

DOI: 10.13376/j.cblls/2016113

文章编号: 1004-0374(2016)08-0856-06



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。现任国际乳腺癌研究协会(IABCR)理事, 中国细胞生物学学会理事。主要研究方向为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。研究组的主要研究工作包括: (1) 乳腺成体干细胞与微环境之间的相互作用及其信号调控网络; (2) WNT 信号维持和促进乳腺干细胞自我更新的分子机制; (3) 以上调控网络和分子机制在乳腺癌发生发展中的作用。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, 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。

乳腺干细胞的发现与乳腺癌靶向治疗的前景

王代松, 曾 艺*

(中国科学院上海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)

摘 要: 乳腺干细胞对组织自稳态的维持和乳腺癌的发生有至关重要的作用, 然而人们对乳腺干细胞的了解仍然非常贫乏。三阴性(雌激素、孕激素、生长素受体阴性)乳腺癌是源于干细胞的乳腺病变, 由于没有已知的分子标记, 至今临床治疗上没有有效的干预手段。以中国科学院干细胞先导专项为依托, 曾艺实验室开展了系统的研究, 获得了一系列前沿性进展: 发现了乳腺干细胞赖以自我更新的关键微环境因子, 建立并优化了能够筛选乳腺干细胞关键基因的体外培养体系; 发现了乳腺干细胞的表面特异标记分子, 探索了乳腺干细胞性质及其与三阴性乳腺癌病变的关系, 为乳腺癌的靶向治疗提供了潜在的新靶点和理论基础。主要对干细胞先导专项中曾艺实验室的原创性工作进行综述。

关键词: 乳腺干细胞; 多潜能性; 蛋白 C 受体

中图分类号: Q813; R737.9 **文献标志码:** A

Identification of mammary stem cell and the prospect on breast cancer targeted therapy

WANG Dai-Song, ZENG Aerial Yi*

(State Key Laboratory of Cell Biology, Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology,
Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract: Mammary stem cells (MaSCs) play pivotal roles in mammary homeostasis and breast cancer, yet the nature and properties of MaSCs are remained elusive. Triple-Negative Breast Cancers (TNBCs) are clinically defined by the lack of expression of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and the absence of

收稿日期: 2016-04-20

基金项目: 中国科学院“干细胞与再生医学研究”战略性先导科技专项(XDA01010307)

*通信作者: E-mail: yzeng@sibcb.ac.cn; Tel: 021-54921433

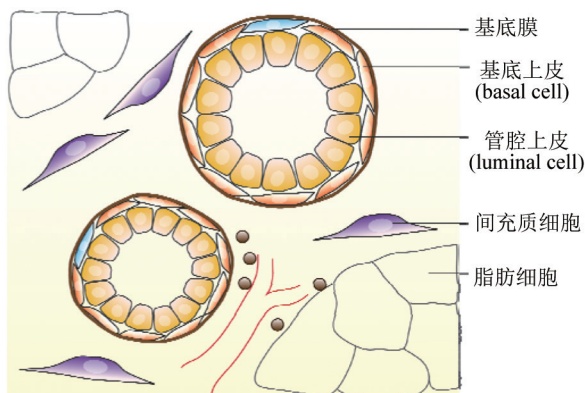
amplification or overexpression of HER2. Treatment of TNBC patients has been challenging due to the absence of well-defined molecular targets. Supported by grants from the “Strategic Priority Research Program” of the Chinese Academy of Sciences, we have carried out a systemic research centering on mammary stem cells. We identify the essential niche signals that MaSCs are dependent on, establish MaSCs *in vitro* culture system that allows screening of MaSCs key factors, identify MaSCs novel surface marker, investigate the properties of MaSCs and explore their relevance in TNBC tumorigenesis. These studies have led to a better understanding of MaSCs and breast cancers, providing novel strategy for potential TNBC cancer treatment. In this article, we summarize our original works funded by the “Strategic Priority Research Program”.

