

研究论文

下调骨肉瘤细胞CD13表达对肿瘤血管生成的作用及机制

陈倩竹¹ 马 磊¹ 蒋师放¹ 黄 伟² 李龙江^{1*}⁽¹重庆医科大学病理生理学教研室, 干细胞与组织工程研究室, 重庆 400016;²重庆医科大学附属第一医院骨科, 重庆 400016)

摘要 白细胞分化抗原13(cluster of differentiation 13, CD13)不仅能促进肿瘤细胞恶性发展, 而且有助于肿瘤血管的生成。该研究下调骨肉瘤细胞(MG63)CD13表达, 通过ELISA和Western blot观察骨肉瘤中CD13的表达对白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)释放和血管内皮细胞(vascular endothelial cell, HUVEC)中信号转导和转录激活子3酪氨酸705位点(signal transducer and activator of transcription^{Tyr705}, STAT3^{Tyr705})磷酸化水平的影响。同时, 检测MG63中CD13对HUVEC迁移、侵袭和血管管腔形成能力的调控作用和机制。结果显示, 下调MG63中CD13表达可抑制IL-6释放, 降低HUVEC中STAT3^{Tyr705}磷酸化水平, 并抑制其迁移、侵袭和血管形成能力。而外源性IL-6能抵消下调MG63中CD13后对HUVEC的上述作用。因此, 抑制骨肉瘤中CD13-IL-6-STAT3信号通路将阻止肿瘤血管形成, 可成为骨肉瘤治疗的新靶点。

关键词 骨肉瘤; CD13; 白细胞介素-6; 信号转导和转录激活因子3; 血管生成

The Impact and Mechanism of Downregulation of CD13 in Osteosarcoma on Tumor Angiogenesis

Chen Qianzhu¹, Ma Lei¹, Jiang Shifang, Huang Wei², Li Longjiang^{1*}

⁽¹Department of Pathophysiology, Laboratory of Stem Cell and Tissue Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; ²Department of Orthopaedics, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract Cluster of differentiation 13 (CD13) is able to accelerate the progression of tumor cells and promote tumor angiogenesis. In the present work, the expression of CD13 in osteosarcoma cell MG63 was reduced in order to investigate the interleukin-6 (IL-6) level released from MG63 and phosphorylation level of signal transducer and activator of transcription^{Tyr705} (STAT3^{Tyr705}) in vascular endothelial cells (HUVEC) by ELISA and Western blot. Moreover, the effects and mechanisms of CD13 expressed in MG63 on HUVEC migration, invasion, vascular lumen formation were also investigated. The results showed that downregulation of CD13 in osteosarcoma MG63 could inhibit IL-6 release and decrease the phosphorylation of STAT3^{Tyr705} in HUVEC, contributing to reducing HUVEC migration, invasion and angiogenesis. The exogenous IL-6 neutralized above effects involved in downregulated CD13 in MG63 cells. Inhibition of CD13-IL-6-STAT3 signaling pathway could impede tumor angiogenesis and became novel target for therapy of osteosarcoma.

Keywords osteosarcoma; CD13; interleukin-6; signal transducer and activator of transcription 3; angiogenesis

收稿日期: 2016-11-05 接受日期: 2017-03-14

*通讯作者。Tel: 023-68485626, Email: lljly2003@163.com

Received: November 5, 2016 Accepted: March 14, 2017

*Corresponding author. Tel: +86-23-68485626, E-mail: lljly2003@163.com

网络出版时间: 2017-04-20 16:56:47

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170420.1656.004.html>

骨肉瘤是最常见的骨原发恶性肿瘤,在儿童和青少年中发病率为5.6/1 000 000^[1],该疾病主要起源于股骨、胫骨、桡骨等长骨^[2]。虽然手术切除和放化疗等综合性治疗不断发展和成熟,但20%~25%的患者在确诊前已有局部浸润或远处转移^[3],导致骨肉瘤预后差,5年生存率不足70%^[4]。白细胞分化抗原13(cluster of differentiation 13, CD13)又名氨肽酶N(aminopeptidase N, APN),是一种分子量约为150 kDa的跨膜糖蛋白,参与了肿瘤的生长、转移和血管形成^[5]。有数据表明,CD13可促进骨肉瘤细胞的迁移和侵袭^[6],也有研究证实血管内皮细胞中CD13可促进其自身的血管发生^[7]。然而,关于肿瘤细胞中CD13表达是否有助于肿瘤血管生成却未见报道。本研究将通过下调骨肉瘤CD13表达,观察其对血管内皮细胞增殖、迁移、侵袭和血管形成的影响,以阐明肿瘤细胞利用CD13对细胞因子释放的调控和促进肿瘤血管生成的分子机制。

