

·儿童肿瘤·

抗 EpCAM 单克隆抗体治疗肝母细胞瘤的动物实验研究

陈立才¹ 李朋飞² 黄一敏¹ 刘江斌¹ 吕志宝¹

【摘要】 目的 观察抗上皮细胞粘附分子(epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)单克隆抗体靶向治疗人肝母细胞瘤(hepatoblastoma, HB)荷瘤鼠模型的疗效。**方法** 体外培养 HB HuH-6 细胞,采用免疫组化检测 HuH-6 细胞中 EpCAM 的表达。将 10 只裸鼠皮下接种 HuH-6 细胞,待建立稳定的 HuH-6 细胞荷瘤鼠模型后,将荷瘤鼠等随机分为两组:实验组经鼠尾静脉注射抗 EpCAM 单克隆抗体,剂量 30 ug/kg,每天 1 次;对照组经鼠尾静脉注射等量生理盐水;两组均给药 3 周。停药 1 周后取荷瘤鼠肿瘤组织进行病理检查,测算肿瘤的重量及体积,并计算抑瘤率。**结果** HuH-6 细胞传代培养成功,免疫组化染色可见其细胞膜 EpCAM 呈阳性表达。裸鼠接种 HuH-6 细胞 6 周后可形成肿瘤体,病理检查证实为 HB,成功建立 HB 荷瘤鼠模型。实验组肿瘤重量及体积分别为 (35.6 ± 2.97) mg 和 (1.12 ± 0.09) cm³,对照组肿瘤重量及体积分别为 (45.8 ± 4.59) mg 和 (1.37 ± 0.77) cm³,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。实验组肿瘤组织 EpCAM 表达阳性率 $(28.3 \pm 5.4)\%$,对照组肿瘤组织 EpCAM 表达阳性率 $(39.7 \pm 4.4)\%$,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 动物实验结果表明,抗 EpCAM 单克隆抗体能够抑制 HB 荷瘤裸鼠肿瘤的生长,为 HB 靶向治疗提供了一定的实验基础和理论依据。

【关键词】 肝母细胞瘤;上皮细胞粘附分子;抗体,单克隆;靶向治疗;模型,动物

【中图分类号】 R726 R735.7 R730.51

Targeting therapy of anti-EpCAM monoclonal antibody in hepatoblastoma animal model. Chen Licai¹, Li Pengfei², Huang Yimin¹, Liu Jiangbin¹, Lv Zhibao¹. 1. Department of General Surgery, Shanghai Children's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200062, China; 2. Department of General Surgery, Children's Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 471003, China. Corresponding author: Liu Jiangbin, Email: ljbin888@163.com

【Abstract】 Objective To explore the efficacy of anti-EpCAM (epithelial cell adhesion molecule) monoclonal antibody for hepatoblastoma (HB) in a nude mice model. **Methods** HB cell line of HuH-6 was cultured and the expression of EpCAM in HuH-6 examined. After HuH-6 cell was inoculated subcutaneously, all mice were randomly divided into treatment and control groups. In treatment group, anti-EpCAM monoclonal antibody was injected into mice by tail vein (30 ug/kg qd daily) for 3 weeks. In control group, the same volume of saline was applied. The expression of EpCAM from implanted tumor mass was detected by immunohistochemistry. Weight and volume of implanted tumor were measured and then tumor inhibition rate was calculated 1 week later. **Results** HuH-6 cell was successfully sub-cultured and the expression of EpCAM was positive on cell membrane. After 6-week cell implantation, mass was confirmed as HB by histopathological examination. Compared with control group, anti-EpCAM monoclonal antibody could significantly inhibit tumor growth in control group. Tumor weight and volume were smaller in treatment group than those in control group [tumor weight: (35.6 ± 2.97) vs. (45.8 ± 4.59) mg ($P < 0.05$); tumor size: (1.12 ± 0.09) vs. (1.37 ± 0.77) cm³ ($P < 0.05$)]. The positive rate of EpCAM expression was $(28.3 \pm 5.4)\%$ in tumor tissue of experimental group and $(39.7 \pm 4.4)\%$ in tumor tissue of control group. The positive rate of EpCAM expression was lower in tumor tis-

