

结直肠癌组织中赖氨酰氧化酶的表达与 肿瘤进展及预后的关系*

石晓明, 赵伟, 杨永宾, 吕柏楠[△]

河北省人民医院 普外二科(石家庄 050051)

【摘要】 目的 分析结直肠癌组织中赖氨酰氧化酶(LOX)的表达与患者临床病理特征及预后的关系,并探讨 LOX 在结直肠癌进展中的作用。方法 收集 2009 年 1 月至 2010 年 5 月在我院确诊并行肿瘤切除的 82 例结直肠癌患者的癌组织、癌旁组织石蜡标本及临床资料、随访信息。免疫组化染色检测结直肠癌及癌旁组织中 LOX、缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、MMP-7 蛋白的表达情况。分析 LOX 与患者临床病理参数及预后的关系,进一步探讨 LOX 与 HIF-1 α 、MMP-2、MMP-7 之间的关系。结果 结直肠癌组织中 LOX 表达率较癌旁组织高($P < 0.05$)。LOX 表达阳性的患者肿瘤临床分期更晚、浸润深度更深、淋巴结转移更多(P 均 < 0.05);预后分析显示 LOX 表达阳性患者的预后较差,COX 模型显示 LOX 表达和 TNM 分期 III~IV 期是影响结直肠癌患者预后的独立危险因素($P < 0.05$)。结直肠癌组织 HIF-1 α 、MMP-2、MMP-7 阳性表达率高于癌旁组织(均 $P > 0.05$)。相关分析显示 LOX 表达与 HIF-1 α 、MMP-2 蛋白之间存在正相关($P < 0.05$)。结论 LOX 蛋白在结直肠癌组织中表达增强,与结直肠癌的进展有关,且可作为预后预测因子。LOX 可能与 HIF-1 α 、MMP-2 共同作用促进结直肠癌进展。

【关键词】 结直肠癌 赖氨酰氧化酶基因 临床病理特征 预后 侵袭,转移

Expression of LOX in Colorectal Cancer Tissues and Its Relationship with Progress and Prognosis SHI Xiao-ming, ZHAO Wei, YANG Yong-bin, LÜ Bo-nan[△]. Department of General Surgery, Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050051, China

[△] Corresponding author, E-mail: lvbn1999@126.com

【Abstract】 **Objective** To analyze the expression of lysyl oxidase (LOX) in colorectal cancer and its relationship with clinicopathological characteristics, prognosis, and its progress. **Methods** 82 cases of colorectal tumor paraffin-embedded specimens and paired tumor-adjacent tissues were collected, and data of clinicopathological characteristics and prognosis of these patients were also recorded from 2009. 1 to 2010. 5. Expressions of LOX, hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α), matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-7 were determined by immunohistochemistry. Then relationship between LOX and clinicopathological characteristics and prognosis was explored, and relationship between LOX and HIF-1 α , MMP-2, MMP-7 were investigated. **Results** Expressions of LOX was stronger in tumors than in tumor-adjacent tissues ($P < 0.05$). Cancer tissues with overexpressed LOX had later clinical stages, deeper tumor invasion, and more metastatic lymph nodes (all $P < 0.05$). The result also showed that patients with overexpression of LOX had poorer prognosis, and overexpression of LOX was independent factor for prognosis in COX survival analysis. Expression of HIF-1 α , MMP-2, MMP-7 in colorectal cancer was stronger than in tumor-adjacent tissues ($P < 0.05$). Positive relationship was found between LOX and HIF-1 α , MMP-2, MMP-7 proteins ($P < 0.05$). **Conclusion** LOX was overexpressed in colorectal cancer tissues, and was associated with the progression of colorectal cancer. LOX may be involved in the progress of colorectal cancer by regulating HIF-1 α , MMP-2, MMP-7 protein expression.

