

潘氏细胞的发生及其信号调控

陶凯忠 唐庆娟¹ 郑萍*

(上海交通大学附属第一人民医院消化疾病研究室, 上海 200080;

¹ 中国海洋大学食品科学与工程学院, 青岛 266006)

摘要 潘氏细胞是位于肠隐窝底部的浆液性腺上皮细胞, 是构成小肠黏膜屏障的重要细胞成分。潘氏细胞来源于小肠干细胞, 后者可能是位于潘氏细胞上方的标记保留细胞, 也可能是位于潘氏细胞之间的肠隐窝基底柱状细胞。潘氏细胞与杯状细胞和肠内分泌细胞同属于小肠上皮的分泌细胞系, 又与杯状细胞有共同的前体——中间型细胞。潘氏细胞的分化经历了从小肠干细胞到分泌系祖细胞再到中间型细胞的过程。决定潘氏细胞分化、迁移和分布的信号通路主要有 Wnt 信号通路, 其次是 Notch 信号通路、Hedgehog 信号通路、骨形态发生蛋白信号通路等。

关键词 潘氏细胞; Wnt; Notch; Hedgehog; 骨形态发生蛋白

潘氏细胞(Paneth cell)位于小肠腺(又名肠隐窝)底部, 是小肠的特征性细胞, 其主要特征是细胞顶部有大量粗大的嗜酸性分泌颗粒, 内含 α 防御素、溶菌酶、磷脂酶 A₂、sIgA 等多种抗微生物成分。这些成分在潘氏细胞脱颗粒时被释放到肠腔, 成为肠黏膜屏障的重要效应分子。表达于潘氏细胞的模式识别受体 NOD2、Toll 样受体 9 以及肿瘤坏死因子 α 、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、白介素-17 等也是调节免疫与炎症反应的重要成分。防御素和模式识别受体是当代免疫学研究的重要发现, 由于这两种成分在固有免疫特别是黏膜免疫中的重要性, 自上世纪九十年代以来, 潘氏细胞一直是国际上黏膜免疫研究的热点。现已证明, NOD2 单核苷酸多态性与克罗恩病关系密切。有关潘氏细胞发生及其调控的研究, 近年来也取得许多重要进展。

1 潘氏细胞的形态

光镜下, 每个空、回肠肠隐窝约有 3~6 个潘氏细胞, 其分泌颗粒被伊红染成红色。 α 防御素、溶菌酶、磷脂酶 A₂ 等抗菌肽在小肠上皮均特异性地分布于潘氏细胞。这些抗菌肽共存于潘氏细胞分泌颗粒, 是肠黏膜屏障的重要效应分子。人潘氏细胞防御素有两种, 即人防御素 5 (human defensin 5, HD-5) 和人防御素 6 (HD-6); 小鼠潘氏细胞防御素被称为隐窝素(cryptdin), 多达 19 种或以上。溶菌酶、 α 防御素免疫染色已成为观察潘氏细胞的主要手段。

潘氏细胞也见于阑尾、盲肠和升结肠, 但数量极少, 未见于乙状结肠和直肠, 可能与胚胎发育过程

中小肠、盲肠和升结肠均发生于中肠, 而乙状结肠和直肠发生于后肠有关。小鼠潘氏细胞的更新时间, [³H]TdR 测定的结果为 18~22 天, 而应用转基因技术测定的结果为 57 天。

自发现以后的近一百年里, 潘氏细胞一直被认为是肠隐窝底部唯一的细胞成分。事实上, 在潘氏细胞之间还有一种肠隐窝基底柱状细胞(crypt base columnar cell, CBCC), 其数量约为潘氏细胞的 1/3。CBCC 形态细长或呈楔形, 细胞器较少, 无分泌颗粒, 但含有许多吞噬体, 吞噬体内可见衰老、变性的潘氏细胞残余物。另外, 在隐窝侧壁、潘氏细胞上方还有一种中间型细胞(intermediate cell)。电镜下, 这种细胞具有与潘氏细胞分泌颗粒形态相似而直径略小、内含少量粘蛋白的高电子密度颗粒, 在形态上兼有潘氏细胞和杯状细胞的部分特征。

2 小肠干细胞、中间型细胞与潘氏细胞的发生

2.1 潘氏细胞的发生

潘氏细胞的发生比其他类型的小肠上皮细胞要晚。人与鼠潘氏细胞的发生在时间上差异很大。在 20 周、21 周、24 周以及 5.2 月胎儿的小肠上皮中已可观察到潘氏细胞。小鼠潘氏细胞始见于生后第 7 天, 至断乳期(12~20 天)开始出现分泌活动。也有研究发现, 在新生小鼠的小肠上皮内已可观察到潘氏

收稿日期: 2008-11-05 接受日期: 2009-03-10

* 通讯作者。Tel: 021-63240090-4255, Fax: 021-63241377, E-mail:

zhengpingdoctor@126.com

细胞,但数量极少。此时,小肠上皮尚未形成肠隐窝,但已在袋状的绒毛间区出现肠隐窝原基,潘氏细胞位于绒毛间区或散在分布于绒毛上皮细胞之间。生后第3天,肠隐窝原基下陷并形成肠隐窝,潘氏细胞的分布也开始固定于肠隐窝底部。在断乳期以前,潘氏细胞的数量增长缓慢,至生后第10天,平均每个肠隐窝仅有0.38个潘氏细胞。Bry等^[1]发现,小鼠在胚胎第15天,也就是肠黏膜开始由假复层上皮转化为单层上皮时,绒毛间区已有部分细胞表达隐窝素,但肠隐窝底部出现磷脂酶 A_2 和溶菌酶阳性染色的时间分别为生后第7、第10天,而潘氏细胞发育成熟的标志——凝集素UEA-1和MAA则要到生后第21天才能检出。大鼠潘氏细胞的发生与小鼠相似:生后2天,含潘氏细胞的肠隐窝不足2%;生后6~8天,多数肠隐窝只有1个潘氏细胞;至生后第21天,即断乳期结束时,潘氏细胞的数量与生后第28天已无显著差异,基本达到成年水平。可见,断乳期是潘氏细胞数量增长的关键时期。