1 材料与方法

1.1 试剂

胎牛血清、DMEM高糖培养基和青/链霉素均购自美国Gibco公司;RNA裂解液、RNA逆转录试剂盒、引物合成和DNA聚合酶购于日本TaKaRa公司;CD13、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、STAT3^{Tyr705}(signal transducer and activator of transcription^{Tyr705})和Total-STAT3一抗购自美国Abcam公司;IL-6(interleukin-6)和重组人IL-6 ELISA试剂盒购于美国Sigma公司;RIPA蛋白质裂解液、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、Western blot配胶试剂盒和ECL发光液购自上海碧云天生物技术有限公司;基质胶购于美国Sigma公司。

1.2 细胞培养

人骨肉瘤细胞MG63和血管内皮细胞(vascular endothelial cell, HUVEC)购于中国科学院上海生命科学研究院细胞库,2种细胞均培养于含有10% FBS和1%青/链霉素的DMEM高糖培养基中。进行HUVEC诱导培养时,将培养48 h的MG63培养基与新鲜完全培养基按1:1混合作为条件培养基。

1.3 质粒转染

shRNA-CD13和shRNA-IL-6病毒购买于上海吉凯基因生物有限公司。转染72 h后用2 μ g/mL嘌呤霉素筛选,2周后建立稳定克隆株,荧光倒置显微镜

下观察绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)表达。Real-time PCR和Western blot检测病毒下调骨肉瘤中目标分子表达的能力。

1.4 Real-time PCR

Trizol法提取MG63细胞总RNA,测得浓度后将其逆转录为cDNA。CD13扩增引物为Forward: 5'-CGG TGG TGA GGA AGA GTG GAA-3', Reverse: 5'-CCA A GG CTG AGC GGA GTT TAT-3'; GAPDH扩增引物为Forward: 5'-CAG AAG TAT CCT GTG CGG GTG A-3', Reverse: 5'-CAT TTT CAA GCC GCT CAT CC-3'。采用SYBR[®] Green法进行扩增,反应条件为:95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 40 s, 40个循环。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法表示与空白对照相比,阴性病毒组和CD13下调组中转录水平相对变化。

1.5 Western blot

RIPA裂解液提取细胞总蛋白,BCA法测定蛋白质浓度。按照每孔40 μ g蛋白质总量进行电泳,经转膜和5% BSA封闭1 h后4 $^{\circ}$ C孵育一抗过夜,一抗浓度为:CD13(1:200)、GAPDH(1:800)、Total-STAT3(1:500)、STAT3^{Tyr705}(1:200)。次日在37 $^{\circ}$ C条件下孵育相应二抗(1:5 000)1 h后,使用ECL发光。Quantity One 4.6软件分析各条带光密度值。

1.6 ELISA

收集培养MG63 48 h后对照组(control)、阴性病毒组(negative control, NC)和CD13下调组(shRNA-CD13)的培养基,4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min离心10 min,收集各组上清液,按照IL-6 ELISA试剂盒的方法测量各组培养基中IL-6含量。

1.7 MTT

收集培养MG63 48 h后control组、NC组、shRNA-CD13组培养基,按1:1比例加入新鲜培养基,分别作为HUVEC诱导培养基1、2和3。另取诱导培养基3并加入人重组IL-6蛋白200 μ g/mL,作为诱导培养基4,4种诱导培养基分别标记为1组、2组、3组、4组。HUVEC中只加入新鲜培养基的作为空白组(blank组)。将HUVEC按5 000/孔接种于96孔板中,分别给予新鲜培养基和各种条件培养基处理细胞24、48、72、96 h。PBS清洗各组细胞后分别加入200 μ L培养基+20 μ L MTT液,继续孵育4 h,紫外分光光度计测得各组在570 nm波长中的吸光度(D)值。

1.8 划痕实验

将HUVEC种于6孔板,每孔 2×10^4 细胞。用各种条件培养基诱导24 h后于倒置显微镜200 $\times$ 视野下观

察细胞迁移能力。IPP6.0软件计算出迁移距离。

1.9 Transwell小室实验

使用孔径为8 μm Transwell小室进行HUVEC迁移和侵袭研究。用50 μL 5 mg/mL的纤连蛋白包被小室外侧, 待其干燥1 h后用PBS清洗。行侵袭实验时小室内侧需包被100 μL 5 mg/mL的基质胶。用各种诱导条件处理HUVEC细胞48 h后, 将各组细胞均匀种入小室内侧(迁移实验每孔 4×10^4 , 侵袭实验每孔 1×10^5), 上室为各种条件培养基, 下室均为新鲜完全培养基。24 h后刮除内室细胞, 4%多聚甲醛固定小室外侧细胞30 min。经结晶紫染色20 min后, 观察各组穿过Transwell小室的细胞数。随机选取5个视野, 计算平均值, Image J软件计算细胞个数。

