

上皮细胞黏附分子与肿瘤诊断及治疗的研究进展

张敏娜 杨永平 貌盼勇

摘要 上皮细胞黏附分子(EpCAM)为一种跨膜糖蛋白,表达于上皮组织和多数上皮源性恶性肿瘤中,与细胞的黏附、迁移、增生、分化以及肿瘤的发生、进展等有关。近年来,EpCAM被认为是肿瘤的干细胞标记,与其诊断、治疗及预后判定相关。以EpCAM阳性循环肿瘤细胞为基础的检测技术也被逐步开发应用。目前,EpCAM抗体主要应用于上皮源性恶性肿瘤的临床研究及治疗,但仍有待于进一步研究和探讨。

关键词 上皮细胞黏附分子 肿瘤 诊断 治疗

中图分类号 R73

文献标识码 A

DOI 10.3969/j.issn.1673-548X.2015.03.005

上皮细胞黏附分子(epithelial cell adhesion molecule, EpCAM),按白细胞分化抗原命名为CD326,是最早在结肠癌中发现的一种跨膜糖蛋白,也是第1个用单克隆抗体技术鉴定出来的人肿瘤相关抗原。EpCAM除了在健康个体的上皮细胞表达,还在大多数人类肿瘤中不同程度地过表达。并被多项研究证实与肿瘤的诊断和预后判断密切相关。而且,EpCAM的过表达已在EpCAM抗体及以疫苗为基础的多种肿瘤的临床实验中被开发和应用。本文就EpCAM与肿瘤相关性的研究进展综述如下。

一、分子结构

EpCAM是细胞膜表面的一种跨膜糖蛋白。由位于4q染色体上的GA733-2基因编码。也有报道认为EpCAM由位于人染色体2p21上的TACSTD1(tumor-associated calcium signal transducer protein 1-precursor)编码。其实,这两个基因在基因库中的序列完全一致,为同一个基因编码。EpCAM的基因长度为14kbp,成熟的mRNA为1.5kbp,人和鼠的EpCAM核苷酸80%同源,氨基酸序列82%同源,说明EpCAM在进化中高度保守。EpCAM的相对分子质量为40kDa,由314个氨基酸构成。其分子由胞外段结构域(EpEX)、单次跨膜结构域和胞内段结构域(EpICD)构成^[1]。EpEX(N端)由242个氨基酸构成,其所包含的表皮生长因子样重复序列和甲状腺球蛋白结构域是同型分子间黏附的结构基础。跨膜段

结构域由23个氨基酸残基构成,C端的胞内段结构域由26个氨基酸残基构成,具有2个 α -辅肌动蛋白结合位点,可以与肌动蛋白结合,从而和细胞骨架相互作用。而且EpICD对于EpCAM依赖的由浆膜至胞核的信号转导也至关重要,EpICD通过膜内蛋白水解,起到部分转录复合体的作用,诱导c-myc、细胞周期蛋白A和E的表达^[2]。

二、EpCAM的信号转导通路

1. 调节的膜内蛋白水解作用:EpCAM的寡聚化形式是信号转导的启动子,使EpCAM被蛋白酶水解,释放其细胞内结构域。2009年,Munz等的研究显示,细胞质、核周和核内存在点样EpICD染色,而在细胞黏附部位的EpCAM常丢失胞内域,说明细胞间的接触部位存在调节的膜内蛋白水解(regulated intramembrane proteolysis, RIP)作用诱导的信号转导。RIP包括配基诱导的EpEX的脱落和EpICD的释放。脱落的EpEX和(或)EpICD能够活化信号事件,诱导肿瘤细胞增生,而EpCAM裂解也可引发对于自身表达的正反馈循环。在甲状腺癌、乳腺癌中,EpICD核表达被认为与侵袭性的肿瘤类型、生存期缩短等不良预后有关^[3-5]。另外,最近研究证实,EpCAM的胞外域还存在另外几个裂解位点,这提示EpCAM信号被不同的蛋白水解通路调节,可能涉及控制EpCAM的多种功能^[6]。

