

# Legumain在肿瘤微环境中的作用

康瑾<sup>1</sup> 薛凯凯<sup>2</sup> 范雅荣<sup>2</sup> 张晓龙<sup>2</sup> 张清<sup>2</sup> 董丽<sup>2</sup> 刘小春<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>山西医科大学第三医院(山西白求恩医院 山西医学科学院 同济山西医院), 太原 030032;

<sup>2</sup>山西大学生物医学研究院, 太原 030006)

**摘要** 肿瘤微环境是肿瘤发生发展过程中重要的决定因素, 受到细胞内多种蛋白质表达量异常或结构改变的影响。LGMN(Legumain)是一种半胱氨酸蛋白酶, 参与多种蛋白质的加工, 在体内发挥一定的生物学功能。同时LGMN在多种实体瘤中高表达, 与恶性肿瘤的侵袭、扩散和转移密切相关, 其具体生物学作用机制涉及多种途径, 包括影响肿瘤微环境中肿瘤相关巨噬细胞和新生血管内皮细胞等。该文将对LGMN在肿瘤形成和进展中的作用机制及其与肿瘤微环境的关系加以综述, 从而为系统阐明LGMN在肿瘤微环境中的作用机理以及探索新型的肿瘤诊断标志物和治疗靶点提供科学依据。

**关键词** Legumain; 肿瘤微环境; 生物学机制

## Research of Legumain in Tumor Microenvironment

KANG Jin<sup>1</sup>, XUE Kaikai<sup>2</sup>, FAN Yarong<sup>2</sup>, ZHANG Xiaolong<sup>2</sup>, ZHANG Qing<sup>2</sup>, DONG Li<sup>2</sup>, LIU Xiaochun<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Third Hospital of Shanxi Medical University, Shanxi Bethune Hospital, Shanxi Academy of Medical Sciences, Tongji Shanxi Hospital, Taiyuan 030032, China; <sup>2</sup>Shanxi University Biomedical Research Institute, Taiyuan 030006, China)

**Abstract** Tumor microenvironment is an important determinant in the process of tumorigenesis and development, and is affected by abnormal expression or structural changes of various proteins in cells. Legumain, a cysteine protease, is involved in the processing of various proteins and exerts certain biological functions *in vivo*. At the same time, it is highly expressed in various tumors and is closely related to the invasion, spread and metastasis of malignant tumors. Its specific biological mechanism involves multiple pathways and may affect the tumor microenvironment, including tumor-associated macrophages and vascular endothelial cells. This article will review the mechanism of Legumain in tumor formation and progression and its relationship with tumor microenvironment, so as to provide a scientific basis for systematically elucidating the mechanism of Legumain in tumor microenvironment and exploring new biomarkers for tumor diagnosis and treatment.

**Keywords** Legumain; tumor microenvironment; biological mechanism

豆蛋白酶(Legumain, LGMN)又称天冬酰胺内肽酶(asparagine endopeptidase, AEP), 最早于20世纪80年代初在豆科种子中被发现, 并于1997年首次在哺乳动物中被分离鉴定<sup>[1-2]</sup>, 是目前已知的唯

一一种特异性切割哺乳动物基因组中天冬酰胺残基肽键的半胱氨酸蛋白酶, 属于半胱氨酸蛋白酶C13家族的一个新成员<sup>[3]</sup>。有研究显示, LGMN的表达水平及分布与乳腺癌、胃癌等多种肿瘤的

收稿日期: 2022-03-01 接受日期: 2022-04-06

山西省自然科学基金(批准号: 201901D211135)、山西省高等学校科技创新项目(批准号: 201802009)和山西省出国留学人员专项(批准号: 2021-020)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 13934226668, E-mail: tyxchliu@163.com

Received: March 1, 2022 Accepted: April 6, 2022

This work was supported by the Natural Science Foundation of Shanxi Province (Grant No.201901D211135), the Scientific and Technological Innovation Programs of Higher Education Institutions in Shanxi (Grant No.201802009) and the Research Project Supported by Shanxi Scholarship Council of China (Grant No.2021-020)

\*Corresponding author. Tel: +86-13934226668, E-mail: tyxchliu@163.com

发生发展密切相关<sup>[4-6]</sup>,而且可以通过重塑细胞外基质、调节外泌体介导的物质转运、影响肿瘤微环境的血管生成参与肿瘤细胞的生长、增殖和迁移<sup>[7-9]</sup>。近年来LGMN在肿瘤微环境中的作用已经得到了广泛关注。本文将针对LGMN在恶性肿瘤组织中的表达特点、在肿瘤形成中的作用机制及其与肿瘤微环境的调控作用进行综述,旨在促进LGMN在癌症进程中的作用机制研究以及为临床转化和拓展应用提供依据。

## 1 LGMN的生物学特点

LGMN定位于人的14q32.1,由14个外显子和13个内含子组成,编码了由433个氨基酸残基组成的多肽链<sup>[2-4]</sup>。CHEN等<sup>[10]</sup>通过免疫共沉淀实验表明,人的LGMN蛋白共有3种形式,分别为56 kDa的酶原前体,46 kDa和36 kDa的成熟酶,其中酶原前体不具备活性,通过调整环境中的pH可以启动其自身催化机制而转变为具有活性形式的46 kDa成熟酶。46 kDa成熟酶在溶酶体内经过多种蛋白酶处理后,其羧基端被剪切生成36 kDa成熟酶,并且这两种形式的酶活性一致。LGMN酶原前体的结构主要由信号肽,催化功能区以及稳定与活化调节区(legumain stabilization and activity modulation, LSAM)三部分组成<sup>[10]</sup>。其中信号肽部分引导LGMN到内质网进行加工。催化功能区通过在空间上相互接近的3个活性位点残基His148、Cys189和Asn42,稳定LGMN的酶活性。LSAM则通过触发位于催化结构域附近的静电编码稳定开关来保证LGMN酶原前体的稳定状态<sup>[11-12]</sup>。