1.10 血管生成实验

于48孔板中包被5 mg/mL基质胶, 将各组HUVEC细胞按每孔 5×10^3 均匀种在基质胶上, 6 h后在100 $\times$ 视野下每孔随机选择3个视野观察血管管状形态发生, 计算出每个视野血管管腔结构数量。

1.11 统计学分析

使用SPSS 20.0进行统计学分析, 各组间采用方

差分析, 所有数据用均数 $\pm$ 标准差表示, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

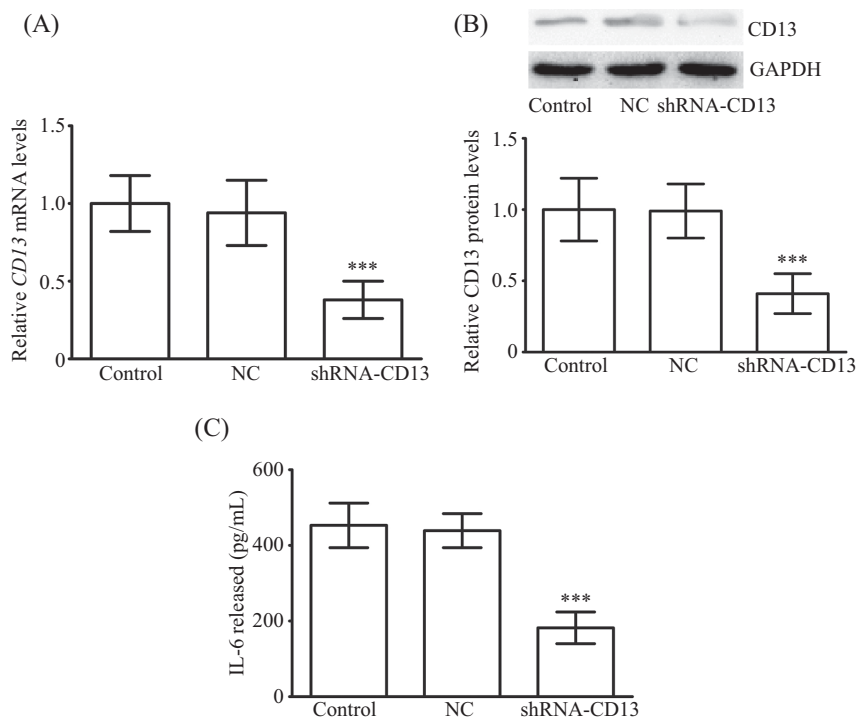
2 结果

2.1 下调骨肉瘤MG63中CD13表达抑制IL-6释放

将骨肉瘤MG63分为control组、NC组和shRNA-CD13组。慢病毒稳定转染并用嘌呤霉素筛选克隆株后, Real-time PCR和Western blot结果发现, CD13 mRNA和蛋白质水平在shRNA-CD13组中均明显减少(图1A和图1B)。培养48 h后, 收集各组细胞培养基, ELISA证实shRNA-CD13组中IL-6水平明显低于Control组和NC组(图1C)。该结果说明, 下调CD13能抑制骨肉瘤MG63释放IL-6。

2.2 下调骨肉瘤CD13通过降低IL-6释放抑制HUVEC细胞STAT3磷酸化激活

Western blot检测发现, 条件培养基2较新鲜完全培养基能使HUVEC中STAT3^{Tyr705}磷酸化水平增加, 但下调骨肉瘤MG63中CD13可降低HUVEC中STAT3^{Tyr705}磷酸化水平。当加入人重组IL-6后, STAT3^{Tyr705}的磷酸化水平又上升(图2A)。当下调骨



A: Real-time PCR检测control组、NC组和shRNA-CD13组中CD13 mRNA变化($n=5$); B: Western blot观察3组中CD13蛋白质水平差异($n=3$); C: ELISA分析下调骨肉瘤MG63中CD13对释放IL-6的影响($n=9$)。*** $P < 0.001$, 与control组和NC组相比。

A: Real-time PCR to test CD13 mRNA levels in Control, NC and shRNA-CD13 groups ($n=5$); B: Western blot was used to observe CD13 protein levels in there groups ($n=3$); C: the effect of IL-6 release after downregulation of CD13 expression in osteosarcoma MG63 by ELISA ($n=9$). *** $P < 0.001$ vs control and NC groups.