2. EpCAM与Wnt- β -catenin信号通路:Wnt- β -catenin信号通路为经典的肿瘤信号转导通路。Yamashita等^[7]研究显示,EpCAM为Wnt- β -catenin通路的直接转录靶点,通过RNA干扰沉默EpCAM表达或抑制 β -catenin,可导致EpCAM表达阳性的肝癌细胞死亡。而激活Wnt- β -catenin信号

作者单位:100853 北京,解放军医学院(张敏娜、杨永平、貌盼勇);100039 北京,中国人民解放军第302医院肝脏肿瘤诊疗与研究中心(张敏娜、杨永平),实验技术保障与研究中心(貌盼勇)

通讯作者:杨永平,电子信箱:yongpingyang@hotmail.com;貌盼勇,电子信箱:maopy302@163.com

通路则会使 EpCAM 阳性的肝癌细胞数量增加。

3. EpCAM 与 PI_3K 通路:2007 年, Litvinov 等通过对乳腺上皮细胞 HBL100 的研究显示, 3 - 磷脂酰肌醇激酶 (phosphatidylinositol 3 - kinase, PI_3K) 可调节 P85 亚基在 EpCAM 与 N - 钙黏素间的穿梭。EpCAM/p85 复合体具备激酶活性, 而 PI_3K 的激活可促使细胞进入 DNA 合成期, 使细胞发生癌前转化的特征性改变, PI_3K 活化也是诱导细胞增生和细胞间黏附所必需的。以上结果表明, EpCAM 可能通过 PI_3K 通路发挥对细胞增生的部分调节作用^[8]。

三、EpCAM 表达谱

EpCAM 在生理条件下广泛表达于上皮源性的正常组织 (包括胃囊、结肠、胰腺、膀胱、前列腺、乳腺、卵巢、皮肤汗腺等) 的基底外侧膜。而神经内分泌组织、间叶组织及部分上皮来源的腺上皮 (如肝细胞、胃壁细胞、上皮角化细胞、肌上皮) 则不表达 EpCAM。在病理情况下, EpCAM 在部分发生癌前病变的上皮组织表达转为阳性 (如不典型增生的口腔黏膜、食管化生上皮、急慢性活动性肝炎、子宫颈不典型增生) 或表达明显增强 (如结肠腺瘤)^[1]。EpCAM 在头颈部肿瘤、乳腺癌、胃癌、结直肠癌、胰腺癌、膀胱癌、前列腺癌、卵巢癌、子宫颈癌、肺鳞状细胞癌及皮肤基底细胞癌等上皮源性肿瘤中高水平表达, 而在间质或外胚层来源的肿瘤 (肉瘤、黑素瘤、淋巴瘤) 不表达^[1]。

四、生物学功能

1. 调节细胞间黏附及迁移、调控细胞形态: EpCAM 主要介导非钙离子依赖性的同源细胞之间的黏附, 这种黏附作用较 E - 钙黏蛋白 (E - cadherin) 松散。在生理条件下, EpCAM 通过重排细胞肌动蛋白骨架来实现对细胞运动的调节, 可能有促进细胞迁移的作用。另外, EpCAM 还通过对细胞形态的调控参与上皮组织的发生、发展及肿瘤的成瘤及进展。

2. 调节细胞周期和细胞增生: EpCAM 对细胞周期和细胞增生均有影响^[9]。当把 EpCAM 的全长 cDNA 转染到 EpCAM 阴性的 HEK293 细胞后, HEK293 细胞表达 EpCAM, 细胞周期调节基因 cyclin A/E 及其蛋白、c - myc 基因快速上调表达而促进细胞的代谢及增生。EpCAM 也通过 Wnt 信号通路参与细胞增生过程^[10]。而且, EpICD 的蛋白水解裂解 (proteolytic cleavage) 被证实提供有丝分裂信号。另外, EpCAM 还可通过在转录水平调节细胞周期蛋白 D1 (cyclin D1) 表达并通过与 FHL2 (four and half LIM domains - 2) 作用的能力来直接影响细胞周期^[11]。

