

• 基础研究 •

## 成纤维细胞中赖氨酰氧化酶调控卵巢癌紫杉醇敏感性的作用及机制探讨

王嘉桐<sup>1</sup>, 徐圣杰<sup>1</sup>, 李 珊<sup>2</sup>, 徐 娟<sup>1,3</sup>, 贾雪梅<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>南京医科大学附属妇产医院(南京市妇幼保健院)妇科, <sup>2</sup>医学研究中心, 江苏 南京 210004; <sup>3</sup>南京市女性生育力保护及重塑医学重点实验室, 江苏 南京 210004

**[摘要]** 目的: 探讨赖氨酰氧化酶(lysyl oxidase, LOX)在卵巢癌中的表达模式、可能的作用机制, 以及其表达与卵巢癌临床特征及治疗结局的相关性。方法: 利用人类癌症基因组图谱(the Cancer Genome Atlas, TCGA)分析 LOX 表达与卵巢癌临床病理特征、治疗结局及预后的相关性; 利用 TISCH2 数据库研究 LOX 在卵巢癌微环境不同细胞中的表达特征; 免疫组化分析 LOX 在卵巢癌组织中的表达情况; 利用 siRNA 转染技术沉默 LOX 基因, 并通过转录组测序分析 LOX 沉默组及对照组细胞差异表达基因; 通过基因集富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA)LOX 沉默组及对照组差异表达的信号通路蛋白并通过 qRT-PCR 验证; 通过测定半数致死剂量(half-maximal inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>)分析成纤维细胞中敲降 LOX 对卵巢癌紫杉醇敏感性的影响; 通过 Western blot 及 qRT-PCR 分析紫杉醇作用下人纤维细胞和鼠纤维细胞中(L929)中 LOX 表达变化。结果: LOX 高表达与卵巢癌的肿瘤存在、治疗结局差及静脉侵犯显著相关; 在卵巢癌中, LOX 在成纤维细胞中表达较高; 沉默 LOX 可下调细胞黏附分子的表达; 紫杉醇可诱导成纤维细胞中 LOX 表达上调; 成纤维细胞中敲降 LOX 可增加共培养的成纤维细胞与肿瘤细胞对紫杉醇的敏感性。结论: LOX 高表达与卵巢癌的不良预后相关, 敲降 LOX 可提高卵巢癌对紫杉醇的化疗敏感性; 其作用机制可能与改变成纤维细胞中细胞黏附分子表达相关; 紫杉醇可上调成纤维细胞中 LOX 的表达。

**[关键词]** 赖氨酰氧化酶; 卵巢癌; 细胞黏附分子; 紫杉醇

**[中图分类号]** R737.31

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2024)11-1499-11

**doi:** 10.7655/NYDXBNSN240547

## The role and mechanism of lysyl oxidase in fibroblasts in regulating the sensitivity of ovarian cancer to paclitaxel

WANG Jiatong<sup>1</sup>, XU Shengjie<sup>1</sup>, LI Shan<sup>2</sup>, XU Juan<sup>1,3</sup>, JIA Xuemei<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Gynecology, <sup>2</sup>Nanjing Maternal and Child Health Institute, Women's Hospital of Nanjing Medical University(Nanjing Women and Children's Healthcare Hospital), Nanjing 210004; <sup>3</sup>Nanjing Medical Key Laboratory of Female Fertility Preservation and Restoration, Nanjing 210004, China

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the expression patterns and underlying mechanisms of lysyl oxidase(LOX)in ovarian cancer, and to explore the correlation between its expression level and the clinical characteristics and therapeutic outcomes of the disease. **Methods:** The correlations of high LOX expression with the clinicopathological features, treatment outcomes, and prognosis of ovarian cancer were analyzed by the Cancer Genome Atlas (TCGA). The expression characteristics of LOX mRNA in different ovarian cancer cells in the tumor microenvironment were explored by the TISCH2 database. The expression pattern of LOX in ovarian cancer tissues were confirmed through immunohistochemistry. We used siRNA transfection technology to silence the expression and LOX, and then analyzed the differentially expressed genes between LOX-silencing and control fibroblasts through RNA sequencing, followed by Gene Set Enrichment Analysis(GSEA) to identify the signaling pathways that were differentially enriched between the LOX-silenced and the control groups, with subsequent validation through qRT-PCR. The effect of knocking down LOX in fibroblast on the sensitivity of ovarian cancer to paclitaxel was analyzed by determining the half-maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>). Furthermore, Western blot

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81872126)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: xmjia@njmu.edu.cn

and qRT-PCR were performed to analyze the expression levels of LOX in human fibroblasts and mouse fibroblasts (L929) induced by paclitaxel. **Results:** High expression of LOX was significantly associated with the presence of tumors, poor treatment outcomes, and venous invasion in ovarian cancer. LOX was highly expressed in cancer associated fibroblasts in ovarian cancer. Silencing LOX led to the downregulation of cell adhesion molecule expression. Paclitaxel induced upregulation of LOX expression in fibroblasts. Knocking down LOX in fibroblasts increased the sensitivity of co-cultured fibroblasts and tumor cells to paclitaxel. **Conclusion:** High expression of LOX is associated with a poor prognosis in ovarian cancer, knocking down LOX in fibroblast may enhance the sensitivity of ovarian cancer to paclitaxel; the mechanism of LOX may linked to alterations in the expression of cell adhesion molecules in cancer-associated fibroblasts. Paclitaxel may upregulate the expression of LOX in fibroblasts.

[**Key words**] lysyl oxidase; ovarian cancer; cell adhesion molecules; paclitaxel

[J Nanjing Med Univ, 2024, 44(11): 1499-1509]

卵巢癌是常见且致命的妇科恶性肿瘤之一<sup>[1]</sup>。由于缺乏早期预警症状和有效的筛查及早期诊断方法,约70%的病例在确诊时已为晚期,预后较差<sup>[2]</sup>。卵巢癌的标准治疗方法是肿瘤细胞减灭术联合铂类、紫杉醇(paclitaxel, PTX)化疗<sup>[3]</sup>。然而,即使接受标准治疗,晚期卵巢癌患者的5年生存率仍然只有30%左右<sup>[4]</sup>。大多数卵巢癌复发和死亡与获得性耐药有关,耐药已成为影响治疗效果的主要障碍<sup>[5]</sup>。因此,深入探索卵巢癌耐药因素是一项亟待解决的临床问题。

肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)在肿瘤发生发展及耐药过程中均发挥着重要作用<sup>[6]</sup>。TME由肿瘤细胞、细胞外基质(extracellular matrix, ECM)、分泌因子和肿瘤相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts, CAF)和免疫细胞等组成<sup>[7]</sup>。其中丰度最高的CAF可以通过调控ECM组分的合成和/或蛋白降解以及基质整合生长因子的释放进行ECM重塑,从而形成促进内皮细胞增殖、迁移和血管生成的微环境<sup>[8]</sup>,同时,CAF还可与ECM蛋白相互作用以支持侵袭性肿瘤生长和耐药,抑制T细胞的有效浸润等<sup>[9]</sup>。

赖氨酰氧化酶(lysyl oxidase, LOX)为一种胺氧化酶,主要在平滑肌及成纤维细胞中表达,可促进胶原交联及纤维沉积<sup>[10]</sup>。LOX已经被证实可以促进乳腺癌、肺癌、头颈癌、肝癌等多种癌症的发生发展<sup>[11-12]</sup>。有文献报道,LOX可促进CAF驱动的纤维胶原基质重塑和交联,从而促进胰腺癌细胞的侵袭<sup>[13]</sup>。另一方面,PTX化疗可上调T细胞中LOX表达,促进T细胞介导的ECM重塑,从而促使肿瘤转移<sup>[14]</sup>。因此,靶向LOX治疗可能成为一种重要的肿瘤治疗策略。

