DOI:10.16016/j.1000-5404.201912238

沉默 APN 对胶质瘤细胞 U251 增殖、侵袭和凋亡的影响

董云朋,程 远,陈 晋 400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院神经外科

[**摘要**] **目的** 探究 aminopeptidase N(APN)对胶质瘤细胞 U251 增殖能力、迁移侵袭能力和凋亡等生物学行为的影响及可能的作用机制。**方法** 通过 RNA 干扰技术沉默胶质瘤细胞 U251 中 APN 的表达后,运用 RT-qPCR 的方法检测 APN mRNA 表达,采用 Western blot 检测 APN 蛋白表达水平,CCK-8 检测各组 U251 细胞的增殖活性;采用流式细胞仪检测细胞凋亡和细胞周期;采用细胞划痕实验检测 U251 细胞的迁移能力,Transwell 实验检测细胞侵袭能力;采用 Western blot 检测 STAT3 通路蛋白 t-STAT3、p-STAT3、Bcl-2 和 MMP-2 的蛋白表达水平。**结果** 与空白对照组和阴性对照组相比,沉默 U251 中 APN 的表达后 APN 在基因和蛋白表达水平下降($P<0.01$),沉默 APN 后 U251 的增殖活性明显下降($P<0.05$),细胞周期停滞在 G_0/G_1 期,并且凋亡率明显增加($P<0.01$);另外沉默 APN 的表达后 U251 细胞的迁移能力和侵袭能力明显下降($P<0.01$);沉默 APN 后 STAT3 磷酸化水平下降,引起下游蛋白 Bcl-2 和 MMP-2 等蛋白表达下降($P<0.05$)。**结论** 沉默 APN 可通过 STAT3 信号途径抑制胶质瘤细胞 U251 增殖、迁移和侵袭,诱导凋亡。

[**关键词**] 胶质瘤;aminopeptidase N;RNA 干扰;STAT3;细胞凋亡;侵袭

[**中图法分类号**] R394.3; R730.23; R730.264 [**文献标志码**] A

Effects of silencing APN gene on proliferation, invasion and apoptosis of human glioma U251 cells

DONG Yunpeng, CHENG Yuan, CHEN Jin Department of Neurosurgery, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of aminopeptidase N (APN) on the proliferation, invasion, and apoptosis in human glioma U251 cells and to investigate the possible mechanism. **Methods** After APN gene expression was silenced in glioma cells U251 by RNAi, its expression at mRNA and protein levels was detected by RT-qPCR and Western blotting, respectively. Then, CCK-8 assay, flow cytometry, wound healing test and transwell assay were used to detect the proliferation ability, cell cycle and apoptosis, migration and invasion activity in the U251 cells. The protein expression of STAT3 signal pathway proteins t-STAT3, p-STAT3, MMP-2 and Bcl-2 was measured by Western blotting. **Results** Compared with blank control and NC-siRNA cells, the expression of APN was decreased at mRNA and protein levels in APN-siRNA cells ($P<0.01$). Silencing of APN gene also resulted in inhibited proliferation ability ($P<0.05$), cell cycle arrested at G_0/G_1 phase, enhanced apoptotic rate ($P<0.01$), and decreased migration and invasion abilities ($P<0.01$) in U251 cells. What's more, the inhibited expression of p-STAT3 caused the decreased expression of Bcl-2 and MMP-2 (all $P<0.05$). **Conclusion** Silencing of APN could inhibit the proliferation, migration and invasion, and induce apoptosis in glioma U251 cells *via* STAT3 signaling pathway.

[**Key words**] glioma; aminopeptidase N; RNAi; STAT3; apoptosis; invasion

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81401505). Corresponding author: CHEN Jin, E-mail: chenjin@hospital.cqmu.edu.cn

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81401505)

[**通信作者**] 陈 晋,E-mail:chenjin@hospital.cqmu.edu.cn

Aminopeptidase N(APN,EC 3.4.11.2)含 967 个氨基酸残基,相对分子质量为 150×10^3,与 CD13 的序列完全一样,是细胞表面跨膜糖蛋白和锌依赖性外肽酶,属于 M1 家族金属蛋白酶,其编码基因位于 15 号染色体的长臂 q25~26 位置[1],在内皮细胞、小肠和肾近端小管的刷状缘膜上高度表达[2],在肝肿瘤、乳腺肿瘤、前列腺肿瘤等多种肿瘤细胞中高度表达,参与肿瘤细胞的增殖、浸润和肿瘤血管的生成[3-5],另外有研究表明 APN 参与肿瘤细胞的耐药[6],因此 APN 是肿瘤治疗的潜在靶点。

