

文章编号 1006-8147(2015)01-0039-04

论 著

## 氨肽酶 N 在乳腺癌血管生成中的作用及其与 VEGF 的相关性

曹文庆, 宁殿宾, 冯 丽, 赵玉哲, 张 静

(河北省人民医院普外一科, 石家庄 050051)

**摘要** 目的: 研究氨肽酶 N (APN) 在乳腺癌的表达及临床意义, 比较其与血管内皮生长因子 (VEGF) 的关系, 探讨 APN 在乳腺癌血管生成中的作用。方法: 采用免疫组织化学 SP 法检测 APN 在 60 例乳腺癌组织、20 例癌旁正常乳腺组织中的表达。结果: APN 主要表达于肿瘤细胞的细胞膜, APN 在乳腺癌上的表达率 [36.7% (22/60)] 明显高于癌旁正常乳腺组织 [0% (0/20)] ( $\chi^2=10.115$ ,  $P=0.001$ ); APN 在乳腺癌上的表达与病理类型有关 ( $P=0.035$ )。乳腺癌组织内还可见新生血管内皮着色, 而癌旁正常组织血管内皮无着色; 相关性分析显示, 乳腺癌组织 APN 与 VEGF 的表达无直线相关关系 ( $r_s=0.078$ ,  $P=0.553$ ), 但 VEGF 阳性组 APN 表达率 [44.7% (21/47)] 高于 VEGF 阴性组 [7.7% (1/13)] ( $\chi^2=4.512$ ,  $P=0.034$ )。结论: APN 与 VEGF 在乳腺癌血管发生中可能存在一定的协同作用, 乳腺癌中 APN 的表达可提示预后不良, APN 可以作为抗肿瘤血管药物中有力的靶点。

**关键词** 氨肽酶 N/CD13; 免疫组织化学; 乳腺肿瘤; 血管内皮生长因子

中图分类号 R737.9

文献标志码 A

### Functions of aminopeptidase N in breast cancer angiogenesis and its correlation with VEGF

CAO Wen-qing, NING Dian-bin, FENG Li, ZHAO Yu-zhe, ZHANG Jing

(Department of The First General Surgery, Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050051, China)

**Abstract Objective:** To investigate the expression and significance of aminopeptidase N (APN) in breast cancer, meanwhile, to explore the relationship between APN and vascular endothelial growth factor (VEGF), and to discuss the functions of APN in angiogenesis of breast cancer. **Methods:** Immunohistochemistry (SP means) was performed to measure the expression of APN in 60 cases of breast cancer tissues and 20 cases of adjacent normal breast tissues. **Results:** APN mainly was expressed in the membrane of malignant cells, and the positive rate of APN expression in breast cancer tissues was higher than that in adjacent normal breast tissues, 36.7% (22 out of 60) and 0% (0 out of 20) respectively ( $\chi^2=10.115$ ,  $P=0.001$ ). APN expression was associated with tumor pathological type ( $P=0.035$ ). Furthermore, APN expression in neovascular endothelium was also observed in breast cancer tissues while no expression was found in normal endothelium. Under the correlation analysis, no linear correlation was found between the APN expression and VEGF expression ( $r_s=0.078$ ,  $P=0.553$ ). However, the APN positive rates in VEGF positive group and in VEGF negative group were 44.7% (21 out of 47), 7.7% (1 out of 13) respectively, showing the APN expression was more often observed in VEGF positive group than in VEGF negative group ( $\chi^2=4.512$ ,  $P=0.034$ ). **Conclusion:** A synergistic effect may exist between APN and VEGF in the function of tumor angiogenesis in breast cancer, and the expression of APN in breast cancer may indicates a poor prognosis. APN could function as an effective target in anti-cancer therapy.

