

肠上皮干细胞研究进展

郑永波*, 吴承堂

(第一军医大学南方医院普通外科, 广州 510515)

摘要: 肠上皮干细胞是位于肠黏膜陷窝内的具有自我更新和增殖分化为成熟肠上皮细胞功能的细胞。肠黏膜上皮细胞不断更新及肠黏膜损伤的修复均通过肠上皮干细胞增殖、分化完成。根据抗损伤能力的不同肠上皮干细胞可分为三级, 一定程度内可适应不同生理、病理变化。陷窝内干细胞之间存在竞争, 占优势的干细胞迅速分裂、增殖, 使陷窝表现为单克隆性。肠上皮干细胞所处微环境内的各种细胞因子及端粒酶共同影响肠上皮干细胞的分裂、增殖与分化。目前尚缺乏确切的肠上皮干细胞标记, Msi-1、Hes-1 和 β 整合素可能是肠上皮干细胞的自然标记物, 有待进一步研究证实。

关键词: 肠上皮干细胞; 细胞因子; 端粒酶; Msi-1

中图分类号: R333.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-9977(2004)01-06-04

肠上皮干细胞的研究始于上世纪 80 年代, 迄今尚未完全揭开其具体分化调控机制。创伤、感染、肿瘤化疗等造成的肠黏膜损伤尚缺乏有效的治疗手段, 探讨肠上皮干细胞的特性及其增殖、分化、调控机制对肠黏膜损伤修复具有重要意义。

1 肠上皮干细胞的特性

目前在形态学上肠上皮干细胞尚没有明确的标志, 亦不能用现在已知的一系列标记物标记, 因此, 有关肠上皮干细胞的特性多是通过监测肠黏膜组织受损前后细胞群变化推理得知的, 只能反映陷窝细胞总体的动力学特性。

1.1 肠上皮干细胞的概念

过去很强调干细胞的未分化属性, 认为肠上皮干细胞必须是未分化细胞。现在人们更强调从功能上定义, 认为肠上皮干细胞是位于肠黏膜陷窝内的具有自我更新与增殖分化功能的细胞^[1]。按照这个定义, 将那些已部分分化但仍具有干细胞功能的细胞也称之为肠上皮干细胞, 如 II、III 级肠上皮干细胞。研究发现, 一个陷窝内各种表型已分化细胞的数量及比例是恒定的, 说明肠上皮干细胞是一种多能干细胞^[2]。

1.2 肠上皮干细胞的位置

肠上皮细胞(潘氏细胞除外)由陷窝底部向肠腔内移行、分化并逐渐衰老、脱落是一连续的过程, 陷窝内的不同位置的细胞处于不同的分化时

期, 肠上皮干细胞位于陷窝基底部(结肠部分)或近似于基底部(小肠部分)^[3], 具体位于距陷窝基底第 2—7 细胞直径平面, 平均为第 4 个细胞直径处, 这一特性说明肠上皮干细胞随着向肠腔内移行, 其分裂产生的子细胞逐渐失去干细胞功能。

1.3 肠上皮干细胞的数量

肠上皮干细胞分裂产生的第 I、II 代子细胞可保持一些干细胞功能, 条件需要时(如受损伤时)具有分裂、增殖能力, 通常也被认为是肠上皮干细胞, 因此, 不同研究者对肠黏膜每个陷窝的干细胞的数量估计差别很大, 一般认为占陷窝细胞总数的 0.4%~60%, 也有学者认为一个陷窝只存在一个干细胞^[4]。

1.4 肠上皮干细胞周期

经实验发现, 小鼠小肠肠上皮干细胞周期大约为 24h, 大肠肠上皮干细胞的周期约为 33h, 人类肠上皮干细胞的增殖周期测定较少, 可能是小鼠的 4~8 倍。通常, 一个陷窝内的 4~6 个干细胞中可能只有一个表现出干细胞功能, 其余的处于静止状态^[4]。这一现象也是计算干细胞数量时引起差异的原因之一。

收稿日期: 2003-06-30; 修回日期: 2003-08-20

广东省重点科技攻关项目(编号 2002C31004), 广东省自然科学基金资助课题(编号 032901)