2.2 小肠干细胞和中间型细胞

潘氏细胞与吸收细胞、杯状细胞和肠内分泌细胞均来源于小肠干细胞(intestinal stem cell, ISC)。ISC的部位和属性,目前尚不明确。一般认为,ISC位于潘氏细胞上方的增殖细胞区。该部位的部分细胞具有干细胞的特征:增殖率低,能长时间保留BrdU,因而被称为标记保留细胞(label-retaining cells, LRC)。LRC完成分化以后,吸收细胞、杯状细胞和肠内分泌细胞逐渐向绒毛顶部迁移,直至凋亡、脱落,而潘氏细胞则向肠隐窝底部迁移。越靠近肠隐窝底部,潘氏细胞的成熟度越高,衰老、变性的潘氏细胞也越多。LRC理论的合理性在于它较好地解释了小肠上皮细胞的迁移和更新。另一种观点认为,ISC即CBCC。在发现CBCC之初,就观察到此类细胞常见核分裂相,注射 $[^3H]TdR$ 后具有很高的标记指数,属于未分化细胞。因此推测,CBCC可能是潘氏细胞的前体,潘氏细胞在衰老、变性后被CBCC吞噬,受这一过程的影响,CBCC也随之分化为新的潘氏细胞。Potten等^[2]和Kayahara等^[3]发现CBCC具有以下ISC的特征:表达Hes1、Musashi-1等干、祖细胞标志分子,能摄取BrdU, Ki-67免疫反应阳性。Barker等^[4]和Sangiorgi等^[5]研究表明,干细胞标志分子Lgr5主要表达于CBCC,而Bmi1主要表达于LRC, Lgr5与Bmi1阳性细胞均具有自我更新和多向分化的能力。Lgr5⁺细胞广泛分布于小肠和结肠,而Bmi1⁺细胞主要

分布于十二指肠和空肠,至远端逐渐减少直至消失。由此看来,LRC与CBCC可能是一种ISC的两种形态,也可能是两种不同的ISC。Bmi1⁺细胞的分布特征也提示:可能存在不同的ISC群体,这样可以解释肠道各节段形态与功能的多样性。根据这一思路研究潘氏细胞的发生,或许会有新的发现。

潘氏细胞与杯状细胞和肠内分泌细胞同属于小肠上皮的分泌细胞系,吸收细胞则单独构成吸收细胞系。早在上世纪五、六十年代就有学者提出,杯状细胞是潘氏细胞的前体,也有学者认为,潘氏细胞是杯状细胞的前体。尽管观点相反,但可以肯定的是,在发生过程中,潘氏细胞与同属于分泌细胞系的杯状细胞关系密切。中间型细胞的发现则提示潘氏细胞和杯状细胞可能来源于共同的祖细胞。最初,研究者并未观察到两种细胞的标志分子共存于中间型细胞的现象,即中间型细胞既不含杯状细胞特有的粘蛋白和sulfomucin,也不含潘氏细胞特有的溶菌酶,他们认为中间型细胞可能是一种独立的细胞类型。后来, Garabedian等^[6]和Stappenbeck等^[7]先后证实,人、大鼠和小鼠小肠的中间型细胞表达溶菌酶、隐窝素和磷脂酶 A_2 ,他们认为,中间型细胞是潘氏细胞和杯状细胞共同的前体(图1)。

