

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2023.01.002

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220927.1101.006.html\(2022-09-28\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220927.1101.006.html(2022-09-28))

基于 EpCAM 核酸适配体分子信标的构建及其对胃癌细胞的靶向成像研究*

靳思涵¹, 李佳宁², 孙芳², 李鑫¹, 张书睿³, 李婉明^{1△}

(1. 中国医科大学卫生部细胞生物学重点实验室/医学细胞生物学教育部重点实验室/生命科学学院细胞生物学教研室, 沈阳 110122; 2. 中国医科大学临床三系, 沈阳 110122; 3. 中国医科大学第一临床学院, 沈阳 110001)

[摘要] **目的** 设计并构建靶向上皮细胞黏附分子(EpCAM)的核酸适配体分子信标 MAB-SYL3L 用于胃癌细胞的靶向识别/成像。**方法** 根据分子信标探针的设计原则,将靶向 EpCAM 的核酸适配体 SYL3 进行适当的截短,构建核酸适配体分子信标 MAB-SYL3L。采用流式细胞术对 MAB-SYL3L 的特异性和亲和性进行分析,并观察不同温度下 MAB-SYL3L 的结合能力;采用流式细胞术和荧光显微镜对 MAB-SYL3L 与 SGC-7901 细胞一步法靶向识别/成像进行分析。**结果** 构建的 MAB-SYL3L 与 SGC-7901 细胞的结合具有高亲和性和高特异性,解离常数为 $(47.0 \pm 3.8) \text{ nmol/L}$ 。MAB-SYL3L 与 SGC-7901 细胞的结合不受温度的影响,不需洗涤过程便能一步法实现 SGC-7901 细胞的靶向识别/成像。**结论** 成功构建出基于 EpCAM 的核酸适配体分子信标 MAB-SYL3L,建立了一种快速、便捷的胃癌细胞靶向识别/成像方法。

[关键词] 核酸适配体;分子信标;胃癌;靶向识别;靶向成像**[中图法分类号]** R730.4**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2023)01-0006-05

Construction of molecular beacon based on EpCAM aptamer and its targeting imaging study on gastric cancer cells*

JIN Sihan¹, LI Jianing², SUN Fang², LI Xin¹, ZHANG Shurui³, LI Wanming^{1△}

(1. Key Laboratory of Cellular Biology, Ministry of Public Health, and Key Laboratory of Medical Cell Biology, Ministry of Education, Department of Cell Biology, College of Life Sciences, China Medical University, Shenyang, Liaoning 110122, China; 2. Third Faculty of Clinic, China Medical University, Shenyang, Liaoning 110122, China; 3. First Clinical College of China Medical University, Shenyang, Liaoning 110001, China)

[Abstract] **Objective** To design and construct EpCAM-targeted aptamer molecular beacon (MAB-SYL3L) for the targeted recognition/imaging of gastric cancer cells. **Methods** According to the design principle of the molecular beacon probe, the nucleic acid aptamer SYL3 targeting Ep-CAM was appropriately truncated, and the nucleic acid aptamer molecular beacon MAB-SYL3L was constructed. The specificity and affinity of MAB-SYL3L were analyzed by flow cytometry, as well as the binding capacity of MAB-SYL3L in different temperatures was also investigated. In addition, the one-step targeting identification/imaging of MAB-SYL3L and gastric cancer cell SGC-7901 was analyzed by flow cytometry and fluorescence microscopy. **Results** The constructed binding of MAB-SYL3L to gastric cancer cell SGC-7901 had high affinity and high specificity, with a dissociation constant of $(47.0 \pm 3.8) \text{ nmol/L}$. The binding of MAB-SYL3L to gastric cancer cell SGC-7901 was not only unaffected by temperature, but also could achieve targeted recognition/imaging of gastric cancer cell SGC-7901 in one step without the need for a washing process. **Conclusion** The aptamer molecular beacon MAB-SYL3L based on EpCAM is successfully constructed, and a fast and convenient method for targeted recognition/imaging of gastric cancer cells is established.

