

## 领域前沿 · 中国



曾艺, 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所研究员, 博士生导师, 中国科学院“百人计划”、上海市“浦江人才”获得者。1997年毕业于暨南大学生物工程学系, 2000年在该校获硕士学位。2005年毕业于加拿大Simon Fraser大学, 获分子及细胞生物学博士学位。2005年至2010年在美国斯坦福大学Howard Hughes医学院著名科学家Roel Nusse实验室从事博士后研究, 获California Institute of Regenerative Medicine博士后奖学金。2010年10月起任生物化学与细胞生物学研究所研究员。曾艺研究组主要以小鼠乳腺为组织模型, 研究乳腺干细胞自我更新的调控机制及其在乳腺癌发生发展中的变化。已在Nature、Cell Stem Cell、Genes Dev、Development等著名学术期刊发表论文多篇。实验室近期在Nature上发表的研究成果首次发现了乳腺干细胞特异标记分子, 进而证实乳腺干细胞具有多潜能性, 从而结束了乳腺中是否存在多潜能干细胞这一争议, 在干细胞基础研究中获得重大理论突破, 对于乳腺癌的诊断及靶向治疗具有重大意义(Wang *et al.* Nature 2014)。

<http://www.sibcb.ac.cn/PI.asp?id=134>

## 多潜能乳腺干细胞的发现

王代松<sup>1</sup> 蔡车国<sup>1</sup> 董小兵<sup>1</sup> 俞清<sup>1</sup> 张晓鸥<sup>2</sup> 杨力<sup>2</sup> 曾艺<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 细胞生物学国家重点实验室, 上海 200031;

<sup>2</sup>中国科学院-德国马普学会计算生物学伙伴研究所, 中国科学院计算生物学重点实验室, 上海 200031)

**摘要** 小鼠乳腺由多种不同类型的上皮细胞构成。多潜能干细胞位于乳腺发育的顶端, 是乳腺中所有分化细胞类型的来源。然而, 这群多潜能乳腺干细胞此前尚未通过特定的标记基因得到鉴定, 其存在性也备受争议。借助乳腺干细胞体外培养体系, 从Wnt信号通路入手, 发现了蛋白C受体基因*Procr*。在乳腺中, *Procr*作为一个新的Wnt信号通路的靶基因, 能够标记多潜能乳腺干细胞。*Procr*标记乳腺基底细胞中的一个亚群, 这个亚群的细胞低表达基底细胞普遍表达的角蛋白, 表现出上皮-间充质转化的特性。*Procr*阳性的细胞在移植实验中表现出最高的乳腺重建率, 体内追踪*Procr*阳性细胞的后代, 发现*Procr*阳性细胞能够在发育过程中分化形成乳腺上皮的所有细胞类型。多潜能乳腺干细胞的发现结束了乳腺中多潜能干细胞存在性的争议, 对乳腺癌的诊断及靶向治疗具有重大意义。

**关键词** 乳腺干细胞; 多潜能性; 蛋白C受体

## Identification of Multipotent Stem Cells in Mouse Mammary Gland

Wang Daisong<sup>1</sup>, Cai Cheguo<sup>1</sup>, Dong Xiaobing<sup>1</sup>, Yu Qing Cissy<sup>1</sup>, Zhang Xiaou<sup>2</sup>, Yang Li<sup>2</sup>, Zeng Yi Ariel<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>State Key Laboratory of Cell Biology, Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Chinese Academy of Sciences,

Shanghai 200031; <sup>2</sup>Key Laboratory of Computational Biology, CAS-MPG Partner Institute for Computational Biology,

Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

**Abstract** The mammary gland is composed of multiple types of epithelial cells. Mammary stem cells (MaSCs) reside in the heterogeneous basal cells as suggested by transplantation assays, yet a specific marker for