DOI:10.3969/j.issn.1671-6353.2019.01.014

基金项目:上海市卫生与计划生育委员会重点课题(编号:201440031)

作者单位:1.上海交通大学附属儿童医院普外科(上海市,200062);
2.郑州大学附属儿童医院普外科(河南省郑州市,471003)

通讯作者:刘江斌, Email: ljbin888@163.com

sue of experimental group than that of control group. And the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Anti-EpCAM monoclonal antibody can inhibit the growth of HB tumor cells in a murine model. And it serves as a potential monoclonal targeting therapy for pediatric HB.

【Key words】 Hepatoblastoma; EpCAM; Antibodies, Monoclonal; Targeting Therapy; Models, Animal

肝母细胞瘤 (hepatoblastoma, HB) 是最常见的儿童肝脏恶性肿瘤。近年来,随着手术技术的提高和化疗方案的改进,HB 的治疗效果得到了显著提升^[1-3]。但对于晚期、复发或已出现病灶转移的病例,治疗效果仍不理想^[4,5]。上皮细胞粘附分子 (epithelial cell adhesion molecule, EpCAM) 是一种跨膜糖蛋白,不仅参与同源细胞间的粘附,还可通过介导细胞内信号转导参与细胞迁移、转移、增殖、分化等过程,并与肿瘤的恶性程度相关^[6,7]。目前,有关抗 EpCAM 单克隆抗体靶向治疗的报道日渐增多,但其用于小儿恶性实体肿瘤治疗的报道相对较少。因此,我们拟通过动物实验初步评估抗 EpCAM 单克隆抗体靶向治疗 HB 荷瘤鼠的疗效,为小儿 HB 靶向治疗提供实验基础和理论依据。

材料与方法

一、实验材料

1. 细胞株 HB HuH-6 肿瘤细胞株购于中国科学院上海细胞研究所。

2. 实验动物 SPF 级裸小鼠 (上海斯莱克实验动物有限责任公司) 10 只,雄性,6~8 周龄,体质量 (20 ± 2) g。饲养条件:温度 $20^{\circ}\text{C} \sim 25^{\circ}\text{C}$,相对湿度 30%~70%,12 h 明暗交替人工光照,供应无菌饲料和无菌水。实验获得上海市儿童医院实验动物管理及伦理委员会批准。

3. 主要试剂与仪器 10% 胎牛血清、DMEM 培养基及胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司。鼠抗人 EpCAM 单克隆抗体购自 Abcam 公司。广谱二抗试剂盒、DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥公司。 CO_2 恒温培养箱购自日本 SANYO 公司。正置显微镜购自日本 Olympus 公司。

二、实验方法

1. HuH-6 细胞株培养和鉴定 HuH-6 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 37°C 、5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养,每 2~3 天换液 1 次,0.25% 胰蛋白酶消化传代。培养至实验所需细胞数后制成 $5 \times 10^6 \text{ U/mL}$ 的细胞悬液备用,HE 染色后采用免疫组化检测 EpCAM 在 HuH-6 细胞的表达。

2. HB 移植瘤模型的建立 实验动物经过 3 d 适应期观察,适应期结束后,每只裸鼠肩胛区皮下注射 HuH-6 细胞悬液 $100 \mu\text{L}$ (约含 5×10^5 个细胞),注射时针头在皮下潜行 1 cm 后再注射,注射完毕拔出针头,无菌棉签轻压进针点 5 min,以避免肿瘤细胞流出。整个操作流程于无菌环境下进行。每天观察瘤体生长情况,游标卡尺测量肿瘤大小。

