

赖氨酰氧化酶样蛋白 2 在肺腺癌患者中的预后价值

展 平, 谢海燕

(南京市胸科医院, 江苏 南京 210029)

摘 要: [目的] 探讨 LOXL2 在肺腺癌中的表达情况及与临床病理特征预后意义。[方法] 采用免疫组化染色 (Immunohistochemical staining, IHC) 的方法检测 60 对配对的肺腺癌及癌旁组织中 LOXL2 蛋白的表达水平, 并根据免疫组化染色评分判断 LOXL2 蛋白的表达强度, 分析 LOXL2 蛋白表达与肺腺癌临床病理特征以及预后的相关性。[结果] LOXL2 蛋白在癌组织中显著性高表达。LOXL2 蛋白在肺腺癌组织中主要定位于细胞核。细胞核 LOXL2 高表达与肺腺癌的淋巴结转移 ($P=0.025$)、TNM 分期 ($P=0.031$) 相关, 并是肺腺癌差预后的独立预测因子 ($P=0.028$)。[结论] 细胞核 LOXL2 蛋白的高表达与肺腺癌患者的差预后相关, LOXL2 可以作为肺腺癌患者的一种新的预后生物指标和潜在的治疗靶点。

主题词: 赖氨酰氧化酶样蛋白 2; LOXL2; 肺腺癌; 预后; 转移

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2017)11-0973-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2017.11.B007

Prognostic Value of Lysyl Oxidase-Like 2 in Patients with Lung Adenocarcinoma

ZHAN Ping, XIE Hai-yan

(Nanjing Chest Hospital, Nanjing 210029, China.)

Abstract: [Purpose] To assess the prognostic value of lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) in patients with lung adenocarcinoma (AD). [Methods] LOXL2 protein levels were detected in 60 samples of lung AD and pericancerous lung tissues with immunohistochemical and its clinicopathologic and prognostic significance was analyzed. [Results] LOXL2 protein levels were higher in lung AD tissues than those in paired adjacent normal tissues. High LOXL2 levels were associated with increased lymph node metastasis and advanced p-TNM stage, LOXL2 levels were an independent prognostic factor in lung AD. [Conclusion] LOXL2 protein levels are associated with poor prognosis in lung AD patients. LOXL2 might serve as a prognostic biomarker and potential therapeutic target in lung AD patients.

Subject words: lysyl oxidase-like 2; LOXL2; lung adenocarcinoma; prognosis; metastasis

在世界范围内, 肺癌已经成为发病率及死亡率最高的恶性肿瘤。2015 年我国所有的癌症死亡患者中, 肺癌约占 21.6%^[1]。非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 约占所有肺癌的 80%~85%。NSCLC 分为两种主要的病理类型, 腺癌 (adenocarcinoma, AD) 和鳞状细胞癌 (squamous cell carcinoma, SCC), 其中肺腺癌约占 40%, 肺鳞癌约占

25%~30%。尽管近年来肺癌新的诊治方法层出不穷, 但是肺癌患者的总体 5 年生存率仅为 10%~15%^[3]。侵袭和转移是 NSCLC 死亡的一个重要的原因。因此, 对 NSCLC 特别是肺腺癌发病机理分子机制更好的认识, 将有助于预后指标和新治疗靶点的发展, 进一步改善临床治疗效果。

赖氨酰氧化酶样蛋白 2 (Lysyl oxidase-like 2, LOXL2) 是赖氨酰氧化酶家族的一位成员, 赖氨酰氧化酶家族包含五个成员 (LOX、LOXL1、LOXL2、LOXL3 和 LOXL4), 由高度保守的 C 端序列形成^[4]。

通讯作者: 谢海燕, 副主任医师, 学士; 南京市胸科医院呼吸内科, 江苏省南京市广州路 215 号 (210029); E-mail: xiehaiyan_njxk@sina.com