\*通讯作者。Tel: 021-54921433, E-mail: yzeng@sibcb.ac.cn

\*Corresponding author. Tel: +86-21-54921433, E-mail: yzeng@sibcb.ac.cn

网络出版时间: 2014-12-26 15:42

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20141226.1542.003.html>

MaSCs remains unidentified. Moreover, the existence of these multipotent MaSCs remains controversial. Here we demonstrate that protein C receptor (Procr), a novel Wnt target in the mammary gland, marks a unique population of multipotent mouse MaSCs. Procr-positive cells localize to the basal layer, exhibit epithelial-to-mesenchymal transition characteristics and express low levels of basal keratins. Procr-expressing cells have a high regenerative capacity in transplantation assays and differentiate into all lineages of the mammary epithelium by lineage tracing. Our results define a novel mammary stem cell population and settle a ranging debate on the existence of the multipotent mammary stem cell. These cells could be important in the initiation of breast cancer.

**Keywords** mammary stem cells; multipotency; protein C receptor (Procr)

## 乳腺干细胞: 多潜能 VS 单潜能

乳腺是由多种不同类型的细胞构成的导管结构。组成乳腺上皮的细胞类型主要包括基底细胞(basal cell)和管腔细胞(luminal cell)。此外,在怀孕期,位于乳腺导管分支末端的管腔细胞能够进一步分化形成分泌乳汁的特殊细胞类型——腺泡状细胞(alveolar cell)。

很多器官存在着组织特异的干细胞,也称为成体干细胞。通过自我更新和分化,成体干细胞为器官的发育和成体器官的自稳态维持提供各类型的分化细胞。并且,成体干细胞的病变也是肿瘤的重要起源之一<sup>[1]</sup>。因而,研究成体干细胞具有十分重要的意义。而作为出生后发育的器官,乳腺系统在成体干细胞研究中具有得天独厚的优势。随着个体进入青春期,乳腺也会进入一个快速发育阶段,在这一时期,乳腺干细胞的自我更新十分旺盛,从而构建形成完整的乳腺结构。乳腺的第二个快速发育阶段是在怀孕时,这一时期,乳腺干细胞会被重新活化,通过不断地自我更新,来满足怀孕期乳腺发育对多种细胞类型的需求<sup>[1-3]</sup>。乳腺干细胞这种活跃的自我更新和分化,为我们研究其特性提供了便利。

此前的研究利用特异的细胞表面标记Lin<sup>-</sup>、CD24<sup>+</sup>和CD29<sup>hi</sup>,能够将基底层细胞和管腔细胞通过流式分选区分开来,并通过移植实验,发现了乳腺上皮的基底细胞中存在多潜能的乳腺干细胞(mammary stem cells, MaSCs),能够在体内再生成为新的器官,包含所有乳腺分化细胞类型<sup>[4-5]</sup>。然而,乳腺的基底细胞存在很强的异质性,它们包括了多种细胞类型,例如干细胞、祖细胞(progenitor)和终末分化的基底细胞。乳腺基底细胞的异质性在移植实验中的表现就是虽然能够重建完整乳腺,但乳腺重建的成功率较低。如何借助特异的细胞表面标记在基底细胞中鉴定出真正具有高乳腺重建成

功率的多潜能干细胞,此前尚未得到解决。除了借助移植实验,科学家也试图通过细胞谱系追踪的方法(lineage tracing)在乳腺的正常发育过程中鉴定多潜能干细胞的类群。此前,两个实验室分别报道了他们对基底细胞所形成的后代细胞类型进行追踪及分析的结果。其中一方的结果发现,基底细胞形成的后代细胞只有基底细胞,因而认为乳腺中并不存在多潜能的干细胞,只存在单潜能的干细胞<sup>[6]</sup>;而另一方的结果却与之截然相反<sup>[7]</sup>,提示基底细胞能够形成所有细胞类型。除了对所有基底细胞进行谱系追踪外,也有实验室开展了对基底细胞的亚群Lgr5<sup>+</sup>或Axin2<sup>+</sup>细胞进行谱系追踪<sup>[8-9]</sup>。这些工作提示,这些细胞所形成的后代细胞仅贡献于基底细胞,Lgr5<sup>+</sup>或Axin2<sup>+</sup>细胞是单潜能的干细胞。位于乳腺细胞谱系最顶端的多潜能干细胞是否存在仍是未解之谜。

