

赖氨酰氧化酶与肝纤维化研究进展

王玉洁, 谢雯 (首都医科大学附属北京地坛医院 肝病中心, 北京 100015)

赖氨酰氧化酶(lysyl oxidases, LOXs)又称蛋白赖氨酸-6-磷酸酶, 是一种在细胞外基质(如胶原和弹性蛋白)的修饰过程中起重要作用的酶类, 可以引起胶原纤维和弹性纤维的交联效应, 包括分子内和分子间的交联^[1]。因此, 在细胞外基质形成和修复反应中发挥关键作用^[2]。最近研究表明, LOXs在肿瘤抑制及转移、细胞增殖和细胞趋化中亦表现出举足轻重的作用。肝纤维化是肝脏对各种损伤的修复愈合性反应, 以肝细胞外基质的过度沉积和降解减少为主要特征, 目前许多研究表明, LOXs与肝纤维化间关系密切, 本文就LOXs的结构及分布、功能和其与肝纤维化的关系作一综述。

1 LOXs的结构及分布

LOXs是一种铜离子依赖性的单胺氧化酶类, 由纤维形成细胞如成纤维细胞和平滑肌细胞等分泌产生。第一个被发现的LOXs是赖氨酰氧化酶(lysyl oxidase, LOX), 后来相继发现了4种与LOX具部分结构同源性的人类赖氨酰氧化酶样蛋白, 即赖氨酰氧化酶样蛋白1(lysyl oxidase-like 1, LOXL1)、LOXL2、LOXL3和LOXL4, 从而形成了具有5种成员的赖氨酰氧化酶家族。编码这5种赖氨酰氧化酶的基因分别位于人类5号、15号、8号、2号和10号染色体上, 其具有不同数目及结构的外显子和内含子^[3]。以LOX的合成为例, 由纤维形成细胞合成46 kD的LOX前酶原, 经过信

号肽剪切和N-端糖基化而形成50 kD的LOX酶原, LOX酶原分泌到细胞外, 经蛋白水解酶在Gly-Asp间的剪切而形成32 kD的活性LOX。前胶原C-蛋白激酶可以完成这个剪切活化过程, 该酶又名骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein-1, BMP-1)^[4], LOXL1的活化需要此酶, 而LOXL2、LOXL3和LOXL4目前的研究未显示需要此酶的活化^[5]。目前已知, 转化生长因子、血小板衍生生长因子、血管紧张素II、维甲酸、成纤维细胞生长因子等均可调节LOX的表达。

所有LOXs的C-末端均含有一个高度保守的催化结构域, 其中有铜离子结合部位、脯氨酸酪氨酸醌残基(lysine tyrosylquinone, LTQ)和细胞因子受体结构域^[6]。

用Northern印迹法对不同LOXs的表达进行比较发现, LOX在心脏、胎盘、睾丸、肺脏、肾脏和子宫中高表达, 而在脑和肝脏中很少表达; LOXL1在胎盘、肾脏、肌肉、心脏、肺脏和胰腺中有表达, 而在脑和肝脏中很少表达; LOXL2在子宫、胎盘以及其他器官中高水平表达, 而在脑和肝脏中表达水平很低; LOXL3在睾丸、脾脏和前列腺中表达水平较高, 在胎盘中表达适中, 而在肝脏中则未见表达^[7]; 惟一在正常肝脏中明显表达的只有LOXL4。故在健康肝脏中不表达或仅表达相对很少量的LOXs。

2 LOXs的功能

最初对于LOX的认识, 即其在细胞外基质修饰过程中的作用, 也是LOX最重要的功能之一,

基金项目: 卫生部医药卫生科技发展研究中心《脂肪性肝病流行病学调查与临床干预研究》(2008-01001), 首都医学发展科研基金重点支持项目《社区脂肪性肝病流行状况及早期行为干预研究》(2007-2044)

