doi:10.16118/j.1008-0392.2020.01.004

·基础研究·

赖氨酰氧化酶样蛋白 4 在肾间质纤维化中的表达及意义

朱赛雅,牛阳阳,张晓琴,余 晨
(同济大学附属同济医院肾脏科,上海 200065)

【摘要】目的 赖氨酰氧化酶样蛋白 4(lysyl oxidase-like protein 4,LOXL4)是赖氨酰氧化酶(lysyloxidase,LOX)家族的最新成员,本研究旨在观察 LOXL4 在肾脏纤维化形成中的表达及意义。**方法** 收集慢性肾脏病患者的肾活检标本,单侧输尿管结扎(unilateral ureteral ligation,UUO)大鼠;TGF-β1 刺激大鼠肾成纤维细胞(NRK-49F)。通过 q-PCR,Western 印迹法和/或免疫组化等方法检测 LOXL4 的表达及作用。**结果** 患者肾脏纤维化组织中 LOXL4 沉积显著高于正常肾组织($P<0.01$);与 Sham 组相比,UUO 组大鼠肾脏 LOXL4、Col1(collgen 1)表达水平明显升高($P<0.01$);TGF-β1 显著促进 LOXL4、Col1 的表达($P<0.01$);转染 LOXL4 过表达质粒后,NRK-49F 胶原表达水平明显增多($P<0.01$);下调 LOXL4 后,胶原表达水平明显下降($P<0.01$)。**结论** 在肾间质纤维化中 LOXL4 表达明显增加,其通过调控胶原纤维的表达而参与肾脏纤维化。

【关键词】赖氨酰氧化酶样蛋白 4;转化生长因子 β1;肾纤维化;细胞外基质;交联
【中图分类号】R692.5 **【文献标志码】**A **【文章编号】**1008-0392(2020)01-0019-07

Expression of LOXL4 and its roles in renal interstitial fibrosis

ZHU Sai-ya, NIU Yang-yang, ZHANG Xiao-qin, YU Chen
(Dept. of Nephrology, Tongji Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200065, China)

【Abstract】Objective To investigate the expression of lysyl oxidase-like protein 4(LOXL4) and its roles in renal fibrosis. **Methods** Renal biopsy specimens from patients with chronic kidney disease were collected. Sprague-Dawley rats were randomly divided into unilateral ureteral ligation(UUO) model group and sham operation(Sham) group;Rat kidney fibroblasts(NRK-49F) were stimulated with TGF-β1. The expression of LOXL4 mRNA and protein was detected by q-PCR, western blotting and/or immunohistochemistry, respectively. **Results** The expression of LOXL4 in fibrotic renal tissues of patients was significantly higher than that in normal renal tissues($P<0.01$). Compared with Sham group, the expressions of LOXL4 and collgen1(Col1) in the kidney of UUO group of rats were significantly higher($P<0.01$). TGF-β1 significantly promoted the expression of LOXL4 and Col1($P<0.01$). After transfecting with LOXL4 expression plasmid, the expression of Col1 was increased significantly($P<0.01$). There was significant reduction of Col1 expression in NRK-49F cells transfected with LOXL4 siRNA($P<0.01$). **Conclusion** The expression of LOXL4 is up-regulated in renal interstitial fibrosis, which may be involved in renal fibrosis by regulating the expression of collagen fibers.

【Key words】lysyl oxidase-like protein 4; transforming growth factor β1; renal fibrosis; extracellular matrix; cross-linking

收稿日期:2019-03-21
基金项目:国家自然科学基金(81873609、81600523、81700617)
作者简介:朱赛雅(1994—),女,博士研究生.E-mail:saisai08@163.com
通信作者:余 晨.E-mail:yuchen@tongji.edu.cn

肾脏纤维化是多种慢性肾脏疾病的主要病理改变,是终末期肾病的必经途径。其病理特点包括细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度增多、肾小管萎缩或扩张、细胞凋亡等[1]。近年来,关于肾间质纤维化的机制研究越来越受到关注[2]。目前,临床上仍缺乏有效手段治疗肾脏纤维化,因此需要全面地了解肾纤维化分子机制,为临床认识、治疗肾纤维化提供新的思路。