* 通讯作者, E-mail: zhybo333@163.com

2 肠上皮干细胞的分级

用不同剂量 γ 射线照射陷窝, 依据对 γ 射线照射强度耐受性的差异, 将肠上皮干细胞分成三级^[5]: 低(I级)、中(II级)、高(III级)耐照射性。I级干细胞是最原始的肠上皮干细胞, 对DNA损伤非常敏感, 1Gy γ 射线即可使其凋亡。这种超敏感性阻止了I级干细胞受损伤后突变的维持, 否则容易出现癌变。II级干细胞是I级干细胞发生第一次有丝分裂产生的可分化为成熟肠上皮细胞的子细胞, 能耐受较低剂量的 γ 射线照射, 正常情况下继续分化为成熟细胞, 并不表现干细胞的特性, 但在I级干细胞受损伤时则表现干细胞功能, 且有修复自身DNA的能力, 可转变为I级干细胞和生成正常陷窝。II级干细胞的凋亡与p53介导有关, 受 γ 射线照射时可高水平表达p53蛋白^[6]。III级干细胞是II级干细胞再次发生分裂时产生的子细胞, 能耐受较高剂量的 γ 射线照射, 具有II级干细胞的特性。因此, II、III级干细胞实质是I级干细胞的子细胞, 在一定程度上增强了陷窝损伤后的修复能力。研究发现, III级干细胞分裂产生的子细胞不再具有干细胞功能, 表明肠上皮干细胞分裂产生的子细胞的干细胞功能在第一、二次分裂时逐渐丧失, 其机理尚不清楚^[6]。

3 肠上皮干细胞的分裂、增殖与调控

肠上皮干细胞通常发生不对称分裂, 生成一个子代干细胞和一个可继续分化的子细胞。肠上皮干细胞分化的数学模型提示, 约5%的时间发生对称分裂, 即一个干细胞生成两个子代干细胞或两个可继续分化的子细胞, 这是陷窝内干细胞发生丢失、增多、替代或凋亡的原因^[4]。对称分裂结果是由其子代干细胞分裂形成一个新陷窝, 它可能取代原来的陷窝, 发生陷窝更新。这种更新约需要100天, 主要依赖于每个陷窝的干细胞数量、细胞周期时间和对称分裂的发生频率。环境改变刺激干细胞趋于需要的分裂方式。陷窝内干细胞之间存在竞争, 占优势的干细胞迅速分裂、增殖, 使陷窝表现为单克隆性^[5], 机制尚不清楚。干细胞的竞争为一个陷窝内只有一个功能性干细胞的解释提供了依据。

对幼鼠、中年鼠及老年鼠肠上皮干细胞周期及DNA损伤敏感性比较发现, 老年鼠肠上皮干细胞对损伤的敏感性增加^[7]。研究发现, 实验小鼠在三年的生命期内大约发生了1000次干细胞分裂。每次有丝分裂都将引起染色体端粒长度的缩短, 在人类结

肠陷窝基底部和小肠潘氏细胞上部存在端粒酶RNA及蛋白, 说明端粒酶对维持干细胞的分裂具有重要意义。小鼠染色体端粒极长, 敲除端粒酶基因后增殖到第六代才有肠上皮异常表现, 提示小鼠染色体最多能进行6000次干细胞分裂。人类染色体的端粒较短, 对端粒酶活性的缺失可能更敏感^[8]。

4 肠上皮干细胞的微环境

肠上皮干细胞在陷窝内的位置及其子细胞向绒毛上移过程中逐渐失去干细胞功能的事实, 说明干细胞所处的微环境(即位置)是保持其功能的决定因素之一, 但目前尚未确定哪种因子起主要作用^[9]。有文献报道T细胞因子-4(T Cell Factor-4, TCF-4)通过与 β -连环蛋白相互作用, 可调节细胞增殖或上移, TCF-4基因敲除小鼠表现出陷窝干细胞数量减少而死亡^[10], 说明TCF-4与干细胞功能有关。

小肠干细胞散布于陷窝内第二到第七层细胞的位置, 每个干细胞被其子细胞围绕, 彼此不直接相连, 很难想像环境因子在不同水平能像对彼此相邻细胞控制那样严格, 也很难想像干细胞间能够相互识别并调控其数量的机制。干细胞均与潘氏细胞相邻, 所以一种机制认为潘氏细胞起调控干细胞功能的作用。但一些动物不存在潘氏细胞, 说明潘氏细胞对维持干细胞功能不是必须的。另一种机制认为干细胞产生一个干功能区域, 所有相关因子共同决定干细胞的命运^[11]。

