文章编号:1000-5404(2008)18-1681-05

专家述评

乳腺干细胞研究进展

肖福英[1],Jing LIU(刘 婧)[2],Tao-sheng HUANG(黄涛生)[2,3,4] ([1]桂林医学院生物技术学院,广西 桂林 541004;[2]Department of Human Genetics/Pediatrics,[3] Department of Pathology, [4]Department of Developmental and Cell Biology, University of California, Irvine, California, USA)

乳腺发育是一个复杂的过程。在小鼠早期乳腺发育中,简单的乳腺导管树已经形成[1]。出生后直至青春期,乳腺生长一直保持静止[2]。在青春期,从导管树的顶端长出终末芽胚(terminal end buds, TEBs)。TEBs由两种细胞组成,帽细胞形成单一的外层,体细胞构成多重的内层。目前认为乳腺干细胞(mammary stem cells, MSCs)存在于TEBs的帽细胞中,TEBs中细胞增殖导致乳腺脂肪垫中的导管延长,在青春期末,TEBs接触到脂肪垫的边缘而消失[2,3]。一个复杂的网络调控着乳腺的发育。在细胞水平,乳腺由肌上皮细胞和管腔上皮细胞构成,两者都起源于共同的乳腺干细胞,乳腺干细胞有3种功能:①发育成成熟乳腺;②参与妊娠、哺乳和月经周期中乳腺的增殖;③修复受损的乳腺组织。

1 乳腺干细胞的分离

乳房组织中乳腺干细胞的存在最初是由限制性稀释移植实验证实的[4],始祖细胞能产生一个完整的、有功能的乳腺。许多高水平的研究[5]又将这一观点进一步发展,例如,通过外科手术将乳腺组织移植入已清除腺体的小鼠脂肪垫,并且不依赖于年龄和发育时期。一些技术如细胞表面标志SCA1、Hoechest染色、Rhodamine-123荧光染色、BrdU标志和雌激素受体等[6]曾被用来识别和分离乳腺干细胞。然而,这些技术都已被证明不十分可靠。

直到最近,新的细胞表面标记的发现极大地推动了乳腺干细胞的研究。许多数据显示$Lin^-CD24^+CD29^{high}$细胞群中含有乳腺干细胞[6,7]。单个$Lin^-CD24^+CD29^{high}$细胞能产生有功能的乳腺[6]。分离乳腺干细胞时,首先将Lin^+($CD31^+$、$CD45^+$和$TER119^+$)细胞移去,CD31是上皮细胞的标志,CD45和TER119是造血细胞的标志。因此,Lin^+($CD31^+$、$CD45^+$和$TER119^+$)细胞被认为是分化成熟的细胞。与之相反,CD29是皮肤干细胞标志[8],而CD24是神经干细胞标志[9]。采用这些细胞表面标志,最终单个$Lin^-CD24^+CD29^{high}$细胞能产生有功能的乳腺,支持乳腺干细胞确实存在于这种细胞亚群的论点。

2 乳腺球培养

乳腺球(mammosphere)类似于悬浮培养的神经干细胞形成的神经球。Dontu等[10]为了分离未分化的乳腺干细胞而建立了这一技术。在体外培养条件下,乳腺干细胞以锚定独立的方式(anchorage-independent manner)悬浮生长形成乳腺球,起源于单个细胞的乳腺球能够分化成乳腺的多种不同的细胞系。在基质胶上,从乳腺球分离出的单个细胞能形成类似乳腺的功能性导管和小叶结构,加入泌乳刺激素能使细胞分泌β-casein进入管腔。其他研究也证实由乳腺球分离出的细胞能在多次传代后保持未分化状态。乳腺球培养系统已广泛应用于乳腺干细胞自我更新和分化的信号通路研究。