3. 单克隆抗体药物实验 当裸鼠移植瘤直径增大到 5 mm 左右时进行干预实验。将荷瘤鼠随机分为两组,每组 5 只。实验组经鼠尾静脉注射抗 EpCAM 单克隆抗体 (每次 $30 \mu\text{g/kg}$,每天 1 次,连续给药 3 周)。对照组经鼠尾静脉注射等量生理盐水,注射频率与持续时间同实验组。每天观察裸鼠生长、进食、活动情况,每 3 天测量裸鼠体质量及肿瘤大小 1 次。停药 1 周后,裸鼠颈椎脱臼处死,切取裸鼠皮下肿瘤组织,记录肿瘤重量、体积,并计算抑瘤率。肿瘤体积 = 长 \times 宽 \times 高 $\times \pi/6$,抑瘤率 = (对照组平均重量 - 实验组平均重量)/对照组平均重量 $\times 100\%$ 。

4. HE 染色 肿瘤组织 HE 染色:肿瘤组织 10% 甲醛溶液固定,常规脱水,石蜡包埋,切片后行苏木精-伊红染色,光学显微镜下观察。肿瘤细胞 HE 染色:细胞用胰酶消化后,按 $(1 \sim 5) \times 10^5/\text{mL}$ 的细胞密度在灭菌 12 孔板中铺上细胞爬片 (圆片)。取细胞悬液分别滴于圆片上,30 min 后在培养皿中补加培养液,置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 6 h 左右,HE 染色方法同前。

5. 免疫组化 肿瘤组织免疫组化:肿瘤组织 10% 甲醛溶液固定,常规脱水,石蜡包埋,制作切片; 60°C 烤箱内烤片 30 min,二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化,3% H_2O_2 除去内源性过氧化氢酶,柠檬酸缓冲液修复抗原,血清封闭,加一抗,于 4°C 保存过夜;加二抗, 37°C 温箱中 30 min,加 DAB 显色剂,苏木素复染,无水乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。肿瘤细胞免疫组化:细胞爬片制备和免疫组化方法同前。由 2 位病理医师独立观察,随机选取 10 个有代表性的视野进行计数,细胞膜出现棕黄色颗粒判定为阳性。染色程度评分^[8]:基本不着色计 0 分,着色淡计 1 分,着色适中计 2 分,着色深计 3 分。着色

细胞占计数细胞的百分率分为4个计分等级: $\leq 5\%$ 计0分, $6\% \sim 25\%$ 计1分, $26\% \sim 50\%$ 计2分; $\geq 51\%$ 计3分。染色程度与染色细胞百分率得分相乘,其乘积为最后得分(总得分区间0~9分),得分大于3分判定为EpCAM阳性。阳性表达率 = EpCAM阳性表达数/总观察数。

三、统计学方法

采用SPSS19进行统计分析。裸鼠皮下肿瘤的重量、体积及EpCAM阳性表达率采用($\bar{x} \pm s$)进行统计学描述,两组间比较采用独立样本 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、HuH-6细胞HE染色及免疫组化

HE染色显微镜下可见肿瘤细胞呈梭形,大小基本一致,细胞核较大,核深染。EpCAM免疫组化见HuH-6细胞膜上的棕黄色颗粒,胞浆内可见少量表达(图1、图2)。

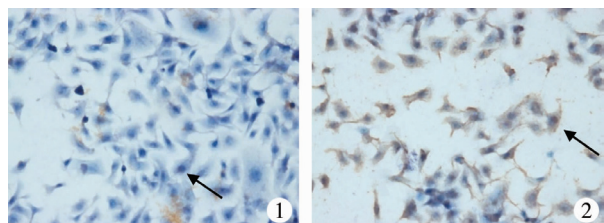


图1 HuH-6细胞传代培养($\times 200$ 倍),镜下见肿瘤细胞呈梭形,大小基本一致,细胞核较大,核深染 图2 HuH-6细胞EpCAM免疫组化检测($\times 200$ 倍),镜下见细胞膜上的棕黄色颗粒,胞浆内可见少量表达