**Key words** aminopeptidase N/CD13; immunohistochemistry; breast cancer; vascular endothelial growth factor

氨肽酶 N (aminopeptidase N, APN) 是一种能从肽链氨基端催化降解氨基酸残基的水解蛋白酶。1989 年 Look 等<sup>[1]</sup>通过互补 DNA 克隆序列对比发现 APN 与 CD13 为同一蛋白。多年来 APN/CD13 主要作为髓系造血干细胞表面的标志物而应用于白血病或者淋巴瘤的分型, 近年来却相继报道, 其在肺癌、卵巢癌和肝癌等多种癌细胞表面高水平表达, 在体内参与肿瘤的血管发生。Gao 等<sup>[2]</sup>研究发现 APN 抑制剂能显著降低小鼠卵巢癌移植瘤的微血管密

度; Bhagwat 等<sup>[3]</sup>研究发现, 在肿瘤微环境中, 缺氧、血管内皮生长因子 (VEGF) 等血管生长信号均可诱导新生血管内皮 APN mRNA 的表达。本实验应用免疫组织化学 SP 法, 检测 APN 在乳腺癌组织上的表达情况, 分析其与乳腺癌临床病理特征之间的关系; 并通过比较 APN 表达与 VEGF 的关系, 探讨 APN 在乳腺癌血管发生中的作用。

### 1 材料与方法

1.1 材料 收集河北省人民医院病理科 2011 年 7 月-2012 年 9 月经手术切除、病理证实的乳腺癌石蜡标本 60 例, 癌旁正常乳腺组织石蜡标本 20 例。所有乳腺癌患者均为女性, 年龄 28~72 岁, 中位年

作者简介 曹文庆 (1968-), 男, 主治医师, 学士, 研究方向: 乳腺及甲状腺外科诊治及基础研究; 通信作者: 张静, E-mail: zhangjing166@126.com。

龄 51.5 岁,术前均未行放、化疗或其他针对肿瘤的治疗;无其他肿瘤病史。

1.2 主要试剂 鼠抗人 CD13 单克隆抗体、SP 免疫组化试剂盒及 DAB 显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 实验方法 采用免疫组织化学 SP 法检测 APN 在乳腺癌及癌旁正常组织上的表达情况。用 PBS 代替一抗作为阴性对照,用预实验阳性片做阳性对照。步骤:(1)所有石蜡包埋标本做 4  $\mu\text{m}$  厚组织切片,置于 60  $^{\circ}\text{C}$  隔水式培养箱内烤片 2 h;(2)经二甲苯、梯度酒精脱蜡,自来水冲洗、浸泡水化;(3)应用柠檬酸盐抗原修复液进行高压热修复;(4)冷却后滴加 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  去离子水,室温下孵育 10 min, PBS 冲洗;(5)滴加 50  $\mu\text{L}$  山羊血清工作液,室温下孵育 10 min, PBS 冲洗;(6)滴加 50  $\mu\text{L}$  一抗,置于湿盒中孵育,4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱过夜;(7)取出过夜的切片,室温下复温 20 min, PBS 冲洗;(8)滴加 50  $\mu\text{L}$  二抗,湿盒内室温孵育 1 h, PBS 冲洗;(9)滴加 50  $\mu\text{L}$  辣根酶,湿盒内室温孵育 45 min, PBS 冲洗;(10)滴加 DAB 显色,在光学显微镜下边观察边显色,观察 1~15 min,达最佳效果后,蒸馏水冲洗终止反应;(11)苏木素液中复染 1 min,自来水冲洗 10 s;(12)1%盐酸酒精分化 5 s,自来水冲洗;(13)梯度酒精脱水,自然风干;(14)中性树胶封片,光学显微镜下观察结果。

1.4 结果判定 APN 阳性判断标准:在高倍镜下(400 $\times$ )计数 400 个肿瘤细胞,按阳性细胞百分比评分:<10%为 1 分;11%~50%为 2 分;51%~75%为 3 分;>75%为 4 分。按阳性着色程度评分:0 分为无着色,1 分为浅黄色,2 分为棕黄色,3 分为棕褐色。两者乘积判定阳性结果:1~3 分为阴性(-);4~5 分为弱阳性(+);6~7 分为中阳性(++); $\geq 8$  分为强阳性(+++)。以“-”者为阴性,以“+、++、+++”者为阳性。阅片采用双盲法,每张切片均由 2 名病理医师判读。

1.5 统计学分析 应用 SPSS 13.0 统计软件对结果进行统计处理,统计方法采用  $\chi^2$  检验及 spearman 等级相关分析,以  $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 APN 在乳腺癌组织及癌旁组织上的表达情况

APN 主要表达于肿瘤细胞,定位于细胞膜,少许细胞浆着色,多呈浅黄色或棕黄色。仅少数患者(6.7%)APN 表达于间质细胞。另外可见癌组织导管上皮基底膜和新生血管内皮着色,癌旁正常组织仅见导管上皮基底膜着色,血管内皮未见着色(图 1,2)。