LGMN主要分布于溶酶体中,介导着多种蛋白质的加工,例如将半胱氨酸组织蛋白酶的单链形式转化为双链形式;同时在哺乳动物免疫过程中也起着重要作用。LGMN在哺乳动物中定位于抗原递呈细胞,如B细胞和树突状细胞。在B细胞中,LGMN会加工自身和外源蛋白,使其在T细胞表面呈现II类主要组织相容性复合体,从而辅助免疫耐受的形成<sup>[13-14]</sup>。除此之外,它也是免疫信号转导的重要因子,同组织蛋白酶一样酶切激活toll样受体(toll-like receptors, TLRs),参与固有免疫反应。除了正常的生物学功能以外,LGMN还与多种疾病包括肿瘤关系密切。LGMN在肿瘤新生血管内皮细胞、肿瘤基质内的肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated

macrophages, TAMs)以及乳腺<sup>[10]</sup>、结肠<sup>[15]</sup>、前列腺<sup>[16]</sup>、卵巢肿瘤<sup>[17]</sup>等多种实体瘤组织中高表达,并且其表达与多种肿瘤的病理指标和预后密切相关。此外,在肿瘤微环境多种细胞中也发现LGMN高表达的现象<sup>[18-19]</sup>。

## 2 LGMN与肿瘤的关系

### 2.1 LGMN与肿瘤恶性程度之间的关系

LGMN在宫颈癌、乳腺癌和卵巢癌等多种肿瘤疾病中呈现高表达状态,其表达量与肿瘤的分级或患者的临床分期有关,且高表达量提示较差临床分期。杨艳彬等<sup>[20]</sup>通过免疫组织化学方法研究了41例宫颈癌,62例宫颈癌前病变和84例正常样本,证实了LGMN在宫颈癌组织中的表达阳性率及强度均远远高于癌前病变和正常组织。同样,TOSS等<sup>[21]</sup>通过免疫组化方法,发现了LGMN在乳腺癌中的表达水平越高肿瘤分级也越高。且有学者通过实时荧光定量PCR和蛋白质印迹方法验证了LGMN表达量增加与卵巢肿瘤恶性程度呈正相关<sup>[16]</sup>。这些相关性提示LGMN可能作为恶性肿瘤的筛查和辅助诊断指标。

### 2.2 LGMN与肿瘤形成进展的关系

肿瘤细胞中LGMN有促进恶性肿瘤细胞侵袭及转移的作用。XU等<sup>[22]</sup>对小鼠注射LGMN蛋白后,发现乳腺癌细胞生长和转移速度加快,而使用LGMN AEPI(Aza-Asn epoxides effectively inhibit the activity of AEP)抑制剂后却发现乳腺癌细胞转移受到抑制,证实了LGMN蛋白会影响乳腺癌细胞的生长与转移。类似的,MENG等<sup>[23]</sup>将HeLa和SiHa细胞中的LGMN基因敲除后,发现其迁移和侵袭能力显著降低,这表明了LGMN在宫颈癌细胞的迁移和侵袭中起到了关键作用。在体外培养的胃癌和卵巢癌细胞中也同样观察到,LGMN过表达能够促进肿瘤细胞的迁移及浸润<sup>[9,24]</sup>。

### 2.3 LGMN与肿瘤预后的关系

LGMN高表达不仅与较差的临床分期和肿瘤转移有关,而且会导致不良的肿瘤预后,其患者生存率较低。WANG等<sup>[17]</sup>通过对卵巢癌患者随访发现,与LGMN表达低的患者相比,LGMN高表达患者不良预后的发生概率增加。同样,在LI等<sup>[25]</sup>对73例胃癌患者进行随访时,也发现LGMN表达与累积生存率呈显著负相关。LGMN高表达患者的相对生存期较短,其他多项研究也表明,LGMN在多种恶性肿瘤细

胞中的高表达均会影响患者的预后<sup>[26]</sup>。

### 3 LGMN在肿瘤形成和进展中的作用机制

随着分子生物学技术的发展, LGMN参与肿瘤发生发展的作用机制逐渐得到研究和揭示, 如外泌体转运、蛋白酶活性调节、整合素互作调控、信号通路干预等(表1)。

#### 3.1 LGMN参与MMP-2、MMP-9信号通路

基质金属蛋白酶是一种锌依赖的内肽酶, 在肿瘤微环境中的核心作用是降解和重构细胞外基质。LGMN的裂解会使MMP家族中的MMP-2和MMP-9获得酶活性<sup>[27]</sup>。激活的LGMN特异性地裂解明胶酶N-端的天冬酰胺键, 产生成熟的MMP-2和MMP-9。二者都参与了细胞外基质的降解, 促进乳腺癌细胞的转移和侵袭<sup>[28]</sup>。在胃癌中, LGMN通过直接或间接作用于MMP-9, 使MMP-9无活性蛋白酶形式逐渐向具有降低细胞外基质活性的MMP-9形式转变, 从而促进胃癌细胞转移<sup>[29]</sup>。