3. 参与恶性肿瘤的发生、发展: EpCAM 过表达可能激活与肿瘤发生有关的 Wnt 信号途径。另外, EpCAM 通过促进 Th2 分化阻断树突状细胞的 MHC II 限制性抗原递呈, 产生的 $CD4^+$ T 细胞部分功能缺陷, 使肿瘤细胞逃逸 $CD4^+$ T 细胞依赖性的免疫反应而促成肿瘤进展^[12,13]。在宫颈鳞状上皮及前列腺中, EpCAM 的表达从正常上皮、经由上皮内瘤形成到癌形成均显著增加。在胃癌、乳腺癌、肝癌、舌鳞状细胞癌中, 过表达 EpCAM 的肿瘤细胞具有增生活性高及侵袭性强的特点, 通过 RNA 干扰下调 EpCAM 表达能够降低细胞的增生、迁移和侵袭能力^[14,15]。这些结果进一步证实了 EpCAM 促进肿瘤发生、发展、侵袭方面的作用。但是, 有些研究却显示 EpCAM 的表达在某些情况下对抗肿瘤的生长和转移。鼠结直肠癌细胞转染 EpCAM cDNA 后, 增加了细胞间黏附, 减弱了肿瘤细胞在基质胶的侵袭, 当预先注入鼠的脾脏时减少了肿瘤的发生和转移^[16]。此外, EpCAM 在不同肿瘤的预后判断中起到不同的提示作用。在膀胱癌、胆囊癌、胰腺癌、低分化乳腺癌、肺鳞癌中, EpCAM 高表达与淋巴结转移、肿瘤分期晚和低分化等不良预后因素有关^[17]。而在口腔鳞癌、食管癌、低分化甲状腺癌、肾透明细胞癌中, EpCAM 则是肿瘤预后良好的标志, 与患者生存期延长相关^[18]。EpCAM 担当抑癌基因或致癌基因的角色可能取决于微环境。由于外在的调节与 EpCAM 的异常表达有关, 根据肿瘤类型上调或下调 EpCAM 的表达, 可能成为新的、有潜力的肿瘤治疗方法。

五、EpCAM 与肿瘤的诊断

1. EpCAM 为肿瘤干细胞标记: EpCAM 于 2008 年被鉴定为人胚胎干细胞标记。其后多项研究证实了 EpCAM 为鼠及人胚胎干细胞的多能性及增生性的标记。近年来, 直肠癌、胃癌、胰腺癌、乳腺癌等的研究结果均证实 EpCAM 可作为肿瘤干细胞的标志^[19]。在肝癌的研究中, EpCAM⁺ 的肝癌细胞也同时表达其他肝干细胞标记, 具备自我更新和分化能力及较高的侵袭性, 能够在 NOD/SCID 小鼠 (非肥胖糖尿病联合免疫缺陷小鼠) 中有效诱生高侵袭性的肝癌。2008 年 Yamashita 等^[20]依据 EpCAM 及 AFP 的表达情况将肝细胞癌分为具有预后提示信息的 4 型, 即胆管上皮样肝癌 (EpCAM⁺ AFP⁻)、肝干细胞样肝癌 (EpCAM⁺ AFP⁺)、肝祖细胞样肝癌 (EpCAM⁻ AFP⁺)、成熟肝细胞样肝癌 (EpCAM⁻ AFP⁻)。其中, 肝干细胞样肝癌具备肝癌干细胞样特性, 患者年龄

