

胚胎早期乳腺原基体外培养对乳腺干细胞 相关标记表达稳定性的影响

宋嘉哲¹ 杜立颖² 薛 恺^{1*}

(¹大连医科大学基础医学院, 大连 116044; ²北京大学生命科学学院, 北京 100871)

摘要 乳腺干细胞具有产生各类乳腺细胞的能力, 其研究对于乳腺发育的认知、乳腺癌的治疗以及乳腺生物反应器的开发都具有重要意义。此外, 伴随胎儿发育, 胚胎期乳腺干细胞所经历的增殖、迁移、侵袭等过程是成体乳腺干细胞没有的, 而这些经历与乳腺癌的发生过程非常相似。因此, 针对胚胎乳腺干细胞的研究在医学上具有更重要的意义。Sca-1、CD29、CD49f和CD24都是经常被用于乳腺干细胞分离纯化的细胞表面标记。该研究分析了不同的体外处理条件和时间对于上述标记在小鼠乳腺原基中表达稳定性的影响, 旨在为胚胎早期乳腺干细胞的分离、纯化以及鉴定奠定分子基础, 也为胚胎乳腺发育和乳腺癌发生的相关研究提供支持。

关键词 乳腺干细胞; 细胞表面标记; 胚胎乳腺原基; 流式细胞分析

In Vitro Culture of Early Embryonic Mammary Anlagen Affects Expression Stabilities of Mammary Stem Cell-associated Markers

Song Jiazhe¹, Du Liying², Xue Kai^{1*}

(¹College of Basic Medical Sciences, Dalian Medical University, Dalian 116044, China;

²College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract Mammary stem cells (MaSCs) possess the ability to generate all differentiated cell types in the mammary gland. The researches of MaSCs are important and fundamental for understanding mammary gland development, developing therapy of breast cancer and studying mammary gland bioreactor. In particularly, during embryonic development, fetal MaSCs undergo proliferation, migration and invasion, which do not occur in the resting adult mammary gland, and do resemble the progression of breast cancer. Therefore, the researches of fetal MaSCs are meaningful, especially in the field of medicine. Sca-1, CD29, CD49f and CD24 are specific cell surface markers that have ever been applied to purify MaSCs. Here, we analyzed the expression stabilities of these cell surface markers in mouse mammary anlagen, which were cultured in different conditions. Our research provides foundation to purify and identify MaSCs, and supports the studies of mammary gland development and breast cancer.

Key words mammary stem cells (MaSCs); cell surface marker; fetal mammary anlagen; flow cytometry analysis

乳腺是哺乳动物哺育后代的重要器官, 它的发育是一个复杂而长期的过程。小鼠乳腺的发育起始

于胚胎期10.5 d(E10.5), 开始时形似凸透镜, 随着胎龄的增加, 逐渐向乳脂垫延伸。到了胚胎期16 d, 开始出

收稿日期: 2014-06-16 接收日期: 2014-08-04

国家自然科学基金(批准号: 31101717)和辽宁省教育厅高等学校科研项目(批准号: L2013338)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0411-86110313, E-mail: nkx123xuekai@sina.com

Received: June 16, 2014 Accepted: August 4, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31101717) and the General Project of Education Department of Liaoning Province (Grant No.L2013338)

*Corresponding author. Tel: +86-411-86110313, E-mail: nkx123xuekai@sina.com

网络出版时间: 2014-09-23 14:19

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.10.0207.html>

现导管分叉^[1]。出生后3周龄小鼠乳腺仅由几条简单的乳腺导管构成, 他们共同开口于乳头。此后乳腺导管开始延伸、分叉, 如果未经怀孕, 此过程将持续进行直至12周龄才会停止^[2]。成年小鼠乳腺组织结构复杂, 包含的细胞种类也非常丰富, 包括腔上皮细胞、肌上皮细胞、脂肪细胞、基质细胞、淋巴细胞、血细胞以及上述各种细胞的前体细胞、祖细胞等^[3]。