图1 下调骨肉瘤MG63中CD13的表达及对IL-6释放的影响

Fig.1 The downregulation of CD13 expression in osteosarcoma MG63 and the effect of IL-6 release

肉瘤MG63中IL-6(shRNA-IL-6)表达后,也将抑制STAT3^{Tyr705}磷酸化位点激活(图2B)。该研究说明,下调骨肉瘤MG63中CD13表达将通过抑制IL-6释放降低HUVEC中STAT3^{Tyr705}磷酸化水平。

2.3 下调骨肉瘤MG63中CD13抑制HUVEC迁移和侵袭

MTT结果发现,条件培养基1、2、3、4诱导HUVEC 24、48、72、96 h后,并未引起HUVEC活力的明显变化(图3A)。但划痕实验和Transwell小室实验证实,条件培养基1诱导24 h后, HUVEC迁移和侵袭能力明显增加。与条件培养基1相比,条件培养基3使HUVEC的迁移和侵袭能力明显减弱。而当加入人重组IL-6后(条件培养基4), HUVEC迁移和侵袭能力较条件培养基3相比增加(图3B~图3D)。因此,下调骨肉瘤中CD13可抑制IL-6释放,降低HUVEC的迁移和侵袭能力。

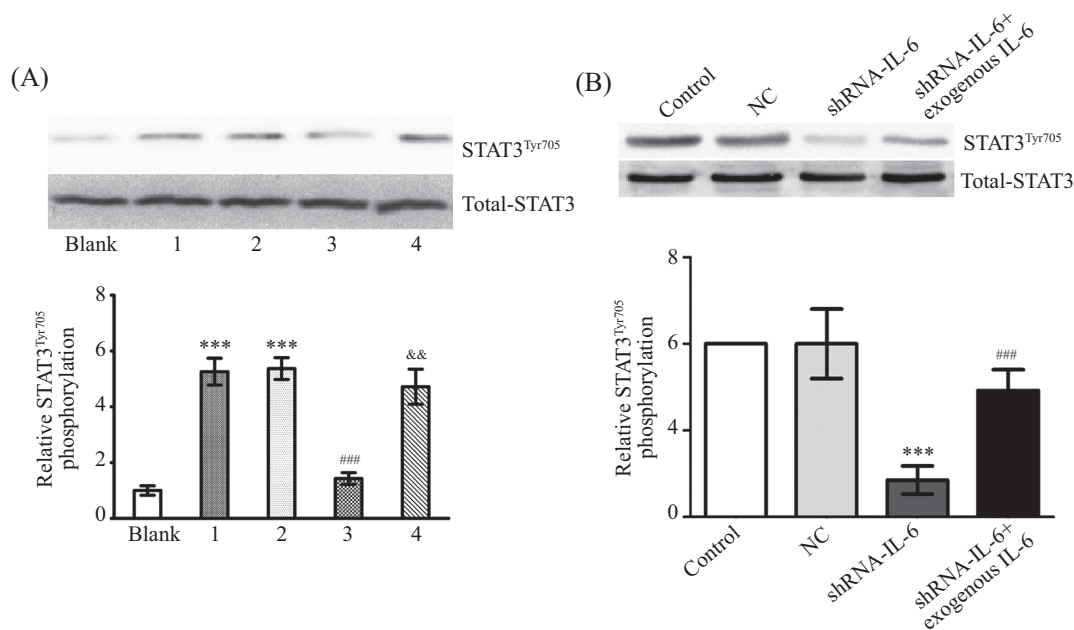
2.4 下调骨肉瘤MG63中CD13抑制HUVEC血管发生

在基质胶上分别培养blank组和诱导组1组、2组、3组、4组的HUVEC细胞6 h后发现,骨肉瘤MG63

培养基能促进血管管腔结构形成,而降低MG63中CD13表达后所诱导的HUVEC血管发生明显减弱。值得注意的是,当加入IL-6后能有效促进血管形成能力(图4)。因此,下调骨肉瘤MG63中CD13表达可通过减少IL-6释放而抑制血管内皮细胞HUVEC的血管形态发生。