[Key words] aptamer; molecular beacon; gastric cancer; targeted recognition; targeted imaging

* 基金项目:辽宁省自然科学基金项目(2020-MS-164);沈阳市中青年科技创新人才支持计划项目(RC190261)。作者简介:靳思涵(1999—),学士,主要从事核酸适配体的筛选研究。△ 通信作者, E-mail: wml@cmu.edu.cn。

胃癌是全球第 5 大常见的癌症,也是导致癌症相关死亡的第 3 大原因^[1]。胃癌早期诊断率较低,导致患者发现时已进入晚期,易转移,预后差,生存率降低^[2]。因此,设计特异性、灵敏度更高的靶向诊断探针在实现胃癌早期诊断中具有重要的价值。

核酸适配体(aptamer)是一类能特异性识别靶标的分子探针,可以折叠成不同的三维空间结构(如发夹、假结等)与靶标发生结合,又称为“化学抗体”^[3]。与蛋白类抗体相比,核酸适配体因具有高亲和力和特异性、分子量小、稳定性高、易于化学修饰等优势,成为肿瘤早期诊断领域的理想分子探针^[4]。然而常规的核酸适配体荧光探针往往是“常亮式”的,容易产生假阳性,需要经过多次的洗涤步骤,操作过程繁杂,难以完成某些特定靶标的准确检测^[5]。核酸适配体分子信标是一种“激活式”分子探针,使用时操作简单、背景低,可以高选择性高特异性地结合目的分子,不需要经过洗涤步骤,即可一步法完成原位实时检测。本研究拟在靶向上皮细胞黏附分子(epidermal growth factor receptor, EpCAM)的核酸适配体 SYL3 的基础上,设计构建“激活式”分子探针——核酸适配体分子信标 MAB-SYL3L,分析其亲和性、特异性、生物活性及其对胃癌细胞的靶向识别,为核酸适配体分子信标的应用及胃癌的早期诊断提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

人胃癌细胞 SGC-7901 及人胚肾上皮细胞 HEK-293 均由实验室保存;实验室中所需适配体及文库(Library)均委托上海生工生物有限公司合成,以 HPLC 方式纯化。TU-1901 紫外-可见分光光度计购自北京普析通用有限责任公司;荧光倒置显微镜 Axio observer Z1 购自德国 Zeiss 公司;流式细胞仪 FAC-Salibur 购自美国 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

SGC-7901 细胞和 HEK-293 细胞均使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,在 37 ℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养,取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 核酸适配体分子信标的构建

根据 EpCAM 的核酸适配体 SYL3 的二级结构特征,在保留功能性结合区域的基础上进行截短处理,截短序列命名为 SYL3L。在此基础上,根据分子信标设计的 3 大原则:茎部序列不能过长,序列中 GC 含量不能过高,荧光基团和淬灭基团之间的距离适宜,设计构建核酸适配体分子信标 MAB-SYL3L,即在 5' 末端添加荧光基团 FAM,在 3' 末端添加淬灭基团 BHQ1。

1.2.3 分光光度计检测 MAB-SYL3L 的荧光情况

将合成的 FAM-SYL3L 和 MAB-SYL3L 溶于 PBS 中,取 100 μL 加入比色杯中,利用 TU-1901 紫

外-可见光分光光度计检测溶液的荧光情况。

1.2.4 流式细胞术检测 MAB-SYL3L 与不同细胞系的结合情况

取对数生长期的 SGC-7901 细胞和 HEK-293 细胞用无酶细胞消化液消化后制成细胞悬液。分别加入 FAM-SYL3L 或 MAB-SYL3L (终浓度 250 nmol/L) 4 ℃ 孵育 30 min, PBS 洗涤 2 次,加入 300 μL PBS 重悬细胞,流式细胞仪检测细胞的荧光信号。

1.2.5 Western blot 检测不同细胞系中 EpCAM 的表达情况

收集对数生长期的 SGC-7901 细胞和 HEK-293 细胞,加入细胞裂解液冰上孵育 20 min, 4 ℃, 12 000 r/min 离心 30 min, 收集蛋白上清液,通过 BCA 法测定蛋白浓度。向蛋白样品中加入 5 × loading buffer, 煮沸 5 min。取煮沸后样品注入加样孔, 80 V 30 min, 120 V 60 min 电泳。电泳结束后 80 V 恒压转膜, 封闭 60 min 后进行抗体孵育, EpCAM 抗体购自英国 Abcam 公司, 一抗在 4 ℃ 孵育过夜, 二抗室温孵育 1 h, 结束后通过成像系统进行结果分析。

