

【DOI】 10.3969 / j.issn.1671-6450.2024.10.002

PCR 技术与肿瘤

β -氨基丙腈通过抑制赖氨酰氧化酶减弱低氧诱导的非小细胞肺癌转移侵袭

王楷,王聪剑,鞠雪涛,焦振华,喻钧

基金项目: 国家自然科学基金(81902347)

作者单位: 430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院胸外科

通信作者: 喻钧, E-mail: junyu2018@ hotmail.com



【摘要】 目的 探讨 β -氨基丙腈(β -APN)通过抑制赖氨酰氧化酶(LOX)减弱低氧诱导的非小细胞肺癌(NSCLC)转移侵袭的作用及其机制。方法 低氧状态对 NSCLC 细胞 LOX 表达及催化活性的实验: 将 A549、SPCA1 细胞系各分为常氧组、低氧 12 h 组、低氧 24 h 组; β -APN 介导 LOX 失活导致 NSCLC 细胞迁移侵袭能力及上皮-间质转化(EMT)相关分子表达变化的实验: 将 A549、SPCA1 细胞系分常氧组、低氧组、低氧+ β -APN 组。运用荧光法检测 2 种细胞 LOX 活性,采用逆转录及实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测细胞中低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、LOX、上皮性钙黏附蛋白(E-cadherin)、神经钙黏蛋白(N-cadherin)、基质金属蛋白酶 2(MMP-2)、MMP-9 基因表达情况,运用 Western blot 检测 E-cadherin、N-cadherin、MMP-2、MMP-9 蛋白水平。利用 Transwell 试验检测 NSCLC 细胞的转移侵袭能力。结果 与常氧组比较,低氧 12 h 组和低氧 24 h 组 A549 及 SPCA1 细胞 HIF-1 α 、LOX mRNA 表达水平显著上调($P<0.01$),HIF-1 α 、LOX 蛋白水平显著上调($P<0.01$),LOX 酶活性显著增强($P<0.01$)。与常氧组比较,低氧组 A549 及 SPCA1 细胞系的迁移能力和侵袭能力增强;与低氧组比较,低氧+ β -APN 组均显著减弱($P<0.01$)。与常氧组比较,低氧组中 E-cadherin mRNA 的表达水平下降,N-cadherin、MMP-2 及 MMP-9 mRNA 的表达水平上升;与低氧组比较,低氧+ β -APN 组 E-cadherin mRNA 的表达水平上升,N-cadherin、MMP-2 及 MMP-9 mRNA 的表达水平下降($P<0.01$)。与常氧组比较,低氧组 E-cadherin 蛋白水平下降及 N-cadherin、MMP-2、MMP-9 蛋白水平上升;与低氧组比较,低氧+ β -APN 组 E-cadherin 的蛋白水平上升,N-cadherin、MMP-2、MMP-9 蛋白水平下降($P<0.01$)。结论 β -APN 可通过抑制 LOX 酶减弱低氧诱导的 NSCLC 转移侵袭。

【关键词】 非小细胞肺癌; β -氨基丙腈;赖氨酰氧化酶;侵袭;迁移;作用机制**【中图分类号】** R734.2**【文献标识码】** A

Lysyl oxidase inhibition via β aminopropionitrile attenuates hypoxia induced migration and invasion of non-small cell lung cancer cells Wang Kai , Wang Congjian , Ju Xuetao , Jiao Zhenhua , Yu Jun. Department of Thoracic Surgery , Tongji Hospital Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology , Hubei Province , Wuhan 430030 , China

Funding program: National Natural Science Foundation of China(81902347)

Corresponding author: Yu Jun , E-mail: junyu2018@ hotmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect and mechanism of aminopropionitrile (β APN) on hypoxia induced metastasis and invasion of non-small cell lung cancer (NSCLC) by inhibiting lysyl oxidase (LOX). **Methods** Experiments on the expression and catalytic activity of LOX in NSCLC cells under hypoxia state: A549 and SPCA1 cell lines were divided into normal oxygen group, hypoxia 12h group and hypoxia 24h group. Experiments on changes of NSCLC cell migration and invasion ability and epithelial mesenchymal transition (EMT) related molecular expression induced by β APN mediated LOX inactivation: A549 and SPCA1 cell lines were divided into normal oxygen group, hypoxia group, hypoxia+ β APN group. LOX activity of the two cells was detected by fluorescence assay. The expression of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α), LOX, epithelial cadherin (E-cadherin), neural cadherin (N-cadherin), matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) genes were detected by reverse transcription and quantitative real time PCR (qRT-PCR). The protein expression levels of E cadherin, N cadherin, MMP-2 and MMP-9 were detected by Western blot. Transwell assay was used to detect the migration and invasion ability of NSCLC cells. **Results** Compared with normoxia group, the expression levels of HIF-1 α

mRNA and LOX mRNA in A549 and SPCA1 cells in hypoxia 12h and hypoxia 24h group were significantly up regulated ($P < 0.01$), HIF-1 α protein and LOX protein were significantly up-regulated ($P < 0.01$), and LOX enzyme activity of were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with normoxia group, the migration and invasion ability of A549 and SPCA1 cell lines in hypoxia group were enhanced, while all significantly decreased in hypoxia+ β APN group ($P < 0.01$). Compared with normoxia group, the expression level of E cadherin mRNA in hypoxia group was decreased, and the expression levels of N cadherin mRNA, MMP-2 mRNA and MMP-9 mRNA were increased, while the expression level of E cadherin mRNA increased, and the expression levels of N cadherin mRNA, MMP-2 mRNA and MMP-9 mRNA decreased in hypoxia+ β APN group ($P < 0.01$). Compared with normoxia group, the expression of E cadherin protein decreased and the expression of N cadherin, MMP2 and MMP9 protein increased in the hypoxia group, while the expression levels of N cadherin, MMP-2 and MMP-9 protein decreased, E cadherin protein was increased in hypoxia+ β APN group ($P < 0.01$). **Conclusion** β APN can attenuate hypoxic induced migration and invasion of NSCLC by inhibiting LOX enzyme.