3 潘氏细胞发生的信号转导机制

潘氏细胞的发生包括肠隐窝形成以及干细胞的增殖、分化,这一过程受上皮细胞之间以及上皮细胞与间充质细胞之间多种信号通路的调控^[8]。

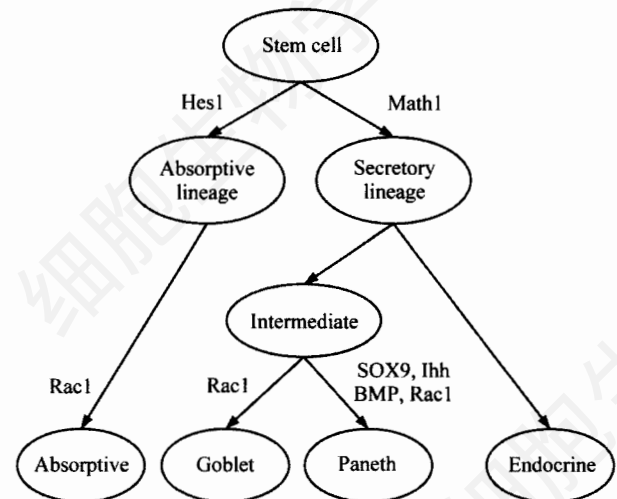


Fig.1 Differentiation of Paneth cell

3.1 Wnt 信号通路

Wnt 信号通路的成分主要有: 信号分子 Wnt、受体卷曲蛋白(Frizzled, Fz)、共受体低密度脂蛋白受体相关蛋白(low density lipoprotein receptor related protein, LRP)、 β -连环蛋白(β -catenin, β -cat)、 β -cat 降解复合物以及转录因子 T 细胞因子(T cell factor, TCF)。其中, β -cat 是 TCF 的辅因子, Wnt 信号通路的作用就是抑制 β -cat 降解复合物的活性, 促进 β -cat 的核转移, 激活 TCF。 β -cat 降解复合物由结肠腺瘤性息肉病蛋白(adenomatous polyposis coli, APC)、轴蛋白(axin)、酪蛋白激酶 I α (casein kinase I α , CKI α)和糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)组成。其中, APC 和轴蛋白构成 β -cat 降解复合物的支架。Fz 未与 Wnt 结合时, APC 和轴蛋白与 β -cat 结合, CKI α 和 GSK-3 β 先后将 β -cat 氨基端的 4 个丝 / 苏氨酸残基(Ser45, Ser33, Ser37,

Thr41)磷酸化, 使 β -cat 被 β -TrCP 识别并通过泛素-蛋白酶体途径降解。Wnt 信号通路被激活后, 结合 Wnt 的 Fz 募集磷酸化的散乱蛋白(disheveled, Dsh), 后者能抑制 GSK-3 β 的活性, 从而阻断 β -cat 的降解, 使 β -cat 在胞浆内聚积、增多。最后, 在 PI3K-Rac1-JNK2 信号组件的介导下, β -cat 的 Ser191 与 Ser605 发生磷酸化, 继而进入细胞核并与 TCF 结合, 解除转录抑制因子 Groucho 对 TCF 的抑制作用, 释放 TCF 的转录因子活性(图 2)。TCF 的靶基因有: *CD44*、*c-myc*、*cyclin D1*、*EphB2*、*EphB3*、*ephrinB1*、*Sox9*、*HD-5*、*HD-6*、*隐窝素*等。

Wnt 信号通路的活性受多种因素的影响。① Wnt 抑制因子(Wnt inhibitory factor, WIF)、cerberus、分泌性 Fz 相关蛋白(secreted frizzled-related protein, sFRP)和 Dickkopf-1 (Dkk-1)可与 Wnt、Fz 或 LRP 结合, 阻断 Wnt 信号向下游传导。