Fig.1 Subculture of HuH-6 cell ($\times 200$). The tumor cells were spindle, almost uniform in size, with large and hyperchromatic nucleus **Fig. 2** Immunohistochemical staining of EpCAM expression ($\times 200$). The yellow-brown granules are seen on the cell membrane, with little expression in the cytoplasm

二、建立HuH-6细胞荷瘤鼠模型

10只裸鼠均成功接种肿瘤细胞。皮下接种4周后裸鼠出现皮下肿块,呈结节样隆起,质地韧。肿块表面皮肤无明显色泽改变,随着时间的变化,肿瘤体积逐渐增大,质地变硬。

三、肿瘤重量、体积及抑瘤率

皮下接种6周后于体表测量肿瘤直径达4~5 mm时进行干预实验,实验中两组裸鼠的进食、排泄、活动及体质量情况均无明显异常。试验完成后取出瘤体。实验组肿瘤重量及体积分别为(35.6 ± 2.97) mg 和 (1.12 ± 0.09) cm^3 ,对照组分别为(45.8

± 4.59) mg 和 (1.37 ± 0.77) cm^3 ,实验组肿瘤重量及体积均小于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),抗EpCAM单克隆抗体对HuH-6的抑瘤率达22%。见表1、表2。

表1 两组裸鼠皮下肿瘤重量(mg)

Table 1 Weight of nude mice (mg)

组别	肿瘤重量(mg)
实验组	35.6 ± 2.97
对照组	45.8 ± 4.59
t 值	-4.199
P 值	0.003

表2 两组裸鼠皮下肿瘤体积(cm^3)

Table 2 Subcutaneous tumor volume of two nude mice groups (cm^3)

组别	肿瘤体积(cm^3)
实验组	1.12 ± 0.09
对照组	1.37 ± 0.77
t 值	-4.667
P 值	0.002

四、肿瘤组织HE染色及免疫组化

裸鼠皮下瘤体细胞为纺锤形,核大,与小儿HB肿瘤组织病理特点相似。免疫组化染色EpCAM阳性,可见棕黄色颗粒,主要表达在细胞膜,部分表达于胞浆(图3、图4),与传代培养的HuH-6细胞免疫组化染色检查结果一致。实验组肿瘤组织EpCAM表达阳性率(28.3 ± 5.4)%,对照组肿瘤组织EpCAM表达阳性率(39.7 ± 4.4)%,实验组肿瘤组织EpCAM表达阳性率小于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表3。两组的组织结构无明显差异,实验组及对照组肿瘤细胞均无凋亡。

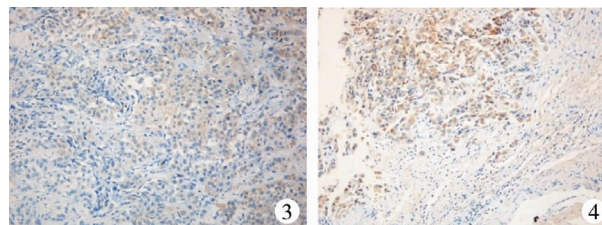


图3 实验组免疫组化结果图 图4 对照组免疫组化结果图 裸鼠皮下肿瘤EpCAM免疫组化染色($\times 20$ 倍)

Fig.3 Treatment group **Fig.4** Control group Immunohistochemical staining of subcutaneous tumors in nude mice ($\times 20$). The nucleus of tumor cells were large and deeply stained, with cell membrane positive in yellow-brown.