1.2.6 流式细胞术检测 MAB-SYL3L 的亲和力

配制不同浓度的 MAB-SYL3L (终浓度分别为 0、1 nmol/L、2 nmol/L、4 nmol/L、8 nmol/L、16 nmol/L、32 nmol/L、64 nmol/L、128 nmol/L、256 nmol/L、512 nmol/L), 利用流式细胞仪检测细胞的荧光信号。利用 SigmaPlot 软件对各浓度 MAB-SYL3L 与 SGC-7901 细胞结合的平均荧光强度进行分析, 得到相关结合曲线及 K_d 值。

1.2.7 流式细胞术检测不同温度下 MAB-SYL3L 的结合能力

收集对数生长期的 SGC-7901 细胞, 分别与 MAB-SYL3L (终浓度 250 nmol/L) 在 4 ℃、25 ℃ 和 37 ℃ 下孵育 30 min, PBS 洗涤 2 次后, 加入 300 μL PBS 重悬细胞, 流式细胞仪检测细胞的荧光信号。

1.2.8 荧光显微镜观察 MAB-SYL3L 对 SGC-7901 细胞的靶向成像

取对数生长期的 SGC-7901 细胞铺于激光共聚焦小皿内, 置于细胞培养箱过夜培养后取出, PBS 洗涤细胞, 分别加入 FAM-SYL3L 和 MAB-SYL3L, 在 4 ℃ 孵育 30 min 后, 分别进行洗涤步骤或无洗涤步骤, 使用荧光倒置显微镜观察并拍照。

2 结果

2.1 MAB-SYL3L 的构建

将靶向 EpCAM 的核酸适配体 SYL3 从 79 nt 长度截短至 43 nt 的截短序列 SYL3L (图 1), 在此基础上构建核酸适配体分子信标 MAB-SYL3L (图 2A)。紫外-可见分光光度计检测结果如图 2B 所示, 直接连接荧光基团的 FAM-SYL3L 在 518 nm 波长左右处可见明显的荧光峰, 而 MAB-SYL3L 上荧光基团和淬灭基团间发生能量共振转移, 没有检测到任何荧光

信号。

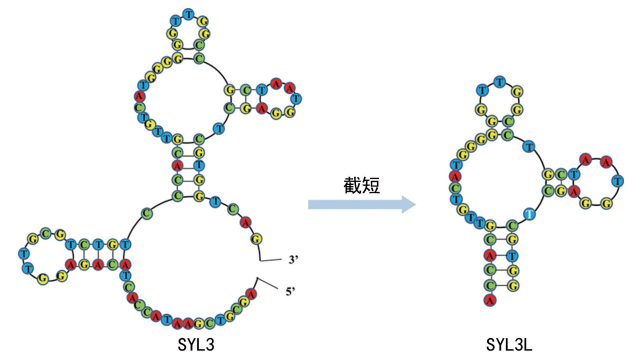


图 1 SYL3 截短成 SYL3L 的二级结构模拟图

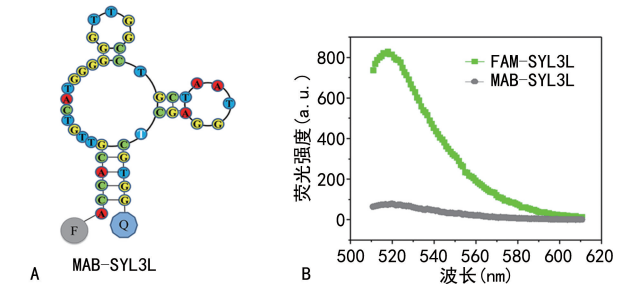
2.2 MAB-SYL3L 的细胞选择性

与对照序列 Library 比较，FAM-SYL3L 和 MAB-SYL3L 与 SGC-7901 细胞的荧光结合峰发生明显的右移，而与 HEK-293 细胞的荧光结合峰几乎没有发生右移，见图 3A。HEK-293 细胞的 EpCAM 呈现低表达，而 SGC-7901 细胞的 EpCAM 呈现高表达，

