

具有乳腺导管再生能力的小鼠乳腺原基细胞群黏附因子的表达特点*

宋嘉哲¹⁾ 薛 恺¹⁾ 李 松²⁾ 李 宁^{1)**}

(¹⁾ 中国农业大学生物学院, 农业生物技术国家重点实验室, 北京 100193; (²⁾ 北京济普森生物技术有限公司, 北京 100193)

摘要 乳腺干细胞是研究器官形成、细胞增殖、分化、生存和凋亡等信号通路的理想模型, 而近来的研究发现许多成体干细胞的特异性表面标记都与细胞黏附分子(cell adhesion molecule, CAM)家族相关. 因此, 研究胚胎期乳腺干/祖细胞群的黏附分子基因表达特点, 对于纯化和鉴定胚胎期乳腺干/祖细胞具有重要指导意义. 用成年小鼠乳腺上皮干细胞的标记 CD24 和 CD49f 来分选小鼠胚胎期 14 天乳腺原基细胞群, 发现 CD24⁺ 和 CD49f⁺ 双阳性的乳腺原基细胞包含两个细胞群: CD24^{hi}CD49f⁺ 细胞群和 CD24^{low}CD49f⁺ 细胞群. 它们占乳腺原基总细胞的比例分别为 16% 和 47%. 在随后的细胞培养实验和体内移植再生实验中发现, CD24^{low}CD49f⁺ 细胞群可以贴壁, 而且具有再生乳腺导管的能力, 相反, CD24^{hi}CD49f⁺ 细胞群既不能贴壁也不具有移植再生能力. 这些结果表明, 这两个细胞群分别代表不同的细胞类型, 而 CD24^{low}CD49f⁺ 细胞群有可能包含具有自我更新能力的乳腺原基干/祖细胞. 挑选了可能与乳腺相关的 19 个黏附分子, 并对这两群细胞进行了定量 PCR 检测. 结果表明, 具有乳腺导管重建能力的 CD24^{low}CD49f⁺ 细胞群的黏附分子基因表达明显区别于 CD24^{hi}CD49f⁺ 细胞群, 而且其中几个与成体干细胞相关的标记基因在 CD24^{low}CD49f⁺ 细胞群中的表达显著高于 CD24^{hi}CD49f⁺ 细胞群.

关键词 乳腺原基, 乳腺干细胞, 细胞黏附分子, 再生

学科分类号 Q2, Q7

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00120

由于乳腺干细胞(mammary stem cells, MaSCs)具有自我更新、分化成乳腺各种类型细胞以及可能的单细胞重建完整乳腺的能力, 越来越多的人对它产生了浓厚的研究兴趣. 目前, 乳腺干细胞的研究以成年小鼠为主, 原因是胚胎期小鼠乳腺在取材方面存在技术操作上的困难. 2006 年, Stingl 和 Shackleton 等^[1-2]第一次用干细胞标记 CD29/CD49f 和 CD24 成功地从小鼠乳腺上皮组织中富集到 Lin⁻CD24^{low}CD49f^{hi} 乳腺干细胞群和 Lin⁻CD24^{hi}CD29^{hi} 乳腺干细胞群. 对于胚胎乳腺的研究, 早在 2000 年, Robinson 等^[3]就已经证明胚胎期 15 天的小鼠乳腺原基经移植能够再生乳腺导管树, 但直到目前为止还没有人从乳腺原基中分离到具有乳腺再生能力的细胞群. 人们对乳腺原基细胞的了解还很模糊. 那么乳腺原基中的所有细胞都具有再生能力吗, 它是否包含不同的细胞类型? 这些问题尚需要我们进一步研究.

最近发现, 许多成体干细胞的表面特征标记都

与细胞黏附分子有关. 细胞黏附分子(cell adhesion molecule, CAM)的作用主要是参与细胞与细胞之间及细胞与细胞外基质之间相互作用, 可大致分为五类: 钙黏素、选择素、免疫球蛋白超家族、整合素及透明质酸黏素. 目前发现的与黏附分子家族基因相关的成体干细胞有许多种, 例如, 脂肪干细胞表面高表达 CD29、CD44 和 CD49e^[4], 乳腺癌干细胞的表面标记 CD44^[5], 皮肤角质细胞干细胞的标记 CD29、CD49f 和 CD34^[6-7]等. 另外, 脐带间充质干细胞表达 CD51、CD29 和 CD44^[8], 胎儿骨髓间充质干细胞高表达 CD29、CD44 及 CD49e 分子, 低表达 CD106、CD54、CD11b^[9]等等. 那么,