【Key words】 Colorectal cancer Lysyl oxidase (LOX) gene Clinicopathological characteristics Prognosis Invasion, metastasis

结直肠癌的发生发展机制复杂,结直肠癌的肿瘤细胞易于发生侵袭转移而导致肿瘤进展转移,但具体机制还没有完全阐明。寻找结直肠癌相关的新

基因对探讨发病机制、确定肿瘤标志物和预后因子有重要意义。赖氨酰氧化酶(lysyl oxidase, LOX)具有催化肿瘤的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的功能,与胰腺癌、肺癌、胃癌^[1-3]等肿瘤关系密切。已有研究表明,LOX 在结直肠癌也存在表达增高^[4],与肿瘤的发生有关,提示 LOX 可能参与

* 河北省医学科学研究重点课题计划(No. 20160074)资助

[△] 通信作者, E-mail: lvbn1999@126.com

结直肠癌的发生进展,但是目前关于 LOX 与结直肠癌的具体关系报道还较为少见。为探讨 LOX 在结直肠癌组织中表达情况及临床意义,本研究检测了 82 例结直肠癌组织及癌旁组织中 LOX 的表达,同时收集患者的临床病理特征及预后情况,对 LOX 与结直肠癌临床病理特征和预后的关系进行了分析。本研究还检测并探讨了 LOX 与肿瘤侵袭转移相关蛋白缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)、基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2)、MMP-7 的关系,对 LOX 通过调节结直肠癌细胞凋亡参与结直肠癌发生进展的机制进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 临床资料

选取 2009 年 1 月至 2010 年 5 月于我科就诊并行肿瘤切除的结直肠癌患者 82 例,所有患者均有完整临床资料和随访结果(随访截止于 2015 年 6 月),并有肿瘤及配对癌旁组织(确诊无癌细胞存在)的石蜡标本。其中男性 61 例,女性 21 例。年龄 21~86 岁,平均年龄(59.27 \pm 11.06)岁。标本均经体积分数 4%多聚甲醛固定、石蜡包埋、4 μ m 连续切片,经 HE 染色诊断。本研究已获得患者或家属的知情同意,并得到本院医学伦理委员会的批准。

1.2 试剂及方法

1.2.1 主要试剂 兔抗人 LOX 多克隆抗体为美国 Sigma 公司产品,兔抗人 HIF-1 α 、MMP-2、MMP-7 多克隆抗体为美国 Santa Cruz 公司产品,工作浓度均为 1:100。免疫组化试剂盒为美国 Santa Cruz 公司产品。

1.2.2 免疫组织化学染色检测 LOX、HIF-1 α 、MMP-2、MMP-7 蛋白表达 切片经抗原修复后 SP 两步法检测结直肠癌的癌及癌旁组织 LOX、HIF-1 α 、MMP-2、MMP-7 蛋白的表达,操作严格按试剂盒说明进行。结果判断:LOX、HIF-1 α 、MMP-2、MMP-7 蛋白以细胞浆或细胞核中出现棕黄色颗粒为阳性。400 倍光镜下随机观察 5 个视野,每视野计数 100 个肿瘤细胞,计数阳性细胞数。采取二次计分法:首先按染色强度计分,无色为 0,淡黄色为 1,棕黄色为 2,棕褐色为 3;再按阳性细胞百分比计分,阳性细胞<25%为 0,25%~50%为 1,51%~75%为 2, \geq 76%为 3。将每张切片的染色强度与阳性细胞百分比计分之和记录为结果,0 分为阴性(-),1~2 分为弱阳性(+),3~4 分为阳性(++),

5~6 分为强阳性(+++)。以(++)和(+++)为阳性,计算阳性表达率。

1.2.3 统计学方法 采用 χ^2 检验比较各蛋白在不同组织及不同分组中的差异;相关性分析采用 Spearman 等级相关分析。以 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,并制作 COX 比例风险回归模型进行多因素分析,确定影响结直肠癌预后的因素。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LOX、HIF-1 α 、MMP-2、MMP-7 蛋白的表达

