

· 论 著 ·

# XPNPEP2 蛋白高表达对乳腺癌远期预后的影响

张全文, 杨齐, 葛沙沙

首都医科大学附属复兴医院普外科, 北京 100038

**摘要:** **目的** 探讨氨肽酶 P2(XPNPEP2) 表达水平对乳腺癌患者远期预后的影响。**方法** 研究病例为首都医科大学附属复兴医院 2013 年 1 月至 2015 年 6 月收治的采用手术治疗的 93 例乳腺癌患者, 收集其手术切除的乳腺癌及癌旁组织的病理标本及临床病理资料。采用免疫组化法检测并比较乳腺癌及癌旁组织 XPNPEP2 的表达情况, 分析其与乳腺癌相关病理参数间的关系; 比较不同 XPNPEP2 表达乳腺癌患者的 5 年生存率; COX 多因素比例风险回归分析乳腺癌预后与 XPNPEP2 表达的关系。**结果** XPNPEP2 在乳腺癌组织中阳性表达率 72.73%, 显著高于癌旁组织中的 26.14% ( $\chi^2 = 38.209, P < 0.01$ )。在乳腺癌组织中, XPNPEP2 的阳性表达在不同肿瘤分化程度、淋巴结有无转移及不同 TNM 分期患者间差异均有统计学意义 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。XPNPEP2 阳性表达患者 5 年总生存率 35.94%, 显著低于阴性表达患者的 79.17% ( $\chi^2 = 13.074, P < 0.01$ )。COX 回归分析发现, XPNPEP2 高表达 ( $HR = 3.476, 95\% CI = 1.531 \sim 7.892, P < 0.01$ )、肿瘤分化程度低 ( $HR = 2.903, 95\% CI = 1.357 \sim 6.210, P < 0.01$ )、淋巴结发生转移 ( $HR = 3.415, 95\% CI = 1.167 \sim 9.992, P < 0.05$ ) 及 TNM 分期高 ( $HR = 2.767, 95\% CI = 1.125 \sim 6.803, P < 0.05$ ) 均是影响乳腺癌患者预后的独立危险因素。**结论** XPNPEP2 的阳性表达与乳腺癌患者多种病理参数及不良预后相关, 有望成为其预后评估的潜在标志物。

**关键词:** 乳腺癌; 氨肽酶 P2; 病理参数; 预后

**中图分类号:** R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2021)11-1478-04

## Influence of overexpression of XPNPEP2 protein on long-term prognosis of breast cancer

ZHANG Quan-wen, YANG Qi, GE Sha-sha

Department of General Surgery, Fuxing Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100038, China

Corresponding author: YANG Qi, E-mail: 952839102@qq.com

**Abstract: Objective** To investigate the effect of X-prolyl aminopeptidase P2 (XPNPEP2) level on the long-term prognosis of patients with breast cancer. **Methods** The pathological specimens of breast cancer tissues and paracancerous tissues and the clinicopathological data were collected from 93 patients with breast cancer undergoing surgical treatment from January 2013 to June 2015. The expressions of XPNPEP2 were detected by immunohistochemistry and compared between breast cancer tissues and adjacent tissues, analyze the relationship between the expression of XPNPEP2 and the pathological parameters of breast cancer. The 5-year survival rate associated with different XPNPEP2 expression levels was compared. The relationship between prognosis of breast cancer and expression of XPNPEP2 was analyzed by COX multivariate proportional hazards regression. **Results** The positive expression rate of XPNPEP2 in breast cancer tissues was significantly higher than that in adjacent tissues (72.73% vs 26.14%,  $\chi^2 = 38.209, P < 0.01$ ). The positive expressions of XPNPEP2 were significantly related with the tumor differentiation, lymph node metastasis and TNM stages in breast cancer tissues ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). The 5-year overall survival rate of patients with XPNPEP2 positive expression was significantly lower than that of patients with XPNPEP2 negative expression (35.94% vs 79.17%,  $\chi^2 = 13.074, P < 0.01$ ). COX regression analysis showed that high XPNPEP2 expression ( $HR = 3.476, 95\% CI = 1.531 \sim 7.892, P < 0.01$ ), poor tumor differentiation ( $HR = 2.903, 95\% CI = 1.357 \sim 6.210, P < 0.01$ ), lymph node metastasis ( $HR = 3.415, 95\% CI = 1.167 \sim 9.992, P < 0.05$ ) and high TNM stage ( $HR = 2.767, 95\% CI = 1.125 \sim 6.803, P < 0.05$ ) were the independent risk factors affecting the prognosis of breast cancer patients. **Conclusion** The positive expression