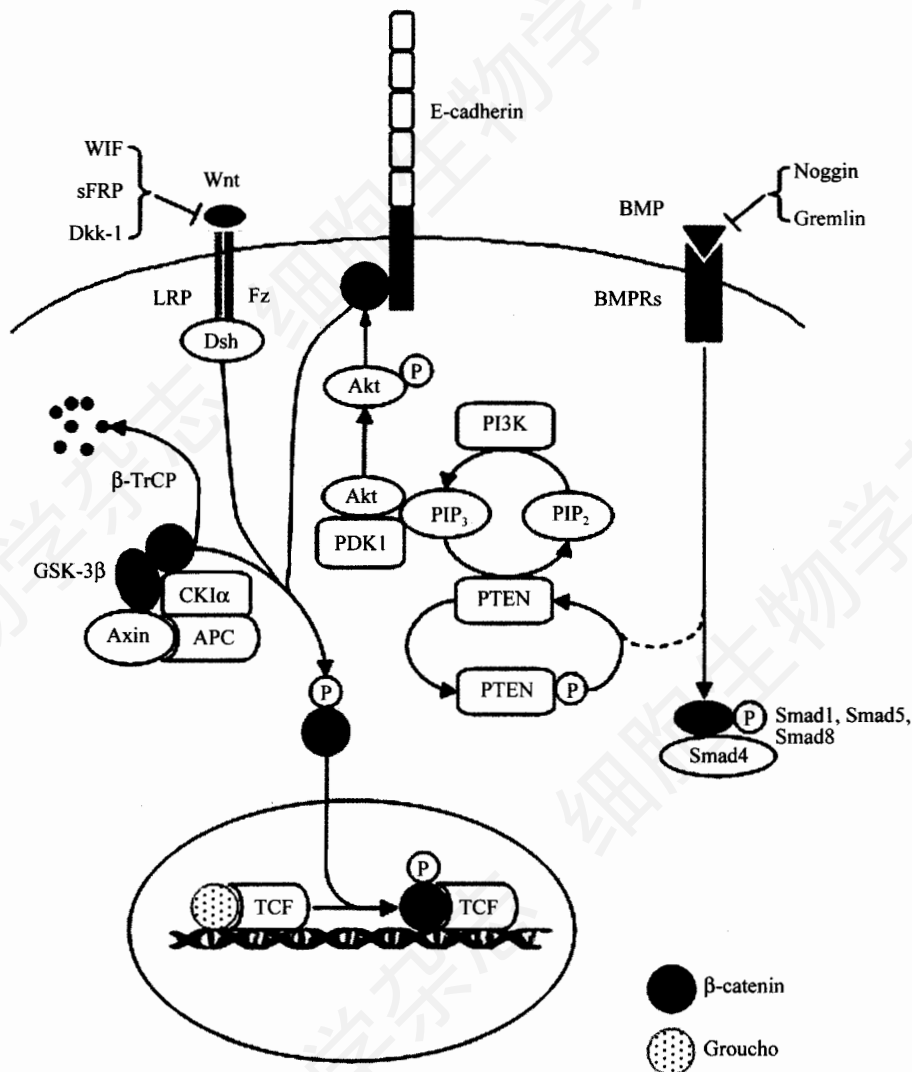


Fig.2 Wnt signaling

②除 β -cat 降解复合物以外,胞浆 β -cat 的含量还受细胞膜上 E-钙粘着蛋白(E-cadherin, E-cad)复合物的调节。E-cad 复合物由 E-cad、p120、 β -cat 和 α -cat 等成分组成,通过 α -cat 与肌动蛋白连接,是形成细胞间连接的重要基础,参与上皮细胞的增殖、分化、迁移、极性形成及肿瘤转移等。表皮生长因子受体、Src 等蛋白酪氨酸激酶抑制 β -cat 与 E-cad 或 α -cat 的结合,使胞浆 β -cat 增多,而蛋白酪氨酸磷酸酶和酪蛋白激酶 II (CK II)则增强 E-cad 复合物的稳定性,使胞浆 β -cat 减少^[9]。E-cad 的过表达导致核内 β -cat 减少,抑制 E-cad 的表达则使进入 Wnt 信号通路的 β -cat 增多。E-cad 在胎儿与成年肠隐窝底部的表达水平低于小肠上皮的其他部位,可能是该部位 Wnt 信号通路活化程度较高的原因之一^[10]。③在丝/苏氨酸激酶 Akt 的作用下, E-cad 复合物中的 β -cat 的羧基端 Ser552 发生磷酸化,继而脱离 E-cad 复合物并进入 Wnt 信号通路^[11]。胰岛素样生长因子、表皮生长因子等能激活磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K),后者使磷脂酰肌醇-3,4 二磷酸(PIP₂)磷酸化,生成磷脂酰肌醇-3,4,5 三磷酸(PIP₃)。PIP₃ 作为第二信使,使 Akt 与同属于丝/苏氨酸激酶的 PDK1 一起被募集到细胞膜。在 PDK1 的作用下, Akt 的 Thr308 位点发生磷酸化。当 Ser473 也发生磷酸化时, Akt 被完全激活。PTEN 作为 PIP₃ 的磷酸酶,可使 PIP₃ 向 PIP₂ 转化,从而阻断 Akt 信号通路,抑制 β -cat 从 E-cad 复合物向胞浆的转移(图 2)^[12]。

小肠黏膜上皮及固有层共表达 6 种 Wnt、5 种 Fz、2 种 LRP、2 种 TCF。Wnt-3 与 Wnt-9b 主要表达于潘氏细胞, Fz5、APC、 β -cat、TCF4、EphB3、SOX9 等在潘氏细胞也有表达, HD-5、HD-6、隐窝素在小肠上皮则特异性地分布于潘氏细胞,提示 Wnt 信号通路对潘氏细胞的分化有重要的影响,潘氏细胞也可能通过旁分泌方式激活小肠干、祖细胞的 Wnt 信号通路,从而影响小肠上皮的发生^[13]。小鼠在发育过程中,其小肠的 Wnt 信号通路在胚胎第 16.25 天开始激活,但仅局限于绒毛部,至出生时开始向绒毛间区转移,这一转移过程在生后第 3 天全部结束。随着肠隐窝的形成和潘氏细胞的分化、成熟,到成年时, Wnt 信号通路活性仅限于肠隐窝的增殖细胞和潘氏细胞^[14]。Wnt 信号通路对 ISC 的增殖、分化以及潘氏细胞的迁移、分布都有不同程度的影响。

3.1.1 Wnt 信号通路对于 ISC 增殖功能的保持起着决定性作用 Fevr 等^[15]应用条件性基因敲除技术

选择性地造成肠上皮细胞的 β -cat 基因失活,从而建立了实验动物模型—— β -catenin^{-lox}-villin-creERT2 小鼠。正常情况下, β -catenin^{-lox}-villin-creERT2 小鼠的表型与野生型小鼠相同。在腹腔注射三苯氧胺诱导 β -cat 基因敲除后 2 天,其小肠上皮内促进细胞增殖的 c-myc 表达减少,而抑制细胞增殖的 p21 表达增多,肠隐窝无 BrgU 标记细胞; 4 天后,肠隐窝消失,肠绒毛变短; 6 天后,所有小肠上皮细胞消失。TCF4 基因敲除小鼠在胚胎晚期其小肠绒毛间区的细胞减少,组织结构与绒毛上皮相似,无细胞分裂, BrdU 标记及 Ki-67 免疫染色均为阴性^[16]。应用转基因或基因转染技术使小鼠过表达 Dkk1,由于 Wnt 信号通路受阻,ISC 丧失增殖能力,光镜下可见肠隐窝消失,肠绒毛变短^[17,18]。表达于间充质细胞的转录因子 Foxl1 也是 Wnt 信号通路的负性调节因子, Foxl1^{-/-} 小鼠肠隐窝细胞的核 β -cat 增多,细胞增殖能力增强,肠隐窝面积增大^[19,20]。另一个 Wnt 信号通路的负性调节因子是细胞膜小凹的主要结构蛋白小凹蛋白 1(caveolin-1),它通过抑制 β -cat 和 TCF-4 的合成,从而抑制 ISC 的增殖^[21]。相反, Cre⁺Apc^{fl/fl} 或 Apc^{lox/lox}; Vil-CreERT2 小鼠由于小肠上皮不表达 APC, β -cat 的降解受阻,导致小肠上皮内增殖细胞异常增多,肠隐窝的高度达到肠绒毛的一半甚至更多^[22,23]。