通讯作者: 谢雯 Email: xiewen6218@163.com

参与胶原纤维与弹性纤维共价交联的形成过程。LOX对弹性蛋白的氧化作用类似,先催化弹性蛋白中的赖氨酸残基氧化脱氨基形成醛基,后3个活化的醛基与1个赖氨酸残基发生缩合形成四功能复合物-锁链素,从而形成不可溶性的弹性纤维^[8]。

不可溶性胶原纤维与弹性纤维交联的形成,不仅对维持细胞外基质的形态和完成组织修复有极其重要的作用,而且对呼吸系统、循环系统、运动系统及人体其他各器官系统中正常结缔组织的维持有很大贡献,从而可以保证机体完成正常的生命活动。Bruehl等^[9]将 β -氨基丙腈(BAPN,一种LOX抑制剂)注入幼年大鼠体内以抑制胶原纤维和弹性纤维的交联,对胸主动脉的生物特性进行研究发现,与对照组相比,BAPN注射组的动脉直径明显增加,管壁硬度明显下降,胶原和弹性蛋白的浓度未见改变,说明LOX催化的胶原交联对维持主动脉管壁结构的稳定性至关重要。Mäki等^[10]对敲除LOX基因的小鼠进行观察,此种小鼠在晚孕期或者出生时即死去,尸检可以发现较大的主动脉瘤,光学显微镜示主动脉管壁弹性蛋白层变薄,电子显微镜示管壁弹性纤维大量断裂且平滑肌细胞层不连续,说明LOX对心血管系统的结构与功能的维持发挥重要作用。Hornstra等^[11]发现敲除LOX基因的小鼠出生后不久就因为主动脉瘤和横膈破裂而死亡,显微镜示大动脉壁弹性纤维结构断裂,说明LOX对胚胎形成过程中动脉与横膈结缔组织的发育具有重要作用。Maki等^[12]发现LOX基因敲除小鼠具有不可逆的近、远端气道的损害,与对照组相比,肺中弹性纤维染色明显变浅且更加分散,皮肤同样也有胶原纤维与弹性纤维的异常,培养的敲除LOX基因小鼠的皮肤成纤维细胞与大动脉平滑肌细胞中LOX活性下降了80%左右,说明LOX对呼吸系统和皮肤的正常发育起重要作用。

LOX除了以经典的胶原和弹性蛋白为底物外,目前还发现其亦可氧化一系列含赖氨酸的球蛋白而产生相应效应,如核酸组蛋白H1、H2和碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth

factor, bFGF)等^[2]。除了在细胞外分布,在细胞核内也检测到了LOX的存在,作用可能是调控核内染色质的组装。Li等^[13]发现LOX也可以bFGF为底物,通过氧化其结构中的赖氨酸引起bFGF单体的共价交联,形成二聚体或者寡聚体而明显改变了bFGF的生物学特性,bFGF的促有丝分裂特性和核内分布状态明显受到抑制,LOX具有抑制细胞增殖的作用,有关文献也认为LOX是原癌基因Ras的抑制剂^[14]。最近有报道^[15]LOX还可氧化血小板源性生长因子受体 β (PDGF- β),致其下游信号转导级联放大效应而引起一系列效应。

此外,LOX还表现出对单核细胞和血管平滑肌细胞的趋化作用^[16],还可诱导缺氧状态下的肿瘤转移^[17],在体外LOX对外周血中单核细胞和淋巴细胞计数有较明显的抑制,LOX氧化反应的产物 H_2O_2 也可调节基因表达与细胞行为。

研究表明,LOXL1也参与含赖氨酸胶原底物的交联过程,但可能与LOX的作用底物各有特异性。Liu等^[18]发现,缺乏LOXL1的小鼠产后子宫管无正常弹性纤维沉积,还可以导致盆腔器官脱垂、肺组织腔隙扩大、皮肤松弛和血管异常等弹性纤维异常的表现,且伴有原弹性纤维的沉积;还发现与LOX不同,LOXL1特异性分布于弹性纤维产生部位,且可与纤连蛋白-5相互作用,可为弹性蛋白沉积提供骨架支持,进而保证弹性纤维的稳态。