3 乳腺干细胞增殖和生存的信号通路

具体见图1。

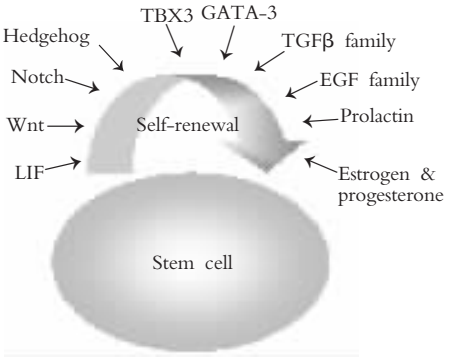


图1 乳腺干细胞的自我更新和分化可能涉及的途径

3.1 Wnt信号通路在乳腺癌和乳腺干细胞增殖中的作用

在Wnt信号通路中,Wnt蛋白通过与其受体复合物结合产生信号,受体复合物由Frizzle和LDL受体家族组成。细胞质中,β-catenin为Wnt信号通路中的重要角色,其稳定性受复合体降解的调节。在缺乏Wnt信号时,包括APC和Axin支架蛋白在内的几种蛋白与β-catenin形成复合体,导致其被蛋白酶降解。当Wnt蛋白与其受体结合,Wnt信号通路激活,β-catenin在细胞质中累积并且进入细胞核与Tcf/Lef家族转录因子形成复合体,进而调节靶基因的表达。在乳腺的发育中,Wnt是必需的。文献[11]报道$Lef1^{-/-}$小鼠的表型提示Wnt信号调节胚胎的乳腺发育。此外,研究还表明在怀孕早期Wnt 4介导孕酮诱导的导管侧支形成[12];Wnt 1或Wnt 10b转基因的高表达引起处女鼠乳腺的过度分支和过早发育[13];Axin的过量表达抑制β-catenin,在怀孕期引起乳腺泡形成的缺陷[14]。以上研究结果充分说明Wnt信号通路在正常乳腺发育中起重要作用。

最近的研究显示Wnt信号通路与胚胎时期的乳腺干细胞

通信作者:黄涛生,男,福建省连城市人,加州大学终身教授,儿科学、发育生物学、病理学博士生导师,博士后导师,该校心血管遗传部主任和MitoMed分子诊断实验室主任,主要从事遗传病的分子机制方面的研究。曾获由美国国立卫生院颁发的杰出医生奖和加州大学尔湾分校医学科学家奖。E-mail:huangts@uci.edu

收稿日期:2008-06-30;**修回日期**:2008-07-10

分化有关。Wnt 10b 转基因动物的乳腺出现小叶增生并有转变为癌症的风险,提示 Wnt 信号与多能祖细胞群扩增相关。已有研究证明 Wnt 信号在乳腺干细胞增殖和扩增中的作用。Musashi 1(Msi 1) 是一个已知的神经干细胞标志,在乳腺标记保留细胞(lable-retaining cells,LRC)和侧群细胞(side population cell,spc)中表达[11],被认为是乳腺干细胞标志之一[15]。Msi 1 在小鼠乳腺上皮细胞系的表达导致始祖细胞($CD24^{high}$ $CD29^{+}$ 细胞)的扩增和 β-catenin 的细胞核定位增加。Msi 1 的表达不仅激活 Wnt 信号通路,而且抑制了 $p21^{Cipl}$ 的表达 。Wang 等[15]由此认为 Msi 1 表达作用是促进 Cyclin D1 和 Cyclin D2 依赖蛋白激酶的活化和 G_1/S 细胞周期的转变,从而促进始祖细胞的扩增和增殖。

与 Msi 1 一样, 小窝蛋白(caveolins)也通过调节 Wnt 信号通路调节乳腺干细胞增殖。小窝蛋白是质膜内陷的主要结构蛋白,称为细胞质膜微囊(caveolae)[16,17]。小窝蛋白具有许多功能,包括通过与绞手架结构域 (caveolin scaffolding domain, CSD)相互作用的信号转导调节[17-19]。小窝蛋白-1(Cav-1)在不同的细胞类型中表达,包括血管内皮细胞[17-20]。它通过 Wnt 信号通路在许多组织中发挥抑制原生性增殖蛋白和癌蛋白活性的作用,包括乳腺组织。从 Cav-1 基因敲除小鼠分离出的乳腺细胞中,Sca-1 和角蛋白 6(keratin 6) 以及 β-catenin 在乳腺导管中的表达增加[21]。上述研究表明 Cav-1 是 Wnt 信号通路的一个负性调节因子[17-22]。由于 Wnt 信号通路激活,Cav-1 基因表达缺失可以间接促进乳腺干细胞自我更新。

在乳腺癌中,Wnt 信号通路的许多成分已被证实为激活的原癌基因[23],这表示 Wnt 信号通路异常可促进乳腺癌的发生。由 Liu 等[24]研究证实:小鼠体内 Wnt 信号效应物的正向表达导致乳腺干细胞的积累,在形态上与细胞增生相关。Sdc-1 敲除小鼠(抗 Wnt-1 和 β-catenin 诱导肿瘤小鼠)和 Wnt 信号通路过表达转基因小鼠杂交产生的后代肿瘤发生率降低,潜伏期较长。进一步研究表明在肿瘤发生、发展的过程中,杂交后代的始祖细胞增殖减低。因此,乳腺干细胞的扩增可能是肿瘤易感性的决定性因素。与此一致,Li 等[21]的研究也表明转基因编码 Wnt 信号通路的成分能从始祖细胞中诱导乳腺癌发生。MMTV-Wnt-1 转基因小鼠产生含有 Keratin-6 和 Sca-1 阳性细胞的前瘤样病变和增生性肿瘤。此种小鼠产生的肿瘤中管腔上皮细胞和肌上皮细胞共存,说明恶性转化发生于同一祖细胞。总之,近期的研究表明 Wnt 信号通路的异常激活可能通过乳腺干细胞引起肿瘤发生。