表3 两组裸鼠肿瘤组织 EpCAM 表达阳性率(%)

Table 3 Positive rates of EpCAM expression in tumor tissues of two nude mice groups (%)

组别	EpCAM 表达阳性率(%)
实验组	28.3 ± 5.4
对照组	39.7 ± 4.4
t 值	3.662
P 值	0.006

讨论

HB 的治疗方法以手术为主,以化疗、介入、消融为辅^[9],2年和5年生存率分别为81.4%和72.0%^[2],但复发或伴远处转移的HB患儿5年生存率仅15%~20%^[10]。因此探索新的HB治疗手段是提高HB疗效的重要途径之一^[11]。

EpCAM 在大部分正常上皮细胞中少量表达,而在大部分恶性肿瘤(如肝细胞肝癌、肝内胆管癌、胰腺癌、结肠癌、乳腺癌等)组织中则呈高表达,并提示预后极差^[12]。最新研究发现 EpCAM 在小儿肝母细胞瘤中也呈高表达,有学者对61例HB儿童肿瘤组织进行免疫组化检测,发现 EpCAM 在HB肿瘤组织中表达率为83.6%,可考虑将其作为HB肿瘤的标志物^[13-14]。同时,EpCAM 在HB肿瘤组织中呈特异性高表达这一特征也为 EpCAM 靶向治疗 HB 提供了前提条件。

肿瘤细胞裸鼠皮下移植瘤模型是目前应用较为广泛的肿瘤造模方法之一,由于移植瘤对动物的致病机制与人类类似,因此适用于肿瘤发病机理、药物靶向治疗等方面的研究。在裸鼠皮下注射 HuH-6 细胞构建人 HB 裸鼠移植瘤模型可以模拟 HB 在人体的生长过程,因此可作为 HB 诊疗研究的重要手段之一^[15]。Naundorf S 等^[16]在裸鼠皮下注射 HT-29(人结肠癌)细胞悬液建立肿瘤移植瘤模型,并使用抗 EpCAM 单克隆抗体经鼠尾静脉注射,旨在研究抗 EpCAM 单克隆抗体对人结肠癌的疗效,目前抗 EpCAM 单克隆抗体已应用于治疗结直肠癌肝转移的临床实验研究中。本研究建立的动物模型亦采用裸鼠皮下肿瘤细胞移植的方法,并经鼠尾静脉注射抗 EpCAM 单克隆抗体干预荷瘤鼠,可在一定程度上反映抗 EpCAM 单克隆抗体对 HB 肿瘤的治疗作用^[17]。

抗 EpCAM 单克隆抗体早已应用于实验和临床研究,Edrecolomab 是一种小鼠抗 EpCAM 抗原的单

克隆 IgG2a 抗体,它能识别人类肿瘤相关抗原 17-1A,作用机制包括抗体依赖细胞和补体介导的细胞毒作用^[10],也可能和抗个体基因型网络的诱导有关^[18]。此单抗 1994 年在德国上市,并开展了乳腺癌和结直肠癌的临床试验,最初报道其单用或联用均可有效改善患儿复发及生存情况,但随后的大样本临床随机对照试验结果显示,其单用或联用对术后Ⅱ、Ⅲ期结直肠癌都是无效的^[19]。Edrecolomab 临床疗效不显著可能与下列因素有关:第一,肿瘤细胞靶抗原表达不均匀可能限制单一特异性抗体治疗的疗效;第二,Edrecolomab 对靶抗原的亲合力低;第三,Edrecolomab 本质为鼠源性^[20]。但由于 Edrecolomab 具有毒性小、耐受性好、不加重 5-Fu 等其他辅助治疗毒性的优势,因此仍可将其视为实体瘤的辅助治疗药物。

虽然第一代鼠源性单克隆抗体 Edrecolomab 的临床疗效不够理想,但经过改良后,新一代抗 EpCAM 单克隆抗体 Adecatumumab(MT201)的临床疗效得到了显著提升。Adecatumumab 是一个完全的人源性重组 IgG1 单克隆抗体,主要依靠 ADCC 途径介导免疫杀伤。实验发现,Adecatumumab 具有比 Edrecolomab 更强烈的 ADCC 细胞毒性反应,IB 期临床实验发现其对乳腺癌有显著治疗效果^[21]。此外,Adecatumumab 比鼠源性 Edrecolomab 有着更长的半衰期,并且在转移性乳腺癌和早期前列腺癌治疗的Ⅱ期临床实验中表现出良好的耐受性。目前 Adecatumumab 联合使用多烯紫杉醇类药物的 IB 期临床实验和结直肠癌肝转移肿瘤切除后患者的Ⅱ期临床试验正在进行中^[22,23]。

