

CD90和EpCAM在人肝癌细胞系中的表达及 EpCAM⁺细胞的特性分析

宁淑芳[#] 许 飒[#] 利基林 张力图^{*}

(广西医科大学附属肿瘤医院实验研究部, 南宁 530021)

摘要 该研究检测了人肝癌细胞系中CD90和EpCAM的表达情况, 从中筛选EpCAM⁺细胞并初步探讨其生物学特性。用流式细胞仪检测五种肝癌细胞系(Bel-7403、Bel-7404、SMMC-7721、HepG2和Sk-Hep-1)中CD90及EpCAM的表达。从肝癌细胞系中分选EpCAM⁺细胞和EpCAM⁻细胞, CCK-8法检测分选细胞的增殖能力和顺铂对细胞生长的抑制率; 平板克隆实验检测分选细胞的克隆形成能力。结果显示, 肝癌细胞系Bel-7404中EpCAM的表达率为54.94%, EpCAM和CD90分别表达于不同的细胞系。与EpCAM⁻和未分选细胞相比, EpCAM⁺细胞具有更强的克隆形成能力和增殖能力($P<0.05$)。顺铂对EpCAM⁺细胞的抑制率为21.73%, 明显低于EpCAM⁻细胞(49.32%, $P<0.05$)和未分选细胞(39.51%, $P<0.05$)。该实验结果表明, CD90和EpCAM不在同一种肝癌细胞系中表达。从肝癌细胞系中分选的EpCAM⁺细胞具有肝癌干细胞的特性: 自我更新能力、耐药性以及更强的克隆形成能力。

关键词 人肝癌细胞系; CD90; EpCAM

The Expression of CD90 and EpCAM in Human Hepatocellular Carcinoma Cell Lines and Characteristics Analysis of EpCAM⁺ Cells

Ning Shufang[#], Xu Sa[#], Li Jilin, Zhang Litu^{*}

(Department of Research, Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

Abstract The expression of CD90 and EpCAM was examined in hepatocellular carcinoma (HCC) cell lines, and EpCAM⁺ cells were isolated for biological characteristics study. Fluorescence activated cell sorter (FACS) was used to detect the expression of CD90 and EpCAM in five HCC cell lines (Bel-7403, Bel-7404, SMMC-7721, HepG2 and Sk-Hep-1). EpCAM⁺ cells and EpCAM⁻ cells were sorted from HCC cell lines and their proliferation capacity and chemosensitivity to cisplatin were determined by CCK-8 assay; the colony-formation ability was observed in terms of tablet clone formation test. The percentage of EpCAM⁺ cells was 54.94% in SK-Hep-1 cell line, and EpCAM and CD90 were expressed in different cellular lineages respectively. The colony-formation ability and proliferation ability of EpCAM⁺ subpopulation were significantly higher than that of EpCAM⁻ cells and unsorted cells ($P<0.05$). Cisplatin inhibited growth of EpCAM⁺ cells by 21.73%, significantly less than it inhibited the growth of EpCAM⁻ cells (49.32%, $P<0.05$) and unsorted cells (39.51%, $P<0.05$). These results suggested that CD90 and EpCAM were independently expressed in HCC cell lines. EpCAM⁺ subpopulation sorted from HCC cell lines has properties of liver cancer stem

收稿日期: 2014-08-13 接受日期: 2014-10-20

广西科学研究与技术开发计划项目(批准号: 桂科攻1355005-3-10)和广西医科大学青年科学基金项目(批准号: GXMUYSF201215)资助的课题

[#]共同第一作者

^{*}通讯作者。Tel: 0771-5310593, E-mail: zhanglitu@gmail.com

Received: August 13, 2014 Accepted: October 20, 2014

This study was supported by Guangxi Scientific Research and Technical Development Program (Grant No.1355005-3-10) and the Youth Science Foundation of Guangxi Medical University (Grant No.GXMUYSF201215)

[#]These authors contributed equally to this work

^{*}Corresponding author. Tel: +86-771-5310593, E-mail: zhanglitu@gmail.com

网络出版时间: 2014-12-31 16:09

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20141231.1609.001.html>

cell, which possessed the ability of self-renewal, drug resistance, and stronger ability of forming colonies.