胶质瘤是原发性神经上皮细胞神经系统恶性肿瘤,约占成年人颅内系统肿瘤的一半,可以发生在神经系统的任何部位[7]。目前胶质瘤的标准治疗方法是手术切除术后放化疗,但胶质瘤患者的预后不佳,经过标准化、综合治疗的生存期为 12~15 个月,5 年生存率只有不到 5%[8]。由于胶质瘤的恶性程度高,预后不良,因此急需寻找更加有效的治疗方法。APN 在众多肿瘤中作为促癌基因,可以作为潜在的肿瘤治疗靶点。我们此前的预实验发现 APN 在胶质瘤组织中高表达,但是 APN 在胶质瘤中的作用还未知。因此,本实验旨在探究 APN 在胶质瘤中的作用,并试图探究其作用机制,以探索胶质瘤治疗的新靶点。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人胶质瘤细胞株 U251 购于上海生命科学院细胞库,高糖 DMEM 培养基、胎牛血清购于美国 Gibco 公司,青霉素、链霉素购于重庆蒙博生物科技有限公司。APN 干扰序列由上海吉凯基因化学技术有限公司合成,APN:前链:5′-CCCTCTTCATTCACTTCAGAA-3′;后链:5′-TTCTGAAGTGAATGAAGAGGG-3′。阴性对照、嘌呤霉素购于上海吉凯基因化学技术有限公司,RNAiso Plus、Primescript RT reagent Kit、TB green 购于 TaKaRa 公司,抗 APN、抗 p-STAT3、抗 t-STAT3、抗 Bcl-2、抗 MMP-2 和 β-actin 购于 Abcam,辣根过氧化物酶标记山羊抗兔、羊抗鼠二抗购于北京中山金桥生物技术有限公司,Matrigel 购于 Corning 公司。

1.2 细胞培养、慢病毒转染

U251 细胞培养于含 10%和 1%青-链霉素的高糖 DMEM 培养基中,在 37 ℃、5%CO_2 孵箱中培养,细胞融合度达 80%~100%时进行细胞传代和细胞处理。将 U251 分为 Blank(空白对照)、NC-siRNA、APN-siRNA 3 组,Blank 组不进行病毒转染,NC-siRNA 组进行阴性对照病毒转染,APN-siRNA 组进行阳性病毒转染,U251 融合度在 25%~30%进行慢病毒转染,转染时间为 24 h,慢病毒转染 48 h 后加入嘌呤霉素杀死未转染病毒的 U251 细胞,进行细胞筛选,慢病毒转染 72 h 后在荧光倒置显微镜下观察转染效率。

1.3 RT-qPCR 检测

各组 U251 细胞用 RNAiso Plus 试剂按厂家使用说明提取总 RNA,提取到总 RNA 后用 Primescript RT reagent Kit 进行 cDNA 逆转录,然后进行 RT-qPCR,APN 前链为 5′-CCAGGCAGTGACACGACGAT-3′,后链为 5′-CACCCACTTGATGTTGGCTTTC-3′,β-actin 前链为 5′-CCACGAAACTACCTTCAACTCC-3′,后链为 5′-GTGATCTCCTTCTGCATCCTGT-3′。PCR 反应程序为第一步,95 ℃ 30 s;第二步 95 ℃15 s,60 ℃45 s 重复 40 次;然后用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法评估 mRNA 的表达变化。

1.4 Western blot 检测

各组 U251 细胞用含 1%的 PMSF 的 RIPA 解液在冰上裂解细胞,收取裂解后的细胞液在 4 ℃离心机 12 000 r/min 离心 15 min,离心后取上清,加入 20%上样缓冲液,在 100 ℃条件下煮 10 min,然后放-20 ℃备用。等量的蛋白样本被 SDS-PAGE 分离,转移到 PVDF 膜上,含有蛋白的 PVDF 膜用 5%脱脂牛奶在水平摇床上室温下封闭 60 min,分别用 APN(1∶1 000)、p-STAT3(1∶2 000)、t-STAT3(1∶5 000)、Bcl-2(1∶1 000)、MMP-2(1∶1 000)和 β-actin(1∶1 000)一抗在 4 ℃条件下孵育过夜;用辣根过氧化物酶标记山羊抗兔和羊抗鼠二抗(1∶5 000)在水平摇床上室温孵育 60 min;膜用 TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,用增强化学发光试剂进行曝光,利用图像实验室软件对每个条带的蛋白质含量进行定量分析。

1.5 细胞周期检测

用 70%预冷乙醇对 1×10^6 个不同组的 U251 细胞进行固定,用 50 mg/mL 碘化丙钠(PI)和 50 mg/mL RNase 在 37 ℃下孵育 30 min,用流式细胞仪分析细胞周期。

1.6 细胞凋亡检测

1×10^6 个各组 U251 细胞重悬在 500 μL PBS 中,用 25 μg/mL propidium iodide 和 25 μg/mL Fluorescein isothiocyanate 在 37 ℃和暗室条件下孵育 30 min,流式细胞仪分析细胞凋亡。