已有研究发现,LOX高表达与卵巢癌不良预后<sup>[15]</sup>

相关,且LOX高表达可促进卵巢癌的侵袭和转移<sup>[16]</sup>。但是LOX在卵巢癌组织中的表达模式及可能的作用机制等尚未明晰,化疗是否参与调控LOX表达也尚无研究。因此,本文主要探索LOX在卵巢癌组织中的表达特征及其表达与卵巢癌临床病理特征的相关性,并进一步分析其可能的上下游调控机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞

人源成纤维细胞分离自人早孕流产的胎盘。小鼠成纤维细胞L929(苏州海星生物科技有限公司),人卵巢癌细胞A2780(南京凯基生物技术股份有限公司),OV-CAR3细胞(上海名劼生物科技有限公司)。

#### 1.1.2 试剂

DMEM高糖培养基、RPMI-1640培养基(江苏凯基生物技术股份有限公司)。优级胎牛血清(NEW-ZERUM公司,新西兰)。Lipofectamine 3000、RNA提取纯化试剂盒、RIPA裂解液、青/链霉素混合液、0.25% Trypsin-EDTA(上海赛默飞世尔科技公司)。siRNA(上海吉玛制药技术有限公司)。卡铂(carboplatin, CBP)及PTX(MedChemExpress公司,美国)。5%脱脂奶粉、TritonX-100(广州赛国生物科技有限公司)。逆转录试剂盒、SYBR qRT-PCR Master Mix、DAB工作液(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)。3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(Sigma-Aldrich公司,德国)。4%多聚甲醛、苏木素染液(北京兰杰柯科技有限公司)。山羊血清(武汉博士德生物工程有限公司)。即用型DAPI、CCK8试剂、柠檬酸钠抗原修复液、小鼠单克隆抗 $\beta$ -actin抗体、小鼠单克隆抗GAPDH抗体、HRP标记的山羊抗兔IgG、HRP标记的山羊抗小鼠IgG

(武汉赛维尔生物科技有限公司)。兔单克隆抗 LOX 抗体、小鼠单克隆抗α-SMA 抗体(Abcam 公司, 美国)。小鼠单克隆抗 LOX 抗体、小鼠单克隆抗 Vi- mentin 抗体(Santa Cruz Biotechnology 公司, 美国)。荧光酶标记的抗鼠 IgG(Cell Signaling Technology 公 司, 美国)。

1.1.3 仪器

多色荧光/化学发光成像分析系统(ProteinSim- ple 公司, 美国)。正置光学显微镜(Zeiss 公司, 德 国)。激光共聚焦显微镜(Leica 公司, 德国)。Synergy H4 Hybrid 酶标仪(BIO-TEK 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析

使用 TISCH2 数据库(<http://tisch.comp-genomics.org/>)分析不同单细胞测序数据中 LOX 基因在卵巢癌 中的表达特征, 获得 LOX 表达水平高的细胞群体。

1.2.2 细胞培养

A2780、L929 及人源成纤维细胞培养于含有 10%胎牛血清和 1%青链霉素的 DMEM 高糖培养基 中, OV-CAR3 培养于含有 20%胎牛血清和 1%青链 霉素的 RPMI-1640 培养液中, 所有细胞均在 37 ℃恒 温、含 5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养。

1.2.3 细胞转染

在 6 孔板中培养人源成纤维细胞, 当细胞融合 度到达约 70%时, 按照 Lipofectamine 3000 试剂说明 书转染 siRNA。转染 6 h 后, PBS 清洗 3 次, 更换为无 双抗的培养基; 转染 24 h 后, 收集细胞进行后续实 验。siCtrl 正义链: 5'-UUCUCCGAACGUGUCAC- GUTT-3'; siCtrl 反义链: 5'-ACGUGACACGUUCGG- AGAATT-3'; siLOX-1 正义链: 5'-GCACAGUUGU- CAUCAACAUTT-3'; siLOX-1 反义链: 5'-AUGUUG- AUGACAACUGUGCTT-3'; siLOX-2 正义链: 5'-

CUGACGACAACCCUUAUUATT-3'; siLOX-2 反义 链: 5'-UAAUAAGGGUUGUCGUCAGTT-3'。

1.2.4 蛋白提取及 Western blot

用不同浓度(100、200 μg/mL)的 CBP 处理人源成 纤维细胞 48 h 后, 或者用不同浓度(5、50、100、250、 500 ng/mL)的 PTX 处理人源成纤维细胞及小鼠成纤 维细胞(L929) 48 h 后, 收集细胞加入 RIPA 裂解 液提取蛋白样品, 行 SDS-PAGE 后将蛋白转移至 PVDF 膜上, 用含 5%脱脂奶粉的 TBST 封闭 1 h 后, 与β-actin、GAPDH 抗体 4 ℃孵育过夜。次日将膜与 对应种属的二抗室温孵育 1 h 后, 用 ECL 显影剂显 影后化学发光成像分析系统拍照。以β-actin 及 GAPDH 作为内参, 使用 Image J 进行定量分析。

1.2.5 RNA 提取与 qRT-PCR 分析

收集 PTX 处理的细胞及 siRNA 转染的人源成纤 维细胞, 用 RNA 提取纯化试剂盒提取及纯化细胞 总 RNA, 并使用逆转录试剂盒将细胞总 RNA 逆转 录成 cDNA。之后, 加入 SYBR qRT-PCR Master Mix, 用 ViiA 7 实时荧光定量 PCR 系统(Life tech- nologies)行 qRT-PCR。以 β-actin 或 GAPDH 为内 参, 采用 2<sup>-ΔΔCT</sup> 方法计算 LOX 在细胞内的相对表达。 引物序列见表 1。

1.2.6 转录组测序

转录组测序由上海美吉生物医药科技有限公 司完成。步骤为: 收集瞬时转染 siRNA (si-Ctrl、si- LOX-1) 24 h 的人源成纤维细胞, 提取总 RNA, 利用 带有 Oligo(dT) 的磁珠与 ployA 进行 A-T 碱基配对, 分离含有 Oligo(dT) 的 mRNA; 加入 fragmentation buffer, 将 mRNA 随机断裂成 300 bp; 在逆转录酶 的作用下, 利用随机引物, 以 mRNA 为模板反转合成 cDNA, 随后进行第二链合成, 形成稳定的双链结构; 将双链 cDNA 的黏性末端加入 End Repair Mix 将其