检测乳腺癌石蜡标本共 60 例,“-”38 例,“+”8

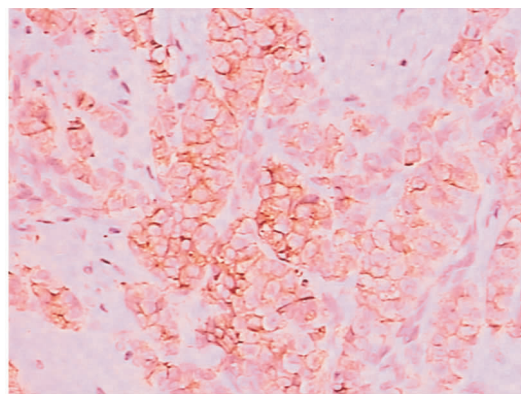


图 1 乳腺癌组织 APN 阳性表达(SP  $\times 200$ )

Fig 1 Positive expression of APN in breast cancer tissues (SP  $\times 200$ )

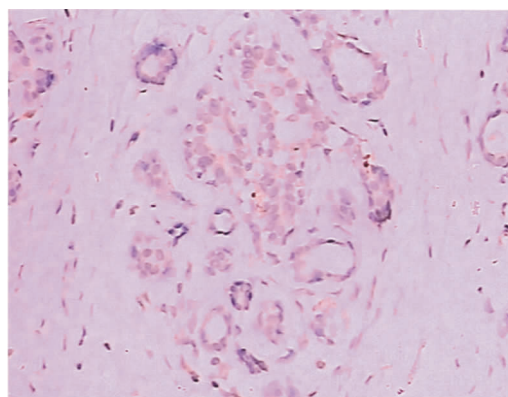


图 2 乳腺癌旁正常组织 APN 阴性表达(SP  $\times 200$ )

Fig 2 Negative expression of APN in normal breast tissues (SP  $\times 200$ )

例,“++”5 例,“+++”9 例,APN 在乳腺癌上的阳性表达率为 36.7%(22/60),癌旁正常乳腺组织未见 APN 表达(0/20)。APN 在乳腺癌上的表达率显著高于癌旁正常乳腺组织( $\chi^2=10.115$ ,  $P=0.001$ )。

2.2 APN 的表达与乳腺癌临床病理特征之间的关系 APN 在乳腺癌组织的表达情况与病理类型有关,APN 在浸润性导管癌组的阳性表达率为 45.2%(19/42),高于其它病理类型组阳性表达率 16.7%(3/18)( $\chi^2=4.429$ ,  $P=0.035$ )。而 APN 的表达与绝经状况、肿瘤大小、临床分期、组织学分级、淋巴结转移状态无关( $P > 0.05$ ),与 ER、PR、Her-2 指标无关( $P > 0.05$ )。见表 1。

2.3 乳腺癌组织中 APN 与 VEGF 的关系 60 例乳腺癌患者 VEGF 的表达,“-”13 例,“+”7 例,“++”13 例,“+++”27 例,VEGF 阳性表达率 78.3%(47/60)。相关性分析显示,APN 与 VEGF 在乳腺癌组织的表达无直线相关关系( $r_s=0.078$ ,  $P=0.553$ )。VEGF 阳性组与 VEGF 阴性组 APN 阳性表达率分别为 44.7%(21/47)、7.7%(1/13),结果显示,VEGF 阳性组 APN 阳性表达率高于 VEGF 阴性组( $\chi^2=4.512$ ,  $P=0.034$ )。

表 1 60 例乳腺癌 APN 表达与临床病理参数之间的关系

Tab 1 Relationship between the expression of APN and clinic-pathological parameters in breast cancer