1.7 CCK-8 检测

分别在慢病毒转染 24、48、72 h 和 96 h 后,在 96 孔板中每孔加入 10 μL CCK-8 继续培养 30 min,在酶标仪上 450 nm 处检测光密度值[D(450)]。

1.8 Transwell 实验

将 Matrigel 原液用无血清培养基以 1∶2的比例稀释,每个 24 孔板的小室用 60 μL 稀释后的 Matrigel 包

被,然后放入 37 ℃培养箱中约 30 min 使 Matrigel 凝固,待 Matrigel 凝固后每孔加入不同处理的用无血清培养基重悬的不同组 U251 细胞约 3×10^4 个,下室每孔加入 600 μL 完全培养基,然后继续培养 24 h,用棉签擦拭小室内残留的细胞和 Matrigel,用甲醇固定 15 min,再用 0.1%结晶紫染色 20 min,用双蒸水清洗 3 次,倒置显微镜随机选取上中下 5 个视野拍照计数(400×)。

1.9 细胞划痕实验

将各组 U251 细胞进行 6 孔板铺板,待各组细胞融合度达 90%~95%时用 200 μL 枪头作"十"字刮痕,PBS 清洗细胞碎片,然后每孔加入无血清培养基并在倒置显微镜下拍照记录,继续培养 24 h 后在倒置显微镜下拍照对比迁移情况(40×)。

1.10 统计学分析

采用 SPSS 21.0 软件进行数据处理分析,数据均用 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组比较采用 t 检验,$P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 APN-siRNA 慢病毒载体感染人胶质瘤 U251 细胞

将 APN-siRNA 和 NC-siRNA 的慢病毒转染进入 U251 细胞中培养 72 h 后,荧光倒置显微镜下观察发现 80%以上的细胞都可见荧光(图 1),提示慢病毒转染成功。

2.2 APN-siRNA 抑制 U251 中 APN 的表达

转染慢病毒 72 h 后,将转染率在 80%以上的细胞进行 Western blot 和 RT-qPCR 实验。Western blot 结果显示:与空白对照组相比,APN-siRNA 组的 APN 蛋白表达水平明显下调,差异有统计学意义($P<0.05$),而 NC-siRNA 组与空白对照组相比无明显差别(图 2A、B);RT-qPCR 显示:与空白对照组相比,APN-siRNA 组的 APN mRNA 表达量降低,差异有统计学意义($P<0.01$),而 NC-siRNA 组与空白对照组相比无明显差别(图 2C)。

2.3 沉默 APN 能抑制 U251 的增殖

利用流式细胞仪检测各组细胞周期,结果显示与空白对照组相比,APN-siRNA 组的 S 期比例明显减低,G_0/G_1 期比例明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$),NC-siRNA 组与空白对照组相比无明显差别(图 3)。采用 CCK-8 在慢病毒转染后 24、48、72 h 和 96 h 时检测各组细胞的增殖活性,结果显示与空白对照组相比,NC-siRNA 的活性无明显改变,而 APN-siRNA 组细胞与空白对照组相比在 48、72 h 和 96 h 增殖活性明显下降($P<0.01$,图 4)。