3 讨论

人CD13基因定位于染色体15q25-26,全长35 Kb,包括20个外显子。已有文献证实,CD13在肺癌、胃肠道肿瘤、乳腺癌、胰腺癌、甲状腺癌、肝癌、白血病等恶性肿瘤中表达升高,导致患者5年生存率明显降低^[7-9]。CD13主要参与了肿瘤迁移、侵袭、耐药和新生血管形成^[10-12]。Yamashita等^[13]发现,CD13不仅可作为肝癌干细胞的标志物,而且与肝癌化疗耐药密切相关,当抑制肝癌干细胞中CD13后可增加细胞内活性氧含量以提高其对氟尿嘧啶、顺铂和多柔比星的敏感性。此外,下调CD13能通过促进磷脂酰丝氨酸外翻和DNA断裂,加强半胱天冬酶-3(caspase-3)和聚腺苷二磷酸-核糖聚合酶(poly

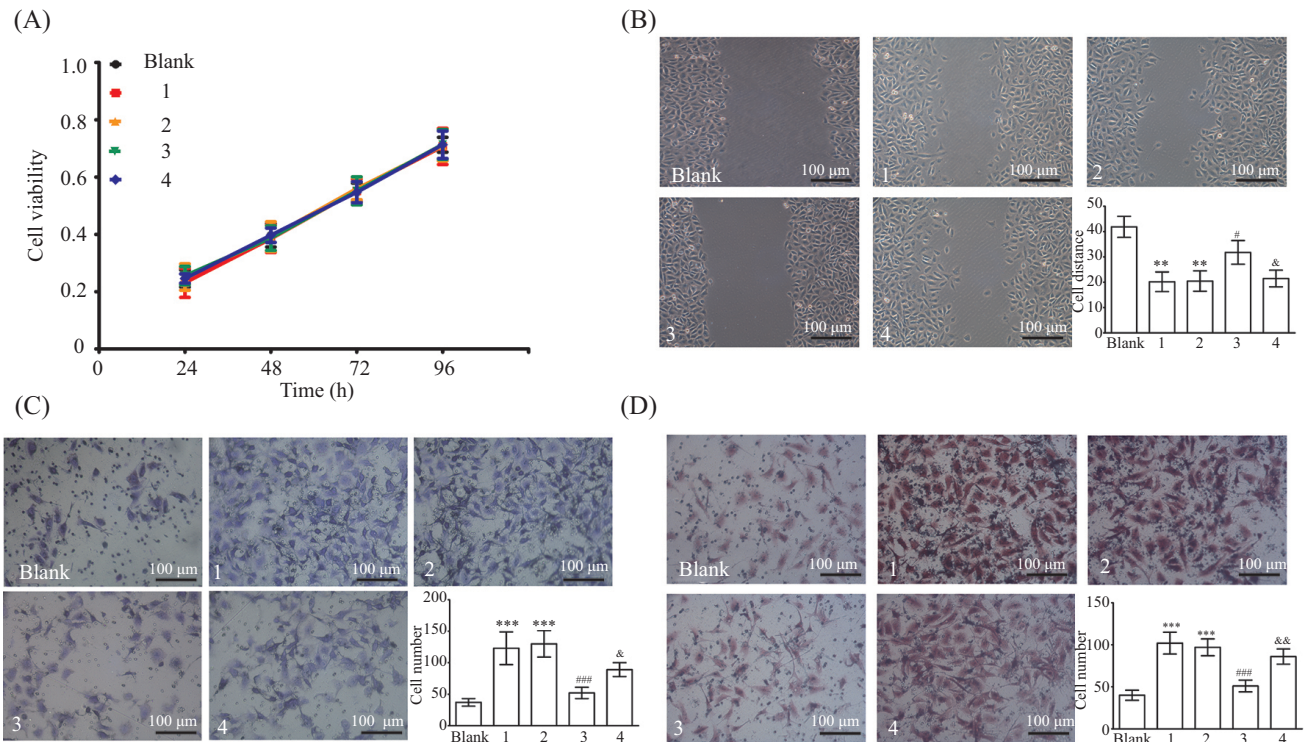


A: 各组HUVEC中STAT3^{Tyr705}磷酸化水平变化。n=3, ***P<0.001, 与blank组比较; ###P<0.001, 与1组和2组比较; &&P<0.01, 与3组比较。B: 下调骨肉瘤MG63中IL-6表达对HUVEC STAT3^{Tyr705}磷酸化水平的影响。n=3, ***P<0.001, 与control组比较; ###P<0.001, 与shRNA-IL-6+外源性IL-6组比较。

A: the phosphorylation levels of STAT3^{Tyr705} in each HUVEC groups. n=3, ***P<0.001 vs blank group; ###P<0.001 vs group 1 and 2; &&P<0.01 vs group 3. B: the effects of downregulation of IL-6 in MG63 on phosphorylation levels of STAT3^{Tyr705} in HUVEC. n=3, ***P<0.001 vs control group; ###P<0.001 vs shRNA-IL-6+exogenous IL-6 group.