## 借助体外培养系统寻找乳腺干细胞标记

此前的多个研究报道了Wnt信号通路对于乳腺的发育和干细胞特性维持的作用<sup>[10-12]</sup>。通过敲除Wnt蛋白受体Lrp5和Lrp6的方法,破坏Wnt信号通路,会导致乳腺发育的迟缓<sup>[13-14]</sup>。而过表达Wnt信号通路关键蛋白 $\beta$ -catenin,持续激活Wnt信号通路,则会导致怀孕期乳腺发育的提早,并诱发异常的乳腺细胞扩增<sup>[15]</sup>。我们实验室前期的研究也发现了Wnt蛋白成员之一Wnt4和Rspo1在体内协同促进干细胞的自我更新<sup>[16]</sup>。更为重要的是,实验室之前的研究工作,通过在体外3D培养体系中添加Wnt3A蛋白,实现了乳腺干细胞在体外培养条件下的传代扩增和干细胞特性维持,从而建立了乳腺干细胞体外培养的体系<sup>[17]</sup>。基于Wnt信号通路对乳腺干细胞干性维持的关键作用,借助自主建立的体外培养系统,我们在乳腺干细胞中的Wnt信号通路的靶基因中筛选出在

干细胞干性维持中能够发挥重要作用的基因, 并计划在其中编码膜蛋白的靶基因中找到乳腺干细胞特异的分子标记。

### 乳腺干细胞分子标记的发现

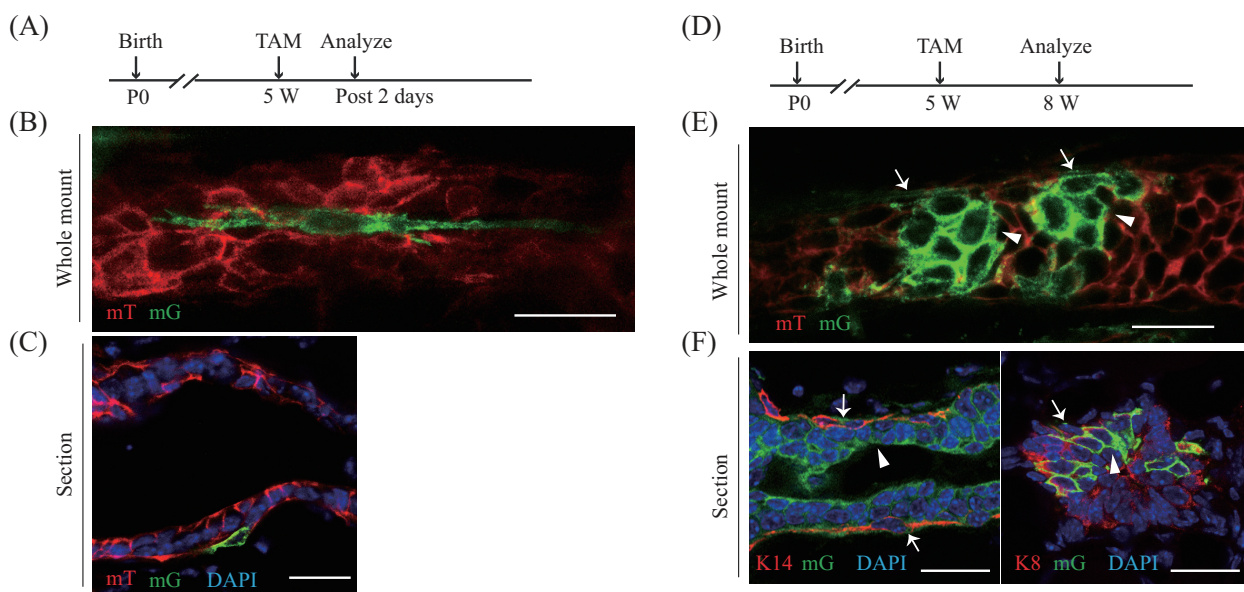
借助芯片(Microarray)的方法, 我们得到了体外培养的干细胞中响应Wnt信号而被激活的一系列基因。我们从中筛选出了*Procr*(protein C receptor)基因。*Procr*是一个单次跨膜蛋白<sup>[18]</sup>, 之前对该蛋白的功能研究主要集中在抗凝血反应、炎症反应和造血干细胞等方面<sup>[19-22]</sup>。*Procr*基因在乳腺干细胞中的作用尚未有报道。借助流式细胞分析技术和免疫荧光染色, 我们发现表达*Procr*的细胞是存在于基底细胞中的一个小的亚群, 约有3%的基底细胞表达*Procr*。而另一方面, *Procr*在管腔细胞中不表达。借助体外3D培养的方法, 我们发现只有*Procr*<sup>+</sup>的基底细胞能够在体外3D培养条件下形成克隆, 而*Procr*<sup>-</sup>的基底细胞没有克隆形成能力。