早期生命的器官发育与成体干细胞的特性是密切相关的。干细胞是一类具有自我更新和多向分化潜能的细胞, 它们具有慢周期性, 同时又可随着机体自身的需要启动增殖, 并定向分化形成多种组织类型的细胞。而成体干细胞存在于已经分化的组织中, 保持着自我复制和分化为该组织中所有类型细胞的潜能, 因此又称组织特异性干细胞。由于乳腺干细胞具有自我更新、产生乳腺组织各种类型的细胞以及单细胞重塑完整乳腺的能力, 使它们在细胞治疗和组织工程方面具有很好的应用前景。因此, 关于乳腺干细胞的研究越来越受到学者们的关注。早在2006年, Shackleton等^[4]就使用细胞表面标记CD29、CD49f和CD24富集了成年小鼠乳腺干细胞群, 并且实现了单细胞再生完整乳腺, 从而证明了乳腺干细胞的存在。随着乳腺发育相关研究的深入, 人们逐渐发现, 伴随着胚胎发生的过程, 组织所需的浸润性增殖、迁移和侵袭等细胞行为在成体乳腺中不具有, 而这些都是与乳腺癌发生过程中的细胞行为非常相似^[5]。所以, 针对胚胎期乳腺干细胞的研究也受到了越来越多的关注。近年来, 人们对胚胎期乳腺干细胞的研究取得了一些重要的进展, 有研究者利用特殊的细胞表面标记在晚胚胎期的小鼠乳腺中分离到了具有干细胞活性的特殊细胞群, 并发现胚胎期的乳腺干细胞和乳腺基质细胞都具有与人乳腺癌细胞相似的基因表达特点^[6]。这提示我们, 研究胚胎期乳腺小芽中的乳腺干细胞所具有的基因表达特点要比之前仅仅关注成年乳腺干细胞更有意义。

虽然人们对于胚胎期乳腺干细胞的研究已经取得了一定的进展^[4,6-9], 但这些研究主要集中在晚胚胎期(E17-18.5)。而Hens和Wysolmerski对胚胎期乳腺发生的可能机制进行了综述, 指出胚胎发育早期(E13.5-15.5)的乳腺原基(mammary anlagen)是研究乳腺导管形成及延伸等发育调控机制的关键时期^[10]。所谓乳腺原基, 就是指出现乳腺组织雏形到乳腺导管开始形成之间的乳腺组织。Robinson等^[11]对小鼠

乳腺原基的发育时期的界定以及乳腺原基移植再生进行了系统研究和报道, 证明E15小鼠乳腺原基移植后再生的乳腺导管可布满清除乳腺组织的脂肪垫, 暗示了乳腺原基中包含乳腺干细胞。目前, 学者们对于早期胚胎中的乳腺干细胞的研究还非常少。由于缺乏对于这一时期乳腺组织中相关细胞标记表达的鉴定, 人们还无法对乳腺原基干细胞群实施有效的分离纯化。要实现胚胎乳腺原基干细胞群的分离和鉴定, 就需要对乳腺原基组织进行体外培养和处理, 而处理环境的变化会使乳腺原基细胞表面标记的表达发生变化。那么在乳腺原基细胞准备的过程中, 哪种标记在体外的表达更稳定, 什么样的操作环境和多长的操作时间会使组织细胞最大程度地保持其原有状态, 这些都是相关研究中亟待解决的问题。Sca-1、CD29、CD49f和CD24都是曾经被用于乳腺干细胞分离纯化的细胞表面标记^[4,6,8]。本研究分析了不同的体外处理条件和时间对于上述标记在小鼠乳腺原基中表达的影响, 旨在为胚胎乳腺原基干细胞的分离、纯化以及鉴定奠定分子基础, 也为胚胎乳腺发育和乳腺癌发生的相关研究提供支持。

1 材料与方法

1.1 材料

仪器: 解剖显微镜(Nikon公司); 流式细胞仪(MoFlo flow cell sorter, Dako, Fort Collins, Colorado, USA) 488 nm ex FITC(530/40); PE(580/30); PI(580/30); Hst 351 nm ex Red(630/30); Blue(450/65)。分析软件: Summit V3.1或4.0; 荧光倒置显微镜(Olympus公司); MilliQ超纯水器(Millipore公司); CO₂培养箱(Thermo公司)。

