

## • 综述 •

## 赖氨酰氧化酶与乳腺癌关系的研究进展

耿莹 刘剑仑

乳腺癌是一种全身性疾病,早期即可发生血行转移,且部分早期乳腺癌患者经规范的治疗后仍最终出现复发和转移导致治疗失败。因此,探讨乳腺癌复发转移的机制,寻找参与乳腺癌复发转移的基因已成为目前国内外研究的焦点。赖氨酰氧化酶(lysyl oxidase, LOX)是一种依赖铜的胺氧化酶,近年来该酶在肿瘤进展中所起的作用及其与肿瘤侵袭、转移的关系已成为一个新的研究热点,并发现 LOX 的异常表达与乳腺癌的侵袭转移有关。现就 LOX 基因与乳腺癌的最新相关研究作一综述。

## 1 LOX 的生物学特性

## 1.1 LOX 基因背景

LOX 是一种相对分子质量( $M_r$ )为 32 000 的糖蛋白,定位于染色体 5q 23.3~31.2 上。Contente 等<sup>[1]</sup>发现 LOX 基因由位于第 5 号染色体上的 Ras 抑制基因编码,此基因表达增加可以防止或逆转 Ras 癌基因诱导的细胞恶变。LOX mRNA 经过翻译并糖基化形成 LOX 酶原,并以糖基化酶原的形式分泌到细胞外,最后经溶胶蛋白酶-C 剪切成 LOX 活性形式( $M_r$  30 000)及一个前肽片段( $M_r$  18 000)<sup>[2,3]</sup>,在细胞外基质中发挥基本的生物学功效。

## 1.2 LOX 结构和生物学功能

LOX 作为细胞外基质修复酶有两个活性基团,即  $\text{Cu}^{2+}$  和赖氨酰酪氨酸基醌(LTQ)<sup>[4]</sup>, $\text{Cu}^{2+}$  是 LOX 的重要活性基团,只有与  $\text{Cu}^{2+}$  结合的 LOX 才具有活性,在铜离子的帮助下,LOX 能够在细胞外基质(extracellular matrix, ECM)氧化胶原蛋白和弹性蛋白上的特殊氨基酸残基,使胶原蛋白和弹性蛋白形成共价交联<sup>[5-6]</sup>。因此 LOX 的表达及其活性调节在保持 ECM 结构的完整性方面起重要作用。LOX 同时还具有许多重要的生物功能,包括细胞的分化、运动、迁移以及基因调控等。有研究表明 LOX 不仅与胶原和弹力蛋白的交联相关,同时具有肿瘤抑制基因的活性<sup>[7]</sup>。

## 1.3 LOX 家族

LOX 家族,既 LOX 样蛋白(LOX-like protein, LOXL),包括五个成员:

基金项目:广西科学与技术开发计划项目(桂科攻 0816004-14)

作者单位:530021 广西,广西医科大学研究生学院(耿莹),广西医科大学附属肿瘤医院乳腺外科(刘剑仑)

通信作者:刘剑仑, E-mail: jianlunliu@hotmail.com

LOXL、LOXL1、LOXL2、LOXL3 和 LOXL4。Molnar 等<sup>[8]</sup>研究发现, LOX 成员分别存在于不同的胞质及胞核, 互相关联但又各自有着不同的功能, 包括细胞生长调控、肿瘤抑制、衰老、趋化等作用。许多关于 LOX 家族成员如 LOXL2、LOXL3、LOXL4 及它们的相关蛋白(LOR-1)等研究均表明其在肿瘤复发、转移中起了关键的作用<sup>[9]</sup>。

## 2 LOX 在乳腺癌中的表达及在乳腺癌侵袭转移中所起的作用

近年研究发现, 细胞外基质 LOX 的表达异常与肿瘤发生、进展、肿瘤细胞分化、生长控制、活性、黏附性、恶性转化和侵袭性等有着密切的联系<sup>[10-11]</sup>。