LOX 主要在细胞浆中表达,阳性染色细胞的阳性颗粒通常呈弥漫性分布(图 1)。结直肠癌组织中 LOX 的阳性表达率为 75.61%(62/82),高于癌旁组织(42.68%,35/82)($\chi^2 = 18.40, P < 0.001$)。HIF-1 α 蛋白在结直肠癌组织中阳性率为 67.07%(55/82),高于癌旁组织(34.15%,28/82)($\chi^2 = 17.78, P < 0.001$);MMP-2 在结直肠癌组织中阳性率为 64.63%(53/82),高于癌旁组织 43.90%(36/82)($\chi^2 = 7.10, P = 0.008$);MMP-7 蛋白在结直肠癌组织中阳性表达率为 58.54%(48/82),高于癌旁组织(34.15%,28/82)($\chi^2 = 9.81, P = 0.002$)。

2.2 LOX 蛋白与结直肠癌临床病理特征的关系

结果显示(表 1),结直肠癌组织中 LOX 蛋白的表达情况与患者的性别、年龄、组织学分化、神经血管受侵情况无明显关系($P > 0.05$)。LOX 蛋白阳性表达与肿瘤临床分期、肿瘤浸润深度、淋巴结转移有关,I~II 期结直肠癌组织 LOX 阳性表达率为 59.46%(22/37),低于 III~IV 期(88.89%,40/45)($P = 0.002$)。LOX 在肿瘤浸润局限于 T1/T2 期(18/30)患者的阳性表达率低于浸润达 T3/T4 期患者(44/52)($P = 0.01$)。结直肠癌患者中无淋巴结转移者的 LOX 阳性表达率(60.00%,18/30)低于有淋巴结转移的患者(84.62%,44/52)($P = 0.01$)。

2.3 结直肠癌患者单因素及多因素生存分析结果

根据 LOX 的表达与预后的关系进行 Kaplan-Meier 分析并绘制生存函数曲线(图 2),发现 LOX 阳性表达患者的平均生存期为(38.06 \pm 3.42)月,而阴性表达者为(50.55 \pm 2.51)月,阳性患者生存期明显比阴性患者缩短($\chi^2 = 7.601, P = 0.006$)。为确定影响结直肠癌预后的独立危险因素,结合患者的随访结果,以生存状态为应变量(Y),以 LOX 蛋白