Keywords human hepatocellular carcinoma cell lines; CD90; EpCAM

肝细胞癌是一个重要的世界健康问题,具有很高的发病率和致死率。肝癌是男性的第五大常见癌症,在女性中为第七大常见的恶性肿瘤。手术切除仍然是目前肝细胞癌最有效的治疗方法,然而,很多患者在手术切除后又出现复发^[1]。尽管在肝癌的治疗上我们已付出了很多努力,肝细胞癌治疗的主要方法依然是手术切除、肝移植或者化疗,其死亡率仍然很高,主要原因是手术后的复发或肝内转移。进一步理解肝癌发生的机制是发展新的肝癌治疗策略的关键^[2]。肿瘤干细胞假说为肿瘤形成提供了一个新的视角。肿瘤干细胞具有一些与正常干细胞相似的特性,比如:自我更新、增殖与分化,并被认为是与肿瘤的复发、扩散及化疗/辐射抗性有关^[3]。

上皮细胞黏附分子(epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)是一个40 kDa的跨膜糖蛋白,在许多上皮细胞中表达。EpCAM在细胞黏附、增殖、分化、迁移和细胞周期调控等过程中发挥重要作用,在恶性肿瘤中EpCAM的表达常呈上升趋势^[4-5]。并且,EpCAM的高表达与肿瘤的分级和预后相关^[6]。EpCAM的过表达往往预示着总生存期下降、预后不良以及多种癌症患者复发风险增高^[7]。另外,EpCAM被证明为包括肝癌在内的多种实体肿瘤启动的细胞标志物^[8]。进一步的研究还表明,表达EpCAM的肝癌细胞可表现部分肿瘤干细胞的特性^[9]。近年来的研究也认为,CD90(Thy-1)为肝癌干细胞的特异性标志物,CD90⁺的肝癌细胞有更高的致瘤性及多向分化潜能等特性^[10]。本实验通过流式细胞仪检测五种肝癌细胞系中CD90和EpCAM的表达情况,分选出阳性标记的细胞,并对其生物学特性进行研究,为肝癌干细胞理论提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM高糖、RPMI-1640培养基、胎牛血清、0.25%胰蛋白酶均购自美国Hyclone公司; Anti-Human Thy-1(CD90) FITC、Mouse IgG1 K Isotype Control FITC、Anti-Human EpCAM PE和Mouse IgG1 K Isotype Control购自eBioscience公司; 五种肝癌细胞系(HepG2、SMMC-7721、Bel-7404、Bel-

7403和Sk-Hep-1)均购自中科院上海生命科学研究院细胞库,并由广西医科大学附属肿瘤医院实验研究部保存提供; CCK-8试剂购自上海生博医学生物工程科技有限公司; 流式细胞仪(美国BD公司)。

1.2 肝癌细胞系的培养

肝癌细胞系HepG2用含10%胎牛血清的DMEM(高糖)培养基培养。其余四种肝癌细胞系(SMMC-7721、Bel-7404、Bel-7403及Sk-Hep-1)用含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基培养。细胞在37℃、5% CO₂的培养箱中孵育,待细胞进入对数生长期后进行传代培养,细胞的传代和收集用0.25%胰蛋白酶消化贴壁生长细胞。PBS洗涤细胞,然后用500 μL 2%胎牛血清的PBS重悬细胞,上机分析。

1.3 流式细胞仪检测分析

取对数生长期生长状态良好的肝癌细胞,0.25%胰蛋白酶消化成单细胞悬液,计数并调整细胞数量约10⁷数量级;用含2%胎牛血清的PBS洗涤、离心、重悬细胞为单细胞悬液。分别加入相应流式抗体(CD90-FITC, FITC同型对照; EpCAM-PE, PE同型对照)5 μL,并加入95 μL含2%胎牛血清的PBS至总体积为100 μL,室温避光孵育30 min,并设立阴性对照。

