

本文引用格式:毕惠娟,尹丽娜,魏欣宇,等.LOXL4在乳腺癌中的表达水平及临床意义[J].安徽医学,2024,45(5):549-552.DOI:10.3969/j.issn.1000-0399.2024.05.003

LOXL4在乳腺癌中的表达水平及临床意义

毕惠娟 尹丽娜 魏欣宇 王娜娜 杨苗苗 沈继录

[摘要] 目的 探讨赖氨酰氧化酶-4(LOXL4)在乳腺癌患者组织中表达水平及与临床特征之间的关系。方法 采用实时荧光定量PCR法检测乳腺癌细胞株及我院收治的30例乳腺癌患者组织样本中LOXL4 mRNA表达水平;采用免疫组化法检测乳腺癌组织LOXL4蛋白表达水平,并对结果进行统计分析。结果 MCF-7、SKBR-3、MDA-MB-231、MDA-MB-468四株乳腺癌细胞中LOXL4 mRNA表达量较对照组细胞株MCF10A升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。30例乳腺癌患者组织样本LOXL4 mRNA表达的阳性率高于癌旁组织,差异有统计学意义($P<0.05$);LOXL4 mRNA在Ⅲ~Ⅳ期患者中表达量较Ⅰ~Ⅱ期升高,差异有统计学意义($P<0.05$);转移组LOXL4基因表达水平较未转移组升高,差异有统计学意义($P<0.05$);SP结果表明,乳腺癌患者LOXL4表达阳性率为90.0%(27/30),其中弱阳性和强阳性占总病例数的比例分别为30%(9/30)和60%(18/30);对照组乳腺组织中LOXL4表达阳性率为26.7%(8/30),阳性染色强度均较乳腺癌组弱,乳腺癌患者乳腺组织LOXL4蛋白表达阳性率较对照组升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 LOXL4无论在基因水平还是蛋白水平,在乳腺癌患者中高表达,可能参与疾病进展,可作为一种潜在的肿瘤生物标志物。

[关键词] 乳腺癌;赖氨酰氧化酶-4;mRNA;荧光定量PCR;免疫组化

doi:10.3969/j.issn.1000-0399.2024.05.003

乳腺癌是女性常见恶性肿瘤之一,其发病率和病死率分别位居我国癌症第2和第5位^[1]。乳腺癌细胞的高侵袭性和转移性是导致其预后不良的重要原因^[2],因此,揭示乳腺癌侵袭转移机制,对于提高患者生存率具有重要的临床意义^[3]。赖氨酰氧化酶4(lysyl oxidase 4, LOXL4)是一种铜依赖性单胺氧化酶,其主要功能是通过共价交联细胞外基质(extracellular matrix, ECM)中胶原蛋白和弹性蛋白以维持ECM结构的完整性^[4],而ECM的稳定性与肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭及血管生成密切相关^[5]。研究表明,LOXL4在头颈癌^[6]、食管癌^[7]、肝癌^[8]等多种肿瘤中高表达。Tan等^[9]报道了LOXL4可通过外泌体的方式,调节巨噬细胞介导的呈递抑制性检查点分子程序性死亡配体1,削弱细胞毒性T细胞介导的免疫监视功能,促进肿瘤的进展。本研究拟通过采用定量聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)及免疫组化的方法初步探究乳腺癌患者LOXL4表达情况,并分析其临床意义,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 细胞株:人乳腺癌细胞株SKB-3、

MCF7、MDA-MB-231、MDA-MB-468均购自上海中科院细胞库;组织样本:收集2019年1月至2022年12月在安徽医科大学第一附属医院北区普外科收治确诊为乳腺癌并手术切除的组织标本30例女性患者,年龄29~68岁,平均(51.8±7.92)岁,所有患者均经病理证实为乳腺恶性肿瘤^[10]。按TNM临床分期,其中Ⅰ期3例,Ⅱ期14例,Ⅲ期9例,Ⅳ期4例;根据是否存在淋巴结或远处转移分为未转移组和转移组,其中转移组21例,未转移组9例。对照组来源于癌旁正常组织样本30例。所有标本离体后立即放入EP管置于液氮保存。本研究经医院医学研究伦理委员会批准并同意(伦理批号:LS-2023-024)。

1.1.2 主要试剂 DMEM高糖培养基(Hyclone公司)、胎牛血清(Hyclone公司)、细胞培养瓶、培养板(Hyclone公司)、胰酶(Sigma公司)、RNA提取试剂盒(TakaRa公司)、逆转录试剂盒(Takara公司)、qRT-PCR引物设计与合成(上海生工),SYBR®Green定量反应试剂盒(Takara公司);兔抗人LOXL4单克隆抗体(Abcam公司),羊抗兔IgG-HRP标记抗体(Abcam公司);总RNA抽提试剂RNAiso Reagent购自TakaRa公司,逆转录试剂盒(RevertAid™ First Strand cDNA Syn-