【Key words】 Non small cell lung cancer; β -aminopropionitrile; Lysyl oxidase; Invasion; Migration; Mechanism

非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 在全球范围内的癌症死因中长期居于首要位置^[1]。尽管近几年外科手术、放化疗及靶向治疗在临床中有所突破,但 NSCLC 患者的 5 年生存率也仅有 15%^[2]。治疗失败的常见原因是肿瘤的局部复发及远处转移。因此,阐明 NSCLC 转移侵袭机制、寻找改善 NSCLC 患者生存率的精确治疗目标是当前首要的工作。实体肿瘤的特征之一是低氧供状态,越来越多的证据表明肿瘤内部的低氧状态可促进包括肿瘤细胞侵袭、转移、附着及血管生成在内的肿瘤活动^[3-4]。缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α) 是由低氧状态下诱导产生的一种关键转录因子,这种因子可通过激活多种下游基因如赖氨酰氧化酶 (lysyl oxidase, LOX) 而影响肿瘤生长过程^[5]。LOX 是一种铜依赖性胺氧化酶,其主要作用是维系胞外基质结构稳定及保持结缔组织强度^[6]。这种酶最初以 50 kD 的酶原形式分泌到细胞外环境中。随后在胞外经骨形态发生蛋白 1 (bone morphogenetic protein-1, BMP-1) 分解为成熟的 32 kD 的 LOX 蛋白和 18 kD 的前肽。除了胞外基质重塑功能外,许多研究报道低氧诱导产生的 LOX 酶也参与到肿瘤生成过程中,如介导肿瘤的转移侵袭及血管生成^[7-8]。此前有报道在 NSCLC 中 LOX 的过表达会促进肿瘤发展,LOX 可作为 HIF-1 α 信号通路上的下游信号分子而发挥促癌作用^[9]。在本研究中,假设在体外实验中低氧诱导的 LOX 上调会促进 NSCLC 转移与侵袭,同时进一步研究 LOX 酶抑制剂 β -氨基丙腈 (β -APN) 的抗癌机制,报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料 (1) 细胞: 肺腺癌细胞系 A549、SPCA1 购自中国科学院细胞库。(2) 试剂: 胎牛血清、RPMI-1640 培养基、Fast SYBR 预混液购自美国赛默飞公司; Bradford 蛋白浓度测定试剂盒购自中国武汉博

斯特生物技术有限公司; 辣根过氧化物酶、 β -APN 购自美国默克西格玛公司; Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司; 抗体 HIF-1 α 、LOX、E-cadherin、N-cadherin、MMP-2、MMP-9、 β -actin、辣根过氧化物酶结合二级抗体 (山羊抗兔和山羊抗小鼠) 购自 Jackson Immunology Research 实验室。(3) 仪器: Thermo-37 型 CO₂ 培养箱购自美国赛默飞公司; Pro-Ox 110 精密三气培养箱购自美国 Biospherix 公司; 分光光度计购自美国 Nanodrop 公司; SuperScript 第一链合成系统购自美国 Invitrogen 公司; 荧光阅读器 ABI-stephephone 系统购自美国 Applied Biosystems 公司。

1.2 实验方法 本实验于 2023 年 9 月—2024 年 1 月在华中科技大学同济医学院科研大楼实验室完成。

1.2.1 细胞培养与氧气夺获: (1) 在探讨低氧状态对 NSCLC 细胞 LOX 表达及催化活性的实验中,将 A549、SPCA1 细胞系分为常氧组、低氧 12 h 组、低氧 24 h 组,常氧组细胞保存在含有 10% FCS 和 100 ng/ml 链霉素、100 U/ml 青霉素的 RPMI-1640 培养基中,于 37℃、5% 二氧化碳培养箱中培养,低氧 12 h 组和低氧 24 h 组细胞在上述培养基中于 37℃ 下,在 1% 氧气、5% 二氧化碳和 94% 氮气下培养 12 h 和 24 h。(2) 在探讨 β -APN 介导 LOX 失活导致 NSCLC 细胞迁移、侵袭能力及上皮-间质转化 (EMT) 相关分子表达变化的实验中,将 A549、SPCA1 细胞系分为常氧组、低氧组、低氧+ β -APN 组,低氧组仅置于低氧条件下培养,低氧+ β -APN 组提前给予 β -APN 然后置于低氧条件下培养。

1.2.2 LOX 活性测定: 用荧光法测定 LOX 的催化活性。无酚红 RPMI-1640 中的 NSCLC 细胞在常氧或缺氧条件下培养。收集条件培养基的上清液,使用 Bradford 分析试剂盒测定上清液的蛋白质浓度。然后,将 100 μ l 上清液与 400 μ l 反应缓冲液 [1.2 mol/L 尿素、0.05 mol/L 硼酸钠 (pH 8.2) 与 1 单位/ml 辣根过氧化