ECM是位于肾间质的动态网状结构,负责维持组织稳态。胶原是ECM中的骨架结构,是一种结构不稳定、易被蛋白水解酶降解的水溶性蛋白[3]。胶原纤维通过共价交联后形成具有抗张强度的不可溶性胶原,维持组织正常结构,传递信号和调节细胞生长。正常的胶原交联能够稳定胶原纤维、提供组织的弹性和机械强度,但是过度胶原交联将破坏肾脏结构和功能,导致肾间质纤维化。

赖氨酸氧化酶(lysyl oxidase, LOXs)家族是参与ECM交联的关键酶。LOXs在细胞内合成后经转运小泡分泌到细胞外发挥作用。LOXs促进胶原和弹性蛋白的赖氨酸残基ε-氨基发生氧化脱氨反应,形成分子内和分子间交联,进而将胶原和弹性蛋白的可溶性单体转变成为不溶性纤维,使其具有强大的弹性与韧性,并能抵抗非特异性蛋白水解酶所引起的弹性蛋白分解和胶原溶解[4-5]。

迄今为止,LOXs家族共有5个成员,即LOX和LOX样蛋白(LOXL1-4),其中LOXL4发现最晚。近年有部分研究显示[6-11],LOX的高表达可造成胶原及弹性蛋白细胞外过度交联,导致心脏、肺脏和肝脏的纤维化。而对于LOXL4的研究主要集中在肿瘤方面中,目前对于LOXL4与脏器纤维化的关系鲜有文献报道,LOXL4与肾脏纤维化的关系未见报道。本研究发现,LOXL4与肾脏纤维化有密切联系。本次研究旨在通过体内外实验,观察LOXL4在肾间质纤维化中的表达和作用,为进一步认识肾纤维化的发病机制提供新的思路。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　*临床标本*　本研究获得同济大学附属同济医院伦理委员会批准[(同)伦审-KYSB-2017-(118)]。所有入组病例组织样本均收集于同济大学附属同济医院,其中癌旁正常肾组织($n=5$)来源于肾透明细胞癌患者,癌灶周围5 cm以外正常肾组织。微小病变肾病组织($n=5$)来源于微小肾病患者,糖尿病肾病组织($n=5$)来源于糖尿病肾病Ⅳ型(重度肾间质纤维化)患者。组织标本分别用于免疫组化和马松染色。

1.1.2　*实验动物*　清洁级SD雄性大鼠20只,体质量200~250 g,购自上海杰思捷实验动物有限公司。所有动物饲养于同济大学附属同济医院动物房,光照昼夜节律,自由进食、饮水。适应环境5 d后开始实验。

1.1.3　*主要试剂*　Tween-200购自生工生物工程股份有限公司;胰酶购自江苏凯基生物科技有限公司;异丙醇、氯仿、75%乙醇、水合氯醛购自国药集团化学试剂有限公司;PBS、DEPC水、高糖DMEM、TRIzol、FBS、胎牛血清购自美国Thermo Fisher Scientific公司;PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit、SYBR® Premix Ex Taq™(TliRNaseH Plus)购自日本TaKaRa公司;引物购自上海迈浦生物科技有限公司;TGF-β1购自美国Proteintech公司。

1.2　*方法*

1.2.1　*动物分组和肾纤维化模型的制备*　将20只SD大鼠随机分成单侧输尿管梗阻(unilateral ureteral ligation, UUO)模型组和假手术(Sham)组,每组10只。UUO模型组:手术前称体质量,20%水合氯醛(2 mL/kg)腹腔注射进行麻醉,剔除左下肢上2 cm周围的皮毛,碘伏消毒,从大鼠左下肢上2 cm处切开皮肤层、脂肪层和肌肉层,充分暴露左侧肾脏,沿肾蒂向下寻找输尿管。充分分离输尿管后进行结扎,缝合伤口、消毒。Sham组:进行同样的方法分离出输尿管,但不进行结扎。麻醉苏醒后,动物自由摄取水和食物。

1.2.2　*细胞培养*　NRK-49F成纤维细胞受赠于复旦大学病理生理实验室。所有细胞在含有10%FBS的DMEM中生长,保持在37 ℃培养箱中,供应95%空气和5%CO_2。在刺激前将细胞用0.5%FBS饥饿12 h,然后使用4%FBS的高糖DMEM培养液进行培养,分别在对照组和TGF-β1处理组加入柠檬酸配制液和TGF-β1柠檬酸配制液。

1.2.3　*Western印迹法*　冰上裂解组织、细胞后提取总蛋白,采用BCA试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)测定蛋白浓度。使用SDS-PAGE分离蛋