Key words: mammary stem cells; multipotency; protein C receptor (Procr)

成体干细胞具有自我更新能力及多分化潜能, 是处于细胞分化谱系最顶端的细胞。成体干细胞的静息、自我更新或分化状态受到细胞外微环境信号及细胞内基因转录等多重机制的协同调控^[1]。成体干细胞不仅对组织和各个器官系统的发育和再生起十分重要的作用, 而且很有可能是癌症发生的靶点^[2]。由于在大多数器官中仍未找到干细胞的特异性标记, 使得干细胞和其他细胞的属性难以区分, 所以, 尽管成体干细胞如此重要, 人们对于它的性质和发挥作用的分子机制的了解仍然非常有限。

1 乳腺及其成体干细胞

乳腺是一个树形分支的上皮组织, 被包围在间充质细胞和脂肪细胞中。乳腺上皮主要由两层终末分化细胞形成, 基底上皮细胞 (basal cell/myoepithelial cell) 和管腔上皮细胞 (luminal epithelial cell) (图 1)。乳腺在胚胎期形成, 在青春期和孕期迅速发育, 在哺乳期分化, 完成哺乳后通过细胞凋亡退化回成体的形态^[3]。乳腺器官的发育、分化、凋亡的过程在每一个孕期发生, 乳腺干细胞的增殖和分化提供了



管腔上皮和基底上皮细胞组成乳腺上皮组织, 间充质细胞和脂肪细胞组成乳腺基质, 上皮组织与基质由基底膜分隔。

图1 小鼠乳腺横切面图

重要的细胞来源。在 2006 年, 研究者发现乳腺干细胞存在于基底细胞中。通过运用表面分子标记 (Lin^- 、 $CD24^+$ 、 $CD29^{hi}$), 结合流式细胞分选技术, 活体的基底细胞能够被分离出来^[4-5]。这些基底细胞被移植到免疫缺陷的小鼠体内时, 能够形成形态正常、功能完整的新乳腺, 证实了这些基底细胞中存在乳腺干细胞。然而, 运用这些标记 (Lin^- 、 $CD24^+$ 、 $CD29^{hi}$) 分离出的细胞不仅包括乳腺干细胞, 还包括了分化的基底细胞。从移植实验的效率来推测, 在 Lin^- 、 $CD24^+$ 、 $CD29^{hi}$ 细胞中只有约 5% 的细胞是乳腺干细胞^[4]。所以, 找到乳腺干细胞的特异表面标记分子成为了推进这个领域研究的关键。

2 微环境因子的发现及乳腺干细胞培养体系的建立

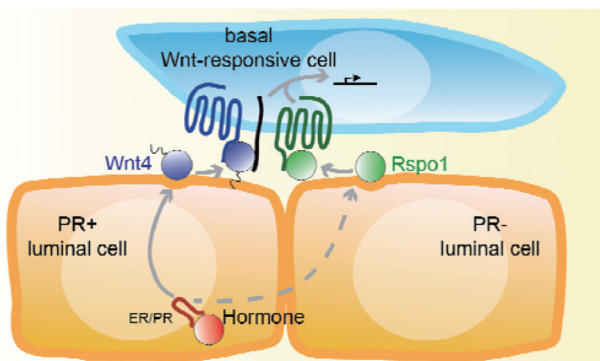
成体干细胞处在特殊的 microenvironment 当中, 称为 niche, 中文统称为微环境。微环境中的信号分子调控成体干细胞的静息、自我更新或分化状态。微环境信号严格调控干细胞的自我更新规律, 对防止由干细胞无限扩增导致的癌症形成有至关重要的影响^[6]。细胞外信号调控的一个重要环节是这些信号的定位性和定量性。微环境信号分子 (niche signal) 的位置决定了干细胞可能存在的位置; 微环境信号分子的量决定了干细胞是否进入自我更新程序而得以维持, 甚至是扩增干细胞的数量。发现关键的微环境信号分子、定位微环境的物理位置及探索上游信号如何调控微环境信号分子的产生量是干细胞研究的重要科学问题。

Wnt 信号是维持成体干细胞特性最重要的微环境信号, 在小肠、肝脏等多个器官中维持成体干细胞的性质^[7-8]。Wnt 是一个家族的细胞外蛋白, Wnt 信号转导是进化上最保守的通路之一。Wnt 蛋白与受体 Frizzled/Lrp 偶联, 级联激活细胞内转录因子 TCF, 启动下游基因的转录调控^[9]。成体干细胞是

Wnt 信号转导通路的直接信号靶点, 响应 Wnt 信号的刺激后激活细胞内信号通路, 表达特异的靶基因。例如在小肠中, 干细胞是位于小肠陷窝中的少量 crypt base columnar (CBC) 细胞, Wnt 信号由周围的间充质细胞和潘氏 (Paneth) 细胞提供, 小肠干细胞响应 Wnt 信号而特异性地表达 Lgr5 基因。另一个例子来自近期的肝脏干细胞的研究^[8]: 在肝脏中, 中央静脉提供 Wnt 信号, 一部分位于中央静脉周围的肝脏干细胞响应来自血管的 Wnt 信号而表达 Axin2, 这群 Axin2 表达的细胞是正常发育过程中肝脏细胞的重要来源。

