

CD13/氨基肽酶 N 在新生血管成像中的应用价值

付彤 瞿卫 王峰

【摘要】 新生血管的发生在恶性肿瘤发生、发展和转移过程起着关键作用。CD13 是人类白血病分级的重要谱系特异性标志物, 在新生血管内皮细胞上特异性高表达, 在静止血管内皮细胞上不表达。利用荧光、核素标记或磁性纳米颗粒耦联 CD13 单克隆抗体、配体, 通过分子成像技术可有效探测新生血管的发生, 为研究血管相关疾病的发生、发展提供影像学依据; CD13 的配体——天冬氨酸-甘氨酸-精氨酸与各种抗肿瘤药物构成复合物, 然后转运到肿瘤新生血管内皮细胞表面与 CD13 结合, 释放抗肿瘤药物治疗肿瘤。CD13 在与新生血管相关的各类疾病的认识、诊断、治疗的研究中有着突破性进展和良好的前景。

【关键词】 新生血管化, 病理性; 抗原, CD13; 寡肽类; 靶向追踪; 抗肿瘤药

The application of CD13/aminopeptidase N in the angiogenesis imaging FU Tong, QU Wei, WANG Feng. Department of Nuclear Medicine, Nanjing First Hospital Affiliated to Nanjing Medicine University, Nanjing 210006, China

Corresponding author: WANG Feng, Email: fengwangcn@hotmail.com

【Abstract】 The development and metasis of malignant tumor depend on neovascularization. CD13 is a significant marker of cells commit to myeloid lineage to classify leukemia, meanwhile it expresses on the neovascular endothelial cells specifically but expresses barely in vascular endothelial cells. Coupling CD13 monoclonal antibody or CD13 ligand to CD13 in fluorescence, radionuclide or magnetic nanoparticles to achieve molecular imaging to probe angiogenesis and provide imaging evidence of the development of angiogenesis associated disease. Asn-Gly-Arg peptide motif compound with different anticancer drugs targeted deliver to neovascular endothelial cells and release the anticancer drugs to treat the tumor. The research of CD13 to understand, diagnose and treat the angiogenesis associated diseases has gotten breakthrough and have a promising future.

【Key words】 Neovascularization, pathologic; Antigens, CD13; Oligopeptides; Target homing; Anti-neoplastic agents

CD13 是一种包括 967 个氨基酸的同源二聚体跨膜糖蛋白, 是锌离子结合金属蛋白酶超级家族的成员之一, 在体内以可溶形式存在。CD13 可以催化小肽上 NH₂ 残基的脱落, 因此, CD13 又名氨基肽酶 N(aminopeptidase N, APN)。CD13/APN 具有多种生物活性, 在抗原加工、神经肽和细胞活性因子的降解、细胞周期的控制和分级、肿瘤侵入以及细胞外基质溶解等过程中起着重要作用^[1]。CD13 最初主要作为粒细胞谱系的特异性标志物, 用于人类白血病的分级。近年来的研究发现, CD13/APN 作为血管发生信号的受体, 在血管发生过程中活化、

表达上调, 调节血管发生信号进而调节血管生成^[2-3]。CD13/APN 在新生血管内皮细胞中的特异性表达为 CD13 抑制剂、CD13 配体及 CD13 单克隆抗体提供了特异性受体。新生血管在各种炎症和肿瘤的发生、发展过程中起支持作用, 靶向示踪 CD13/APN 对新生血管所支持的疾病的诊断和治疗提供了新的手段。

1 靶向 CD13/APN 的工具

靶向 CD13/APN 的工具具有 3 种: CD13 抑制剂^[4]、CD13 配体和 CD13 单克隆抗体, 其中应用较多的是 CD13 配体天冬氨酸-甘氨酸-精氨酸(Asn-Gly-Arg, NGR) 和 CD13 单克隆抗体。CD13 配体 NGR 追踪 CD13/APN, 结构有 2 种: 环状 NGR (circle NGR,