白样品并转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,5%脱脂牛奶封闭 1 h,孵育一抗 LOXL4(1∶1 000),GAPDH(1∶35 000),Col1(1∶1 000),4 ℃过夜。TBST 清洗液洗涤 3 次,每次 10 min,加入辣根过氧化物酶标记二抗(1∶1 000),37 ℃孵育 1 h,曝光、分析。

1.2.4　q-PCR　用 TRIzol 法提取组织、细胞中的总 RNA,用核酸蛋白分析仪(美国赛默飞世尔科技公司)检测 RNA 纯度和浓度。以 RNA 为模板经逆转录反应(reverse transcription, RT)获得 cDNA。实时荧光定量 PCR 采用 SYBR Green 法。LOXL4 上游引物:5′-CCTTTTCCGTCTCCTCCG-3′;下游引物:5′-CCAACCTTCCCGTGTCTTT-3′。Col1 上游引物:5′-CCTTTCTGCTCCTTTCTCCA-3′;下游引物:5′-AGCAACACAGTTACACAAGG-3′。Smad2 上游引物:5′-GGGAAGTGTTTGCCGAGTG-3′;下游引物:5′-CTGCTGACGGACTTTAGGACA-3′。Smad3 上游引物:5′-TGCCAGCGATGGACTTTATG-3′;下游引物:5′-CACGACTGCCCTTGTTGC-3′。GAPDH 上游引物:5′-GGCAAGTTCAACGGCACA-3′;下游引物:5′-CCATTTGATGTTAGCGGGAT-3′。其反应条件为:95 ℃预变性 30 s,95 ℃变性 5 s,60 ℃退火 34 s,反应 40 个循环。实验结果得出扩增曲线、熔解曲线及 Ct 值,运用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行计算及分析。

1.2.5　免疫组化　取大鼠肾脏,4%多聚甲醛室温下固定 24 h,石蜡包埋,切片。将切片浸入已加温到 98 ℃的柠檬酸缓冲液(pH=7.4)中,加温 10 min 进行抗原修复。滴加相应稀释后的第一抗体,4 ℃过夜,PBS 洗涤 3 次;用生物素标记的二抗和辣根过氧化物酶标记的三级抗体(DAKO)孵育。最后苏木精染色,脱水、密封后显微镜下观察。

1.2.6　马松染色　将石蜡切片脱蜡至蒸馏水,用苏木精染核 5~10 min,充分水洗,如过染用盐酸酒精分化;蒸馏水洗,用丽春红酸性复红液染 5~8 min,蒸馏水洗;用 1%磷钼酸水溶液染 1~3 min,不经水洗直接用苯胺蓝或亮绿液染 5 min;用 2%冰醋酸水溶液浸洗片刻,置 60 ℃温箱中烘干,二甲苯透明,封固。

1.2.7　细胞转染　将 NRK-49F 细胞以 1.2×10^5 每孔接种于 6 孔板中,加入 2 mL 培养基,使转染时的细胞密度达到 40%~50%,同步化 6~12 h,待细胞密度达到 70%后进行转染。转染的基本步骤:将 DMEM 培养液与待转质粒或 siRNA、Lipo 2000 试剂混匀,室温静置 15 min。将转染复合物加入培养板中,放入 37 ℃恒温培养箱内培养 4~8 h 后,更换新鲜培养基(含 10%FBS)终止转染。24 h 后收集细胞,储存在-80 ℃冰箱,待下一步检测。

1.3　统计学处理

使用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析,用单因素方差分析进行对照组与实验组的比较。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　　果

2.1　LOXL4 在癌旁正常肾组织、病理肾组织中的表达

Image J 定量分析结果显示,在糖尿病肾病患者肾组织中 LOXL4 表达水平显著高于癌旁正常肾组织、微小病变肾组织($P<0.01$),同时马松染色显示糖尿病肾病患者肾组织的胶原纤维增加($P<0.01$),见图 1。