3.2 FGF 信号通路在乳腺癌和乳腺发育中的作用

成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)信号通路也在乳腺癌和乳腺发育中起重要作用[25,26]。成纤维细胞生长因子-3(fibroblast growth factor 3, FGF-3)具有复杂的表达模式,并在发育的胚胎组织增殖和分化中起广泛作用。用小鼠乳腺肿瘤病毒(mouse mammary tumor virus, MMTV)插入激活 FGF-3 与乳腺肿瘤发生相关[27]。转基因小鼠的 FGF-3 异常过度表达会导致乳腺增生[28,29]。Ornitz 等[30]报道,在早期处女鼠中 FGF-3 过量表达引起乳腺畸形发育。但在早期的乳腺发育和肿瘤发生的初期,由于缺乏暂时的、可逆的转基因表达系统,目前尚无法评价 FGF-3 的作用。此外,实验证明 FGF-10 是 FGFR 2β 主要的配体,两者在乳腺发育中至关重要。

3.3 Notch 信号通路的作用

Notch 信号及其配体在乳腺发育中起重要作用[31],在 Notch 4 位点 MMTV 的插入引起乳腺癌[32],转基因小鼠模型中,Notch 4 过量表达也会引起乳腺癌[33]。Notch 信号通路在乳腺干细胞自我更新和分化中的作用已由乳腺球培养证实,其配体过量表达导致乳腺球数目的显著增加[34]。反之,使用抗体阻止 Notch 4 通路可阻断乳腺球的形成。过表达 Msi 1 的乳腺上皮细胞中始祖细胞的扩增增加($CD24^{high}CD29^{+}$ 细胞)[15],同时一些与 Notch 和 Wnt 信号途径相关的蛋白激酶被上调,用定量 RT-PCR 分析表明 Notch 1、Notch 的配体 DL 1 和 Jag 1,以及 Notch 靶基因 Hes1 表达均增加[15]。通过 Msi 1 抑制 Numb 蛋白(与 Notch1 相互作用决定细胞去向)被发现能保持 Notch 活性、下游配体以及效应基因的转录,Numb 蛋白由此被认为是 Notch 信号通路的正性调控因子。

研究表明缺氧状态可保持干细胞的表型并促使分化标志物的表达降低,从而阻止细胞分化[35-37]。体内实验显示干细胞的缺氧调节基因表达水平相当高[38]。有研究表明 Notch 信号通路与缺氧诱导因子 1(hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)相互作用可促进干细胞表型的表达[36]。Sansone 等[37]报道 p66Shc(哺乳动物长寿基因)受缺氧刺激诱导,可控制 Notch-3 的表达,这种相互作用导致 Notch 配体的上调。此外,p66Shc, Notch-3 和 Jagged-1 相互作用被证明能促进人类干细胞自我更新。上述研究表明,Notch 信号的激活对乳腺干细胞的增殖和自我更新起重要作用,并可促进干细胞表型表达。

3.4 Hedgehog 信号通路的作用

在乳腺的发育中, Hedgehog(Hh)信号也扮演重要角色。研究表明在乳腺导管形态发生和乳腺上皮细胞静态平衡的过程中,Hh 信号参与了基质与乳腺上皮细胞之间的相互作用[39,40]。在乳腺癌中,Hh 信号通路的一些组成成分被发现有突变或过量表达[41]。Hh 能刺激乳腺干细胞的自我更新[42],这个通路在神经干细胞的增殖中也有重要作用[43]。Hh 信号通路组成成分 PTCH 1、Gli 1 和 Gli 2 在正常人类乳腺干细胞的乳腺球培养中高度表达[44]。经诱导分化,这些基因则会下调。此外,研究还表明 Hh 信号在富集的乳腺癌干细胞(Lin^{-}/$CD44^{+}$/$CD24^{-/low}$ 细胞)中被激活,提示其在癌症发生的调控作用。Bmi-1 介导的 Hh 信号活化可以增加乳腺球细胞的数目和乳腺球大小。在乳腺干细胞中,当 Smoothened(Smo)基因激活时可增加乳腺球形成的有效性[45],但同时会降低乳腺再生能力。Li 等[39]报道 Hh 活化可增加乳腺干细胞有丝分裂。与 Wnt 和 Notch 信号通路一样,Hh 信号通路在调节乳腺干细胞增殖和癌症发生中也发挥了重要作用。

3.5 TBX3 和乳腺干细胞

TBX3 是 T-Box 基因家族的一种转录因子,人类 TBX3 突变引起尺骨-乳腺综合征(ulnar-mammary syndrome, UMS),其临床特征之一是乳腺发育不全,说明 TBX3 对正常乳腺发育中起重要作用[46,47]。TBX3 杂合基因敲除会引起成年小鼠乳腺导管分支减少[48],纯合基因敲除导致胚胎死亡和乳腺缺失[49],这进一步支持 TBX3 在乳腺发育中的作用。研究表明 TBX3 在1/3的乳腺癌细胞系中过量表达[50]。生物素标记研究证实乳腺癌患者血清中 TBX3 水平升高[51]。TBX3 在原发性乳腺癌组织中也过量表达,TBX3 与 HDACs 相互作用可抑制 $p14^{ARF}$ 肿瘤抑制基