1.4 CCK-8法检测细胞体外增殖能力

将分选的EpCAM⁺细胞、EpCAM⁻细胞和未分选的Bel-7404细胞调整密度至1×10⁴/mL,接种至96孔板,每孔200 μL,置于37℃、5% CO₂细胞培养箱中培养,隔日换液。在接种后的第1, 3, 5, 7 d随机取出一块96孔板,每孔加入CCK-8试剂20 μL,细胞培养箱中孵育1 h后在酶标仪上450 nm波长处检测吸光度(D)值。以生长天数为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制三组细胞的生长曲线。

1.5 耐药能力的比较

将分选的EpCAM⁺细胞、EpCAM⁻细胞和未分选的Bel-7404细胞调整密度至1.25×10⁴/mL,以200 μL/孔接种至96孔板,三组细胞都设置对照组和加药组。培养24 h后,每种细胞加药组加入12 μmol/L的顺铂。隔天更换相应的培养基,继续培养72 h后,取出96孔板,每孔加入20 μL CCK-8试剂,培养箱中孵育1 h,酶标仪检测各孔内细胞在450 nm处的吸光度(D)值。计算抑制率:抑制率(%)=(D₀-D_m)/D₀×100%。D_m和

D_0 分别为加药组和对照组的 D_{450} 值。

1.6 平板克隆实验

将分选的EpCAM⁺细胞、EpCAM⁻细胞和未分选的Bel-7404细胞调整密度至 $1 \times 10^4/\text{mL}$, 接种细胞到6孔板, 每孔1 000个细胞。6孔板置于37 °C、5% CO₂培养箱中培养。15 d后, 弃掉培养液, 进行Gi-ems染色, 计数 ≥ 50 个细胞的克隆数。克隆形成率=形成的克隆数/接种细胞数 $\times 100\%$ 。

1.7 统计学分析

采用SPSS 16.0统计软件进行数据处理。计量资料的比较用 t 检验, 计数资料的比较用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 流式细胞仪分析结果

我们前期的研究表明, 经FACS分选得出肝癌细胞系Sk-Hep-1中CD90阳性表达率为66.02%^[11], 本实

验验证了前期的研究结果。检测结果还显示, 细胞系Bel-7404中EpCAM阳性表达细胞为54.94%(图1)。本实验中未检测到CD90和EpCAM在一个细胞系中同时表达。用流式细胞仪分选出肝癌细胞系Bel-7404中EpCAM⁺和EpCAM⁻细胞备用。

2.2 细胞形态观察

在显微镜下观察细胞的形态发现, CD90高表达的Sk-Hep-1细胞呈长梭形; EpCAM过表达的Bel-7404细胞呈现多角形或短梭形, 细胞之间紧密相靠, 互相衔接, 连接成片, 为典型的上皮细胞样(图2)。

2.3 细胞的体外增殖能力

用CCK-8法检测EpCAM⁺、EpCAM⁻细胞及未分选Bel-7404细胞的体外增殖能力。在培养的1, 3, 5, 7 d, 三组细胞450 nm处的吸光度(D)值如图3所示。从第3 d开始, EpCAM⁺细胞的吸光度(D)值开始高于未分选细胞和EpCAM⁻细胞。到培养的第7 d, EpCAM⁺、EpCAM⁻、未分选细胞的 D_{450} 值分别为