### 2.1 LOX 在乳腺癌中的表达

研究发现, LOX 在转移性乳腺癌组织中较原发性乳腺癌组织表达上调<sup>[12]</sup>。Akiri 等<sup>[13]</sup>应用 RT-PCR 和免疫组化的方法对乳腺癌组织、癌旁组织、淋巴结及良性乳腺肿瘤组织中 LOX 及蛋白进行检测, 结果发现, 乳腺良性病变组织中 LOX 蛋白表达水平极低, 早期乳腺癌组织 LOX 蛋白呈弱阳性或阴性, 而中晚期乳腺癌(包括远处转移)的癌组织 LOX 呈强阳性表达, 雌激素受体(ER)(-)、孕激素受体(PR)(-)、人表皮生长因子受体 2(HER-2)(-)的三阴和 ER(-)、PR(-)、HER-2(+++)乳腺癌病人的癌组织中 LOX 也呈强阳性表达。

### 2.2 LOX 与乳腺癌的侵袭转移

研究<sup>[11]</sup>表明, (1)LOX 表达与乳腺癌的复发转移有关, 高侵袭或转移性的乳腺癌 LOX 高表达; 肿瘤细胞中表达上调的 LOX, 能够促进肿瘤细胞扩散到其它组织器官; (2)肿瘤组织缺氧提示癌细胞的生长和分裂速度快于血管提供氧气的速度, 这些区域的细胞容易转移; (3)低氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor, HIF-1)可诱导 LOX 活性增高, 可能是导致癌细胞侵袭转移的主要原因; (4)缺氧可增强 LOX mRNA、LOX 蛋白、分泌型 LOX 的活性; LOX 在高侵袭转移乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中高表达, 而低侵袭性乳腺癌细胞系 LOX 低表达。研究<sup>[14-15]</sup>发现, LOX 基因直接介入了乳腺癌细胞的转移, LOX 及 LOX 家族成员(LOXL, LOXL2, LOXL3 和 LOXL4)仅在高侵袭性乳腺癌细胞中表达, 在低侵袭性乳腺癌细胞中无表达, 且 LOX 和 LOXL2 与高侵袭性乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 及 Hs578T 的侵袭和转移能力关系密切。应用 LOX 反义寡核苷酸转染 MDA-MB-231 和 Hs578T 细胞发现, LOX 反义寡核苷酸能通过激活细胞中的Ⅳ型胶原、层黏连蛋白、明胶等抑制侵袭。而应用 LOX 酶活性的不可逆抑制剂( $\beta$ APN)对 MDA-MB-231 和 Hs578T 细胞进行处理, 可降低其侵袭性。而转染 LOX 基因的低侵袭性乳腺癌细胞系 MCF-7 的侵袭能力可提高 2 倍, 此侵袭能力被  $\beta$ APN 逆转。

### 2.3 缺氧诱导的乳腺癌转移

肿瘤微环境低氧是体内肿瘤的常见现象,相关检测表明肿瘤组织内的低氧区域的产生与肿瘤迅速生长、肿瘤血管结构异常等原因有关。目前认为肿瘤低氧可能与诱导包括血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)在内的多种促血管生长因子有关,但是具体细节科学家们尚不清楚。

Kirschmann 等<sup>[16]</sup>的研究发现,肿瘤抑制基因乳腺丝氨酸蛋白酶抑制物和缺氧可从正反两方面调节 LOX 促进乳腺癌转移。该研究进一步地揭示了 LOX 可促进乳腺癌细胞的迁徙和转移。高侵袭转移性乳腺癌细胞经  $\beta$ APN 处理后细胞能动性下降。低侵袭或转移性乳腺癌细胞在低氧环境诱导下, LOX 表达增加,细胞侵袭性也相应增加;反之,高侵袭或转移性乳腺癌细胞导入肿瘤抑制基因乳腺丝氨酸蛋白酶抑制物, LOX 表达下降,细胞迁徙力也相应下降。该研究结果显示, LOX 促进乳腺癌细胞迁徙运动是通过内源性乳腺丝氨酸蛋白酶抑制物和外源性缺氧环境刺激共同调节而产生的。Erler 等<sup>[17]</sup>进一步研究证实,人乳腺癌和头颈部肿瘤中低氧诱导因子(HIF)缺氧环境下共同调节 LOX 表达,高表达 LOX 的肿瘤患者有较高的远处转移率和较低的总生存率。此外,Erler 等<sup>[17]</sup>实验研究发现 LOX 寡义反核苷酸、RNA 干扰片段(shRNA)及抑制剂可以有效抑制乳腺癌细胞的迁徙、转移,而再次导入活性 LOX 可逆转上述情况,但导入无活性 LOX 则无此作用。该研究进一步把 MDA-MB-231 细胞株通过尾静脉注射移植到裸鼠,肿瘤经过  $\beta$ APN 或 LOX 抗体处理后,肺和肝的转移灶发生率呈明显下降;对已转移的病灶,使用 LOX shRNA 处理后,转移灶可变小或消失。但该处理措施对原发灶无明显影响。因此, LOX 调控肿瘤细胞的侵袭性,在肿瘤侵袭转移中发挥着重要作用。