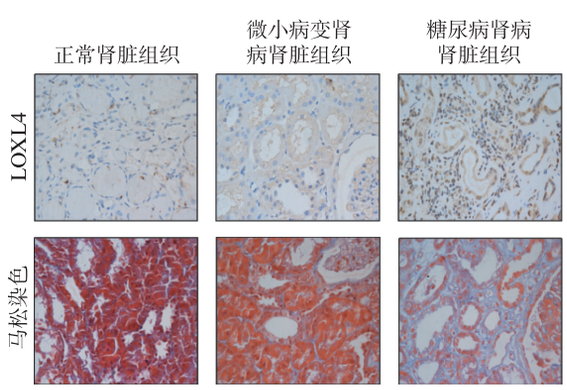


图 1　LOXL4 在患者肾组织中的表达情况

Fig.1　Expression of LOXL4 in human kidney tissues

特异性抗 LOXL4 免疫组化染色(×400);马松染色检测细胞外基质沉积水平(×400);与微小病变肾病组比较,$^{**}P<0.01$

2.2　UUO 模型中纤维蛋白增加,LOXL4 表达增加

选择单侧输尿管梗阻(UUO)的大鼠作为体内肾间质纤维化的模型。Western 印迹法、q-PCR 结果可见 Col1 蛋白和 mRNA 的表达明显增加($P<0.05$),见图 2A、B,马松染色发现 UUO 大鼠肾脏明显纤维化,见图 2C。值得注意的是,与 Sham 组相比,UUO 组肾组织的 LOXL4 蛋白、mRNA 表达明显增加,见图 2D、E,免疫组化显示 LOXL4 蛋白沉积明显升高($P<0.05$),见图 2F。

2.3　TGF-β1 上调 LOXL4 表达

在图 1 中,LOXL4 主要表达在肾小管上皮细胞

和肾间质细胞,并且伴有胶原表达的增加。因此在体外实验中,仅采用肾脏成纤维化细胞进行体外实验。结果显示,与 Sham 组相比,TGF-β1 处理组 Smad2、Smad3、Col1 的表达明显上升(P<0.001),见图 3A、C、D,特别是观察到 LOXL4 的蛋白和 mRNA 表达均显著增加(P<0.01),见图 3A、B。

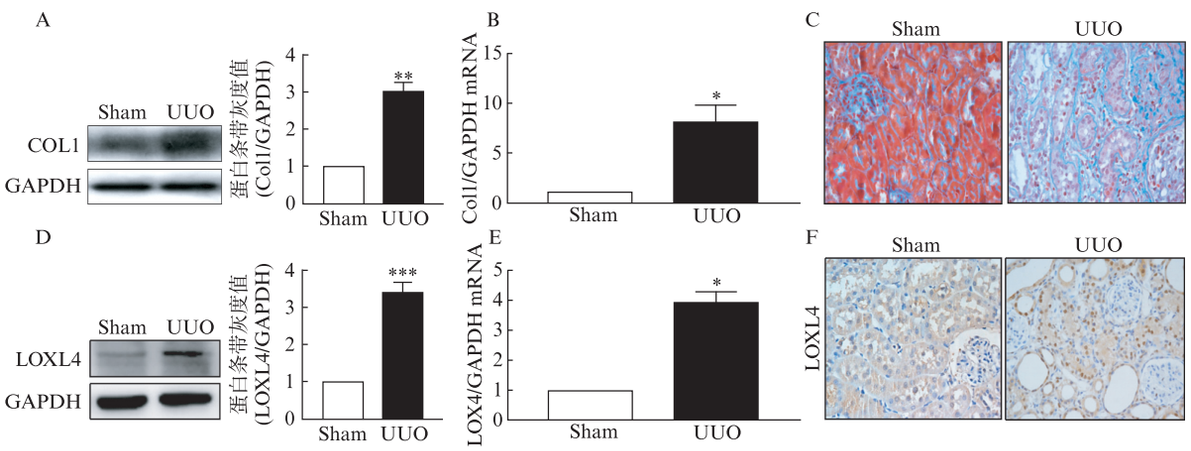


图 2　LOXL4 在 UUO 大鼠中表达增加

Fig.2　Increased expression of LOXL4 in UUO rats

A: Western 印迹法检测 Sham 组和 UUO 模型组 Col1 的蛋白表达;B: q-PCR 方法检测 Col1 的 mRNA 表达;C: 特异性抗 Col1 的免疫组化染色(×400);D、E: Sham 组和 UUO 模型组 LOXL4 的蛋白表达水平及 mRNA 表达水平;F: 免疫组化染色 LOXL4(×400);与 Sham 组比较,$^{*}P$<0.05,$^{**}P$<0.01,$^{***}P$<0.001