因[52]。此外,TBX3 过量表达使 MEF 细胞永生化[50,53-55]。在大鼠膀胱癌细胞中敲除 TBX3 能抑制细胞增殖和促进细胞凋亡[56]。在肝癌中 TBX3 是 Wnt/β-catenin 信号通路下游的介质,说明 TBX3 在肝癌发生中起着重要作用[57]。以上资料表明 TBX3 与乳腺发育和乳腺癌的形成相关,TBX3 在乳腺干细胞维持和分化中起关键作用。

此外,TBX3$^{-/-}$小鼠缺乏 Lef1 和 Wnt10b 表达,提示 Wnt 信号是 TBX3 的下游靶位,TBX3 通过 Wnt 信号通路影响乳腺的发育。在乳腺发育中,Wnt-表达/Lef1-反应的乳腺细胞很有可能是 TBX3 诱导的间叶细胞信号的靶位,或 Wnt 表达在上皮细胞乳腺原基形成位点被这些信号诱导。异常的 DKK1 阻碍上皮细胞 TBX3 的表达。因此,Wnt 信号既位于 TBX3 的上游也位于其下游[58]。另外,FGF 信号通路与 TBX3 表达的诱导有关[25]。当把 FGF 浸泡株植入小鼠胚胎中,其周围的间叶细胞 TBX3 表达增加。在可见乳腺原基时期,TBX3 从乳腺间叶细胞表达转到上皮细胞的表达[25],从遗传学方面,FGF、TBX3 和 Wnt 之间的准确关系尚不明了。

3.6　GATA-3 与乳腺干细胞

GATA-3 的是 GATA 家族的转录因子,在乳腺干细胞分化中也起着重要作用, GATA-3 在乳腺上皮细胞中高度表达。敲除 GATA-3 后,因不能形成乳腺基板和终末芽胚,使实验动物乳腺发育产生严重缺陷[59],成年小鼠 GATA-3 的条件性敲除会导致未分化管腔细胞扩增。GATA-3 不仅对乳腺干细胞分化为成熟的管腔细胞极为重要,对分化成熟的管腔上皮细胞的保持也是必需的。

4　乳腺癌干细胞

分离与鉴定乳腺癌干细胞是发展有效的治疗方法的关键。现有证据表明,乳腺癌干细胞起源于干细胞,通过近年发展的细胞表面标志技术鉴别乳腺癌干细胞,带有 CD44$^+$CD24$^{-/low}$标志的细胞群被认为含有干细胞样的人乳腺癌细胞,少量的 CD44$^+$CD24$^-$ 细胞就能复制出人乳腺癌模型。但单个的 CD44$^+$CD24$^-$细胞不能形成复杂的乳腺癌,未来的研究仍需进一步证实这就是乳腺癌干细胞。

由 BRCA-1 基因缺陷引起的小鼠乳腺肿瘤细胞系中 CD44$^+$CD24$^-$或 CD133$^+$细胞(已知的人类乳腺癌干细胞标志)[60]的数目增加。这些细胞能够形成细胞球,仅需要 50 ~ 100 个 CD44$^+$CD24$^-$或 CD133$^+$标志细胞就可使 NOD/SCID 小鼠形成肿瘤[60]。干细胞相关基因(Oct4、Notch1、Aldh1、Fgfr1 和 Sox1)在 CD44$^+$CD24$^-$或 CD133$^+$细胞中表达增加[60]。此外,这些细胞比其他细胞更具 DNA 损害药物耐药性,提示其可能影响肿瘤治疗效果,还说明 BRCA-1 基因缺陷小鼠乳腺肿瘤含有不同的肿瘤干细胞群。乳腺癌干细胞是否存在于 BRCA-1 基因相关乳腺肿瘤和其是否影响治疗效果还需进一步研究。虽然许多研究认为 CD44$^+$CD24$^-$或 CD133$^+$细胞可作肿瘤干细胞标志,Zucchi 等[61]证实一个单一的 LA7 细胞(取自大鼠乳腺腺癌)有能力产生所有乳腺的细胞系;并能产生形态、功能和乳腺导管相似的分支导管样结构;在 NOD/SCID 鼠能形成不同类型的肿瘤。此外,从 LA7 衍生的肿瘤中所得的细胞有类似单个 LA7 细胞的性质,说明 LA7 可能是一种癌症干细胞。