物酶、10 $\mu\text{mol/L}$ Amplex red 和 10 mmol/L 二氨基戊烷]混合,并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 30 min。为了抑制 LOX 活性,则在混合培养物中加入 1 000 $\mu\text{mol/L}$ β -APN。样品在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 30 min,置于冰上,然后在 560 nm 的激发波长下记录,发射波长为 590 nm。通过计算有无 β -APN 的样品之间荧光强度的差异来评估 LOX 催化活性,并将每个结果归一化为细胞总蛋白。

1.2.3 RNA 分离、逆转录及 qRT-PCR 检测:用 Trizol 试剂提取各个细胞系总 RNA。用分光光度计测量 RNA 浓度。使用 1 μg RNA 进行逆转录。使用 Super-Script First Strand cDNA 系统逆向转录 RNA。HIF-1 α 、LOX、E-cadherin、N-cadherin、MMP-2、MMP-9 基因在荧光阅读器 ABI-stephone β -actin 系统中扩增。扩增体系总容积为 10 μl ,包括 5 μl Fast SYBR Green Master Mix、3 μl 无菌水、1 μl cDNA 和 0.5 μl 每个引物。循环条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 下初始激活 20 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 3 s 40 个周期,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火/延伸 30 s,每个基因的引物序列见表 1。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算 mRNA 的相对表达量,其中 $\Delta\text{Ct}=(\text{Ct}_{\text{靶基因}}-\text{Ct}_{\beta\text{-actin}})$ 。每个实验分 3 次进行。

表 1 qRT-PCR 中使用的引物序列
Tab.1 Primer sequence used in qRT PCR

基因	上游	下游
HIF-1 α	5'-TGAGCCAGAAGAACT-TTTAG-3'	5'-AGACATATCCACCT-CTTTTG-3'
LOX	5'-CCTGGTTCCTGAATC-TGACT-3'	5'-CTTCAGAACACCAGG-CACTG-3'
E-cadherin	5'-AGGTCACAGCCACAG-ACG-3'	5'-GCAGCTTGAACACCA-GG-3'
N-cadherin	5'-AGGATCAACCCCATACAC-3'	5'-CTTGGCTAATGGCACTTG-3'
MMP-2	5'-CTTCTTCCTCGCAAG-CC-3'	5'-ATGGAT-TCGAGAAAACCG-3'
MMP-9	5'-ACGCAGACATCGTCA-TCC-3'	5'-AACCGAGTTGGAACC-ACG-3'
β -actin	5'-GCAAAATGCTTCTAGG-CGGAC-3'	5'-GCTGTACACCTTCACC-GTTCC-3'

1.2.4 免疫印迹分析:用 RIPA 裂解缓冲液提取细胞蛋白,用 BCA 蛋白实验试剂加 Bradford 法测定蛋白浓度。采用免疫印迹法进行免疫印迹。实验中使用的一级抗体有: HIF-1 α (1:1 000)、LOX (1:1 000)、E-cadherin (1:500)、N-cadherin (1:500)、MMP-2 (1:500)、MMP-9 (1:500)、 β -actin (1:1 000)。辣根过氧化物酶结合二级抗体(山羊抗兔和山羊抗小鼠)。使用 Quantity One 软件对印迹带进行密度测定。

1.2.5 体外侵袭迁移试验:细胞侵袭试验在 Transwell

小室中进行。8 μm 孔径的过滤器涂有 100 μl 1 mg/ml 的基质凝胶,收集细胞,将均匀的单细胞悬浮液(2×10^5 个细胞/孔)加入上室,在常氧或缺氧条件下培养 24 h。将含有 10% FBS 的 500 μl RPMI 1640 培养基添加到下室。在氧气夺获前将 β -APN 加入培养基中,并在整个实验过程中持续。用类似的方法检测细胞迁移,而不使用基质凝胶包被。孵育 24 h 后,用棉签除去顶腔细胞,移行细胞固定于 PBS、25%戊二醛中,结晶紫染色,相差显微镜下观察、拍照。在醋酸和甲醇(1:1)中溶解结晶紫染色细胞,在 595 nm 处测定吸光度。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 25.0 软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,2 组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