试剂: MEGM完全培养基(Cambrex公司), EGF(Sigma公司), bFGF(Sigma公司); 胎牛血清FBS(Gibco公司); PE标记的anti-mouse CD24抗体(BD公司); PE-cy5标记的anti-human CD49f抗体(BD公司); FITC标记的anti-mouse CD29抗体(Serotec公司); FITC标记的anti-mouse Sca-1抗体(BD公司); 胰蛋白酶Trypsin(Gibco公司); 胰蛋白酶抑制剂Trypsin inhibitor(Sigma公司); DPBS(Gibco公司); DMEM(Gibco公司); BSA(Sigma公司)。

1.2 胎鼠的获得和日龄的确定

将8周龄ICR雌性发情小鼠于下午5点左右放入种公鼠笼子中进行交配, 隔日早上9点检查阴栓, 确

定是否受孕。以见栓日为第0.5 d、14 d后早上取得的胎鼠计为胚胎期14.5 d, 如此计算。实验操作遵循的程序符合国家及提供实验动物单位制订的有关实验动物福利的规则和制度。

1.3 快速鉴定胚胎期小鼠性别

将围产期指定日期的雌性母鼠脱颈处死, 70%酒精消毒腹部。用已灭菌的手术剪刀、镊子小心剪开腹部皮肤, 将子宫剪下, 迅速放入盛有DPBS的培养皿中, 用弯头镊小心将子宫壁撕破, 取出胎儿, 并将其转移至另一盛有DPBS的培养皿中, 反复清洗3次至液清为止。取胚胎期14.5~16 d的胎鼠, 置于体视镜下, 观察胎鼠第4、5对乳腺, 乳腺原基呈现为白色圆点的为雄性; 乳腺原基呈现为与皮肤界限模糊的圆晕的为雌性, 观察时体视镜的放大倍数为0.8×10倍(8倍), 需要外光源的辅助。本方法已经获批国家专利, 专利授权号: ZL200810246595.3。

1.4 乳腺原基准备

在体视镜下去除胎鼠头部及四肢, 用眼科镊和游丝镊沿胎鼠体躯两侧壁分别剥离腹部皮肤, 用游丝镊剥离雌性小鼠乳腺原基, 通过体视镜(Nikon)对乳腺原基进行观察。

1.5 乳腺原基细胞准备

将分离好的乳腺原基用口吸管转移至冷的0.1%胰酶中, 4℃预冷3 min后37℃孵育1 min, 小心机械吸打吹散。随后, 加入相应浓度的胰酶抑制剂(Sigma公司)抑制胰酶活性。离心, 将乳腺原基细胞重新悬浮于DPBS中, 并用40 μm细胞筛过滤以获得单细胞悬液, 于Olympus荧光倒置显微镜下观察消化后的细胞悬液。

1.6 细胞免疫荧光染色和流式分析

本实验分别使用PBS+5% FBS、DMEM+5% FBS和MEGM+GF(B27, 5 μg/mL insulin, 20 ng/mL EGF, 20 ng/mL bFGF)这三种培养基对新鲜分离的乳腺原基组织进行恒温孵育。在0, 0.5, 4, 12 h这几个时间点取出孵育的乳腺原基组织, 通过消化将其制备成单细胞悬液。将准备好的单细胞悬液离心, 用1%的BSA重悬, 4℃封闭10 min。使用一抗直标的抗体(CD24-PE、CD49f-PE-cy5、Sca-1-FITC、CD29-FITC), 按照说明书建议的使用量, 4℃孵育15 min。随后, 将细胞离心, DPBS重悬以备分析; 如果分选细胞, 可用不加血清的DMEM培养液重悬细胞以备分选。流式细胞分析使用MOFLO High-performance

cell sorter(Dako公司)。

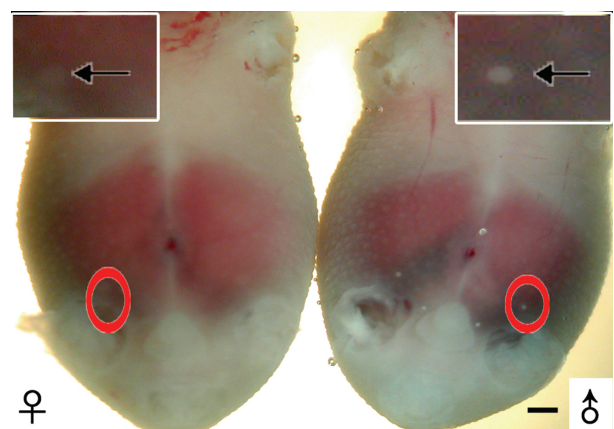
1.7 数据分析

本研究用SPSS 13.0(单因素ANOVA)和SUMMIT 4.0(<http://www.Dakocytomation.com>)软件进行统计分析, 实验重复3次。采用Microsoft Office Excel和Sigma-Plot进行数据处理和绘制柱状图, 图像处理采用Adobe Photoshop 8.0软件完成。 $P<0.05$ 表示显著差异。