另一候选乳腺癌干细胞标志是乙醛脱氢酶(ALDH)。ALDH1 是细胞内乙醛氧化脱氢酶,ALDH1 在干细胞分化早期氧化视黄醇形成视黄酸[62]。鼠和人类的造血及神经干细胞 ALDH1 活性增高[63],Hoechst 染色方法和 ALDH 活性已被用来纯化和鉴定鼠和人的造血干细胞[64,65]。循环祖细胞也可用 ALDH 活性来鉴定[66]。另一研究显示 ALDH1 的表达可能表示乳腺上皮细胞具有干细胞特征。Ginestier 等[67]发现 ALDH 活性增加的正常人和癌症患者的乳腺上皮细胞具有干/祖细胞特性。含有高水平的 ALDH 的正常乳腺上皮细胞群能形成乳腺球,从中分离的细胞能自我更新 。ALDH 高活性的乳腺癌细胞可以重现亲代肿瘤的杂合性,说明 ALDH 高活性的乳腺癌细胞也包含干细胞群。Ginestier 等[67]还认为 ALDH1 免疫组化可用来鉴别乳腺干细胞。ALDH1 免疫组化染色阳性的细胞不能被 CK18(管腔上皮标志)和 SMA (肌上皮标志)抗体染色,ALDH1 阳性细胞定位于末端导管小叶单位。与此一致,另一研究也认为乳腺干细胞定位于乳腺导管[68]。在乳腺癌临床检测中 ALDH1 的表达与预后差有关。

癌症复发被认为是由于非分裂的癌症干细胞具有抗药性。比如,大多数与 BRCA-1 基因相关的乳腺癌在解除铂治疗 2 ~ 3 个月后获得抗铂性[69]。对这些肿瘤细胞分析发现,与原发性肿瘤移植相比,CD29^{high}CD24^{med}细胞群在铂难治性继发肿瘤移植中显著增加,从 6.6% ~ 11.0% 增加至 16.5% ~ 29.2%。这表明克隆演变和癌症干细胞扩增可能是化疗耐药的一个原因。免疫疗法是另一种用来消除癌症干细胞群的治疗方法。Engelmann 等[70]研究提示作为免疫治疗靶位,MUC1 肿瘤抗原在 MCF7 乳腺癌细胞系的癌症干/始祖细胞中也表达。这些干细胞在体内引发 MUC1$^+$肿瘤,肿瘤中保留了 MUC1$^+$侧细胞群。因此,干/祖细胞像成熟的肿瘤细胞一样可能是抗 MUC1 免疫治疗的直接靶位。Li 等[71]研究显示添加突变 rh471 TNF-α 到 MCF7 亚群(乳腺癌干细胞标记阳性)可促进细胞凋亡和降低自我更新的能力。突变 rh471 TNF-α 可负性调节乳腺癌干细胞,也有可能被用于乳腺癌治疗。

实体肿瘤中的癌症干细胞是用 Hoechst3342 染色等技术,根据细胞表面标志的各种表达来鉴定的。目前,几种实体肿瘤的癌症干细胞鉴别仅是一小亚群瘤细胞,代表它们分化后代的一种非均质混合物。要鉴别和分离能产生新肿瘤的单个乳腺癌干细胞,Li 等[72]采用悬浮培养结合化疗药物分类的方法,将 TMD40 小鼠乳腺癌细胞在无血清培养基中培养,通过流式细胞仪测试 CD44$^+$CD24$^-$的表达,用抗癌剂紫杉醇和阿霉素处理细胞,快速杀死分裂的癌细胞,留下相对静止的乳腺癌干细胞。在悬浮培养中有 77% 的细胞含有 CD44$^+$ CD24$^-$标志,单个的肿瘤细胞在 0.35 的高峰血药浓度下能在小鼠体内产生肿瘤,这种新型的鉴别单个乳腺癌干细胞的方法可以用来识别其他实体瘤癌症干细胞。

5　乳腺干细胞应用前景

乳腺干细胞研究将极大地推进对乳腺发育、乳腺癌形成的了解以及乳腺癌治疗方法的发展。目前的资料表明,少量的癌症干细胞就可发展为乳腺癌,提示应重新评估目前治疗乳腺癌的方法。我们治疗乳腺癌患者的大多数方法是针对增殖和终末分化的细胞,这些疗法可能会暂时导致肿瘤萎缩,但不能清除肿瘤干细胞。而肿瘤干细胞可能会抵抗放疗和化疗,增加肿

瘤复发风险。因此,研究乳腺干细胞和乳腺癌干细胞是建立更好治疗方法的关键。

关键词:乳腺干细胞;乳腺癌干细胞;信号通路
中图法分类号:R322.66 **文献标识码**:A

参考文献:

[1] Robinson G W. Cooperation of signalling pathways in embryonic mammary gland development[J]. Nat Rev Genet, 2007, 8(12): 963 - 972.
[2] Watson C J, Khaled W T. Mammary development in the embryo and adult: a journey of morphogenesis and commitment[J]. Development, 2008, 135(6): 995 - 1003.
[3] Smalley M, Ashworth A. Stem cells and breast cancer: A field in transit[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(11): 832 - 844.
[4] Deome K B, Faulkin L J, Jr. , Bern H A, *et al*. Development of mammary tumors from hyperplastic alveolar nodules transplanted into gland - free mammary fat pads of female C3H mice[J]. Cancer Res, 1959, 19(5): 515 - 520.
[5] Smith G H, Medina D. A morphologically distinct candidate for an epithelial stem cell in mouse mammary gland[J]. J Cell Sci, 1988, 90 (Pt 1): 173 - 183.
[6] Shackleton M, Vaillant F, Simpson K J, *et al*. Generation of a functional mammary gland from a single stem cell[J]. Nature, 2006, 439 (7072): 84 - 88.
[7] Visvader J E, Lindeman G J. Mammary stem cells and mammopoiesis [J]. Cancer Res, 2006, 66(20): 9798 - 9801.
[8] Jones P H, Harper S, Watt F M. Stem cell patterning and fate in human epidermis[J]. Cell, 1995, 80(1): 83 - 93.
[9] Rietze R L, Valcanis H, Brooker G F, *et al*. Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain[J]. Nature, 2001, 412(6848): 736 - 739.
[10] Dontu G, Abdallah W M, Foley J M, *et al*. *In vitro* propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells[J]. Genes Dev, 2003, 17(10): 1253 - 1270.
[11] Brennan K R, Brown A M. Wnt proteins in mammary development and cancer[J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2004, 9(2): 119 - 131.
[12] Brisken C, Heineman A, Chavarria T, *et al*. Essential function of Wnt-4 in mammary gland development downstream of progesterone signaling[J]. Genes Dev, 2000, 14(6): 650 - 654.
[13] Robinson G W, Hennighausen L, Johnson P F. Side-branching in the mammary gland: the progesterone-Wnt connection[J]. Genes Dev, 2000, 14(8): 889 - 894.
[14] Hsu W, Shakya R, Costantini F. Impaired mammary gland and lymphoid development caused by inducible expression of Axin in transgenic mice[J]. J Cell Biol, 2001, 155(6): 1055 - 1064.
[15] Wang X Y, Yin Y, Yuan H, *et al*. Musashi1 modulates mammary progenitor cell expansion through proliferin-mediated activation of the Wnt and Notch pathways[J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(11): 3589 - 3599.
[16] Glenney J R, Jr. , Soppet D. Sequence and expression of caveolin, a protein component of caveolae plasma membrane domains phosphorylated on tyrosine in Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992, 89(21): 10517 - 10521.
[17] Sotgia F, Williams T M, Cohen A W, *et al*. Caveolin-1-deficient mice have an increased mammary stem cell population with upregulation of Wnt/beta-catenin signaling[J]. Cell Cycle, 2005, 4(12): 1808 - 1816.
[18] Okamoto T, Schlegel A, Scherer P E, *et al*. Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane[J]. J Biol Chem, 1998, 273(10): 5419 - 5422.
[19] Cohen A W, Hnasko R, Schubert W, *et al*. Role of caveolae and caveolins in health and disease[J]. Physiol Rev, 2004, 84(4): 1341 - 1379.
[20] Scherer P E, Okamoto T, Chun M, *et al*. Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(1): 131 - 135.
[21] Li Y, Welm B, Podsypanina K, *et al*. Evidence that transgenes encoding components of the Wnt signaling pathway preferentially induce mammary cancers from progenitor cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(26): 15853 - 15858.
[22] Galbiati F, Volonte D, Brown A M, *et al*. Caveolin-1 expression inhibits Wnt/beta-catenin/Lef-1 signaling by recruiting beta-catenin to caveolae membrane domains[J]. J Biol Chem, 2000, 275(30): 23368 - 23377.
[23] Bradley R S, Brown A M. A soluble form of Wnt-1 protein with mitogenic activity on mammary epithelial cells[J]. Mol Cell Biol, 1995, 15(8): 4616 - 4622.
[24] Liu B Y, McDermott S P, Khwaja S S, *et al*. The transforming activity of Wnt effectors correlates with their ability to induce the accumulation of mammary progenitor cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(12): 4158 - 4163.
[25] Eblaghie M C, Song S J, Kim J Y, *et al*. Interactions between FGF and Wnt signals and Tbx3 gene expression in mammary gland initiation in mouse embryos[J]. J Anat, 2004, 205(1): 1 - 13.
[26] Dillon C, Spencer-Dene B, Dickson C. A crucial role for fibroblast growth factor signaling in embryonic mammary gland development[J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2004, 9(2): 207 - 215.
[27] Peters G, Brookes S, Smith R, *et al*. Tumorigenesis by mouse mammary tumor virus: evidence for a common region for provirus integration in mammary tumors[J]. Cell, 1983, 33(2): 369 - 377.
[28] Muller W J, Lee F S, Dickson C, *et al*. The int-2 gene product acts as an epithelial growth factor in transgenic mice[J]. EMBO J, 1990, 9(3): 907 - 913.
[29] Stamp G, Fantl V, Poulsom R, *et al*. Nonuniform expression of a mouse mammary tumor virus-driven int-2/Fgf-3 transgene in pregnancy-responsive breast tumors[J]. Cell Growth Differ , 1992, 3(12): 929 - 938.
[30] Ornitz D M, Moreadith R W, Leder P. Binary system for regulating transgene expression in mice: targeting int-2 gene expression with yeast GAL4/UAS control elements[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991, 88(3): 698 - 702.
[31] Smith G H, Chepko G. Mammary epithelial stem cells[J]. Microsc Res Tech, 2001, 52(2): 190 - 203.
[32] Gallahan D, Callahan R. The mouse mammary tumor associated gene INT3 is a unique member of the NOTCH gene family (NOTCH4) [J]. Oncogene, 1997, 14(16): 1883 - 1890.
[33] Callahan R, Egan S E. Notch signaling in mammary development and oncogenesis[J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2004, 9(2): 145 - 163.
[34] Dontu G, Jackson K W, McNicholas E, *et al*. Role of Notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells [J]. Breast Cancer Res, 2004, 6(6): R605 - R615.
[35] Axelson H, Fredlund E, Ovenberger M, *et al*. Hypoxia-induced dedifferentiation of tumor cells——a mechanism behind heterogeneity and aggressiveness of solid tumors[J]. Semin Cell Dev Biol, 2005, 16(4 - 5): 554 - 563.
[36] Gustafsson M V, Zheng X, Pereira T, *et al*. Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state[J]. Dev Cell, 2005, 9(5): 617 - 628.
[37] Sansone P, Storci G, Giovannini C, *et al*. p66Shc/Notch-3 interplay