* 国家重点基础研究发展计划(973)(2006CB102106)和国家自然科学基金创新群体(30621064)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 010-62733323, E-mail: ninglbau@public3.bta.net.cn

收稿日期: 2010-03-16, 接受日期: 2010-04-20

不同类型的干细胞可能有其独特的细胞表面黏附分子表达特点。

针对以上的问题, 我们用成体小鼠乳腺上皮干细胞的标记对乳腺原基细胞进行分选, 发现乳腺原基细胞 CD24 和 CD49f 双阳性表达区域包含两个分界清晰的细胞群。随后, 我们通过实验来研究这两个不同的乳腺原基细胞群的特点及其黏附分子表达, 以进一步探讨乳腺干/祖细胞群特有的细胞表面黏附分子表达特点。

1 材料与方法

1.1 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 4:00 左右放入种公鼠笼子中进行交配, 隔日早上 9:00 检查阴栓, 确定是否受孕。以见栓日为第 0 天, 14 天后早上取得的胎鼠计为胚胎期 14 天; 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。

1.2 乳腺原基准备

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, 小心将子宫剪下, 迅速放入盛有 DPBS 的培养皿中, 用弯头镊小心将子宫壁撕破, 取出胎鼠, 并将其转移至另一盛有 DPBS 的培养皿中, 反复清洗 3 遍至液清为止。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, 用游丝镊剥离乳腺原基。

1.3 乳腺原基细胞准备

将分离好的乳腺原基用口吸管转移至 0.1% 胰酶中, 37℃ 孵育 1.5 min。机械吸打吹散, 相应浓度的胰酶抑制剂(Sigma 公司)抑制胰酶活性。之后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。

1.4 流式细胞染色及分选

将准备好的单细胞悬液离心, 用 1% BSA 重悬, 4℃ 封闭 10 min。使用一抗直标的抗体按照说明书建议的用量, 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。数据分析使用 SUMMIT 4.0 软件(<http://www.Dakocytomati on.com>)。细胞分选使用 MOFLO (High-performance cell sorter, Dako)。

1.5 细胞贴壁实验

为了更好地增加细胞的黏附, 我们在培养板上

先铺了一层饲养层细胞作为细胞支持基质。之后将分选的 GFP-CD1 小鼠来源的绿色细胞培养在饲养层细胞上。细胞培养基使用 Ham's F-12 培养基 (Invitrogen 公司) 添加 5% FBS, 1 g/L 氢化可的松 (Sigma 公司), 5 g/L 胰岛素 (Sigma 公司) 和 20 μg/L EGF (Sigma 公司)。饲养层细胞的制备: 使用无菌条件下的 12.5 天 ICR 小鼠胚胎成纤维细胞, 一般使用第二代到第四代的饲养层细胞。饲养层细胞用丝裂霉素 C (10 mg/L) 处理后使用。以 5.6×10^4 个/cm² 的细胞密度铺在 0.1% 明胶处理过的培养皿上。

1.6 移植再生分析

21 日龄的雌性 Scid 小鼠作为受体动物。通过手术去除这些小鼠腹股沟内侧第四对乳腺的内源上皮。GFP-CD1 小鼠作为供体动物。细胞移植的时候, 用过火烤拉伸的巴斯德口吸管将分选得到的不同细胞群注射到上皮完全去除干净的 Scid 乳脂垫上。7 周后, 手术取出乳腺, 并将其展开在载玻片上, 通过荧光倒置显微镜 (Nikon 公司) 观察再生情况并照相。

1.7 组织免疫荧光染色

将乳腺组织固定于 4% 多聚甲醛溶液中, 石蜡切片依照标准步骤进行。免疫荧光染色时, K14 一抗 4℃ 孵育过夜, 二抗室温孵育 1.5 h, K18 一抗复染过夜, 二抗室温孵育 1.5 h, 详细步骤参考文献[10]。共聚焦显微镜使用 Nikon Eclipse TE2000-E。

1.8 RNA 提取及 Real-time PCR

我们用 RNeasy micro kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA) 从指定的细胞群提取总 RNA, 基本参照美国 ABI 7900 定量 PCR Mix 试剂盒说明书进行操作^[10]。实验数据分析和作图均使用 Microsoft Office Excel 软件, $P < 0.05$ 被认为是统计学差异显著。