2 结果

2.1 E14.5小鼠性别鉴定

通过显微观察E14.5小鼠乳腺的外观, 结合组织解剖乳腺原基的方法, 总结了快速鉴定早期胚胎小鼠性别的方法, 从而大大提高了显微操作方法分离雌性胎儿乳腺原基的效率。体视镜下, 用外光源照射胎鼠腹部, 根据乳腺原基的颜色和大小等外部特点区别雌雄, 如图1所示, 胎鼠腹部中线两侧的第4、第5对乳腺已呈现明显差异。左边为雌性胎鼠, 箭头所示为雌性胎鼠乳腺原基; 右边为雄性胎鼠, 箭头所示为雄性胎鼠乳腺原基。乳腺原基呈现为白色圆点的为雄性, 所呈现的白色圆点为针尖大小, 直径约为150~300 μm, 与周围皮肤颜色差异显著; 乳腺原基呈现为与皮肤界限模糊的圆晕的为雌性, 该乳腺原基与周围皮肤界限不清晰。在观察时体视镜的放大倍数以0.8×10倍(8倍)为宜, 并且需要外光源辅助观察。通过E14.5小鼠性别的快速鉴定, 我们将这一阶段的



E14.5雌性(♀)和雄性(♂)小鼠腹部中线两侧的第4和第5对乳腺已呈现明显差异。方框内为红色圆形区域所示乳腺组织的放大图像; 箭头所示为E14.5小鼠乳腺原基。标尺=1 000 μm。

E14.5 female (♀) and male (♂) mice mammary gland tissues exhibit obvious differences. Insert shows a magnified image of the region in the red circle. Arrows show the mammary anlagen. Scale bar=1 000 μm.

图1 E14.5小鼠腹部体视镜拍摄外观图

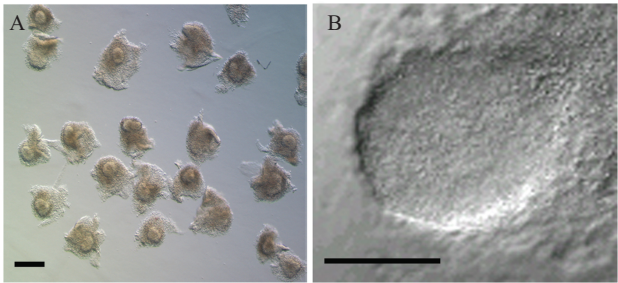
Fig.1 Stereoscope observation of E14.5 mouse mammary anlagen

雌性胎鼠进行收集, 以备后续实验使用。

2.2 E14.5小鼠乳腺原基的解剖分离

雄性小鼠胚胎期的乳腺原基形似凸透镜, 与周围皮肤边缘清晰, 容易分辨; 而雌性小鼠的乳腺原基形似一个圆晕, 与周边组织界线不清晰, 不易分辨(图1)。将准备好的E14.5雌性小鼠进行解剖, 利用外科手术的方法分离小鼠乳腺原基(图2)(具体步骤见材料方法)。

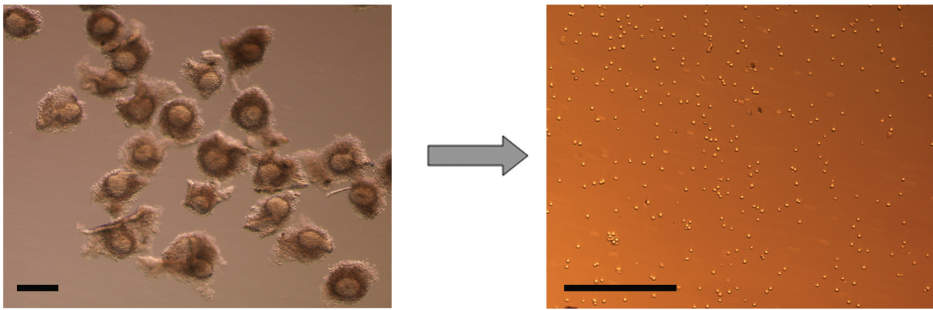
乳腺原基时期是乳腺发育的较早时期, 细胞类型相对简单。因此, 对于它们的消化处理不必像对成年乳腺上皮组织那样使用多种酶共同作用, 且时间较长。对胚胎期小鼠乳腺组织的消化只需要胰酶