#### 3.2 LGMN参与PI3K/AKT信号通路

PI3K是一种磷脂酰肌醇-3-羟激酶, AKT是一种丝氨酸/苏氨酸激酶, PI3K/AKT途径会参与调节细胞生长、侵袭和转移。磷酸肌醇3-激酶通过抑制细胞凋亡和增强化疗诱导细胞凋亡的抵抗力来提高肿瘤生长的速度, 从而增强乳腺癌细胞的侵袭和转移能力。此外, PI3K/AKT通路相关蛋白编码基因的突变可能会异常激活该通路, 进而通过减少细胞黏附诱发肿瘤血管生成和调节上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transitions, EMT), 促进乳腺癌的侵袭和转移<sup>[30-34]</sup>。ZHU等<sup>[35]</sup>发现, 抑制前列腺细胞22RV1

中LGMN的表达可降低PI3K水平, 但不影响mTOR蛋白水平; 而缺失LGMN则显著降低了AKT的磷酸化, 但并没有降低AKT的总表达。因此, LGMN可能通过激活PI3K/AKT信号通路而成为癌细胞增殖、侵袭和存活的关键因子。

#### 3.3 LGMN参与整合素信号通路

肿瘤相关血管可以表达一组异二聚体细胞表面受体, 称为整合素。LGMN和 $\alpha\beta$ 整合素在许多人类癌症的肿瘤细胞和血管生成系统中过表达。整合素可以转导信号以调节细胞生长、增殖、分化和黏附, 它们在各种类型细胞上表达, 包括成纤维细胞、内皮细胞和免疫细胞<sup>[36]</sup>。乳腺癌细胞来源的LGMN含有一个RGD基序, 可与内皮整合素 $\alpha\beta 3$ 相互作用, 使 $\alpha\beta 3$ 闭合。整合素 $\alpha\beta 3$ 的闭合通过STAT3信号通路间接下调ZO-1的表达, 最终增加了内皮细胞的通透性, 从而协助肿瘤细胞的转移<sup>[28]</sup>。在上皮性卵巢癌(epithelial ovarian cancer, EOC)中有一些特异性表达的整合素, 例如 $\alpha 5\beta 1$ 、 $\alpha 2\beta 1$ 和 $\alpha\beta 3$ <sup>[37-39]</sup>。其中, EOC细胞分泌的外泌体中所含有的 $\alpha 5\beta 1$ /LGMN复合物会影响人类腹膜间皮细胞(human peritoneal mesothelial cell, HPMC)的增殖和迁移, 与此同时,  $\alpha 5\beta 1$ 和LGMN在EOC和HPMC中均高度表达并存在共定位现象。此外, 将HPMC与EOC衍生的外泌体共培养还可引发 $\alpha 5\beta 1$ /LGMN的下游通路FAK/AKT/Erk的变化以及EMT蛋白质水平的变化<sup>[9]</sup>。

#### 3.4 LGMN参与TGF- $\beta$ 信号通路

TGF- $\beta$ 是一个庞大的家族, 脊椎动物TGF- $\beta$ 超家族包括TGF- $\beta$ 活化素和骨形成蛋白。哺乳

表1 LGMN在肿瘤形成和进展中的作用机制

Table 1 Mechanism of LGMN in tumor formation and progression

信号通路 Signaling pathway	肿瘤类别 Tumor categories	信号变化 Signal change	影响 Effect	参考文献 References
LGMN/MMP-2, MMP-9	Breast cancer	Activation	Promote metastasis and invasion of breast cancer cells	[28]
	Gastric cancer	Activation	Promote metastasis and invasion of gastric cancer cells	[29]
LGMN/PI3K/AKT	Breast cancer	Activation	Promote metastasis and invasion of breast cancer cells	[30-34]
	Prostate cancer	Activation	Promote prostate cancer cell proliferation, invasion and survival	[35]
LGMN, Integrin	Breast cancer	Inhibition	Promote metastasis of breast cancer cells	[28]
	Epithelial ovarian cancer	Co-activation	$\alpha 5\beta 1$ /AEP complex affects proliferation and migration of epithelial ovarian cancer	[9,37-39]
LGMN/TGF- $\beta$		Activation	Promote tumor-associated macrophage repolarization	[42]
LGMN/P53	Glioblastoma	Inhibition	Promote tumorigenesis, proliferation and anti-apoptotic activity of glioblasts	[44]



动物TGF- $\beta$ 共有3种TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2、TGF- $\beta$ 3。Smads为与线虫Sma和果蝇Sma蛋白同源的蛋白质，TGF- $\beta$ 1通过与TGF- $\beta$ 受体II(T $\beta$ R<sub>II</sub>)结合来启动细胞内信号转导。TGF- $\beta$ 1激活TGF- $\beta$ 受体I型(T $\beta$ R<sub>I</sub>)激酶，导致Smad2和Smad3的磷酸化。随后，活化的Smad2和Smad3与Smad4形成低聚复合物。这些低聚复合物移动到细胞核中可调节靶基因的转录<sup>[40-41]</sup>。JIN等<sup>[42]</sup>通过研究TGF- $\beta$ 3/FAK通路靶向脂质代谢克服EMT相关耐药，利用LGMN活化实现肿瘤相关巨噬细胞复极化。

