

结直肠癌患者赖氨酰氧化酶检测的临床意义

杨永宾¹, 杨洁², 张红鹏³, 白海岭³, 石晓明^{1△}

(1. 河北省人民医院普外二科, 石家庄 050051; 2. 河北省人民医院血液科, 石家庄 050051;

3. 邯郸市人民医院外科, 河北邯郸 056005)

[摘要] 目的 探讨赖氨酰氧化酶(LOX)在结直肠癌(CRC)患者组织及外周血中的表达情况,并分析其关系和临床意义。

方法 选取 2014 年 1~12 月于河北省人民医院行 CRC 切除术的 96 例患者作为 CRC 组,其中行根治性手术者 74 例(根治组),非根治性手术者 22 例(非根治组);同时选取体检健康者 60 例作为对照组。取 CRC 患者肿瘤及癌旁正常黏膜组织,采用免疫组织化学染色检测 LOX 表达;采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测各组外周血 LOX、癌胚抗原(CEA)、糖链抗原 19-9(CA19-9)表达水平。结果 CRC 组织中 LOX 阳性率(75.00%)高于癌旁正常黏膜(26.04%),且非根治组肿瘤组织 LOX 阳性率(95.45%)高于根治组(68.92%),差异均有统计学意义($P<0.05$)。CRC 患者外周血 LOX、CEA 及 CA19-9 水平均高于对照组,非根治组患者外周血 LOX 水平高于根治组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。CRC 患者肿瘤组织 LOX 表达水平与外周血 LOX 水平呈正相关($r=0.75, P<0.05$)。CRC 患者外周血 LOX 与 CEA 水平呈正相关($r=0.42, P<0.05$);CRC 患者外周血 LOX 与 CA19-9 水平无明显相关性($r=0.12, P>0.05$)。结论 CRC 患者外周血及肿瘤组织中 LOX 表达水平增高,且与肿瘤转移有关,检测外周血 LOX 水平对预测 CRC 转移有意义。

[关键词] 结直肠癌;赖氨酰氧化酶;癌胚抗原;转移

[中图分类号] R735.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)35-4971-03

Clinical significance of determination of the serum levels and the expression of LOX in patients with colorectal cancer

Yang Yongbin¹, Yang Jie², Zhang Hongpeng³, Bai Hailing³, Shi Xiaoming^{1△}

(1. Department of General Surgery, Hebei General Hospital, Shijiazhuang, Hebei 050051, China;

2. Department of Hematology, Hebei General Hospital, Shijiazhuang, Hebei 050051, China;

3. Department of Surgery, the People's Hospital of Handan, Handan, Hebei 056005, China)

[Abstract] **Objective** To explore the expression status of lysyl oxidase(LOX) in tumor tissues and peripheral serum of patients with colorectal cancer(CRC), and to analyse their relationships and clinical significance. **Methods** A total of 96 cases of patients with CRC who underwent surgical resection of CRC in Hebei General Hospital were enrolled into the CRC group, among them, there was 74 cases of patients underwent radical surgery(radical surgery group), while the other 22 cases of patients underwent palliative surgery(palliative surgery group). Simultaneously, 60 cases of healthy individuals were enrolled into the control group. The colorectal cancer tissues and the adjacent normal tissue were collected from patients with CRC, and the immunohistochemical technique was performed to detect the expression of LOX. The peripheral serum levels of LOX, CEA and CA19-9 were detected by using ELISA in 96 cases of patients with CRC and 60 healthy volunteers. **Results** The positive rate of LOX expression in colorectal cancer tissues(75.00%) was significantly higher than that in adjacent normal tissues(26.04%), and the positive rate of LOX expression in the palliative surgery group(95.45%) was significantly higher than that in the radical surgery group(68.92%), there were statistically significant differences($P<0.05$). The peripheral serum levels of LOX, CEA and CA19-9 in patients with CRC were significantly higher than those in the control group, and the peripheral serum levels of LOX in he radical surgery group was significantly higher than that in the palliative surgery group, there were statistically significant differences($P<0.05$). In patients with CRC, the expression level of LOX in CRC tissue was positively correlated with that in peripheral serum ($r=0.75, P<0.05$). There was positive correlation between peripheral serum LOX and CEA in patients with CRC($r=0.42, P<0.05$), while no significant correlation was found between peripheral serum LOX and CA19-9($r=0.12, P>0.05$). **Conclusion** LOX is highly expressed in the peripheral serum and the CRC tissues, which is related to the tumor invasion and metastasis. The determination of LOX in the serum appears to be a well-characterized indicator of tumor prognosis and metastasis.