收稿日期: 2017-07-26; **修回日期:** 2017-09-14

研究表明, LOXL2 mRNA 表达水平在头颈鳞状细胞癌和卵巢癌中呈现下调^[6-8]。然而, 在乳腺癌、结肠癌、食管癌和胰腺癌和胃癌细胞株中 LOXL2 的 mRNA 表达水平呈现上调^[9-12]。LOXL2 mRNA 表达在不同肿瘤类型中的表达情况不一致, 表明其可能在不同肿瘤中的作用及功能不一致。另外, Peinado 等^[13]发现 LOXL2 可通过与 snail 相互作用促进细胞上皮间质转换(epithelial mesenchymal transformation, EMT)。Peinado 等^[13]还发现 LOXL2 的高表达可能是喉鳞状细胞癌不良预后的一种生物标志。近年来, 已有研究报道 LOXL2 蛋白高表达可作为乳腺癌^[14,15]、结肠癌^[16]和胃癌^[12,17]的差预后因素。然而, LOXL2 蛋白在肺腺癌中的表达以及其与肺腺癌临床病理特征预后的相关性仍不清楚。为此, 本研究选取包含预后信息的 60 对肺腺癌及癌旁组织进行免疫组化检测, 分析 LOXL2 的表达情况及预后价值。

1 资料与方法

1.1 组织样本

收集南京市胸科医院 2008~2013 年期间手术切除的 60 例肺腺癌患者癌组织及癌旁组织, 所有的组织经病理组织学检查确认为肺腺癌, 或者为邻近正常肺组织。所有患者术前未经化疗和/或放疗。手术切除病理组织标本经生理盐水冲洗后加入福尔马林液, 石蜡包埋成组织蜡块。纳入本研究的患者术后生存时间为 3 月以上, 术后 5 年内肺癌是其惟一死因。随访的截止日期为 2016 年 12 月 30 日。60 例 NSCLC 患者病理特征信息见 Table 1。根据南京市胸科医院伦理委员会批准的协议, 所有患者均签署标本使用知情同意书。

1.2 免疫组化染色和评分

采用免疫组化的方法对 60 例肺腺癌和匹配的邻近正常肺组织进行 LOXL2 蛋白水平进行检测, 免疫组化的方法参考本课题组以往的研究方法^[18,19], 具体的操作步骤如下: 脱蜡, 将玻片放入烤箱中, 温度 63℃, 烤蜡 1h; 取出玻片, 放入全自动染色机中, 进行脱蜡; 取出片子, 用纯水冲洗 3 次, 每次 1min; 抗原修复: 柠檬酸高压修复, 柠檬酸修复液沸腾后, 将片子放入高压锅中, 待喷气后开始计时, 5min, 自然冷却 30min; 配置内源性过氧化物酶阻断剂,

38.4ml 无水甲醇+12ml 30%浓度的 H₂O₂+9.6ml 纯水; 将片子放入阻断剂中 15min, 取出片子, PBS 缓冲液冲洗 3 次, 一次 1min; 稀释一抗(兔多克隆抗-LOXL2 抗体, 公司 Abcam, 货号 ab96233); 滴加一抗, 室温孵育半小时; PBS 缓冲液冲洗 3 次, 每次 1min。加二抗, 室温孵育 30min; PBS 冲洗 3 次, 每次 1min; DAB 显示: 1ml DAB 稀释液+1ml DAB 显色液进行配置后滴加入片子上, 显色 5min, 自来水冲洗 5min; 苏木素复染, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。将第一抗体用磷酸盐缓冲液 PBS 代替, 作为阴性对照。对所有组织都进行染色强度和染色细胞比例评估, 染色强度总分为 3 分, 染色细胞比例总分为 4 分, 通过将强度和染色细胞比例评分相乘, 计算得出总的蛋白质表达得分(总分值范围, 0~12)^[18,19]。

1.3 统计学处理

实验结果采用 GraphPad Prism 6.0 统计软件分析, 变量均以均数±标准差表示, 数据组间比较采用配对资料 *t* 检验, LOXL2 表达与肺腺癌患者临床病理特征相关性采用卡方检验, 生存分析用 K-M 生存曲线, 多因素预后分析采用 Cox 回归分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