表1 引物序列  
Table 1 Primer sequences

Gene	Organism	Forward(5'→3')	Reverse(5'→3')
<i>Lox</i>	<i>Mus musculus</i>	CCTGGCCAGTTCAGCATATAG	GTAAGAAGTCCGATGTCCCTTG
<i>LOX</i>	<i>Homo sapiens</i>	TACCCAGCCGACCAAGATA	TGGCATCAAGCAGGTCATAG
<i>β-actin</i>	<i>Mus musculus</i>	CAGCCTTCCTTCTTGGGTATG	GCATAGAGGTCTTTACGGATG
<i>β-ACTIN</i>	<i>Homo sapiens</i>	AAGGCCAACC GCGAGAAG	ACAGCCTGGATAGCAACGTACA
<i>GAPDH</i>	<i>Homo sapiens</i>	ATTCCACCCATGGCAAATTCC	GACTCCACGACGTACTCAGC
<i>CD34</i>	<i>Homo sapiens</i>	AATCAGCACAGTGTTCACCAC	TGCCCTGAGTCAATTTCACTTC
<i>CLDN2</i>	<i>Homo sapiens</i>	GCCTCTGGATGGAATGTGCC	GCTACCGCCACTCTGTCTTTG
<i>ITGAV</i>	<i>Homo sapiens</i>	ATCTGTGAGGTCGAAACAGGA	TGGAGCATACTCAACAGTCTTTG
<i>PTPRF</i>	<i>Homo sapiens</i>	GCTTCGAGGTCATTGAGTTTGA	CCCATGTGATGGAAGGGAA



补成平末端,随后在3'末端加上1个A碱基,以加入 adapter 序列;对连接 adapter 后的产物进行纯化和片段分选,用分选产物进行 PCR 扩增,并使用 Illumina® Stranded mRNA Prep, li 富集文库;使用 Illumina NovaSeq X Plus 测序仪进行 RNA 测序。基因集富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA)由上海美吉生物医药科技有限公司完成。将 si-Ctrl 与 si-LOX-1 差异基因集与标准化 GSEA 分子特征数据库基因集进行分析,探索 LOX 可能发挥作用的通路。

### 1.2.7 免疫组化染色

卵巢癌及癌旁组织来自南京医科大学附属妇产医院(南京市妇幼保健院)病理科,样本搜集获得该院伦理委员会的批准(批准号:2022KY-176)。用4%多聚甲醛固定组织24 h,石蜡包埋后进行连续切片(委托武汉赛维尔生物科技有限公司完成),玻片置于60℃烘箱中过夜。次日,将切片按以下步骤处理:二甲苯30 min 2次,梯度乙醇复水,每级5 min;用柠檬酸钠抗原修复液煮沸30 min 修复抗原,在抗原修复液中自然冷却后用3% $H_2O_2$ 灭活10 min,用山羊血清常温封闭30 min,按照说明书稀释并加入 $\alpha$ -SMA 及 LOX 一抗,4℃孵育过夜。次日用去离子水浸洗3次后室温孵育 HRP 标记的山羊抗兔 IgG、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 30 min, TBS 浸洗3次后用 DAB 工作液显色,镜下观察 DAB 显色并适时终止。去离子水浸洗3次后苏木复染5 min,去离子水浸洗3次后在 TBS 中返蓝5 min,再次用去离子水浸洗3次。随后,梯度乙醇脱水及二甲苯,每级5 min,用中性树脂封片后在正置光学显微镜下观察。

### 1.2.8 细胞免疫荧光

将分离的人源成纤维细胞种于灭菌后已置入爬片的24孔板上,培养24 h后吸去培养基,4%多聚甲醛固定15 min,用含0.1% TritonX-100的PBST室温破膜15 min。加入山羊血清常温封闭30 min,按照说明书稀释并加入 $\alpha$ -SMA 及 Vimentin 抗体,4℃孵育过夜。次日弃一抗后用 PBS 清洗3次爬片,并加入荧光酶标记的抗鼠 IgG 常温避光孵育2 h。弃二抗, PBS 清洗3次后用即用型 DAPI 室温避光孵育5 min。PBS 清洗后,在载玻片上滴加抗荧光淬灭液,将爬片倒扣在载玻片上并在激光共聚焦显微镜下进行拍摄。

### 1.2.9 半数致死剂量(half-maximal inhibitory concentration, $IC_{50}$ )

将 A2780 以及 OV-CAR3 单独或分别与转染 siRNA(siCtrl、siLOX-1、siLOX-2)的人源成纤维细胞

以肿瘤细胞:成纤维细胞=3:1的比例铺入96孔板中(每孔8 000个细胞),待细胞贴壁后,按组别加入不同浓度(肿瘤细胞单独培养:0、31.25、62.50、125.00、250.00、500.00、1 000.00 ng/mL;肿瘤细胞与人成纤维细胞共培养:0、100、200、400、800、1 600、3 200 ng/mL)的 PTX 及无菌生理盐水(对照组)。细胞均置于37℃恒温、含有5%  $CO_2$  的细胞培养箱中培养48 h,通过 CCK8 试剂检测细胞活性,计算  $IC_{50}$  值。

### 1.3 统计学方法

为了研究 LOX 与卵巢癌临床病理特征及初始治疗结局的相关性,将 TCGA 卵巢癌 RNAseq (PKFM)数据根据 LOX mRNA 表达中位数分为高表达组和低表达组,进行正态分布检验后,满足方差齐性的用 Student's *t* 检验,不满足方差齐性的用 Welch's *t* 检验。

使用 GraphPad Prism7.0 软件对数据进行分析,结果以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间差异均用双尾 Student's *t* 检验,多组数据之间比较,采用 One Sample Wilcoxon Signed Rank 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

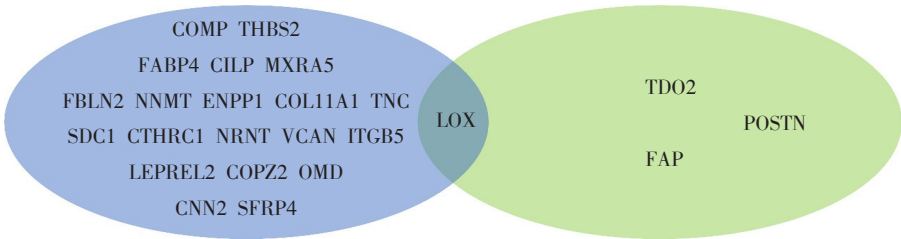
## 2 结果

### 2.1 LOX 高表达与卵巢癌不良化疗结局相关

肿瘤基质成分可通过多种机制调控肿瘤的进展和耐药,为筛选出卵巢癌基质中可能调控肿瘤进展和化疗敏感性的关键靶基因,本课题组比较了原发肿瘤基质成分( $n=11$ )与配对的大网膜转移的卵巢癌样本基质成分( $n=11$ )中蛋白表达差异,筛选出了大网膜转移样本中显著上调的蛋白[差异倍数(fold change, FC) $>5$ ,错误发现率(false discovery rate, FDR) $<0.05$ ]<sup>[17]</sup>,并进一步与在耐药复发卵巢癌患者( $n=32$ )中相比敏感复发卵巢癌患者( $n=26$ )的肿瘤基质中显著上调的 mRNA (FC $>2$ , FDR $<0.05$ )<sup>[18]</sup>取交集(图1),结果发现,仅 LOX 同时在耐药卵巢癌的肿瘤基质和大网膜转移的卵巢癌基质中显著上调。

随后,通过比较 TCGA 数据库中 190 例 LOX 低表达组及 191 例 LOX 高表达组卵巢癌患者临床病理资料发现(表2),与低表达组相比,LOX 高表达组无肿瘤比例显著降低(30.6% vs. 69.4%,  $P < 0.001$ ),提示卵巢癌组织中 LOX 水平可能与肿瘤存在状态相关;与低表达组相比,初始治疗后 LOX 高表达组完全缓解患者的比例显著较低(45.6% vs. 54.4%,  $P < 0.01$ ),提示 LOX 高表达可能与卵巢癌化疗抵抗相





Intersectional analysis of proteins significantly up-regulated in omentum metastatic tumor stroma compared with primary ovarian cancer stroma and mRNA significantly up-regulated in drug-resistant recurrent ovarian cancer samples compared with sensitive recurrent ovarian cancer samples.