[Key words] colorectal cancer; lysyl oxidase; carcinoembryonic antigen; metastasis

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是常见的消化系恶性肿瘤之一,发病率及病死率不断上升,严重危害人类健康,由于其发病隐匿且易转移,一些患者常常失去了根治性手术治疗的机会。赖氨酰氧化酶(lysyl oxidase, LOX)是一种铜依赖性氧化酶,它对细胞外基质起着结构共价修饰作用,被认为在转移的过程中起着重要的作用。研究发现,LOX 与 CRC、胃癌、乳腺

癌的发生、发展密切相关^[1]。癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)是糖蛋白抗原,是 CRC 的相关肿瘤标志物。糖链抗原 19-9(carbohydrate antigen 19-9, CA19-9)是一种单涎酸神经节苷脂,对消化道肿瘤如 CRC、胃癌、胰腺癌等的诊断和预后判断有极其重要的价值。本研究通过检测 LOX 在 CRC 患者肿瘤组织及外周静脉血的表达情况,探讨其与外周血中 CEA、

CA19-9 的关系及其临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2014 年 1~12 月于河北省人民医院行 CRC 切除术的患者 96 例(CRC 组),术前均病理证实为结肠或直肠癌。其中,74 例行根治性切除术(根治组),22 例由于各种原因未行根治性切除术(非根治组),非根治手术为姑息性肿瘤切除术,切除肿瘤的原发灶与转移灶的大部分,肉眼尚有癌残留。手术时收集 CRC 组织及癌旁组织(距病灶边缘超过 5 cm 的正常黏膜组织)。所有患者术前未进行放疗,未服用免疫抑制剂,无感染性疾病史。同时选取 60 例体检健康者作为对照组,均排除炎症性疾病与肿瘤。本实验符合伦理学标准,获得所有受试者的签字同意,并取得伦理委员会的批准。

1.2 主要试剂 LOX 兔抗人单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司,链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接(SP)免疫组织化学试剂盒、二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒均购自北京中山生物公司;LOX、CEA、CA19-9 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自美国 R&D 公司。

1.3 方法

1.3.1 血清检测方法 所有 CRC 患者在入院次日清晨空腹采集肘静脉血 4 mL,体检健康者于清晨空腹采集肘静脉血 4 mL。注入未加抗凝剂的洁净玻璃管内,37℃静置约 1 h,2 500 r/min 离心 20 min,分离血清后收集上清液,放置于-80℃冰箱保存待测。采用 ELISA 检测 LOX、CEA、CA19-9 在血清中的表达水平,按照试剂盒说明步骤进行操作。

1.3.2 免疫组织化学法 将术后收集的组织的石蜡包埋,快速连续切片(厚约 4 μm),将切取的石蜡切片固定于载玻片;常规脱蜡、脱水,将载玻片放入甲醇新鲜配制的 3%过氧化氢中,除去内源性过氧化物酶;10%正常山羊血清封闭,湿化盒中 37℃孵育 30 min,封闭内源性过氧化物酶;滴加一抗 LOX(1:500)将标本完全覆盖,4℃过夜;滴加生物素标记的二抗 37℃孵育 30 min,加入卵白素-生物素复合物 37℃孵育 30 min,加入 DAB 显色液,苏木精复染,衬染胞核,30 s;封片、观察。