### 3.5 LGMN参与P53信号通路

P53是一种肿瘤抑制基因，YAMANE等<sup>[43]</sup>对DJ-1-敲除的细胞分析后，发现LGMN的表达和蛋白酶活性能够由P53通过小鼠上的DJ-1进行调节。有研究发现，大多数肿瘤类型都有P53基因错义突变，但是在大多数胶质母细胞瘤中，P53基因的突变很少发生。在2020年，LIN等<sup>[44]</sup>发现了一种调节P53蛋白活性的新方法，被激活的LGMN会在N311处切割P53蛋白，产生P53片段，这些片段失去了对癌基因转录抑制的功能，从而间接促进胶质母细胞的肿瘤发生、增殖和提高抗凋亡活性。

## 4 LGMN与肿瘤微环境的关系

肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)是肿瘤形成和进展过程中重要的影响因素，主要由肿瘤细胞、肿瘤相关巨噬细胞、肿瘤相关成纤维细胞、

血管内皮生成细胞、细胞外基质、T淋巴细胞和B淋巴细胞等组成。在TME中，肿瘤细胞可吸引或激活许多非肿瘤细胞，这些细胞直接(通过释放因子)或间接(通过诱导组织缺氧或出现坏死)改变微环境<sup>[45]</sup>(图1)。

### 4.1 LGMN影响血管再生微环境

LGMN在肿瘤微环境中的新生血管内皮细胞中高表达。吴文苑等<sup>[46]</sup>为研究LGMN对人静脉血管内皮细胞(HUVEC)管腔形成的影响，向培养基中加入LGMN的抑制物APEI。实验结果显示，HUVEC细胞形成的完整小管腔数目明显减少，并且随着APEI加入量的增加而进一步减少，表明在肿瘤组织血管内皮细胞高表达的LGMN可能会促进肿瘤新生血管的形成，改善肿瘤血供，促进肿瘤生长。且LGMN已被证实与肿瘤新生血管和肿瘤相关巨噬细胞有着重要关联。容维宁等<sup>[47]</sup>对肿瘤新生血管进行CD31和LGMN的双染，通过流式细胞仪分析发现LGMN在新生血管处于增殖状态的内皮细胞中高表达。

### 4.2 LGMN影响肿瘤相关巨噬细胞

肿瘤相关巨噬细胞(TAMs)是肿瘤微环境的重要组成部分，属于M2型巨噬细胞。TAMs通过分泌多种生长因子、血管生成因子、蛋白酶等促进肿瘤基质重构、新生血管生成、肿瘤细胞增殖及转移。某些髓系细胞来源于单核细胞，它们在暴露于局部肿瘤微环境后可分化为TAMs。

SHEN等<sup>[36]</sup>通过在TAMs中敲除LGMN基因，构

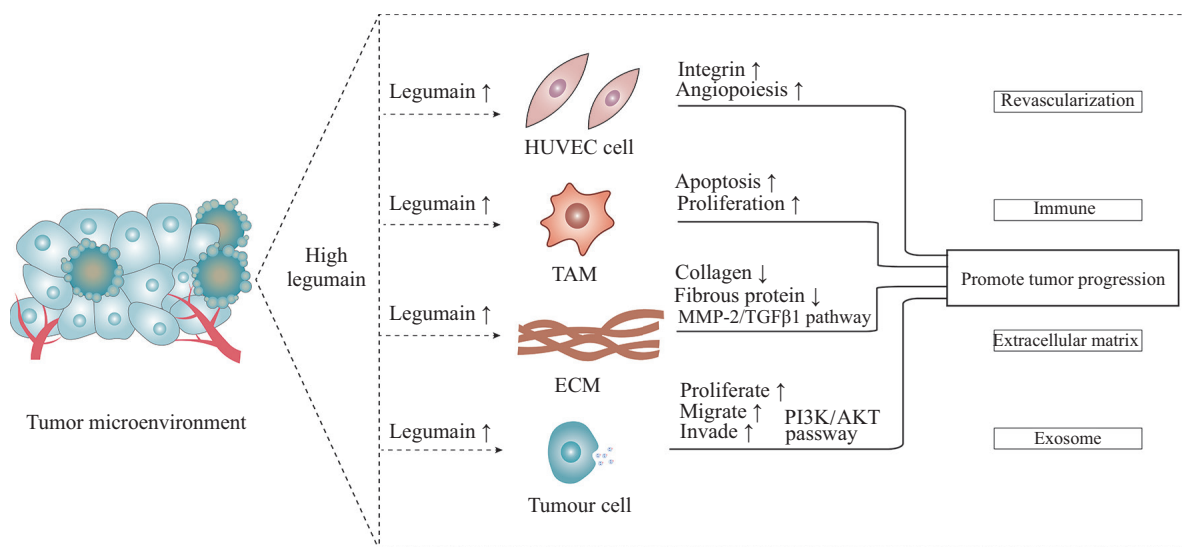


图1 LGMN对肿瘤微环境的作用机制示意图

Fig.1 Schematic diagram of the functional mechanism of LGMN in the tumor microenvironment