Wnt 信号转导通路在乳腺发育和乳腺癌形成中至关重要^[10-14]。本实验室在前期的研究证实了 Wnt 信号通路在体内调控乳腺干细胞的自我更新。多个 Wnt 基因在乳腺上皮组织和基质表达^[15-19], 本实验室的研究证明在体内维持干细胞自我更新的 Wnt 家族成员是 Wnt4 及其激动剂 R-spondin1 (Rspo1)^[20]。Rspo1 与 Wnt4 信号分子在相邻的管腔细胞表达并协同作用, 共同构成体内的乳腺干细胞微环境因子。进一步研究发现, Rspo1 与 Wnt4 的表达受雌、孕激素调控, 管腔上皮细胞感应雌激素、孕激素的调控, 通过分泌 Wnt4 和 Rspo1 蛋白促进位于基底的干细胞进入自我更新 (图 2)。本实验室的研究揭示了乳腺干细胞的物理位置及其关键的分子信号, 证明了激素在乳腺干细胞增殖中的重要作用, 揭示了系统性的激素信号如何通过局部的微环境因子 Wnt 信号调控成体干细胞活动的作用机理^[20]。

在了解 Wnt 信号促进乳腺干细胞自我更新的



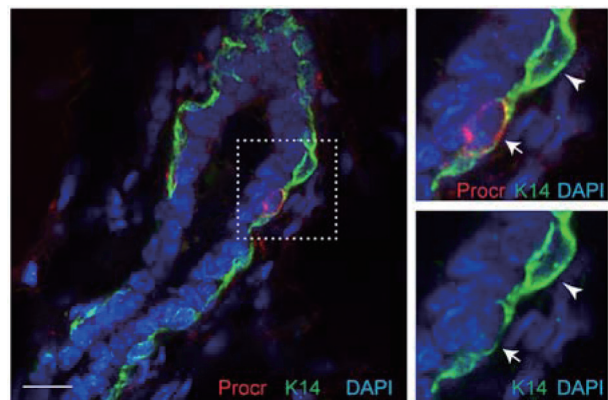
管腔细胞分为两种: 激素受体阳性和激素受体阴性细胞。激素受体阳性的管腔细胞响应雌、孕激素信号刺激分泌 Wnt4; 激素受体阴性的管腔细胞分泌 Rspo1; Rspo1 与 Wnt4 共同构成体内的乳腺干细胞微环境因子, 协同促进基底的乳腺干细胞自我更新。

图2 激素和微环境信号对乳腺干细胞作用模型图

理论上, 本实验室将这个研究成果进一步地应用到成体干细胞的体外培养, 运用纯化的 Wnt 蛋白和 3D 培养方法, 首先建立了乳腺干细胞 (Lin^- 、 CD24^+ 、 CD29^{hi}) 的体外培养和扩增, 并长期保持其干细胞干性的实验体系^[20-21]。乳腺干细胞能够在体外长期培养、连续传代十次以上, 其数量呈几何级上升。这些体外长期培养的乳腺干细胞保持了完整的发育潜能, 在移植实验中能够形成功能完整的新器官。再生的乳腺形态正常、功能完整, 能够在孕期的激素刺激下完成终末分化并产生乳汁。这一成果是研究成体干细胞体外实验手段的重要突破。

3 乳腺干细胞特异表面标记分子的发现

微环境关键信号分子的发现及干细胞体外培养体系的建立为筛选乳腺干细胞的标记基因奠定了坚实的基础。在本实验室建立的乳腺干细胞体外培养和扩增的体系里, 通过基因表达差异的筛选, 在这个培养系统中发现了 Wnt 信号转导通路新的靶基因——蛋白 C 受体 (protein C receptor, Procr), 并通过一系列实验阐明其为乳腺干细胞的表面特异标记分子^[22]。Procr 是一个单次跨膜蛋白, 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^[23-26]。本实验室的研究首次发现, Procr 在小鼠乳腺上皮细胞表达, Procr 标记的干细胞 (Lin^- 、 CD24^+ 、 CD29^{hi} 、 Procr^+) 占有基底细胞层的 3%, 表达较低的基底细胞标记 Keratin 14 (K4) (图 3)。活体分离后的 Procr 阳性细胞展现出干细胞特性, 能够高效率地在体外 3D 培养中形成克隆, 并能够高效率地在移植实验中重建乳腺器官^[22]。乳腺干细胞表面特异标记分子的发现, 首次能够将