1.3.3 结果判定 在高倍镜(×400)视野下随机计数 10 个视野。根据标本染色强度和染色细胞百分率综合评分。染色强度计分:未着色计为 0 分;淡黄色,细颗粒状计为 1 分;棕黄色,粗颗粒状计为 2 分;棕褐色,小块状计为 3 分。阳性表达数量:无阳性表达细胞计为 0 分,阳性表达细胞小于 25%计为 1 分,阳性表达细胞 25%~<50%计为 2 分,阳性表达细胞 50%~<75%计为 3 分,阳性表达细胞大于或等于 75%计为 4 分。根据标本染色强度和阳性细胞百分率计分,两项之和为 0~3 分判为阴性或弱阳性;≥4 分判为阳性和强阳性^[2]。

1.4 统计学处理 运用 SPSS13.0 统计软件对所有的数据进行统计分析。计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验;计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验;采用 Spearman 相关及 Pearson 相关进行相关性分析;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LOX 在 CRC 组织及癌旁正常黏膜组织中的表达 LOX 蛋白表达主要定位于细胞质内,为棕黄色颗粒。CRC 组织中 LOX 蛋白阳性表达率为 75.00%(72/96),明显高于癌旁正常黏膜组织中的阳性表达率 26.04%(25/96),差异有统计学意义($P < 0.05$);非根治组癌组织中 LOX 蛋白阳性表达率为 95.45%(21/22),高于根治组中的 68.92%(51/74),差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 CRC 组与对照组血清 LOX、CEA 及 CA19-9 表达水平比较 CRC 患者外周血清 LOX、CEA 及 CA19-9 表达水平均高于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);非根治组患者外周血清 LOX 表达水平高于根治组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 CRC 组与对照组血清 LOX、CEA 及 CA19-9 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	LOX(ng/mL)	CEA(ng/mL)	CA19-9(U/mL)
CRC 组	96	7.87±2.25*	37.62±13.16*	57.65±17.62*
根治组	74	5.69±1.78#	23.27±14.76	33.17±11.03
非根治组	22	9.57±2.32	54.81±19.38	69.21±22.87
对照组	60	3.92±1.05	3.16±0.45	14.57±2.95

*: $P < 0.05$,与对照组比较;#: $P < 0.05$,与非根治组比较。

2.3 CRC 组织中 LOX 表达强度与外周血清 LOX 表达水平的相关性 相关性分析显示,随着 CRC 组织中 LOX 蛋白表达强度的增强,外周血清 LOX 表达水平升高,二者呈正相关($r = 0.75, P < 0.05$)。

2.4 CRC 患者外周血清 LOX、CEA 及 CA19-9 表达水平的相关性 相关性分析显示,CRC 患者外周血 LOX 与 CEA 表达水平呈正相关($r = 0.42, P < 0.05$),LOX 与 CA19-9 表达水平无明显相关性($r = 0.12, P > 0.05$)。

3 讨论

恶性肿瘤中 CRC 的发病率在女性中位居第 2 位,在男性中位居第 3 位^[3]。随着电子肠镜检查的普及与治疗技术的进步,CRC 患者的早期诊断率及总体生存率得到了很大的提高^[4]。由于该病发病隐匿且易转移,一些患者常通过 CT 或磁共振成像(MRI)检查,甚至在术中才发现已失去了根治性手术治疗的机会。目前,血液学指标 CEA、CA19-9 虽然已经用于 CRC 的诊断,但在评价肿瘤转移中的特异性和敏感性并不理想^[5],因此需要寻找更有效的血液学指标来评估 CRC,协助诊断。