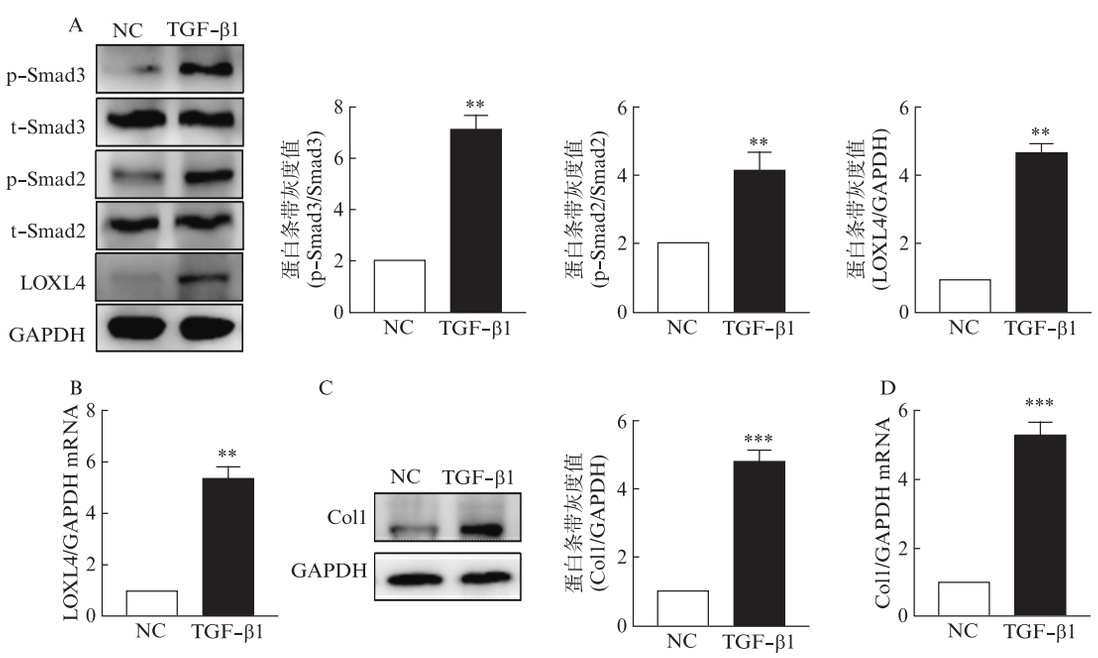


图 3　TGF-β1 刺激促进 LOXL4 蛋白和 mRNA 的表达

Fig.3　TGF-β1 stimulation promotes the expression of LOXL4 protein and mRNA

A: Western 印迹法检测 Smad2、Smad3、LOXL4 的蛋白表达水平;B: q-PCR 方法检测 LOXL4 的 mRNA 表达水平;C: 予 TGF-β1 刺激后,检测 Col1 的蛋白表达水平;D: q-PCR 方法检测 Col1 mRNA 表达;与 NC 组比较,$^{*}P$<0.05,$^{**}P$<0.01,$^{***}P$<0.001

2.4　LOXL4 对细胞外基质表达的影响

为明确 LOXL4 对细胞外基质的影响,首先利用质粒过表达 NRK-49F 细胞中的 LOXL4,发现过表达 LOXL4 基因后,LOXL4 的表达明显上调,见图 4A、B;细胞外基质 Col1 的表达明显增加,见图 3C。进一步在 NRK-49F 细胞中转染 siLOXL4,观察到 LOXL4 表达明显下调,见图 3D、E;Col1 表达明显降低,见图 4F。

