的侵袭和远处转移。但 LOX 极度高表达的情况下,ECM 高度交联,也可以激活体内相关信号通路,促进肿瘤侵袭转移,发展恶化<sup>[3]</sup>。LOX 是一种趋化因子,它可以使细胞(如血管平滑肌细胞等)发生趋化反应,也可以增强血小板源性生长因子 BB(platelet derived growth factor-BB, PDGF-BB)的趋化活性。其原因可能是 LOX 可以氧化特定的细胞膜表面蛋白,如血小板源性生长因子受体 b,从而增强 PDGF-BB 诱导的趋化反应<sup>[4]</sup>。

## 3 LOX 与肿瘤的发生

肿瘤的发生是一个多步骤的过程。细胞发生完全恶性转化,一般需要多个基因的改变,例如数个癌基因的激活和(或)肿瘤抑制基因的失活。大量的研究<sup>[5-9]</sup>表明,LOX 在多种恶性肿瘤以及相应的细胞株中表达具有明显差异,迄今为止,LOX mRNA 和(或)LOX 蛋白表达下调已经在基底细胞癌、结肠癌、胰腺癌、支气管肺癌、头颈部鳞状细胞癌和前列腺癌等多种肿瘤中被检测到。在人转化性细胞系中,包括黑色素瘤、绒毛膜癌、SV40 病毒转化的细胞系、H-ras 原癌基因转化的大鼠胚胎成纤维细胞和 H-ras 原癌基因转化的小鼠 NIH-3T3 成纤维细胞(RS485 细胞),LOX 基因的转录水平大大降低<sup>[10]</sup>。综上所述,LOX 在肿瘤中表达降低可能是导致恶性肿瘤发生的原因之一,同时亦表明 LOX 具有抑制肿瘤的作用。但是,有文献<sup>[11]</sup>报道在肾癌和食管癌中 LOX 表达却成上调趋势,而且体外实验<sup>[12]</sup>发现,人乳腺癌细胞系中 LOX 通过促进癌细胞迁移而加剧肿瘤恶化。这些迹象又说明 LOX 不具

有肿瘤抑制功能。对于 LOX 的肿瘤抑制功能所产生的分歧,可能是 LOX 的这一功能因细胞种类不同而不同,还可能是癌细胞中 LOX 过度表达是在抑制癌细胞中的过度增殖,仍然在发挥肿瘤抑制功能。LOX 抑制肿瘤作用的机制:LOX 能够抑制原癌基因(Ras)的转化活性,因而又被称为 Ras 剪切基因(Rrg)。LOX 的下调或失活则促进细胞生长的信号传导蛋白 Ras 基因 12 号密码子 GGC 发生单个碱基置换,成为 GTC,导致 Ras 蛋白的 12 号氨基酸(甘氨酸)变为缬氨酸。突变的 Ras 蛋白阻碍 GTP 的水解作用,GTP 不能水解为 GDP,因此一直处于活性状态,造成永久的信号通路。这种突变的 Ras 蛋白不受上游信号控制,持续促进细胞增殖。在细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)通路中,活化的 Ras 首先激活蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶(Raf),后者再激活 MEK(Raf/MAPK-ERK 激酶)。MEK 具有双重特性,它既能使 ERK 上的一个酪氨酸磷酸化,又能使一个邻近的苏氨酸磷酸化。通过这些磷酸化激活的 ERK 再磷酸化激活下游效应分子,包括转录因子,如 c-jun、c-fos、c-myc。这些转录因子促进细胞周期基因的转录。有学者<sup>[13]</sup>指出,LOX 表达下调或失活可激活磷脂酰肌醇 3 和丝氨酸/苏氨酸蛋白以及促使丝裂原活化蛋白活化来激活 NF- $\kappa$ B,从而细胞转化为癌细胞。在人体的各种肿瘤中,启动子甲基化是导致基因失活的最常见机制之一。有相关报道<sup>[14]</sup>指出,胃癌中 LOX 的表达水平具有下调趋势,并且 LOX 失活是由于基因甲基化以及杂合度丧失造成的,一旦加入甲基转移酶抑制剂,LOX 会增强表达。