图2 下调骨肉瘤中CD13通过抑制IL-6释放降低HUVEC中STAT3^{Tyr705}磷酸化水平

Fig.2 Downregulation of CD13 in osteosarcoma MG63 inhibits IL-6 release then decreases the phosphorylation level of STAT3^{Tyr705} in HUVEC



A: 新鲜培养基和各种诱导培养基对HUVEC细胞活力的影响; B: 划痕实验分析各组诱导条件下24 h后对HUVEC迁移能力的影响; C、D: Transwell小室观察各种诱导条件24 h对HUVEC迁移和侵袭的影响。 $n=5$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与空白组比较; # $P<0.05$, ### $P<0.001$, 与1组和2组比较; & $P<0.05$, && $P<0.01$, 与3组比较。

A: the effect of fresh medium and various conditioned media on HUVEC viability; B: scratch test was used to analyze the effect of various conditioned media on HUVEC migration after 24 h; C,D: Transwell chamber was used to observe the effect of various conditioned media on HUVEC migration and invasion after 24 h; $n=5$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs Blank group; # $P<0.05$, ### $P<0.001$ vs group 1 and 2; & $P<0.05$, && $P<0.01$ vs group 3.

图3 下调骨肉瘤MG63中CD13表达对HUVEC迁移和侵袭的影响

Fig.3 The effects of downregulation of CD13 in osteosarcoma MG63 on HUVEC migration and invasion

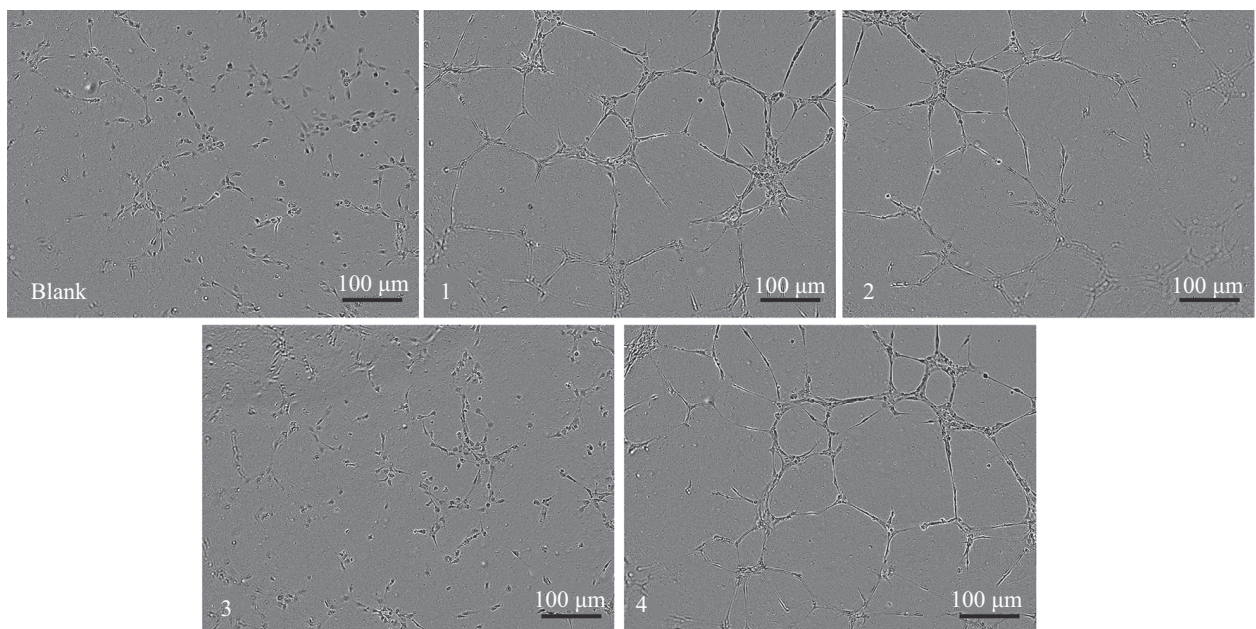


图4 下调骨肉瘤MG63中CD13通过减少IL-6释放抑制HUVEC血管形成

Fig.4 Downregulation of CD13 in osteosarcoma MG63 inhibits HUVEC angiogenesis via reducing IL-6 release

ADP ribose polymerase, PARP)活性来抑制卵巢癌体内外生长和侵袭^[14]。Graziadio等^[15]利用CD13特异性配体天冬氨酸-甘氨酸-精氨酸(aspartic acid-glycin-arginine, NGR)使药物靶向CD13阳性肿瘤细胞,在很大程度上延长了肿瘤患者生存时间,并显著提高了5年生存率^[15]。因此,CD13在肿瘤的恶性发展中至关重要,下调该基因在肿瘤中的表达将成为基因治疗的新策略。