建LGMN基因缺失的乳腺癌小鼠模型,发现肿瘤生长受到显著抑制;对分离的原代肿瘤细胞进行检测,证明TAMs中LGMN的敲除可以抑制肿瘤的生长、增殖和凋亡。此外,与对照组相比,Lgmn<sup>-/-</sup>小鼠的肿瘤组织和分离的原代肿瘤细胞中,衰老激活的主要上游通路分子p38MAPK的磷酸化水平上调。这些结果表明,敲除TAMs中的LGMN可显著促进体内肿瘤细胞的衰老。WANG等<sup>[24]</sup>首先证实,与相邻正常组织样本相比,LGMN在胃癌组织样本的TAMs中高表达;其次,研究者通过构建LGMN过表达细胞系和LGMN敲低细胞系,证明LGMN敲低的TAMs在体内可抑制肿瘤进展;通过免疫组化检测到血管生成标志物CD31的表达明显受到抑制,并且恶性生长标志物Ki67在LGMN抑制的TAM相关肿瘤中表达下调,证明LGMN抑制的TAM可减少体内肿瘤生长和血管生成。总之,减少肿瘤基质中TAM的数量可以有效地改变肿瘤微环境,从而显著抑制肿瘤生长和转移。

#### 4.3 LGMN影响细胞外基质的形成

细胞外基质(extracellular matrix, ECM)由多糖、蛋白质或蛋白聚糖组成,是由机体细胞合成,并分布在细胞之间或细胞表面的物质。细胞外基质不但能够起到支持、连接的功能,还能调节组织和细胞的生理功能,在肿瘤的形成、转移,以及在细胞增殖、分化和维持组织稳态方面起着至关重要作用<sup>[48]</sup>。LGMN可以分泌到TME中,重塑ECM。SHEN等<sup>[7]</sup>用免疫荧光染色显示LGMN和纤连蛋白在异种移植的肿瘤组织中共定位,表明LGMN可以分泌到TME中,且LGMN可以导致ECM的主要成分纤维蛋白和胶原蛋白I分解代谢,进而起到重塑ECM的作用。ZAWA等<sup>[49]</sup>通过Western blot证明在人主动脉平滑肌细胞中,LGMN表达显著增加了胶原蛋白、纤连蛋白和弹性蛋白的表达量。BAI等<sup>[50]</sup>研究表明,LGMN通过在肺动脉高压小鼠模型中激活肺动脉VSMC中的MMP-2/转化生长因子-β1信号转导来增加ECM蛋白的合成。

#### 4.4 LGMN影响外泌体的功能

外泌体是活细胞分泌到胞外直径在30~150 nm的双层磷脂小囊泡,由细胞内吞体腔室内陷而成。肿瘤细胞来源的外泌体通过有效地将miRNA、mRNA和蛋白质传递到其他细胞中,从而调节细胞增殖、侵袭和血管生成等功能<sup>[51-53]</sup>。YAN等<sup>[8]</sup>研究表明,

富含LGMN的外泌体能够增强胰腺导管腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力;相反缺乏LGMN的外泌体则降低了癌细胞的侵袭能力。LI等<sup>[9]</sup>为探索含LGMN的外泌体的功能,首先建立了稳定的AEP-KD SKOV3细胞系,并证实抑制外泌体中LGMN复合物可减少HPMC增殖和迁移;其次,通过分析临床样本,还发现LGMN复合物在晚期上皮性卵巢癌患者的血清和腹水来源的外泌体中高度表达。研究结果还表明,由器官特异性细胞摄取的肿瘤来源外泌体可以制备转移前的生态位<sup>[54]</sup>。因此,LGMN可能以外泌体依赖方式对某些癌症的进展发挥重要作用。

## 5 LGMN作为靶标在肿瘤免疫治疗中的应用前景

鉴于LGMN在肿瘤微环境和肿瘤组织中会选择性过表达,且在免疫系统中发挥着重要作用,因此靶向LGMN可能是发展肿瘤免疫治疗的一个有前景策略。

### 5.1 基于LGMN的DNA疫苗

LEWEN等<sup>[10]</sup>构建了基于LGMN的DNA疫苗,发现在BALB/c小鼠中,DNA疫苗通过诱导针对LGMN高表达的TAMs的特异性CD8<sup>+</sup> T细胞反应,有效保护宿主免受肿瘤细胞攻击。除了LGMN单肽DNA疫苗的证据外,KARYAMPUDI等<sup>[55]</sup>还利用多肽疫苗构建了抗PD-1抗体,作为一种联合治疗方案来逆转肿瘤微环境中的免疫抑制作用。联合方案改善了疫苗的疗效,使肿瘤的诱导消退,促进了CD8<sup>+</sup> T细胞在消退肿瘤中的浸润,也延长了荷瘤小鼠的中位生存时间。但在将其引入临床之前,DNA疫苗引发的复杂宿主免疫反应仍需要进一步的研究。

### 5.2 小分子抑制剂对LGMN的抑制作用

SAR131675是一种酪氨酸激酶抑制剂,ALAM等<sup>[56]</sup>发现,SAR131675可通过靶向几种原位和同基因乳腺肿瘤模型来诱导有效的抗肿瘤作用,减少淋巴结浸润,以及避免肺转移。此外,ESPAGNOLLE等<sup>[57]</sup>还发现,用SAR131675治疗可减少肿瘤微环境中高水平表达LGMN且免疫功能低下的巨噬细胞数量。这些结果表明,酪氨酸激酶抑制剂(如SAR131675)在以LGMN为靶点的肿瘤微环境中具有潜在的靶向性。