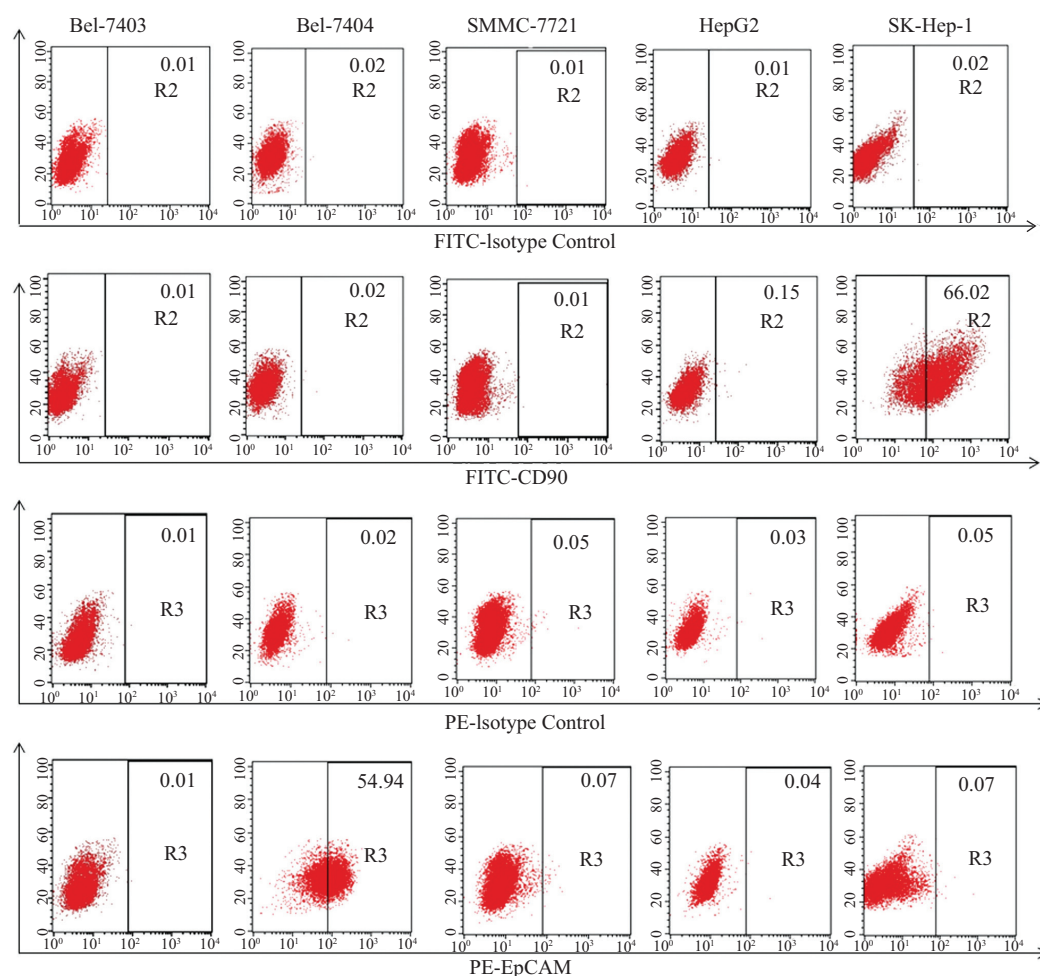


图1 流式细胞仪检测肝癌细胞系中CD90和EpCAM的表达

Fig.1 Expressions of CD90 and EpCAM markers in HCC cell lines by FACS

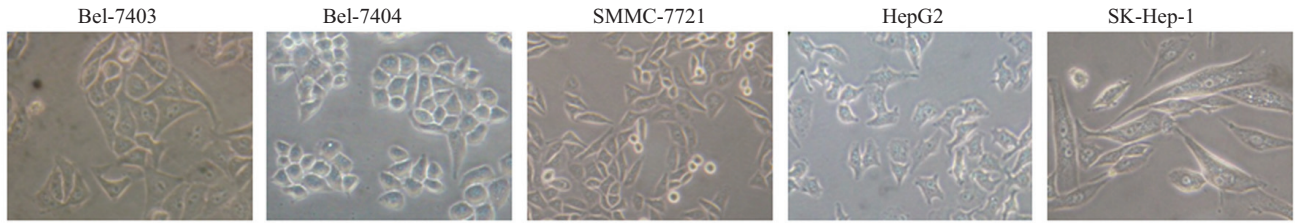
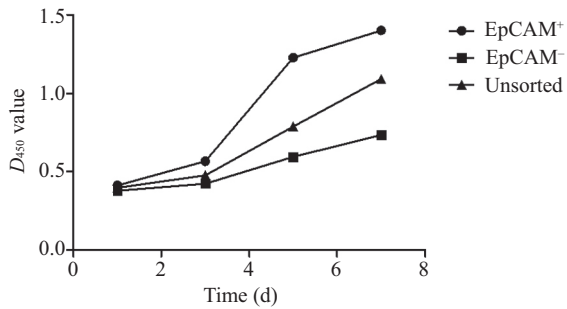
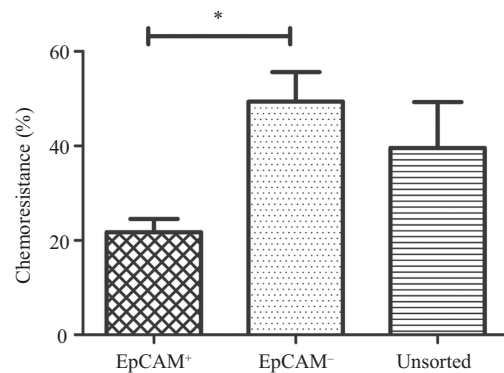


