

类赖氨酰氧化酶 2 与肿瘤关系研究进展

李才营 吴鸣宇

类赖氨酰氧化酶 2 (lysyl oxidase-like 2, LOXL2) 于 1997 年被发现, 是赖氨酰氧化酶 (LOX) 家族成员之一。近年来, 国内外有文献报道在多种恶性肿瘤细胞株中 LOXL2 表达升高, 基因水平上调, 被认为在肿瘤的发生及发展过程中扮演了重要的角色。是否可以用 LOXL2 作为肿瘤预测及判断预后的一个新的标志物仍需更多实验验证支持。本文将从 LOXL2 与赖氨酰氧化酶家族、肿瘤关系及前景等方面做一综述。

一、LOXL2 与赖氨酰氧化酶家族

赖氨酰氧化酶是一类铜依赖性胺氧化酶, 具有催化细胞外基质交联的作用。赖氨酰氧化酶家族有 5 个成员, 包括: LOX、LOXL1、LOXL2、LOXL3、LOXL4。每个成员在其高度保守的羧基端均含有一个铜离子结合位点和细胞因子样受体区域, 对胺氧化酶的活性有明显影响^[1]。但 N-端却不保守, 特别是 LOXL2、LOXL3、LOXL4 基因, 它们的 N-端包括 4 个富含半胱氨酸的清道夫受体领域 (SRCR), 有研究表明 SRCR 参与了某些外分泌及受体蛋白的蛋白-蛋白相互作用, 但具体作用目前尚未明了^[2]。Kim 等^[3]通过敲除不同数目的 LOXL2 基因 N-端的 SRCR 区域, 得到一系列重组的 LOXL2 基因, 并测得重组细胞表达的胺氧化酶的荧光强度没有明显差异, 同样与 LOXL2 结构类似的 LOXL4 基因敲除 SRCR 区域亦不影响胺氧化酶活性, 表明 LOX 家族胺氧化酶活性与其 SRCR 区域无明显关系。实验同时发现 LOXL2 胺氧化酶活性不能被 BAPN 抑制, BAPN 是赖氨酰氧化酶不可逆转的酶活性抑制剂, 拥有和胶原蛋白及弹性蛋白相似的 CH₂-CH₂-NH₂ 的结构, 易与 LOX 的赖氨酰残基结合从而发挥抑制效果, 提示 LOXL2 的结构及作用方式与 LOX 不同, 对基因结构更深入的研究有助于进一步阐明两者的不同。

LOX 基因家族的成员有不一样的功能及细胞定位。已经证实 LOX 和 LOXL1 作为细胞外酶参与了细胞外基质稳态的调节, 使用特异性抗体对培养的细

胞和组织进行免疫荧光分析提示 LOXL2 是定位在细胞质和核周的内分泌性酶, 其过度表达可诱导上皮细胞向间叶细胞转化 (EMT) 的完整过程。而同样的实验分析 LOXL3 过度表达只能诱导部分的 EMT, LOXL4 过表达甚至不能检测到 EMT 相关的标志物。

二、类赖氨酰氧化酶 2 与肿瘤的关系

LOXL2 因在衰老的纤维母细胞中过表达而首次被发现, 基因定位于 8p21.2 ~ p21.3^[4]。高侵袭性肿瘤中 LOXL2 的表达明显高于非侵袭性肿瘤, 表明 LOXL2 在肿瘤的侵袭过程中发挥一定的作用。Kirschmann 等^[5]首先报道了在乳腺肿瘤演进过程中有 LOXL2 的参与, 此后 LOXL2 在多种肿瘤组织和细胞中被检测到表达异常, 目前研究比较清楚的是 LOXL2 在乳腺癌、鳞状细胞癌等肿瘤发生发展过程的促进作用。

1. LOXL2 与乳腺癌: LOXL2 通过引起 EMT 过程来促进肿瘤细胞的迁徙。Akiri 等^[6]将经过处理后稳定表达 LOXL2 及未处理不表达 LOXL2 的低侵袭/无转移能力的 MCF-7 乳腺癌细胞分别注射到正常裸鼠中, 观察发现两组皆诱发生雌激素依赖性肿瘤, 但仅处理组肿瘤细胞能够突破肿瘤的假包膜进入到周围血管、神经及肌肉组织中, 认为 LOXL2 可促进乳腺癌细胞的迁徙过程。