基金项目:安徽医科大学临床科学基金项目(编号:2021xkj182),安徽省转化医学研究科研基金项目(编号:2021zhxy-C55),安徽省高校自然科学基金研究重点项目(编号:2023AH050568)

作者单位:230000 安徽合肥 安徽省公共卫生临床中心(安徽医科大学第一附属医院北区检验科)

通信作者:沈继录,shenjilu@126.com

thesis Kit #K)购自 TakaRa 公司。Taq 酶(2×Taq PCR MasterMix)、DL2000 DNA Marker 均购自 TakaRa 公司。LOXL4、GAPDH 引物由上海生工有限公司设计并合成。

1.1.3 主要仪器 ABI-7500 荧光定量 PCR 仪器(Roche 公司)、CHP-240HE 二氧化碳培养箱(上海三发)、GelDoc Go 凝胶成像系统(BRO-RAD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 乳腺癌细胞株 MCF-7、SKBR-3、MDA-MB-231、MDA-MB-468 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基。置于 37℃, 5%CO₂ 饱和度二氧化碳培养箱中孵育。

1.2.2 总 RNA 抽提 依照试剂说明书,裂解细胞和组织样本后,将 gDNA 柱置于 2 mL 的收管集上,加入裂解液,12 000 r/min 离心 1 min,弃去 gDNA 柱,保留收集管中滤液。加入等体积 70% 乙醇,充分混匀,立即转入 RNA 柱中,12 000 r/min 离心 1 min,弃滤液,加入 500 μL Buffer RWA,12 000 r/min 离心 30 s,弃滤液,加入 600 μL 的 Buffer RWB,12 000 r/min 离心 30 s,弃滤液,将 RNA 柱重新置于收集管上,12 000 r/min 离心 2 min,将 RNA 柱重新安置于 1.5 mL 的无酶收集管上,在 RNA 柱膜中央处加入 50 μL 的 0.1% DEPC 水,室温静置 5 min。12 000 r/min 离心 2 min 洗脱 RNA,保存于-80℃超低温冰箱备用。

1.2.3 cDNA 合成 依照逆转录试剂盒使用说明,所有体系均在冰上配置,分 2 步进行:第一步在反应管中依次加入 2.0 μL 5×g DNA Eraser Buffer、1.0 μL gDNA Eraser、1.0 μg Total RNA,最后用 RNase Free dH₂O 补足至总体积 10 μL,反应条件为 42℃ 2 min,;第二步在上述体系中,继续加入 RT Primer Mix 1.0 μL、5×PrimeScript Buffer 2 4.0 μL、PrimeScript RT Enzyme Mix I 1.0 μL、RNase Free dH₂O 4.0 μL。反应条件为:37℃ 15 min, 85℃ 5 s, 4℃ 5 min,最终逆转录产物 cDNA 置-20℃保存备用。

1.2.4 qRT-PCR 检测 LOXL4 mRNA 表达:实时荧光定量 PCR 所使用的 LOXL4、GAPDH 引物由上海生工生物工程股份有限公司设计合成,具体序列见表 1。反应条件:95℃ 30 s, 95℃ 5 s, 60℃ 30 s,反应结束后,可获得每个孔的反应数据,再根据标准曲线,分析 LOXL4 mRNA 相对表达量。 $\Delta Ct=Ct(\text{目的基因})-Ct(\text{管家基因})$, $\Delta\Delta Ct=\Delta Ct(\text{研究组})-\Delta Ct(\text{对照组})$,每个基因的相对表达量为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

1.2.5 免疫组化检测 LOXL4 蛋白 常规切取乳腺癌组织切片(3~4 μm),置 60℃烤箱烤片 1 h 后,将切片置于新鲜二甲苯中脱蜡、水化后,采用高温高压法进行组

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因	引物序列
LOXL4	F: 5'-CCGCTGCAAGTATGATGG-3' R: 5'-GTTCTGAGACGCTGTTTC-3'
GAPDH	F: 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3' R: 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'

织抗原修复(将切片置于 3% 双氧水中,微波低热 3 min),抗原修复后,滴加 50 μL LOXL4(1:200 稀释)单克隆抗体,置湿盒中 4℃过夜(对照组采用 PBS 液替代 LOXL4 抗体),滴加 HRP 二抗 50 μL,孵育 30 min, DAB 显色,苏木素对比染色,脱水,封片,显微镜下观察。细胞中出现棕黄色颗粒即判为阳性结果,根据染色深度及分布进行记分,最终根据记分进行综合判断^[11],其中综合评分≤3 分判定为阴性(-),综合评分 4~6 分为弱阳性(+),综合评分>6 分为强阳性(++)。