| 参数      | n        | APN |       | 阳性率/<br>% | $\chi^2$ | P           |
|---------|----------|-----|-------|-----------|----------|-------------|
|         |          | -   | +~+++ |           |          |             |
| 淋巴结转移状态 | 阴性       | 34  | 22    | 12        | 35.3     | 0.064 0.801 |
|         | 阳性       | 26  | 16    | 10        | 38.5     |             |
| 组织学分级   | I~II 级   | 30  | 18    | 12        | 40.0     | 1.163 0.281 |
|         | III 级    | 12  | 5     | 7         | 58.3     |             |
| 肿瘤大小    | ≤ 2 cm   | 26  | 14    | 12        | 46.2     | 1.778 0.182 |
|         | > 2 cm   | 34  | 24    | 10        | 29.4     |             |
| 临床分期    | I 期      | 18  | 10    | 8         | 44.4     | 0.670 0.413 |
|         | II~III 期 | 42  | 28    | 14        | 33.3     |             |
| 绝经状态    | 绝经前      | 27  | 18    | 9         | 33.3     | 0.235 0.628 |
|         | 绝经后      | 33  | 20    | 13        | 39.4     |             |
| 病理类型    | 浸润性导管癌   | 42  | 23    | 19        | 45.2     | 4.429 0.035 |
|         | 其它病理类型   | 18  | 15    | 3         | 16.7     |             |
| ER      | 阴性       | 16  | 8     | 8         | 50.0     | 1.670 0.196 |
|         | 阳性       | 44  | 30    | 14        | 31.8     |             |
| PR      | 阴性       | 23  | 13    | 10        | 43.5     | 0.745 0.388 |
|         | 阳性       | 37  | 25    | 12        | 32.4     |             |
| Her-2   | 阴性       | 23  | 12    | 11        | 47.8     | 2.000 0.157 |
|         | 阳性       | 37  | 26    | 11        | 29.7     |             |

### 3 讨论

目前我国乳腺癌发病率呈上升趋势,且发病年龄趋于年轻化。现如今对于乳腺癌综合治疗的理念已日臻成熟,但是仍有部分患者治疗失败出现复发转移。因此,探讨乳腺癌复发转移的机制,寻找参与乳腺癌复发转移的基因,是目前国内外研究的热点之一。

人 APN 基因定位于染色体 15q25-26,全长 35 kb,基因编码序列包含 20 个外显子,其表达受近端和远端两个启动子调节,在上皮细胞,由近端启动子启动转录;在髓细胞及成纤维细胞,由远端启动子启动转录。APN 蛋白属于结合锌离子的金属蛋白酶超家族,分子量 150 kD 左右,由 967 个氨基酸组成,通过氨基端跨膜螺旋区锚在细胞膜上,能够从肽、酰胺或芳酰胺上水解释放 N 端的中性氨基酸。研究发现,APN 在肿瘤的信号转导、免疫调节、侵袭转移与血管生成等方面都发挥着重要作用,以 APN 为靶点的靶向性抗肿瘤药物也成为了抗癌药物开发的新领域。

APN 参与降解细胞外基质,这种酶在肿瘤细胞上的表达可以增强细胞运动性,加快肿瘤扩散和转移<sup>[4]</sup>。近几年来关于 APN 在实体瘤方面的临床研究相继开展,涉及乳腺癌、肺癌、胰腺癌等多种恶性肿瘤疾病<sup>[5-7]</sup>。本研究发现 APN 主要表达于肿瘤细胞,定位于细胞膜,这可能与 APN 定位于细胞膜的分子

结构有关。APN 在乳腺癌上表达率为 36.7%,这与 Ranogajec 等<sup>[5]</sup>(36.2%, 50/138)报道的数据较为一致。本研究还证实,APN 在乳腺癌组织上的阳性表达高于癌旁正常乳腺组织。

乳腺癌病理类型较多,预后差别大。常用的预测因子,包括疾病的临床分期、肿瘤大小、淋巴结转移情况、组织学分级、ER、PR 和 Her-2 蛋白表达情况等。本研究分析了 APN 的表达情况与乳腺癌预后因子的关系,发现在乳腺癌上 APN 多表达于浸润性导管癌,而 APN 表达情况与淋巴结转移状态无关。Ranogajec 等<sup>[5]</sup>发现乳腺癌上 APN 表达与淋巴结状态无相关性,但淋巴结阳性组 APN 在乳腺癌上的表达更强。有关肺癌的研究发现,鳞癌组织 APN 的表达与淋巴结状态有显著相关性,而腺癌组织 APN 的表达与淋巴结状态无相关性,认为其原因可能由于鳞癌组织 APN 主要表达于肿瘤间质细胞,累及成纤维细胞和血管内皮细胞,更有利于肿瘤的侵袭、转移,所以与淋巴结状态有显著相关性,而腺癌组织 APN 主要表达于肿瘤实质细胞,间质表达缺乏,所以与淋巴结状态无相关性。我们的研究显示,乳腺癌上 APN 主要表达肿瘤细胞,间质细胞表达缺乏,所以,APN 在乳腺癌上表达情况与淋巴结状态的关系还需进一步研究。另外,APN 表达情况与乳腺癌其它预后因子无关。还有研究发现乳腺癌 APN 的表达与总生存时间呈负相关趋势,类似的结果在其他肿瘤上也有发现,如胰腺癌、肺癌等<sup>[6-7]</sup>。提示 APN 可以作为恶性肿瘤的不良预后因素之一。