#### 4 LOX 与肿瘤的侵袭和转移

虽然 LOX 促进肿瘤转移的机制尚未完全明确,但是目前已经明确肿瘤组织中氧含量的降低是促进肿瘤转移的主要原因之一。这是因为肿瘤细胞的生长和分裂速度增快导致耗氧量增加,致使肿瘤区域性缺氧。肿瘤缺氧的微环境将引起一系列基因表达的变化,导致肿瘤发生、恶性转化甚至转移。Denko 等<sup>[15]</sup>通过缺氧基因的微点阵研究发现,LOX 的表达与人类肿瘤细胞缺氧有关。进一步的研究<sup>[16]</sup>发现 LOX 的启动子具有一个规范的功能性的缺氧应答元件,低氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor, HIF-1)通过这个缺氧应答元件可以在 mRNA 水平诱导 LOX 的表达上调。现已证实 HIF 可以引起上皮-间质转化并改变肿瘤细胞新陈代谢,如上调己糖激酶、血管新生、侵袭凋亡。HIF-1 促进 LOX 酶活性增加,而高水平的 LOX 使头颈部肿瘤和雌激素受体耐受的乳腺癌更易转移,预后更差。只要抑制了细胞外 LOX 就能抑制肿瘤侵袭转移,LOX 对肿瘤的转移作用显著<sup>[15]</sup>。抑制 LOX 的人单克隆抗体已发展到临床前期。最近有研究<sup>[12]</sup>发现了一种新的肿瘤抑制剂 Pdcd4,它的过量表达能够逆转低氧诱导的乳腺癌细胞中 LOX 的表达,且这一逆转过程不依赖于 HIF-1。

目前已确定的是 LOX 可以抑制乳腺癌、黑色素瘤、胰腺

癌体外细胞侵袭。上述中阐述 LOX 能够增强缺氧肿瘤细胞的侵袭能力,可能是缺氧的体外肿瘤细胞发生侵袭的机制之一。通过免疫组化染色,在缺氧条件下,LOX 的表达会从肿瘤的缺氧中心延伸到周边的 ECM 而呈现较高水平。LOX 引起的 ECM 重构,是肿瘤细胞运动性增加发生侵袭转移的原因之一<sup>[16]</sup>。

Payne 等<sup>[17]</sup>的研究发现,缺氧条件下,活化的 LOX 通过过氧化氢介导的机制激活 FAK(focal adhesion kinase)/Src 信号通路来调节细胞黏附。当由纤维细胞合成并分泌出的相对分子质量为  $50 \times 10^3$ , LOX 酶原由 BMP-1 水解释放出相对分子质量为  $32 \times 10^3$  的活化 LOX 时,激活的 LOX 由细胞外基质进入到胞浆和细胞核,而 LOX 完全激活还需要铜结合区域结合铜离子和赖氨酸酪氨酸基区域结合赖氨酸基,然后赖氨酸基由胺氧化成醛,形成含有过氧化氢和氨水的副产物,过量的过氧化物促使 Src 激酶磷酸化和活化;随后,FAK 和 Src 产生一系列信号通路调节细胞黏附和移行。此外,活化的 LOX 也能通过与整合素及激活的由外向内的信号级联放大系统相互作用来调节 Src 产生信号通路。FAK 活化后产生各种信号通路,如 FAK-MAPK、FAK-PI-3K、FAK-STAT1 等,使细胞黏附下降、移行增强,并促进血管、淋巴管等生成来促进肿瘤侵袭转移。此外,活化的 FAK 通过激活纤维连接蛋白为微转移的肿瘤细胞生长提供一个“允许环境”<sup>[18]</sup>。总之,肿瘤转移的多步过程受到细胞与细胞、细胞与基质交互作用的直接微环境和肿瘤扩展微环境(例如血管化)的影响。临床上组织缺氧与肿瘤发生转移、预后差的患者有关,尽管这一过程尚未清楚。近年来,越来越多的证据显示缺氧增加肿瘤细胞的局部侵袭及转移潜力。

#### 5 展望

虽然很多人体实性肿瘤的基础理论、治疗原则已趋于成熟,但肿瘤仍是人类一直难以攻克的难题。近年来,肿瘤的生物治疗,即免疫治疗和基因治疗得到越来越多的重视。LOX 在肿瘤的发生、侵袭转移的绝大部分过程中均扮演重要角色,可能是体内外抗癌治疗的一个很好的靶因子,LOX 的靶向治疗结合手术、化疗、放疗等手段,将为恶性肿瘤的治疗提供新的方向。

#### 6 参考文献

- 1 Lucero HA, Ravid K, Grimsby JL, et al. Lysyl oxidase oxidizes cell membrane proteins and enhances the chemotactic response of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 2008, 283: 24103-24117.
- 2 Ng MR, Brugge JS. A Stiff Blow from the stroma: collagen crosslinking drives tumor progression. *Cancer Cell*, 2009, 16: 455-457.
- 3 Levental KR, Yu H, Kass L, et al. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell*, 2009, 139: 891-906.

4 Bouez C, Reynaud C, Noblesse E, et al. The lysyl oxidase LOX is absent in basal and squamous cell carcinomas and its knockdown induces an invading phenotype in a skin equivalent model. *Clin Cancer Res*, 2006, 12: 1463-1469.

5 Csiszar K, Fong SF, Ujfalvai A, et al. Somatic mutations of the lysyl oxidase gene on chromosome 5q23.1 in colorectal tumors. *Int J Cancer*, 2002, 97: 636-642.