2 结 果

2.1 CD24^{hi}CD49f⁺细胞群与 CD24^{med}CD49f⁺细胞群具有不同的贴壁特点

CD49f 属于细胞黏附分子整合素家族, CD24 是神经干细胞的标记。2006 年 Stingl 等使用标记 CD24^{med} 和 CD49f^{hi} 富集了成年小鼠乳腺上皮组织中的干细胞群, 证实了成年乳腺上皮干细胞的存在。这里我们用 CD24 和 CD49f 来分选小鼠胚胎期 14 天的乳腺原基细胞。根据 CD24 和 CD49f 的表达, 流式细胞分析结果表明, CD24⁺ 和 CD49f⁺ 双阳性区域内乳腺原基细胞可以分成 2 个界限明

显的细胞群： $CD24^{hi}CD49f^{+}$ 细胞群 (16%) 与 $CD24^{med}CD49f^{+}$ 细胞群 (47%，图 1a)。在随后进行的体外培养实验中，我们发现， $CD24^{hi}CD49f^{+}$ 细

胞群不能贴壁(图 1b 和 1c)，而 $CD24^{med}CD49f^{+}$ 细胞群可以贴壁(图 1d 和 1e)。

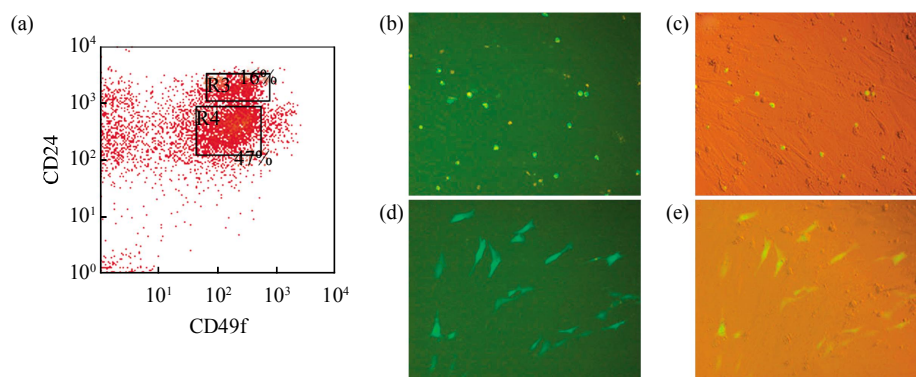


Fig. 1 $CD24^{hi}CD49f^{+}$ and $CD24^{med}CD49f^{+}$ cell populations possess of different abilities for attaching plate

(a) Gating strategy used to purify cells from the two $CD24^{+}$ plus $CD49f^{+}$ double-positive populations. (b, c) In monolayer culture assay, the cells from $CD24^{hi}CD49f^{+}$ population could not attach to the plate. (d, e) The cells from $CD24^{med}CD49f^{+}$ population could attach to the plate and grow.

2.2 $CD24^{med}CD49f^{+}$ 细胞群具有再生乳腺导管结构的能力

为了进一步研究这两个细胞群的功能特点，我们分别对这两个细胞群进行了免疫缺陷小鼠的体内移植实验。发现 $CD24^{hi}CD49f^{+}$ 细胞群不具有再生乳腺导管的能力(图 2a)，而 $CD24^{med}CD49f^{+}$ 细胞群能够再生乳腺导管单元(图 2b)。随后，我们将再生组织进行石蜡包埋切片和乳腺导管上皮标记的免疫

荧光染色实验，发现再生的乳腺导管具有导管腔的结构，并且表达乳腺导管肌上皮标记 K14(keratin 14)和腔上皮标记 K18(keratin 18)(图 2c)。以上结果表明，具有贴壁特点的 $CD24^{med}CD49f^{+}$ 细胞群具有一定的自我更新能力。因此我们认为 $CD24^{med}CD49f^{+}$ 细胞群有可能包含具有乳腺再生能力的乳腺干 / 祖细胞。

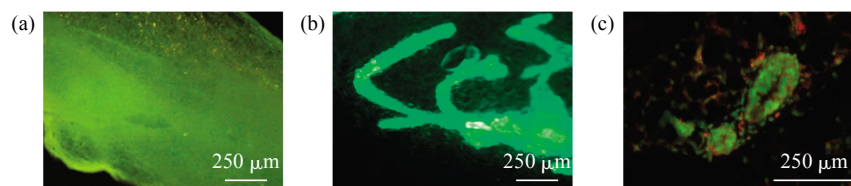


Fig. 2 $CD24^{med}CD49f^{+}$ cell population are capable of regenerating mammary ductal units

(a) No outgrowths were detected after the transplantations of $CD24^{hi}CD49f^{+}$ cells into cleared mammary fat pad for 7 weeks. (b) 7-week GFP⁺ duct outgrowth regenerated in cleared mammary fat using $CD24^{med}CD49f^{+}$ mammary anlagen cells. (c) Expressions of K14 (green) and K18 (red) were detected in regenerated mammary duct.