图2 显微镜下观察细胞形态(200×)

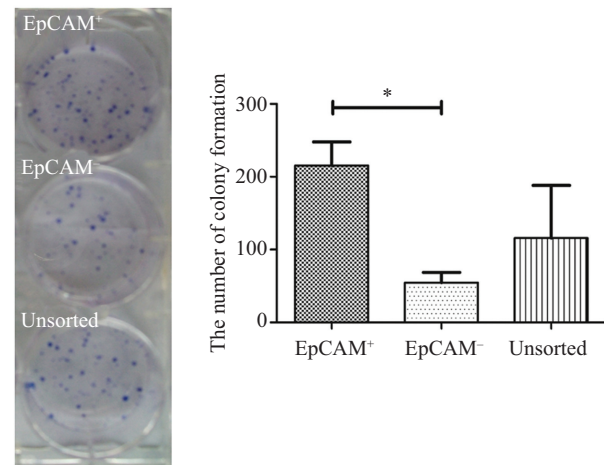
Fig.2 Representative photomicrographs of HCC cell lines (200×)

图3 EpCAM⁺、EpCAM⁻及未分选细胞的生长曲线Fig.3 Cell growth curves of EpCAM⁺, EpCAM⁻ and unsorted cells* $P<0.05$.图4 顺铂对三种细胞亚群EpCAM⁺、EpCAM⁻和未分选细胞的生长抑制率Fig.4 The chemosensitivity to cisplatin of EpCAM⁺, EpCAM⁻ and unsorted cells

(21.73±2.81)%、(49.32±6.23)%和(39.51±9.74)%。三组细胞中,化疗药顺铂对EpCAM⁻细胞的生长有明显的抑制作用,对EpCAM⁺细胞生长的抑制作用不明显,二者有显著差异($P<0.05$)。

2.5 细胞的体外克隆形成能力

三组细胞EpCAM⁺、EpCAM⁻和未分选的Bel-7404细胞的克隆形成率分别为: (21.50±3.26)%、(5.47±1.40)%和(11.56±7.24)% (图5)。与EpCAM⁻细胞相比,EpCAM⁺细胞形成的克隆较密集且直径较大($P<0.05$),表明EpCAM⁺细胞具有更强的克隆形成能力。

* $P<0.05$.图5 EpCAM⁺、EpCAM⁻和未分选细胞的平板克隆形成实验Fig.5 Plate colony formation efficiency of EpCAM⁺, EpCAM⁻ and unsorted cells

1.402±0.207、0.734±0.105、1.042±0.073, EpCAM⁺细胞组显著高于其余两组($P<0.05$),说明与未分选细胞和EpCAM⁻细胞相比,EpCAM⁺细胞具有更强的体外增殖能力。

2.4 细胞耐药能力的比较

本实验采用CCK-8法比较了在化疗药物顺铂作用下,三组细胞EpCAM⁺、EpCAM⁻和未分选的Bel-7404细胞耐受药物杀伤作用的能力。结果如图4所示,三个细胞亚群的生长抑制率分别为