LOXL2也可参与氧化胶原中的赖氨酸残基,这点与LOX类似,还可氧化G₂期肝母细胞瘤细胞的表面蛋白而抑制其增殖^[19]。Peinado等^[20]对LOXs家族5个成员依次筛查,首次报道了LOXL2和LOXL3在体内与转录因子Snail的协同作用,共同下调E-钙黏蛋白的表达,进而促进上皮-间质转化(EMT)过程,尤其应用LOXL2干扰RNA敲除LOXL2表达后可明显抑制侵袭性肿瘤生长与进展,表明LOXL2既可影响肿瘤的生长,又可影响肿瘤的侵袭性与血管形成。最近Bignon等^[21]报道,LOXL2可以通过促进内皮基膜中IV型胶原的聚集而促进新生血管芽的形成。

3 LOXs与肝纤维化

肝纤维化是各种慢性肝病进展为肝硬化的重要阶段,是肝脏对各种慢性损伤的愈合修复性反应,主要病因为病毒性肝炎、酒精性肝病、非酒精性脂肪性肝病和胆道阻塞等,以各种细胞外基质的过度沉积和降解减少为特征,包括各型胶原纤维和纤粘连蛋白、层粘连蛋白等各种糖蛋白。大部分异常的细胞外基质是由表达 α -SMA的肌成纤维细胞产生的,肌成纤维细胞来源于肝脏中某些细胞的活化或者肌成纤维性分化,主要为肝星状细胞(HSC)和门脉区成纤维细胞^[22]。

3.1 LOXs在肝纤维化中的作用 促进胶原的交联与基因表达。Giampuzzi等^[23]发现COS-7细胞中LOX的过表达可以促进III型前胶原基因启动子的活化,使其活性增加12倍之多,而且这种促进是特异性的,对其他胶原类型的启动子则无这种促进作用。

LOX可以促进肌成纤维细胞的形成。Li等^[24]报道HSC和成纤维细胞向肌成纤维细胞的分化是潜在基质硬度增加的结果。Georges等^[25]用四氯化碳诱导大鼠肝纤维化模型,在诱导的第3~70天于不同时间点取出新鲜肝脏组织分别进行组织硬度和纤维化程度的检测,结果发现早期肝硬度即迅速增加,一直增加至第28天,其后保持不变,而纤维化程度随时间渐增,但是要相对晚于肝硬度的增加,而且肝硬度与纤维化程度间无明显相关,又用LOX抑制剂BAPN对一组大鼠进行治疗,发现可明显降低肌成纤维细胞的活化,部分阻止早期肝硬度的增加,故认为在肝纤维化早期LOXs引起的胶原交联使肝硬度增加,HSC和成纤维细胞所在环境的机械张力增加而可能引起两种细胞向肌成纤维细胞的分化,LOX家族成员在肝纤维化早期即增加,且先于也可能介导肌成纤维细胞的活化。

LOX可以促进胆管上皮细胞EMT的发生。EMT被认为是器官(尤其是肾脏)纤维化中肌成纤维细胞的来源之一,而Díaz等^[26]通过对胆道闭锁性纤维化、原发性胆汁性肝硬化等胆道增殖性疾病

病患者的肝组织活检标本进行组织学分析证明,EMT在人类肝纤维化中也存在,尤其是在胆道闭锁性纤维化和原发性胆汁性肝硬化等胆道增殖性肝病,并且检测到胆道内LOX和LOXL1水平明显升高。