Brekman 等^[7]检测到经处理后在 MCF-7 及 MDA-MB-231 细胞中过表达的 LOXL2 促使受体活性修饰蛋白-3 (RAMP-3) 的表达升高, 在 LOXL2 表达受抑制而 RAMP-3 表达正常的 MDA-MB-231 细胞仍具有波纹蛋白的表达, 同时能促进肿瘤的侵袭及发展; LOXL2 表达正常而 RAMP-3 表达受抑制的 MDA-MB-231 细胞却丧失了促进肿瘤侵袭及发展的作用。由此他们认为 RAMP-3 是 LOXL2 的下游调控产物, LOXL2 促肿瘤发生发展可能部分由于 RAMP-3 的作用, 提示 RAMP-3 可能作为一个抗肿瘤发生的作用位点。

Wang 等^[8]发现 CD73 基因在 LOXL2 基因转染的乳腺癌细胞中表达水平下降, 而在胰腺癌及其他实

作者单位: 214023 南京医科大学附属无锡市人民医院肝胆外科

通讯作者: 吴鸣宇, 副主任医师, 电子信箱: wmyok@163.com

体肿瘤中表达升高。乳腺癌中 CD73 的表达水平与肿瘤新生血管的形成、侵袭性、转移性及病人的更短期生存率相关,可能是通过它的底物—腺苷发挥作用的。腺苷同样可以促进肿瘤细胞的迁徙、促进新生血管的形成、增加肿瘤的血供并且拮抗化疗作用。另外一个表达水平降低的是 PAI-1 基因。PAI-1 基因在正常血管平滑肌细胞和肿瘤细胞的表达产物可抑制细胞凋亡,同时能促进肿瘤新生血管的形成及肿瘤细胞的增殖,被认为参与了 EMT 的过程,助推了肿瘤的迁徙^[9]。因此 CD73 及 PAI-1 基因被认为可以调节 LOXL2 的促侵袭能力。

2. LOXL2 与头颈部癌:研究表明 LOXL2 在乳腺癌、结肠癌、食道癌、胰腺癌、前列腺癌及头颈部癌细胞株中表达升高。头颈部癌,特别是鳞状细胞癌的患者 LOXL2 的高表达往往预示着预后差,生存率低^[10]。LOXL2 与转录因子 SNAI1 相互作用并在 EMT 的过程中起部分作用。沉默 LOXL2 或者 SNAI1 基因会阻断肿瘤的形成并且降低分化,但是两者在肿瘤侵袭过程的单独作用及在人类肿瘤中的表达仍处于未知状态^[11,12]。

为了进一步研究 LOXL2 和 SNAIL 在肿瘤形成过程中的作用,Peinado 等^[10]用免疫组化方式检测在人类喉鳞状细胞肿瘤及小鼠皮肤癌中的表达情况。结果表明,LOXL2 及 SNAIL 参与了 2 期模型小鼠皮肤癌变作用的恶性过程,而在 256 例人喉鳞状细胞癌中这两种蛋白的表达都与局部复发相关,同时分析 LOXL2 及 SNAIL 的高表达与生存率及无瘤生存率的关系,结果发现 LOXL2 的高表达导致生存率及无瘤生存率下降,而 SNAIL 则没有明显的作用。由此他们认为 LOXL2 可以作为人类喉鳞状细胞癌预后不良的一个标志物,但是没有得出 LOXL2 必须与 SNAIL 分开单独促进肿瘤的恶性进程。在肺鳞状细胞癌中亦有数据分析 LOXL2 mRNA 的高表达与不良临床结果紧密相关。

Chung 等^[13]发现 LOXL2 的表达升高与高度恶性的头颈部鳞状细胞癌有显著的相关性,对于高危人群可作为一个预防的生物标志物。以上研究表明 LOXL2 具有促进恶性肿瘤转移的潜能,但需要更进一步的研究来揭示这种机制。

3. LOXL2 与胰腺癌:LOXL2 基因是胰腺癌中特异性表达升高的基因之一。Felix 等^[14]选取 Panc1 和 MiaPaCa-2 两株胰腺癌细胞,Panc1 细胞表达 E-cadherin 和高水平的 SNAI1, MiaPaCa-2 细胞不表达