Procr 阳性细胞 (红色荧光) 占基底细胞的 3%, 表达较低的基底细胞标记 K4 (绿色荧光)。

图3 Procr 是乳腺干细胞表面标记

干细胞与其他基底细胞分离开来, 使得深入研究乳腺干细胞的性质及其分子调控机制成为可能。通过对 *Procr* 阳性细胞的测序和转录组分析, 本实验室发现乳腺干细胞展现出上皮向间充质转化 (epithelial to mesenchymal transition, EMT) 的特性, 间充质性质的转录因子 *Zeb1*、*Zeb2*、*FoxC2* 等表达升高; 相反地, 上皮细胞的标记基因 *Ecad*、*K14*、*K5* 等表达降低。EMT 的特性与乳腺癌的发生密切相关, 有报道认为 EMT 直接引导乳腺癌干细胞的产生^[27]。本实验室的研究结果提示, 乳腺正常干细胞与之前报导的肿瘤干细胞有相似性。

4 证实乳腺干细胞的分化“多潜能”性

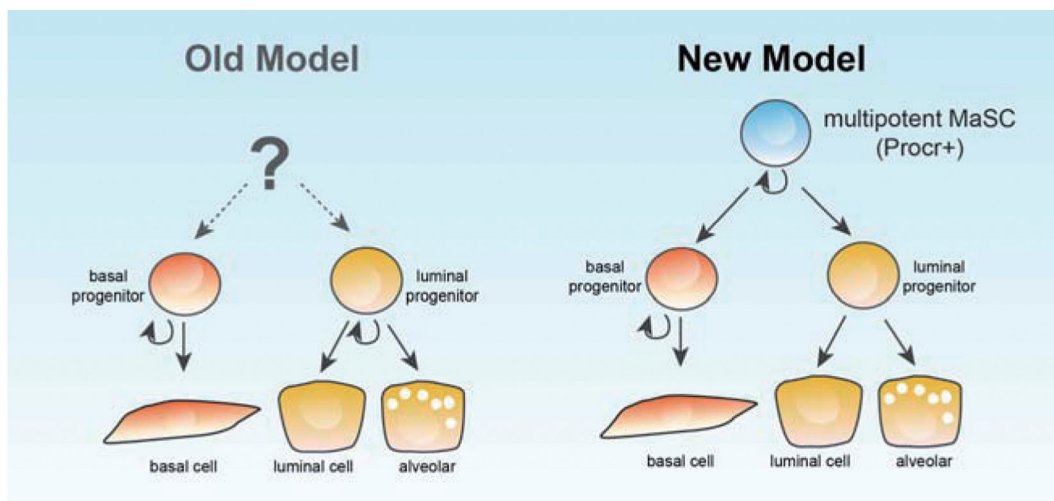
基于乳腺干细胞存在于一部分基底细胞的前期认识, 前人曾经尝试回答乳腺干细胞的分化潜能问题。然而, 无论是利用泛基底细胞标记基因 *K14* 或 *K5* 的启动子驱动的 *CreER* 小鼠模型, 或是利用 *Lgr5*、*Axin2* 等在一部分基底细胞中表达的基因启动子驱动的 *CreER* 小鼠模型进行的体内谱系示踪实验 (lineage tracing), 都未能证实能够分化成为多种类型细胞的“多潜能”干细胞在出生后的乳腺上皮中的存在, 从而有了乳腺器官的自稳态维持是通过单潜能干细胞 (分别是基底干细胞和管腔干细胞) 来维持的假说 (图 4)^[28-30]。

通过对 *Procr* 阳性的乳腺干细胞的表达谱分析发现, *K14* 和 *K5* 的表达都在干细胞中降低, 这提示以前利用 *K14-CreER* 和 *K5-CreER* 的谱系示踪实