1.3 统计方法 采用 SPSS 21.0 进行统计分析。正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验;偏态分布计量资料用 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,两组间比较采用 Mann-Whitney *U* 检验。计数资料以百分比表示,两组间比较采用 χ^2 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

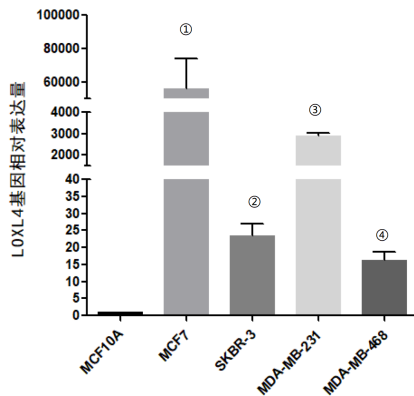
2 结果

2.1 qRT-PCR 检测四株人乳腺癌细胞 LOXL4 基因的表达 MCF-7、SKBR-3、MDA-MB-231、MDA-MB-468 四株乳腺癌细胞中 LOXL4 mRNA 表达量依次为:(6 166.89±1 346.37)、(23.58±5.67)、(2 902.46±230.63)和 (16.33±4.11),均较对照组细胞株 MCF10A 的 LOXL4 mRNA 表达量(1.00±0.00)升高,差异有统计学意义($t=3.138, P=0.035$; $t=6.898, P=0.002$; $t=21.79, P<0.001$; $t=6.462, P=0.003$)。见图 1。

2.2 qRT-PCR 检测乳腺癌患者组织 LOXL4 mRNA 表达情况 乳腺癌患者组织 LOXL4 mRNA 表达量为 (1.44±0.48),高于癌旁组织(1.00±0.00),差异有统计学意义($t=-5.074, P<0.001$)。见图 2。

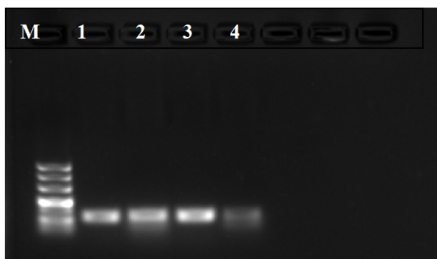
2.3 免疫组化检测乳腺癌患者组织 LOXL4 蛋白表达情况 乳腺癌患者 LOXL4 表达阳性率为 90.0%(27/30),其中弱阳性和强阳性占总病例数的比例分别为 30%(9/30)和 60%(18/30);30 例癌旁正常乳腺组织中 LOXL4 表达阳性率为 26.7%(8/30),阳性染色强度均较乳腺癌组弱,见图 3。乳腺癌患者乳腺组织 LOXL4 蛋白表达阳性率较对照组高,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

2.4 LOXL4 mRNA 表达与临床资料之间关系 LOXL4 mRNA 表达量在 III~IV 期患者中表达量较 I~II



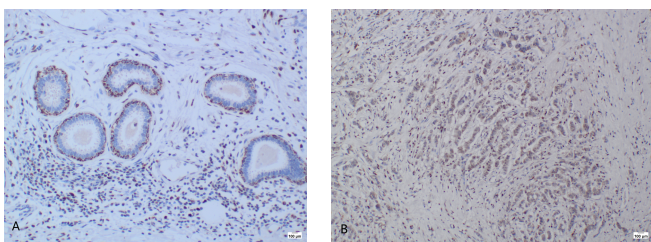
注:与 MCF-10A 组比较,① $P < 0.05$;与 MCF-10A 组比较,② $P < 0.01$;与 MCF-10A 组比较,③ $P < 0.001$;与 MCF-10A 组比较,④ $P < 0.01$ 。

图 1 LOXL4/GAPDH 基因在乳腺癌细胞株中表达量



注:M 为 Marker;1,2 为乳腺癌患者 GAPDH 及 LOXL4;3,4 为乳腺癌旁组织 GAPDH 及 LOXL4。

图 2 LOXL4/GAPDH 基因在乳腺癌组织中的表达



注:A 为癌旁组织,B 为乳腺癌组织。

图 3 乳腺癌患者乳腺组织 LOXL4 蛋白表达($\times 200$)

表 2 LOXL4 蛋白在乳腺癌组织中的表达情况[例(%)]