of XPNPEP2 is associated with a variety of pathological parameters and poor prognosis and is expected to be a potential marker for prognosis evaluation in breast cancer patients.

**Keywords:** Breast cancer; Aminopeptidase P2; Pathological parameters; Prognosis

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,乳腺癌的发生并不局限于某一特定的种族群体,全球每年有近百万乳腺癌患者确诊,其中约有45万人死于该疾病<sup>[1-3]</sup>。我国乳腺癌发病率高且逐年上升,严重威胁我国女性健康<sup>[4-5]</sup>。由于早期诊断水平的提高,其死亡率近20年有所下降,但许多乳腺癌患者可出现治疗后复发和转移,严重影响患者预后<sup>[6-7]</sup>,但至今其复发和转移的机制仍未明确。氨肽酶P2(aminopeptidase P2, XPNPEP2)是氨肽酶蛋白家族成员,具有氨基酸切除功能,可将蛋白质水解为氨基酸,已证实在结直肠癌和胃癌组织中XPNPEP2的异常表达与肿瘤的转移存在密切联系<sup>[8-9]</sup>。本研究通过检测XPNPEP2在乳腺癌患者病理标本中的表达,初步考察XPNPEP2表达与乳腺癌患者预后的关系,探讨其在乳腺癌发病机制中的价值。

## 1 对象与方法

**1.1 研究对象** 选择2013年1月至2015年6月首都医科大学附属复兴医院收治的采用手术治疗的93例乳腺癌患者为对象进行回顾性研究。收集其乳腺癌组织及癌旁组织病理标本及临床病理资料。这些标本均来自女性患者,年龄32~80(53.64±16.07)岁;参照国际抗癌联盟的TNM分期标准(第七版)<sup>[10]</sup>进行肿瘤病理分期,Ⅰ期21例,Ⅱ期40例,Ⅲ期和Ⅳ期共32例;其中,高分化28例,中分化39例,低分化26例;淋巴结发生转移43例,未转移50例。入选标准:(1)所有患者手术治疗前未接受过放疗及化疗;(2)经病理及组织学确诊为乳腺癌患者;(3)无免疫性及感染性疾病。排除标准:(1)肝肾功能严重受损者;(2)合并其他种类肿瘤者。本研究方案已获医院伦理审核批准,所有患者均签署知情同意书。

**1.2 免疫组化法检测<sup>[11]</sup>** 患者在入院后均行乳腺癌根治手术治疗,收集手术过程中切除的患者肿瘤组织及相应的癌旁组织送病理实验室制成标本,采用免疫组化SP法进行检测,所用试剂盒及对应试剂均购自上海江莱生物科技。操作:取乳腺癌组织和癌旁组织的蜡块制成石蜡切片,厚度为4 μm;室温条件下,对石蜡切片进行脱蜡脱苯处理,之后用过氧化氢溶液浸泡30 min,以使内源性过氧化物酶失活;用磷酸盐