图1 文献中显著上调的mRNA与蛋白的交集图

Figure 1 Intersection plot of significantly up-regulated mRNAs and proteins in the literature

关;此外,与低表达组相比,LOX高表达组中发生静脉侵犯的比例也显著升高(56.2% vs. 43.8%,  $P < 0.05$ )。利用KM plotter数据库(Kaplan-Meier plotter database)进行生存分析发现,LOX高表达与卵巢癌总生存期短显著相关,且3种LOX探针对应的mRNA表达结果一致(图2)。综上,LOX高表达与卵巢癌预后差显著相关,可能是一个重要的卵巢癌干预靶点。

表2 TCGA数据库分析LOX mRNA水平与卵巢癌临床特征及初始治疗结局的相关性

Table 2 Correlation between LOX mRNA levels and clinical characteristics as well as initial treatment outcomes in ovarian cancer based on the TCGA database analysis [n(%)]

Characteristic	Cases(n)	Low expression of LOX(n=190)	High expression of LOX(n=191)	P
Age	381			0.801
≤ 60 years	209	103(49.3)	106(50.7)	
> 60 years	172	87(50.6)	85(49.4)	
Clinical stage	378			0.196
I – II	24	15(62.5)	9(37.5)	
III – IV	354	173(48.9)	181(51.1)	
Tumor status	338			<0.001
Tumor free	72	50(69.4)	22(30.6)	
With tumor	266	117(44.0)	149(56.0)	
Primary therapy outcome	309			0.005
PD/SD/PR	92	34(37.0)	58(63.0)	
CR	217	118(54.4)	99(45.6)	
Anatomic neoplasm subdivision	359			0.403
Bilateral	257	126(49.0)	131(51.0)	
Left or right	102	55(53.9)	47(46.1)	
Histologic grade	371			0.568
G1–G2	46	21(45.7)	25(54.3)	
G3–G4	325	163(50.2)	162(49.8)	
Venous invasion	105			0.049
No	41	26(63.4)	15(36.6)	
Yes	64	28(43.8)	36(56.2)	
Lymphatic invasion	149			0.110
No	48	30(62.5)	18(37.5)	
Yes	101	49(48.5)	52(51.5)	
Tumor residual	337			0.184
No	68	39(57.4)	29(42.6)	
Yes	269	130(48.3)	139(51.7)	

PD: Progressive disease; SD: Stable disease; PR: Partial response; CR: Complete response.

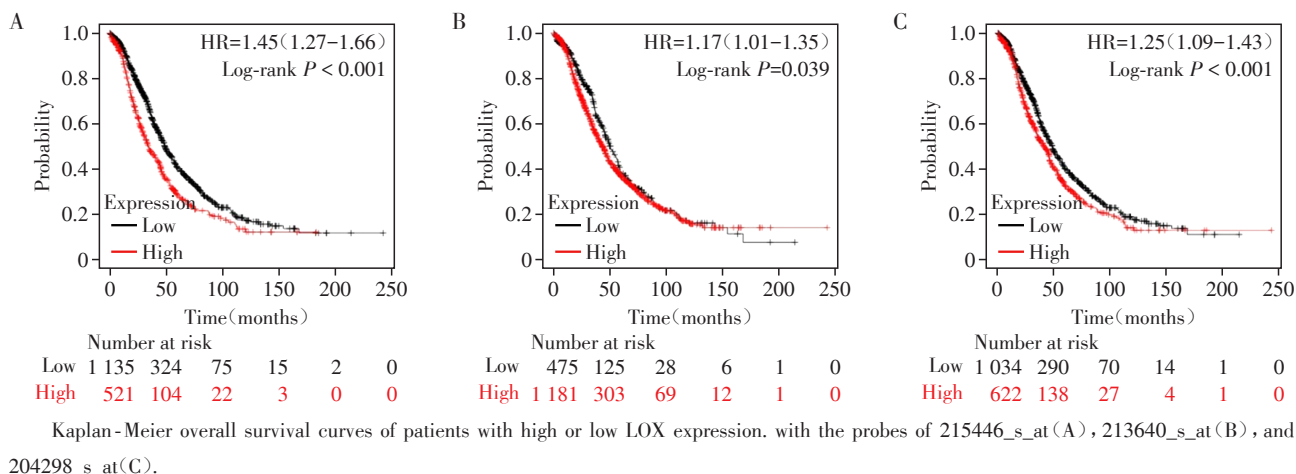


图2 3种不同的LOX探针检测LOX表达水平与卵巢癌患者总生存期的相关性

Figure 2 Three different LOX probes were used to detect the correlation between the expression levels of LOX and the overall survival of ovarian cancer patients

## 2.2 LOX在肿瘤相关成纤维细胞中高表达,敲降LOX可抑制成纤维细胞中细胞黏附分子的表达

由于肿瘤存在显著的异质性,为探究卵巢癌中LOX表达特征及其调节肿瘤进展的机制,首先利用TISCH2单细胞数据库探索了LOX在卵巢癌组织中的表达特征,结果发现,在卵巢癌中,LOX mRNA主要在成纤维细胞中高表达,而在其他细胞中表达量较低(图3A)。随后,在人卵巢癌组织及癌旁对照组织中,通过LOX与 $\alpha$ -SMA免疫组化染色发现,卵巢癌组织中LOX蛋白水平高于癌旁组织,差异有统计学意义(图3B~D,  $P < 0.001$ )。LOX在卵巢癌组织成纤维细胞及卵巢癌细胞中均有表达,但在成纤维细胞中的蛋白水平相对更高。

为进一步验证其可能的作用机制,首先分离了人源成纤维细胞,并通过 $\alpha$ -SMA及Vimentin免疫荧光染色,证明其高表达成纤维细胞分子标志物(图4A、B)。接着,利用siRNA沉默人成纤维细胞中LOX表达,将siLOX组( $n=3$ )及siCtrl组( $n=3$ )细胞进行转录组测序发现,siLOX组中46个基因显著上调,165个基因显著下调( $P_{\text{adjust}} < 0.05$ ,  $FC \geq 2.0$ ,图4C)。随后,通过GSEA发现,siLOX组的人源成纤维细胞中细胞黏附通路归一化的富集得分(enrichment score, ES)为-1.29( $P=0.034$ ),提示LOX可能通过抑制细胞黏附通路表达来发挥作用(图4D)。基于GSEA结果,转染siRNA沉默LOX后验证部分细胞黏附通路mRNA水平表达变化,发现在siLOX组的人源成纤维细胞中ITGAV、PTPRF、CLDN2、CD34等细胞黏附通路分子mRNA水平显著降低(图4E),提示敲降LOX可抑制成纤维细胞中细胞黏附分子的表达。