3.1.2 Wnt 信号通路影响潘氏细胞分化 Cre⁺Apc^{fl/fl} 小鼠的小肠吸收细胞、杯状细胞及肠内分泌细胞均显著减少,而潘氏细胞则显著增多,但这些潘氏细胞缺乏典型的分泌颗粒, UEA-1 染色为阴性^[22,23]。另一方面, Catnb^{lox(ex3)/lox(ex3)} 小鼠肠组织 β -cat mRNA 的表达水平虽然仅降低至野生型小鼠的 75%,但肠隐窝已减少一半,潘氏细胞的数量更是减少 87%,而且是没有分泌颗粒的潘氏细胞^[24]。由此可见, Wnt 信号通路能促进 ISC 定向分化为潘氏细胞,而这一分化过程的最后完成,除 Wnt 信号通路这一必要条件之外,还需要其他因素的参与。进一步研究表明, Wnt 信号通路主要以其靶蛋白 SOX9 促进潘氏细胞的分化。SOX9 是转录因子 SOX 家族的成员,自十二指肠至远端结肠均有大量表达,分布范围局限于肠上皮增殖细胞区的未成熟细胞和小肠潘氏细胞^[25]。 Sox9^{fl/fl}; VilCre 小鼠的 ISC 不再分化为潘氏细胞,而其他细胞的分化不受影响,仅杯状细胞的数量有所减少^[26,27]。Rho GTP 酶家族成员 Rac1 是介导 β -cat 核转移的信号分子之一。表达组成性活化 Rac1 的嵌合体小鼠在胚胎第 18.5 天其绒毛间区即已出现吸收细胞和潘氏

细胞, 而表达显性抑制性 *Rac1* 的嵌合体小鼠在生后 42 天其病变肠隐窝的顶部无吸收细胞, 中间型细胞增多, 而杯状细胞和潘氏细胞减少。*Rac1* 的作用主要是促进 ISC 的晚期分化, 影响范围可能包括所有小肠上皮细胞而以吸收细胞最为显著, 潘氏细胞次之^[7]。

3.1.3 Wnt 信号通路决定潘氏细胞的分布 *EphB2*、*EphB3* 及其配体 *ephrin-B1* 都是膜结合蛋白。肠隐窝形成以前, *EphB3* 与 *EphB2* 的分布大致相同, 均位于绒毛间区; *ephrin-B1* 则分布于绒毛间区的周边区域, 绒毛间区的底部无 *ephrin-B1* 表达。肠隐窝形成以后, *EphB2* 分布于 CBCC 和增殖细胞区, 而以增殖细胞区最为丰富, 并由此向肠隐窝顶部方向逐渐减少; *ephrin-B1* 在隐窝-绒毛接合部最为丰富, 并由此向肠隐窝底部方向逐渐减少; *EphB3* 主要分布于 CBCC 和潘氏细胞, 增殖细胞区仅有少量表达。如前所述, *EphB2*、*EphB3*、*ephrin-B1* 是 TCF 的靶基因, 后者抑制 *EphB2/EphB3*、促进 *ephrin-B1* 的表达。*EphB2*^{-/-}、*EphB3*^{-/-} 及 *EphB2*^{-/-/EphB3}^{+/-} 新生小鼠小肠的吸收细胞与增殖细胞之间界限分明, 但 *EphB2*^{-/-/EphB3}^{-/-} 新生小鼠则不然: *ephrin-B1* 在肠隐窝各部均有表达, 吸收细胞不再局限于绒毛部, 增殖细胞之间也有吸收细胞; 增殖细胞也不再局限于绒毛间区, 绒毛部也有增殖细胞。*EphB3*^{-/-} 及 *EphB2*^{-/-/EphB3}^{-/-} 小鼠的另一个显著特征, 就是潘氏细胞不再局限于肠隐窝底部, 而是弥散分布于整个肠隐窝。与肠隐窝底部潘氏细胞不同的是, 异位潘氏细胞的核 β -cat 免疫染色为阴性, 而前者为阳性。*Dkk1* 转基因杂合子小鼠和 *Fz5* 基因敲除小鼠潘氏细胞的分布也有类似的变化, 异位潘氏细胞的 *EphB3* 免疫染色均为阴性。可见, 肠隐窝/绒毛间区同时表达 *EphB2* 与 *EphB3* 以及 *EphB2/EphB3* 与 *ephrin-B1* 的反向梯度分布是小肠上皮内增殖细胞与分化细胞形成区域分布的关键, 而 *EphB3* 则是决定潘氏细胞分布的主要因素^[17,28-30]。Sansom 等^[22]和 Takano-Maruyama 等^[20]发现, *Cre*⁺*Apc*^{fl/fl} 与 *Foxl1*^{-/-} 小鼠也表现为潘氏细胞异常分布。与 *EphB3*^{-/-} 及 *EphB2*^{-/-/EphB3}^{-/-} 小鼠不同的是, 两种小鼠小肠上皮的 *EphB2* 和 *EphB3* 表达增多, 异位潘氏细胞的 *EphB3* 免疫染色仍为阳性。发生这一现象的原因可能是: ①除 *EphB2/EphB3* 以外, 尚存在决定潘氏细胞分布的其他成分, 该成分的表达或/和活性不受 Wnt 信号通路的调控。② *Apc*、*Foxl1* 基因突变并非潘氏细胞异常分布的直接原因, 而是因为小肠干、祖细胞过度增殖, 从而影响了潘氏细胞的迁移和分布。