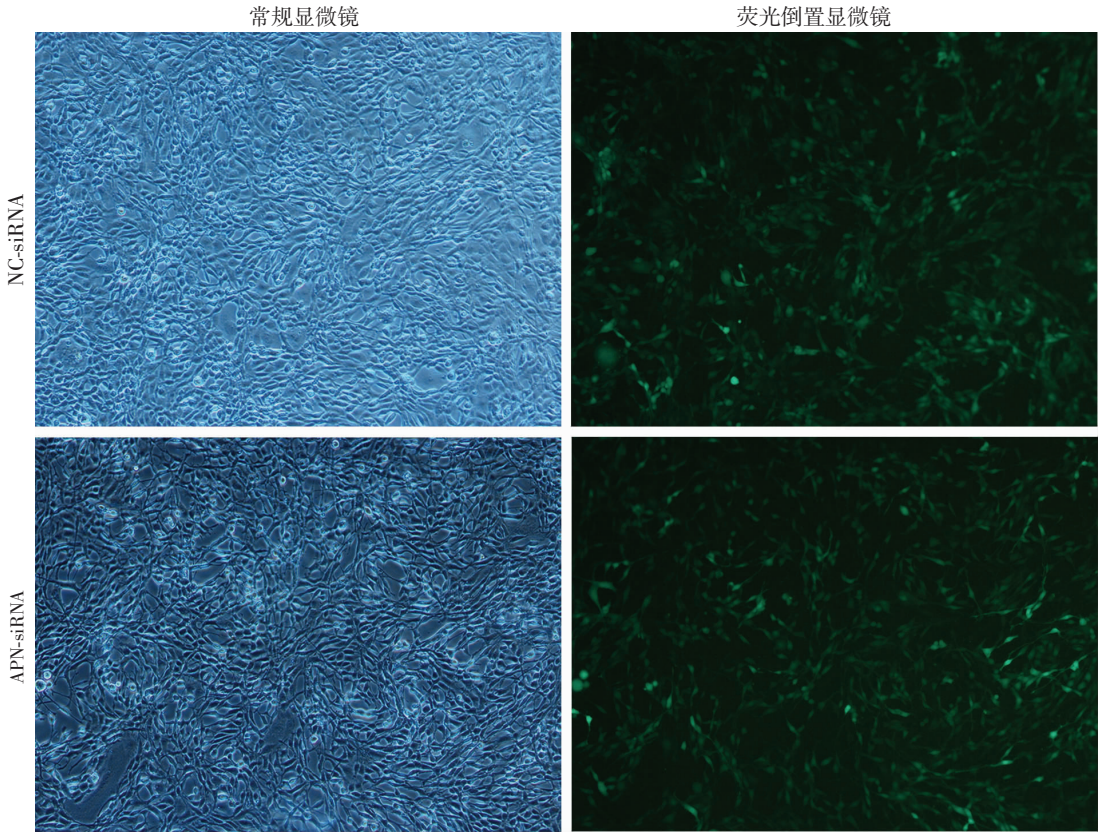
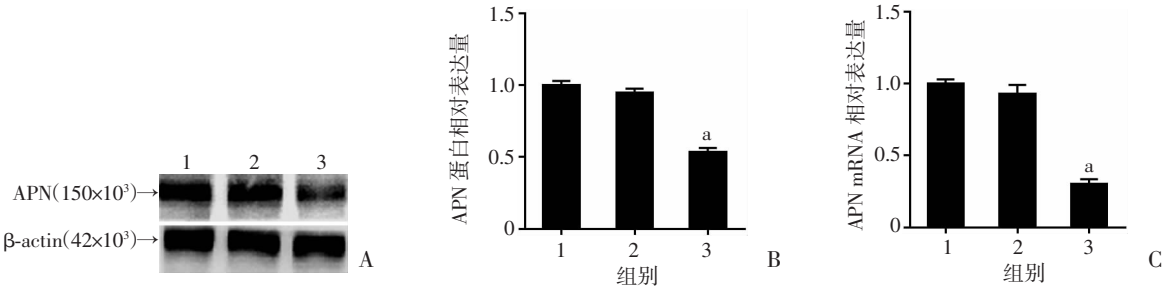
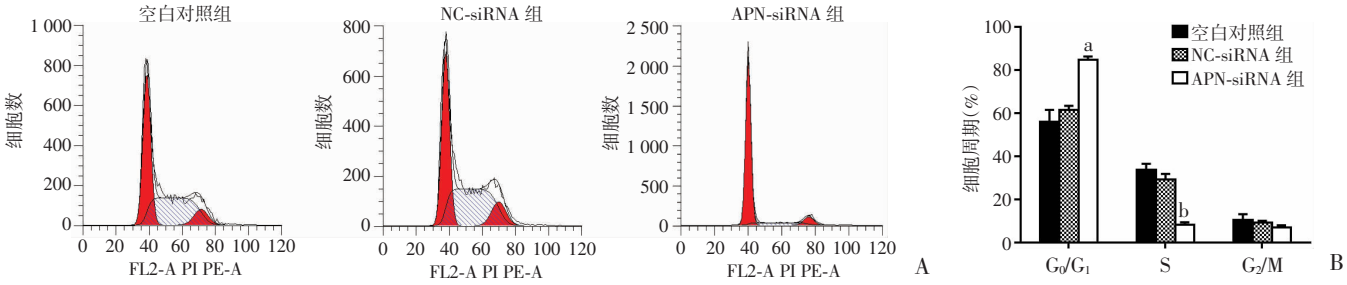


图 1 U251 细胞转染慢病毒 72 h 后荧光倒置显微镜观察 (×40)



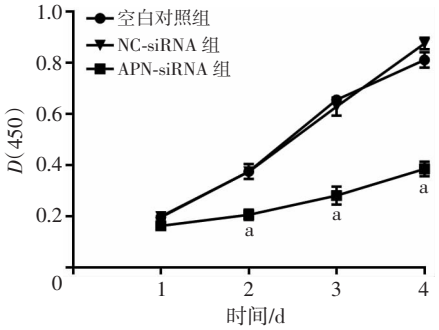
A:Western blot 检测 APN 蛋白表达;B:APN 蛋白半定量分析;C: APN mRNA 表达　1:空白对照组;2:NC-siRNA 组;3:APN-siRNA 组;a: $P<0.01$,与空白对照组比较