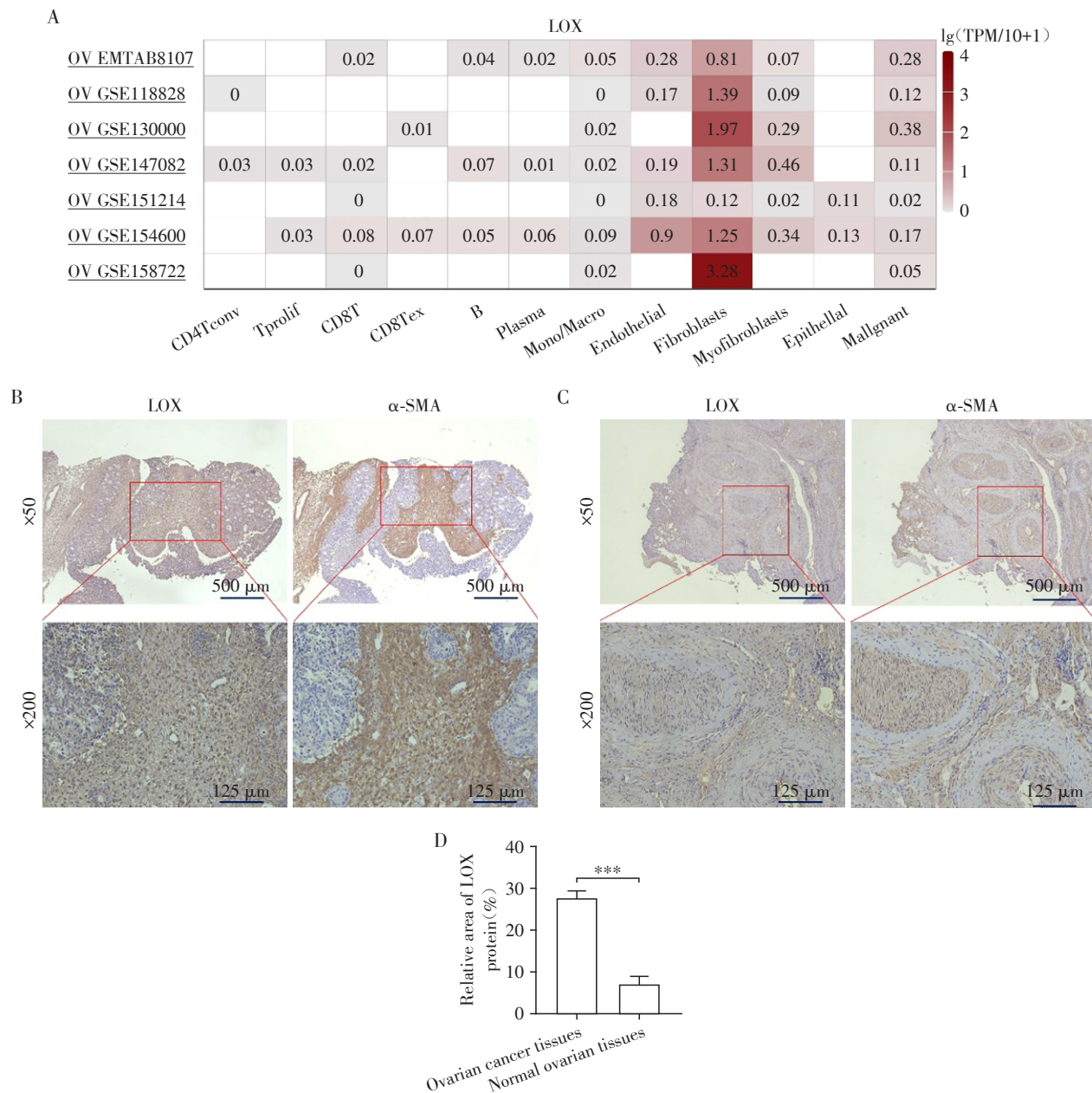
## 2.3 PTX上调成纤维细胞LOX表达,敲降LOX增强卵巢癌细胞PTX敏感性

PTX与铂类药物联合化疗是卵巢癌的常规化疗方案<sup>[19]</sup>。为了探索LOX在卵巢癌化疗中的作用。使用不同浓度的PTX和CBP处理成纤维细胞48 h,从mRNA及蛋白水平验证PTX及CBP对成纤维细胞中LOX表达的影响,结果发现CBP处理不影响LOX的mRNA和蛋白水平(图5A、B),而PTX处理组LOX的mRNA及蛋白水平均增加(图5C、D)。进一步在小鼠成纤维细胞系L929细胞中验证发现,PTX可上调LOX的表达(图5E、F)。以上结果表明PTX化疗可上调成纤维细胞中LOX的表达。

前期已经证明LOX高表达与卵巢癌初始治疗的结局显著相关。为探讨其是否通过成纤维细胞调控卵巢癌初始治疗结局,将人源成纤维细胞与卵巢癌细胞(A2780和OV-CAR3)共培养,使用浓度梯度的PTX处理共培养的细胞后,检测各培养组对PTX的 $IC_{50}$ 。结果显示,与单独培养的肿瘤细胞组比较,成纤维细胞与肿瘤细胞共培养组PTX  $IC_{50}$ 升高[A2780: 339.91 ng/mL vs. 2 120.22 ng/mL; OV-CAR3: 130.78 ng/mL vs. 1 924.14 ng/mL]。肿瘤细胞与成纤维共培养时,与对照组相比,成纤维细胞LOX敲降组PTX  $IC_{50}$ [A2780: si-Ctrl组 2 120.22 ng/mL vs. siLOX-1组 1 314.84 ng/mL, siLOX-2组 1 278.29 ng/mL; OV-CAR3: si-Ctrl组 1 924.14 ng/mL vs. siLOX-1组 1 226.22 ng/mL, siLOX-2组 1 217.75 ng/mL](图6)。

## 3 讨论

LOX已被证实在多种肿瘤中参与肿瘤的发生与



A: Analysis of LOX mRNA expression characteristics in ovarian cancer microenvironment by using the TISCH2 database. B: The expression characteristics of LOX and α-SMA in human ovarian cancer tissues. C: The expression characteristics of LOX and α-SMA in human normal ovarian tissues. D: Quantification of LOX protein expression of human normol ovarian cancer tissues and normal ovarian tissues, \*\*\**P* < 0.001 (*n*=3).