验有可能漏掉标记 *Procr* 阳性的干细胞。并且, *Procr* 阳性的乳腺干细胞的表达谱分析显示, 这群细胞与 *Lgr5*⁺ 或 *Axin2*⁺ 的基底细胞亚群也不重叠, 因此, 以往利用 *Lgr5-CreER* 或 *Axin2-CreER* 进行的谱系示踪实验也没有能涵盖 *Procr* 阳性的干细胞。为了探索真正的乳腺干细胞在发育中的分化潜能, 本实验室构建了 *Procr-CreER* 的小鼠模型。该小鼠利用 *Procr* 基因的启动子驱动 *CreER* 重组酶, *CreER* 在注射他莫昔芬 (Tamoxifen) 后能被条件性地激活。接着, 通过遗传实验获得 *Procr-CreER; Rosa^{mTmG/+}* 小鼠, 实现在 *Procr* 阳性细胞中通过同源重组启动 *mGFP* 的表达。同源重组是发生在染色体上的不可逆过程, 因而能够实现对 *Procr* 阳性干细胞及其所有的后代细胞的标记及鉴定。本实验室利用 *Procr* 标记的干细胞进行的谱系示踪实验首次证实, 乳腺干细胞具有多潜能性——能够在发育过程中分化成为乳腺器官中所有上皮细胞类型, 从而结束了乳腺中是否存在“多潜能”干细胞这一争议 (图 4)^[22]。

5 乳腺干细胞表面标记与乳腺癌的靶向治疗

三阴性 (雌、孕激素受体阴性, 生长素受体阴性) 乳腺癌是临床上最难治愈的乳腺癌, 尚没有靶向治疗手段。这类乳腺癌占有乳腺癌的 15%~20%, 具有发病年龄早、恶性程度高、器官转移率高、患者 5 年存活率最低等特点^[31-32]。三阴性乳腺癌由于不表达激素受体和生长素受体, 对于现有的激素或



在旧模型中, 基底细胞和管腔细胞有各自的干细胞, 该模型质疑多潜能干细胞在乳腺中存在; 在新模型中, 我们率先发现了 *Procr* 阳性的多潜能干细胞, 在发育过程中这类干细胞能够分化成为所有的乳腺上皮细胞类型。

图4 发现多潜能乳腺干细胞

生长素抑制药物不响应；由于没有分子标记，不能有针对性地研发药物，目前临床上没有靶点药物和针对性的治疗方法。三阴性乳腺癌由于分化程度低，被认为有可能是从干细胞起源的病变，而且与 Wnt 信号通路的激活有密切的关联^[33-36]。发现乳腺干细胞、了解其特异的标记分子、探索干细胞的性质、对比分析正常干细胞与肿瘤干细胞的异同，对于研究三阴性乳腺癌具有重要意义。而且，由于 Procr 是细胞表面分子，针对该分子设计的中和性抗体不需要进入细胞内就能起作用，因而有可能成为理想的药物靶点。

6 结语

以干细胞先导专项为依托，本实验室以乳腺干细胞为重点开展系统研究，获得了一系列前沿性进展：发现了乳腺干细胞赖以自我更新的关键微环境因子，建立并优化了能够筛选乳腺干细胞关键基因的体外培养体系^[20]；通过基因表达差异筛选，在这个培养系统中发现了乳腺干细胞的表面特异标记分子 Procr^[22]。这一系列自主创新的研究成果推进了整个领域对乳腺干细胞的认知，使得能够利用 Procr 为标记分离出干细胞，用以探索干细胞的特性；能够去探索 Procr 作为细胞表面信号分子在乳腺发育和病变中的作用机制；亦能够最先去研制识别 hPROCR 的具有中和能力的单抗，探索和发现针对三阴性乳腺癌的靶向治疗的新方法。

[参 考 文 献]