Table 1 Relationship of LOXL2 protein expression with clinicopathological characteristics in lung AD patients

Features	N	LOXL2 expression		P value
		Low expression	High expression	
Gender				0.236
Male	29	20	9	
Female	31	14	17	
Age(years old)				0.125
<65	36	21	15	
≥65	24	13	11	
Size of tumor				0.202
≤3cm	27	13	14	
>3cm	33	21	12	
Grade				0.231
Low	12	5	7	
High	48	29	19	
Lymph node metastasis (pN)				0.025
N ₀	37	26	11	
N ₁₋₃	23	8	15	
p-TNM stage				0.031
I	21	16	5	
II	12	9	3	
III	27	9	18	

2 结果

2.1 LOXL2mRNA 在 Oncomine 数据库中的表达水平

在 Oncomine 数据库中检索 LOXL2 在 NSCLC 及配对正常组织中 mRNA 差异表达情况,发现在 2 个研究的数据集中(Beer 等研究和 Hou 等研究^[20-21])呈现高表达,且差异具有统计学意义(Figure 1)。

2.2 肺腺癌组织中 LOXL2 情况

利用免疫组织化学染色的方法在 60 对肺腺癌和匹配的癌旁肺组织中检测 LOXL2 的蛋白表达情况,结果发现 LOXL2 蛋白主要位于细胞核中。根据 LOXL2 的染色强度及染色细胞比例的乘积进行综合评分,肺腺癌组织的染色评分的平均值为 4.5 分,而对应癌旁组织的染色评分的平均值为 0.5 分,肺腺癌组织中的 LOXL2 表达明显高于癌旁组织(Figure 2)。

2.3 LOXL2 蛋白表达水平和临床病理特征及预后之间的相关性分析

将 LOXL2 在 60 例肺腺癌中的染色评分的平均值(4.5 分)作为判断表达高低的截断值,结果表明 LOXL2 高表达的患者有 26 例,而低表达者有 34 例(Figure 3A)。LOXL2 蛋白表达与临床病理特征之间的相关性分析结果表明,LOXL2 高表达与患者的淋巴结转移及 TNM 分期相关(Table 1)。

本研究中患者中位生存时间为 28 个月(14~81 个月),通过 K-M 生存分析、Log-rank 检验发现 LOXL2 高表达的生存明显差于 LOXL2 低表达组(Figure 3B)。Cox 多因素分析显示 LOXL2 高表达也是预后判断的独立因素(Table 2)。术后 TNM 分期(HR=1.927,95%CI:1.362~3.527, $P=0.041$)及细胞核 LOXL2 蛋白高表达(HR=2.321,95%CI:1.405~

4.528, $P=0.028$)是肺腺癌患者独立的差预后因素。

3 讨论

本课题研究在 Oncomine 数据库中发现, LOXL2mRNA 表达水平在 NSCLC 组织中呈现高表达。在 60 对配对的肺腺癌及癌旁组织中,LOXL2 的蛋白水平在肺腺癌组织中也明显增高。另外,细胞核 LOXL2 蛋白高表达与肺腺癌患者的淋巴结转移和术后病理 TNM 分期相关,更重要的是,我们还发现细胞核 LOXL2 蛋白高表达是肺腺癌患者差预后的

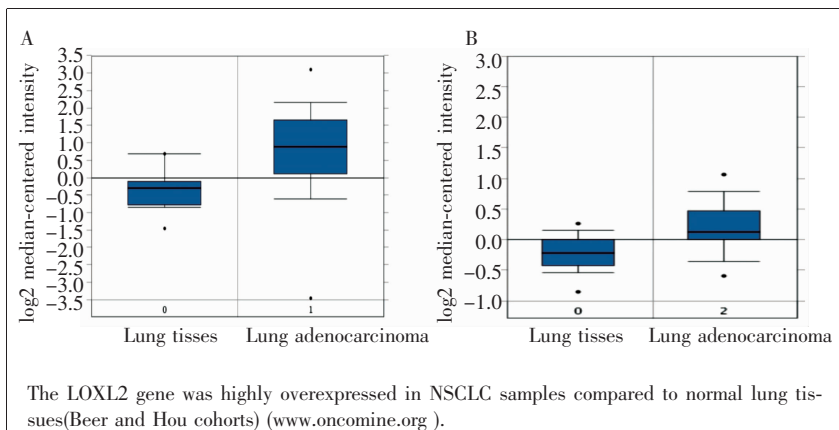


Figure 1 LOXL2 is highly overexpressed in human NSCLC samples from the Oncomine database