图3 卵巢癌微环境中LOX在成纤维细胞中的表达丰度较高

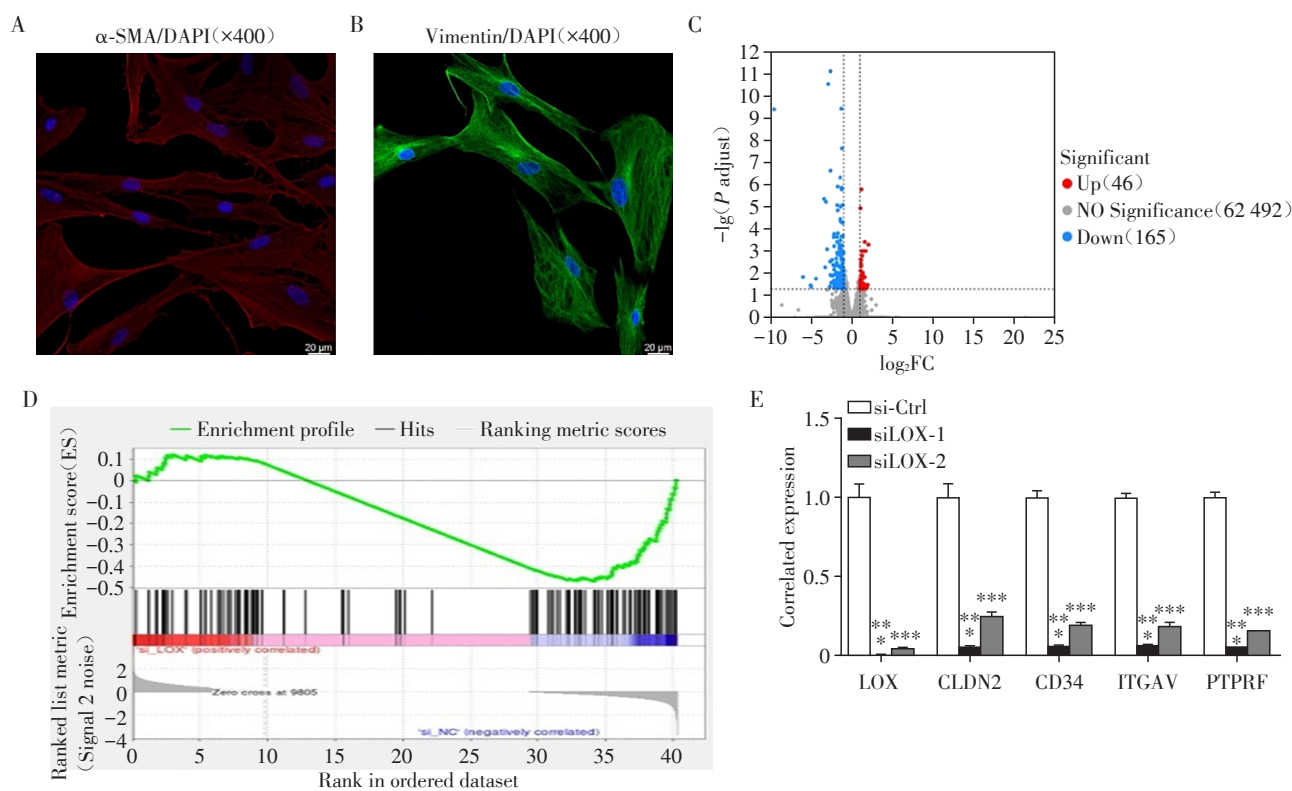
Figure 3 LOX was highly expressed in fibroblasts in ovarian cancer microenvironment

发展<sup>[20]</sup>。一方面,肿瘤细胞中LOX可通过调节胶原蛋白和弹性蛋白交联,增加ECM刚度,促进肿瘤细胞生长、侵袭、转移、血管生成等<sup>[21]</sup>;另一方面,LOX也可以通过调控T细胞等参与细胞外基质重塑,促进肿瘤的进展<sup>[22]</sup>。在LOX与胆管癌的研究中<sup>[23]</sup>,发现LOX升高是由间质炎性癌症相关成纤维细胞驱动的,LOX蛋白在CAF中丰度较高。且CAF来源的LOX可以通过调控氧化磷酸化,调节微环境中肿瘤细胞的转录重编程,增加肿瘤细胞的干性和转移能力<sup>[24]</sup>。然而,

LOX在卵巢癌中的表达模式及相关机制未有研究报道。本研究结合TISCH2单细胞数据库结果及人卵巢癌组织与癌旁组织免疫组化染色,发现卵巢癌LOX在成纤维细胞中的蛋白表达水平相对更高,这与其他肿瘤中LOX表达特征基本一致<sup>[25-27]</sup>。

此前关于LOX在卵巢癌中的功能及机制的探索主要集中在肿瘤细胞<sup>[28]</sup>,本研究利用单细胞测序数据及免疫组化等发现,LOX mRNA和蛋白在卵巢癌成纤维细胞中的表达高于卵巢癌细胞。结合TC-

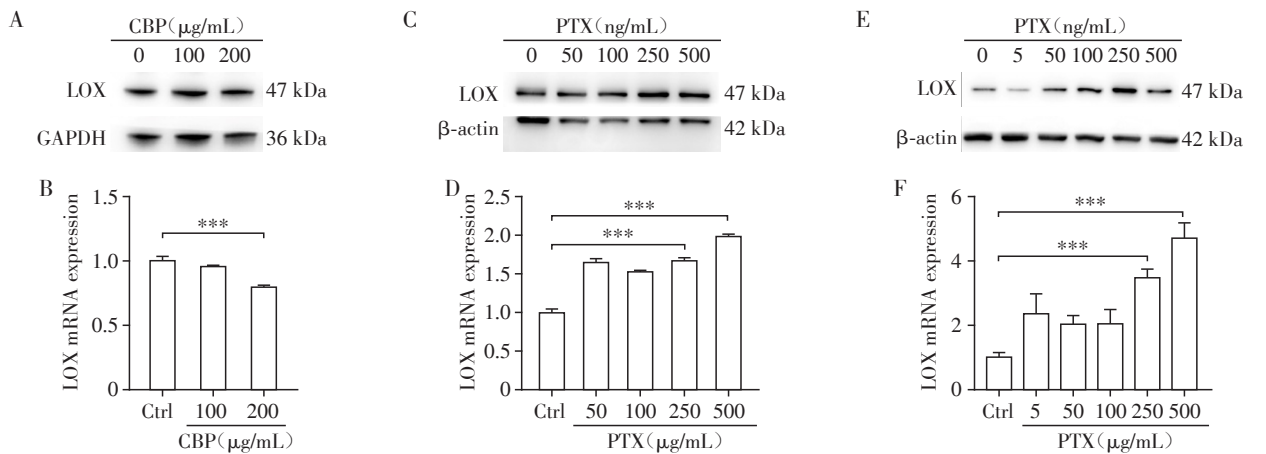




A: The expression characteristics of  $\alpha$ -SMA in human fibroblasts (×400). B: The expression characteristics of Vimentin in human fibroblasts (×400). C: Volcano plot of expression difference ( $P_{\text{adjust}} < 0.05$ ,  $FC \geq 2.0$ ). D: The GSEA enrichment analysis revealed a significant downregulation of cell adhesion molecules in siLOX group. E: Differences of cell adhesion molecules in human fibroblasts induced by silencing LOX were analyzed using qRT-PCR. Compared with the si-Ctrl group, \*\*\* $P < 0.001$  ( $n=3$ ).

图4 沉默LOX可显著下调细胞黏附分子表达

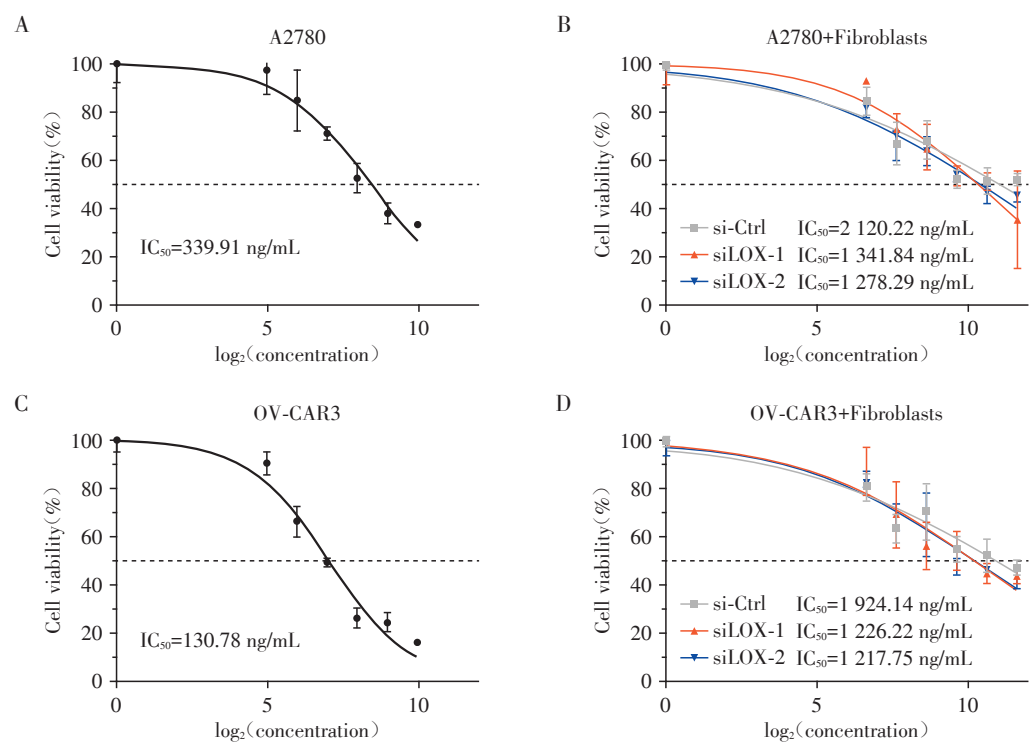
Figure 4 Silencing LOX significantly downregulated the expression of cell adhesion molecules