缓冲液(PBS)洗涤3次,每次3 min,之后采用pH 6.0的柠檬酸盐缓冲液浸泡修复抗原;再次重复PBS洗涤步骤,室温条件下染色处理约2 h;用PBS再次洗涤,将通用型二抗滴在切片上,于室温条件孵育30 min左右,用PBS再次洗涤;所有切片在室温下用DAB显色液50 μl处理约5 min,再次用PBS洗涤后,用苏木精进行复染色;最后脱水处理,封片。

**1.3 结果判定** 每张切片以细胞染色强度及染色比例作为评分标准,并由至少两名病理学领域专家进行评分,评判结果一致则接受,否则重新判片。XPNPEP2蛋白主要在细胞质中阳性表达,表现为棕黄色颗粒染色。随机选取5个高倍镜下视野,综合染色强度和阳性细胞比例进行综合判定<sup>[11]</sup>。(1)染色强度评分标准:无染色为0分,弱染色(浅黄色)为1分,中等染色(棕黄色)为2分,强染色(棕褐色)为3分。(2)阳性细胞比例评分标准:阳性细胞<5%为0分,≥5%且≤25%为1分,>25%且≤50%为2分,>50%且≤75%为3分,>75%为4分。最后以染色强度评分和阳性比例评分的乘积进行综合评价,分数介于0~12分,0~2分则判定为阴性(-),>2分判定为阳性(+)

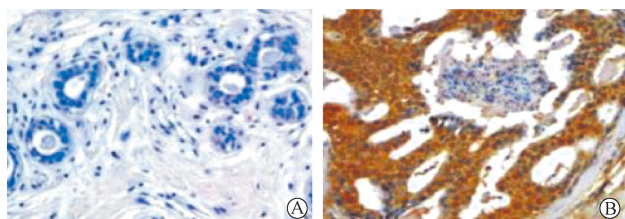
**1.4 患者随访** 手术治疗后对所有病例采取跟踪随访,随访形式包括电话和门诊复查,患者术后结束日期开始计时,当患者出现复发或死亡时则结束随访。末次随访日期为2020年6月30日,随访时间4~60个月。最终失访5例(5.38%),实际纳入分析的病例为88例。

**1.5 统计学方法** 使用SPSS 25.0软件进行统计分析。计数资料采用例(%)表示,应用 $\chi^2$ 检验进行分析;5年生存率采用直接计算法;用COX风险回归分析影响乳腺癌患者预后的危险因素。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 XPNPEP2蛋白的表达** XPNPEP2在乳腺癌组织及癌旁组织中均有表达,如图1所示。乳腺癌组织中共64例出现XPNPEP2表达,阳性表达率为72.73%(64/88);而癌旁组织中有23例阳性表达,阳性表达率为26.14%(23/88),差异有统计学意义( $\chi^2=38.209, P<0.01$ )。

2.2 乳腺癌组织中 XPNPEP2 的表达与病理参数的关系 在乳腺癌组织中, XPNPEP2 的阳性表达在不同肿瘤分化程度、有无淋巴结转移及不同 TNM 分期患者间差异均有统计学意义( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 而在不同年龄、肿瘤大小、孕激素受体(PR)状态、雌激素受体(ER)状态及人表皮生长因子受体-2(HER2)状态间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 1。



注:A 为乳腺癌组织;B 为癌旁组织。

图 1 XPNPEP2 蛋白表达的病理图(免疫组化,  $\times 200$ )

表 1 乳腺癌组织中 XPNPEP2 表达与病理参数的关系 [例(%)]