3.2 Notch 信号通路

Notch 及其配体都是跨膜蛋白, 在隐窝上皮细胞均有表达。与配体结合后, Notch 被 β -secretase 裂解, 其胞内段(NICD)被转运至细胞核。NICD 在核内与 CBF1 形成复合体, 促进 *Hes1*、抑制 *Math1* 的转录。*Hes1* 和 *Math1* 都是碱性螺旋-环-螺旋转录因子, 但二者的作用相反。*Hes1* 使 ISC 更倾向于分化为吸收细胞系, 而 *Math1* 使 ISC 更倾向于分化为分泌细胞系^[31-33]。*Dkk1* 转基因小鼠由于 Wnt 信号通路受阻, 小肠上皮不表达 *Math1*, 分泌细胞系的三种细胞均告缺失^[17]。以上现象提示, 吸收细胞系与分泌细胞系的分化是 Wnt 与 Notch 信号通路共同作用的结果。Notch 信号通路还可以侧向抑制(lateral inhibition)的方式影响 ISC 的分化, 即已经实现定向分化的祖细胞以其配体与相邻未分化细胞的 Notch 结合, 启动 Notch 信号通路, 防止该细胞发生同样的分化。

3.3 Hedgehog 信号通路

胚胎以及新生小鼠的小肠中, 表达 Hedgehog 家族成员 *Shh* 和 *Ihh* 的细胞仅限于上皮, 并随着隐窝的发生逐渐集中于绒毛间区。Hedgehog 信号通路的其他成分, 如受体(*Ptch1*、*Ptch2*)、转录因子(*Gli1*、*Gli2*、*Gli3*)和靶蛋白骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)均由间质细胞表达^[34]。HHIP 通过与 Hedgehog 结合而抑制后者的信号转导。新生 *Hhip* 转基因小鼠的小肠上皮表现为: BMP4 mRNA 表达减少, TCF 活性增强, 干、祖细胞增殖能力增强; 吸收细胞分化受阻, 绒毛扁平, 局部出现假复层上皮和异位隐窝, 绒毛和异位隐窝内 Ki-67 阳性细胞增多^[35]。此外, 过氧化物酶体增殖物激活受体 β (peroxisome proliferator-activated receptor β , PPAR β)通过下调 *Ihh* 的表达, 促进潘氏细胞前体分化、成熟; 视网膜母细胞瘤蛋白(retinoblastoma protein, pRb)也通过下调 *Ihh* 的表达, 防止小肠干、祖细胞过度增殖^[36,37]。以上结果表明, 在小肠发生过程中, Hedgehog 可能通过 BMP 抑制 Wnt 信号通路, 从而抑制 ISC 增殖, 促进上皮重建, 促进上皮细胞分化和绒毛形成。BMP 属于转化生长因子 β 家族, BMP4 仅来源于固有层, BMP7 主要来源于上皮, BMP2 在小肠上皮和固有层均有表达, 三者都是 Hedgehog 信号通路的靶基因产物, 而小肠上皮细胞又表达 BMP 受体 1a (BMPR1a)。这样, 小肠上皮与固有层之间通过 Hedgehog 和 BMP 以旁分泌方式形成反馈回路。Hedgehog-BMP 反馈回路主要通过 BMP 信号通路影响肠隐窝形成和潘氏细胞的发生。

3.4 BMP 信号通路

BMPR1a 主要分布于小肠绒毛和肠隐窝顶部的上皮和间充质细胞, 肠隐窝底部仅有少量表达^[38]。在潘氏细胞的发生过程中, **BMP** 信号通路的作用主要是抑制肠隐窝形成、促进分泌细胞系分化。**BMPR1a** 突变或过表达 **BMP** 受体拮抗剂 **Noggin** 的小鼠均表现为肠隐窝增生、肥大, 其病理特征与家族性幼年息肉病相似^[39,40]。临床研究也表明, 幼年息肉病的发生与 *Bmpr1a*、*Smad4* 等基因突变有关。但是, *Smad4* 基因突变引起的肠息肉以间质细胞增生为主, 而 *Bmpr1a* 与 *Pten* 基因突变患者的小肠却有着类似的病理特征。可见, 经典 **BMP** 信号通路不是 **BMP** 影响肠隐窝形成的主要途径, **BMP** 可能通过目前尚不清楚的机制抑制 **PTEN** 的磷酸化, 增强 **PTEN** 对 **Akt** 信号通路的抑制作用, 从而将 **Wnt** 信号通路的活性控制在适当水平, 防止肠隐窝过度分裂, 保证小肠上皮的正常发生和自我更新(图 2)。首先, He 等^[39]发现, **BMPR1a** 与磷酸化 **PTEN** 共存于小肠上皮。其次, 体外研究表明, 暴露于 **Noggin** 的小肠其 β -cat 活性显著增高, **PI3K** 抑制剂 **Ly294002** 能逆转这种效应。应用基因转染技术使离体小肠表达显性抑制性 **BMPR1a** 或组成性活化 **Akt**, 其 β -cat 活性显著增高; 相反, 若使离体小肠表达组成性活化 **BMPR1a** 或将其暴露于 **Ly294002**, 则其 β -cat 活性显著降低。最后, *Mx1-Cre⁺; Pten^{fl/fl}* 小鼠与 *Bmpr1a* 显性抑制性突变和 *noggin* 转基因小鼠一样, 其小肠也发生息肉病变^[12]。值得注意的是, **BMP** 信号通路研究中, 各种实验模型对肠隐窝形成和潘氏细胞发生的影响并不完全相同。*Bmpr1a* 显性抑制性突变和 *noggin* 转基因小鼠均表现为小肠上皮 β -cat 活性增高, 绒毛内可见隐窝分裂、隐窝从头形成、息肉等^[39,40]。*Villin-Cre; Bmpr1a^{loxP/loxP}* 小鼠虽然也表现为肠隐窝增多, 但未见肠隐窝从头形成、息肉等病变; 分泌细胞数量正常或减少, 主要表现为粘原颗粒、分泌颗粒减小, 溶菌酶、隐窝素、三叶因子 3、嗜铬粒蛋白 A 等标志分子的表达减少, 说明发生于上皮细胞的 **BMP** 信号通路对包括潘氏细胞在内的分泌细胞系的晚期分化具有促进作用。另外, *Villin-Cre; Bmpr1a^{loxP/loxP}* 小鼠小肠上皮的 β -cat 活性与对照组并无显著差异。可见, 发生于间充质细胞的 **BMP** 信号通路与幼年息肉病的关系更为密切^[38]。正常情况下, 该信号通路主要通过非经典途径抑制小肠上皮的 **Wnt** 信号通路, 防止小肠黏膜异常增生。而发生于上皮细胞的 **BMP** 信号通路主要影