图 2　RNA 干扰后 APN 在 U251 中的表达变化



A:流式细胞仪检测细胞周期;B:细胞周期的分布　a: $P<0.05$,b: $P<0.01$,与空白对照组比较

图 3　流式细胞仪检测沉默 U251 细胞 APN 后对细胞周期的影响



a: $P<0.01$,与空白对照组比较

图 4　不同处理组 U251 细胞的 CCK-8 增殖曲线

2.4　沉默 APN 能降低 U251 的迁移和侵袭能力

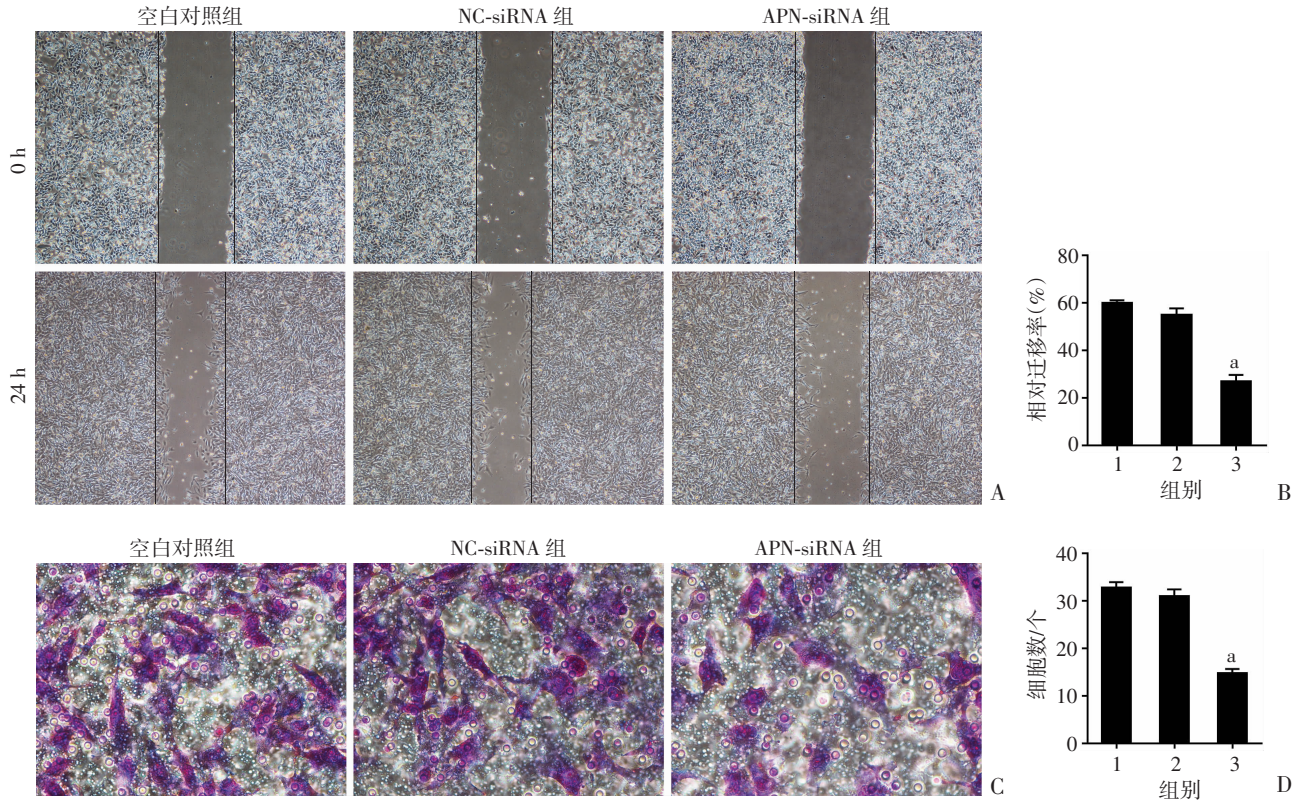
采用划痕实验来检测 APN 对胶质瘤细胞 U251 的迁移能力,结果表明 APN-siRNA 组的迁移能力比空白对照组明显减弱,差异有统计学意义(图 5A、B,$P<0.01$);用Transwell的方法来检测各组U251细胞的侵袭能力,结果表明与空白对照组相比,APN-siRNA 组的细胞显著减少($P<0.05$),NC-siRNA 组与空白对照组无明显差异($P>0.05$,图 5C、D)。

2.5　沉默 APN 能诱导 U251 凋亡

采用流式细胞仪检测沉默胶质瘤细胞 U251 中 APN 的表达对凋亡的影响,结果显示:APN-siRNA 组与空白对照组的凋亡率差异有统计学意义($P<0.01$),NC-siRNA 组与空白对照组的凋亡率无明显差异($P>0.05$,图 6)。