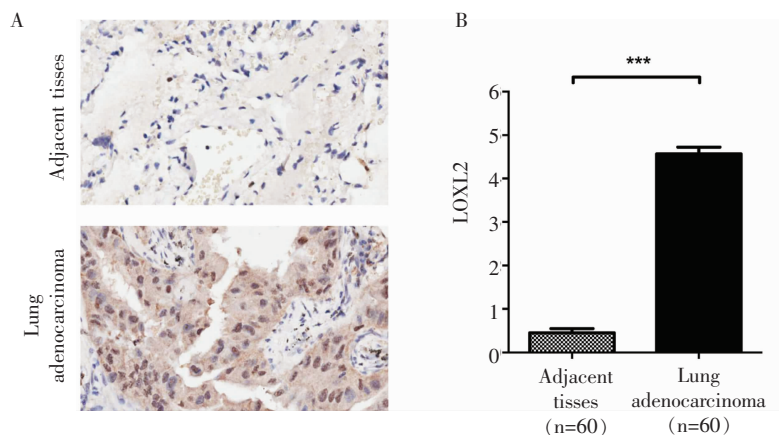


Figure 2 LOXL2 levels are elevated in primary lung AD tissues

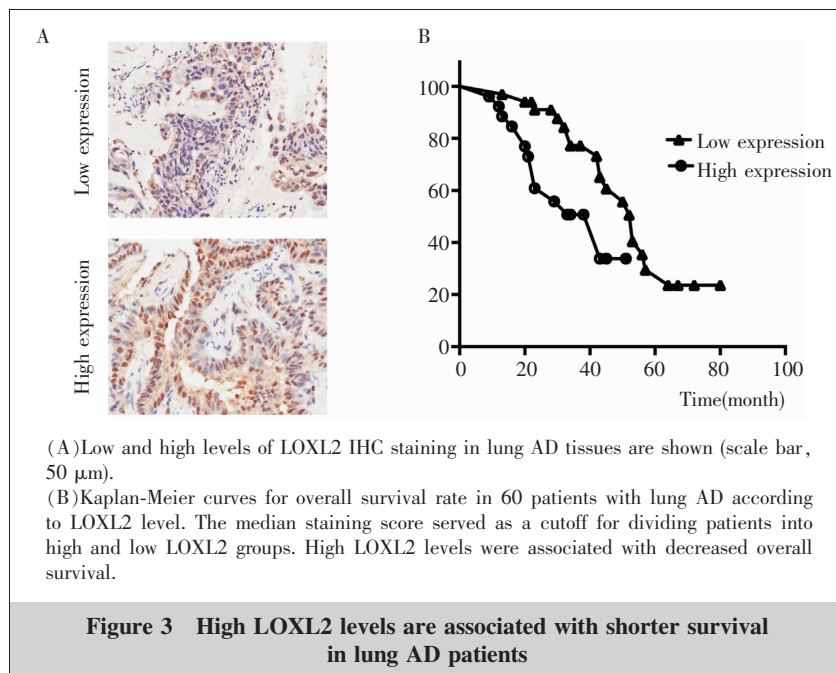


Table 2 Multivariate analyses of prognostic factors for OS in lung AD patient

Factors	HR(95%CI)	P
Age(≥ 65 / <65 years)	2.699(0.769~4.698)	0.311
Gender(Female/Male)	1.351(0.631~1.822)	0.321
Size of tumor (>3 cm/ ≤ 3 cm)	1.432(0.552~2.545)	0.908
Grade(High/Low)	1.621(0.572~3.521)	0.221
N stage(N1~3/N0)	1.681(1.163~3.531)	0.034
p-TNM Stage (I ~ II vs III)	1.927(1.362~3.527)	0.041
LOXL2 expression (High/Low)	2.321(1.405~4.528)	0.028