见图 3B。

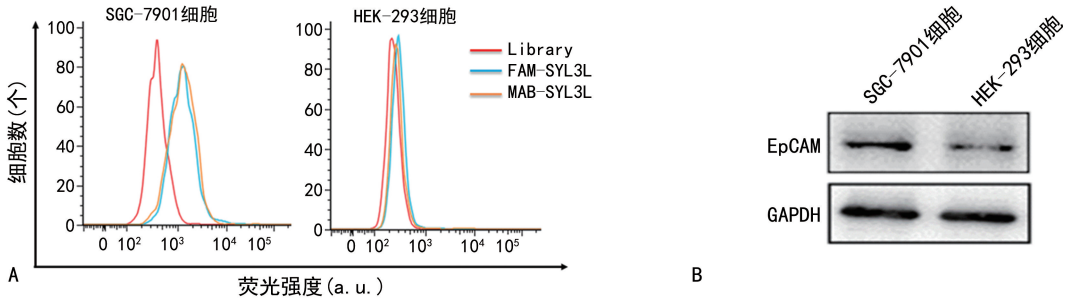
2.3 MAB-SYL3L 的亲性和

随着 MAB-SYL3L 浓度的增加，SGC-7901 细胞的荧光结合峰逐渐发生右移，增加到一定程度后，荧光结合峰右移程度逐渐减弱，达到饱和状态，见图 4A。MAB-SYL3L 对 SGC-7901 细胞具有很好的亲和力，见图 4B。



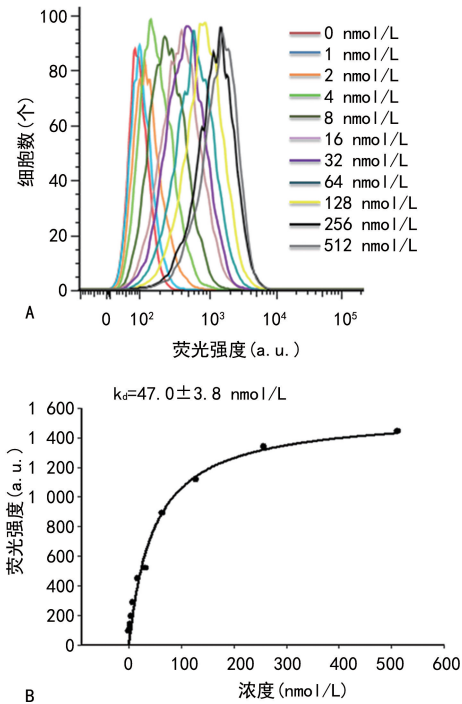
A: MAB-SYL3L 的二级结构模拟图; B: 紫外-可见分光光度计检测 MAB-SYL3L 的荧光信号。

图 2 MAB-SYL3L 的构建



A: 流式细胞术检测 MAB-SYL3L 与不同细胞系的结合情况; B: Western blot 检测 EpCAM 在不同细胞系中的表达情况。

图 3 MAB-SYL3L 的结合特异性



A: 流式细胞术检测不同浓度 MAB-SYL3L 与靶细胞的结合情况; B: MAB-SYL3L 与 SGC-7901 细胞的解离曲线。

图 4 MAB-SYL3L 的亲性和

2.4 MAB-SYL3L 在不同温度下的结合能力

与对照序列 Library 比较，在室温 25 ℃ 和体内温度 37 ℃ 下，MAB-SYL3L 与 SGC-7901 细胞的荧光结合峰均发生明显的右移，且结合能力基本上与核酸适配体的筛选温度 4 ℃ 时几乎相同，见图 5。

2.5 MAB-SYL3L 对 SGC-7901 细胞的靶向成像

激光共聚焦荧光显微镜观察结果显示，当使用常规的荧光成像步骤操作时，即细胞与探针孵育后通过洗涤步骤去除没有发生结合的探针，与对照序列 Library 比较，FAM-SYL3L 和 MAB-SYL3L 的细胞表面均能观察到明显的绿色荧光。当探针与细胞孵育后不经过洗涤步骤直接观察时，FAM-SYL3L 和 FAM-Library 具有很高的荧光背景，无法实现细胞成像，而 MAB-SYL3L 荧光背景低，仍然能够清晰观察到细胞表面的绿色荧光，见图 6。

流式细胞术结果进一步证实，FAM-SYL3L 没有经过洗涤步骤，SGC-7901 细胞会检测到很高的非特异性荧光；而 MAB-SYL3L 有无洗涤步骤，SGC-7901 细胞荧光结合峰几乎重合，没有非特异性荧光，见图 7。