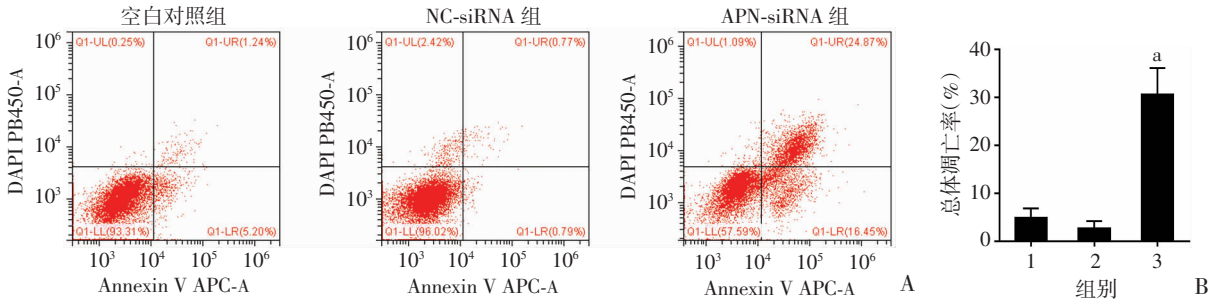
2.6　沉默 APN 抑制 STAT3 信号通路的激活

采用 Western blot 检测沉默 U251 细胞中 APN 的表达后 STAT3 及下游蛋白 Bcl-2、MMP-2 的表达变化,结果显示:与空白对照组相比,APN-siRNA 组 p-STAT3、Bcl-2、MMP-2 的蛋白表达水平明显降低($P<0.05$),NC-siRNA 组与空白对照组相比,p-STAT3、Bcl-2、MMP-2 的蛋白表达水平没有明显变化(图 7)。



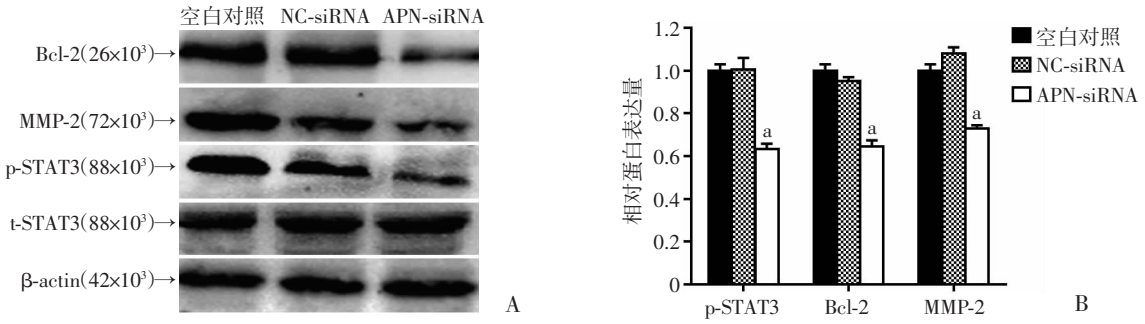
A、B:划痕实验检测 U251 细胞迁移能力的变化(×40);C、D:Transwell 实验检测 U251 细胞侵袭能力的变化(×400) 1:空白对照组;2:NC-siRNA 组;3:APN-siRNA 组;a: $P<0.01$,与空白对照组比较

图 5 沉默 U251 细胞 APN 后对其迁移、侵袭能力的影响



A:流式细胞仪检测;B:细胞凋亡率分析 1:空白对照组;2:NC-siRNA 组;3:APN-siRNA 组;a: $P<0.01$,与空白对照组比较

图 6 流式细胞仪检测沉默 U251 细胞 APN 后对其凋亡的影响



A:Western blot 检测 STAT3 通路蛋白的变化;B: STAT3 信号途径蛋白半定量分析 a: $P<0.05$,与空白对照组比较

图 7 沉默 U251 细胞中 APN 后对 STAT3 细胞通路的影响

3 讨论

胶质瘤占神经系统肿瘤的一半左右,由于胶质瘤生长在颅内,所以胶质瘤是国内外最棘手的肿瘤类型,探究胶质瘤的形成机制对于寻找有效的治疗方法有重要的意义。研究发现胶质瘤的发生发展与 IDH 的突变、1p/19q 染色体的缺失、MGMT 启动子的甲基化、TERT 启动子的突变、EGFRvIII 基因的突变等因素有关,其中这些基因的突变与缺失往往同时存在[9],基于对胶质瘤发生、发展过程中的认识研究者为胶质瘤的治疗不断开辟新的治疗方法。免疫疗法治疗肿瘤具有广阔的前景,免疫检查点抑制剂帕博利珠单抗和纳武利尤单抗已运用于恶性黑色素瘤、非小细胞肺癌、膀胱癌和霍奇金淋巴瘤等恶性肿瘤的治疗[10-11],但有研究表明免疫检查点抑制剂在胶质瘤的治疗中没有明显的效果[12],需要进一步的探索和寻找其他的有效治疗方法;CAR-T 细胞疗法目前在血液系统肿瘤如急性淋巴细胞白血病[13]、B 细胞淋巴瘤[14]、非小细胞肺癌[15]和胰腺癌[16]等肿瘤治疗中取得了不错的治疗效果,因此有学者运用 CAR-T 细胞疗法治疗胶质瘤,其用 CAR-T 细胞疗法靶向 IL13Rα2、EGFRvIII 和 HER2[17]治疗胶质瘤取得了一定的治疗成果,表明 CAR-T 细胞疗法用于胶质瘤的治疗存在理论上的可行性。但是由于胶质瘤的复杂性和神经系统的特殊性,目前的治疗方法对于胶质瘤的治疗效果存在很大的局限性,因此需要不断地探究新的胶质瘤靶向治疗方法。