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2011.06.001

作者单位: 210006, 南京医科大学附属南京第一医院核医学科

通信作者: 王峰(Email: fengwangcn@hotmail.com)

cNGR)、线状 NGR^[9]。通过NGR 追踪肿瘤新生血管内皮细胞表面的 CD13/APN, 能从体内、体外两个方面实现对肿瘤的认识^[9]。同时, CD13/APN 对于肿瘤新生血管的发生、细胞外基质的降解、肿瘤的侵入均有调节作用, NGR 携带 CD13 抑制剂阻碍 CD13 对肿瘤的各种调节作用, 达到控制肿瘤发生、发展的目的。NGR 携带肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、多柔比星、干扰素 γ (interferon- γ , INF- γ)等抗肿瘤药物通过靶向肿瘤血管内皮细胞来治疗肿瘤已取得了一定的成效^[9]。

用 WM15、3D8 和 BF10 (3 种 CD13 的单克隆抗体)对 58 例正常组织、32 例炎症、149 例肿瘤进行免疫组化法血管染色, 结果: 这 3 种抗体均能标记肿瘤组织, 约半数的肿瘤组织基质也有着色, 不同的是: WM15 标记肿瘤内外的毛细血管, 大血管的着色极少, 而 BF10 和 3D8 标记动脉、静脉, 对毛细血管着色的范围小得多, 由此可见, WM15 对于新生毛细血管内皮细胞表达的 CD13/APN 有特异性结合作用; 在炎性病灶中, 3 种抗体均标记血管和基质; 在正常组织中, 它们仅着色小部分的血管, 包括人脐静脉内皮细胞和结肠癌血管^[7]。此 3 种单克隆抗体不仅在靶向示踪 CD13 中起到重要的作用, 还能携带显像剂、抗疾病药物在新生血管中发挥诊断和局部治疗的作用。

2 CD13/APN 在血管内皮细胞中的表达

新生血管对器官的生长和修复有很重要的作用, 在促血管生成因子和抗血管生成因子的平衡被打破时, 就会出现缺血、炎症、感染、免疫紊乱, 甚至肿瘤^[8-9]。CD13/APN 是体内外血管内皮细胞的迁移、入侵和毛细血管生成的关键因子^[9]。Pasqualini 等^[6]用 NGR 靶向追踪肿瘤新生血管内皮细胞的 CD13/APN, 证明 CD13/APN 是 NGR 的靶向受体, 是新生血管的靶目标。CD13/APN 选择性地表达于血管内皮细胞, Fukasawa 等^[10]证实, CD13/APN 在人脐静脉内皮细胞和 21 种肿瘤细胞系中的 18 种有高表达, 而在 5 种正常细胞中仅 1 种正常细胞有表达。Curnis 等^[11]用 NGR-TNF 复合物和 13Co3、WM15 两种单克隆抗体证明, CD13 在肾癌、乳腺癌和前列腺癌中的髓细胞、上皮细胞和肿瘤血管中表达, 而在正常肾脏和正常髓细胞中并不表达。由此可见, CD13 只在活化的血管内皮细胞中表达。

Oostendorp 等^[12]通过顺磁性量子 (paramagnetic quantum dots, pQDs) 与 NGR 结合对急性心肌梗死后新生血管区行分子 MRI 证实, CD13 在有活性的内皮细胞表面高表达(如肿瘤、炎症组织中的新生血管), 而在静止的细胞和正常的细胞中很少表达或者不表达。

Oostendorp 等^[12]用 cNGR 标记的顺磁性量子 (cNGR-pQDs) 进行荷瘤鼠靶向性 MRI, 可见肿瘤边缘显像, 而肿瘤核心并不显像, 说明对肿瘤的增长和扩散有重要意义的血管在肿瘤边缘生成、活跃; 而未标记 cNGR 的 pQDs 在 MRI 和双光子激光扫描显微技术中都不显像或显像很少, 证明 cNGR 是与肿瘤血管内皮结合的功能部位。

综上所述, 在各种刺激因子打破血管生成平衡的条件下, CD13/APN 在新生血管内皮细胞表面大量表达, 在静止的血管内皮细胞中的不表达或表达较少, 因而不能被配体或单克隆抗体追踪。

3 血管内皮细胞 CD13/APN 的上调机制

CD13/APN 是新生血管发生的关键因子, 而 CD13/APN 在血管生成的平衡打破之后在各种因素的刺激下上调, 实现血管生成的调节。Petrovic 等^[13]证实, CD13 通过调节膜依赖的缓激肽介导的细胞分裂周期蛋白 42 (cell division cyclin 42) 以及伪足伸出情况来调节血管生成。在缺氧、血管生长因子、血管生成调节信号的调节下, CD13 近端启动子活跃, 转录大量增加, 立即提高 CD13 的表达, 促进毛细血管的生成, 以此对微环境发生的改变做出应答^[2]。CD13/APN 在成熟血管内皮细胞内静止, 肿瘤在微环境改变后产生血管生成因子, 调节 CD13/APN 大量表达。这一上调是通过 Ras 蛋白的活化来启动 Ras 信号途径, 并由 Ras 蛋白激活信号通路下游目标的调节器而完成。