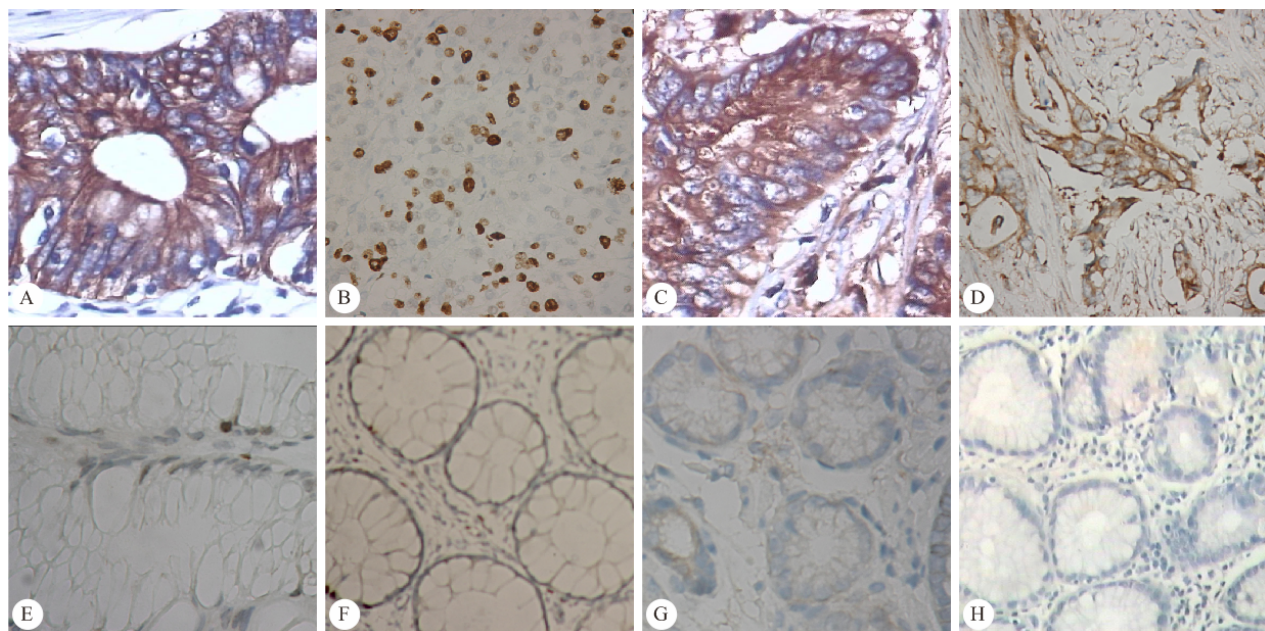


图 1 LOX、HIF-1 α 、MMP-2、MMP-7 蛋白在结直肠癌中的表达。SP $\times 400$

Fig 1 Expression of LOX, HIF-1 α , MMP-2, MMP-7 proteins in colorectal cancer and paracancerous tissues. SP $\times 400$

A: LOX in colorectal cancer tissues; B: LOX in paracancerous tissues; C: HIF-1 α in colorectal cancer tissues; D: HIF-1 α in paracancerous tissues; E: MMP-2 in colorectal cancer tissues; F: MMP-2 in paracancerous tissues; G: MMP-7 in colorectal cancer tissues; H: MMP-7 in paracancerous tissues

表 1 82 例结直肠癌患者肿瘤组织 LOX 蛋白表达与临床病理参数的关系

Table 1 Relationship between the protein expression of LOX in 82 gastric cancer and the clinicopathological parameters in patients

Clinical feature	LOX ⁺ (n=62)	LOX ⁻ (n=20)	χ^2	P
Sex			2.88	0.09
Male (n=61)	49	12		
Female (n=21)	13	8		
Age/yr.			1.04	0.31
≥ 60 (n=45)	36	9		
< 60 (n=37)	26	11		
Tumor differentiation			0.43	0.51
Highly/moderately (n=44)	32	12		
Poorly/undifferentiated (n=38)	30	8		
TNM stage			9.54	0.002
I - II (n=37)	22	15		
III - IV (n=45)	40	5		
Depth of invasion			6.25	0.01
T1/T2 (n=30)	18	12		
T3/T4 (n=52)	44	8		
Lymphatic metastasis			6.25	0.01
Positive (n=52)	44	8		
Negative (n=30)	18	12		
Nerve or blood vessel invaded			0.49	0.48
Invaded (n=30)	24	6		
Not invaded (n=52)	38	14		

表达、性别、年龄、肿瘤分化程度、浸润深度、淋巴结转移情况、远处转移情况、神经血管侵犯情况、TNM 分期、并发症情况(包括瘘、出血、梗阻、严重感染等)

为自变量($X_1 \sim X_{10}$)建立 COX 比例风险回归模型,结果表明 LOX 阳性表达、TNM 临床分期 III ~ IV 期是影响结直肠癌患者预后的独立危险因素 ($P < 0.05$, 表 2)。