### 5.3 LGMN活化前药

由于LGMN在肿瘤组织中选择性高表达,被

LGMN特异性激活的前体药物可能具有选择性和肿瘤特异性。这种机制可能会降低非特异性靶向药物不良反应的发生率。为减少化疗药阿霉素(Dox)的副作用, LIU等<sup>[4]</sup>提出了一种基于Dox的肿瘤特异性LGMN活化前药Legubicin。Legubicin在LGMN高表达的肿瘤小鼠中具有较好的耐受性, 与使用阿霉素治疗的类似小鼠相比, 显示出更高的效力并使小鼠体重减轻的发生率降低。

#### 5.4 氮杂肽环氧化物对LGMN的抑制作用

氮杂肽是一种由氨基脲取代的一个或多个氨基酸残基肽。JAMES及其同事<sup>[58]</sup>设计了一种氮杂肽环氧化物, 不可逆地抑制曼氏血吸虫和猪肾的LGMN。设计的氮杂肽环氧化物对LGMN有特异性, 但对其他蛋白酶没有特异性<sup>[58]</sup>。此外, 与LGMN具有潜在不可逆相互作用的化合物可能会干扰LGMN的生理功能和蛋白酶活性。

## 6 展望

LGMN作为一种细胞内特定应激反应条件下产生的半胱氨酸蛋白酶, 在肿瘤的发生发展过程中通过参与调控动态变化的肿瘤微环境发挥重要作用, 相关作用机制涉及外泌体转运、蛋白酶活性调节、整合素互作调控、信号通路干预等, 但在许多方面的机制尚不明确。如PI3K/AKT信号通路在LGMN相关生物学效应中的激活机制、LGMN影响外泌体的确切机制、LGMN在特定肿瘤中信号调控通路等。这些机制仍需细胞水平、动物模型以及临床相关研究中深入推进, 完善LGMN肿瘤调控机制的理论体系。

由于LGMN高表达于肿瘤细胞及其专一性水解特定底物的特性, 其对肿瘤监测和治疗有提示意义, 也有望成为预测恶性肿瘤患者预后的标记物, 应用于恶性肿瘤的预防、诊断和治疗。目前针对LGMN的肿瘤早期病变靶向性标记如荧光标记探针已获得初步进展, 其分布与表达量可作为辅助指标整合到现有的临床诊断方式中, 但其在肿瘤诊断的可靠性及检测的灵敏性仍需要进一步探索和验证。通过研制以LGMN为靶点的基因疫苗或抑制剂来控制体内癌细胞的发展进程可为癌症的基因治疗提供新的思路, 然而在临床治疗应用转化方面目前仍处于探索阶段, 还需大规模的人群研究和机制的技术研究支持并验证其可靠性。

总之, LGMN调控通路在不同肿瘤类型、微环境和组织之间存在广泛差异, 深入了解和关联分析这种多样性以及探究其被调控的机制是该领域应用转化的重点和难点, 尚需更多的机制研究予以探讨和验证。

## 参考文献 (References)

- [1] CSOMA C, POLGÁR L. Proteinase from germinating bean cotyledons. Evidence for involvement of a thiol group in catalysis [J]. *Biochem J*, 1984, 222(3): 769-76.
- [2] CHEN J M, DANDO P M, RAWLINGS N D, et al. Cloning, isolation, and characterization of mammalian legumain, an asparaginyl endopeptidase [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(12): 8090-8.
- [3] ZHANG W, LIN Y. The mechanism of asparagine endopeptidase in the progression of malignant tumors: a review [J]. *Cells*, 2021, 10(5): 1153.
- [4] LIU C, SUN C, HUANG H, et al. Overexpression of legumain in tumors is significant for invasion/metastasis and a candidate enzymatic target for prodrug therapy [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(11): 2957-64.
- [5] WU W, LUO Y, SUN C, et al. Targeting cell-impermeable prodrug activation to tumor microenvironment eradicates multiple drug-resistant neoplasms [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(2): 970-80.
- [6] MURTHY R V, ARBMAN G, GAO J, et al. Legumain expression in relation to clinicopathologic and biological variables in colorectal cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(6): 2293-9.
- [7] SHEN L, LI H, SHI Y, et al. M2 tumour-associated macrophages contribute to tumour progression via legumain remodelling the extracellular matrix in diffuse large B cell lymphoma [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 30347.
- [8] YAN Q, YUAN W B, SUN X, et al. Asparaginyl endopeptidase enhances pancreatic ductal adenocarcinoma cell invasion in an exosome-dependent manner and correlates with poor prognosis [J]. *Int J Oncol*, 2018, 52(5): 1651-60.
- [9] LI X, TANG M, ZHU Q, et al. The exosomal integrin  $\alpha 5 \beta 1$ /AEP complex derived from epithelial ovarian cancer cells promotes peritoneal metastasis through regulating mesothelial cell proliferation and migration [J]. *Cell Oncol*, 2020, 43(2): 263-77.
- [10] LEWEN S, ZHOU H, HU H D, et al. A legumain-based minigene vaccine targets the tumor stroma and suppresses breast cancer growth and angiogenesis [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2008, 57(4): 507-15.
- [11] DALL E, BRANDSTETTER H. Mechanistic and structural studies on legumain explain its zymogenicity, distinct activation pathways, and regulation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(27): 10940-5.
- [12] ZHAO L, HUA T, CROWLEY C, et al. Structural analysis of asparaginyl endopeptidase reveals the activation mechanism and a reversible intermediate maturation stage [J]. *Cell Res*, 2014, 24(3): 344-58.
- [13] MANOURY B, HEWITT E W, MORRICE N, et al. An asparaginyl endopeptidase processes a microbial antigen for class II MHC presentation [J]. *Nature*, 1998, 396(6712): 695-9.
- [14] TROMBETTA E S, EBERSOLD M, GARRETT W, et al. Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation [J].