参数	例数	XPNPEP2 表达		$\chi^2$ 值	P 值
		阳性(n=64)	阴性(n=24)		
年龄					
<60 岁	56	41 (73.21)	15 (26.79)	0.018	0.892
$\geq 60$ 岁	32	23 (71.88)	9 (28.12)		
肿瘤大小				0.191	0.662
<2 cm	40	30 (75.00)	10 (25.00)		
$\geq 2$ cm	48	34 (70.83)	14 (29.17)		
肿瘤分化程度				4.107	0.043
高、中分化	63	42 (66.67)	21 (33.33)		
低分化	25	22 (88.00)	3 (12.00)		
淋巴结转移				8.069	0.005
是	40	35 (87.50)	5 (12.50)		
否	48	29 (60.42)	19 (39.58)		
TNM 分期				6.249	0.012
I、II 期	59	38 (64.41)	21 (35.59)		
III、IV 期	29	26 (89.66)	3 (10.34)		
PR 状态				0.008	0.927
阴性	58	42 (72.41)	16 (27.59)		
阳性	30	22 (73.33)	8 (26.67)		
ER 状态				0.432	0.511
阴性	39	27 (69.23)	12 (30.77)		
阳性	49	37 (75.51)	12 (24.49)		
HER2 状态				0.306	0.580
阴性	66	49 (74.24)	17 (25.76)		
阳性	22	15 (68.18)	7 (31.82)		

2.3 XPNPEP2 表达对乳腺癌患者预后的影响 XPNPEP2 阳性表达乳腺癌患者 5 年死亡 41 例, 总生存率为 35.94% (23/64), 阴性表达患者 5 年死亡 5 例, 总生存率为 79.17% (19/24)。XPNPEP2 阳性表达患者预后明显更差( $\chi^2 = 13.074, P < 0.01$ )。

2.4 COX 比例风险回归分析 以乳腺癌患者生存预后情况(死亡=1, 存活=0)为因变量, 以可能影响乳

腺癌预后的病理因素为自变量(变量赋值见表 2), 作 COX 比例风险回归分析, 结果显示, XPNPEP2 高表达、肿瘤分化程度低、有淋巴结转移及 TNM 分期高均是影响乳腺癌患者生存预后的独立危险因素( $P < 0.05$ )。见表 3。

表 2 变量赋值

变量	变量赋值	变量	变量赋值
年龄	<60 岁=0, $\geq 60$ 岁=1	PR 状态	阴性=0, 阳性=1
肿瘤大小	<2 cm=0, $\geq 2$ cm=1	ER 状态	阴性=0, 阳性=1
肿瘤分化程度	高、中分化=0, 低分化=1	HER2 状态	阴性=0, 阳性=1
淋巴结转移	否=0, 是=1	XPNPEP2 表达	阴性=0, 阳性=1
TNM 分期	I、II 期=0, III、IV 期=1		

表 3 COX 比例风险回归分析

自变量	$\beta$	S.E.	Wald	P 值	HR	95%CI
XPNPEP2 表达	1.25	0.42	8.868	0.003	3.476	1.531~7.892
肿瘤分化程度	1.07	0.39	7.547	0.006	2.903	1.357~6.210
淋巴结转移	1.23	0.55	5.027	0.025	3.415	1.167~9.992
TNM 分期	1.02	0.46	4.916	0.027	2.767	1.125~6.803

### 3 讨论

XPNPEP2 是由位于染色体 Xq25.2 上的人类 XPNPEP2 基因编码的生物活性肽, 是一种膜结合的金属蛋白水解酶, 以脯氨酸为特异识别位点, 可从肽的 N 末端去除倒数第二个脯氨酰残基, 切割多肽或氨基酸, 可能导致后者失去活性<sup>[12]</sup>。XPNPEP2 可以用激素、生长因子、神经递质、凝固剂、毒素和细胞因子等作为潜在底物, 广泛分布于淋巴细胞、血管内皮细胞、肠和肾小管等多种组织中<sup>[13]</sup>。重要的是, XPNPEP2 在缓激肽产生过程中与激肽释放酶协同作用, 人激肽释放酶 3(hK3), 能够通过其激肽原酶活性产生激肽, 变异的 XPNPEP2 和激肽释放酶-激肽系统的异常都与缓激肽介导的血管水肿有关; 目前报道大多关注其在心血管疾病方面的应用, 认为 XPNPEP2 可影响血管紧张素转换酶抑制剂引起的血管性水肿副作用的发生率<sup>[14]</sup>。但 XPNPEP2 在肿瘤中的生理作用和临床意义研究较少, 尤其缺乏在乳腺癌方面的报道。本研究检测到 XPNPEP2 在乳腺癌组织和癌旁组织中均可见表达, 其在乳腺癌组织中阳性表达率为 72.73%, 显著高于癌旁组织中的 26.14%, 提示 XPNPEP2 的阳性表达与乳腺癌发展可能存在一定联系。