抗 EpCAM 双特异性抗体已经研制成功,并在临床实验研究中取得了显著疗效。Brischwein 等^[24]研制的 EpCAM/CD3 双特异性单克隆抗体 MT110 能激活 CD8⁺T 细胞,分泌白介素、干扰素、肿瘤坏死因子引起肿瘤细胞溶解,实验中 MT110 成功清除了鼠皮肤转移性卵巢癌。随后证实,MT110 只有在靶抗原存在的情况下才会激活 T 细胞诱导细胞溶解,因此 MT110 是一种安全、有效的双特异性抗体,可作为 EpCAM 过表达肿瘤治疗的一种选择。目前,MT110 已应用于结直肠癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、肺癌等肿瘤体内外模型的治疗研究中,临床前期效果明显^[25]。Catumaxomab 是一种能与 EpCAM 分子、CD3 抗原以及 FC 受体特异结合的三功能双特异性抗体。目前,Catumaxomab 应用于胃肠道肿瘤及上皮源性卵巢癌恶性腹水的Ⅰ~Ⅲ期

临床研究已经完成,并已应用于胃癌、卵巢癌的术中及术后辅助化疗,其安全性、耐受性、药动学良好,抗肿瘤活性效果显著,可明显延长肿瘤患者的生存期。同时,Catumaxomab 应用于非小细胞肺癌及恶性胸腔积液的 I、II 期临床研究也已经完成^[26-28]。

本研究还发现,抗 EpCAM 单克隆抗体治疗的 HuH-6 荷瘤鼠肿瘤重量和体积明显小于对照组,且抑瘤率达 22%,表明抗 EpCAM 单克隆抗体对 HB 肿瘤细胞生长具有明显的抑制作用,且实验组裸鼠的饮食、活动较对照组无明显变化,亦未出现死亡裸鼠,因此可以认为 EpCAM 单克隆抗体的体内毒性较小。但一般而言,靶向治疗的动物实验肿瘤抑制率达到 50% 以上才可进入临床实验,本研究中肿瘤抑制率仅 22%,可能与本实验所用单克隆抗体为鼠源性抗人 EpCAM 单克隆抗体有关。目前已有双特异性抗 EpCAM 抗体抑制培养的肿瘤细胞增殖的报道,效果理想^[29],为今后临床开展 HB 靶向治疗提供了研究基础。