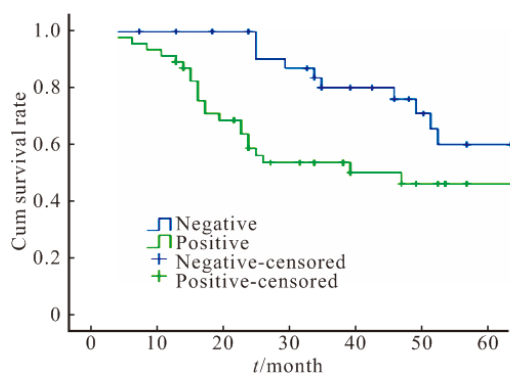


图 2 结直肠癌组织 LOX 蛋白不同表达程度与生存关系的 Kaplan-Meier 曲线

Fig 2 The Kaplan-Meier curve of different expression of LOX in colorectal cancer

2.4 LOX 表达与 HIF-1 α 、MMP-2、MMP-7 蛋白的关系

Spearman 相关性分析显示,LOX 蛋白表达与 HIF-1 α 、MMP-2 蛋白之间存在正相关($r=0.4033$,

表2 结直肠癌患者预后影响因素的COX分析结果

Table 2 The analysis results of COX risk model of colorectal cancer

Index	B	SE	Wald	P	RR	95%CI for RR
Step1 positive LOX expression	0.463	0.167	7.695	0.006	1.589	1.146-2.204
Step2 positive LOX expression	0.395	0.173	5.235	0.022	1.484	1.058-2.081
Step2 TNM stage	0.448	0.194	5.311	0.021	1.565	1.069-2.289

B: Partial regression coefficient; SE: Standard error; RR: Relative risk; CI: Confidence interval

$P < 0.001$; $r = 0.3423$, $P = 0.002$), 与 MMP-7 蛋白之间无明显相关关系 ($r = 0.2011$, $P = 0.070$)。HIF-1 α 与 MMP-2、MMP-7 蛋白之间的表达存在正相关 ($r = 0.3816$, $P < 0.001$; $r = 0.2685$, $P = 0.015$), MMP-2 与 MMP-7 蛋白之间无明显相关 ($r = 0.1855$, $P = 0.095$)。

3 讨论

目前发现 LOX 家族有 5 个成员, 其中最早确定的是 LOX, 其余 4 个成员命名为人赖氨酰氧化酶样蛋白(hLOXL)1~4(hLOXL1~hLOXL4)^[5-6]。研究表明, LOX 与 ECM 中蛋白的氧化及交联关系密切, 在肿瘤的侵袭和转移过程中发挥了重要作用。关于 LOX 与恶性肿瘤的关系, 有研究发现, LOX 具有原癌基因的特征, 在许多肿瘤中表达增高, 并随肿瘤的进展表达进一步增强。JI 等^[7]的体外研究也发现, LOX 对卵巢癌肿瘤细胞的侵袭迁移能力有明显的促进作用, 说明 LOX 可能通过调控一些侵袭迁移基因促进了肿瘤的进展。本研究也发现, LOX 在结直肠癌组织中的表达水平明显高于癌旁组织, 说明 LOX 蛋白的异常表达与结直肠癌有关, 该蛋白可能在结直肠癌的发生和进展中发挥了重要作用。

进一步分析 LOX 蛋白与结直肠癌患者临床病理特征的关系, 发现该蛋白的表达与结直肠癌肿瘤临床分期、肿瘤浸润深度、淋巴结转移有关。结果显示肿瘤临床分期越晚、浸润深度越深的患者 LOX 蛋白表达阳性率越高; 结果还显示淋巴结转移阳性的患者 LOX 蛋白阳性表达率比阴性者高, 提示 LOX 在肿瘤侵袭转移过程中进一步增强, 在结直肠癌的进展可能参与并发挥了作用。预后分析显示 LOX 表达阳性的结直肠癌患者生存期比阴性者明显缩短, COX 模型进一步证实 LOX 阳性表达可作为结直肠癌患者预后的独立危险因素。这些结果都说明 LOX 可能作为新的肿瘤标志物及预后预测因子对结直肠癌的诊断、病情评估及预后分析做出贡献。但关于 LOX 的功能也有不同的意见。AGRA

等^[8]研究发现, 在尤文肉瘤细胞中 LOX 的表达降低, 认为 LOX 具有抑癌基因的功能, 该基因表达的缺失是癌变的重要因素。关于 LOX 的具体作用迄今还不完全明确, 需要进一步系统深入的研究才有可能得到确定的结论。