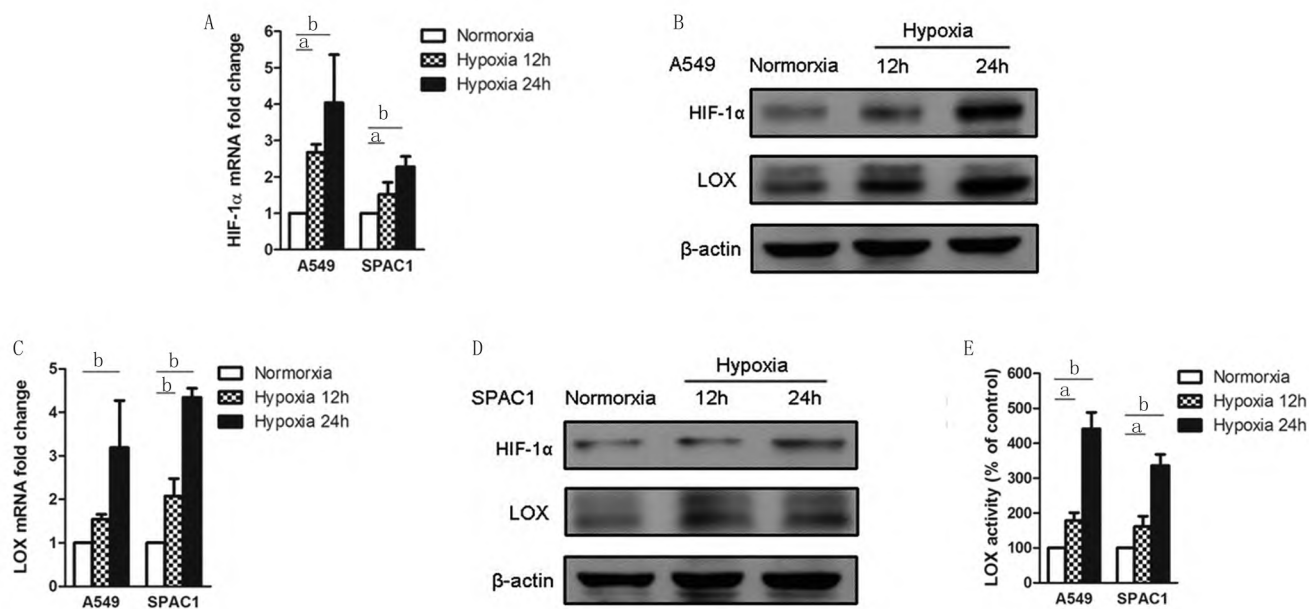
2 结果

2.1 低氧状态对 LOX 在 NSCLC 细胞中 mRNA 表达、蛋白水平及酶活性的影响 与常氧组比较,低氧 12 h 组和低氧 24 h 组 A549 及 SPCA1 细胞 HIF-1 α 、LOX mRNA 表达水平显著上调($P<0.01$),见图 1A、C。免疫印迹试验显示,与常氧组比较,低氧 12 h 组和低氧 24 h 组 A549 及 SPCA1 细胞 HIF-1 α 、LOX 蛋白水平显著上调($P<0.01$),见图 1B、D。酶活性实验显示,与常氧组比较,低氧 12 h 组和低氧 24 h 组 A549 及 SPCA1 细胞的 LOX 酶活性显著增强($P<0.01$),见图 1E。

2.2 由 β -APN 介导的 LOX 失活对低氧状态诱导的 NSCLC 细胞转移侵袭的影响 与常氧组比较,低氧组 A549 及 SPCA1 细胞系的迁移和侵袭能力均显著增强($P<0.01$);与低氧组比较,低氧+ β -APN 组 A549 及 SPCA1 细胞系的迁移和侵袭能力均显著减弱($P<0.01$),见图 2。

2.3 各组 A549 及 SPCA1 细胞系 EMT 相关分子的表达比较 与常氧组比较,低氧组中 E-cadherin mRNA 的表达水平下降,N-cadherin、MMP-2 及 MMP-9 mRNA 的表达水平上升($P<0.05$);与低氧组比较,低氧+ β -APN 组中 E-cadherin mRNA 的表达水平上升,N-cadherin、MMP-2 及 MMP-9 mRNA 的表达水平下降($P<0.01$),见图 3。

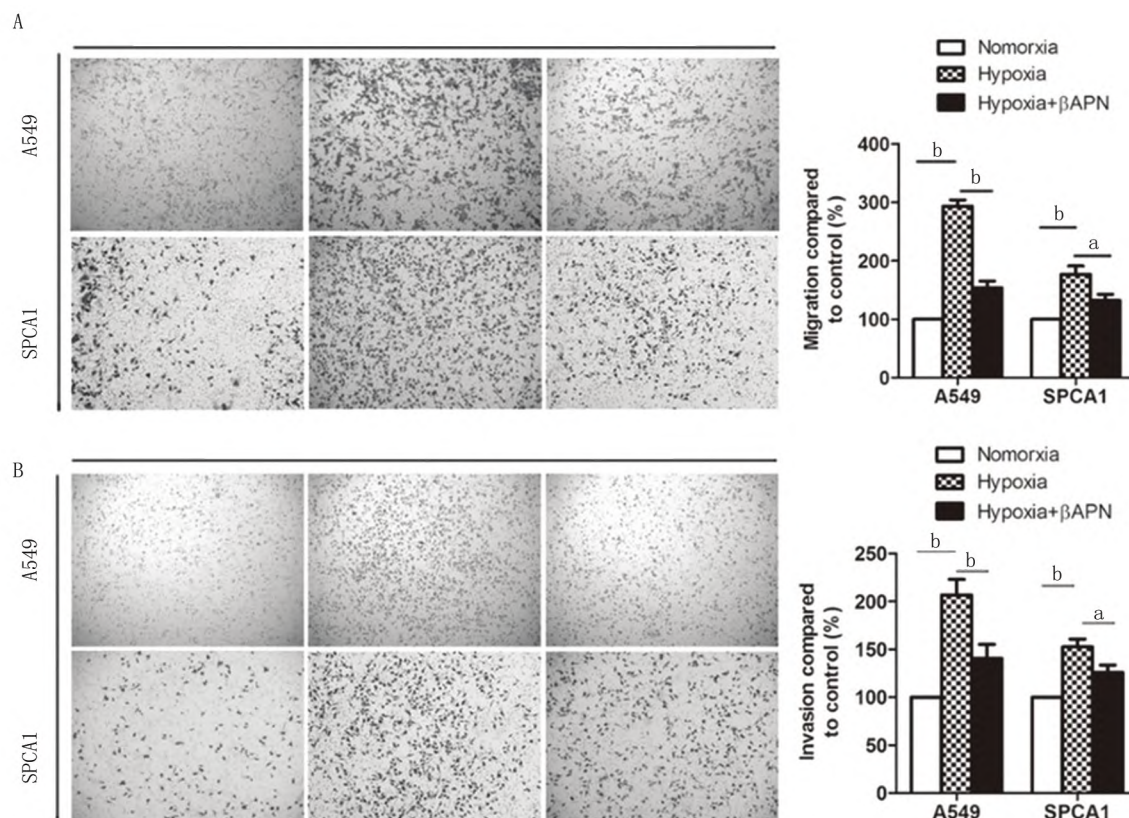
2.4 各组 A549、SPCA1 细胞系 EMT 相关分子蛋白水平比较 与常氧组比较,低氧组 E-cadherin 蛋白水平下降,N-cadherin、MMP-2、MMP-9 蛋白水平上升($P<0.01$);与低氧组比较,低氧+ β -APN 组 N-cadherin、MMP-2、MMP-9 蛋白水平下降,E-cadherin 的蛋白水平上升($P<0.01$),见图 4。