A: 新鲜解剖的小鼠乳腺原基。标尺=200 μm; B: 小鼠乳腺原基的放大图像。标尺=100 μm。
A: freshly dissected mouse mammary anlagen. Scale bar=200 μm; B: magnified image of female mouse mammary anlagen. Scale bar=100 μm.

图2 雌性小鼠乳腺原基

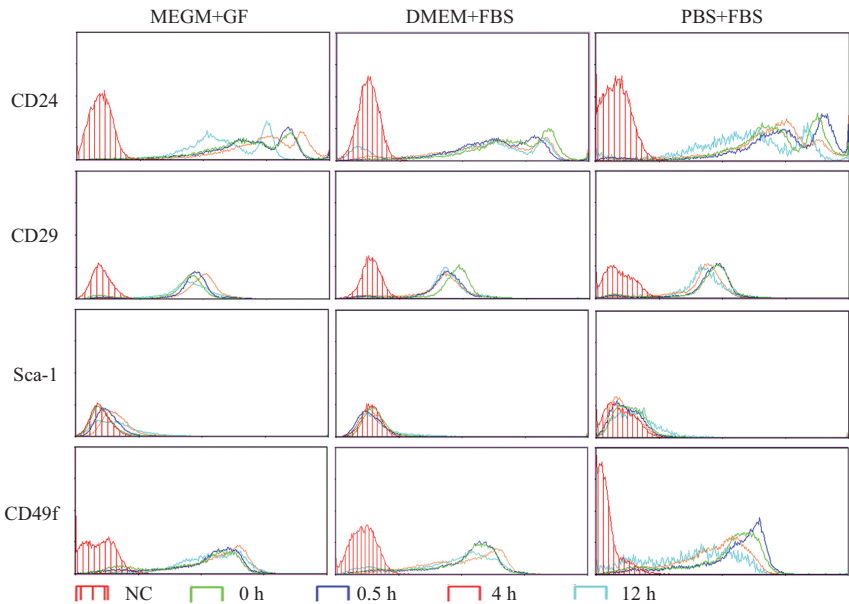
Fig.2 Female mouse mammary anlagen



将新鲜分离的E14.5雌性小鼠乳腺原基放在胰酶中消化, 然后通过机械吹打获得细胞悬液。左图标尺=200 μm; 右图标尺=100 μm。
The freshly dissected E14.5 female mouse mammary anlagen were digested in 0.1% trypsin, and then distributed into cell suspension by mechanical pipetting. Scale bar of the left image=200 μm; Scale bar of the right image=100 μm.

图3 体外消化小鼠乳腺原基

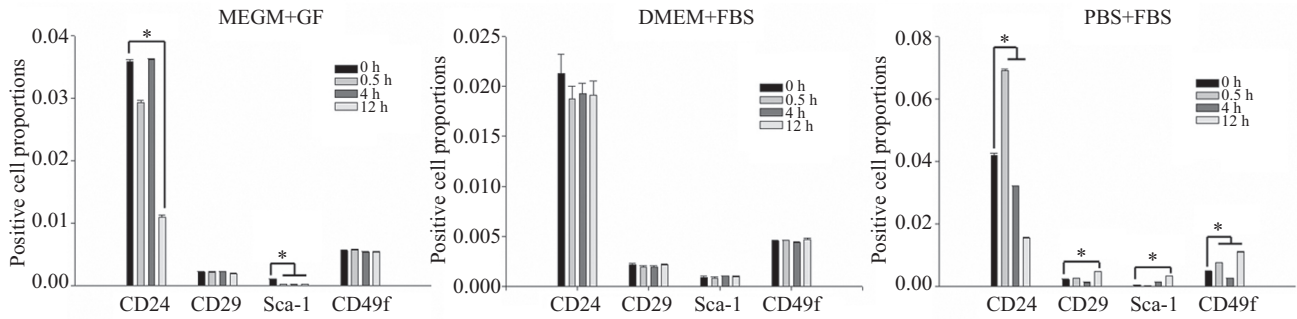
Fig.3 In vitro digestion of female mouse mammary anlagen



流式细胞直方图显示CD24、CD29、Sca-1和CD49f这四个细胞表面标记在不同体外操作环境和时间处理的乳腺原基中表达稳定性有差别。
The flow cytometry histograms showed the different expression stabilities of CD24, CD29, Sca-1 and CD49f in mouse mammary anlagen, which were cultured in different conditions.