6 Kaneda A, Wakeaono K, Tsukamoto T, et al. Lysyl oxidase is a tumor suppressor gene inactivated by methylation and loss of heterozygosity in human cancers. *Cancer Res*, 2004, 64: 6410-6415.

7 Woznick AR, Braddock AL, Dulai M, et al. Lysyl oxidase Expression in bronchogenic carcinoma. *Am J Surg*, 2005, 189: 297-301.

8 Rost T, Pyritz V, Rathke IO, et al. Reduction of LOX- and LOXL2-mRNA expression in head and neck squamous cell carcinomas. *Anti-cancer Res*, 2003, 23: 1565-1573.

9 Ren C, Yang G, Timme TL, et al. Reduced lysyl oxidase messenger RNA levels in experimental and human prostate cancer. *Cancer Res*, 1998, 58: 1285-1290.

10 Lucero HA, Kagan HM. Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function. *Cell Mol Life Sci*, 2006, 63: 2304-2316.

11 Sakai M, Kato H, Sano A, et al. Expression of lysyl oxidase is correlated with lymph node metastasis and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol*, 2009, 16: 2494-2501.

12 Santhanam AN, Baker AR, Hegamyer G. Pcd4 repression of lysyl oxidase inhibits hypoxia-induced breast cancer cell invasion. *Oncogene*, 2010, 29: 3921-3932.

13 Denko NC, Fontana LA, Hudson KM, et al. Investigating hypoxic tumor physiology through gene expression patterns. *Oncogene*, 2003, 22: 5907-5914.

14 Erler JT, Bennewith KL, Nicolau M, et al. Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature*, 2006, 440: 1222-1226.

15 Mack GS, Marshall A. Lost in migration. *Nat biotechnol*, 2010, 28: 214-229.

16 Cairns RA, Khokha R, Hill RP. Molecular mechanisms of tumor invasion and metastasis: an integrated view. *Curr Mol Med*, 2003, 3: 659-671.

17 Payne SL, Fogelgren B, Hess AR, et al. Lysyl oxidase regulates breast cancer cell migration and adhesion through a hydrogen peroxide-mediated mechanism. *Cancer Res*, 2005, 65: 11429-11436.

18 Erler JT, Giaccia AJ. Lysyl oxidase mediates hypoxic control of metastasis. *Cancer Res*, 2006, 66: 10238-10241.

(收稿日期: 2011-07-14)

(本文编辑: 李霖)

(上接第 173 页)

酞, 应考虑为心血管疾患的危险标志物。(B, 中)

**11.3** 测定尿白蛋白方法的分析 CV 应 < 15%。(B, 中)

**11.4** 尿白蛋白定性或半定量法凡能检出 > 95% 患者的尿蛋白者, 可用于筛查, 但为阳性时需经过认可实验室确定。(GPP)

**11.5** 目前应用的试纸法检测尿白蛋白的分析敏感度不够。(B, 中)

**11.6** 定时收集尿标本(12 或 24 h)可直接检测白蛋白浓度; 定时或非定时尿标本应检测白蛋白/肌酐比值。(B, 中)

**11.7** 适宜的留取尿标本的时间为清晨。为减少分析变异应在当日完成测定。患者在留尿前 2 h 不应进食, 但需饮水(即不减少尿量)。(GPP)

**11.8** 如尿白蛋白浓度 < 30 mg/g 肌酐, 且估算肾小球滤过率(glomerular filtration rate, eGFR) > 60 ml/(min · 1.73m<sup>2</sup>)者, 则与心血管疾病的高危无关。如高血压患者的尿蛋白 ≥ 30 mg/g 肌酐, 且 eGFR < 60 ml/(min · 1.73m<sup>2</sup>), 应在年内复验以确定此种改变。(A, 中)

## 12 其他可能具有重要性的检验

**12.1** 常规测定胰岛素、C 肽或胰岛素原对 DM 患者一般无作用。对 1 型或 2 型 DM 的鉴别大多靠临床表现和后续病程, 此类检验只适用于研究。有时对可疑病例测血清 C 肽有助于鉴别 1 型和 2 型 DM, 例如 2 型 DM 患者出现酮中毒时。(B, 中)

**12.2** 测定血清胰岛素对评价患者的心血管病的危险性无作用。此测定值不能改变对患者的治疗方法。(B, 中)

**12.3** 由于目前胰岛素测定的共通性不好, 需要标准化的敏感的方法以支持其在临床实践中的应用。(GPP)

**12.4** 尚无已发表的证据支持胰岛素抗体的测定能常规地用于 DM 患者的诊治。(C, 极低)

摘译自 Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, et al. Executive summary: guidelines and recommendation for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clin Chem*, 2011, 57: 793-798.

(收稿日期: 2011-07-14)

(本文编辑: 杨军)