我们通过移植实验进一步验证了*Procr*<sup>+</sup>的基底细胞的体内再生能力。我们发现, *Procr*<sup>+</sup>的基底细胞能够在免疫缺陷的受体小鼠中更有效地再生成新的器官, 与总体的基底细胞比较, *Procr*<sup>+</sup>的基底细胞的乳腺重建能力提高了约6倍, 这表明*Procr*能够作

为特异的分子标记进一步在基底细胞中富集乳腺干细胞。

### 多潜能乳腺干细胞的发现

为进一步验证*Procr*<sup>+</sup>细胞在正常乳腺发育中是否具有这种多潜能性, 我们构建了*Procr*<sup>CreERT-IRES-tdtomato</sup>基因敲入小鼠。在*Procr*<sup>+</sup>细胞中特异表达CreER重组酶, 该重组酶需要在注射Tamoxifen的情况下才能被条件性地激活。接着, 我们通过遗传实验获得*Procr*<sup>CreERT-IRES-tdtomato</sup>、*Rosa*<sup>mTmG/+</sup>小鼠, 在注射Tamoxifen的情况下, 未发生同源重组的细胞依然表达mTomato, 而*Procr*<sup>+</sup>的细胞产生有活性的重组酶, 开始表达mGFP<sup>[23]</sup>。这种重组是不可逆的过程, 因此*Procr*<sup>+</sup>的细胞的后代细胞都表达mGFP。实验证明, 我们成功地标记了小鼠正常发育状态下乳腺中表达*Procr*的细胞(图1A~图1C)。进一步追踪这群被标记细胞的后代细胞, 分析其细胞类型, 我们证明了这群被标记的*Procr*<sup>+</sup>细胞在正常乳腺发育过程中能够形成所有的乳腺细胞类型(图1D~图1F)。该发现解决了乳腺干细胞领域长期以来对多潜能干细胞是否存在的争议。我们证明, *Procr*<sup>+</sup>细胞是对位于乳腺细胞谱系的最顶端的多潜能干细胞, 在移植实验中具有最高的再生能力, 在谱系



A~C: 短期(2 d)追踪标记基底层中单个*Procr*<sup>+</sup>细胞; D~F: 长期追踪(3周)显示, *Procr*<sup>+</sup>细胞产生的后代包括了基底层细胞和管腔细胞。

A~C: short term (2 days) tracing of single *Procr*<sup>+</sup> cell in basal layer; D~F: long term (3 weeks) tracing shows that the progeny of *Procr*<sup>+</sup> cells contribute to both basal and luminal layer.

图1 细胞谱系追踪: *Procr*能够标记多潜能的乳腺干细胞(根据参考文献[24]修改)

Fig.1 *Procr* labels multipotent adult mammary stem cells in lineage tracing (modified from reference [24])