注: A.A549、SPCA1 细胞 HIF-1α mRNA 表达水平; B.A549 细胞 HIF-1α、LOX 蛋白水平; C.A549、SPCA1 细胞 LOX mRNA 表达水平; D.SPCA1 细胞 HIF-1α、LOX 蛋白水平; E.A549、SPCA1 细胞酶活性。细胞分别暴露于常氧状态及低氧 12、24 h。与常氧组比较, ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ 。

图 1 各组 A549、SPCA1 细胞 HIF-1α、LOX 表达水平及 LOX 酶活性比较

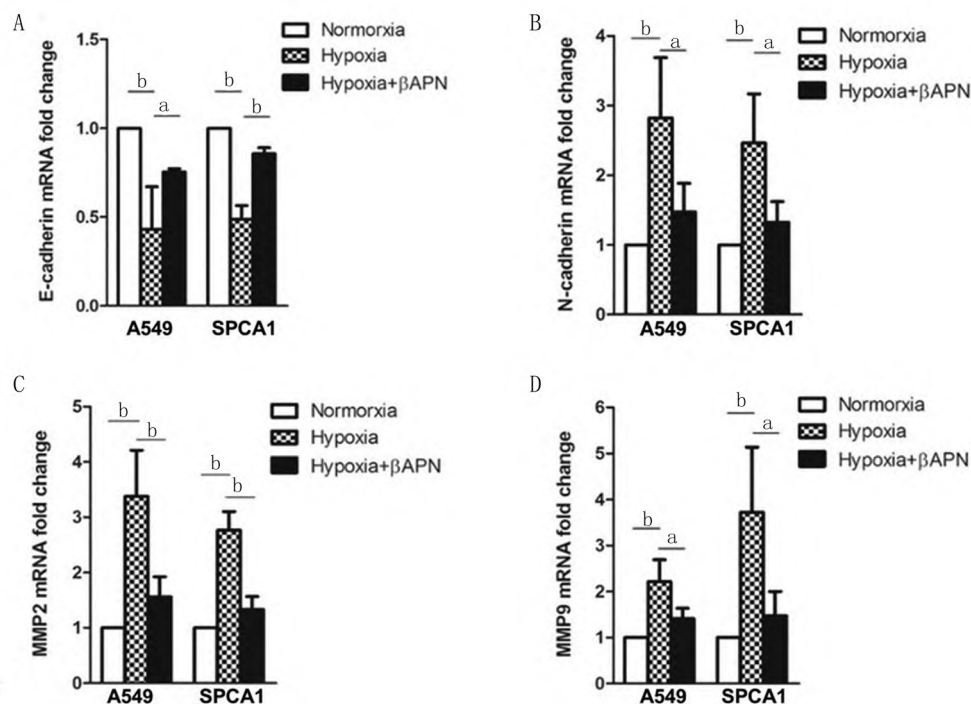
Fig.1 Comparison of HIF-1 α , LOX expression levels and LOX enzyme activity in A549 and SPCA1 cells among different groups



注: A.各组 A549、SPCA1 细胞转移能力比较; B.各组 A549、SPCA1 细胞侵袭能力比较。细胞分别在常氧、低氧、低氧+β-APN 的条件下培养。与低氧组比较, ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ 。

图 2 各组 A549、SPCA1 细胞的迁移和侵袭能力比较

Fig.2 Comparison of migration and invasion abilities of A549 and SPCA1 cells in different groups



注: A.A549、SPCA1 细胞中 E-cadherin mRNA 表达水平; B.A549、SPCA1 细胞中 N-cadherin mRNA 表达水平; C.A549、SPCA1 细胞中 MMP-2 mRNA 表达水平; D.A549、SPCA1 细胞中 MMP-9 mRNA 表达水平。细胞分别在常氧、低氧、低氧+β-APN 的条件下培养。与低氧组比较 $^a P < 0.05$ $^b P < 0.01$ 。

图 3 各组 A549、SPCA1 细胞的 EMT 相关分子表达水平比较

Fig.3 Comparison of EMT related molecular expression levels in A549 and SPCA1 cells among different groups