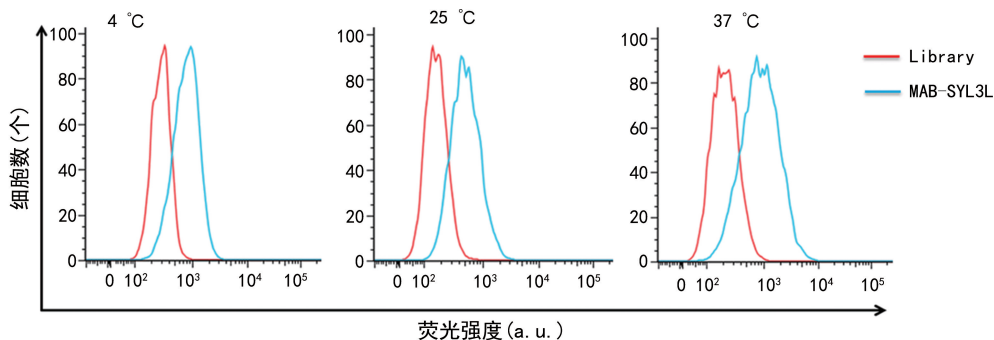


图 5 MAB-SYL3L 在不同温度下与 SGC-7901 细胞的结合情况

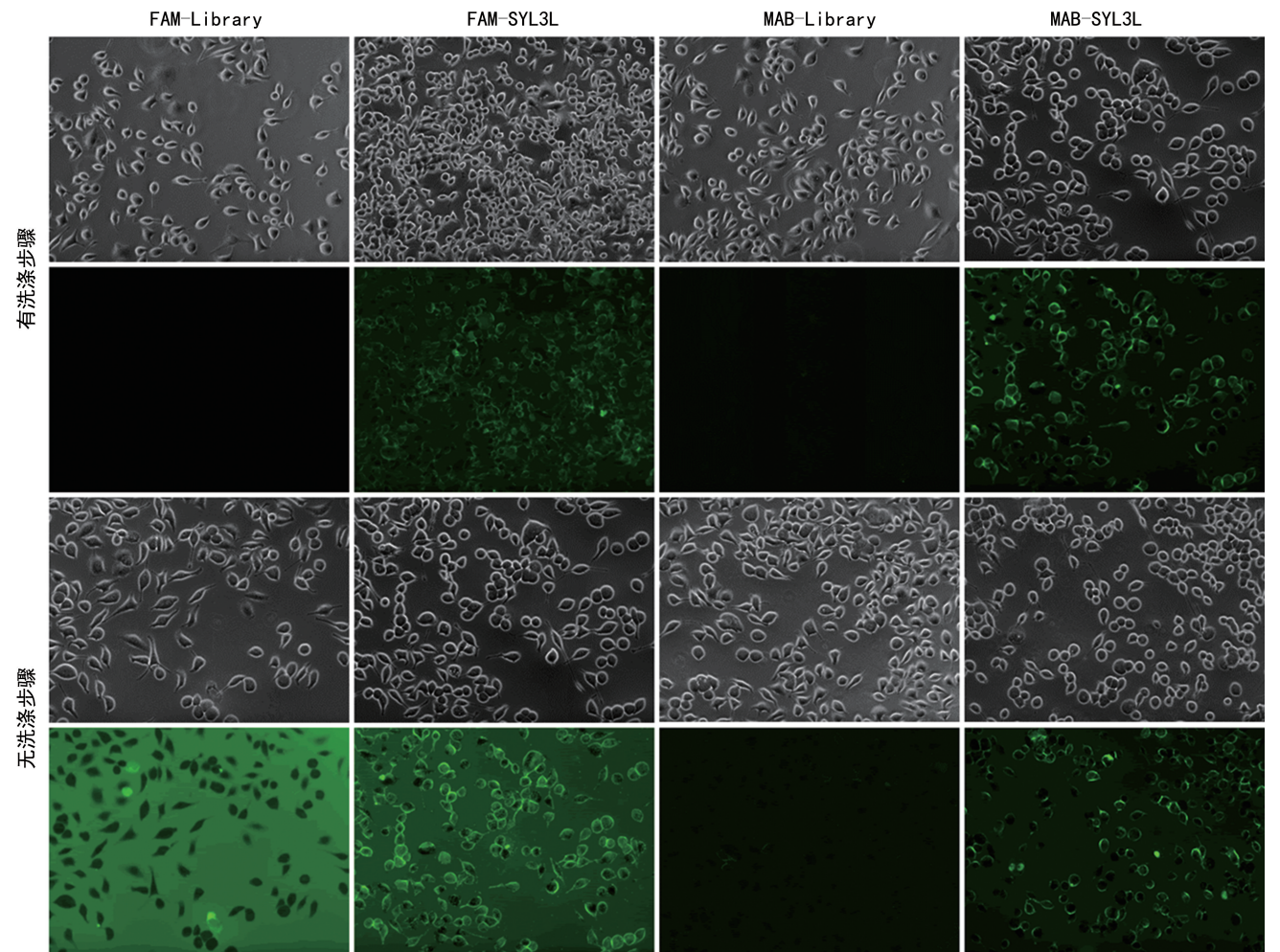


图 6 激光共聚焦显微镜观察 MAB-SYL3L 对 SGC-7901 细胞的靶向成像(×200)

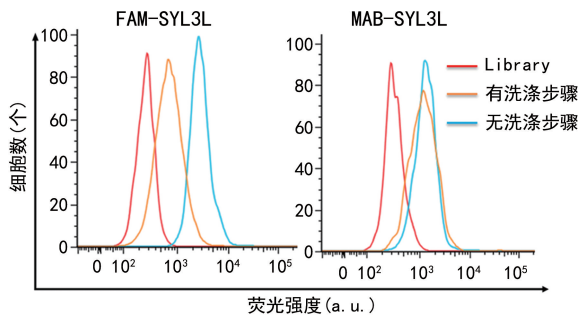


图 7 洗涤步骤对 MAB-SYL3L 与 SGC-7901 细胞结合的影响

3 讨 论

核酸适配体作为肿瘤早期诊断的靶向分子识别

探针,主要是通过结合荧光染料或纳米发光材料等完成对肿瘤细胞的靶向成像^[6-7]。然而,传统的核酸适配体分子探针具有恒定的信号,图像对比度受到高背景的严重影响,因此,在使用的过程中需要经过多次洗涤步骤才能清楚地观察到靶向荧光信号,操作不但复杂繁琐,而且在观察细小靶向对象(如外泌体)时难以实现。

分子信标是基于荧光共振能量转移原理设计出的具有茎-环结构的一段寡核苷酸探针,其中环部是目标识别区,茎部是互补序列,荧光基团和淬灭基团分别连接在茎部的 2 个末端^[8]。当目标分子不存在时,两侧互补碱基配对形成双螺旋,分子信标呈发夹结

构,使得 2 个碱基末端的荧光基团和淬灭基团相互接近,并发生能量转移,荧光被淬灭。当目标分子存在时,环部与目标分子结合,导致分子信标的构象改变,荧光基团与淬灭基团分离,能量转移终止,荧光恢复,且荧光强度与目标分子浓度呈正比。