2.3 $CD24^{hi}CD49f^{+}$ 与 $CD24^{med}CD49f^{+}$ 细胞群具有不同的黏附分子基因表达特点

上面的结果表明， $CD24^{hi}CD49f^{+}$ 细胞群不能贴壁也不具有再生能力，相反， $CD24^{med}CD49f^{+}$ 细胞群可以贴壁，也具有一定的再生乳腺导管的能力。我们通过查阅资料知道细胞表面分布大量的黏附分

子，而且这些黏附分子在干细胞的特异表面标记研究中具有重要作用。因此，为了阐明这两个细胞群各自特定的黏附分子表达特点，我们选择了 19 个有可能与乳腺细胞相关的黏附因子，对这两个细胞群进行定量 PCR 检测。结果表明，有 12 个黏附分子在 $CD24^{med}CD49f^{+}$ 细胞群中的表达高于

CD24^{hi}CD49f⁺ 细胞群, 它们分别是 CD29, CD49e, CD49d, E-cadherin, CD49a, CD44, N-cadherin, CD51, CD11a, CD56, CD11c, CD11b(图 3b). 但是也有 7 个黏附分子在 CD24^{hi}CD49f⁺ 细胞群中的表达高于 CD24^{med}CD49f⁺ 细胞群, 包括 CD49c, CD104, P-cadherin, CD54, CD49b, CD50, CD102(图 3a). 其中, CD49d, E-cadherin, CD49b, CD50, CD102 这几个基因的表达值在两个细胞群中都偏低. 但我们仍然可以通过这些实验了解这两个乳腺原基细胞群的不同特点.

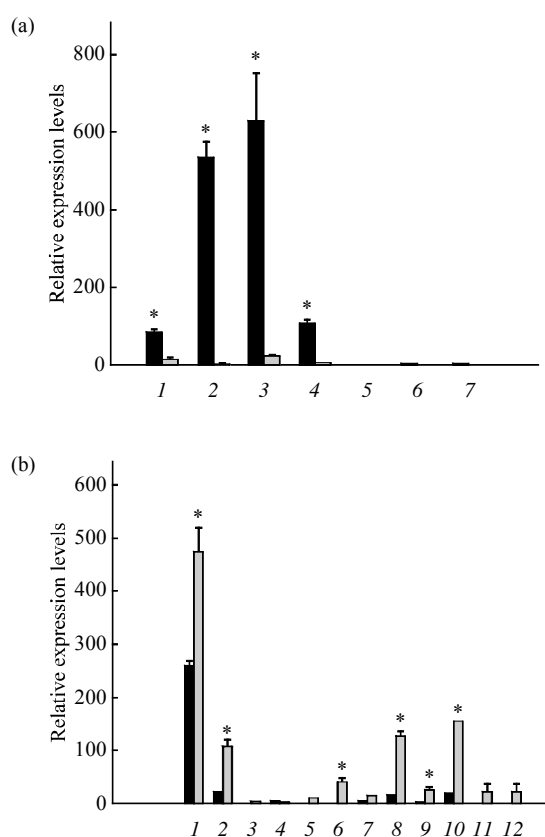


Fig. 3 CD24^{hi}CD49f⁺ and CD24^{med}CD49f⁺ cell populations possess of different cell adhesion molecule gene expressions

(a) Quantitative RT-PCR of 7 cell adhesion molecule genes that are highly expressed in the CD24^{hi}CD49f⁺ cells. Error bars, $\pm$ standard deviation (SD). "*" indicate remarkable statistical differences ($P < 0.05$).

1: CD49c; 2: CD104; 3: p-cad; 4: CD54; 5: CD49b; 6: CD50; 7: CD102;

(b) Quantitative RT-PCR of 12 cell adhesion molecule genes that are highly expressed in the CD24^{med}CD49f⁺ cells. Error bars, $\pm$ standard deviation (SD). "*" Indicate remarkable statistical differences ($P < 0.05$).

1: CD29; 2: CD49e; 3: CD49d; 4: E-cad; 5: CD49a; 6: CD44; 7: N-cad; 8: CD51; 9: CD11a; 10: CD56; 11: CD11c; 12: CD11b. ■ : CD24^{hi}CD49f⁺; □ : CD24^{med}CD49f⁺.