参考文献

- Meyers RL, Czauderna P, Otte JB. Surgical treatment of hepatoblastoma[J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2012, 59(5): 800-808. DOI: 10.1002/pbc.24220.
- 董焱然. 我国儿童胚胎性恶性实体肿瘤的研究和治疗进展[J]. *临床小儿外科杂志*, 2017, 16(5): 417-421. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6353.2017.05.001.
Dong KR. Diagnosis and treatment of embryonic malignant tumors in children in China[J]. *J Clin Ped Sur*, 2017, 16(5): 417-421. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6353.2017.05.001.
- Karski EE, Dvorak CC, Leung W, et al. Treatment of hepatoblastoma with high-dose chemotherapy and stem cell rescue: the pediatric blood and marrow transplant consortium experience and review of the literature[J]. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2014, 36(5): 362-368. DOI: 10.1097/MPH.0000000000000130.
- Hishiki T, Matsunaga T, Sasaki F, et al. Outcome of hepatoblastomas treated using the Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor (JPLT) protocol-2: report from the JPLT[J]. *Pediatr Surg Int*, 2011, 27(1): 1-8. DOI: 10.1007/s00383-010-2708-0.
- O'Neill AF, Towbin AJ, Krailo MD, et al. Characterization of Pulmonary Metastases in Children With Hepatoblastoma Treated on Children's Oncology Group Protocol AHEP0731 (The Treatment of Children With All Stages of Hepatoblastoma): A Report From the Children's Oncology Group[J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35(30): 3465-3473. DOI: 10.1200/JCO.2017.73.5654.
- 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. DOI: 10.1016/j.ctrv.2011.04.002.
- Gires O, Stoecklein NH. Dynamic EpCAM expression on circulating and disseminating tumor cells: causes and consequences[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71(22): 4393-402. DOI: 10.1007/s00018-014-1693-1.
- Wang MH, Sun R, Zhou XM, et al. Epithelial cell adhesion molecule overexpression regulates epithelial-mesenchymal transition, stemness and metastasis of nasopharyngeal carcinoma cells via the PTEN/AKT/mTOR pathway[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(1): 2. DOI: 10.1038/s41419-017-0013-8.
- 史淑君, 康权. 儿童离体或半离体肝切除自体肝移植术-不可切除性肝脏肿瘤的新治疗方式[J]. *临床小儿外科杂志*, 2017, 16(6): 537-541. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6353.2017.06.004.
Shi SJ, Kang Q. Ex vivo liver tumor resection techniques and liver autotransplantation: another resource for otherwise unresectable malignancy in children[J]. *J Clin Ped Sur*, 2017, 16(6): 537-541. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6353.2017.06.004.
- Ismail H, Broniszczak D, Kaliciński P, et al. Changing treatment and outcome of children with hepatoblastoma: analysis of a single center experience over the last 20 years[J]. *J Pediatr Surg*, 2012, 47(7): 1331-1339. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2011.11.073.
- Armeanu-Ebinger S, Hoh A, Wenz J, et al. Targeting EpCAM (CD326) for immunotherapy in hepatoblastoma[J]. *Oncoimmunology*, 2013, 2(1): e22620. DOI: 10.4161/onci.22620.
- Martowicz A, Seeber A, Untergasser G, et al. The role of EpCAM in physiology and pathology of the epithelium[J]. *Histol Histopathol*, 2016, 31(4): 349-355. DOI: 10.14670/HH-11-678.
- Kurtz JE, Dufour P. Adecatumumab: an anti-EpCAM monoclonal antibody, from the bench to the bedside[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2010, 10(6): 951-958. DOI: 10.1517/14712598.2010.482098.
- Yun WJ, Shin E, Lee K, et al. Clinicopathologic implication of hepatic progenitor cell marker expression in hepatoblastoma[J]. *Pathol Res Pract*, 2013, 209(9): 568-573. DOI: 10.1016/j.prp.2013.06.015.