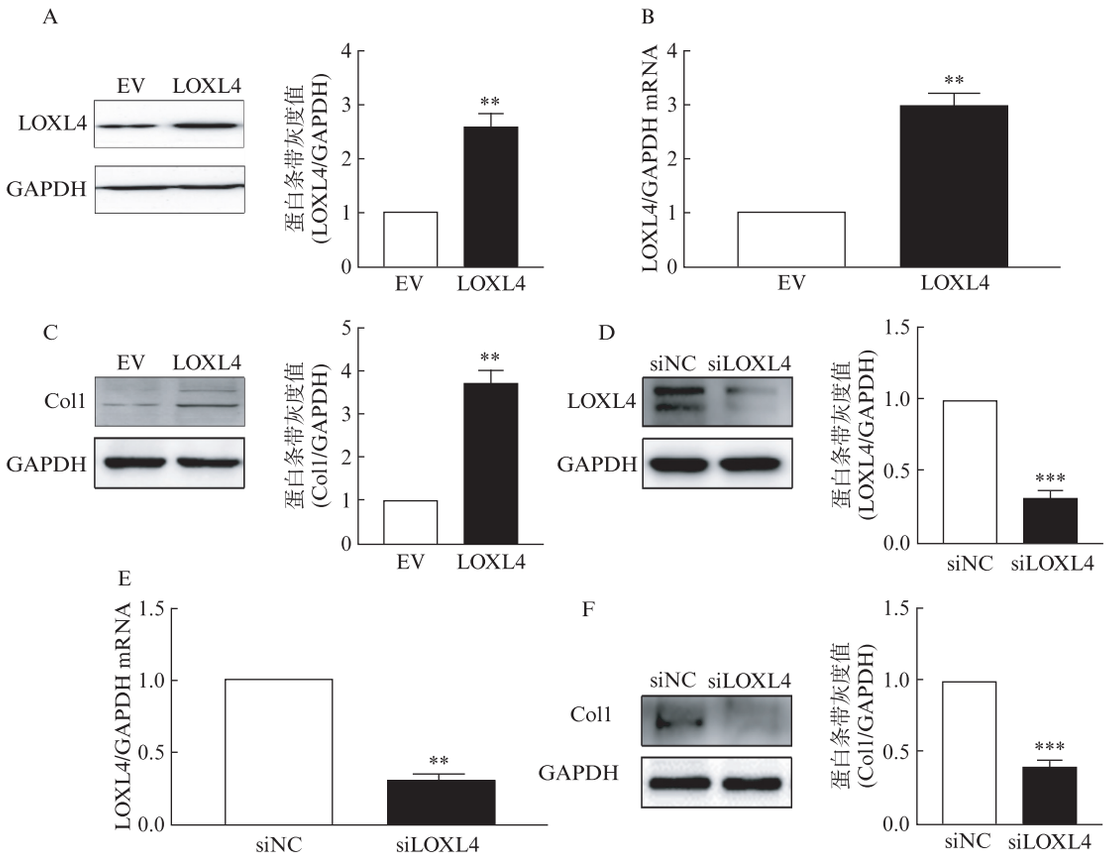


图 4　LOXL4 对细胞外基质表达的影响

Fig.4　Effect of LOXL4 onexpression of extracellular matrix

A：用 Western 印迹法检测 LOXL4 的蛋白表达；B：用 q-PCR 检测 LOXL4 的 mRNA 表达；C：用 Western 印迹法检测 Col1 的蛋白表达。转染对照 siRNA 或 LOXL4 的 siRNA 后；D：用 Western 印迹法检测 LOXL4 的蛋白表达水平；E：用 q-PCR 检测 LOXL4 的 mRNA 表达；F：用 Western 印迹法检测 Col1 的蛋白表达水平；与对照组比较，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$

3　讨　　论

本研究发现，LOXL4 在糖尿病肾病患者的肾脏纤维化组织以及大鼠的肾间质纤维化模型中高表达，并且这种特征性的高表达伴随着肾间质胶原表达增加。体外研究显示，TGF-β1 能诱导 LOXL4 高表达；过表达 LOXL4 后，细胞外基质 Col1 表达量明显增加；下调 LOXL4 后，细胞外基质 Col1 表达量明显下降。本研究结果显示 LOXL4 可调节胶原表达，参与肾间质纤维化。目前还没有见到类似研究报道。

在 LOXs 家族的研究中，除 LOXL4，其他成员与脏器纤维化的研究已有部分报道。在乙型病毒性肝炎相关的肝纤维化患者中，高 LOXL2 水平与更高的伊沙克（Ishak）纤维化评分相关，抗病毒治疗后 LOXL2 表达水平下降。在特发性肺间质纤维化患者中，LOXL2 表达水平越高，特发性肺间质纤维化疾病进展越迅速[12]。研究显示，在阿霉素诱导的肾纤维化模型中，LOX 表达增加且胶原交联增加[13]。同时研究发现，在 UUO 手术诱导的肾纤维化大鼠中，LOXL2、胶原表达量明显增加[14]。抑制 LOXL2 活性可减少组织纤维化形成，甚至可逆转组织纤维化进程[15]。在糖尿病肾病大鼠模型和单侧输尿管梗阻模型中，抑制 LOXL2 可减少 ECM 交联，从而减轻肾纤维化[16]。