3.2 肝纤维化时LOXs的表达 最初ROBERT C.SIEGEL等用四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化模型来监测肝纤维化发展过程中肝组织和血液LOX活性的变化,结果发现肝组织中LOX活性在诱导3周后迅速上升,6周达高峰,后又下降,血浆中LOX活性的变化与肝组织中LOX活性的变化是平行的,而且与早期结缔组织形成的组织学结果也是相关的,间接免疫荧光示LOX主要分布于细胞外基质中,与胶原分布具一定相关性。

Desmoulière等发现,在大鼠胆管结扎模型中,结扎24小时后即在门脉区检测到较强LOX信号,至结扎后72小时处于上升过程,并且分布于肌成纤维细胞周围。Díaz等在健康者肝脏组织的胆管上皮细胞中仅发现有LOX的表达,而在胆道闭锁性纤维化等胆道增殖性疾病患者的肝组织中检测到了LOX和LOXL1的高表达。

Vadasz等^[19]用原位杂交和免疫组化法研究包埋的肝脏石蜡切片,对正常和肝脏组织中除LOXL4以外的4种LOXs的表达进行了检测,结果发现正常肝脏组织中四种LOXs含量均较少,而在威尔森病(Wilson's disease, WD)患者肝组织中LOX和LOXL2呈高表达状态且在未出现纤维化时就已高表达,mRNAs定位于肝细胞核内,与肝细胞周围的胶原沉积一致,而在乙型肝炎和丙型肝炎等所致肝纤维化中,仅检测到纤维化区域内肌成纤维细胞等细胞表达LOXs,这与WD一致,但未检测到肝细胞中LOXs的表达和周围胶原的沉积。在WD肝纤维化形成前,LOX和LOXL2也可作为预后评估的早期诊断性标志物。

3.3 LOXs与肝纤维化的治疗 LOXs抑制剂分为3类,抗体、铜螯合剂和毒性小分子。关于LOXs抑制剂治疗肝纤维化的报道较少,Georges等^[25]使用LOX抑制剂BAPN治疗四氯化碳诱导的肝纤维化

模型2周,发现只能减少肌成纤维细胞的活化,并减轻早期肝硬度的增加,但不能逆转肝纤维化,组织学表现无明显改善。Barry等^[27]用一种特异性LOXL2单克隆抗体AB0023治疗四氯化碳诱导的肝纤维化BALB/c小鼠,发现与M64治疗组相比,AB0023可提高生存率,明显减轻门-门及门-中心桥接纤维化并且能够把整体纤维化水平在大多数情况下控制在METAVIR F1期,ABOO23治疗组小鼠的门-门纤维化区域内 α -SMA阳性肌成纤维细胞的数量明显减少,总TGF- β 含量无差别但p-Smad3信号通路明显降低,即AB0023可弱化TGF- β 的信号转导,显示了其优于BAPN的治疗效果。最近Pestov等^[28]发现了一种新的抑制LOX活性的方法,他们发现LOX氧化6, 6-d (2)-赖氨酸的几率要比其他类型赖氨酸低很多,而赖氨酸又是一种必需氨基酸,故认为摄入富含6, 6-d (2)-赖氨酸的食物应该是很好抑制LOX活性的方法。

4 结语

作为各种慢性肝病的终末阶段,肝纤维化诊断与治疗技术上的提高显得尤其重要,肝组织活检一直以来被视为肝纤维化诊断的金标准,但因其有创性以及取样等各种限制而为临床工作者所困扰,因此无创性肝纤维化生物标志物研究是近几年的热点,但目前仍未找到一种准确检测早期肝纤维化的工具,也尚无能够得到大家认可的抗纤维化治疗方法。从目前的研究成果来看,虽然存在诸多争议,但LOXs家族在肝纤维化发展中的作用不容忽视,Wajahat等^[29]最近提出LOXL2可能是纤维化发展过程中的一条关键通路,故有待继续深入研究LOXs家族在肝纤维化发病和诊治中的价值与意义。