Bhagwat 等^[14]报道, CD13 的上调是通过新生血管信号转导而实现的, 而信号的转导是通过 Ras 蛋白 / 丝裂原激活蛋白激酶 (Ras/mitogen activated protein kinase)、Ras 蛋白 / 磷脂酰肌醇 3-激酶 (Ras/phosphatidylinositol 3-kinases) 两条信号转导通路刺激 CD13/APN 近端启动子的转录而完成的。Ras 蛋白介导的信号转导对生长因子介导的血管生成是必需的, 因为抑制 Ras 蛋白激活的信号转导通路下游的调节器, 能够抑制内皮细胞的迁移、入侵和形态

的发生,而 CD13 的再诱导克服了这些抑制作用,恢复内皮细胞的迁移、入侵和形态发生的功能;对细胞外信号调节丝氨酸/苏氨酸激酶(extracellular signal-regulated serine/threonine kinase)通路的抑制,可以消除内皮细胞的入侵和毛细血管的形成,但是此抑制作用可由外源性 CD13 有效地补救。可见,CD13 是 Ras 蛋白介导的 Ras 信号途径信号转导的靶目标,是新生血管发生过程的关键因子。Petrovic^[14]等从 RNA 转录水平进一步证明,CD13/APN 的信号转导是由 Ras/丝裂原激活蛋白激酶信号转导通路中的 CD13/APN 启动子中 38 对碱基对区域中的 Ets-2 基因实现磷酸化,从而调节 CD13/APN 的诱导;对比试验显示,Ets-2 基因敲除后的内皮细胞和包含抑制 Ets-2 基因的干扰 RNA 的内皮细胞完全失去了调节内皮细胞形态的功能,而未磷酸化的 Ets-2 基因并不能转录、活化 CD13/APN,可见 Ets-2 基因的磷酸化对于 CD13/APN 诱导是必不可少的。

4 CD13/APN 在疾病诊断上的应用

肿瘤的生存和生长依靠血管供给养分和排除废物,同时肿瘤的转移也依赖新生血管,因此,CD13/APN 在新生血管内皮细胞的特异性高表达为亲肿瘤显像提供了很好的靶目标。Pasqualini 等^[6]用 NGR 与肿瘤新生血管内皮细胞表面表达的 CD13/APN 结合,实现靶向追踪肿瘤。Ikeda 等^[15]在免疫组化染色、计数微血管中利用 CD13 的单克隆抗体 MH8-11 在 50 例胰腺癌患者体内发现,CD13/APN 基因表达阳性率为 50%,而 CD13/APN 蛋白阳性率为 48%;CD13/APN 阳性表达患者的半生存时间远远短于 CD13/APN 阴性表达的患者。Tokuhara 等^[9]同样运用 CD13 的单克隆抗体 MH8-11 在研究中发现,CD13/APN 是患非小细胞肺癌的重要先兆因素:在 194 例非小细胞肺癌中,CD13/APN 参与降解细胞外基质、活化细胞和增加血管生成。以上两项研究说明,CD13/APN 的表达情况对于预测癌症的发生、发展及生存时间的长短有着重要的参考价值。Oostendorp 等^[12]运用 pQDs 和 cNGR-pQDs 对肿瘤和肌肉组织行 MRI,结果:cNGR-pQDs 的反应范围较未标记 cNGR 的 pQDs 大 3 倍,cNGR-pQDs 与肿瘤边缘的新生血管内皮细胞结合,而非肿瘤内部组织,支持了新生血管的形成在肿瘤边缘活跃的观点;同时,cNGR-pQDs 在肿瘤组织中的分布高于

肌肉组织 2 倍,支持了 cNGR-pQDs 对新生血管有特异性的观点;cNGR-pQDs 与新生血管内皮细胞的结合是可逆的,并可由未结合的 cNGR 竞争抑制。这些结果在体外由双光子激光扫描显微技术所证实。cNGR-pQDs 的肿瘤 MRI 实现了无创性地在数量上评估新生血管的活性,从而可用于判断肿瘤良恶性、监测肿瘤的生长和转移、估测肿瘤对药物治疗反应的情况。