A: Western blot validation of differences in LOX protein expression in human fibroblasts induced by different concentrations of carboplatin. B: Differences in LOX expression in human fibroblasts induced by varying concentrations of carboplatin were analyzed using RT-qPCR. C: Western blot validation of differences in LOX protein expression in human fibroblasts induced by different concentrations of paclitaxel. D: Differences in LOX expression in human fibroblasts induced by varying concentrations of paclitaxel were analyzed using RT-qPCR. E: Western blot validation of differences in LOX protein expression in L929 induced by different concentrations of paclitaxel. F: Differences in LOX expression in L929 induced by varying concentrations of paclitaxel were analyzed using RT-qPCR. \*\*\* $P < 0.001$  ( $n=3$ ).

图5 PTX处理可促进成纤维细胞LOX的表达

Figure 5 PTX treatment promoted the expression of LOX in fibroblasts



A: CCK8 assay to investigate the effects of different concentrations of paclitaxel on the viability of A2780 cells. B: CCK8 assay to investigate the effects of different concentrations of paclitaxel on the viability of co-cultured A2780 cells and fibroblasts (at a ratio of 3:1). C: CCK8 assay to investigate the effects of different concentrations of paclitaxel on the viability of OV-CAR3 cells. D: CCK8 assay to investigate the effects of different concentrations of paclitaxel on the viability of co-cultured OV-CAR3 cells and fibroblasts (at a ratio of 3:1).

图6 成纤维细胞中敲降LOX可增加卵巢癌细胞及成纤维细胞对紫杉醇的敏感性

Figure 6 Knockdown of LOX in fibroblasts increased the sensitivity of ovarian cancer cells and fibroblasts to paclitaxel

GA数据库中LOX mRNA表达与卵巢癌不良预后及初始治疗结局差的相关性,成纤维细胞中的LOX可能调控肿瘤的进展和化疗耐药等。既往研究多聚焦于LOX高表达卵巢癌细胞的侵袭和迁移等恶性行为<sup>[29]</sup>,而LOX与卵巢癌耐药的关系却较少被探讨。在一项LOX与卵巢癌的研究中,PTX耐药卵巢癌细胞系(A2780PR1)中LOX表达显著高于亲本对照细胞系(A2780)<sup>[28]</sup>。此外,已有研究发现,PTX可上调T细胞中LOX表达<sup>[14]</sup>。但化疗是否影响成纤维细胞中LOX表达尚不明确。基于LOX的表达特征,本研究以人源及小鼠成纤维细胞系为模型,探索了LOX可能的上下游机制。在下游机制中,结果与已有研究结果一致,LOX主要通过调控细胞黏附通路分子表达来发挥作用<sup>[30]</sup>;在上游机制方面,本研究发现卵巢癌中常用化疗药物PTX可以促进成纤维细胞中LOX的表达,而CBP则对成纤维细胞中LOX表达无显著影响。进一步的IC<sub>50</sub>分析表明,敲降LOX可以增强共培养的肿瘤细胞和成纤维细胞对PTX的敏感性,提示PTX化疗可能对间质成分较高的卵巢癌患者效果有限。

综上,本研究从探索卵巢癌基质中可能调控卵巢癌进展及化疗敏感性的关键分子出发,证明LOX可能是卵巢癌基质中促进卵巢癌进展及化疗耐药的关键分子。进一步发现LOX在卵巢癌微环境的成纤维细胞中表达水平相对较高,为深入了解LOX作用机制提供了新的见解,并可能为卵巢癌的个体化化疗提供参考。关于PTX如何介导LOX上调的机制部分尚需要更多的实验证据。

[参考文献]

[1] TORRE L A, TRABERT B, DESANTIS C E, et al. Ovarian cancer statistics, 2018[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68 (4): 284-296

[2] BHAVSAR D, RAGURAMAN R, KIM D, et al. Exosomes in diagnostic and therapeutic applications of ovarian cancer[J]. J Ovarian Res, 2024, 17(1): 113

[3] BAO W Y, LI Z Y. Efficacy and safety of neoadjuvant chemotherapy containing anti-angiogenic drugs, immunotherapy, or PARP inhibitors for ovarian cancer[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2024, 194: 104238