5 肠上皮干细胞的研究方法

目前尚无确切的肠上皮干细胞标记物, 所有研究均是基于通过对核酸染色, 荧光显微检测。Potten^[5]等用扁豆属植物凝集素染色观察到肠上皮干细胞从陷窝底部上移, 每小时上移1至2个细胞直径。用氚标记去氧胸腺嘧啶核苷(³HTdR)标记干细胞的模板链, 银染色, 放射自显影法观察, 发现分化上移的核分裂象。用³HTdR标记小肠干细胞模板链, 用5-溴-2-脱氧尿苷(BrdUrd)标记小肠干细胞新合成链, 观测到肠上皮干细胞再次有丝分裂时³HTdR存在, BrdUrd消失, 说明肠上皮干细胞通过选择模板链来维持自身稳定性^[12]。Bjerknes^[13]等研究肠切除后肠上皮干细胞反应时用³HTdR标记干细胞的模板链, 注射环氧树脂后放射自显影检查, 观测到不同分裂时相的细胞比例。目前认为最有前途的研究方法是建立体外干细胞培养模型。在体外短期培养获得成功的模型已有报道, 如离体完

整的陷窝分离培养成功^[14], 或散在陷窝细胞分离培养成功^[15]。干细胞转染技术和体外干细胞的稳定技术的发展, 为研究肠上皮干细胞周期、定向分化及凋亡提供了方法。

研究发现有一种RNA结合蛋白Msi-1(Musashi-1)(一种被认为在神经内分泌干细胞发育中与不对称分裂有关的蛋白)稳定状态下仅在少数肠上皮干细胞区域表达, 受射线照射后, 可以诱导在全部功能性肠上皮干细胞区域表达^[16]。Kayahara等^[17]发现Msi-1和Hes-1(hairy enhancer of the split-1)(一种受Msi-1调控的转录因子蛋白)在潘氏细胞上部的干细胞区域内联合高表达, Fujimoto等^[18]在分离和鉴定结肠干细胞时发现 β 整合素亦在干细胞表面高表达。这些说明Msi-1、Hes-1和 β 整合素可能是肠上皮干细胞的自然标记物; 但尚有待进一步研究证实。

6 前景与展望

肠上皮干细胞的特性已渐被揭示, 如肠上皮干细胞的数目、细胞周期时间、增殖潜能等, 但其确切的分化调控机制尚未完全阐明。研究肠上皮干细胞可为临床操纵肠上皮干细胞, 提高消化道黏膜病变及全身性疾病(如癌症)的治疗水平奠定理论基础。目前已有报道利用转化生长因子- β 3(Transferring Growth Factor- β 3, TGF- β 3)促进肠上皮干细胞分裂、增殖, 加快黏膜损伤的修复, 降低化疗引起黏膜炎的严重性, 以增加化疗药物剂量, 增强癌症治疗效果^[19]。