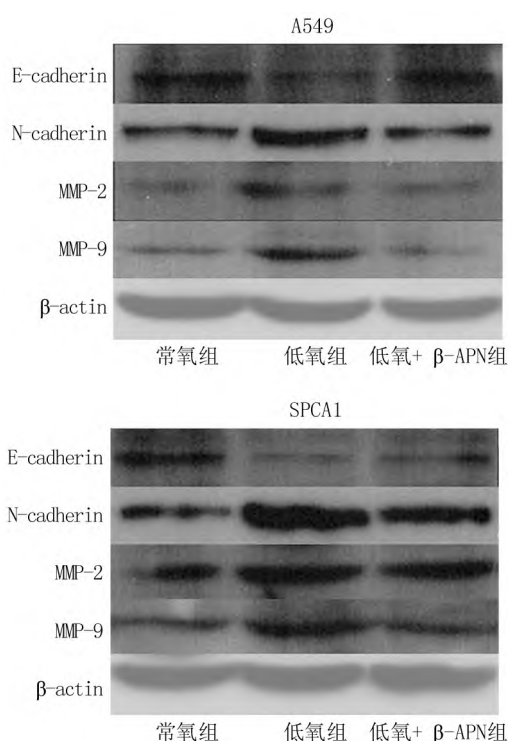


图 4 各组 E-cadherin、N-cadherin、MMP-2 及 MMP-9 蛋白电泳图

Fig.4 E-cadherin , N-cadherin , MMP-2 , and MMP-9 protein electrophoresis images of each group

3 讨论

LOX 是一种低氧状态诱导的 ECM 蛋白 ,此前报道称在肝脏肿瘤转移及发展过程中该蛋白受 HIF-1α 调控^[10]。在该研究中 ,笔者发现 LOX 的表达水平及酶活性在低氧状态下显著上调 ,并且由 β-APN 介导的 LOX 活性抑制可下调低氧状态下 NSCLC 细胞的转移侵袭。更为重要的是 ,β-APN 起到的抑制作用是通过调控 EMT 分子而实现的。

为了验证上述理论 ,本研究首先在 A549 及 SPCA1 细胞系中测试了低氧状态对 LOX 表达水平的影响。与常氧状态比较 ,低氧状态下 A549 及 SPCA1 细胞 LOX mRNA 表达及蛋白水平显著上升与 HIF-1α 的表达一致。并且 ,LOX 酶活性在低氧状态下也有所上调。这些发现与之前在其他癌症中所描述的结果一致^[11-13]。因此 ,笔者得出 LOX 是一种低氧应激基因的结论。

低氧应激原理被运用在肿瘤治疗的基因疗法领域^[14-15] ,但针对 HIF-1α 的治疗策略具有挑战性 ,因为这种分子在肿瘤微环境中具有多效调控作用^[16-17]。以往的研究表明 ,在乳腺癌组织中可检测到 LOX 家族基因赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 的过表达 ,并且与患

者的不良预后相关^[18]。而在之前的一系列体内及体外研究中,β-APN 被证明在乳腺癌中可以减少肿瘤远处转移的几率,同时对已存在的转移肿瘤的生长没有影响^[19]。然而也有研究指出 LOX 在癌症中具有抗肿瘤作用^[20]。这种争议可能是因为 LOX 蛋白存在多种形式。有文献指出具有抑瘤作用的蛋白是 18 kD 的 LOX 前肽,而并非 32 kD 的 LOX 蛋白^[21]。本研究发现体外低氧诱导的 LOX 上调可促进 NSCLC 的转移侵袭,β-APN 在低氧状态下可减弱肿瘤的转移能力。

在恶性肿瘤转移的起始阶段,会生成活动型肿瘤细胞,这一生成过程被称为 EMT,其是恶性肿瘤转移过程中的重要事件^[22-23],在这一过程中,上皮细胞失去极性与细胞间接触,随后经历了胞质骨架的明显变化^[24]。肿瘤微环境中存在的成纤维细胞可分泌富含活化 LOX(α-LOX)的囊泡,这种囊泡可通过整合素 α2β1 检测基质胶原并诱导胶原交联。交联基质可活化 p-FAK/p-paxillin 通路介导 YAP 的核易位,从而促进 EMT^[25]。在正常细胞及肿瘤细胞中,低氧状态下 LOX 会诱导 EMT 过程。本研究为了阐明 LOX 调控 NSCLC 细胞转移侵袭的机制,通过 qRT-PCR 和免疫印迹试验发现,低氧状态下 E-cadherin 的表达下调及 N-cadherin 的表达上调,这与之前文献报道的结果一致^[26]。并且,本研究还发现 LOX 可能起到驱动 EMT 的作用,因为低氧诱导的间质细胞分子 N-cadherin 被 β-APN 阻截。除了低氧状态,EMT 还可被胞外基质的改变所诱导^[27]。本研究数据显示,低氧状态下 LOX 的活性与 MMP-2、MMP-9 的表达关系密切。因此,LOX 通过 EMT 在肿瘤细胞转移的过程中起重要作用。

综上所述,在 NSCLC 细胞系中,低氧诱导的 LOX 表达与酶活性会促进肿瘤细胞的 EMT 过程,导致肿瘤细胞转移、侵袭能力增强。并且,β-APN 可通过调控 EMT 分子抑制低氧诱导的肿瘤细胞转移。因此,本研究在肿瘤治疗的干预措施中为 β-APN 提供了理论基础。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

王楷:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写,论文修改;
王聪剑、鞠雪涛:协作实施研究过程;焦振华:数据处理,统计学分析;喻钧:提出研究思路,论文审核

参考文献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, et al. Cancer statistics 2023 [J]. CA Cancer J Clin, 2023, 73(1): 17-48. DOI: 10.3322/caac.21763.
- [2] Kim SY, Gettinger S. First-line treatment of driver-negative non-small cell lung cancer [J]. Hematol Oncol Clin North Am, 2023, 37(3):

557-573. DOI: 10.1016/j.hoc.2023.02.008.