3 讨论

随着研究的深入,肿瘤干细胞在肿瘤发生、发展中所发挥的重要作用也逐渐明确。包括肝癌在内的多种实体肿瘤利用干细胞标志经流式细胞仪分离获得了肿瘤干细胞。肝癌中,已建立的人肝癌细胞系和原代肿瘤细胞均经体内移植实验证实几种肿瘤干细胞标志物的存在。在过去的研究中,CD133、CD90、EpCAM、CD24、ALDH和ABCG2等都是常用的肝癌干细胞标志物^[10,12-15]。近年来,有研究

表明, CD133是肿瘤干细胞一个有用的标志物, 并可作为肝癌治疗的靶点^[16]。人婆罗双树样基因(*sal-like 4*, *SALL4*)属于锌指转录因子家族的一员, 被认为是肝癌干细胞标志物和肝癌临床预后指标^[17]。肿瘤干细胞被认为是肿瘤中数量极少的细胞群, 然而部分标记物如EpCAM、CD90、CD133等在肝癌细胞系中的表达能够达到或者超过50%, 这些标记物能否完全代表肝癌干细胞, 其特异性和敏感性值得进一步的研究。为提高其特异性, 有研究认为, 可将几个标记物结合来进行肝癌干细胞的鉴定和分选, 如CD133与EpCAM^[18]、CD90与CD45^[19]、CD13与CD90^[16]、CD90与CD44^[10,20]、CD133与CD44^[2]等。本实验的初期, 我们试图从肝癌细胞系中分离CD90和EpCAM双阳性细胞, 但结果表明, 在我们所选用的五种肝癌细胞系中没有发现CD90和EpCAM双阳性表达的细胞。Yamashita等^[21]的研究表明, 在正常培养条件下表达CD90的人肝癌细胞系几乎不表达EpCAM, 反之亦然。进一步的研究还认为, EpCAM⁺细胞和CD90⁺细胞分别代表不同的细胞亚群, 二者拥有不同的生物学特性, 并且两类细胞在形态上存在差异, 表达EpCAM的人肝癌细胞系呈多角形, 为典型的上皮细胞形态; 而表达CD90的人肝癌细胞系呈梭形, 其形态特征上更接近于血管内皮细胞。本实验中, 表达EpCAM的肝癌细胞系Bel-7404呈多角形, 而CD90高表达的人肝癌细胞系Sk-Hep-1呈长梭形, 与Yamashita等的报道一致。

EpCAM表达于早期肝脏发育过程中, 而不在成熟肝细胞中表达, 在肝干细胞中也能检测到EpCAM的表达, 并且被认为是多能性人类胚胎干细胞的表面标记物^[22-23]。越来越多的证据表明, EpCAM可能是肝癌干细胞潜在的标志物, 现有的研究已证明了以下几点^[9,13]: (1)已知的肝干细胞标志物在EpCAM⁺细胞中高表达, 而成熟肝细胞标志物在EpCAM⁻细胞中的表达明显增高; (2)与EpCAM⁻细胞相比, EpCAM⁺细胞有更强的克隆形成能力; (3)EpCAM⁺细胞包含一个多潜能的细胞群, 可分化为EpCAM⁺细胞和EpCAM⁻细胞; (4)NOD/SCID小鼠的体内致瘤实验表明, EpCAM⁺细胞可有效形成肿瘤, 而EpCAM⁻细胞不能; (5)体外侵袭实验表明, EpCAM⁺的肝癌细胞具有比EpCAM⁻细胞更强的侵袭性; (6)EpCAM⁺细胞亚群比EpCAM⁻细胞亚群高表达干细胞转录因子Nanog、Sox2和Oct4, 并且用分化诱导剂处理