- Science, 2003, 299(5611): 1400-3.
- [15] HAUGEN M H, JOHANSEN H T, PETERSEN S J, et al. Nuclear legumain activity in colorectal cancer [J]. PLoS One, 2013, 8(1): e52980.
- [16] OHNO Y, NAKASHIMA J, IZUMI M, et al. Association of legumain expression pattern with prostate cancer invasiveness and aggressiveness [J]. World J Urol, 2013, 31(2): 359-64.
- [17] WANG L, CHEN S, ZHANG M, et al. Legumain: a biomarker for diagnosis and prognosis of human ovarian cancer [J]. J Cell Biochem, 2012, 113(8): 2679-86.
- [18] LIU Z, XIONG M, GONG J, et al. Legumain protease-activated TAT-liposome cargo for targeting tumours and their microenvironment [J]. Nat Commun, 2014, 5: 4280.
- [19] REISFELD R A. The tumor microenvironment: a target for combination therapy of breast cancer [J]. Crit Rev Oncog, 2013, 18(1/2): 115-33.
- [20] 杨艳彬, 吴智清. Legumain在宫颈癌中的表达及相关危险因素[J]. 热带医学杂志(YANG Y B, WU Z Q. Legumain expression and associated risk factors in cervical cancer [J]. Journal of Tropical Medicine), 2016, 16(4): 464-6.
- [21] TOSS M S, MILIGY I M, GORRINGE K L, et al. Legumain is an independent predictor for invasive recurrence in breast ductal carcinoma *in situ* [J]. Mod Pathol, 2019, 32(5): 639-49.
- [22] XU C, CAO L, LIU J, et al. Suppression of asparaginyl endopeptidase inhibits polyomavirus middle T antigen-induced tumor formation and metastasis [J]. Oncol Res, 2017, 25(3): 407-15.
- [23] MENG F, LIU W. Knockdown of legumain suppresses cervical cancer cell migration and invasion [J]. Oncol Res, 2016, 23(1): 7-12.
- [24] WANG H, CHEN B, LIN Y, et al. Legumain promotes gastric cancer progression through tumor-associated macrophages *in vitro* and *in vivo* [J]. Int J Biol Sci, 2020, 16(1): 172-80.
- [25] LI N, LIU Q, SU Q, et al. Effects of legumain as a potential prognostic factor on gastric cancers [J]. Med Oncol, 2013, 30(3): 621.
- [26] LIN Y, QIU Y, XU C, et al. Functional role of asparaginyl endopeptidase ubiquitination by TRAF6 in tumor invasion and metastasis [J]. J Natl Cancer Inst, 2014, 106(4): dju012.
- [27] CHEN J M, FORTUNATO M, STEVENS R A, et al. Activation of progelatinase A by mammalian legumain, a recently discovered cysteine proteinase [J]. Biol Chem, 2001, 382(5): 777-83.
- [28] KANG L, SHEN L, LU L, et al. Asparaginyl endopeptidase induces endothelial permeability and tumor metastasis via down-regulating zonula occludens protein ZO-1 [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2019, 1865(9): 2267-75.
- [29] 汤新跃. 幽门螺杆菌感染性胃癌组织中Legumain、MMP-9的表达及其临床意义[J]. 现代中西医结合杂志(TANG X Y. Expression of Legumain, MMP-9 and clinical significance in H. pylori infected gastric cancer [J]. Journal of Modern Integrative Medicine), 2015, 24(12): 1270-2,5.
- [30] MORITA Y, ARAKI H, SUGIMOTO T, et al. Legumain/asparaginyl endopeptidase controls extracellular matrix remodeling through the degradation of fibronectin in mouse renal proximal tubular cells [J]. FEBS Lett, 2007, 581(7): 1417-24.
- [31] RAFAEL D, DOKTOROVÁ S, FLORINDO H F, et al. EMT blockage strategies: targeting Akt dependent mechanisms for breast cancer metastatic behaviour modulation [J]. Curr Gene Ther, 2015, 15(3): 300-12.
- [32] THAPA N, CHOI S, TAN X, et al. Phosphatidylinositol phosphate 5-kinase  $I\gamma$  and phosphoinositide 3-kinase/akt signaling couple to promote oncogenic growth [J]. J Biol Chem, 2015, 290(30): 18843-54.
- [33] XU K, YIN N, PENG M, et al. Glycolysis fuels phosphoinositide 3-kinase signaling to bolster T cell immunity [J]. Science, 2021, 371(6527): 405-10.
- [34] DIRICAN E, AKKIPRIK M. Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit 1 and phosphatase and tensin homolog as therapeutic targets in breast cancer [J]. Tumour Biol, 2017, 39(3): 1010428317695529.
- [35] ZHU W, SHAO Y, YANG M, et al. Asparaginyl endopeptidase promotes proliferation and invasiveness of prostate cancer cells via PI3K/AKT signaling pathway [J]. Gene, 2016, 594(2): 176-82.
- [36] SHEN L, KANG L, WANG D, et al. Legumain-deficient macrophages promote senescence of tumor cells by sustaining JAK1/STAT1 activation [J]. Cancer Lett, 2020, 472: 40-9.
- [37] DENG B, ZHANG S, MIAO Y, et al. Adrenomedullin expression in epithelial ovarian cancers and promotes HO8910 cell migration associated with upregulating integrin  $\alpha 5\beta 1$  and phosphorylating FAK and paxillin [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2012, 31(1): 19.
- [38] GAO J, HU Z, LIU D, et al. Expression of Lewis y antigen and integrin  $\alpha v, \beta 3$  in ovarian cancer and their relationship with chemotherapeutic drug resistance [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2013, 32(1): 36.
- [39] NACI D, VUORI K, AOUDJIT F. Alpha2beta1 integrin in cancer development and chemoresistance [J]. Semin Cancer Biol, 2015, 35: 145-53.
- [40] CONIDI A, CAZZOLA S, BEETS K, et al. Few Smad proteins and many Smad-interacting proteins yield multiple functions and action modes in TGF $\beta$ /BMP signaling *in vivo* [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2011, 22(5/6): 287-300.
- [41] MENG X M, CHUNG A C, LAN H Y. Role of the TGF- $\beta$ /BMP-7/Smad pathways in renal diseases [J]. Clin Sci, 2013, 124(4): 243-54.
- [42] JIN H, HE Y, ZHAO P, et al. Targeting lipid metabolism to overcome EMT-associated drug resistance via integrin  $\beta 3$ /FAK pathway and tumor-associated macrophage repolarization using legumain-activatable delivery [J]. Theranostics, 2019, 9(1): 265-78.
- [43] YAMANE T, KOZUKA M, YAMAMOTO Y, et al. Protease activity of legumain is inhibited by an increase of cystatin E/M in the DJ-1-knockout mouse spleen, cerebrum and heart [J]. Biochem Biophys Rep, 2017, 9: 187-92.
- [44] PENG Z, LIU C, WU M. New insights into long noncoding RNAs and their roles in glioma [J]. Mol Cancer, 2018, 17(1): 61.
- [45] ZHANG X, TIAN W, CAI X, et al. Hydrazinocurcumin encapsulated nanoparticles "re-educate" tumor-associated macrophages and exhibit anti-tumor effects on breast cancer following STAT3 suppression [J]. PLoS One, 2013, 8(6): e65896.
- [46] 吴文苑, 余涟, 刘春, 等. Legumain对肿瘤细胞浸润力和血管内皮细胞管腔形成的作用[J]. 热带医学杂志(WU W Y, YU L, LIU C, et al. Effect of legumain on tumor cell invasiveness and vascular endothelial cell lumen formation [J]. Journal of Tropical Medicine), 2009, 9(8): 864-7,978.