LOX 于 1968 年被发现,LOX 基因家族包括 5 个成员,即 LOX、LOXL1、LOXL2、LOXL3、LOXL4,是一种铜依赖性氧化酶,对机体组织细胞外基质起着结构共价修饰作用,在机体组织细胞中发挥促进弹性蛋白赖氨酸残基和胶原蛋白产生交联的作用。LOX 异常表达与肿瘤细胞的分化、生长控制、黏附性、侵袭转移性等有着密切的联系^[6-7]。越来越多的研究结果表明,LOX 蛋白在恶性肿瘤细胞中广泛表达,在肿瘤细胞转移过程中发挥着重要作用,且与患者的预后密切相关^[8-9]。有研究发现,LOX 蛋白表达与 CRC 肿瘤细胞增殖、转移密切相关,在 CRC 小鼠模型中,LOX 蛋白过表达的细胞较 LOX 被沉默的细胞显示出具有更强的侵袭和转移能力;同样通过免疫组织化学发现,CRC 组织 LOX 表达较癌旁组织明显增高,并与 TNM 分期相关^[10-11]。罗浩等^[12]运用蛋白质印迹法(Western blotting)检测 LOX 蛋白在胃癌及癌旁组织中的表达情况,发现胃癌组织中的 LOX 表达水平较癌旁组织明显升高,在有淋巴结转移的组织中,LOX 与血管内皮生长因子(VEGF)的表达呈正相关,推测其与胃癌的发生、转移密切相关。Wilgus 等^[13]运用免疫组织化学法对肺腺癌的研究发现,肿瘤浸润范围大、LOX 表达越高,患者 5 年生存率越低,是判断早期肺腺癌患者的独立预后因素。Kirschmann 等^[14]比较低、高侵袭转移性乳腺癌细胞中 LOX 的表达情况,发现 LOX 在低侵袭性乳腺癌细胞低表达,甚至无表达,而在高侵袭性乳腺癌细胞中高表达。

刘剑仑等^[15]研究运用 LOX 慢病毒干扰载体(LOX-RNAi-LV)稳定转染乳腺癌细胞 MDA-MB-231 后,乳腺癌细胞中的 LOX 表达明显受到抑制,而且细胞的迁移和侵袭能力明显下降,表明 LOX 在肿瘤细胞侵袭、转移中起关键作用。韦薇等^[16]研究发现,LOX 在乳腺癌组织中存在高表达,明显高于癌旁组织及乳腺良性病变组织;并且还发现伴淋巴结转移的乳腺癌组织中 LOX 表达明显高于无淋巴结转移者。本研究结果显示,直肠癌组织中 LOX 蛋白阳性表达率明显高于癌旁正常黏膜组织;非根治组癌组织中 LOX 蛋白阳性率高于根治组,直肠癌患者外周血清 LOX 蛋白表达水平明显高于对照组;非根治组患者外周血清 LOX 蛋白表达水平高于根治组,LOX 在 CRC 肿瘤组织中的表达与患者外周血清 LOX 表达呈正相关,表明随着肿瘤组织 LOX 表达的增强,CRC 患者外周血清 LOX 表达水平同时增多,肿瘤转移能力增强,提示血清中 LOX 表达水平与肿瘤负荷、转移及预后密切相关。

随着科学技术的进步与发展,及早发现 CRC 与评价其预后已成为可能。肿瘤标志物是通过肿瘤细胞合成并释放,以及机体对肿瘤反应产生的物质,是反映肿瘤存在的一类物质。机体中检测出肿瘤标志物或其血液中的水平发生变化可表明肿瘤的性质,同时可进一步了解肿瘤细胞的发生、分化及功能。测定肿瘤标志物的水平可辅助肿瘤的诊断、判断预后,给予治疗方向。但是,受肿瘤标志物特异性和敏感性的局限,检测单一的肿瘤标志物对恶性肿瘤的诊断常存在不足,而多种标志物联合检测可提高肿瘤诊断的准确性^[17]。CEA 是一种糖蛋白抗原,从胚胎肠黏膜组织和结肠腺癌中分离而得,是胃肠癌肿瘤经常检测的标志物。正常情况下,CEA 通过胃肠道代谢,当胃肠道发生癌变时 CEA 则被释放入淋巴和血液循环,导致血清 CEA 表达水平异常增高。CA19-9 是一种单涎酸神经节苷脂,由癌细胞产生后可经胸导管引流到血液循环,从而导致血清 CA19-9 表达水平的异常增高,它在多种腺癌中升高,如胃癌、CRC、胰腺癌及肝胆系癌等,在消化道肿瘤的诊断和预后判断中起重要作用。血清 CA19-9 的表达水平与肿瘤大小、肿瘤浸润深度、有无淋巴结转移及分期密切相关,是消化道癌患者预后的独立判断指标。陈蕾等^[18]研究发现,314 例 CRC 患者中,术前仅 CEA 升高者占 21.3%,仅 CA19-9 升高者占 5.4%,二者同时升高者占 28.3%,二者联合检测有助于判断 CRC 患者的预后。本研究直肠癌患者外周血清 CEA、CA19-9 表达水平均明显高于对照组,非根治组患者外周血清 LOX 表达水平高于根治组,通过相关性分析显示:CRC 患者外周血清 LOX 与 CEA 表达水平呈正相关;而血清中 LOX 与 CA19-9 表达水平无明显相关性,表明直肠癌患者外周血清 CEA、CA19-9 表达水平越高预后越差。