因此,利用分子信标对靶标物质进行检测时不需要分离未结合探针即可实现靶标的检测,具有操作简便、快捷、灵敏度高等优点^[9-10]。将核酸适配体的靶向识别特性和分子信标的荧光检测性能相结合,构建的一类新型的核酸适配体分子信标具有以下优点^[11]:(1)核酸适配体在分子信标的设计中作为识别单元,只要获得目标物的核酸适配体,就可以设计出相应的分子信标探针并对其进行检测;(2)核酸适配体的靶标类型广泛,在各领域都具有良好的应用前景;(3)核酸适配体对靶标具有高亲和力和高特异性,因此可以明显提高被检测靶标的灵敏度和选择性。

EpCAM 也称为 CD326,是一种 Ca^{2+} 非依赖性跨膜糖蛋白,它在上皮组织的基底外侧细胞表面表达^[12]。EpCAM 参与细胞信号传导、分化、增殖、侵袭和迁移,在肿瘤的发生、发展中发挥重要作用^[13-14]。作为肿瘤特异性蛋白,EpCAM 在 $>90\%$ 的胃肿瘤中过度表达^[15]。本研究中构建 EpCAM 核酸适配体分子信标 MAB-SYL3L,采用流式细胞术分别对其亲和性、温度稳定性等进行分析,结果表明 MAB-SYL3L 保留了核酸适配体 SYL3 的特性,且与 SGC-7901 细胞具有高亲和力, K_d 值依然在 nmol/L 级别;此外,MAB-SYL3L 在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 仍能保持与 SGC-7901 细胞的结合力,提示 MAB-SYL3L 可以应用于室温或体内的实验。