### 2.4 LOX 通过氧化氢介导机制参与乳腺癌细胞的侵袭与转移

Payne<sup>[18]</sup>研究发现,过氧化氢是 LOX 催化活性的一种负产物,侵袭性乳腺癌细胞通过过氧化氢酶消除过氧化氢,可以导致 Src 家族蛋白酪氨酸激酶表达下降。用  $\beta$ APN 处理高度恶性乳腺癌细胞系 Hs578T 和 MDA-MB-231,观察到参与细胞黏附机制的重要蛋白酶,黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)和 Src 激酶表达下降,同时在 MCF-7/LOX32-His 细胞系,FAK 和 Src 激酶表达上调,这种上调可被  $\beta$ -氨基丙腈( $\beta$ -APN)抑制<sup>[19]</sup>。这些研究表明 LOX 基因通过过氧化氢调节机制和 FAK/Src 信号传导通路,促进侵袭性乳腺癌细胞的转移和细胞基质黏附力的形成。LOX 调节乳腺癌迁徙的模型见图 1。

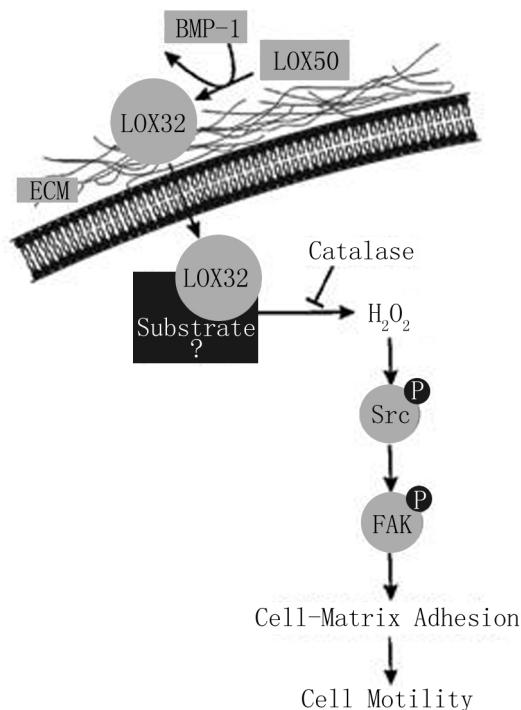


图 1 LOX 调节乳腺癌迁徙的模型

## 2.5 LOX 在浸润性乳腺癌细胞系中促进细胞内信号传导

Payne 等<sup>[20]</sup>研究发现,具有催化活性的 LOX 集中分布在成纤维细胞的细胞核和胞质及血管平滑肌细胞中,且已证明其在基因转录调节、运动、迁徙中发挥着重要作用。用  $\beta$ APN 处理浸润性乳腺癌细胞系 Hs578TLOX 抑制活性后,发现 FAK、Src、NF $\kappa$ B 和 Ras 活性下降,FAK、Src、NF $\kappa$ B 和 Ras 活性的下降或丧失可导致细胞黏附性的下降。以上研究显示 LOX 活性的抑制导致参与调节细胞黏附、基因转录调节的几个关键蛋白活性的下降。LOX 调节浸润性乳腺癌细胞系胞内信号传导,导致了一系列的细胞运动、迁徙和侵袭性的变化。