响小肠上皮的发生, 其机制可能是经典的 **BMP-Smad4** 信号通路。

4 小结

潘氏细胞既是肠隐窝最后形成的标志, 也是构成 **ISC** 微环境的重要内容; 肠隐窝的形成也为潘氏细胞的分化、迁移和分布提供了必要的条件。潘氏细胞的分化经历了从 **ISC** 到分泌细胞系再到中间型细胞的过程, 控制这一过程的主要是发生于上皮细胞之间以及上皮细胞与间充质细胞之间的多种信号通路, 如 **Wnt**、**Notch**、**Hedgehog**、**BMP** 信号通路等。这些信号通路的第一信号分子(包括受体拮抗剂)或来源于隐窝上皮细胞, 或来源于邻近的间充质细胞; 有分泌性蛋白, 也有跨膜蛋白, 以 **Wnt** 信号通路的作用最为显著。**Wnt** 信号通路既可以作用于 **Notch** 信号通路, 使后者以其靶分子 **Math1** 促进潘氏细胞的早期分化, 也可以直接通过 **SOX9**、**EphB2/EphB3** 及 **ephrin-B1** 影响潘氏细胞的晚期分化、迁移和分布(图 1)。**Hedgehog** 与 **BMP** 信号通路则在小肠上皮与固有层之间形成反馈回路, 并通过 **BMP**、**Wnt** 信号通路影响小肠上皮的发生。

参考文献(References)

- [1] Bry L, Falk P, Huttner K, et al. Paneth cell differentiation in the developing intestine of normal and transgenic mice, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(22): 10335-10339
- [2] Potten CS, Booth C, Tudor GL, et al. Identification of a putative intestinal stem cell and early lineage marker; musashi-1, *Differentiation*, 2003, 71(1): 28-41
- [3] 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, *FEBS Lett*, 2003, 535(1-3): 131-135
- [4] 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(7165): 1003-1007
- [5] Sangiorgi E, Capecchi MR. *Bmi1* is expressed *in vivo* in intestinal stem cells, *Nat Genet*, 2008, 40(7): 915-920
- [6] Garabedian EM, Roberts LJJ, McNevin MS, et al. Examining the role of Paneth cells in the small intestine by lineage ablation in transgenic mice, *J Biol Chem*, 1997, 272(38): 23729-23740
- [7] Stappenbeck TS, Gordon JI. *Rac1* mutations produce aberrant epithelial differentiation in the developing and adult mouse small intestine, *Development*, 2000, 127(12): 2629-2642
- [8] Scoville DH, Sato T, He XC, et al. Intestinal stem cells and signaling, *Gastroenterology*, 2008, 134(3): 849-864
- [9] Nelson WJ, Nusse R. Convergence of **Wnt**, β -catenin, and