controls self-renewal and hypoxia survival in human stem/progenitor cells of the mammary gland expanded *in vitro* as mammospheres[J]. Stem Cells, 2007, 25(3): 807 – 815.

[38] Suda T, Arai F, Hirao A. Hematopoietic stem cells and their niche [J]. Trends Immunol, 2005, 26(8): 426 – 433.

[39] Li N, Singh S, Cherukuri P, *et al*. Reciprocal intraepithelial interactions between TP63 and hedgehog signaling regulate quiescence and activation of progenitor elaboration by mammary stem cells[J]. Stem Cells, 2008, 26(5): 1253 – 1264.

[40] Lewis M T, Ross S, Strickland P A, *et al*. Defects in mouse mammary gland development caused by conditional haploinsufficiency of Patched-1[J]. Development, 1999, 126(22): 5181 – 5193.

[41] Lewis M T, Ross S, Strickland P A, *et al*. The Gli2 transcription factor is required for normal mouse mammary gland development[J]. Dev Biol, 2001, 238(1): 133 – 144.

[42] Liu S, Dontu G, Mantle I D, *et al*. Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells[J]. Cancer Res, 2006, 66(12): 6063 – 6071.

[43] Machold R, Hayashi S, Rutlin M, *et al*. Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches[J]. Neuron, 2003, 39(6): 937 – 950.

[44] Lewis M T, Visbal A P. The hedgehog signaling network, mammary stem cells, and breast cancer: connections and controversies[J]. Ernst Schering Found Symp Proc, 2006, (5): 181 – 217.

[45] Moraes R C, Zhang X, Harrington N, *et al*. Constitutive activation of smoothened (SMO) in mammary glands of transgenic mice leads to increased proliferation, altered differentiation and ductal dysplasia [J]. Development, 2007, 134(6): 1231 – 1242.

[46] Bamshad M, Lin R C, Law D J, *et al*. Mutations in human TBX3 alter limb, apocrine and genital development in ulnar-mammary syndrome[J]. Nat Genet, 1997, 16(3): 311 – 315.

[47] Bamshad M, Le T, Watkins W S, *et al*. The spectrum of mutations in TBX3: Genotype/Phenotype relationship in ulnar-mammary syndrome [J]. Am J Hum Genet, 1999, 64(6): 1550 – 1562.

[48] Jerome-Majewska L A, Jenkins G P, *et al*. Tbx3, the ulnar-mammary syndrome gene, and Tbx2 interact in mammary gland development through a p19Arf/p53-independent pathway[J]. Dev Dyn, 2005, 234(4): 922 – 933.

[49] Davenport T G, Jerome-Majewska L A, Papaioannou V E. Mammary gland, limb and yolk sac defects in mice lacking Tbx3, the gene mutated in human ulnar mammary syndrome[J]. Development, 2003, 130(10): 2263 – 2273.

[50] Fan W, Huang X, Chen C, *et al*. TBX3 and its isoform TBX3 + 2a are functionally distinctive in inhibition of senescence and are overexpressed in a subset of breast cancer cell lines[J]. Cancer Res, 2004, 64(15): 5132 – 5139.

[51] Lomnytska M, Dubrovska A, Hellman U, *et al*. Increased expression of cSHMT, Tbx3 and utrophin in plasma of ovarian and breast cancer patients[J]. Int J Cancer, 2006, 118(2): 412 – 421.