分子信标最大的优势之一就是在检测靶标物质的过程中不需要额外的洗涤步骤,能够实现一步法的特异性检测,因此为了检测 MAB-SYL3L 的分子信标特性,采用荧光显微镜和流式细胞术分析存在洗涤步骤与否的情况下,核酸适配体探针 FAM-SYL3L 和构建的核酸适配体分子信标 MAB-SYL3L 与 SGC-7901 细胞的检测情况。荧光显微镜结果显示不经过后续的洗涤步骤时,FAM-SYL3L 的细胞荧光信号背景较深,掩盖了细胞膜上的荧光信号,经过洗涤步骤后才可观察到细胞膜表面的荧光;而 MAB-SYL3L 信噪比较高,几乎没有荧光信号背景,在有无洗涤步骤下均可很好地实现 SGC-7901 细胞的靶向识别/成像,提示 MAB-SYL3L 无须洗涤过程即可通过一步法达到检测靶标物质的目的,体现出核酸适配体分子信标 MAB-SYL3L 对靶标物质检测具有高特异性、高灵敏度并且操作简便的优势。流式细胞术结果也进一步证实这一结论。

综上所述,本研究成功构建了靶向 EpCAM 的核酸适配体分子信标 MAB-SYL3L,建立了一种方便快捷、准确性高的胃癌细胞靶向成像方法,为核酸适配

体和分子信标的相关应用及胃癌细胞的靶向成像提供新方法。

参考文献

- [1] SMYTH E C,NILSSON M,GRABSCH H I,et al. Gastric cancer [J]. Lancet, 2020, 396 (10251):635-648.
- [2] JOSHI S S,BADGWELL B D. Current treatment and recent progress in gastric cancer[J]. CA Cancer J Clin,2021,71(3):264-279.
- [3] 雷容,刘杨文易,平秦榕,等. 核酸适配体在前列腺癌诊断应用的研究进展[J]. 重庆医学,2020, 49(2):315-318.
- [4] ROY D,PASCHER A,JURATLI M A,et al. The potential of aptamer-mediated liquid biopsy for detection of cancer[J]. Int J Mol Sci,2021, 22(11):5601.
- [5] YUAN B Y,JIANG X C,CHEN Y Y,et al. Metastatic cancer cell and tissue-specific fluorescence imaging using a new DNA aptamer developed by cell-SELEX [J]. Talanta, 2017, 170:56-62.
- [6] LI W M,BING T,WEI J Y,et al. Cell-SELEX based selection of aptamers that recognize distinct targets on metastatic colorectal cancer cells[J]. Biomaterials,2014,35(25):6998-7007.
- [7] LIU M,WANG L,LO Y,et al. Aptamer-enabled nanomaterials for therapeutics,drug targeting and imaging[J]. Cells,2022,11(1):159.
- [8] KLIMEK R,WANG M,MCKENNEY V R,et al. Photo-tethered molecular beacons for superior light-induction[J]. Chem Commun (Camb), 2021,57(5):615-618.
- [9] 黄晨,李婉明. 核酸适配体分子信标探针在肿瘤研究中的应用进展[J]. 癌症进展,2019,17(4): 373-375.
- [10] MAO S,YING Y,WU X,et al. Delivering molecular beacons via an electroporation-based approach enables live-cell imaging of single RNA transcripts and genomic loci[J]. Methods Mol Biol,2020,2106:241-252.
- [11] ZHANG Z,LIU N,ZHANG Z,et al. Construction of aptamer-based molecular beacons with varied blocked structures and targeted detection of thrombin[J]. Langmuir,2021,37(29):8738-8745.
- [12] GIRES O,PAN M,SCHINKE H,et al. Expression and function of epithelial cell(下转第 14 页)