- cadherin pathways, *Science*, 2004, 303(5663): 1483-1487
- [10] Escaffit F, Perreault N, Jean D, *et al.* Repressed E-cadherin expression in the lower crypt of human small intestine: a cell marker of functional relevance, *Exp Cell Res*, 2005, 302(2): 206-220
- [11] Fang DX, Hawke D, Zheng Y, *et al.* Phosphorylation of β -catenin by AKT promotes β -catenin transcriptional activity, *J Biol Chem*, 2007, 282(15): 11221-11229
- [12] He XC, Yin T, Grindley JC, *et al.* PTEN-deficient intestinal stem cells initiate intestinal polyposis, *Nat Genet*, 2007, 39(2): 189-198
- [13] Gregorieff A, Pinto D, Begthel H, *et al.* Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine, *Gastroenterology*, 2005, 129(2): 626-638
- [14] Kim BM, Mao JH, Taketo MM, *et al.* Phases of canonical Wnt signaling during the development of mouse intestinal epithelium, *Gastroenterology*, 2007, 133(2): 529-538
- [15] Fevr T, Robine S, Louvard D, *et al.* Wnt/ β -catenin is essential for intestinal homeostasis and maintenance of intestinal stem cells, *Mol Cell Biol*, 2007, 27(21): 7551-7559
- [16] Korinek V, Barker N, Moerer P, *et al.* Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4, *Nat Genet*, 1998, 19(4): 379-383
- [17] Pinto D, Gregorieff A, Begthel H, *et al.* Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium, *Genes Dev*, 2003, 17(14): 1709-1713
- [18] Kuhnert F, Davis CR, Wang HT, *et al.* Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(1): 266-271
- [19] Perreault N, Katz JP, Sackett SD, *et al.* *Foxl1* controls the Wnt/ β -catenin pathway by modulating the expression of proteoglycans in the gut, *J Biol Chem*, 2001, 276(46): 43328-43333
- [20] Takano-Maruyama M, Hase K, Fukamachi H, *et al.* *Foxl1*-deficient mice exhibit aberrant epithelial cell positioning resulting from dysregulated EphB/EphrinB expression in the small intestine, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006, 291(1): G163-G170
- [21] Li JW, Hassan GS, Williams TM, *et al.* Loss of caveolin-1 causes the hyper-proliferation of intestinal crypt stem cells with increased sensitivity to whole body γ -radiation, *Cell Cycle*, 2005, 4(12): 1817-1825.
- [22] Sansom OJ, Reed KR, Hayes AJ, *et al.* Loss of *Apc* *in vivo* immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration, *Genes Dev*, 2004, 18(12): 1385-1390
- [23] Andreu P, Colnot S, Godard C, *et al.* Crypt-restricted proliferation and commitment to the Paneth cell lineage following *Apc* loss in the mouse intestine, *Development*, 2005, 132(6): 1443-1451
- [24] Andreu P, Peignon G, Slomianny C, *et al.* A genetic study of the role of the Wnt/ β -catenin signalling in Paneth cell differentiation, *Dev Biol*, 2008, 324(2): 288-296
- [25] Blache P, van de Wetering M, Duluc I, *et al.* SOX9 is an intestine crypt transcription factor, is regulated by the Wnt pathway, and represses the *CDX2* and *MUC2* genes, *J Cell Biol*, 2004, 166(1): 37-47
- [26] Bastide P, Darido C, Pannequin J, *et al.* Sox9 regulates cell proliferation and is required for Paneth cell differentiation in the intestinal epithelium, *J Cell Biol*, 2007, 178(4): 635-648
- [27] Mori-Akiyama Y, van den Born M, van Es JH, *et al.* SOX9 is required for the differentiation of paneth cells in the intestinal epithelium, *Gastroenterology*, 2007, 133(2): 539-546
- [28] Batlle E, Henderson JT, Begthel H, *et al.* β -catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB, *Cell*, 2002, 111(2): 251-263
- [29] Holmberg J, Genander M, Halford MM, *et al.* EphB receptors coordinate migration and proliferation in the intestinal stem cell niche, *Cell*, 2006, 125(6): 1151-1163
- [30] van Es JH, Jay P, Gregorieff A, *et al.* Wnt signalling induces maturation of Paneth cells in intestinal crypts, *Nat Cell Biol*, 2005, 7(4): 381-386
- [31] Yang Q, Bermingham NA, Finegold MJ, *et al.* Requirement of *Math1* for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine, *Science*, 2001, 294(5549): 2155-2158
- [32] Fre S, Huyghe M, Mourikis P, *et al.* Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine, *Nature*, 2005, 435(7044): 964-968
- [33] Suzuki K, Fukui H, Kayahara T, *et al.* *Hes1*-deficient mice show precocious differentiation of Paneth cells in the small intestine, *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 328(1): 348-352
- [34] Ramalho-Santos M, Melton DA, McMahon AP. Hedgehog signals regulate multiple aspects of gastrointestinal development, *Development*, 2000, 127(12): 2763-2772
- [35] Madison BB, Braunstein K, Kuizon E, *et al.* Epithelial hedgehog signals pattern the intestinal crypt-villus axis, *Development*, 2005, 132(2): 279-289
- [36] Varnat F, Heggeler BB, Grisel P, *et al.* PPAR β/δ regulates Paneth cell differentiation via controlling the hedgehog signaling pathway, *Gastroenterology*, 2006, 131(2): 538-553
- [37] Yang HS, Hinds PW. pRb-mediated control of epithelial cell proliferation and Indian Hedgehog expression in mouse intestinal development, *BMC Dev Biol*, 2007, 7: 6-17
- [38] Auclair BA, Benoit YD, Rivard N, *et al.* Bone morphogenetic protein signaling is essential for terminal differentiation of the intestinal secretory cell lineage, *Gastroenterology*, 2007, 133(3): 887-896
- [39] He XC, Zhang JW, Tong WG, *et al.* BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt- β -catenin signaling, *Nat Genet*, 2004, 36(10): 1117-1121
- [40] Haramis APG, Begthel H, van den Born M, *et al.* *De novo* crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine, *Science*, 2004, 303(5664): 1684-1686

Development of Paneth Cell and Regulation of Signaling Pathways

Kai-Zhong Tao, Qing-Juan Tang¹, Ping Zheng*

(Laboratory of Digestive Disease, First People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200080, China;

¹College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266006, China)

Abstract Paneth cells are serous glandular epithelial cells at the base of small intestinal crypts. They constitute the key cell component in the intestinal mucosal barrier. These cells originate from the intestinal stem cell (ISC). There are two hypotheses about ISC, i.e. the label-retaining cells above and the crypt base columnar cells intercalated between Paneth cells. Paneth cells, together with goblet and enteroendocrine cells, belong to the secretory cell lineage of the small intestinal epithelium. Furthermore, Paneth and goblet cells share the common precursor, intermediate cell. The differentiation of Paneth cells undergoes a process from ISC to the secretory cell lineage progenitor and to intermediate cell, which is regulated predominantly by the Wnt signaling pathway. The Notch, Hedgehog and bone morphogenetic protein signaling pathways also have effects on the development of Paneth cells.

Key words Paneth cell; Wnt; Notch; Hedgehog; bone morphogenetic protein

Received: November 5, 2008 Accepted: March 10, 2009

*Corresponding author. Tel: 86-21-63240090-4255, Fax: 86-21-63241377, E-mail: zhengpingdoctor@126.com