- [47] 容维宁. 视网膜母细胞瘤中Legumain的表达及其对临床病理和预后的影响[D]. 天津: 天津医科大学, 2010.
- [48] MOHAN V, DAS A, SAGI I. Emerging roles of ECM remodeling processes in cancer [J]. *Semin Cancer Biol*, 2020, 62: 192-200.
- [49] OZAWA N, SATO Y, MORI Y, et al. Legumain promotes atherosclerotic vascular remodeling [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(9): 2195.
- [50] BAI P, LYU L, YU T, et al. Macrophage-derived legumain promotes pulmonary hypertension by activating the mmp (matrix metalloproteinase)-2/tgf (transforming growth factor)- $\beta$ 1 signaling [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019, 39(4): e130-e45.
- [51] GAO Q, ZHAO Y J, WANG X Y, et al. Activating mutations in PTPN3 promote cholangiocarcinoma cell proliferation and migration and are associated with tumor recurrence in patients [J]. *Gastroenterology*, 2014, 146(5): 1397-407.
- [52] JEONG D, JO W, YOON J, et al. Nanovesicles engineered from ES cells for enhanced cell proliferation [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(34): 9302-10.
- [53] KALLURI R. The biology and function of exosomes in cancer [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(4): 1208-15.
- [54] HOSHINO A, COSTA-SILVA B, SHEN T L, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis [J]. *Nature*, 2015, 527(7578): 329-35.
- [55] KARYAMPUDI L, LAMICHHANE P, SCHEID A D, et al. Accumulation of memory precursor CD8 T cells in regressing tumors following combination therapy with vaccine and anti-PD-1 antibody [J]. *Cancer Res*, 2014, 74(11): 2974-85.
- [56] ALAM A, BLANC I, GUEGUEN-DORBES G, et al. SAR131675, a potent and selective VEGFR-3-TK inhibitor with antilymphangiogenic, antitumoral, and antimetastatic activities [J]. *Mol Cancer Ther*, 2012, 11(8): 1637-49.
- [57] ESPAGNOLLE N, BARRON P, MANDRON M, et al. Specific inhibition of the VEGFR-3 tyrosine kinase by SAR131675 reduces peripheral and tumor associated immunosuppressive myeloid cells [J]. *Cancers*, 2014, 6(1): 472-90.
- [58] JAMES K E, GÖTZ M G, CAFFREY C R, et al. Aza-peptide epoxides: potent and selective inhibitors of *Schistosoma mansoni* and pig kidney legumains (asparaginyl endopeptidases) [J]. *Biol Chem*, 2003, 384(12): 1613-8.