LOXL4 由 LOXs 家族共同的 C-末端铜离子结合和催化结构域，以及决定个体作用的独特 N-末端结构域组成[17]。LOXL4 主要在胎盘、气管、肺、肾、肝脏等组织脏器中表达[18-19]，目前在癌症方面研究较多。研究发现 LOXL4 参与头颈部鳞状细胞癌和胃癌的进展，对癌细胞增殖，迁移和侵袭具有促进作用[20-22]。

对于 LOXL4 参与器官纤维化的研究很少。Busnadiego 等[23]发现 LOXL4 在与纤维化相关的血管病变中有潜在意义。TGF-β1 可使大动脉内皮细

胞的LOXL4依赖性表达,LOXL4分泌到细胞外,促进ECM沉积。研究发现在肺血管性高血压的病程中,LOXL4表达较正常组增加,并且与肺血管平滑肌细胞和基质结构重构密切相关[24]。另有研究发现TGF-β1可上调小梁网细胞中LOXL4的表达[25],但是至今没有关于LOXL4与肾纤维化的报道。

本研究还发现,TGF-β1通过Smad2/3信号通路来调节LOXL4、Col1的表达。已有文献报道TGF-β1作为纤维化的启动和激活环节,可通过Smad3、丝裂原活化蛋白激酶信号通路、磷脂酰肌醇3激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI-3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, PKB)即PI3K/Akt通路上调LOX的表达[26-28]。TGF-β/Smad信号通路是纤维化中研究较多的信号转导途径。此前有研究显示,LOXL2表达增加可能与TGF-β/Smad信号通路中各种分子的上、下调有关。抑制TGF-β1信号通路后,其Smads磷酸化被抑制,LOX mRNA和蛋白水平表达下降,Ⅰ型胶原表达减少,ECM交联与沉积减少[29]。

本研究运用了肾间质纤维化患者标本,UUO动物模型及TGF-β1刺激细胞塑造的纤维化模型,较充分揭示了LOXL4在肾脏纤维化过程中的表达及重要作用,这对于临床探索纤维化有效防治措施,延缓肾衰进程,延长患者寿命有重大意义。

但是,本研究有一些不足,较多从现象层面研究了LOXL4与肾纤维化的关系,后续还需要更深入研究LOXL4调节胶原表达参与肾纤维化的具体机制。

【参考文献】

[1] TATSUKAWA H, OTSU R, TANI, et al. Isozyme-specific comprehensive characterization of transglutaminase-crosslinked substrates in kidney fibrosis[J]. Sci Rep, 2018,8(1): 7306.

[2] MAREK I, LICHTNEGER T, CORDASIC N, et al. Alpha8 integrin(Itga8) signalling attenuates chronic renal interstitial fibrosis by reducing fibroblast activation, not by interfering with regulation of cell turnover[J]. PLoS One, 2016,11(3): e0150471.

[3] GENOVESE F, MANRESA A A, LEEMING D J, et al. The extracellular matrix in the kidney: a source of novel non-invasive biomarkers of kidney fibrosis?[J]. Fibrogenesis Tissue Repair, 2014,7(1): 4.

[4] LUCERO H A, KAGAN H M.Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function[J]. Cell Mol Life Sci, 2006,63(19/20): 2304-2316.

[5] LI T, WU C J, GAO L, et al. Lysyl oxidase family members in urological tumorigenesis and fibrosis[J]. Oncotarget, 2018,9(28): 20156-20164.

[6] KANTA J. Elastin in the liver[J]. Front Physiol, 2016,7: 491.

[7] ZHANG J, LIU Z Y, ZHANG T T, et al. Loss of lysyl oxidase-like 3 attenuates embryonic lung development in mice[J]. Sci Rep, 2016,6: 33856.

[8] LÓPEZ B, QUEREJETA R, GONZÁLEZ A, et al. Impact of treatment on myocardial lysyl oxidase expression and collagen cross-linking in patients with heart failure[J]. Hypertension, 2009,53(2): 236-242.

[9] TOVAR-VIDALES T, FITZGERALD A M, CLARK A F, et al. Transforming growth factor-β2 induces expression of biologically active bone morphogenetic protein-1 in human trabecular meshwork cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013,54(7): 4741-4748.

[10] GOTO Y, UCHIO-YAMADA K, ANAN S, et al. Transforming growth factor-beta1 mediated up-regulation of lysyl oxidase in the kidneys of hereditary nephrotic mouse with chronic renal fibrosis[J]. Virchows Arch, 2005,447(5): 859-868.