3 讨 论

乳腺是一个复杂的器官, 成体小鼠乳腺组织包括许多种细胞类型, 有乳腺上皮细胞、基质细胞、脂肪细胞、神经细胞、淋巴细胞等等. 而在乳腺的发育早期, 细胞的组成则相对简单, 但是具体的乳腺原基包含哪些类型的细胞, 现在还没有研究清楚^[1]. 我们分离到的两群乳腺原基细胞具有明显不同的贴壁能力和再生能力, 表明这两群细胞分别代表不同的细胞类型. 由于 CD24^{med}CD49f⁺ 细胞群具有再生乳腺导管的能力, 于是我们猜测这群细胞可能包含具有再生能力的乳腺原基干/祖细胞, 但这群细胞是否还包含其他分化等级的细胞, 尚需要进一步研究. 此外, 根据 CD24^{hi}CD49f⁺ 细胞群的不贴壁特性, 我们推测它不属于乳腺上皮特点的细胞类型^[12].

从定量表达分析结果可知, 有 7 个黏附分子在 CD24^{hi}CD49f⁺ 细胞群中的表达值高于在 CD24^{med}CD49f⁺ 细胞群中的表达值, 而另外的 12 个黏附分子在 CD24^{med}CD49f⁺ 细胞群中表达值较高. 这个结果表明这两群细胞表达不同的细胞标记, 进一步证明他们分属不同的细胞类型. 并且, 在 CD24^{med}CD49f⁺ 细胞群中相对高表达的 12 个黏附分子, 可能与这群细胞的贴壁特性以及再生能力有潜在的联系. 由于最近越来越多的研究发现成体干细胞的表面黏附因子呈特异性表达, 而具有乳腺导管再生能力的 CD24^{med}CD49f⁺ 细胞群可能包含乳腺干/祖细胞, 所以这群细胞也应该有其独特的黏附分子表达特点. 那么, 在这群细胞中显著高表达的 12 个黏附分子就有可能代表乳腺原基干/祖细胞群的特点. 以前的研究表明 CD29 是成年乳腺上皮干细胞的标记, 也是皮肤角质化干细胞的标记^[6]. 在这里, CD49f 富集的细胞群同样具有 CD29 的高表达, 暗示原基干/祖细胞群的细胞标记与成年乳腺上皮干细胞群可能具有一致性. 但是由于 CD24^{hi}CD49f⁺ 细胞群也同时表达 CD29, 暗示这两个标记对于富集乳腺原基干/祖细胞而言可能不具有特异性. 因此, 需要通过分析其他细胞表面标记的表达, 进一步寻找特异的乳腺干细胞标记. 而在两个细胞群间存在的表达显著差异的黏附分子中, CD49e 和 CD51 是其他成体干细胞的标记^[8-9], CD44 是乳腺癌的标记^[5], 这些都有可能作为候选标记用以进行乳腺原基干细胞的分离纯化. 另外,

我们目前得到的证据并不足以解释 CD24^{med}CD49f⁺ 细胞群可以贴壁和移植再生的原因, 还需要在今后的其他实验进一步探索.

总之, 我们的研究揭示了小鼠乳腺原基中包含不同类型的细胞. 其中的一群细胞有可能包含乳腺原基干/祖细胞. 而未来对于乳腺原基干/祖细胞群的特点鉴定将有助于我们进一步了解胎儿乳腺发育过程与乳腺干细胞的直接关系以及乳腺干细胞的发育起源. 此外, 一些研究者指出, 怀孕早期胎儿过度暴露于激素条件下会增加出生后的乳腺癌易感率^[13-15], 而这些很有可能是正常干细胞癌变所致^[16]. 因此, 我们的研究同样为一些因胎儿激素环境改变而引起乳腺癌的治疗性研究提供有利的理论基础和操作可行性.