独立预测因素。

既往有研究表明,在胃癌细胞组织与匹配的正常组织中,LOXL2 高表达与胃癌的侵袭程度、淋巴结转移及差预后相关^[12]。在食管鳞状上皮细胞癌中(ESCC),LOXL2 的细胞质高表达与淋巴结转移相关^[22]。Zou 等^[23]进一步在食管鳞癌中探讨了 LOXL2 的恶性肿瘤生物学功能,结果发现了一种新的 LOXL2 剪接变体(缺乏 72 个核苷酸),与野生型的 LOXL2 相比,这种新的 LOXL2 剪接变体具有更强的侵袭与转移能力。既往及本课题研究表明,LOXL2 高表达与人体胃癌、食管癌及肺腺癌等实体瘤的侵袭转移相关。

上皮-间叶样表型转化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT) 是指上皮细胞向间质细胞样转化,是具有极性的上皮细胞失去原来的极性,转变为活动能力较强的间质细胞,并具有迁移和侵袭能力

的一种现象^[24]。已有研究认为,LOXL2 可以通过调控 EMT 过程调控肿瘤细胞增殖及转移。近期有研究表明,LOXL2 可以通过抑制 Snail 的降解从而促进 EMT 的进程,肿瘤细胞分泌的 LOXL2 可以提高上皮细胞的可塑性^[25]。另外,Peinado 等^[26]发现,LOXL2 可通过与 snail 相互作用促进 EMT 过程。此外,分泌的 LOXL2 通过上调金属蛋白酶组织抑制因子-1(TIMP-1) 和基质金属蛋白酶-9(MMP-9),调整细胞外基质重塑,从而促进肿瘤细胞的侵袭能力^[9]。还需要其他研究来进一步证实 LOXL2 对肺腺癌侵袭转移的作用及分子机制。

本研究也存在一定的局限性,首先该研究属于回顾性研究,而且样本量相对较小。但是,本课题研究按照严格的标本收集流程,成对的收集了肺腺癌组织及配对的正常肺组织,并制作成石蜡标本,用于免疫组化。另外,我们也对这些肺腺癌患者进行了定期的随访,完整采集了患者的预后信息资料。本研究利用这些预后信息完整的标本通过免疫组化分析的方法发现,LOXL2 在肺腺癌中明显上调,而且可以作为肺腺癌患者差的预后因素。

本课题研究结果表明,LOXL2 蛋白水平在肺腺癌组织中明显高表达,LOXL2 蛋白高表达与肺腺癌患者的淋巴结转移及 TNM 分期相关,LOXL2 蛋白高表达的肺腺癌患者预后更差,并且是一种独立的差预后的预测因子。这些结果表明,LOXL2 可能对肺腺癌的致癌和恶化起着关键的作用,有可能成为干预肺癌进展转移的一个治疗靶点。

参考文献:

- [1] Chen W,Zheng R,Baade PD,et al. Cancer statistics in China,2015[J]. CA Cancer J Clin,2016,66(2):115-132.
- [2] Ettinger DS,Wood DE,Akerley W,et al. Non-small cell lung cancer,Version 6.2015[J]. J Natl Compr Canc Netw,2015,13(5):515-524.
- [3] Siegel R,DeSantis C,Virgo K,et al. Cancer treatment and survivorship statistics,2012[J]. CA Cancer J Clin,2012,

