

综述

肠道干细胞及其干细胞巢

文 敏^{1,2} 贾 刚^{1*} 王康宁¹ 赵 华¹¹四川农业大学动物营养研究所, 雅安 625014; ²西藏职业技术学院, 拉萨 850000

摘要 肠上皮是动物体内更新速度最快的组织之一, 其功能的正常发挥有赖于定植在隐窝底部的肠道干细胞。肠道干细胞周围的细胞构成干细胞巢, 为其提供了支持性微环境。随着肠道干细胞标记分子、谱系示踪技术、类器官培养等技术的进步和完善, 使得人们对于肠道干细胞来源、增殖、分化相关信号通路的认识不断加深。该文就近年来肠道干细胞及其干细胞巢的研究进展进行了简要综述。

关键词 肠道干细胞; 干细胞巢; 亮氨酸重复序列G蛋白偶联受体5; Wnt; 类器官

Intestinal Stem Cell and Its Niche

Wen Min^{1,2}, Jia Gang^{1*}, Wang Kangning¹, Zhao Hua¹¹Animal Nutrition Institute, Sichuan Agricultural University, Yaan 625014, China;²Tibet Vocational Technical College, Lasa 850000, China)

Abstract The epithelium of the intestine is one of the most rapidly self-renewing tissue in the body, the function of epithelium depends on the intestinal stem cells (ISCs) who reside at the base of the crypt. The cells surrounding the ISCs constitute a stem cell niche which prove a supporting microenvironment for the ISCs. With the identification of the ISC markers, the advancement of the lineage tracing and the organoid culture, our understanding of the origin and the mechanism regulating the proliferation and differentiation of the ISCs has been improved. We briefly summarize the recent progresses about the ISCs and its niches in this paper.

Keywords intestinal stem cells; niche; Lgr5; Wnt; organoid

肠道担负着消化、吸收、内分泌、防御等功能。肠腔表面覆盖着一层由上皮细胞组成的单细胞层组织—肠上皮, 肠上皮细胞通过折叠形成大量自我更新的隐窝—绒毛结构^[1]。肠上皮细胞更新速率很快, 小鼠约5 d更新一次^[2]。维持肠上皮细胞自我更新的细胞增殖发生在隐窝(crypt of lieberkuhn)底部, 每个隐窝内含有约4~6个活跃肠道干细胞(intestinal stem cells, ISCs)^[3-4], 约24 h分裂一次^[5]; ISCs产生的子代细

胞—过渡扩增细胞(transit amplifying cells, TA细胞), 约12 h分裂一次; TA细胞能在约6次的有限分裂过程中向绒毛顶端不断移行并分化为成熟肠上皮细胞, 以补充肠绒毛顶端的细胞凋亡脱落^[6]。

干细胞的特性有赖于干细胞内在基因编程以及外界信号调控^[7]。1978年, 由Schofield最早提出干细胞巢的概念, 他推测是造血干细胞(haematopoietic stem cells, HSCs)周围的微环境给予了HSCs干细胞

收稿日期: 2015-07-22 接受日期: 2015-08-19

教育部博士点基金和四川省科技支撑计划(批准号: 2013NZ0054)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0835-2885005, E-mail: jiagang700510@163.com

Received: July 22, 2015 Accepted: August 19, 2015

This work was supported by the Doctoral Foundation of Ministry of Education of China and the Science and Technology Support Program of Sichuan Province (Grant No.2013NZ0054)

*Corresponding author. Tel: +86-835-2885005, E-mail: jiagang700510@163.com

网络出版时间: 2015-11-06 18:24:33 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20151106.1824.012.html>

特性。肠道干细胞巢(intestinal stem cell niche)是隐窝的特化区域, 这个区域能够提供维持ISCs的所有因子, 支持ISCs的自我更新及分化, 包括了调控ISCs命运的所有细胞和非细胞成分^[8]。

1 肠道干细胞

1.1 肠道干细胞来源及其标记分子

干细胞具有维持自身数量并分化为其他类型细胞的能力。早期由于缺乏有效的干细胞标记方法, 通常是以直接观察、染料或同位素示踪等方法探索干细胞的生物学特性^[9], 关于ISCs形成了两种理论模型: 由Cheng等^[10]提出的CBC细胞模型和由Potten等^[11]提出的+4位干细胞模型。随着技术的进步, 转基因小鼠模型、基因芯片、谱系示踪(lineage tracing)等技术的应用, 加快了我们对ISCs认识的步伐。