参考文献

- [1] Payne SL, Hendrix MJ, Kirschmann DA. Paradoxical roles for lysyl oxidases in cancer-a prospect[J]. *J Cell Biochem*,2007,101:1338-1354.
- [2] Li WD, Zhou J, Chen LJ, et al. Lysyl oxidase, a critical intra- and extra-cellular target in the lung for cigarette smoke pathogenesis[J]. *Int J Environ Res Public Health*,2011,8:161-184.
- [3] Asuncion L, Fogelgren B, Fong KS, et al. A novel human lysyl oxidase-like gene (LOXL4) on chromosome 10q24 has an altered scavenger receptor cysteine rich domain[J]. *Matrix Biol*,2001,20:487-491.
- [4] 张艳君, 蒋稼欢, 谢静, 等. 赖氨酰氧化酶与人类疾病[J]. *生物化学与生物物理进展*,2011,38:389-399.
- [5] Maki JM, Kivirikko KI. Cloning and characterization of a fourth human lysyl oxidase isoenzyme[J]. *Biochem J*,2001,355:381-387.
- [6] Maki JM, Tikkanen H, Kivirikko KI. Cloning and characterization of a fifth human lysyl oxidase isoenzyme: the third member of the lysyl oxidase-related subfamily with four scavenger receptor cysteine-rich domains[J]. *Matrix Biol*,2001,20:493-496.
- [7] Jourdan-Le Saux C, Tomsche A, Ujfalusi A, et al. Central nervous system, uterus, heart, and leukocyte expression of the loxl3 gene, encoding a novel lysyl oxidase-like protein[J]. *Genomics*,2001,74:211-218.
- [8] Kagan HM. Intra- and extracellular enzymes of collagen biosynthesis as biological and chemical targets in the control of fibrosis[J]. *Acta Tropica*,2000,77:147-152.
- [9] Br  l A, Ortoft G, Oxlund H. Inhibition of cross-links in collagen is associated with reduced stiffness of the aorta in young rats[J]. *Atherosclerosis*,1998,140:135-145.
- [10] M  ki JM, R  s  nen J, Tikkanen H, et al. Inactivation of the lysyl oxidase gene lox leads to aortic aneurysms, cardiovascular dysfunction, and perinatal death in mice[J]. *Circulation*,2002,106:2503-2509.
- [11] Hornstra IK, Birge S, Starcher B, et al. Lysyl oxidase is required for vascular and diaphragmatic development in mice[J]. *J Biol Chem*,2003,278:14387-14393.
- [12] Maki JM, Sormunen R, Lippo S, et al. Lysyl oxidase is essential for normal development and function of the respiratory system and for the integrity of elastic and collagen fibers in various tissues[J]. *Am Pathol*,2005,167:927-936.
- [13] Li W, Nugent MA, Zhao Y, et al. Lysyl oxidase oxidizes basic fibroblast growth factor and inactivates its mitogenic potential[J]. *J Cell Biochem*,2003,88:152-164.
- [14] KenyonK, Contente S, Trackman PC, et al. Lysyl oxidase and rrg messenger RNA[J]. *Science*,1991,253:802.
- [15] Eliades A, Papadantonakis N, Bhupatiraju A, et al. Control of megakaryocyte expansion and bone marrow fibrosis by lysyl oxidase[J]. *J Biol Chem*,2011,286:27630-27638.
- [16] Lucero HA, Ravid K, Grimsby JL, et al. Lysyl oxidase oxidizes cell membrane proteins and enhances the chemotactic response of vascular smooth muscle cells[J]. *J Biol Chem*,2008,283:24103-24117.
- [17] Erler JT, Bennewith KL, Nicolau M, et al. Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis[J]. *Nature*,2006,440:1222-1226.
- [18] Liu XQ, Zhao Y, Gao JG, et al. Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein[J]. *Nature Genetics*,2004,36:178-182.
- [19] Vadasz Z, Kessler O, Akiri G, et al. Abnormal deposition of collagen around hepatocytes in Wilson's disease is associated with hepatocyte specific expression of lysyl oxidase and lysyl oxidase like protein-2[J]. *J Hepatol*,2005,43:499-507.
- [20] Peinado H, Del Carmen Iglesias-de la Cruz M, Olmeda D, et