小, TNM 分期晚, 伴门脉受侵, 预后差。

2. EpCAM 阳性的循环肿瘤细胞检测技术: EpCAM⁺的循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTC)拥有干细胞特性, 能够在原发组织重新种植或转移至远处脏器, 与总的 CTC 相比能够提供更多的临床预后信息^[21]。目前 EpCAM⁺的 CTC 的检测技术包括以整个细胞为基础的技术方法(免疫组织化学、免疫磁性分离、流式细胞术等)和以核酸为基础的技术方法。其中基于免疫磁性分离原理发展起来的 Cell Search 系统, 只需应用 7.5ml 血液样本即可从 400 多亿的血细胞中检测到 1 个 CTC, 敏感度较高。已被美国 FDA 批准应用于临床, 目前主要应用于预测转移性乳腺癌、结直肠癌或前列腺癌的无病生存期和总生存期。临床应用结果表明, 通过 Cell Search 系统检测 CTC 可判断疗效及评估患者预后, 并具备无创、简便、易行的特点, 可对同一患者进行连续监测。2012 年, Sun 等^[22]首次应用 Cell Search 系统对肝癌患者 CTC 进行检测, 结果显示 CTC 在 HCC 患者中检出率为 66.67%。术前 CTC7.5 ≥ 2 为肿瘤复发的独立预后因素。EpCAM 阳性 CTC 作为肝细胞癌的不良预后因素也被 Schulze 等^[23]的研究证实。之后在此基础上发展起来的微流体芯片分离技术较 Cell Search 系统更敏感。Cell Search 系统和微流体芯片技术因其检验对象是血液标本, 无需通过有创手段取得实体肿瘤组织就可进行组织病理学检查, 故又被称为“液体活检”(liquid biopsy), 有望在临床上普及使用^[24]。以核酸为基础的技术方法主要通过多聚酶链反应法(PCR)在外周血标本中检测癌细胞 EpCAM 的 mRNA 来间接提示 EpCAM⁺ CTC 的存在。该研究方法检测的敏感度较高, 但特异性略差。且不能进行细胞形态学及功能等方面的研究^[25]。

六、EpCAM 抗体的治疗应用

目前, 已开发的 EpCAM 抗体主要应用于上皮源性肿瘤治疗的探索。

1. 单克隆抗体: 包括鼠源性 IgG2a 抗体(edrecolomab)、1 个鼠嵌合 IgG1 抗体和全人源 IgG1 抗体(3622W94, ING-1, adecatumumab-MT201)。其中 edrecolomab(ED)是第 1 个用于治疗人类胃肠道肿瘤的单克隆抗体, 并显示出延长整体生存期的临床疗效, 已在德国上市。但随着临床治疗的应用, 发现 ED 对实体瘤的治疗效果有限, 而对术后辅助治疗有一定的帮助。其安全性良好, 但存在半衰期短、鼠抗人单克隆抗体快速中和反应和临床作用不明确等缺陷。

adecatumumab(MT201)介导补体依赖和抗体依赖的细胞毒性反应。与 ED 相比, 此抗体具有不良反应较小、体外试验显示更强的抗体依赖性细胞毒性反应的特点。在转移性乳腺癌患者的 II 期临床试验中, MT201 显示出剂量及靶点依赖性的临床效应, 并且使新的转移灶发生减少。EpCAM 表达阳性的卵巢癌细胞株对 MT201 介导的 ADCC(抗体依赖细胞介导的细胞毒性作用)高度敏感, 白细胞介素-2 能增强 MT201 对 EpCAM⁺卵巢癌细胞的细胞毒性作用。

2. 双特异性三功能抗体: catumaxomab 能够同时特异性识别并结合 EpCAM 阳性肿瘤细胞及 CD3⁺T 细胞, 并通过其 Fc 段形成 ADCC 效应细胞、肿瘤细胞、T 细胞复合体, 触发诱导肿瘤细胞凋亡的多种免疫机制。2009 年 4 月, catumaxomab 被欧盟委员会批准应用于 EpCAM 表达阳性肿瘤患者的恶性腹腔积液的治疗, 显示出仅次于上皮癌的临床获益。Strohlein 等应用 catumaxomab 治疗消化道源性的腹腔肿瘤, 随访 2 年结果显示, 65% 患者无进展生存, 1 例完全缓解, 3 例部分缓解, 取得了延缓疾病进展、延长生存时间的疗效。卵巢癌及胃癌并恶性腹腔积液的临床 III 期实验显示其有效减少腹腔积液产生、延长整体存活时间的确切的临床效果。近期, Jagern 等分析治疗后的腹腔液体样本结果显示, 治疗组肿瘤细胞数目和 VEGF 水平均降低, 激活 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞群数量增高 2 倍, 值得关注的是, 治疗组样本中 CD133⁺和 EpCAM⁺肿瘤干细胞消失。