[4] ZHONG Y, CAO L, MA H, et al. Lin28A regulates stem-

- like properties of ovarian cancer cells by enriching RAN and HSBP1 mRNA and up-regulating its protein expression[J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(11): 1941–1953
- [5] YANG L, XIE H J, LI Y Y, et al. Molecular mechanisms of platinum - based chemotherapy resistance in ovarian cancer(Review)[J]. *Oncol Rep*, 2022, 47(4): 82
- [6] SIDDHARTHA R, GARG M. Interplay between extracellular matrix remodeling and angiogenesis in tumor ecosystem[J]. *Mol Cancer Ther*, 2023, 22(3): 291–305
- [7] NEDAEINIA R, NAJAFGHOLIAN S, SALEHI R, et al. The role of cancer - associated fibroblasts and exosomal miRNAs-mediated intercellular communication in the tumor microenvironment and the biology of carcinogenesis: a systematic review (review) [J]. *Cell Death Discov*, 2024, 10(1): 380
- [8] LIU Y, ZHANG X, GU W, et al. Unlocking the crucial role of cancer-associated fibroblasts in tumor metastasis: mechanisms and therapeutic prospects (review) [J]. *J Adv Res*, 2024, 31: S2090-1232(24)00220-0
- [9] WANG H, LIANG Y, LIU Z, et al. POSTN+ cancer-associated fibroblasts determine the efficacy of immunotherapy in hepatocellular carcinoma[J]. *J Immunother Cancer*, 2024, 12(7): e008721
- [10] WANG T H, HSIA S M, SHIEH T M. Lysyl oxidase and the tumor microenvironment (review) [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 18(1): 62
- [11] CAI R Q, TRESSLER C M, CHENG M L, et al. Primary breast tumor induced extracellular matrix remodeling in premetastatic lungs[J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 18566
- [12] WANG W, WANG X, YAO F, et al. Lysyl oxidase family proteins: prospective therapeutic targets in cancer[J]. *Int J Mol Sci*. 2022, 23(20): 12270
- [13] CHITTY J L, YAM M, PERRYMAN L, et al. A first-in-class pan-lysyl oxidase inhibitor impairs stromal remodeling and enhances gemcitabine response and survival in pancreatic cancer[J]. *Nat Cancer*, 2023, 4(9): 1326–1344
- [14] HAJ-SHOMALY J, VORONTSOVA A, BARENHOLZ-COHEN T, et al. T cells promote metastasis by regulating extracellular matrix remodeling following chemotherapy[J]. *Cancer Res*, 2022, 82(2): 278–291
- [15] YE M M, ZHOU J H, GAO Y, et al. The prognostic value of the lysyl oxidase family in ovarian cancer[J]. *J Clin Lab Anal*, 2020, 34(12): e23538
- [16] NATARAJAN S, FOREMAN K M, SORIANO M I, et al. Collagen remodeling in the hypoxic tumor - mesothelial niche promotes ovarian cancer metastasis [J]. *Cancer Res*, 2019, 79(9): 2271–2284
- [17] ECKERT M A, COSCIA F, CHRYPLEWICZ A, et al. Proteomics reveals NNMT as a master metabolic regulator of cancer - associated fibroblasts [J]. *Nature*, 2019, 569(7758): 723–728
- [18] RYNER L, GUAN Y H, FIRESTEIN R, et al. Upregulation of periostin and reactive stroma is associated with primary chemoresistance and predicts clinical outcomes in epithelial ovarian cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(13): 2941–2951
- [19] RAY-COQUARD I L, SAVOYE A M, SCHIFFLER C, et al. Neoadjuvant and adjuvant pembrolizumab in advanced high - grade serous carcinoma: the randomized phase II NeoPembrOV clinical trial[J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 5931
- [20] LIBURKIN-DAN T, TOLEDANO S, NEUFELD G. Lysyl oxidase family enzymes and their role in tumor progression (review)[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(11): 6249
- [21] LAURENTINO T S, SOARES R D S, MARIE S K N, et al. Correlation of matrisome - associated gene expressions with LOX family members in astrocytomas stratified by IDH mutation status[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(17): 9507
- [22] NICOLAS-BOLUDA A, VAQUERO J, VIMEUX L, et al. Tumor stiffening reversion through collagen crosslinking inhibition improves T cell migration and anti-PD-1 treatment[J]. *Elife*, 2021, 10: e58688
- [23] LEWINSKA M, ZHURAVLEVA E, SATRIANO L, et al. Fibroblast-derived lysyl oxidase increases oxidative phosphorylation and stemness in cholangiocarcinoma[J]. *Gastroenterology*. 2024, 165(5): 886–901
- [24] ZHANG J Y, ZHU W W, WANG M Y, et al. Cancer-associated fibroblasts promote oral squamous cell carcinoma progression through LOX-mediated matrix stiffness[J]. *J Transl Med*, 2021, 19(1): 513
- [25] LIU X, LI J, YANG X S, et al. Carcinoma-associated fibroblast-derived lysyl oxidase-rich extracellular vesicles mediate collagen crosslinking and promote epithelial-mesenchymal transition *via* p-FAK/p-paxillin/YAP signaling[J]. *Int J Oral Sci*, 2023, 15(1): 32
- [26] ZHAO H, LI R, CHEN Y, et al. Stromal nicotinamide N-methyltransferase orchestrates the crosstalk between fibroblasts and tumour cells in oral squamous cell carcinoma: evidence from patient - derived assembled organoids [J]. *Oncogene*, 2023, 42(15): 1166–1180
- [27] TANG X, HOU Y, YANG G, et al. Stromal miR-200s contribute to breast cancer cell invasion through CAF activation and ECM remodeling[J]. *Cell Death Differ*, 2016, 23(1): 132–145
- [28] STERZYŃSKA K, KLEJEWSKI A, WOJTOWICZ K, et al. Mutual expression of ALDH1A1, LOX, and collagens in



ovarian cancer cell lines as combined CSCs- and ECM-related models of drug resistance development[J]. *Int J Mol Sci*,2018,20(1):54

[29] YE M, SONG Y, PAN S, et al. Evolving roles of lysyl oxidase family in tumorigenesis and cancer therapy (review)[J]. *Pharmacol Ther*,2020,215: 107633

[30] LIU Y F, SUN B J, LIN Y, et al. Lysyl oxidase promotes the formation of vasculogenic mimicry in gastric cancer through PDGF-PDGFR pathway[J]. *J Cancer*, 2024, 15(7):1816-1825

[收稿日期] 2024-05-28  
(本文编辑:戴王娟)

(上接第1498页)

国慢性肾脏病营养治疗临床实践指南(2021版)[J]. *中华医学杂志*,2021,101(8):539-559

[5] IKIZLER T A, BURROWES J D, BYHAM-GRAY L D, et al. KDOQI clinical practice guideline for nutrition in CKD:2020 update[J]. *Am J Kidney Dis*,2020,76(3 Suppl 1):S1-S107

[6] 陈 涛,赵庆勇,朱 镇,等. 利用分子标记辅助选择培育优良食味、低谷蛋白香粳稻新品系[J]. *中国水稻科学*,2023,37(1):55-65

[7] 杨 涛. 阿霉素联合羟基脲诱导大鼠CKD肾阳虚证模型的建立与评价及真武汤干预机制研究[D]. 北京:北京中医药大学,2020:35

[8] LU Q Y, YANG L J, XIAO J J, et al. Empagliflozin attenuates the renal tubular ferroptosis in diabetic kidney disease through AMPK/NRF2 pathway[J]. *Free Radic Biol Med*,2023,195:89-102

[9] 任宇晴,唐 堂,李 颖,等. 降糖丸抑制TGF- $\beta$ 1改善糖尿病肾病小鼠肾损伤及纤维化[J]. *中国药理学通报*,2023,39(10):1988-1993

[10] 刘 苏,徐巍龙,查 敏,等. miR-296-5p在糖尿病肾病db/db小鼠血浆外泌体中的表达及功能[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*,2022,42(1):14-22

[11] ZHANG H Y, NAIR V, SAHA J, et al. Podocyte-specific JAK2 overexpression worsens diabetic kidney disease in mice[J]. *Kidney Int*,2017,92(4):909-921

[12] LI L, TANG W, ZHANG Y, et al. Targeting tissue-resident memory CD8<sup>+</sup> T cells in the kidney is a potential therapeutic strategy to ameliorate podocyte injury and glomerulosclerosis[J]. *Mol Ther*,2022,30(8):2746-2759

[13] ZHOU M J, GUO C H, LI X, et al. JAK/STAT signaling controls the fate of CD8<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> tissue-resident memory T cell in lupus nephritis[J]. *J Autoimmun*,2020,109:102424

[14] ZHANG Y Q, JIN D, KANG X M, et al. Signaling pathways involved in diabetic renal fibrosis [J]. *Front Cell Dev Biol*,2021,9:696542

[15] KITADA M, OGURA Y, MONNO I, et al. A low-protein diet for diabetic kidney disease: its effect and molecular mechanism, an approach from animal studies[J]. *Nutrients*,2018,10(5):544

[16] KITADA M, OGURA Y, SUZUKI T, et al. A very-low-protein diet ameliorates advanced diabetic nephropathy through autophagy induction by suppression of the mTORC1 pathway in Wistar fatty rats, an animal model of type 2 diabetes and obesity [J]. *Diabetologia*, 2016, 59(6):1307-1317

[17] WEI S Y, LI C C, LUO X M, et al. Intermittent protein restriction protects islet  $\beta$  cells and improves glucose homeostasis in diabetic mice[J]. *Sci Bull*, 2022, 67(7):733-747

[收稿日期] 2024-08-07  
(本文编辑:陈汐敏)