- 62(4):220–241.
- [4] Csiszar K. Lysyl oxidases;a novel multifunctional amine oxidase family [J]. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 2001, 70:1–32.
 - [5] Borel A,Eichenberger D,Farjanel J,et al. Lysyl oxidase-like protein from bovine aorta. isolation and maturation to an active form by bone morphogenetic protein-1[J]. *The Journal of biological chemistry*, 2001, 276(52):48944–48949.
 - [6] Zhan P,Shen XK,Qian Q,et al. Down-regulation of lysyl oxidase-like 2(LOXL2) is associated with disease progression in lung adenocarcinomas [J]. *Medical Oncology (Northwood, London, England)*, 2012, 29(2):648–655.
 - [7] Hough CD,Sherman-Baust CA,Pizer ES,et al. Large-scale serial analysis of gene expression reveals genes differentially expressed in ovarian cancer [J]. *Cancer Research*, 2000, 60(22):6281–6287.
 - [8] Rost T,Pyritz V,Rathcke IO,et al. Reduction of LOX- and LOXL2-mRNA expression in head and neck squamous cell carcinomas [J]. *Anticancer Res*, 2003, 23(2B): 1565–1573.
 - [9] Barker HE,Chang J,Cox TR,et al. LOXL2-mediated matrix remodeling in metastasis and mammary gland involution[J]. *Cancer Research*, 2011, 71(5):1561–1572.
 - [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[J]. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 2007, 46(7):644–655.
 - [11] Ruckert F,Joensson P,Saeger HD,et al. Functional analysis of LOXL2 in pancreatic carcinoma [J]. *Int J Colorectal Disease*, 2010, 25(3):303–311.
 - [12] Peng L,Ran YL,Hu H,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.
 - [13] 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 Research*, 2008, 68(12):4541–4550.
 - [14] Ahn SG,Dong SM,Oshima A,et al. LOXL2 expression is associated with invasiveness and negatively influences survival in breast cancer patients [J]. *Breast Cancer Research & Treatment*, 2013, 141(1):89–99.
 - [15] Chang J,Nicolau MM,Cox TR,et al. LOXL2 induces aberrant acinar morphogenesis via ErbB2 signaling [J]. *Breast Cancer Research Bcr*, 2013, 15(4):R67.
 - [16] Torres S,Garcia-Palmero I,Herrera M,et al. LOXL2 is highly expressed in cancer-associated fibroblasts and associates to poor colon cancer survival [J]. *Clin Cancer Research*, 2015, 21(21):4892–4902.
 - [17] Kasashima H,Yashiro M,Kinoshita H,et al. Lysyl oxidase-like 2(LOXL2) from stromal fibroblasts stimulates the progression of gastric cancer[J]. *Cancer Lett*, 2014, 354(2): 438–446.
 - [18] Zhan P,Zhang B,Xi GM,et al. PRC1 contributes to tumorigenesis of lung adenocarcinoma in association with the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1):108.
 - [19] Zhan P,Xi GM,Zhang B,et al. NCAPG2 promotes tumour proliferation by regulating G2/M phase and associates with poor prognosis in lung adenocarcinoma [J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(4):665–676.
 - [20] Beer DG,Kardia SL,Huang CC,et al. Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma[J]. *Nature medicine*, 2002, 8(8):816–824.
 - [21] Hou J,Aerts J,den Hamer B,et al. Gene expression-based classification of non-small cell lung carcinomas and survival prediction[J]. *PLoS One*, 2010, 5(4):e10312.
 - [22] Li TY,Xu LY,Wu ZY,et al. Reduced nuclear and ectopic cytoplasmic expression of lysyl oxidase-like 2 is associated with lymph node metastasis and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Human Pathology*, 2012, 43(7):1068–1076.
 - [23] Zou HY,Lv GQ,Dai LH,et al. A truncated splice variant of human lysyl oxidase-like 2 promotes migration and invasion in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2016, 75:85–98.
 - [24] Davis FM,Stewart TA,Thompson EW,et al. Targeting EMT in cancer:opportunities for pharmacological intervention[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2014, 35(9):479–488.
 - [25] Cuevas EP,Moreno-Bueno G,Canesin G,et al. LOXL2 catalytically inactive mutants mediate epithelial-to-mesenchymal transition[J]. *Biology Open*, 2014, 3(2):129–137.
 - [26] Peinado H,Iglesias-de Del Carmen,la Cruz M,et al. A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in snail regulation and tumor progression[J]. *The EMBO journal*, 2005, 24(19):3446–3458.