已有研究发现,CD13可作为肿瘤血管新生的标志物^[16],但大部分关于CD13促进血管生成机制的报道仅涉及到血管内皮细胞自身表达CD13后所引起的生物学效应。例如,Fukasawa等^[17]发现,下调血管内皮细胞中CD13可抑制其迁移、黏附和血管管腔形成的能力。目前,关于肿瘤细胞中CD13表达是否有助于血管发生鲜有报道。本研究发现,下调骨肉瘤中CD13表达可抑制血管内皮细胞迁移、降解细胞外基质和血管管腔形成能力。Liang等^[6]也发现,下调骨肉瘤细胞中CD13可减少丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、磷脂酰肌醇3激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)和核转录因子-kappaB(nuclear transcription factor-kappa B, NF-κB)信号分子磷酸化水平以及基质金属蛋白酶2/9(matrix metalloproteinase 2/9, MMP 2/9)的活性,降低骨肉瘤细胞的侵袭。因此,骨肉瘤中CD13不仅有助于自身的恶性生长,还能够促进肿瘤血管发生。

许多临床研究发现,活体肿瘤标本中免疫细胞、基质细胞和肿瘤细胞能够释放大量的IL-6,该炎症因子在肿瘤微环境或循环中含量越高,患者预后越差^[18]。IL-6可通过自分泌和旁分泌形式与细胞膜上IL-6受体(interleukin-6 receptor, IL-6R)结合,引起原癌蛋白STAT3磷酸化激活而同二聚化,使其发生核转位并与靶基因启动子序列结合,参与基因转录调控^[19-20]。有学者证实,骨肉瘤患者血清IL-6水平明显上调,而IL-6可与骨肉瘤细胞表面IL-6R结合,通过激活STAT3加速肿瘤发展^[21]。本研究发现,骨肉瘤中CD13还可促进IL-6的释放,并通过旁分泌机制使血管内皮细胞中STAT3磷酸化激活,有助于肿瘤血管的形成。

总之,靶向CD13-IL-6-STAT3信号通路有望实现对骨肉瘤的分子治疗。目前已开发出针对该信号通路各环节的药物,例如CD13抑制剂乌苯美司^[22]、IL-6-IL-6R拮抗剂托珠单抗^[23]、STAT3失活剂高三

尖杉酯碱^[24]等。这些药物部分已进入临床研究,有的甚至在临床中广泛使用,并有效发挥抗肿瘤的作用。因此,后续研究将探讨各种药物通过失活CD13-IL-6-STAT3信号通路抑制骨肉瘤生长和血管形成的作用机制,为骨肉瘤靶向治疗提供理论依据和实验基础。

参考文献 (References)

- 1 Niu G, Li B, Sun J, Sun L. miR-454 is down-regulated in osteosarcomas and suppresses cell proliferation and invasion by directly targeting c-Met. *Cell Prolif* 2015; 48(3): 348-55.
- 2 Shaikh AB, Li F, Li M, He B, He X, Chen G, *et al.* Present advances and future perspectives of molecular targeted therapy for osteosarcoma. *Int J Mol Sci* 2016; 17(4): 506.
- 3 Pu Y, Yi Q, Zhao F, Wang H, Cai W, Cai S. MiR-20a-5p represses multi-drug resistance in osteosarcoma by targeting the KIF26B gene. *Cancer Cell Int* 2016; 16: 64.
- 4 Carrle D, Bielack S. Osteosarcoma lung metastases detection and principles of multimodal therapy. *Cancer Treat Res* 2009; 152: 165-84.
- 5 Dondossola E, Rangel R, Guzman-Rojas L, Barbu EM, Hosoya H, St John LS, *et al.* CD13-positive bone marrow-derived myeloid cells promote angiogenesis, tumor growth, and metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(51): 20717-22.
- 6 Liang W, Gao B, Xu G, Weng D, Xie M, Qian Y. Possible contribution of aminopeptidase N (APN/CD13) to migration and invasion of human osteosarcoma cell lines. *Int J Oncol* 2014; 45(6): 2475-85.
- 7 Zhang Q, Wang J, Zhang H, Zhao D, Zhang Z, Zhang S. Expression and clinical significance of aminopeptidase N/CD13 in non-small cell lung cancer. *J Cancer Res Ther* 2015; 11(1): 223-8.
- 8 Craddock KJ, Chen Y, Brandwein JM, Chang H. CD13 expression is an independent adverse prognostic factor in adults with Philadelphia chromosome negative B cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 2013; 37(7): 759-64.
- 9 Wickström M, Larsson R, Nygren P, Gullbo J. Aminopeptidase N (CD13) as a target for cancer chemotherapy. *Cancer Sci* 2011; 102(3): 501-8.
- 10 Strese S, Wickström M, Fuchs PF, Fryknäs M, Gerwins P, Dale T, *et al.* The novel alkylating prodrug melflufen (J1) inhibits angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Biochem Pharmacol* 2013; 86(7): 888-95.
- 11 Sun ZP, Zhang J, Shi LH, Zhang XR, Duan Y, Xu WF, *et al.* Aminopeptidase N inhibitor 4cc synergizes antitumor effects of 5-fluorouracil on human liver cancer cells through ROS-dependent CD13 inhibition. *Biomed Pharmacother* 2015; 76: 65-72.
- 12 Krumpel M, Reithmeier A, Senge T, Baeumler TA, Frank M, Nyholm PG, *et al.* The small chemical enzyme inhibitor 5-phenylnicotinic acid/CD13 inhibits cell migration and invasion of tartrate-resistant acid phosphatase/ACP5-overexpressing MDA-MB-231 breast cancer cells. *Exp Cell Res* 2015; 339(1): 154-62.
- 13 Yamashita M, Wada H, Eguchi H, Ogawa H, Yamada D, Noda