EpCAM高表达的肝癌细胞后, 随着EpCAM表达的降低, 细胞分化因子albumin、CK8和CK18的表达逐渐升高^[18,24]。由此可见, EpCAM⁺的肝癌细胞是肝癌干细胞的亚群。进一步的研究表明, Wnt/ β -catenin信号通路在胚胎干细胞的维持过程中发挥了重要作用, 在EpCAM⁺的HCC中信号通路Wnt/ β -catenin被激活, 并且EpCAM是Wnt/ β -catenin信号通路直接的转录靶向基因。此外, 体外实验表明, EpCAM⁺肝癌细胞比EpCAM⁻细胞对 β -catenin抑制剂更敏感。在EpCAM⁺肝癌细胞中, Wnt/ β -catenin信号通路处于激活状态^[13,25]。Kimura等^[9]认为, 相对于EpCAM⁻细胞, EpCAM⁺细胞有更强的致瘤性, 这可能是由于Wnt/ β -catenin信号通路的参与, 并推测EpCAM⁺和EpCAM⁻两个亚群细胞生物学特性差异的原因是二者参与了不同的信号通路, 而不仅仅是细胞表面抗原EpCAM表达的差异。本实验从五种肝癌细胞系中选出EpCAM高表达的Bel-7404细胞作为分选细胞, 以EpCAM为分选标记物, 利用流式细胞仪成功分选出较高纯度的EpCAM⁺细胞。随后进行了一系列体外实验, 包括CCK-8细胞增殖实验、顺铂作用下的耐药实验和平板克隆实验, 结果表明, 与未分选的Bel-7404细胞和EpCAM⁻细胞相比, EpCAM⁺细胞具有更强的体外增殖能力, 对化疗药物顺铂表现出了更强的抗药性和极强的克隆形成能力。

综上所述, 本研究的结果表明, CD90和EpCAM不在同一种肝癌细胞系中表达, 且CD90高表达的肝癌细胞系Sk-Hep-1与表达EpCAM的Bel-7404细胞系呈现不同的形态特征。从肝癌细胞系Bel-7404中分选的EpCAM⁺细胞具有肿瘤干细胞的特性: 自我更新和增殖能力、耐药性以及更强的克隆形成能力。本实验为进一步研究肝癌干细胞的相关生物学特性以及寻找肝癌的治疗靶点奠定了基础。

参考文献 (References)

- 1 Chan AW, Tong JH, Chan SL, Lai PB, To KF. Expression of stemness markers (CD133 and EpCAM) in prognostication of hepatocellular carcinoma. *Histopathology* 2014; 64(7): 935-50.
- 2 Zhu Z, Hao X, Yan M, Yao M, Ge C, Gu J, *et al.* Cancer stem/progenitor cells are highly enriched in CD133⁺CD44⁺ population in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2009; 126(9): 2067-78.
- 3 Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: An old idea—a paradigm shift. *Cancer Res* 2006; 66(4): 1883-90; discussion 1895-6.
- 4 Trzpis M, McLaughlin PM, de Leij LM, Harmsen MC. Epithelial cell adhesion molecule: More than a carcinoma marker and adhe-