参 考 文 献

- [1] Stingl J, Eirew P, Ricketson I, *et al.* Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature*, 2006, **439**: 993-997
- [2] Shackleton M, Vaillant F, Simpson K J, *et al.* Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature*, 2006, **439**: 84-88
- [3] Robinson G W, Accili D, Hennighausen L. *Methods in Mammary Gland Biology and Breast Cancer Research*. New York: Kluwer Academic/Pleum Press, 2000
- [4] Gronthos S, Franklin D M, Leddy H A, *et al.* Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol*, 2001, **189**: 54-63
- [5] Al-Hajj M, Wicha M S, Benito-Hernandez A, *et al.* Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**: 3983-3988
- [6] Jones P H, Watt F M. Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell*, 1993, **73**: 713-724
- [7] Yano S, Ito Y, Fujimoto M, *et al.* Characterization and localization of side population cells in mouse skin. *Stem Cells*, 2005, **23**: 834-841
- [8] Tian X WH-y, Fu R Y. Isolation and biological characteristics of umbilical cord mesenchymal stem cells. *J Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, 2009, **13**(32): 6340-6343
- [9] Feng L, Zhang X H, Hu J S, *et al.* Biological characteristics of fetal bone marrow mesenchymal stem cells. *J Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, 2008, **12**(12): 2253-2257
- [10] 罗 娟, 张 炜, 于 冰, 等. 鸡 Slc24a5 基因的 cDNA 克隆、表达分析及其与黑色素沉积的关系研究, *生物化学与生物物理进展*, 2008, **35**(1): 69-76
Luo J, Zhang W, Yu B, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2008, **35**(1): 69-76
- [11] Han J, Cao S, Jin H, *et al.* Localization of putative stem cells and four cell populations with different differentiation degree in mouse mammary anlagen. *Histochem Cell Biol*, 2006, **126**: 35-43
- [12] Dontu G, Abdallah W M, Foley J M, *et al.* *In vitro* propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev*, 2003, **17**: 1253-1270
- [13] Michels K B, Xue F. Role of birthweight in the etiology of breast cancer. *Int J Cancer*, 2006, **119**: 2007-2025
- [14] Potischman N, Troisi R. In-utero and early life exposures in relation to risk of breast cancer. *Cancer Causes Control*, 1999, **10**: 561-573
- [15] Trichopoulos D. Hypothesis: does breast cancer originate in utero?. *Lancet*, 1990, **335**: 939-940
- [16] Liao M J, Zhang C C, Zhou B, *et al.* Enrichment of a population of mammary gland cells that form mammospheres and have *in vivo* repopulating activity. *Cancer Res*, 2007, **67**: 8131-8138

Expression Pattern of Selected Cell Adhesion Molecules in Mammary Duct Repopulating Cells Sorted From The Mouse Mammary Anlagen*

SONG Jia-Zhe¹⁾, XUE Kai¹⁾, LI Song²⁾, LI Ning^{1)**}

¹⁾ State Key Laboratories for AgroBiotechnology, College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

²⁾ Ji Pulin Biotech Ltd, Beijing 100193, China)

Abstract Mammary stem cells (MaSCs) is an ideal model for studies of organogenesis, cell proliferation, differentiation, survival and apoptosis. Recent researches showed that many adult stem cell surface markers belonged to cell adhesion molecule (CAM) family. Therefore, analysis of relationship between mammary stem/progenitor cells and the expression pattern of CAM have directive meanings for identifying embryonic mammary stem/progenitor cells and understanding their properties. Here, cells in E14 mouse mammary anlagen were purified using the adult mouse mammary epithelial stem cell (MaESC) markers of CD24 and CD49f. It was found that CD24 and CD49f double-positive cells contain two distinct cell populations: CD24^{hi}CD49f⁺ and CD24^{med}CD49f⁺, and their percentages in total mammary anlagen cells were 16% and 47%, respectively. In the following monolayer culture and *in vivo* transplantation tests, it was found that the CD24^{med}CD49f⁺ cells could attach plate and regenerate mammary ductal units; correspondingly, CD24^{hi}CD49f⁺ cells did not possess of these capabilities. These results indicate that the two mammary anlagen cell populations represent different cell types, and CD24^{med}CD49f⁺ population may contain the self-renewal mammary anlagen stem/progenitor cells. Afterwards, the differences in the expressions of 19 mammary-related CAM transcripts in the two cell populations were validated by quantitative real-time PCR analysis. The data show that the CAM gene expressions of mammary repopulating-CD24^{med}CD49f⁺ cells are dramatically different from that of CD24^{hi}CD49f⁺ cell population. The expressions of several adult stem cell markers in CD24^{med}CD49f⁺ cell population are remarkable higher than those in CD24^{hi}CD49f⁺ cell population.

Key words mammary anlagen, mammary stem cell, cell adhesion molecule, regeneration

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00120

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (2006CB102106) and sponsored by Innovation Fund, China (30621064).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-62733323, E-mail: ninglbau@public3.bta.net.cn

Received: March 16, 2010 Accepted: April 20, 2010