组别	例数	LOXL4 蛋白		
		-	+	++
对照组	30	22(73.4)	7(23.3)	1(3.3)
乳腺癌组	30	3(10.0)	9(30.0)	18(60.0)
χ^2 值			24.754	
P 值			< 0.001	

期升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);转移组 LOXL4 mRNA 表达量较未转移组升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 LOXL4 mRNA 与乳腺癌临床资料关系($n=30, \bar{x} \pm s$)

分组	例数	LOXL4 mRNA	t 值	P 值
病理分期			-2.868	< 0.001
I ~ II	17	1.25 \pm 0.46		
III ~ IV	13	1.69 \pm 0.37		
转移与否			-2.955	< 0.001
是	21	1.59 \pm 0.40		
否	9	1.09 \pm 0.47		

3 讨论

随着人们生活水平的提高和生活方式的改变,乳腺癌的发生率和病死率明显增加且年轻化。乳腺癌的早期发现和治疗是改善其预后、提高生存率的重要策略之一^[11]。研究表明,欧美国家通过广泛推行标准、规范的乳腺癌筛查可将早期发现提升至 80%,这对乳腺癌的防治及预后改善具有重要的临床意义^[12]。目前临床上针对乳腺癌的早期筛查的常规血清学指标只有 CA153,且该指标灵敏度和特异度较低,存在假阳性率、假阴性率高等问题^[13],因此临床急需寻找更高灵敏度和特异度的乳腺癌早期筛查标志物。LOXL4 是一类催化细胞外基质中弹性蛋白和胶原蛋白赖氨酸和羟氨酸分子缩合,将存在于二者间的可溶性单体转化为不可溶性纤维,抵抗非特异性蛋白水解酶的溶解,维持细胞外基质的稳定性,大量研究表明,LOXL4 在食管鳞状细胞癌^[14]、头颈癌^[15]、结直肠癌、肺癌、肝癌^[16]等多种肿瘤中高表达,且与肿瘤的增殖、迁移、侵袭、患者预后和总生存率存在显著关联,有望成为多种癌症筛查及预后标志物的可能^[17]。本研究发现无论是乳腺癌细胞株还是乳腺癌组织中均存在 LOXL4 基因表达升高,且与乳腺癌患者的病理分期及转移有关,这提示 LOXL4 参与乳腺癌的发生发展过程,且可能作为一种潜在的肿瘤标志物用于乳腺癌的筛查与诊疗。

本文采用 qRT-PCR 法检测人乳腺癌细胞(MCF-7、SKBR-3、MDA-MB-231、MDA-MB-468)中 LOXL4 的表达情况,结果显示,LOXL4 mRNA 在 MCF-7、SKBR-3、MDA-MB-231、MDA-MB-468 四株人乳腺癌细胞中的表达水平较对照组细胞株 MCF-10A 升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),由此推测,LOXL4 可能参与乳腺癌的发生与发展,但具体机制尚不明确。本研究结果显示,乳腺癌患者组织中 LOXL4 mRNA 表达水平较对照组升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。乳腺癌患者 LOXL4 蛋白表达阳性率为 90.0%,癌旁组织中 LOXL4 表达阳性率为 26.7%,乳腺癌患者组织 LOXL4 蛋白表达阳性率较对照组高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。进一步分析临床资料,发现 LOXL4 mRNA 表达量在 III ~ IV 期患者中表达量较 I ~ II 期升高;转移

组 LOXL4 mRNA 表达量较未转移组升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。这些结果均表明,乳腺癌患者 LOXL4 无论在基因水平还是蛋白水平均存在高表达,且病理分期越晚,表达水平越高。Choi 等^[18]研究表明,LOXL4 可通过诱导胶原合成、沉积和结构变化等参与细胞外基质重塑,促进三阴乳腺癌细胞的生长和转移,且 LOXL4 表达水平并与三阴乳腺癌的生存率密切相关。Yin 等^[19]研究明确了 EZH2-miR29b/miR-30d-LOXL4 信号通路参与了乳腺癌的发生,并通过表观遗传调控巨噬细胞的激活,可作为乳腺癌潜在治疗靶点。Komalasari 等^[20]在最新的研究结果中揭示了 LOXL4 可催化细胞表面膜联蛋白 A2 的活化,阻止整合素 $\beta 1$ 的内化,在乳腺癌的进展中发挥作用。这些结果均是基于体外乳腺癌细胞株或构建乳腺癌小鼠模型的基础研究得出,本研究则基于临床病人样本进一步证实了 LOXL4 参与了乳腺癌的疾病进程,并且与乳腺癌的转移密切相关。