由于本研究显示 LOX 可能在促进肿瘤侵袭转移的过程中发挥了重要的作用, 为研究 LOX 参与结直肠癌侵袭进展的机制, 本研究探讨了 LOX 与肿瘤细胞侵袭迁移相关蛋白 HIF-1 α 、MMP-2、MMP-7 之间的关系。HIF-1 α 是 LOX 的上游调节基因, 直接促进 LOX 的表达^[9]。有研究^[10]表明, 抑制乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中 LOX 表达后 MMP-2 表达降低, 提示 LOX 可通过调节 MMP-2 而促进乳腺癌细胞的侵袭转移。肿瘤中 LOX 与 MMP-7 的关系尚未见报道。本结果发现 LOX 表达与 HIF-1 α 、MMP-2 蛋白之间存在正相关, 与前述研究结果相符。本结果中, LOX 表达与 MMP-7 蛋白无明显相关性, 提示 LOX 在结直肠癌中的作用可能与 MMP-7 无关, 但由于并无相关报道, 因而还有待深入研究。本结果提示 LOX 可能直接调控或与 HIF-1 α 、MMP-2 协同作用, 在结直肠癌的进展及转移中发挥作用, 但具体分子间机制还有待深入研究。

综上, 本研究发现 LOX 蛋白在结直肠癌组织中存在高表达现象, 可能通过调控 HIF-1 α 、MMP-2 表达参与结直肠癌细胞侵袭转移过程, 还有可能作为预后指标。

参 考 文 献

- [1] MILLER BW, MORTON JP, PINESE M, *et al.* Targeting the LOX/hypoxia axis reverses many of the features that make pancreatic cancer deadly: inhibition of LOX abrogates metastasis and enhances drug efficacy. *EMBO Mol Med*, 2015, 7(8):1063-1076.
- [2] LIU J, PING W, ZU Y, *et al.* Correlations of lysyl oxidase with MMP2/MMP9 expression and its prognostic value in non-small cell lung cancer. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(9):6040-6047.

(下转第 574 页)

- range: a cross-sectional study. *BMC Endocr Disord*, 2014, 14(1):1-8.
- [2] 刘大风, 曾义岚, 林 军, 等. 慢性乙型肝炎患者代谢异常的表现形式分析. *成都医学院学报*, 2014, 9(6):712-716.
- [3] 兰丽娟, 张碧英, 刘大风, 等. 不同糖代谢状态的慢性乙型肝炎患者肝脏炎症及纤维化的差异分析. *中华实验和临床感染病杂志(电子版)*, 2015, 9(3):18-21.
- [4] 刘大风, 刘亚玲, 张 鸿, 等. 慢性乙型肝炎患者影响肝纤维化的主要代谢因素分析. *中华实验和临床感染病杂志(电子版)*, 2015, 9(5):58-63.
- [5] 杨德华, 曾义岚, 刘大风, 等. 慢性乙型肝炎患者 Fibroscan 弹性值的影响因素分析//中华医学会感染病学分会病毒性肝炎分组. 第三届全国病毒性肝炎慢性化重症化基础与临床研究进展学术会议论文汇编. 重庆:中华医学会, 2013:160-166.
- [6] 刘大风, 曾义岚, 杨德华, 等. 慢性乙肝患者 Fibroscan 弹性值与胰岛素抵抗的相关性分析//中华医学会感染病学分会病毒性肝炎分组. 第三届全国病毒性肝炎慢性化重症化基础与临床研究进展学术会议论文汇编. 重庆:中华医学会, 2013:166-172.
- [7] 张 鸿, 刘大风, 曾义岚, 等. 慢性乙肝 Fibroscan 弹性值与代谢参数的相关性分析. *成都医学院学报*, 2013, 8(1):35-38.
- [8] 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010年版). *中华肝脏病杂志*, 2011, 19(1):13-24.
- [9] 刘力生. 中国高血压防治指南(2010年版). 北京:人民卫生出版社, 2010.
- [10] 中国成人血脂异常防治指南制订联合委员会. 中国成人血脂异常防治指南. *中华心血管病杂志*, 2007, 35(5):390-419.
- [11] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南(2010年版). *中国糖尿病杂志*, 2012, 20(1):S1-S37.
- [12] 刘 波, 董 静, 张骏飞, 等. HBeAg 阳性与阴性慢性乙型肝炎合并脂肪肝患者临床和病理学特征分析. *实用肝脏病杂志*, 2012, 15(5):397-399.
- [13] 方红龙, 吴金明, 张雪琴, 等. 非酒精性脂肪性肝病对慢性乙型肝炎患者肝脏炎症及纤维化程度的影响. *胃肠病学和肝病杂志*, 2011, 20(2):121-123.
- [14] 柴艳云, 张锦前, 凌 伟, 等. 慢性乙型肝炎伴发代谢综合征影响因素分析. *中华实验和临床感染病杂志(电子版)*, 2009, 3(1):50-55.
- [15] KIM HY, CHO HK, YOO SK, *et al.* Hepatic STAMP2 deceases hepatitis B virus X protein-associated metabolic deregulation. *Exp Mol Med*, 2012, 44(10):622-632.
- [16] KIM KH, SHIN HJ, KIM K, *et al.* Hepatitis B virus X protein induces hepatic steatosis via transcriptional activation of SREBP1 and PPARgamma. *Gastroenterology*, 2007, 132(5):1955-1967.
- [17] 李冰昱, 王福生, 刘慧霞. 慢性乙型肝炎患者胰岛素抵抗与临床病理特点相关性研究. *中国医师杂志*, 2009, 11(5):603-605.