参 考 文 献

- [1] LOEFFLER M, ROEDER I. Tissue stem cells: definition, plasticity, heterogeneity, self-organization and models — a conceptual approach [J]. *Cells Tissues Organs*, 2002, **171**(1): 8 — 26.
- [2] BOOTH C, POTTEN C S. Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells [J]. *J Clin Invest*, 2000, **105**(11): 1493 — 1499.
- [3] POTTEN C S, MARTIN K, KIRKWOOD T B. Ageing of murine small intestinal stem cells [J]. *Novartis Found Symp*, 2001, **235**: 66 — 79.
- [4] MARSHMAN E, BOOTH C, POTTEN C S. The intestinal epithelial stem cell [J]. *Bioessays*, 2002, **24**(1): 91 — 98.
- [5] POTTEN C S. Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1998, **353**: 821 — 830.
- [6] WINTON D J, BROOKS R A. Analysis of DNA damage and repair accompanying differentiation in the intestinal crypt [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1998, **353**(1370): 895 — 902.
- [7] MARTIN K, KIRKWOOD T B, POTTEN C S. Age changes in stem cells of murine small intestinal crypts [J]. *Exp Cell Res*, 1998, **241**: 316 — 323.
- [8] FORSYTH N R, WRIGHT W E, SHAY J W. Telomerase and differentiation in multicellular organisms: turn it off, turn it on, and turn it off again [J]. *Differentiation*, 2002, **69**(4-5): 188 — 197.
- [9] BOOTH D, POTTEN C S. Protection against mucosal injury by growth factors and cytokines [J]. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 2001, (29): 16 — 20.
- [10] KORINEK V, BARKER N, MOERER P, et al. Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4 [J]. *Nat Genet*, 1998, **19**(4): 379 — 383.
- [11] STAPPENBECK T S, MILLS J C, GORDON J I. Molecular features of adult mouse small intestinal epithelial progenitors [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, **100**(3): 1004 — 1009.
- [12] POTTEN C S, OWEN G, BOOTH D. Intestinal stem cells protect their genome by selective segregation of template DNA strands [J]. *Journal of Cell Science*, 2002, **115**: 2381 — 2388.
- [13] BERLANGA-ACOSTA J, PLAYFORD R J, MANDIR N, et al. Gastrointestinal cell proliferation and crypt fission are separate but complementary means of increasing tissue mass following infusion of epidermal growth factor in rats [J]. *Gut*, 2001, **48**(6): 803 — 807.
- [14] BOOTH C, O'SHEA J A, POTTEN C S. Maintenance of functional stem cells in isolated and cultured intestinal epithelium [J]. *Exp Cell Res*, 1999, **249**: 359 — 366.
- [15] WHITEHEAD R H, DEMMLER K, ROCKMAN S P, et al. Clonogenic growth of epithelial cells from normal colonic mucosa from both mice and humans [J]. *Gastroenterology*, 1999, **117**: 858 — 865.
- [16] POTTEN C S, BOOTH C, TUDOR G L, et al. Identification of a putative intestinal stem cell and early lineage marker; musashi-1 [J]. *Differentiation*, 2003, **71**: 28 — 41.
- [17] KAYAHARA T, SAWADA M, TAKAISHI S, et al. Candidate markers for stem and early progenitor cells, Musashi-1 and Hes1, are expressed in crypt base columnar cells of mouse small intestine [J]. *FEBS Lett*, 2003, **535**(1-3): 131 — 135.
- [18] FUJIMOTO K, BEAUCHAMP R D, WHITEHEAD R H. Identification and isolation of candidate human colonic clonogenic cells based on cell surface integrin expression [J]. *Gastroenterology*, 2002, **123**(6): 1941 — 1948.
- [19] VAN'T LAND B, MEIJER H P, FRERICHS J, et al. Transforming Growth Factor-beta2 protects the small intestine during methotrexate treatment in rats possibly by reducing stem cell cycling [J]. *Br J Cancer*, 2002, **87**(1): 113 — 118.

Development of the Investigation for the Intestinal Epithelium Stem Cells

ZHENG Yong Bo*, WU Cheng Tang

(*Department of General Surgery, Nanfang Hospital, the First Military Medical University, Guangzhou 510515, China*)

Abstract: Intestinal epithelium stem cells, which locate in the intestinal mucosa crypts, have the capacity to self-renew as well as the ability to generate differentiated cells. Both the continually renewing of intestinal epithelium cells and the repairing of the damage of intestinal mucosa all come from the cell proliferation and differentiation of intestinal epithelium stem cells. A three-tiered hierarchical system was proposed based upon the studies of their ability of anti- γ -irradiation. Every grade stem cells can adapt to a corresponding change of physiology and pathology. There are competitions among the intestinal epithelium stem cells. A single stem cell may gradually replace the other stem cells in a crypt with its own progeny, ultimately producing a monoclonal population of epithelial cells. Many relevant factors of the environment in which the stem cells locate and the telomerase are all important for their proliferation and differentiation. No distinctive natural marker of this kind stem cell has been found by now. Musashi-1(Msi-1), hairy enhancer of the split-1(Hes-1) and β -integrin may relate with intestinal epithelium stem cells, stated by some scientists recently. It deserves to further insight on them.

Key words: intestinal epithelium stem cells; cytokine; telomerase; Msi-1

*Corresponding author, E-mail: zhybo333@163.com

欢迎订购单印本

应广大科研人员的要求，本刊自2004年第1期起开始提供单印本。单印本的价格暂定为2元/份，10份起购。

细胞生物学杂志编辑部

2004-02-08