研究发现 APN 在许多肿瘤中扮演着促癌作用的角色,被认为是促癌基因。研究表明抑制急性淋巴细胞白血病肿瘤细胞的 APN 活性能通过 PI3K 或 AKT 信号途径诱导肿瘤细胞的凋亡[18],在膀胱癌肿瘤细胞中抑制 APN 活性通过 AKT 信号途径诱导膀胱癌细胞自噬凋亡[19];肿瘤细胞的增殖能力是肿瘤良恶性的关键,APN 对某些肿瘤细胞增殖起着关键作用,在卵巢癌和肺癌细胞中 APN 的表达显著增加[20],研究发现 Notch 和 Wnt/β-catenin 是 APN 促进肿瘤细胞增殖的机制之一[21]。肿瘤细胞的远处转移和侵袭能力是判断肿瘤恶性程度的关键因素之一,研究发现在恶性肿瘤如肝癌、胃癌等细胞中存在 APN 的高表达,通过靶向抑制 APN 的活性能够抑制肝癌、胃癌细胞的运动能力[22]。学者们对 APN 在肝癌、胃癌、肺癌、白血病等肿瘤类型中的角色研究得出 APN 具有促进恶性肿瘤进程的作用,因此本研究探究胶质瘤细胞中 APN 的表达及其对于胶质瘤细胞的作用,为胶质瘤的治疗探寻新的靶向治疗方法。

为了寻找胶质瘤潜在的治疗靶点,我们在前期的实验中发现 APN 在胶质瘤组织标本中高表达,本研究试图探究胶质瘤细胞 U251 中 APN 的表达量,结果显示 U251 细胞中存在 APN 的表达。采用 RNA 干扰方法沉默 U251 中 APN 的表达来检测 APN 对胶质瘤细胞 U251 增殖活性、细胞周期、迁移和侵袭能力的影响,结果显示:沉默 U251 中 APN 的表达后 U251 的细胞活力明显下降;流式细胞显示细胞周期 G_1 期的比例增加,S 期的比例下降,并且 U251 细胞的凋亡比例明显增加;沉默 APN 后 U251 细胞的迁移能力或侵袭能力也明显受到抑制。本研究结果表明 APN 具有促进胶质瘤细胞 U251 增殖、迁移和侵袭能力的作用。

本研究发现 STAT3 信号途径参与肿瘤的发生、发展过程,STAT3 在 Tyr^{705} 位点磷酸化,然后通过诱导下游抗凋亡、促增殖侵袭蛋白的表达从而促进肿瘤进程[23]。本研究发现沉默 U251 细胞中 APN 的表达后 STAT3 的磷酸化水平明显降低,引起其下游抑制凋亡蛋白 Bcl-2 的表达下调,从而诱导了 U251 的凋亡,同时侵袭相关蛋白 MMP-2 的表达下调,抑制了胶质瘤 U251 的迁移和侵袭能力。

综上所述,APN 在胶质瘤细胞 U251 中可通过 STAT3 信号通路促进胶质瘤的发展,因此靶向 APN 及其 STAT3 信号通路可能是胶质瘤治疗潜在的方法之一。

参考文献:

[1] DIXON J, KAKLAMANIS L, TURLEY H, *et al*. Expression of aminopeptidase-n (CD 13) in normal tissues and malignant neoplasms of epithelial and lymphoid origin[J]. J Clin Pathol, 1994, 47(1): 43-47. DOI:10.1136/jcp.47.1.43.

[2] RESHEQ Y J, MENZNER A K, BOSCH J, *et al*. Impaired transmigration of myeloid-derived suppressor cells across human sinusoidal endothelium is associated with decreased expression of CD13[J]. J Immunol, 2017, 199(5): 1672-1681. DOI:10.4049/jimmunol.1600466.

[3] YAMANAKA C, WADA H, EGUCHI H, *et al*. Clinical significance of CD13 and epithelial mesenchymal transition (EMT) markers in hepatocellular carcinoma[J]. Jpn J Clin Oncol, 2018, 48(1): 52-60. DOI:10.1093/jjco/hyx157.

[4] MARTÍNEZ J M, PRIETO I, RAMÍREZ M J, *et al*. Aminopeptidase activities in breast cancer tissue[J]. Clin Chem, 1999, 45(10): 1797-1802. DOI:10.1093/clinchem/45.10.1797.