- [3] Infantino V, Santarsiero A, Convertini P, et al. Cancer cell metabolism in hypoxia: Role of HIF-1 as Key regulator and therapeutic target [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(11): 5703. DOI: 10.3390/ijms22115703.
- [4] Wang Y, Yang Y, Yang Y, et al. Hypoxia induces hepatocellular carcinoma metastasis via the HIF-1α/METTL16/lnc-CSMD1-7/RB-FOX2 axis [J]. iScience, 2023, 26(12): 108495. DOI: 10.1016/j.isci.2023.108495.
- [5] Xin Y, Zhao L, Peng R. HIF-1 signaling: An emerging mechanism for mitochondrial dynamics [J]. J Physiol Biochem, 2023, 79(3): 489-500. DOI: 10.1007/s13105-023-00966-0.
- [6] Anazco C, Riedelsberger J, Vega-Montoto L, et al. Exploring the interplay between polyphenols and lysyl oxidase enzymes for maintaining extracellular matrix homeostasis [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(13): 10985. DOI: 10.3390/ijms241310985.
- [7] Setargew YFI, Wyllie K, Grant RD, et al. Targeting lysyl oxidase family mediated matrix cross-linking as an anti-stromal therapy in solid tumours [J]. Cancers (Basel), 2021, 13(3): 491. DOI: 10.3390/cancers13030491.
- [8] 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. DOI: 10.3390/ijms232012270.
- [9] Tse AP, Sze KM, Shea QT, et al. Hepatitis transactivator protein X promotes extracellular matrix modification through HIF/LOX pathway in liver cancer [J]. Oncogenesis, 2018, 7(5): 44. DOI: 10.1038/s41389-018-0052-8.
- [10] Lei Y, Xu X, Liu H, et al. HBx induces hepatocellular carcinogenesis through ARRB1-mediated autophagy to drive the G1/S cycle [J]. Autophagy, 2021, 17(12): 4423-4441. DOI: 10.1080/15548627.2021.1917948.
- [11] Li R, Li H, Zhu L, et al. Reciprocal regulation of LOXL2 and HIF1α drives the Warburg effect to support pancreatic cancer aggressiveness [J]. Cell Death Dis, 2021, 12(12): 1106. DOI: 10.1038/s41419-021-04391-3.
- [12] Zhu G, Wang L, Meng W, et al. LOXL2-enriched small extracellular vesicles mediate hypoxia-induced premetastatic niche and indicates poor outcome of head and neck cancer [J]. Theranostics, 2021, 11(19): 9198-9216. DOI: 10.7150/thno.62455.
- [13] Gong L, Zhang Y, Yang Y, et al. Inhibition of lysyl oxidase-like 2 overcomes adhesion-dependent drug resistance in the collagen-enriched liver cancer microenvironment [J]. Hepatol Commun, 2022, 6(11): 3194-3211. DOI: 10.1002/hep4.1966.
- [14] Chen S, Liao C, Hu H, et al. Hypoxia-driven tumor stromal remodeling and immunosuppressive microenvironment in scirrhous HCC [J]. Hepatology, 2024, 79(4): 780-797. DOI: 10.1097/HEP.0000000000000599.
- [15] Kheshtchin N, Hadjati J. Targeting hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 in the tumor microenvironment for optimal cancer immunotherapy [J]. J Cell Physiol, 2022, 237(2): 1285-1298. DOI: 10.1002/jcp.30643.

(下转 1170 页)