图4 体外操作环境和时间的改变对E14.5小鼠乳腺原基细胞特异标记表达的影响

Fig.4 The changes of culture conditions affect specific cell surface marker expressions in E14.5 mouse mammary anlagen cells



对CD24、CD29、Sca-1和CD49f这四个细胞表面标记的流式数据进行统计分析, 结果显示, 在不同体外操作环境和时间处理的乳腺原基中标记的表达稳定性有差别。* $P < 0.05$ 。

The statistic analysis showed the different expression stabilities of CD24, CD29, Sca-1 and CD49f in mouse mammary anlagen, which were cultured in different conditions. * $P < 0.05$.

图5 统计分析体外操作环境和时间的改变对E14.5小鼠乳腺原基细胞特异标记表达的影响

Fig.5 The statistic analysis showed that changes of culture conditions affected specific cell surface marker expressions in E14.5 mouse mammary anlagen cells

处理1 min即可得到单细胞悬液(图3)。但是, 通常情况下, 由于乳腺原基非常小, 需要在解剖镜下分离, 因此操作的时间会相对较长。

2.3 体外操作环境和时间的改变对乳腺原基细胞特异标记表达稳定性的影响

体外操作的环境和时间对于维持组织细胞本身的状态具有重要的影响, 而细胞状态的改变会直接影响细胞表面标记的表达。Sca-1、CD29、CD49f和CD24都是曾经被用于乳腺干细胞分离纯化的细胞表面标记^[4,6,8], 它们的表达也会由于细胞体外处理的环境和时间而改变, 而这些改变都会影响到乳腺干细胞的分离纯化。因此, 为了研究体外操作过程对于乳腺原基细胞表面标记表达的影响, 我们针对在不同的培养环境中处理不同时间的乳腺原基细胞进行了流式分析。首先, 我们分别使用PBS+5% FBS、DMEM+5% FBS和MEGM+GF(B27, 5 $\mu\text{g/mL}$ insulin, 20 ng/mL EGF, 20 ng/mL bFGF)这三种培养基对新鲜分离的乳腺原基组织进行恒温孵育。然后, 在0, 0.5, 4, 12 h这几个时间点取出孵育的乳腺原基组织, 通过消化将其制备成单细胞悬液。最后将这些细胞悬液进行流式分析, 观察CD24、CD29、CD49f和Sca-1的标记表达变化。结果表明, E14.5小鼠乳腺原基组织在DMEM+5% FBS的培养基中孵育时, 12 h之内CD24、CD29、CD49f和Sca-1表达变化不明显, 重复性较好; 而在PBS+5% FBS和MEGM+GF培养基中进行培养时, CD24和Sca-1的表达变化比较大, 且重复性差(图4)。值得注意的是, 当E14.5小鼠乳腺原基组织在MEGM+GF的培养基中培

养时, CD49f的表达最稳定, 重复性最好(图4)。另外, 我们对这四种细胞表面标记的阳性细胞比例进行统计分析, 进一步证明了以上所述标记表达变化趋势(图5)。这些结果表明, 不同的培养环境对于乳腺原基组织细胞的状态有影响, 这表现为细胞表面标记表达的稳定性有所变化。而且, 不同的细胞表面标记在不同的培养基中表现出不同的表达稳定性。另外, 本研究所选择的4个与乳腺干细胞相关的标记的表达变化并没呈现出与乳腺原基组织体外培养时间有明显的相关性。重要的是, 当我们选择特定的培养基(DMEM+5% FBS)对E14.5小鼠乳腺原基组织进行体外培养时, 这4种细胞表面标记都可以呈现出较好的表达稳定性(图4和图5)。由此可见, 乳腺原基组织在体外操作12 h以内, 其细胞状态都可以得到较好的保持, 关键是选择适合的体外培养环境。