- 化管理随访分析[J]. 中国儿童保健杂志, 2022, 30(1):102-105.
- [3] 李晓捷, 唐久来. 以循证医学为依据的脑性瘫痪早期诊断与早期干预[J]. 华西医学, 2018, 33(10):1213-1218.
- [4] NOVAK I, MORGAN C, ADDE L, et al. Early, accurate diagnosis and early intervention in cerebral palsy: advances in diagnosis and treatment [J]. JAMA Pediatr, 2017, 171(9):897-907.
- [5] 梁树艺, 刘福花, 吴芙蓉, 等. 全身运动评估对试管婴儿脑性瘫痪发育结局的预测价值分析[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2020, 42(9):812-814.
- [6] 王成举, 胡斌, 屈福祥, 等. 婴儿运动表现测试在早产儿运动评估中的应用[J]. 中国儿童保健杂志, 2020, 28(7):744-747.
- [7] SNIDER L M, MAJNEMER A, MAZER B, et al. A comparison of the general movements assessment with traditional approaches to newborn and infant assessment: concurrent validity [J]. Early Hum Dev, 2008, 84(5):297-303.
- [8] PEYTON C, YANG E, KOCHERGINSKY M, et al. Relationship between white matter pathology and performance on the general movement assessment and the test of infant motor performance in very preterm infants[J]. Early Hum Dev, 2016, 95:23-27.
- [9] 孙一婕, 张悦, 徐媛媛, 等. 我国中西部农村地区高危儿管理现状分析[J]. 中国卫生事业管理, 2020, 37(12):922-926.
- [10] CRACIUNOIU O, HOLSTI L. A systematic review of the predictive validity of neurobehavioral assessments during the preterm period [J]. Phys Occup Ther Pediatr, 2017, 37(3):292-307.
- [11] 李海薇, 赵琳, 卢爱洁, 等. 婴儿运动表现测试在昆明地区小婴儿中的应用研究[J]. 中国儿童保健杂志, 2021, 29(12):1363-1367.
- [12] 郭轶斌, 郭威, 秦宇辰, 等. 基于 Kappa 系数的一致性检验及其软件实现[J]. 中国卫生统计, 2016, 33(1):169-170, 174.
- [13] 黄蕾, 焦晓燕, 李佳槌, 等. 扭动运动阶段全身运动评估与新生儿行为神经测定结果的相关分析[J]. 中国儿童保健杂志, 2020, 28(3):252-255.
- [14] 闫红霞, 沈鹏, 倪仙玉, 等. 早产儿全身运动质量评估等新生儿神经运动发育评估的相关性研究[J]. 中国妇幼保健研究, 2019, 30(8):919-921.
- [15] PRECHTL H F, EINSPIELER C, CIONI G, et al. An early marker for neurological deficits after perinatal brain lesions[J]. Lancet, 1997, 349(9062):1361-1363.
- [16] 魏文新, 闫菲, 曹晓梅, 等. 全身运动质量评估(扭动运动阶段)对高危儿运动发育结局早期预测价值的进一步探讨[J]. 中国小儿急救医学, 2019, 26(12):912-916.
- [17] 李云, 沈修姝, 孟凡喆, 等. 不安运动阶段全身运动评估对晚期早产儿运动发育结局的预测价值[J]. 中国妇幼保健, 2021, 36(12):2791-2793.
- [18] PIRES C D S, MARBA S T M, CALDAS J P S, et al. Predictive value of the general movements assessment in preterm infants: a meta-analysis [J]. Rev Paul Pediatr, 2020, 38:e2018286.
- [19] 王雨晴, 朱萍, 杨忠秀, 等. 全身运动细化评估的脑瘫预警评分的建立[J]. 中国儿童保健杂志, 2019, 27(4):385-387, 391.
- [20] 马良, 冉霓, 冯雪英, 等. 全身运动质量评估研究进展[J]. 中国儿童保健杂志, 2020, 28(5):547-550.

(收稿日期:2022-04-10 修回日期:2022-09-22)

(上接第 10 页)

- adhesion molecule EpCAM: where are we after 40 years [J]. Cancer Metastasis Rev, 2020, 39(3):969-987.
- [13] HUANG L, YANG Y, YANG F, et al. Functions of EpCAM in physiological processes and diseases (Review) [J]. Int J Mol Med, 2018, 42(4):1771-1785.
- [14] SANKPAL N V, BROWN T C, FLEMING T P, et al. Cancer-associated mutations reveal a novel role for EpCAM as an inhibitor of cathepsin-L and tumor cell invasion [J]. BMC Cancer, 2021, 21(1):541.
- [15] DAI M, YUAN F, FU C, et al. Relationship between epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) overexpression and gastric cancer patients: a systematic review and meta-analysis [J]. PLoS One, 2017, 12(4):e0175357.

(收稿日期:2022-04-20 修回日期:2022-11-08)