前期研究可知, XPNPEP2 可通过 snail 介导上皮间质转化(EMT) 的发生从而促使宫颈癌、胃癌发生侵袭和转移<sup>[8]</sup>; 曾瑶等<sup>[15]</sup>研究发现, XPNPEP2 的异常表达与结直肠癌 TNM 分期、肿瘤浸润深度相关; 梁

正等<sup>[9]</sup>研究认为,细胞外信号调节激酶(ERK)介导的信号通路对结直肠癌的转移过程具有重要作用,XPNPEP2异常表达可激活ERK信号通路,进而加快其肿瘤细胞转移,而Li等<sup>[14]</sup>开展的针对前列腺癌的研究也得到类似的结果。乳腺癌预后与患者的临床病理特征存在密切联系,其癌症分期、病理类型、分化程度等都是重要的预后指标,但尽管与乳腺癌预后有关的生物标志物研究较多,大多仍处于研究阶段,仍需寻找适用性更广、与其病理特征密切相关的新型标志物<sup>[16-17]</sup>。本研究发现,在乳腺癌组织中,XPNPEP2的阳性表达与乳腺癌的分化程度、淋巴结发生转移和TNM分期显著相关,而这3个参数是肿瘤最常用的预后指标,提示XPNPEP2的阳性表达可能影响乳腺癌预后。

XPNPEP2蛋白在乳腺癌进展过程中如何发挥作用,目前尚未见相关报道,推测与Snail及ERK信号通路存在联系。Snail是目前乳腺癌转移和复发相关研究的关键调控因子<sup>[18]</sup>,可调控多种蛋白表达导致癌症组织上皮细胞间质化并导致肿瘤发生转移,故XPNPEP2也有可能通过Snail介导EMT从而促使乳腺癌发生侵袭和转移。另外,已有研究表明ERK在乳腺癌、肠癌、肝癌以及宫颈癌等多种肿瘤组织中异常表达,其参与的信号通路与炎症、肿瘤等疾病有关<sup>[19]</sup>。李娟等<sup>[20]</sup>认为EMT是促使肿瘤转移的重要因素,而过度激活的ERK通路可促进EMT进展,其通过U0126抑制剂阻断长链非编码RNA(lncRNA)GAS5对ERK信号通路的抑制作用,亦间接说明ERK与乳腺癌进展的关系。而XPNPEP2通过表达可能导致乳腺癌的ERK信号通路激活,进而发生EMT,最终影响乳腺癌预后。本研究生存分析显示,XPNPEP2阳性表达乳腺癌患者的5年生存率为35.94%,显著低于阴性表达患者的79.17%;COX回归分析可知除肿瘤低分化、有淋巴结转移及TNM分期高外,XPNPEP2阳性表达也是影响乳腺癌患者预后的危险因素,再次验证乳腺癌组织中XPNPEP2阳性表达会影响患者预后的推断。

综上所述,乳腺癌患者XPNPEP2的阳性表达与其多种临床病理参数以及预后不良相关,有望作为评估乳腺癌预后的潜在标志物。但乳腺癌发病机理复杂,XPNPEP2在乳腺癌进展中作用研究过少,有待更加深入的研究对其作用机制予以证实。

#### 参考文献

[1] 何洋,赵伟鹏.新辅助化疗对乳腺癌ER PR HER-2及Ki-67表达

影响的研究进展[J].中国肿瘤临床,2020,17(22):1185-1188.