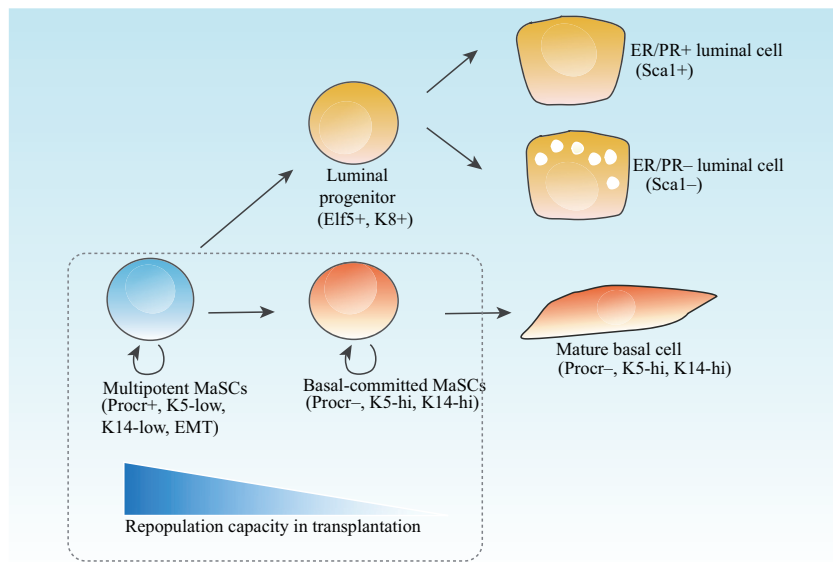


追踪实验中能够分化为所有分化细胞类型<sup>[24]</sup>(图2)。

### 多潜能乳腺干细胞VS乳腺癌干细胞

发现Procr标记的多潜能乳腺干细胞为我们进一步研究乳腺干细胞的特性奠定了坚实的基础。我们通过高通量的RNA-seq技术, 比较了基底细胞中Procr+和Procr-细胞的转录组差异。我们发现, 这群正常乳腺来源的多潜能干细胞具有明显的上皮-

间充质相互转化(epithelial to mesenchymal transition, EMT)的特性。上皮-间充质相互转化在乳腺癌的发生和转移过程中发挥了十分重要的作用<sup>[25-26]</sup>。而Procr也在CD44+富集的乳腺癌干细胞中高表达<sup>[27]</sup>。正常乳腺干细胞表现出明显的EMT特性, 这提示我们, 可能正常乳腺干细胞和乳腺癌干细胞之间的相似性要远比我们之前认识的多得多。这为我们从正常乳腺干细胞入手, 研究肿瘤干细胞的性质, 进而研究肿瘤的发生和转移提供了新的思路。



Procr标记的多潜能乳腺干细胞能够在移植实验中具有最高的乳腺重建率, 并且能在细胞谱系追踪过程中形成所有的乳腺细胞类型。

Multipotent MaSCs marked by Procr can generate all differentiated cell types, as determined by lineage tracing, and displayed the highest repopulation efficiency by transplantation.

图2 多潜能和单潜能的乳腺干细胞在乳腺上皮系统中共同存在(根据参考文献[24]修改)

Fig.2 Multipotent and unipotent MaSCs coexisting in the mammary epithelial cell hierarchy (modified from reference [24])

### 参考文献 (References)

- 1 Visvader JE. Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *Genes Dev* 2009; 23(22): 2563-77.
- 2 Richert MM, Schwertfeger KL, Ryder JW, Anderson SM. An atlas of mouse mammary gland development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2000; 5(2): 227-41.
- 3 Watson CJ, Khaled WT. Mammary development in the embryo and adult: A journey of morphogenesis and commitment. *Development* 2008; 135(6): 995-1003.
- 4 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.
- 5 Shackleton M, Vaillant F, Simpson KJ, Stingl J, Smyth GK, Asselin-Labat ML, *et al.* Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* 2006; 439(7072): 84-8.
- 6 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.
- 7 Rios AC, Fu NY, Lindeman GJ, Visvader JE. In situ identification of bipotent stem cells in the mammary gland. *Nature* 2014; 506(7488): 322-7.
- 8 van Amerongen R, Bowman A N, Nusse R. Developmental stage and time dictate the fate of Wnt/b-catenin-responsive stem cells in the mammary gland. *Cell Stem Cell* 2012; 11(3): 387-400.
- 9 Plaks V, Brenot A, Lawson DA, Linnemann JR, van Kappel EC, Wong KC, *et al.* Lgr5-expressing cells are sufficient and necessary for postnatal mammary gland organogenesis. *Cell Rep* 2013; 3(1): 70-8.
- 10 Briskin C, Heineman A, Chavarria T, Elenbaas B, Tan J, Dey SK, *et al.* Essential function of Wnt-4 in mammary gland development downstream of progesterone signaling. *Genes Dev* 2000; 14(6): 650-4.
- 11 Chu EY, Hens J, Andl T, Kairo A, Yamaguchi TP, Briskin C, *et al.* Canonical WNT signaling promotes mammary placode development and is essential for initiation of mammary gland morphogenesis. *Development* 2004; 131(19): 4819-29.
- 12 Veltmaat JM, van Veelen W, Thiery JP, Bellusci S. Identification