3. EpCAM 的其他治疗应用: 在肝癌的靶向治疗方面, Ogawa 等新近的研究显示, 以 EpCAM 为靶点的抗毒素 VB4-845 与 5-FU 联用在肝癌细胞系中显示出强效的细胞毒性, 而且 VB4-845 显著抑制肝癌细胞的克隆形成能力及肝干细胞标记(CD133、CD13)的表达。体内试验显示, 5-FU 与 VB4-845 联用显著缩小肝原位移植物模型的肿瘤体积。说明 EpCAM 靶向治疗有望成为预后较差的肝细胞癌的新的治疗方式。

4. 治疗策略中的相关问题: 以 EpCAM 为基础的肿瘤治疗策略是否影响正常上皮组织和干细胞? 正常上皮组织和干细胞与肿瘤细胞 EpCAM 表达水平及表达形式的差异又是否允许抗 EpCAM 靶向治疗? 基于 EpCAM 的靶向治疗之所以可行, 考虑与以下因素有关。(1) 抗体亲和力: edrecolomab 和 adecatumumab 及中等亲和力的人源型抗体 MT201 的治疗耐受性良好。而亲和力最高的抗体, 如 3622W94 和

ING-1 即使在低浓度 (1mg/kg 体重) 下也诱发急性胰腺炎。说明适宜的抗体亲和力为靶向治疗可行的因素之一。(2) EpCAM 的表达部位: EpCAM 低水平表达于大多数正常的人上皮组织的基底外侧膜, 但在癌细胞则高水平地表达于膜顶部, 更容易被抗体接近。这种亚细胞水平的分布差异使 EpCAM 成为非常合适的肿瘤治疗靶点。(3) 正常组织与肿瘤组织 EpCAM 表达形式的差异: 如糖基化、甲基化、共表达蛋白等。在正常组织, EpCAM 与 CD9、CD44 和 Claudin-7 同在一个复合体内, 并位于基外膜。这样, EpCAM 结合抗体的亲和力在正常细胞就比肿瘤细胞低。而且, 在治疗性抗体的生产过程中能够发生与细胞毒性有关的糖类物质成分的变化, 可以解释抗 EpCAM 抗体治疗的安全范围内的不良反应。但治疗性抗 EpCAM 抗体仍存在较多的不良反应, 甚至诱发胰腺炎等严重并发症。因此, 目前临床上保守地局部应用抗 EpCAM 抗体治疗, 不失为最大限度地限制系统性不良反应的方法之一。

虽然 EpCAM 分子相关的肿瘤免疫治疗发展很快, 但临床应用仍很局限。如何将 EpCAM 与肿瘤的分子靶向治疗结合, 并最大限度降低药物不良反应使其临床可行, 有待于今后进一步研究和探讨。

参考文献

- 1 Patriarca C, Macchi RM, Marschner AK, *et al.* Epithelial cell adhesion molecule expression (CD326) in cancer: a short review [J]. *Cancer Treat Rev*, 2012, 38(1):68-75
- 2 Maetzel D, Denzel S, Mack B, *et al.* Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM [J]. *Nat Cell Biol*, 2009, 11(2):162-171
- 3 Kunavisarut T, Kak I, Macmillan C, *et al.* Immunohistochemical analysis based Ep-ICD subcellular localization index (ESLI) is a novel marker for metastatic papillary thyroid microcarcinoma [J]. *BMC Cancer*, 2012, 12:523
- 4 Ralhan R, Cao J, Lim T, *et al.* EpCAM nuclear localization identifies aggressive thyroid cancer and is a marker for poor prognosis [J]. *BMC Cancer*, 2010, 10:331
- 5 Srivastava G, Assi J, Kashat L, *et al.* Nuclear Ep-ICD accumulation predicts aggressive clinical course in early stage breast cancer patients [J]. *BMC Cancer*, 2014, 14(1):726
- 6 Schnell U, Kuipers J, Giepmans B N. EpCAM proteolysis: new fragments with distinct functions? [J]. *Biosci Rep*, 2013, 33(2):e30
- 7 Yamashita T, Budhu A, Forgues M, *et al.* Activation of hepatic stem cell marker EpCAM by Wnt-beta-catenin signaling in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(22):10831-10839
- 8 Winter MJ, Cirulli V, Briare-De BI, *et al.* Cadherins are regulated by Ep-CAM via phosphatidylinositol-3 kinase [J]. *Mol Cell Biochem*, 2007, 302(1-2):19-26
- 9 Schnell U, Cirulli V, Giepmans BN. EpCAM: structure and function