(2016-10-23 收稿, 2017-04-30 修回)

编辑 汤 洁

(上接第 569 页)

- [3] LAI H, JIN Q, LIN Y, *et al.* Combined use of lysyl oxidase, carcino-embryonic antigen, and carbohydrate antigens improves the sensitivity of biomarkers in predicting lymph node metastasis and peritoneal metastasis in gastric cancer. *Tumour Biol*, 2014, 35(10):10547-10554.
- [4] GAO X, ZHANG S, ZHU Z. Lysyl oxidase rs1800449 polymorphism and cancer risk among Asians; evidence from a meta-analysis and a case-control study of colorectal cancer. *Mol Genet Genomics*, 2015, 290(1):23-28.
- [5] PERRYMAN L, ERLER JT. Lysyl oxidase in cancer research. *Future Oncol*, 2014, 10(9):1709-1717.
- [6] PAPADANTONAKIS N, MATSUURA S, RAVID K. Megakaryocyte pathology and bone marrow fibrosis: the lysyl oxidase connection. *Blood*, 2012, 120(9):1774-1781.
- [7] JI F, WANG Y, QIU L, *et al.* Hypoxia inducible factor 1 α -mediated LOX expression correlates with migration and invasion in epithelial ovarian cancer. *Int J Oncol*, 2013, 42(5):1578-1588.
- [8] AGRA N, CIDRE F, GARCÍA-GARCÍA L, *et al.* Lysyl oxidase is downregulated by the EWS/FLI1 oncoprotein and its propeptide domain displays tumor suppressor activities in Ewing sarcoma cells. *PLoS One*, 2013, 8(6):e66281 [2016-10-07]. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0066281>.
- [9] WANG Y, MA J, SHEN H, *et al.* Reactive oxygen species promote ovarian cancer progression via the HIF-1 α /LOX/E-cadherin pathway. *Oncol Rep*, 2014, 32(5):2150-2158.
- [10] LIU JL, WEI W, TANG W, *et al.* Silencing of lysyl oxidase gene expression by RNA interference suppresses metastasis of breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(7):3507-3511.

(2016-10-27 收稿, 2017-04-13 修回)

编辑 汤 洁