- al. A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in Snail regulation and tumor progression[J]. *EMBO J*,2005,24:3446-3458.
- [21] Bignon M, Pichol-Thievent C, Hardouin J, et al. Lysyl oxidase-like protein-2 regulates sprouting angiogenesis and type IV collagen assembly in the endothelial basement membrane[J]. *Blood*,2011,118:3979-3989.
- [22] Guyot C, Lepreux S, Combe C, et al. Hepatic fibrosis and cirrhosis: the (myo) fibroblastic cell subpopulations involved[J]. *Int J Biochem Cell Biol*,2006,38:135-151.
- [23] Giampuzzi M, Botti G, Di Duca M, et al. Lysyl oxidase activates the transcription activity of human collagen III promoter[J]. *J Biol Chem*,2000,275:36341-36349.
- [24] Li Z, Dranoff JA, Chan EP, et al. Transforming growth factor-beta and substrate stiffness regulate portal fibroblast activation in culture[J]. *Hepatology*,2007,46:1246-1256.
- [25] Georges PC, Hui JJ, Gombos Z, et al. Increase stiffness of rat liver precedes matrix deposition: implications for fibrosis[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*,2007,293:G1147-G1154.
- [26] Díaz R, Kim JW, Hui JJ, et al. Evidence for the epithelial to mesenchymal transition in biliary atresia fibrosis[J]. *Hum Pathol*,2008,39:102-115.
- [27] Barry-Hamilton V, Spangler R, Marshall D, et al. Allosteric inhibition of lysyl oxidase-like-2 impedes the development of a pathologic microenvironment[J]. *Nature Medicine*,2010,16:1009-1017.
- [28] Pestov NB, Okkelman IA, Shmanai VV, et al. Control of lysyl oxidase activity through site-specific deuteration of lysine[J]. *Bioorg Med Chem Lett*,2011,21:255-258.
- [29] Mehal WZ, Iredale J, Friedman SL. Expressway to the core of fibrosis[J]. *Nat Med*,2011,17:552-553.

收稿日期: 2012-01-06

•消息•

第六届地坛国际感染病会议通知

由中国医师协会主办,首都医科大学附属北京地坛医院承办,全球华人临床微生物暨感染学会(GCACMID)和欧洲临床微生物及感染病学会(ESCMID)协办,并得到中华医学会继续教育部、中华医学会感染病学会、中华医学会肝病学会、中华医学会热带病与寄生虫学会、中华医学会检验学会、中华医学会皮肤性病学分会、中华医学会结核病学分会、中华医学会呼吸病学分会、美国传染病学会(IDSA)、国际传染病学会(ISID)支持的第六届地坛国际感染病会议,定于2012年7月12~15日在北京国家会议中心举行。

今年会议的主题是“临床、科研与行政数据的整合”。临床、科研和行政是有效对抗和控制感染的三个关键元素。一方面从日常医护工作积累经验,另一方面要把科研数据转化到临床应用中。同时政府和医院的行政措施对推动感染控制亦扮演着重要的角色。通过这次会议,希望能够将这三个元素整合在一起,从而加强科研学者、医护人员和行政人员的沟通。众多知名专家将被邀请出席这次会议,分享他们的经验和研究成果。同时,参会代表也可以获得最新的医疗资讯及国家级继续教育I类学分10分。

诚邀您积极投稿和参与。所有被录取的论文摘要均有机会参加“阿甘定杯优秀论文奖”评选或旅费赞助,并结集作为增刊在国际传染病学会(ISID)的官方期刊——《International Journal of Infectious Diseases》正式发表。会议相关的信息及网上投稿,请浏览网站: www.bjditan.org。