- HIF-1 α expression are negative prognostic factors in primary resected early-stage non-small cell lung cancer [J]. *Virchows Arch* ,2017 ,470 (3) : 323-330. DOI: 10.1007/s00428-016-2057-z.
- [15] Alptekin A ,Ye B ,Yu Y ,et al. Glycine decarboxylase is a transcriptional target of MYCN required for neuroblastoma cell proliferation and tumorigenicity [J]. *Oncogene* ,2019 ,38 (50) : 7504-7520. DOI: 10.1038/s41388-019-0967-3.
- [16] Zhu F ,Xu Y ,Pan J ,et al. Epigallocatechin gallate protects against MNNG-induced precancerous lesions of gastric carcinoma in rats via PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med* ,2021 : 8846813. DOI: 10.1155/2021/8846813.
- [17] 李哲丰 ,李洁 ,赵晓婷 ,等. GLDC 通过 PI3K/Akt/mTOR 通路调控卵巢癌细胞的增殖与凋亡 [J]. *国际肿瘤学杂志* ,2021 ,48 (12) : 716-722. DOI: 10.3760/cma.j.cn371439-20210514-00142.
- [18] Zhang JX ,Bao SC ,Chen J ,et al. Xiaojianzhong decoction prevents gastric precancerous lesions in rats by inhibiting autophagy and glycolysis in gastric mucosal cells [J]. *World J Gastrointest Oncol* ,2023 ,15 (3) : 464-489. DOI: 10.4251/wjgo.v15.i3.464.
- [19] Liu R ,Zeng LW ,Gong R ,et al. mTORC1 activity regulates post-translational modifications of glycine decarboxylase to modulate glycine metabolism and tumorigenesis [J]. *Nat Commun* ,2021 ,12 (1) : 4227. DOI: 10.1038/s41467-021-24321-3.
- [20] Li Y ,Wang T ,Wan Q ,et al. TRAF-4 maintains deubiquitination of Caveolin-1 to drive glioblastoma stemness and temozolomide resistance [J]. *Cancer Res* ,2022 ,82 (19) : 3573-3587. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-21-3882.
- [21] Hao M ,Zhang J ,Sun M ,et al. TRAF-4 inhibits the apoptosis and promotes the proliferation of breast cancer cells by inhibiting the ubiquitination of spindle assembly-associated protein Eg5 [J]. *Front Oncol* ,2022 ,12 : 855139. DOI: 10.3389/fonc.2022.855139.
- [22] Singh R ,Karri D ,Shen H ,et al. TRAF-4-mediated ubiquitination of NGF receptor TrkA regulates prostate cancer metastasis [J]. *J Clin Invest* ,2018 ,128 (7) : 3129-3143. DOI: 10.1172/JCI96060.
- [23] Cockram PE ,Kist M ,Prakash S ,et al. Ubiquitination in the regulation of inflammatory cell death and cancer [J]. *Cell Death Differ* ,2021 ,28 (2) : 591-605. DOI: 10.1038/s41418-020-00708-5.
- [24] Zhao R ,He B ,Bie Q ,et al. AQP5 complements LGR5 to determine the fates of gastric cancer stem cells through regulating ULK1 ubiquitination [J]. *J Exp Clin Cancer Res* ,2022 ,41 (1) : 322. DOI: 10.1186/s13046-022-02532-w.
- [25] Singh R ,Meng H ,Shen T ,et al. TRAF-4-mediated nonproteolytic ubiquitination of androgen receptor promotes castration-resistant prostate cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* ,2023 ,120 (20) : e2218229120. DOI: 10.1073/pnas.2218229120.
- [26] Wang Y ,Luo X ,Wu N ,et al. SRC-3/TRAF-4 facilitates ovarian cancer development by activating the PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Med Oncol* ,2023 ,40 (2) : 76. DOI: 10.1007/s12032-022-01944-0.

(收稿日期: 2024-01-22)

(上接 1164 页)

- [16] Lee SH ,Golinska M ,Griffiths JR. HIF-1-Independent mechanisms regulating metabolic adaptation in hypoxic cancer cells [J]. *Cells* ,2021 ,10 (9) : 2371. DOI: 10.3390/cells10092371.
- [17] Zohar Y ,Mabjeesh NJ. Targeting HIF-1 for prostate cancer: A synthesis of preclinical evidence [J]. *Expert Opin Ther Targets* ,2023 ,27 (8) : 715-731. DOI: 10.1080/14728222.2023.2248381.
- [18] Ramos S ,Ferreira S ,Fernandes AS ,et al. Lysyl oxidases expression and breast cancer progression: A bioinformatic analysis [J]. *Front Pharmacol* ,2022 ,13 : 883998. DOI: 10.3389/fphar.2022.883998.
- [19] Erler JT ,Bennewith KL ,Nicolau M ,et al. Retraction note: Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis [J]. *Nature* ,2020 ,579 (7799) : 456. DOI: 10.1038/s41586-020-2112-4.
- [20] Payne SL ,Hendrix MJ ,Kirschmann DA. Paradoxical roles for lysyl oxidases in cancer—a prospect [J]. *J Cell Biochem* ,2007 ,101 (6) : 1338-54. DOI: 10.1002/jcb.21371.
- [21] Bais MV ,Ozdener GB ,Sonenshein GE ,et al. Effects of tumor-suppressor lysyl oxidase propeptide on prostate cancer xenograft growth and its direct interactions with DNA repair pathways [J]. *Oncogene* ,2015 ,34 (15) : 1928-1937. DOI: 10.1038/onc.2014.147.
- [22] Wang Y ,He J ,Liang Y ,et al. Hsa_circ_0102899 promotes epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer [J]. *Clin Transl Oncol* ,2023 ,25 (11) : 3252-3262. DOI: 10.1007/s12094-023-03220-7.
- [23] Bodén E ,Sveréus F ,Olm F ,et al. A Systematic review of mesenchymal epithelial transition factor (MET) and its impact in the development and treatment of non-small-cell lung cancer [J]. *Cancers (Basel)* ,2023 ,15 (15) : 3827. DOI: 10.3390/cancers15153827.
- [24] Azadi S ,Torkashvand E ,Mohammadi E ,et al. Analysis of EMT induction in a non-invasive breast cancer cell line by mesenchymal stem cell supernatant: Study of 2D and 3D microfluidic based aggregate formation and migration ability ,and cytoskeleton remodeling [J]. *Life Sci* ,2023 ,320 : 121545. DOI: 10.1016/j.lfs.2023.121545.
- [25] Liu X ,Li J ,Yang X ,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. DOI: 10.1038/s41368-023-00236-1.
- [26] Huang J ,Yao X ,Zhang J ,et al. Hypoxia-induced downregulation of miR-30c promotes epithelial-mesenchymal transition in human renal cell carcinoma [J]. *Cancer Sci* ,2013 ,104 (12) : 1609-1617. DOI: 10.1111/cas.12291.
- [27] Yao T ,Hu W ,Chen J ,et al. Collagen XV mediated the epithelial-mesenchymal transition to inhibit hepatocellular carcinoma metastasis [J]. *J Gastrointest Oncol* ,2022 ,13 (5) : 2472-2484. DOI: 10.21037/jgo-22-299.

(收稿日期: 2024-04-20)