- 15 Browne M, Stellmach V, Cornwell M, et al. Gene transfer of pigment epithelium-derived factor suppresses tumor growth and angiogenesis in a hepatoblastoma xenograft model [J]. *Pediatric Research*, 2006, 60(3): 282-287. DOI: 10.1203/01.pdr.0000232789.86632.91.
- 16 Naundorf S, Preithner S, Mayer P, et al. In vitro and in vivo activity of MT201, a fully human monoclonal antibody for pancreatic carcinoma treatment [J]. *International Journal of Cancer*, 2002, 100(1): 101-110. DOI: 10.1002/ijc.10443.
- 17 Segota E, Bukowski RM. The promise of targeted therapy: cancer drugs become more specific [J]. *Cleveland Clin J Med*, 2004, 71(7): 551-560.
- 18 Munz M, Baeuerle PA, Gires O. The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(14): 5627-5629. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0654.
- 19 Punt CJ, Nagy A, Douillard JY, et al. Edercolomab alone or in combination with fluorouracil and folinic acid in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: a randomised study [J]. *Lancet*, 2002, 360(9334): 671-677. DOI: 10.1016/S0140-6736(02)09836-7.
- 20 高茜, 王永生. 基于肿瘤相关抗原 Ep-CAM 的免疫治疗现状 [J]. *山东医药*, 2008, 48(14): 146-147. DOI: 10.3969/j.issn.1002-266X.2008.14.108.
Gao X, Wang YG. Current status of immunotherapy based on tumor associated antigen Ep-CAM [J]. *Shandong Medical Journal*, 2008, 48(14): 146-147. DOI: 10.3969/j.issn.1002-266X.2008.14.108.
- 21 Schmidt M, Rüttinger D, Sebastian M, et al. Phase IB study of the EpCAM antibody adecatumumab combined with docetaxel in patients with EpCAM-positive relapsed or refractory advanced-stage breast cancer [J]. *Ann Oncol*, 2012, 23(9): 2306-2313. DOI: 10.1093/annonc/mdr625.
- 22 Richter CE, Cocco E, Bellone S, et al. High-grade, chemotherapy-resistant ovarian carcinomas overexpress epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) and are highly sensitive to immunotherapy with MT201, a fully human monoclonal anti-EpCAM antibody [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2010, 203(6): 582 e1-7. DOI: 10.1016/j.ajog.2010.07.041.
- 23 Marschner N, Rüttinger D, Zugmaier G, et al. Phase II study of the human anti-epithelial cell adhesion molecule antibody adecatumumab in prostate cancer patients with increasing serum levels of prostate-specific antigen after radical prostatectomy [J]. *Urol Int*, 2010, 85(4): 386-395. DOI: 10.1159/000318055.
- 24 Brischwein K, Schlereth B, Guller B, et al. MT110: a novel bispecific single-chain antibody construct with high efficacy in eradicating established tumors [J]. *Mol Immunol*, 2006, 43(8): 1129-1143. DOI: 10.1016/j.molimm.2005.07.034.
- 25 Fiedler WM, Ritter B, Seggewiss R, et al. Phase I safety and pharmacology study of the EpCAM/CD3-bispecific BiTE antibody MT110 in patients with metastatic colorectal, gastric, or lung cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(15S): 2573-2573. DOI: 10.1200/jco.2010.28.15_suppl.2573.
- 26 Ströhlein M, Lordick F, Rüttinger D, et al. Peritoneal carcinomatosis immunotherapy with the trifunctional anti-EpCAM x anti-CD3 antibody catumaxomab in patients with colon, gastric, or pancreatic cancer: Long-term results after a 2-year follow-up [J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(15): 302-323.
- 27 Parsons S, Murawa PX, Koralewski P, et al. Intraperitoneal treatment of malignant ascites due to epithelial tumors with catumaxomab: A phase II/III study [J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(15S): 3000. DOI: 10.1200/jco.2008.26.15_suppl.3000.
- 28 Heiss MM, Ströhlein MA, Bokemeyer C, et al. The role of relative lymphocyte count as a biomarker for the effect of catumaxomab on survival in malignant ascites patients: results from a phase II/III study [J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(12): 3348-3357. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2351.
- 29 Sulpice L. Epithelial cell adhesion molecule is a prognosis marker for intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. *J Surg Res*, 2014, 192(1): 117-23. DOI: 10.1016/j.jss.2014.05.017.

(收稿日期: 2018-01-28)

本文引用格式: 陈立才, 李朋飞, 黄一敏, 等. 抗 EpCAM 单克隆抗体治疗肝母细胞瘤的动物实验研究 [J]. *临床小儿外科杂志*, 2019, 18(1): 63-68. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6353.2019.01.014.

Citing this article as: Chen LC, Li PF, Huang YM, et al. Targeting therapy of anti-EpCAM monoclonal antibody in hepatoblastoma animal model [J]. *J Clin Ped Sur*, 2019, 18(1): 63-68. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6353.2019.01.014.