[5] ISHII K, USUI S, SUGIMURA Y, *et al*. Aminopeptidase N

regulated by zinc in human prostate participates in tumor cell invasion[J]. Int J Cancer, 2001, 92(1): 49-54.

[6] ZHANG J, FANG C Y, QU M H, *et al*. CD13 inhibition enhances cytotoxic effect of chemotherapy agents[J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 1042. DOI: 10.3389/fphar.2018.01042.

[7] AFFRONTI M L, HEERY C R, HERNDON J E 2nd, *et al*. Overall survival of newly diagnosed glioblastoma patients receiving carmustine wafers followed by radiation and concurrent temozolomide plus rotational multiagent chemotherapy [J]. Cancer, 2009, 115(15): 3501-3511. DOI:10.1002/cncr.24398.

[8] LIAO A H, CHOU H Y, HSIEH Y L, *et al*. Enhanced therapeutic epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody delivery *via* pulsed ultrasound with targeting microbubbles for glioma treatment[J]. J Med Biol Eng, 2015, 35(2): 156-164. DOI:10.1007/s40846-015-0032-9.

[9] WELLER M, WICK W, ALDAPE K, *et al*. Glioma[J]. Nat Rev Dis Primers, 2015, 1: 15017. DOI: 10.1038/nrdp.2015.17.

[10] HAMID O, ROBERT C, DAUD A, *et al*. Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma [J]. N Engl J Med, 2013, 369(2):134-144. DOI: 10.1056/NEJMoa1305133.

[11] BALAR A V, WEBER J S. PD-1 and PD-L1 antibodies in cancer: current status and future directions[J]. Cancer Immunol Immunother, 2017, 66(5): 551-564. DOI: 10.1007/s00262-017-1954-6.

[12] FILLEY A C, HENRIQUEZ M, DEY M. Recurrent glioma clinical trial, CheckMate-143: the game is not over yet[J]. Oncotarget, 2017, 8(53): 91779-91794. DOI:10.18632/oncotarget.21586.

[13] GRUPP S A, KALOS M, BARRETT D, *et al*. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia [J]. N Engl J Med, 2013, 368(16): 1509-1518. DOI: 10.1056/NEJMoa1215134.

[14] SCHUSTER S J, SVOBODA J, CHONG E A, *et al*. Chimeric antigen receptor T cells in refractory B-cell lymphomas[J]. N Engl J Med, 2017, 377(26): 2545-2554. DOI: 10.1056/nejmoa1708566.

[15] WEI X R, LAI Y X, LI J, *et al*. PSCA and MUC1 in non-small-cell lung cancer as targets of chimeric antigen receptor T cells[J]. Oncoimmunology, 2017, 6(3): e1284722. DOI:10.1080/2162402x.2017.1284722.

[16] HECKLER M, DOUGAN S K. Unmasking pancreatic cancer: epitope spreading after single antigen chimeric antigen receptor T-cell therapy in a human phase I trial[J]. Gastroenterology, 2018, 155(1): 11-14. DOI: 10.1053/j.gastro.2018.06.023.

[17] 陈峰, 郑晓红, 李文斌. 脑胶质瘤免疫治疗进展[J]. 首都医科大学学报, 2019, 40(6): 966-971.
CHEN F, ZHENG X H, LI W B. Immunotherapy for the treatment of glioma[J]. J Cap Med Univ, 2019, 40(6): 966-971.

[18] PIEDFER M, DAUZONNE D, TANG R P, *et al*. Aminopeptidase-N/CD13 is a potential proapoptotic target in human myeloid tumor cells[J]. FASEB J, 2011, 25(8): 2831-2842. DOI:10.1096/fj.11-181396.

[19] WANG X Q, LIU Y, LIU W, *et al*. Ubenimex, an APN inhibitor, could serve as an antitumor drug in RT112 and 5637 cells by operating in an Aktassociated manner[J]. Mol Med Rep, 2018, 17: 4531-4539. DOI: 10.3892/mmr.2018.8402.

[20] TERAUCHI M, KAJIYAMA H, SHIBATA K, *et al*. Inhibition of APN/CD13 leads to suppressed progressive potential in ovarian carcinoma cells[J]. BMC Cancer, 2007, 7: 140. DOI:10.1186/1471-2407-7-140.

[21] WANG R, SUN Q, WANG P, *et al*. Notch and Wnt/β-catenin signaling pathway play important roles in activating liver cancer stem cells [J]. Oncotarget, 2016, 7(5): 5754-5768. DOI:10.18632/oncotarget.6805.

[22] 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): 137-143. DOI:10.1002/ijc.2910540122.

[23] BRANTLEY E C, BENVENISTE E N. Signal transducer and activator of transcription-3: a molecular hub for signaling pathways in gliomas[J]. Mol Cancer Res, 2008, 6(5): 675-684. DOI:10.1158/1541-7786.mcr-07-2180.

(收稿:2019-12-25;修回:2020-02-08)

(编辑 吴培红)