## 2.6 LOX 基因前肽(LOX-PP)参与乳腺癌肿瘤抑制

LOX 基因被转录、翻译后,生成一个  $M_r$ 50 000 大小的无活性酶原形式并分泌至胞外,蛋白水解产生一个  $M_r$ 32 000 的活性酶分子及一个  $M_r$ 18 000 的前肽。LOX-PP 可诱导由 Ras 基因转化的恶变成纤维细胞发生表型反转<sup>[21]</sup>。

2007 年 Min 等<sup>[22]</sup>发现 LOX-PP 抑制 HER-2/*neu* 阳性表达的乳腺癌的侵袭表型。HER-2/*neu* 阳性使乳腺癌更易发生侵袭转移。HER-2/*neu* 蛋白是 Ras 上游区的催化激动剂,而 Ras 是促进细胞生长的信号传导蛋白;LOX 基因对 ras 抑制活性是通过 LOX 前肽实现的。分泌性 LOX 酶原可形成 LOX-PP 和功能性 LOX 酶,且肿瘤抑制活性存在于 LOX-PP 区域。LOX-PP 可以抑制肿瘤形成和 HER-2/*neu* 阳性的乳腺癌细胞 NF639 的侵袭表型,而



HER-2/*neu* 表达通过 Ras 基因信号传导,因此 LOX-PP 被认为是 Ras 的抑制基因。裸鼠的肿瘤种植实验也表明 LOX-PP 抑制 HER-2/*neu* 控制的肿瘤形成<sup>[23]</sup>。Min 等<sup>[24]</sup>发现 LOX-PP 肿瘤抑制的作用机理是抑制纤维蛋白刺激信号和细胞迁移。LOX-PP 可减弱整联蛋白信号传导通路,导致 FAK 磷酸化和下游 p130Cas 的活化。LOX-PP 的表达可抑制纤维连接蛋白刺激的蛋白质酪氨酸磷酸化,主要表现为 Tyr-397、Tyr-576、P130Cas 和 FAK 的磷酸化作用减弱,内源性 p130Cas 和纤维连接蛋白活化的趋化性下降。已有研究证实用 LOX-PP 处理 NF639、MDA-MB-231 和 Hs578T 乳腺癌细胞系可以降低其纤维蛋白介导的细胞的趋化性<sup>[25]</sup>。

### 3 LOX 与胎盘催乳素(PL)之间相互协同作用与乳腺癌的关系

Polgar 等<sup>[26]</sup>的研究发现 LOX 与 PL 之间相互作用及其在乳腺癌中的潜在作用。LOX 和 PL 在高侵袭性乳腺癌细胞系 MDA-MB231 和 Hs578T 都有一个较高的蛋白表达水平,而在低侵袭性乳腺癌细胞系 MCF-7 和 T47D 中,LOX 与 PL 的蛋白表达水平很低或缺失。2007 年 Polgar 等<sup>[27]</sup>进一步研究了 LOX 与 PL 之间的相互作用关系,发现其协同促进乳腺上皮细胞增殖和迁移,正常情况下 PL 仅在胎盘滋养层细胞中表达,但研究发现 PL 基因在大部分乳腺浸润性导管癌中表达,且 LOX 与 PL 共表达导致了 124% 的细胞迁徙能力增加<sup>[28]</sup>,表明在乳腺癌的进展中 LOX 与 PL 之间的相互作用与上皮细胞转化为迁徙表型高度相关。

### 4 LOX 基因在乳腺癌治疗方面的应用前景

LOX 是一种细胞外酶,催化基质中胶原和弹性纤维的共价交连,具有调节组织张力强度的作用,是细胞外基质基因。而且 LOX 的新功能,包括调节基因转录、细胞活动力或迁徙、细胞黏附,LOX-PP 表达活性及胞内信号传导已经得到了证实。根据这些不同的功能推测,LOX 可能具备细胞外及细胞内的多重功能。更好地了解 LOX 在乳腺癌发展过程中发挥作用的机制,对于发掘新的抗乳腺癌转移的治疗方法能有极大帮助。