肿瘤的发生发展有赖于新生血管生成。肿瘤新生血管生成由多种基因、细胞因子及信号通路协同调控,这些因素都有可能成为抑制肿瘤新生血管生成的作用靶点。APN 参与肿瘤的血管生成。研究证明,APN 是血管内皮生成中 Ras 信号通路的重要靶点,参与肿瘤新生血管的形成,受抑制后能够阻止内皮细胞的迁徙及内皮形态的发生<sup>[8]</sup>。而针对肿瘤血管我们先前亦做了一些相关研究,如 VEGF 信号通路与 DLL4-Notch 信号通路,均是抗新生血管治疗的靶目标。其中,VEGF 是目前已知的作用最强的促血管生成因子之一。VEGF 广泛分布于人和动物的大脑、肝脏、胰腺、脾脏、肾脏及骨骼组织中,在正常生理状态下呈低表达,但在病理环境下,尤其是肿瘤组织中可出现异常表达。VEGF 能特异性作用于血管内皮,它通过与血管内皮细胞相应受体结合,刺激血管内皮细胞的有丝分裂和迁移以及血管的形成,并增强血管通透性,从而为肿瘤细胞提供充足的营养及侵袭转移基质,是乳腺癌免疫组化常



用指标之一。

APN 可降解细胞外基质为新生血管生长提供空间,同时可将贮存在基质中与血管生成有关的因子如碱性成纤维生长因子释放,使其发挥作用。有研究发现,APN 唯独表达于肿瘤新生血管的内皮细胞,而在正常组织血管内皮不表达<sup>[9]</sup>。本实验研究亦发现,APN 选择性地表达于乳腺癌新生血管内皮,在癌旁正常乳腺组织血管内皮无表达。Bhagwat 等<sup>[3]</sup>研究发现,在肿瘤微环境中,缺氧、VEGF 等血管生成因子可诱导内皮细胞 APN mRNA 的表达。于是,本实验比较了乳腺癌组织上 VEGF 与 APN 的表达的相关性,来进一步研究 VEGF 与 APN 在肿瘤血管发生过程的相互关系。结果显示,乳腺癌组织上 VEGF 与 APN 的表达无直线相关关系,但 VEGF 阳性组 APN 阳性率高于 VEGF 阴性组。提示,APN 可能是 VEGF 信号通路的下游靶点之一。另有证据显示,APN 的功能性抑制剂可以干扰血管形成,却不影响原始血管内皮细胞的增生,提示,APN 的功能是影响血管内皮形态发生,是在血管形态发生上起调节作用<sup>[15]</sup>。VEGF 促进血管内皮的增殖,而 APN 影响血管内皮形态的发生,二者在新生血管生成上可能存在一定的协同作用。

有研究发现抗 APN mAb 和 APN 抑制剂均可破坏毛细血管网的形成。在胰腺肿瘤和非小细胞肺癌上,APN 的表达与肿瘤新生血管形成呈正相关<sup>[6-7]</sup>。APN 选择性地表达于肿瘤新生血管的内皮细胞,并且,APN 是天门冬氨酸-甘氨酸-精氨酸(Asn-Gly-Arg,NGR)多肽的特异性受体。基于这几项发现,APN 已经被提议为抗癌治疗策略上的一个很有吸引力的靶点。将 NGR 连接到抗癌药物上,就可以不管是什么类型和起源的肿瘤,高选择性地作用于肿瘤血管<sup>[10-11]</sup>。另外,应用 APN 抑制剂 Ubenimex 可以明显增强宫颈癌对放疗的敏感度<sup>[12]</sup>。Christ 等<sup>[13]</sup>联合应用 APN 抑制剂可以增强 5-FU 对肝癌的化疗效果。对手术切除的 I 期肺鳞癌,APN 抑制剂辅助治疗可延长患者生存期<sup>[14]</sup>。因此,明确患者肿瘤是否表达 APN,是应用这些新的抗癌药物的先决条件。