E-cadherin 但 SNAI1 表达水平高,且显示出高侵袭性生长。对这两株细胞进行 LOXL2 基因敲除后没有出现细胞表型的变化,但发现在 Panc1 细胞株中敲除 LOXL2 基因后出现 SLC7A11 基因的升高,后者已被证实在胰腺癌药物抵抗中发挥重要的重用^[15]。另一个升高的基因是 PEG10 基因,在肝细胞癌中升高的抗细胞凋亡的基因。两者的升高可能是 LOXL2 敲除后的一种补偿机制。此外还发现 LOXL2 参与了胰腺癌抵抗吉西他滨(一种抗肿瘤药物)的过程,因此 LOXL2 可能成为胰腺癌药物抵抗研究的新方向。

4. LOXL2 与其他肿瘤:既往研究认为 LOXL2 通过激活 Snail/E-cadherin 和 Src/FAK 通路来促进肿瘤的形成及侵袭过程。Liang 等^[16]通过对胃癌组织相关表达结果分析证实了 LOXL2 促进肿瘤侵袭是通过 Src/FAK 通路而不是 Snail/E-cadherin 通路,同时发现 LOXL2 特异性抗体作用后胃肿瘤的生长和转移明显受到抑制。因此,LOXL2 可能作为肿瘤转移预防及治疗的新目标。

缺氧被证明促进肿瘤的形成及导致药物抵抗,最近研究显示缺氧环境下 E-钙黏蛋白(E-cadherin)的表达受抑制,从而促进肿瘤的侵袭。这种抑制 E-钙黏蛋白表达的分子机制目前尚未明了,但有研究表明多种赖氨酰氧化酶参与到了其中。缺氧强烈诱导 LOX 及 LOXL2 基因的表达,Ruth 等^[17]发现同 LOX 一样,LOXL2 也是 HIF-1(缺氧诱导因子-1)的直接作用位点,表明在缺氧环境下,多种赖氨酰氧化酶的激活对于抑制 E-钙黏蛋白的表达是必须及充分的。实验充分验证了一个从缺氧到细胞形态转变的分子通路的假设,包括 HIF、LOX 及 LOXL2 的表达升高。因此 LOXL2 及其家族可能成为上皮起源的肿瘤的一个具有吸引力的分子靶点。

Youngho 等研究结果显示 LOXL2 及家族其他成员基因的表达水平升高与结直肠癌恶性腺瘤的位置、分期、分化状态、生长类型没有明显的相关性,但是与淋巴血管侵犯(LVI)的缺失有很强的联系,表明结直肠癌肿瘤周围的氧分压决定了这些基因的表达情况。

三、前 景

Hamilton 等^[18]描述了 LOXL2 在肿瘤及纤维化疾病的形成及发展的病理微环境中的作用。免疫组化及组织学方面的分析证实 LOXL2 特异性单克隆抗体 AB0023 有效的降低了肿瘤及纤维化疾病的发病率。AB0023 抑制生长因子和交叉联合胶原基质及 TGF- β 信号通路的形成,这种抑制疾病相关生长因子及有

效逆转纤维化建立的作用,使得 AB0023 治疗方案不同于其他的治疗方案。相比于 AB0023 有效的治疗效果,其他针对 VEGF 通路、胎盘生长因子、趋化因子 12 (CXCL12) 的治疗方案还没有报告显示对基质纤维化疾病有很好的效果。利用单克隆抗体抑制 LOXL2 的治疗方案显示出比较明显的优势:①LOXL2 在不同病变组织中的高表达相比较于正常组织中的低表达,使得 LOXL2 得以成为一个不同疾病的共同的病理基质间隔的靶点,一个遗传学上更加稳定的细胞类型的治疗靶点并减少了药物抵抗的机会^[20];②LOXL2 表达有效的 LOX 特异性 M64,提供了一个功能治疗的窗口;③AB0023 单克隆抗体抑制疾病相关生长因子,疾病生长因子的减少提供了更好的疾病修饰潜能。这种相比于低分子抑制剂更加针对及有效的抑制模式,可能成为肿瘤治疗的一种新方法。

四、总 结

目前研究显示 LOXL2 在肿瘤演进中扮演了关键的角色,对转染及敲除 LOXL2 的实验中发现了一些与 LOXL2 促进肿瘤发生及发展相关的基因,探讨这些基因对 LOXL2 的促肿瘤侵袭是否起协同作用有助于更深刻的理解肿瘤侵袭转移的发生及发展机制。能否将 LOXL2 的表达作为一个新的、独立的肿瘤预测及预后的判断指标仍需进一步研究。此外,LOXL2 特异性抗体治疗肿瘤及纤维化疾病成效初现,可能为肿瘤的治疗提供一种新思路。