目前,研究<sup>[29]</sup>已证实 LOX 促进乳腺癌的侵袭显型,通过过氧化氢机制及和 PL 协同作用,调节细胞内信号传导参与乳腺癌侵袭转移,乳腺丝氨酸蛋白酶抑制物和缺氧从正反两方面调节 LOX 促进乳腺癌转移及 LOX-PP 区域的肿瘤抑制活性的研究,LOX 通过抑制细胞核因子(NF-kappa B)的活性而抑制 Ras 介导的细胞转化,LOX 与组蛋白 1 和组蛋白 2 共同作用后才具有肿瘤抑制活性<sup>[30]</sup>等。干扰乳腺癌细胞系中 LOX 的表达,使其基因沉默,降低乳腺癌细胞的运动、黏附、迁徙和侵袭能力的研究的不断探索, $\beta$ APN 处理浸润性乳腺癌细胞系的实

验研究,为临床上通过抑制 LOX 酶活性治疗乳腺癌提供了一个新的可能。

LOX 参与乳腺癌的侵袭与转移的机制是复杂多样的,尽管目前已有许多的研究和文献报道,但对于 LOX 各项功能在乳腺癌中所涉及的具体机制远未完全被揭示。今后需要进一步的研究 LOX 与 LOX-PP 在乳腺癌中的表达和活性,在肿瘤与间质细胞中作用,在细胞外基质(extracellular matrix,ECM)中的稳定性作用,LOX 细胞内生物学活性多样化和确定 LOX 不同的催化底物和蛋白结合靶点,进一步了解 LOX 基因参与乳腺癌迁徙转移的机制,为乳腺癌的治疗提供新的前景。LOX 基因的研究成果将指引我们在攻克乳腺癌远处转移的难关上再登高峰。

【关键词】 赖氨酰氧化酶; LOX 基因前肽; 乳腺肿瘤; 侵袭; 转移

【中图分类号】 R737.9      【文献标识码】 A

### 参考文献

- [1] Contente S, Kenyon K, Rimoldi D, et al. Expression of gene rrg is associated with reversion of NIH 3T3 transformed by LTR-c-H-ras. *Science*,1990,249:796-798.
- [2] Panchenko MV, Stetler-Stevenson WG, Trubetsky OV, et al. Metalloproteinase activity secreted by fibrogenic cells in the processing of prolysin oxidase: potential role of procollagen C-proteinase. *J Biol Chem*, 1996, 271: 7113-7119.
- [3] Uzel MI, Scott IC, Babakhanlou-Chase H, et al. Multiple bone morphogenetic protein 1-related mammalian metallo-proteinases process prolysin oxidase at the correct physiological site and control lysyl oxidase activation in mouse embryo fibroblast cultures. *J Biol Chem*,2001,276: 22537-22544.
- [4] Tang C, Klinman JP. The catalytic function of bovine lysyl oxidase in the absence of copper. *J Biol Chem*,2001,276:30575-30578.
- [5] Rucker RB, Kosonen T, Clegg MS, et al. Cooper, lysyl oxidase, and extracellular matrix protein cross-linking. *Am J Clin Nutr*, 1998,67:966-1002.
- [6] Jeay S, Pianetti S, Herbert M, et al. Lysyl oxidase inhibits ras-mediated transformation by preventing activation of NF- $\kappa$ B. *Mol Cell Biol*, 2003,23:2251-2263.
- [7] Mungo L, Kagan HM. Lysyl oxidase properties regulation and multiple functions in biology. *Matrix Biol*,1998,16 :387-398.
- [8] Molnar J, Fong KS, He QP, et al. Structural and functional diversity of lysyl oxidase and the LOX-like proteins. *Biochim Biophys Acta*, 2003,1647:220-224.
- [9] Maki JM, Rasanen J, Tikkanen H, et al. Inactivation of the lysyl oxidase gene LOX leads to aortic aneurysms cardiovascular dysfunction and perinatal death in mice. *Circulation*,2002,106:2503-2509.
- [10] Fong SF, Dietzsch E, Fong KS, et al. Lysyl oxidase-like 2 expression is increased in colon and esophageal tumors and associated with less differentiated colon tumors. *Genes Chromosomes Cancer*,2007,46: 644-655.
- [11] Woznick AR, Braddock AL, Dulai M, et al. Lysyl oxidase expression in bronchogenic carcinoma. *Am J Surg*,2005,189:297-301.
- [12] Peyrol S, Raccourt M, Gerard F, et al. Lysyl oxidase gene expression in the stromal reaction to in situ and invasive ductal breast carcinoma. *Am J Pathology*,1997,150: 497-504.
- [13] Akiri G, Sabo E, Dafni H, et al. Lysyl oxidase-related protein-1 promotes tumor fibrosis and tumor progression in vivo. *Cancer Res*, 2003,63:1657-1666.