3 讨论

乳腺干细胞的分离纯化是一项复杂的工作。研究者需要选择适合的细胞表面标记, 用恰当的方法处理组织细胞, 并且准确地选择细胞亚群, 才能较好的完成这项工作。本文选择CD24、CD29、CD49f和Sca-1这几个曾经被用于乳腺干细胞分离纯化的细胞表面标记进行研究^[4,6,8], 分析了不同体外处理时间以及不同培养环境对于小鼠胚胎乳腺原基细胞的影响, 鉴定了以上四种标记的表达变化, 为胚胎乳腺原基干细胞的分离纯化提供了重要线索。

从现有的研究经验来看, 如果想要成功地在体外获得乳腺干细胞群, 就需要对乳腺组织细胞进行

必要的体外操作, 包括组织解剖、酶消化、标记染色和流式分选等, 而这些必要的体外操作步骤需要耗费大概4~12 h的时间。因此, 12 h应该能够满足实验者在体外对乳腺组织进行有效的操作。所以, 本研究选取0, 0.5, 4, 12 h这几个时间点对体外操作给胚胎乳腺原基组织带来的影响进行研究。结果显示, 当我们使用DMEM+5% FBS培养基时, 乳腺原基组织细胞的标记表达并没有在12 h内出现明显的变化(图4和图5)。当我们使用MEGM+GF培养基对乳腺原基组织进行体外培养时, CD24和Sca-1这两个细胞表面标记的表达在不同时间点上呈现出显著的差异(图5)。而我们使用PBS+5% FBS培养基对乳腺原基组织进行体外培养时, 以上4种细胞表面标记的表达在不同时间点上呈现出显著的差异(图5)。尽管如此, 乳腺原基组织细胞的标记表达变化也并没有表现出与时间变化的相关性。这些结果说明, 如果研究者想要利用以上几种标记进行胚胎期乳腺干细胞群的分离纯化, 12 h以内的体外操作并不会改变胚胎乳腺细胞的状态, 是完全可行的。另外, 适当的体外培养环境的选择, 应该是影响胚胎早期乳腺干细胞群分离纯化的重要因素。

对于原代组织的体外操作, 选择合适的培养环境是保持其细胞状态的关键因素之一, 而细胞状态的改变则会影响细胞表面标记的表达水平。为了鉴定体外操作环境的变化对于小鼠乳腺原基细胞标记表达的影响, 我们选择了几种常用的环境液体, 包括PBS、DMEM和MEGM(乳腺上皮细胞生长培养基)。从以上的实验结果我们可以看出, 培养液对于原代乳腺原基组织细胞的影响较大, 选择不同的体外操作培养液, 会明显影响12 h不同标记的表达重复性。具体来说, 当对三种体外操作环境液体进行比较时, 我们发现, DMEM+5% FBS培养基对于CD24、CD29、CD49f和Sca-1这几个细胞表面标记的表达重复性影响较小。相对而言, PBS+5% FBS培养基对CD24、CD29和CD49f的表达稳定性影响较大, 而MEGM+GF对于CD24和Sca-1的表达稳定性影响较大。这些结果说明, 选择DMEM+5% FBS培养基对于小鼠乳腺原基组织的体外操作, 能够在12 h内较好的保持乳腺原基细胞的状态。如果我们想要从乳腺原基组织中分离纯化乳腺干/祖细胞, DMEM+5% FBS培养基应该是一个比较恰当的选择。