- [1] Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell*, 2008, 132: 598-611
- [2] Visvader JE. Cells of origin in cancer. *Nature*, 2008, 459: 314-22
- [3] Richert MM, Schwertfeger KL, Ryder JW, et al. An atlas of mouse mammary gland development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2000, 5: 227-41
- [4] Shackleton M, Vaillant F, Simpson KJ, et al. Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature*, 2006, 439: 84-8
- [5] Stingl J, Eirew P, Ricketson I, et al. Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature*, 2006, 439: 993-7
- [6] Clarke MF, Fuller M. Stem cells and cancer: two faces of eve. *Cell*, 2006, 124: 1111-5
- [7] Barker N, van Es JH, Kuipers J, et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature*, 2007, 449: 1003-7
- [8] Wang B, Zhao L, Fish M, et al. Self-renewing diploid Axin2⁺ cells fuel homeostatic renewal of the liver. *Nature*, 2015, 524: 180-5
- [9] Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2004, 20: 781-810
- [10] Nusse R, Varmus HE. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell*, 1982, 31: 99-109
- [11] Boras-Granic K, Chang H, Grosschedl R, et al. Lef1 is required for the transition of Wnt signaling from mesenchymal to epithelial cells in the mouse embryonic mammary gland. *Dev Biol*, 2006, 295: 219-31
- [12] Brisken C, Heineman A, Chavarría T, et al. Essential function of Wnt-4 in mammary gland development downstream of progesterone signaling. *Genes Dev*, 2000, 14: 650-4
- [13] Chu EY, Hens J, Andl T, et al. Canonical WNT signaling promotes mammary placode development and is essential for initiation of mammary gland morphogenesis. *Development*, 2004, 131: 4819-29
- [14] Lindvall C, Evans NC, Zylstra CR, et al. The Wnt signaling receptor Lrp5 is required for mammary ductal stem cell activity and Wnt1-induced tumorigenesis. *J Biol Chem*, 2006, 281: 35081-7
- [15] Buhler TA, Dale TC, Kieback C, et al. Localization and quantification of Wnt-2 gene expression in mouse mammary development. *Dev Biol*, 1993, 155: 87-96
- [16] Gavin BJ, McMahon AP. Differential regulation of the Wnt gene family during pregnancy and lactation suggests a role in postnatal development of the mammary gland. *Mol Cell Biol*, 1992, 12: 2418-23
- [17] Lane TF, Leder P. Wnt-10b directs hypermorphic development and transformation in mammary glands of male and female mice. *Oncogene*, 1997, 15: 2133-44
- [18] Olson DJ, Papkoff J. Regulated expression of Wnt family members during proliferation of C57mg mammary cells. *Cell Growth Differ*, 1994, 5: 197-206
- [19] Weber-Hall SJ, Phippard DJ, Niemeyer CC, et al. Developmental and hormonal regulation of Wnt gene expression in the mouse mammary gland. *Differentiation*, 1994, 57: 205-14
- [20] Cai C, Yu QC, Jiang W, et al. R-spondin1 is a novel hormone mediator for mammary stem cell self-renewal. *Genes Dev*, 2014, 28: 2205-18
- [21] 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: 568-77
- [22] Wang D, Cai C, Dong X, et al. Identification of multipotent mammary stem cells by protein C receptor expression. *Nature*, 2015, 517: 81-4
- [23] Bae JS, Yang L, Manithody C, et al. 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: 3909-16
- [24] Balazs AB, Fabian AJ, Esmon CT, et al. Endothelial protein C receptor (CD201) explicitly identifies

- hematopoietic stem cells in murine bone marrow. *Blood*, 2006, 107: 2317-21
- [25] Fukudme K, Esmon CT. Identification, cloning, and regulation of a novel endothelial cell protein C/activated protein C receptor. *J Biol Chem*, 1994, 269: 26486-91
- [26] Vetrano S, Ploplis VA, Sala E, et al. Unexpected role of anticoagulant protein C in controlling epithelial barrier integrity and intestinal inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 19830-5
- [27] Mani SA, Guo W, Liao MJ, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 2008, 133: 704-15
- [28] Van Keymeulen A, Rocha AS, Ousset M, et al. Distinct stem cells contribute to mammary gland development and maintenance. *Nature*, 2011, 479: 189-93
- [29] van Amerongen R, Bowman AN, Nusse R. Developmental stage and time dictate the fate of Wnt/ β -catenin-responsive stem cells in the mammary gland. *Cell Stem Cell*, 2012, 11: 387-400
- [30] de Visser KE, Ciampricotti M, Michalak EM, et al. Developmental stage-specific contribution of LGR5⁺ cells to basal and luminal epithelial lineages in the postnatal mammary gland. *J Pathol*, 2012, 228: 300-9
- [31] Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med*, 2010, 363: 1938-48
- [32] Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*, 2011, 121: 2750-67
- [33] DiMeo TA, Anderson K, Phadke P, et al. A novel lung metastasis signature links Wnt signaling with cancer cell self-renewal and epithelial-mesenchymal transition in basal-like breast cancer. *Cancer Res*, 2009, 69: 5364-73
- [34] Khramtsov AI, Khramtsova GF, Tretiakova M, et al. Wnt/ β -catenin pathway activation is enriched in basal-like breast cancers and predicts poor outcome. *Am J Pathol*, 2010, 176: 2911-20
- [35] Liu CC, Prior J, Piwnica-Worms D, et al. LRP6 overexpression defines a class of breast cancer subtype and is a target for therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 5136-41
- [36] Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol*, 2007, 8: R76