本研究属于横向研究,存在一定的局限性,无法确定 LOXL4 与乳腺癌之间的因果关系,也无法了解 LOXL4 在乳腺癌的疾病进展过程中的具体作用机制。因此,后期将通过体外试验进一步探讨 LOXL4 促进乳腺癌进展的具体机制研究。此外,本次研究中选取的患者范围及数量存在局限性,仍需多中心、大样本临床数据进一步验证。

参考文献

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3):209-249.
- [2] WILKINSON L, GATHANI T. Understanding breast cancer as a global health concern [J]. *Br J Radiol*, 2022, 95(1130): 20211033.
- [3] BRITT K L, CUZICK J, PHILLIPS K A. Key steps for effective breast cancer prevention [J]. *Nat Rev Cancer*, 2020, 20(8): 417-436.
- [4] CHEN W, YANG A, JIA J, et al. Lysyl oxidase (LOX) family members: rationale and their potential as therapeutic targets for liver fibrosis [J]. *Hepatology*, 2020, 72(2):729-741.
- [5] NAJAFI M, FARHOOD B, MORTEZAEI K. Extracellular matrix (ECM) stiffness and degradation as cancer drivers [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(3):2782-2790.
- [6] ALTUNTAŞ O M, SÜSLÜ N, GÜLER TEZEL Y G, et al. Lysyl oxidase like-4 (LOXL4) as a tumor marker and prognosticator in advanced stage laryngeal cancer[J]. *Braz J Otorhinolaryngol*, 2022,88(6):968-974.
- [7] XIE W, HUANG P, WU B, et al. Clinical significance of LOXL4 expression and features of LOXL4-associated protein-protein interaction network in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Amino Acids*, 2019,51(5):813-828.
- [8] LI R, WANG Y, ZHANG X, et al. Exosome-mediated secretion of LOXL4 promotes hepatocellular carcinoma cell invasion and metastasis [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1):18.
- [9] TAN HY, WANG N, ZHANG C, et al. Lysyl oxidase-like 4 fosters an immunosuppressive microenvironment during hepatocarcinogenesis [J]. *Hepatology*, 2021, 73(6):2326-2341.
- [10] 国家肿瘤质控中心乳腺癌专家委员会, 中国抗癌协会乳腺癌专业委员会, 中国抗癌协会肿瘤药物临床研究专业委员会. 中国晚期乳腺癌规范诊疗指南(2022版) [J]. *中华肿瘤杂志*, 2022, 44(12):1262-1287.
- [11] FAHAD ULLAH M. Breast cancer: current perspectives on the disease status[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1152:51-64.
- [12] WU Z J, LIU Y, LI X H, et al. Factors associated with breast cancer screening participation among women in mainland China: a systematic review[J]. *BMJ Open*, 2019, 9(8): e028705.
- [13] SEALE K N, TKACZUK K H R. Circulating biomarkers in breast cancer[J]. *Clin Breast Cancer*, 2022,22(3):e319-e331.
- [14] DU Z, XIA Q, WU B, et al. The analyses of SRCR genes based on protein-protein interaction network in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(5): 2683-2705.
- [15] REN P, NIU X, ZHAO R, et al. Long non-coding RNA AGAP2-AS1 promotes cell proliferation and invasion through regulating miR-193a-3p/LOXL4 axis in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. *Cell Cycle*, 2022,21(7):697-707.
- [16] SHAO J, LU J, ZHU W, et al. Derepression of LOXL4 inhibits liver cancer growth by reactivating compromised p53[J]. *Cell Death Differ*, 2019,26(11):2237-2252.
- [17] WANG J, CHEN C, HUANG J, et al. The possibilities of LOXL4 as a prognostic marker for carcinomas[J]. *Amino Acids*, 2023,55(11):1519-1529.
- [18] CHOI S K, KIM H S, JIN T, et al. LOXL4 knockdown enhances tumor growth and lung metastasis through collagen-dependent extracellular matrix changes in triple-negative breast cancer [J]. *Oncotarget*, 2017,8(7):11977-11989.
- [19] YIN H, WANG Y, WU Y, et al. EZH2-mediated Epigenetic silencing of miR-29/miR-30 targets LOXL4 and contributes to tumorigenesis, metastasis, and immune microenvironment remodeling in breast cancer[J]. *Theranostics*, 2020, 10(19): 8494-8512.
- [20] KOMALASARI NLGY, TOMONOBU N, KINOSHITA R, et al. Lysyl oxidase-like 4 exerts an atypical role in breast cancer progression that is dependent on the enzymatic activity that targets the cell-surface annexin A2r[J]. *Front Oncol*, 2023,13:1142907.

(2023-10-13收稿)

(本文编校:朱岚,张迪)