另外, 细胞表面标记的选择也是乳腺干细胞分

离纯化过程中的一个关键因素。之前, 有研究者发现, Sca-1在生长的乳腺导管中的表达汇集于TEB区域, 而在成熟导管中的表达较弱, 呈零星散布^[12]。在胚胎发育早期的乳腺原基中, Sca-1的表达则主要集中在乳腺原基内侧边缘区域^[13]。这些标记表达定位研究发现, 在乳腺发育的不同时期, 标记的位置均存在差异。这些现象提示我们, 乳腺干细胞的迁移现象可能始终伴随着乳腺发育以及再生的全过程。因此, 研究者可以根据多种乳腺干细胞标记表达的时空特异性, 选择适当的乳腺干细胞标记对不同发育阶段乳腺组织中的乳腺干细胞进行准确的分离纯化。本研究中, 当对所选的几种细胞表面标记的表达进行横向比较时, 我们发现Sca-1在小鼠乳腺原基细胞中的表达量较其他三个标记表达量低。对于在不同培养时间点消化获得的乳腺原基细胞, 其CD24和CD49f在0~12 h的表达变化比较剧烈, 而CD29和Sca-1的表达变化相对稳定。之前, 研究者曾经利用CD24/CD29或CD24/CD49f的标记组合分别在成年小鼠的乳腺上皮和晚胚胎期的小鼠乳腺中成功地分离和鉴定了乳腺干细胞^[6,9,14-15]。而本研究对于胚胎早期乳腺原基细胞表面标记表达的鉴定结果显示, CD29在体外培养的小鼠乳腺原基中的表达稳定性要明显好于CD49f。因此我们推测, CD24/CD29的标记组合对于乳腺原基干细胞群的分离纯化应该是更好的选择。在未来的研究中, 我们也将对利用不同标记组合进行乳腺原基干细胞群分离和鉴定进行实验探索, 以期弥补学者们对于胚胎早期乳腺干细胞群研究的不足。

参考文献 (References)

- 1 Robinson GW, Karpf AB, Kratochwil K. Regulation of mammary gland development by tissue interaction. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1999; 4(1): 9-19.
- 2 Smith GH, Chepko G. Mammary epithelial stem cells. *Microsc Res Tech* 2001; 52(2): 190-203.
- 3 Han J, Cao S, Jin H, Liu Y, Wang M, Song J, *et al.* Localization of putative stem cells and four cell populations with different differentiation degree in mouse mammary anlagen. *Histochem Cell Biol* 2006; 126(1): 35-43.
- 4 Shackleton M, Vaillant F, Simpson KJ, Stingl J, Smyth GK, Asselin-Labat, *et al.* Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* 2006; 439(7072): 84-8.
- 5 Veltmaat JM, Mailleux AA, Thiery JP, Bellusci S. Mouse embryonic mammaryogenesis as a model for the molecular regulation of pattern formation. *Differentiation* 2003; 71(1): 1-17.
- 6 Spike BT, Engle DD, Lin JC, Cheung SK, La J, Wahl GM. A mammary stem cell population identified and characterized in late embryogenesis reveals similarities to human breast cancer. *Cell Stem*

- Cell 2012; 10(2): 183-97.
- 7 Bai L, Rohrschneider LR. s-SHIP promoter expression marks activated stem cells in developing mouse mammary tissue. *Genes Dev* 2012; 24(17): 1882-92.
- 8 Stingl J, Eirew P, Ricketson I, Shackleton M, Vaillant F, Choi D, *et al.* Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature* 2006; 439(7079): 993-7.
- 9 Van Keymeulen A, Rocha AS, Ousset M, Beck B, Bouvencourt G, Rock J, *et al.* Distinct stem cells contribute to mammary gland development and maintenance. *Nature* 2011; 479(7372): 189-93.
- 10 Hens JR, Wysolmerski JJ. Key stages of mammary gland development: Molecular mechanisms involved in the formation of the embryonic mammary gland. *Breast Cancer Res* 2005; 7(5): 220-4.
- 11 Lewis MT, Porter WW. Methods in mammary gland biology and breast cancer research: An update. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2009; 14(4): 365.
- 12 Welm BE, Tepera SB, Venezia T, Graubert TA, Rosen JM, Goodell MA. Sca-1(pos) cells in the mouse mammary gland represent an enriched progenitor cell population. *Dev Biol* 2002; 245(1): 42-56.
- 13 Stingl J, Eaves CJ, Zandieh I, Emerman JT. Characterization of bi-potent mammary epithelial progenitor cells in normal adult human breast tissue. *Breast Cancer Res Treat* 2001; 67(2): 93-109.
- 14 Wansbury O, Mackay A, Kogata N, Mitsopoulos C, Kendrick H, Davidson K, *et al.* Transcriptome analysis of embryonic mammary cells reveals insights into mammary lineage establishment. *Breast Cancer Res* 2011; 13(4): R79.
- 15 Sun P, Yuan Y, Li A, Li B, Dai X. Cytokeratin expression during mouse embryonic and early postnatal mammary gland development. *Histochem Cell Biol* 2011; 133(2): 213-21.