[52] Yarosh W, Barrientos T, Esmailpour T, *et al*. TBX3 is overexpressed in breast cancer and represses p14ARF by interacting with histone deacetylases[J]. Cancer Res, 2008, 68(3): 693 – 699.

[53] Carlson H, Ota S, Campbell C E, *et al*. A dominant repression domain in Tbx3 mediates transcriptional repression and cell immortalization: relevance to mutations in Tbx3 that cause ulnar-mammary syndrome[J]. Hum Mol Genet, 2001, 10(21): 2403 – 2413.

[54] Carlson H, Ota S, Song Y, *et al*. Tbx3 impinges on the p53 pathway to suppress apoptosis, facilitate cell transformation and block myogenic differentiation[J]. Oncogene, 2002, 21(24): 3827 – 3835.

[55] Brummelkamp T R, Kortlever R M, Lingbeek M, *et al*. TBX-3, the gene mutated in Ulnar-Mammary Syndrome, is a negative regulator of p19ARF and inhibits senescence[J]. J Biol Chem, 2002, 277(8): 6567 – 6572.

[56] Ito A, Asamoto M, Hokaiwado N, *et al*. Tbx3 expression is related to apoptosis and cell proliferation in rat bladder both hyperplastic epithelial cells and carcinoma cells[J]. Cancer Lett, 2005, 219(1): 105 – 112.

[57] Renard C A, Labalette C, Armengol C, *et al*. Tbx3 is a downstream target of the Wnt/beta-catenin pathway and a critical mediator of beta-catenin survival functions in liver cancer[J]. Cancer Res, 2007, 67 (3): 901 – 910.

[58] Chu E Y, Hens J, Andl T, *et al*. Canonical WNT signaling promotes mammary placode development and is essential for initiation of mammary gland morphogenesis[J]. Development, 2004, 131(19): 4819 – 4829.

[59] Kouros-Mehr H, Slorach E M, Sternlicht M D, *et al*. GATA-3 maintains the differentiation of the luminal cell fate in the mammary gland [J]. Cell, 2006, 127(5): 1041 – 1055.

[60] Wright M H, Calcagno A M, Salcido C D, *et al*. Brca1 breast tumors contain distinct $CD44^+/CD24^-$ and $CD133^+$ cells with cancer stem cell characteristics[J]. Breast Cancer Res, 2008, 10(1): R10.

[61] Zucchi I, Sanzone S, Astigiano S, *et al*. The properties of a mammary gland cancer stem cell[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104 (25): 10476 – 10481.

[62] Chute J P, Muramoto G G, Whitesides J, *et al*. Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of human hematopoietic stem cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(31): 11707 – 11712.

[63] Hess D A, Wirthlin L, Craft T P, *et al*. Selection based on CD133 and high aldehyde dehydrogenase activity isolates long-term reconstituting human hematopoietic stem cells[J]. Blood, 2006, 107(5): 2162 – 2169.

[64] Christ O, Lucke K, Imren S, *et al*. Improved purification of hematopoietic stem cells based on their elevated aldehyde dehydrogenase activity[J]. Haematologica, 2007, 92(9): 1165 – 1172.

[65] Pearce D J, Bonnet D. The combined use of Hoechst efflux ability and aldehyde dehydrogenase activity to identify murine and human hematopoietic stem cells[J]. Exp Hematol, 2007, 35(9): 1437 – 1446.

[66] Povsic T J, Zavodni K L, Kelly F L, *et al*. Circulating progenitor cells can be reliably identified on the basis of aldehyde dehydrogenase activity[J]. J Am Coll Cardiol, 2007, 50(23): 2243 – 2248.

[67] Ginestier C, Hur M H, Charafe-Jauffret E, *et al*. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome[J]. Cell Stem Cell, 2007, 1(5): 555 – 567.

[68] Villadsen R, Fridriksdottir A J, Ronnov-Jessen L, *et al*. Evidence for a stem cell hierarchy in the adult human breast[J]. J Cell Biol, 2007, 177(1): 87 – 101.

[69] Shafee N, Smith C R, Wei S, *et al*. Cancer stem cells contribute to cisplatin resistance in Brca1/p53-mediated mouse mammary tumors [J]. Cancer Res, 2008, 68(9): 3243 – 3250.

[70] Engelmann K, Shen H, Finn O J. MCF7 side population cells with characteristics of cancer stem/progenitor cells express the tumor antigen MUC1[J]. Cancer Res, 2008, 68(7): 2419 – 2426.

[71] Li Y, Kong L, Yang Y, *et al*. Mutant TNFalpha negatively regulates human breast cancer stem cells from MCF7 *in vitro*[J]. Cancer Biol Ther, 2007, 6(9): 1480 – 1489.

[72] Li H Z, Yi T B, Wu Z Y. Suspension culture combined with chemotherapeutic agents for sorting of breast cancer stem cells[J]. BMC Cancer, 2008, 8: 135.

(编辑　吴培红)