急慢性心肌梗死后,形成侧支循环,Buehler 等^[17]用体内荧光显像和体外双光子激光扫描显微技术来获得心肌梗死后模型中 CD13 在新生血管和非新生血管中的分布,结果显示:CD13/APN 在心肌梗死后新生血管区优先表达;在反转录聚合酶链反应中可测得 CD13 mRNA 的表达在梗死区和梗死边缘区显著上调,在心肌梗死后 7 d 达到峰值,增长 10~20 倍,而在非梗死区和手术安装的假心脏组织基本不变,且梗死区与 cNGR 标记区的空间位置关系一致;CD13/APN 联合 CD105 和 CD31 共同定位于直径小于 15 μm 的血管中,而 cNGR 不与正常心肌组织中的 CD13 阳性血管结合,再次证明 cNGR 只与活化的血管内皮细胞中的 CD13/APN 结合。

5 CD13/APN 在肿瘤治疗方面的应用

NGR 作为 CD13/APN 的配体可以与各种抗肿瘤药物结合成抗肿瘤复合物,靶向肿瘤新生血管内皮细胞释放抗肿瘤药物,发挥其抗肿瘤效用。近年来,研究者们将抗肿瘤药物、细胞活性因子、抗血管生成因子与 cNGR 结合成为抗肿瘤复合物,靶向追踪 CD13/APN,用以发挥它们杀伤新生血管和肿瘤的效能^[9]。其中,Curnis 等^[18]发现,cNGR-TNF- α 20~30 倍高效于 TNF- α ,从而大大降低了大剂量 TNF- α 的系统细胞毒性,突破其局部给药的限制。Curnis 等^[18]还发现,低剂量 cNGR-INF- γ (0.06~3 ng)可以活化依赖 TNF 的抗肿瘤机制,高剂量 cNGR-INF- γ (300 ng)诱导可溶性坏死因子受体脱落,提示低剂量靶向方法可以使抗肿瘤和抗调节机制解耦联,说明 NGR 是理想的运送细胞因子到肿瘤内的靶向工具。

NGR 不仅可以结合抗肿瘤药物,而且可以联合 NGR-复合物和抗肿瘤药物发挥协同抗肿瘤作用。有研究报道,NGR-TNF 与多柔比星的协同抗肿瘤作用在具有免疫力的小鼠中出现,而在无胸腺裸鼠和敲除 INF- γ 基因的鼠体内没有出现,加入

抗 INF- γ 抗体的免疫小鼠体内协同作用同样消失；对无胸腺裸鼠和敲除 INF- γ 基因小鼠给予 INF- γ ，协同作用恢复；在裸鼠体内加入 INF- γ cDNA，同样使协同作用恢复^[9]。总之，NGR 携带多重抗肿瘤药物可以发挥各药物的协同作用。CD13/APN 作为受体与 NGR 携带的抗肿瘤药物结合，能在低剂量水平实现抗肿瘤作用，提高抗肿瘤效用，同时减少高剂量抗肿瘤药物对人体正常组织损害的不良作用。此外，CD13 抑制剂对于实体瘤的治疗作用也取得了令人鼓舞的成果，尤其对于肺鳞癌、非小细胞肺癌治疗后 5 年的生存率均有提高^[4]。

6 整联蛋白 $\alpha v \beta 3$

NGR 是 CD13/APN 的配体，其异构体精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Arg-Gly-Asp, RGD)可与整联蛋白 αv 家族中的整联蛋白 $\alpha v \beta 3$ 结合，整联蛋白 $\alpha v \beta 3$ 也是表达于血管内皮细胞的靶向受体。整联蛋白 $\alpha v \beta 3$ 和 CD13/APN 虽然同时表达于新生血管内皮细胞，但并不是同一种物质^[20]。放射性核素标记的 RGD 引入体内后，可以与整联蛋白 $\alpha v \beta 3$ 特异性结合，在体外可以用核医学检测仪器无创性检测，进而根据放射性化合物的异常浓聚提示肿瘤的大小，判断抗肿瘤血管生成药物的疗效。在未来的研究中，可以借鉴放射性核素标记 RGD 与整联蛋白 $\alpha v \beta 3$ 结合的方式，用放射性化合物标记 NGR 追踪 CD13/APN 显像，进而判断新生血管支持的疾病的发生、发展、治疗效果等。