- [2] DeVaux RS, Herschkowitz JI. Beyond DNA: the role of epigenetics in the premalignant progression of breast cancer[J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2018, 23(4): 223-235.
- [3] 张雪,董晓平,管雅喆,等.女性乳腺癌流行病学趋势及危险因素研究进展[J].肿瘤防治研究,2021,48(1):87-92.
- [4] 周薇,张志将,毕勇毅,等.中国女性1987—2014年乳腺癌死亡趋势的joinpoint回归分析[J].中南大学学报(医学版),2018,43(2):210-215.
- [5] 闫贻忠,王新宇,陈瑜,等.2010—2017年新疆石河子市女性乳腺癌流行趋势分析[J].中国肿瘤,2019,28(9):689-693.
- [6] Huang TT, Pennarun N, Cheng YH, et al. Gene expression profiling in prognosis of distant recurrence in HR-positive and HER2-negative breast cancer patients[J]. Oncotarget, 2018, 9(33): 23173-23182.
- [7] Shiao J, Thomas KM, Rahimi AS, et al. Aspirin/antiplatelet agent use improves disease-free survival and reduces the risk of distant metastases in Stage II and III triple-negative breast cancer patients[J]. Breast Cancer Res Treat, 2017, 161(3): 463-471.
- [8] 王伟,周颖,蒋桂英,等.XPNPEP2在胃癌组织中的表达及其临床意义[J].实用医学杂志,2019,35(9):1393-1396.
- [9] 梁正,李天伦,喻福华,等.结直肠癌组织ULK1、XPNPEP2、RABEX-5表达与临床病理特征及预后的相关性[J].中国生物工程学,2020,19(5):748-751.
- [10] 薛卫成.介绍乳腺癌TNM分期系统(第7版)[J].诊断病理学杂志,2010,17(4):241-244.
- [11] 赵东丽,梁宪斌,王艳,等.Prosporo相关同源异形盒蛋白1在乳腺癌组织中的表达及与预后相关性分析[J].中国癌症杂志,2019,29(4):272-276.
- [12] Simmons WH. Aminopeptidase P2[M]//Handbook of Proteolytic Enzymes. Amsterdam: Elsevier, 2013: 1528-1532.
- [13] Cheng T, Wei R, Jiang GY, et al. XPNPEP2 is overexpressed in cervical cancer and promotes cervical cancer metastasis[J]. Tumour Biol, 2017, 39(7): 1010428317717122.
- [14] Li F, Dai Y, Xu H, et al. XPNPEP2 is associated with lymph node metastasis in prostate cancer patients[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 10078.
- [15] 曾瑶,徐惠丽,王梦漪,等.氨肽酶P2在结直肠癌组织中的表达及其与临床病理特征和预后的关系[J].实用医学杂志,2020,36(2):210-215.
- [16] 熊荣国,田野,田振.乳腺癌预后分子生物标志物的研究进展[J].现代肿瘤医学,2018,26(19):3150-3154.
- [17] 翟婧彤,马飞.乳腺癌免疫治疗及免疫生物标志物研究进展[J].癌症进展,2020,18(19):1965-1968,1992.
- [18] 刘平贤,张浩,李伟汉.乳腺癌组织中Snail、Bcl-2的表达水平及其临床意义[J].中国现代医学杂志,2018,28(23):36-41.
- [19] 刘芳,赵川,陈彻,等.细胞外信号调节激酶与肿瘤的关系及其抑制剂的研究进展[J].肿瘤药学,2019,9(2):184-188.
- [20] 李娟,高青山,牟成金,等.lncRNA GAS5通过抑制MAPK/ERK信号通路阻断乳腺癌细胞的上皮-间质转化过程[J].中国免疫学杂志,2020,36(11):1343-1348.

收稿日期:2021-03-01 修回日期:2021-05-01 编辑:石嘉莹