综上所述,LOX 蛋白表达与 CRC 的发生、发展有关,LOX 表达越高肿瘤侵袭和转移能力越强,CRC 患者的预后越差;可联合检测外周血 LOX 与 CEA 的表达水平,更好地为评价 CRC 的预后提供参考价值。

参考文献

- Ward ST, Weston CJ, Hepburn E, et al. Evaluation of serum lysyl oxidase as a blood test for colorectal cancer[J]. *Eur J Surg Oncol*, 2014, 40(6): 731-738.
- Yu JW, Wu JG, Tajima Y, et al. Study on lymph node metastasis correlated to lymphangiogenesis, lymphatic vessel invasion, and lymph node micrometastasis in gastric cancer[J]. *J Surg Res*, 2011, 168(2): 188-196.
- Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90.
- Edwards BK, Noone AM, Mariotto AB, et al. Annual Report to the Nation on the status of cancer, 1975-2010, featuring prevalence of comorbidity and impact on survival among persons with lung, colorectal, breast or prostate cancer[J]. *Cancer*, 2014, 120(9): 1290-1314.
- Hong L, Ahuja N. DNA methylation biomarkers of stool and blood for early detection of colon cancer[J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2013, 17(5): 401-406.
- Woznick AR, Braddock AL, Dulai M, et al. Lysyl oxidase expression in bronchogenic carcinoma[J]. *Am J Surg*, 2005, 189(3): 297-301.
- 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.
- Barker HE, Cox TR, Erler JT. The rationale for targeting the LOX family in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(8): 540-552.
- Pez F, Dayan F, Durivault J, et al. The HIF-1-inducible lysyl oxidase activates HIF-1 via the Akt pathway in a positive regulation loop and synergizes with HIF-1 in promoting tumor cell growth[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(5): 1647-1657.
- Baker AM, Bird D, Welti JC, et al. Lysyl oxidase plays a critical role in endothelial cell stimulation to drive tumor angiogenesis[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(2): 583-594.
- Baker AM, Cox TR, Bird D, et al. The role of lysyl oxidase in SRC-Dependent proliferation and metastasis of colorectal cancer[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2011, 103(5): 407-424.
- 罗浩, 潘晟, 肖喆, 等. 赖氨酰氧化酶与血管内皮生长因子在胃癌中的表达及在浸润转移中的作用[J]. *中华实验外科杂志*, 2013, 30(8): 1737-1738.
- Wilgus ML, Borczuk AC, Stoopler M, et al. Lysyl oxidase: a lung adenocarcinoma biomarker of invasion and survival[J]. *Cancer*, 2011, 117(10): 2186-2191.
- Kirschmann DA, Seftor EA, Fong SF, et al. A molecular role for lysyl oxidase in breast cancer invasion[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(15): 4478-4483.
- 刘剑仑, 韦薇, 唐玮, 等. 赖氨酰氧化酶在乳腺癌侵袭转移中的作用机制[J]. *中华医学杂志*, 2012, 92(20): 1379-1383.
- 韦薇, 刘剑仑, 唐玮, 等. 乳腺癌组织中 LOX 的表达变化及其 MMP-2、MMP-9、HIF-1 α 的关系[J]. *山东医药*, 2013, 53(24): 6-8.
- 陈志红. CEA、CA19-9、CA724 和 CA242 联合检测在结肠癌中的应用价值[J]. *中国医药指南*, 2013, 11(9): 216-217.
- 陈蕾, 姜北海, 邸佳柏, 等. CA199 在判断 CEA 正常的中晚期结直肠癌患者预后中的价值[J]. *中国肿瘤临床*, 2015, 42(15): 743-750.