参考文献

- Jung ST, Kim MS, Seo JY, *et al.* Purification of enzymatically active human lysyl oxidase (LOX) and lysyl oxidase-like protein (LOXL) from *Escherichia coli* inclusion bodies[J]. *Protein Expr Purif*, 2003, 31(2):240-246
- Hohenester E, Sasaki T, Timpl R. Crystal structure of a scavenger receptor cysteine-rich domain sheds light on an ancient superfamily[J]. *Nat Struct Biol*, 1999, 6(3):228-232
- Kim YM, Kim EC, Kim Y. The human lysyl oxidase-like 2 protein functions as an amine oxidase toward collagen and elastin[J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38(1):145-149
- Saito H, Papaconstantinou J, Sato H, *et al.* Regulation of a novel gene encoding a lysyl oxidase-related protein in cellular adhesion and senescence[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(13):8157-8160
- Kirschmann DA, Sefflor EA, Fong SF, *et al.* A molecular role for lysyl oxidase in breast cancer invasion[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(15):4478-4483
- Akiri G, Sabo E, Dafni H, *et al.* Lysyl oxidase-related protein-1 promotes tumor fibrosis and tumor progression in vivo[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(7):1657-1666
- Brekhan V, Lugassie J, Zaffiyar-Eilol S, *et al.* Receptor activity modifying protein-3 mediates the protumorigenic activity of lysyl oxidase-like protein-2[J]. *The FASEB J*, 2011, 25(1):55-65
- Wang L, Zhou X, Zhou T, *et al.* Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2008, 134(3):365-372
- Malo M, Charriere-Bertrand C, Chettaoui C, *et al.* The PAI-1 swing: microenvironment and cancer cell migration[J]. *C R Biol*, 2006, 329(12):919-927
- Peinado H, Moreno-Bueno G, Hardisson D, *et al.* Lysyl oxidase-like 2 as a new poor prognosis marker of squamous cell carcinomas[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(12):4541-4550
- Olmeda D, Jorda M, Peinado H, *et al.* Snail silencing effectively suppresses tumour growth and invasiveness[J]. *Oncogene*, 2007, 26(13):1862-1874
- Olmeda D, Moreno-Bueno G, Flores JM, *et al.* Snail is required for tumor growth and lymph node metastasis of human breast carcinoma MDA-MB-231 cells[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(24):11721-11731
- Chung CH, Parker JS, Ely K, *et al.* Gene expression profiles identify epithelial-to-mesenchymal transition and activation of nuclear factor- κ B signaling as characteristics of a high-risk head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(16):8210-8218
- Felix R, Peer J, Hans-Detlev S, *et al.* Functional analysis of LOXL2 in pancreatic carcinoma[J]. *Int J Colorectal Dis*, 2010, 25(3):303-311
- Lo M, Ling V, Wang YZ, *et al.* The xc-cystine/glutamate antiporter: a mediator of pancreatic cancer growth with a role in drug resistance[J]. *Br J Cancer*, 2008, 99(3):464-472
- Liang P, Yu LR, H Hai, *et al.* Secreted LOXL2 is a novel therapeutic target that promotes gastric cancer metastasis via the Src/FAK pathway[J]. *Carcinogenesis*, 2009, 30(10):1660-1669
- Ruth S, Christina W, Ingrid W, *et al.* The Lysyl Oxidases LOX and LOXL2 Are Necessary and Sufficient to Repress E-cadherin in Hypoxia[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(9):6658-6669
- Youngho K, Seonae R, Jung YP, *et al.* Differential expression of the LOX family genes in human colorectal adenocarcinomas[J]. *Oncol Rep*, 2009, 22(4):799-804
- Hamilton VB, Rhyannon S, Derek M, *et al.* Allosteric inhibition of lysyl oxidase-like-2 impedes the development of a pathologic microenvironment[J]. *Nat Med*, 2010, 16(9):1009-1016
- Qiu W, Hu M, Sridhar A, *et al.* No evidence of clonal somatic genetic alterations in cancer-associated fibroblasts from human breast and ovarian carcinomas[J]. *Nat Genet*, 2008, 40(5):650-655

(收稿:2011-07-18)

(修回:2011-07-21)