RGD 血管靶向整联蛋白 $\alpha v \beta 3$ 与 NGR 靶向 CD13/APN 的结合，使受体靶向诊断和治疗不仅仅局限于 CD13/APN 这一种新生血管内皮细胞标志物，同时也为多种受体抗体、配体、单克隆抗体联合，发挥诊断、治疗作用提供了更广的思路和方法。

参 考 文 献

[1] Curnis F, Arrigoni G, Sacchi A, et al. Differential binding of drugs containing the NGR motif to CD13 isoforms in tumor vessels, epithelia, and myeloid cells. *Cancer Res*, 2002, 62(3): 867-874.

[2] Bhagwat SV, Lahdenranta J, Giordano R, et al. CD13/APN is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation. *Blood*, 2001, 97(3): 652-659.

[3] Bhagwat SV, Petrovic N, Okamoto Y, et al. The angiogenic regulator CD13/APN is a transcriptional target of Ras signaling pathways in endothelial morphogenesis. *Blood*, 2003, 101 (5) : 1818-1826.

[4] 吴旭辉. CD13 靶向治疗研究进展. *癌症进展*, 2006, 4(2): 163-

166.

[5] Corti A, Curnis F, Arap W, et al. The neovasculature homing motif NGR: more than meets the eye. *Blood*, 2008, 112(7): 2628-2635.

[6] Pasqualini R, Koivunen E, Kain R, et al. Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. *Cancer Res*, 2000, 60(3): 722-727.

[7] Di Matteo P, Arrigoni GL, Alberici L, et al. Enhanced expression of CD13 in vessels of inflammatory and neoplastic tissues. *J Histochem Cytochem*, 2011, 59(1) : 47-59.

[8] Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, 2005, 438(7070): 932-936.

[9] Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 2000, 407(6801): 249-257.

[10] Fukasawa K, Fujii H, Saitoh Y, et al. Aminopeptidase N(APN/CD13) is selectively expressed in vascular endothelial cells and plays multiple role in angiogenesis. *Cancer Lett*, 2006, 243(1): 135-143.

[11] Oostendorp M, Douma K, Wagenaar A, et al. Molecular magnetic resonance imaging of myocardial angiogenesis after acute myocardial infarction. *Circulation*, 2010, 121(6): 775-783.

[12] Oostendorp M, Douma K, Hackeng TM, et al. Quantitative molecular magnetic resonance imaging of tumor angiogenesis using cNGR-labeled paramagnetic quantum dots. *Cancer Res*, 2008, 68 (18): 7676-7683.

[13] Petrovic N, Schacke W, Cahagan JR, et al. CD13/APN regulates endothelial invasion and filopodia formation. *Blood*, 2007, 110(1): 142-150.

[14] Petrovic N, Bhagwat SV, Ratzan WJ, et al. CD13/APN transcription is induced by RAS/MAPK-mediated phosphorylation of Ets-2 in activated endothelial cells. *J Biol Chem*, 2003, 278(49): 49358-49368.

[15] Ikeda N, Nakajima Y, Tokuhara T, et al. Clinical significance of aminopeptidase N/CD13 expression in human pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(4):1503-1508.

[16] Tokuhara T, Hattori N, Ishida H, et al. Clinical significance of aminopeptidase N in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(13):3971-3978.

[17] Buehler A, van Zandvoort MA, Stelt BJ, et al. cNGR: a novel homing sequence for CD13/APN targeted molecular imaging of murine cardiac angiogenesis in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26(12): 2681-2687.

[18] Curnis F, Gasparri A, Sacchi A, et al. Targeted delivery of IFN γ to tumor vessels uncouples antitumor from counter regulatory mechanisms. *Cancer Res*, 2005, 65(7): 2906-2913.

[19] Sacchi A, Gasparri A, Curnis F, et al. Crucial role for interferon gamma in the synergism between tumor vasculature-targeted tumor necrosis factor alpha (NGR-TNF) and doxorubicin. *Cancer Res*, 2004, 64(19): 7150-7155.

[20] Curnis F, Sacchi A, Gasparri A, et al. Isoaspartate-glycine-arginine: a new tumor vasculature-targeting motif. *Cancer Res*, 2008, 68(17): 7073-7082.