- of the mammary line in mouse by Wnt10b expression. *Dev Dyn* 2004; 229(2): 349-56.
- 13 Lindvall C, Zylstra CR, Evans N, West RA, Dykema K, Furge KA, *et al*. The Wnt co-receptor Lrp6 is required for normal mouse mammary gland development. *PLoS One* 2004; 4(6): e5813.
- 14 Lindvall C, Evans NC, Zylstra CR, Li Y, Alexander CM, Williams BO. The Wnt signaling receptor Lrp5 is required for mammary ductal stem cell activity and Wnt1-induced tumorigenesis. *J Biol Chem* 2006; 281(46): 35081-7.
- 15 Teulie`re J, Faraldo MM, Deugnier MA, Shtutman M, Ben-Ze`ev A, Thiery JP, *et al*. Targeted activation of beta-catenin signaling in basal mammary epithelial cells affects mammary development and leads to hyperplasia. *Development* 2005; 132(2): 267-77.
- 16 Cai C, Yu QC, Jiang W, Liu W, Song W, Yu H, *et al*. R-spondin1 is a novel hormone mediator for mammary stem cell self-renewal. *Genes Dev* 2014; 28(20): 2205-18
- 17 Zeng YA, Nusse R. Wnt proteins are self-renewal factors for mammary stem cells and promote their long-term expansion in culture. *Cell Stem Cell* 2010; 6(6): 568-77.
- 18 Fukudome K, Esmon CT. Identification, cloning, and regulation of a novel endothelial cell protein C/activated protein C receptor. *J Biol Chem* 1994; 269(42): 26486-91.
- 19 Balazs AB, Fabian AJ, Esmon CT, Mulligan RC. Endothelial protein C receptor (CD201) explicitly identifies hematopoietic stem cells in murine bone marrow. *Blood* 2006; 107(6): 2317-21.
- 20 Bae JS, Yang L, Manithody C, Rezaie AR. The ligand occupancy of endothelial protein C receptor switches the protease-activated receptor 1-dependent signaling specificity of thrombin from a permeability-enhancing to a barrier-protective response in endothelial cells. *Blood* 2007; 110(12): 3909-16.
- 21 Spek CA, Arruda VR. The protein C pathway in cancer metastasis. *Thromb Res* 2012; 129(suppl. 1): S80-4.
- 22 Vetrano S, Ploplis VA, Sala E, Sandoval-Cooper M, Donahue DL, Correale C, *et al*. Unexpected role of anticoagulant protein C in controlling epithelial barrier integrity and intestinal inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(49): 19830-5.
- 23 Muzumdar MD, Tasic B, Miyamichi K, Li L, Luo L. A global doublefluorescent Cre reporter mouse. *Genesis* 2007; 45(9): 593-605.
- 24 Wang D, Cai C, Dong X, Yu QC, Zhang XO, Yang L, *et al*. Identification of multipotent mammary stem cells by protein C receptor expression. *Nature* 2014; doi: 10.1038/nature13851.
- 25 Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, *et al*. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008; 133(4): 704-15.
- 26 Schaffner F, Yokota N, Carneiro-Lobo T, Kitano M, Schaffer M, Anderson GM, *et al*. Endothelial protein C receptor function in murine and human breast cancer development. *PLoS One* 2013; 8(4): e61071.
- 27 Shipitsin M, Campbell LL, Argani P, Weremowicz S, Bloushtain-Qimron N, Yao J, *et al*. Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell* 2007; 11(3): 259-73.