[11] COX T R, BIRD D, BAKER A M, et al. LOX-mediated collagen crosslinking is responsible for fibrosis-enhanced metastasis[J]. Cancer Res, 2013,73(6): 1721-1732.

[12] CHIEN J W, RICHARDS T J, GIBSON K F, et al. Serum lysyl oxidase-like 2 levels and idiopathic pulmonary fibrosis disease progression[J]. Eur Respir J, 2014,43(5): 1430-1438.

[13] DI DONATO A, GHIGGERI G M, DI DUCA M, et al.Lysyl oxidase expression and collagen cross-linking during chronic adriamycin nephropathy[J]. Nephron, 1997,76(2): 192-200.

[14] CHOI S E, JEON N, CHOI H Y, et al. Lysyl oxidase-like 2 is expressed in kidney tissue and is associated with the progression of tubulointerstitial fibrosis[J]. Mol Med Rep, 2017,16(3): 2477-2482.

[15] BARRY-HAMILTON V, SPANGLER R, MARSHALL

D, et al. Allosteric inhibition of lysyl oxidase-like-2 impedes the development of a pathologic microenvironment [J]. Nat Med, 2010,16(9): 1009 - 1017.

[16] CHEN J, REN J, LOO W T Y, et al. Lysyl oxidases expression and histopathological changes of the diabetic rat nephron[J]. Mol Med Rep, 2018,17(2): 2431 - 2441.

[17] TIAN M, LIU W, JIN L, et al. LOXL4 is downregulated in hepatocellular carcinoma with a favorable prognosis[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015,8(4): 3892 - 3900.

[18] KAGAN H M, LI W D. Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell[J]. J Cell Biochem, 2003, 88(4): 660 - 672.

[19] MÄKI J M.Lysyl oxidases in mammalian development and certain pathological conditions [J]. Histol Histopathol, 2009,24(5): 651 - 660.

[20] WEISE J B, RUDOLPH P, HEISER A, et al. LOXL4 is a selectively expressed candidate diagnostic antigen in head and neck cancer[J]. Eur J Cancer, 2008,44(9): 1323 - 1331.

[21] SCOLA N, GÖRÖGH T. LOXL4 as a selective molecular marker in primary and metastatic head/neck carcinoma [J]. Anticancer Res, 2010, 30(11): 4567 - 4571.

[22] LI R K, ZHAO W Y, FANG F, et al. Lysyl oxidase-like 4(LOXL4) promotes proliferation and metastasis of gastric cancer via FAK/Src pathway[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2015,141(2): 269 - 281.

[23] BUSNADIEGO O, GONZÁLEZ-SANTAMARÍA J, LAGARES D, et al. LOXL4 is induced by transforming growth factor β1 through Smad and JunB/Fra2 and contributes to vascular matrix remodeling[J]. Mol Cell Biol, 2013,33(12): 2388 - 2401.

[24] NAVE A H, MIŽÍKOVÁ I, NIESS G, et al. Lysyl oxidases play a causal role in vascular remodeling in clinical and experimental pulmonary arterial hypertension [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014,34(7): 1446 - 1458.

[25] SETHI A, WORDINGER R J, CLARK A F. Gremlin utilizes canonical and non-canonical TGFβ signaling to induce lysyl oxidase(LOX) genes in human trabecular meshwork cells[J]. Exp Eye Res, 2013,113: 117 - 127.

[26] SETHI A, MAO W M, WORDINGER R J, et al. Transforming growth factor-beta induces extracellular matrix protein cross-linking lysyl oxidase(LOX) genes in human trabecular meshwork cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011,52(8): 5240 - 5250.

[27] 余超,王贞.肠黏膜屏障与慢性肾脏病关系的研究进展[J].同济大学学报(医学版),2018,39(6): 124 - 128.

[28] 陈盈泰,周莹,姚文静,等.Ⅲ型心肾综合征患者 1 年死亡率及相关危险因素分析[J].同济大学学报(医学版),2018,39(6): 87 - 91.

[29] HU C P, DANDAPAT A, SUN L Q, et al. Regulation of TGFbeta1-mediated collagen formation by LOX-1: studies based on forced overexpression of TGFbeta1 in wild-type and lox-1 knock-out mouse cardiac fibroblasts [J]. J Biol Chem, 2008,283(16): 10226 - 10231.