in health and disease [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1828(8):1989-2001

- 10 Shen CI, Lee HC, Kao YH, *et al.* EpCAM induction functionally links to the Wnt-enhanced cell proliferation in human keratinocytes [J]. *Cell Transplant*, 2014, 23(8):1031-1044
- 11 Chaves-Perez A, Mack B, Maetzel D, *et al.* EpCAM regulates cell cycle progression via control of cyclin D1 expression [J]. *Oncogene*, 2013, 32(5):641-650
- 12 Lollini PL, Cavallo F, Nanni P, *et al.* Vaccines for tumour prevention [J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(3):204-216
- 13 Hanson HL, Donermeyer DL, Ikeda H, *et al.* Eradication of established tumors by CD8⁺ T cell adoptive immunotherapy [J]. *Immunity*, 2000, 13(2):265-276
- 14 Yanamoto S, Kawasaki G, Yoshitomi I, *et al.* Clinicopathologic significance of EpCAM expression in squamous cell carcinoma of the tongue and its possibility as a potential target for tongue cancer gene therapy [J]. *Oral Oncol*, 2007, 43(9):869-877
- 15 Zeng Z, Ren J, O'Neil M, *et al.* Impact of stem cell marker expression on recurrence of TACE-treated hepatocellular carcinoma post liver transplantation [J]. *BMC Cancer*, 2012, 12:584
- 16 Basak S, Speicher D, Eck S, *et al.* Colorectal carcinoma invasion inhibition by CO17-1A/GA733 antigen and its murine homologue [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1998, 90(9):691-697
- 17 Ni J, Cozzi P, Hao J, *et al.* Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) is associated with prostate cancer metastasis and chemo/radioresistance via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 45(12):2736-2748
- 18 Van der Gun BT, Melchers LJ, Rutgers MH, *et al.* EpCAM in carcinogenesis: the good, the bad or the ugly [J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31(11):1913-1921
- 19 Gires O, Klein CA, Baeuerle PA. On the abundance of EpCAM on cancer stem cells [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(2):143
- 20 Yamashita T, Forgues M, Wang W, *et al.* EpCAM and alpha-fetoprotein expression defines novel prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(5):1451-1461
- 21 Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells [J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(5):329-340
- 22 Sun YF, Xu Y, Yang XR, *et al.* Circulating stem cell-like epithelial cell adhesion molecule-positive tumor cells indicate poor prognosis of hepatocellular carcinoma after curative resection [J]. *Hepatology*, 2013, 57(4):1458-1468
- 23 Schulze K, Gasch C, Stauffer K, *et al.* Presence of EpCAM-positive circulating tumor cells as biomarker for systemic disease strongly correlates to survival in patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2013, 133(9):2165-2171
- 24 Stott SL, Lee RJ, Nagrath S, *et al.* Isolation and characterization of circulating tumor cells from patients with localized and metastatic prostate cancer [J]. *Sci Transl Med*, 2010, 2(25):25ra23
- 25 Yan Y, Cheng JP, Di LJ, *et al.* Detection and clinical value of epithelial cellular adhesion molecule (EpCAM) mRNA positive circulating tumor cells in metastatic breast cancer [J]. *Beijing Da Xue Xue Bao*, 2012, 44(2):275-280 (收稿日期:2014-10-20)

(修回日期:2014-11-02)