- sion molecule. *Am J Pathol* 2007; 171(2): 386-95.
- 5 Maetzel D, Denzel S, Mack B, Canis M, Went P, Benk M, *et al.* Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. *Nat Cell Biol* 2009; 11(2): 162-71.
- 6 Kuhn S, Koch M, Nubel T, Ladwein M, Antolovic D, Klingbeil P, *et al.* A complex of EpCAM, claudin-7, CD44 variant isoforms, and tetraspanins promotes colorectal cancer progression. *Mol Cancer Res* 2007; 5(6): 553-67.
- 7 Benko G, Spajic B, Kruslin B, Tomas D. Impact of the EpCAM expression on biochemical recurrence-free survival in clinically localized prostate cancer. *Urol Oncol* 2013; 31(4): 468-74.
- 8 Munz M, Baeuerle PA, Gires O. The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling. *Cancer Res* 2009; 69(14): 5627-9.
- 9 Kimura O, Takahashi T, Ishii N, Inoue Y, Ueno Y, Kogure T, *et al.* Characterization of the epithelial cell adhesion molecule EpCAM⁺ cell population in hepatocellular carcinoma cell lines. *Cancer Sci* 2010; 101(10): 2145-55.
- 10 Yang ZF, Ho DW, Ng MN, Lau CK, Yu WC, Ngai P, *et al.* Significance of CD90⁺ cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer Cell* 2008; 13(2): 153-66.
- 11 许 飒, 宁淑芳, 利基林, 冯 雁, 唐艳萍, 骆成飘, 等. 人肝癌细胞系中CD90⁺细胞的生物学特性. *中国癌症防治杂志* (Xu Sa, Ning Shufang, Li Jilin, Feng Yan, Tang Yanping, Luo Chengpiao, *et al.* Biological characteristics of CD90⁺ cells in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Chinese Journal of Oncology Prevention and Treatment*) 2014; 6(1): 12-6.
- 12 Ma S, Lee TK, Zheng BJ, Chan KW, Guan XY. CD133⁺ HCC cancer stem cells confer chemoresistance by preferential expression of the Akt/PKB survival pathway. *Oncogene* 2008; 27(12): 1749-58.
- 13 Yamashita T, Ji J, Budhu A, Forgues M, Yang W, Wang HY, *et al.* EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. *Gastroenterology* 2009; 136(3): 1012-24.
- 14 Lee TK, Castillo A, Cheung VC, Tang KH, Ma S, Ng IO. CD24⁺ liver tumor-initiating cells drive self-renewal and tumor initiation through STAT3-mediated NANOG regulation. *Cell Stem Cell* 2011; 9(1): 50-63.
- 15 Song K, Wu J, Jiang C. Dysregulation of signaling pathways and putative biomarkers in liver cancer stem cells (review). *Oncol Rep* 2013; 29(1): 3-12.
- 16 Haraguchi N, Ishii H, Mimori K, Tanaka F, Ohkuma M, Kim HM, *et al.* CD13 is a therapeutic target in human liver cancer stem cells. *J Clin Invest* 2010; 120(9): 3326-39.
- 17 Oikawa T, Kamiya A, Zeniya M, Chikada H, Hyuck AD, Yamazaki Y, *et al.* Sal-like protein 4 (SALL4), a stem cell biomarker in liver cancers. *Hepatology* 2013; 57(4): 1469-83.
- 18 Chen Y, Yu D, Zhang H, He H, Zhang C, Zhao W, *et al.* CD133⁺EpCAM⁺ phenotype possesses more characteristics of tumor initiating cells in hepatocellular carcinoma Huh7 cells. *Int J Biol Sci* 2012; 8(7): 992-1004.
- 19 Yang ZF, Ngai P, Ho DW, Yu WC, Ng MN, Lau CK, *et al.* Identification of local and circulating cancer stem cells in human liver cancer. *Hepatology* 2008; 47(3): 919-28.
- 20 Michishita M, Ezaki S, Ogihara K, Naya Y, Azakami D, Nakagawa T, *et al.* Identification of tumor-initiating cells in a canine hepatocellular carcinoma cell line. *Res Vet Sci* 2014; 96(2): 315-22.
- 21 Yamashita T, Honda M, Nakamoto Y, Baba M, Nio K, Hara Y, *et al.* Discrete nature of EpCAM⁺ and CD90⁺ cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2013; 57(4): 1484-97.
- 22 Schnell U, Cirulli V, Giepmans BN. EpCAM: Structure and function in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1828(8): 1989-2001.
- 23 Ng VY, Ang SN, Chan JX, Choo AB. Characterization of epithelial cell adhesion molecule as a surface marker on undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2010; 28(1): 29-35.
- 24 Hao PP, Lee MJ, Yu GR, Kim IH, Cho YG, Kim DG. Isolation of EpCAM⁺/CD133⁻ hepatic progenitor cells. *Mol Cells* 2013; 36(5): 424-31.
- 25 Yamashita T, Budhu A, Forgues M, Wang XW. Activation of hepatic stem cell marker EpCAM by Wnt-beta-catenin signaling in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2007; 67(22): 10831-9.