- T, *et al.* A CD13 inhibitor, ubenimex, synergistically enhances the effects of anticancer drugs in hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2016; 49(1): 89-98.
- 14 Cui SX, Qu XJ, Gao ZH, Zhang YS, Zhang XF, Zhao CR, *et al.* Targeting aminopeptidase N (APN/CD13) with cyclic-imide peptidomimetics derivative CIP-13F inhibits the growth of human ovarian carcinoma cells. *Cancer Lett* 2010; 292(2): 153-62.
- 15 Graziadio A, Zanda M, Frau S, Fleming IN, Musolino M, Dall'Angelo S, *et al.* NGR tumor-homing peptides: Structural requirements for effective APN (CD13) targeting. *Bioconjug Chem* 2016; 27(5): 1332-40.
- 16 Di Matteo P, Arrigoni GL, Alberici L, Corti A, Gallo-Stampino C, Traversari C, *et al.* Enhanced expression of CD13 in vessels of inflammatory and neoplastic tissues. *J Histochem Cytochem* 2011; 59(1): 47-59.
- 17 Fukasawa K, Fujii H, Saitoh Y, Koizumi K, Aozuka Y, Sekine K, *et al.* Aminopeptidase N (APN/CD13) is selectively expressed in vascular endothelial cells and plays multiple roles in angiogenesis. *Cancer Lett* 2006; 243(1): 135-43.
- 18 Eichten A, Su J, Adler AP, Zhang L, Ioffe E, Parveen AA, *et al.* Resistance to Anti-VEGF therapy mediated by autocrine IL6/STAT3 signaling and overcome by IL6 blockade. *Cancer Res* 2016; 76(8): 2327-39.
- 19 Banerjee K, Resat H. Constitutive activation of STAT3 in breast cancer cells. *Int J Cancer* 2016; 138(11): 2570-8.
- 20 Zimmers TA, Fishel ML, Bonetto A. STAT3 in the systemic inflammation of cancer cachexia. *Semin Cell Dev Biol* 2016; 54: 28-41.
- 21 Lissat A, Joerschke M, Shinde DA, Braunschweig T, Meier A, Makowska A, *et al.* IL6 secreted by Ewing sarcoma tumor microenvironment confers anti-apoptotic and cell-disseminating paracrine responses in Ewing sarcoma cells. *BMC Cancer* 2015; 15: 552.
- 22 Yamashita M, Wada H, Eguchi H, Ogawa H, Yamada D, Noda T, *et al.* A CD13 inhibitor, ubenimex, synergistically enhances the effects of anticancer drugs in hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2016; 49(1): 89-98.
- 23 Mochizuki D, Adams A, Warner KA, Zhang Z, Pearson AT, Misawa K, *et al.* Anti-tumor effect of inhibition of IL-6 signaling in mucoepidermoid carcinoma. *Oncotarget* 2015; 6(26): 22822-35.
- 24 Cao W, Liu Y, Zhang R, Zhang B, Wang T, Zhu X, *et al.* Homoharringtonine induces apoptosis and inhibits STAT3 via IL-6/JAK1/STAT3 signal pathway in Gefitinib-resistant lung cancer cells. *Sci Rep* 2015; 5: 8477.