综上所述,APN 在乳腺癌组织上表达,参与肿瘤的血管生成和侵袭转移,结合国内外的研究报道,认为可将 APN 作为乳腺癌的一个重要标志物,并有可能成为未来乳腺肿瘤靶向治疗的方向之一。而 APN 的表达激活以及其功能的有效发挥受体内外环境等多种因素的影响,这一领域尚有很多未知的东西有待探讨。因此,对 APN 进一步的深入研究及研发靶向性强的 APN 抑制剂,将对以后恶性肿瘤

的临床辅助治疗提供重要帮助。

#### 参考文献:

- [1] Look A T, Ashmun R A, Shapiro L H, et al. Human myeloid plasma membrane glycoprotein CD13(gp150) is identical to aminopeptidase N[J]. *J Clin Invest*, 1989,83(4):1299
- [2] Gao J J, Xue X, Gao Z H, et al. LYP, a bestatin dimethylaminoethyl ester, inhibited cancer angiogenesis both in vitro and in vivo[J]. *Microvasc Res*, 2011,82(2):122
- [3] Bhagwat S V, Petrovic N, Okamoto Y, et al. The angiogenic regulator CD13/APN is a transcriptional target of Ras signaling pathways in endothelial morphogenesis[J]. *Blood*, 2003,101(5):1818
- [4] Saiki I, Fujii H, Yoneda J, et al. Role of aminopeptidase N (CD13) in tumor-cell invasion and extracellular matrix degradation[J]. *Int J Cancer*, 1993,54(1):137
- [5] Ranogajec I, Jakić-Razumović J, Puzović V, et al. Prognostic value of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and aminopeptidase N/CD13 in breast Cancer patients[J]. *Med Oncol*, 2012,29(2):561
- [6] Ikeda N, Nakajima Y, Tokuhara T, et al. Clinical significance of aminopeptidase N/CD13 expression in human pancreatic carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2003,9(4):1503
- [7] Tokuhara T, Hattori N, Ishida H, et al. Clinical significance of aminopeptidase N in non-small cell lung cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2006,12(13):3971
- [8] Inagaki Y, Tang W, Zhang L, et al. Novel aminopeptidase N (APN/CD13) inhibitor 24F can suppress invasion of hepatocellular carcinoma cells as well as angiogenesis[J]. *Biosci Trends*, 2010,4(2):56
- [9] Dreischalück J, Schwöppe C, Spieker T, et al. Vascular infarction by subcutaneous application of tissue factor targeted to tumor vessels with NGR-peptides: activity and toxicity profile[J]. *Int J Oncol*, 2010, 37(6):1389
- [10] Zhao B J, Ke X Y, Huang Y, et al. The antiangiogenic efficacy of NGR-modified PEG-DSPE micelles containing paclitaxel (NGR-M-PTX) for the treatment of glioma in rats[J]. *J Drug Target*, 2011, 19(5):382
- [11] Takara K, Hatakeyama H, Ohga N, et al. Design of a dual-ligand system using a specific ligand and cell penetrating peptide, resulting in a synergistic effect on selectivity and cellular uptake[J]. *Int J Pharm*, 2010,396(1/2):143
- [12] Tsukamoto H, Shibata K, Kajiyama H, et al. Aminopeptidase N (APN)/CD13 inhibitor, Ubenimex, enhances radiation sensitivity in human cervical cancer[J]. *BMC Cancer*, 2008,8:74
- [13] Christ B, Stock P, Dollinger M M. CD13: waving the flag for a novel cancer stem cell target[J]. *Hepatology*, 2011,53(4):1388
- [14] Ichimura E, Yamada M, Nishikawa K, et al. Immunohistochemical expression of aminopeptidase N (CD13) in human lung squamous cell carcinomas, with special reference to Bestatin adjuvant therapy [J]. *Pathol Int*, 2006,56(6):296
- [15] Bhagwat S V, Lahdenranta J, Giordano R, et al. CD13/APN is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation[J]. *Blood*, 2001,97(3):652

(2014-06-09 收稿)