- [14] Kirschmann DA, Seftor EA, Nieva DR, et al. Differentially expressed genes associated with the metastatic phenotype in breast cancer. *Cancer Res*, 1999, 55: 127-136.
- [15] Kirschmann DA, Seftor EA, Fong SF, et al. A molecular role for lysyl oxidase in breast cancer invasion. *Cancer Res*, 2002, 62: 4478-4483.
- [16] Kirschmann DA, Payne SL, Seftor EA, et al. Tumor suppressor gene Maspin and hypoxia inversely regulate lysyl oxidase facilitated breast cancer motility. *Proc Amer Assoc Cancer Res*, 2005, 46: 57-58.
- [17] Erler JT, Bennewith KL, Nicolau M, et al. Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature*, 2006, 440: 12222-12226.
- [18] 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.
- [19] Nellaiappan K, Risitano A, Liu G, et al. Fully processed lysyl oxidase catalyst translocates from the extracellular space into nuclei of aortic smooth muscle cells. *J Cell Biochem*, 2000, 79: 576-582.
- [20] Payne SL, Angela R, Hess AR, et al. Lysyl oxidase facilitates intracellular signaling in invasive breast cancer cells. *Proc Amer Assoc Cancer Res*, 2005, 46: 67-68.
- [21] Palamakumbura AH, Jeay S, Guo Y, et al. The propeptide domain of lysyl oxidase induces phenotypic reversion of ras-transformed cells. *J Biol Chem*, 2004, 279: 40593-40600.
- [22] Min C, Kathrin KH, Ying Z, et al. The tumor suppressor activity of the lysyl oxidase propeptide reverses the invasive phenotype of Her-2/neu-driven breast cancer. *Cancer Res*, 2007, 67: 1105-1112.
- [23] Klymkowsky MW, Savagner P, Epithelial mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe. *Am J Pathol*, 2009, 174: 1588 - 1593.
- [24] Min C, Ying Z, Siddharth R, et al. The lysyl oxidase pro-peptide attenuates fibronectin-mediated activation of focal adhesion kinase and p130cas in breast cancer cells. *J Biol Chem*, 2009, 284: 1385-1393.
- [25] Min C, Yu Z, Kirsch KH, et al. A loss-of-function polymorphism in the propeptide domain of the LOX gene and breast cancer. *Cancer Res*, 2009, 69: 6685 - 6693.
- [26] Polgar N, Fogelgren B, Csiszar K, et al. The interaction of lysyl oxidase with the placental lactogen hormone and its potential role in breast cancer. *Proc Amer Assoc Cancer Res*, 2006, 47: 804-805.
- [27] Polgar N, Fogelgren B. Lysyl oxidase interacts with hormone placental lactogen and synergistically promotes breast epithelial cell proliferation and migration. *J Biol Chem*, 2007, 282: 3262-3272.
- [28] Shieh TM, Lin SC, Liu CJ, et al. Association of expression aberrances and genetic polymorphisms of lysyl oxidase with areca-associated oral tumorigenesis. *Clin Cancer Res*, 2007, 13: 4378-4385.
- [29] Jeay S, Pianetti S, Kagan HM, et al. Lysyl oxidase inhibits ras-mediated transformation by preventing activation of NF-kappa B. *Mol Cell Biol*, 2003, 23: 2251-2263.
- [30] Giamprizzi M, Oleggin R, Di Donato A, et al. Demonstration of in vitro interaction between tumor suppressor lysyl oxidase and histones H1 and H2: definition of the regions involved. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1647: 245-251.

(收稿日期: 2009-10-02)

(本文编辑: 周艳)

耿莹, 刘剑仑. 赖氨酰氧化酶(LOX)与乳腺癌关系的最新研究进展[J/CD]. 中华乳腺病杂志: 电子版, 2010, 4(2): 206-212.