1.1.1 Lgr5标记CBCs Cheng等^[12]发现, 隐窝底部潘氏细胞(paneth cells, PCs)之间嵌布着一类不断分裂的细胞——隐窝基部柱状细胞(the crypt base columnar stem cells, CBCs), 同位素标记显示分化上皮细胞来源于CBCs^[10]。Bjerknes等^[3]诱导隐窝细胞进行随机突变, 突变标记的细胞持续分裂能够形成由隐窝底部延伸向绒毛顶端的克隆条带(ribbons); 被标记细胞的克隆寿命或长或短, 与隐窝上存在持续终身的干细胞和寿命较短的TA细胞相吻合; 长寿克隆中包括了各类肠上皮细胞以及至少一个被标记的CBC细胞, 这支持CBCs可能就是自我更新的、多潜能干细胞。

亮氨酸重复序列G蛋白偶联受体5(leucine-rich-repeat-containing G-protein-coupled receptor 5, *Lgr5*)是隐窝增殖信号Wnt的靶基因之一, 它被证明是CBCs的标记分子^[5]。Baker等^[5]利用*Lgr5-EGFP-ires-CreERT2/R26R-lacZ*转基因小鼠建立了可诱导的谱系示踪模型。增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)显示Lgr5专一地在CBCs中表达, Lgr5⁺CBCs分散嵌布于PCs之间。他莫昔芬(tamoxifen, TAM)能诱导Lgr5⁺CBCs合成的CreERT2(Cre重组酶)剪去自身*LacZ*(β -半乳糖苷酶)基因阻遏序列, 使该Lgr5⁺CBCs及其子代细胞组成性表达LacZ; 最开始, LacZ⁺细胞只在隐窝底部被观察到; 随着时间延长, LacZ⁺细胞形成了由隐窝底部延伸至绒毛顶端的示踪条带; 条带中包括了所有成

熟上皮细胞, 条带中各类上皮细胞所占比例与该类细胞占肠上皮的比比例一致; 且这些条带持续终身, 这说明Lgr5⁺CBCs就是具有自我更新和分化功能的ISCs^[5]。

1.1.2 Bmi1标记+4位干细胞 Potten等^[11]在隐窝底部+4位发现了一类对放射敏感的DNA标记滞留细胞(label-retaining cells, LRCs)(前三位被PCs占据), 放射敏感意味着能够防止基因突变的积累, DNA标记滞留反映有丝分裂停滞, 而上述特性在早期通常被看作干细胞的替代标志, Potten等由此推测, +4 LRCs就是ISCs。+4 LRCs每天分裂, 其标记滞留特性并不反应分裂停滞, 可能是+4 LRCs通过非对称分裂将永生(标记的)和新生(非标记)DNA链分别分配到干细胞和TA细胞中^[6,13]。但是一直缺乏实验直接证明+4 LRCs与其子代细胞之间的关系。

Bmi1(bmi1 polycomb ring finger oncogene)能够标记一类位于隐窝底部+4位的细胞^[14]。不同于Potten +4 LRCs的是, Bmi1⁺ISCs数量较少、分裂速度缓慢、对于放射损伤不敏感^[15]; 且Bmi1着重标记小鼠小肠近端, 并随着肠道的延伸和标记时间推移逐渐减弱, 暗示肠道中还存在其他非Bmi1标记的ISCs^[14]。

其他的CBCs和+4位干细胞标记分子也陆续被鉴定出来^[16-22], 但值得注意的是, 不同类型的ISCs可能表达同一种标记分子, 这使得关于ISCs的研究变得更为错综复杂^[22-23]。

1.2 肠道干细胞可塑性

肠道能够在活跃Lgr5⁺ISCs失去的条件下存活, 这可能与肠道中存在静止的“储备”干细胞或者TA细胞也具有干细胞潜能有关^[24]。

给*Lgr5*-白喉毒素受体(*Lgr5*-diphtheria toxin receptor, *Lgr5-DTR*)转基因小鼠注射白喉毒素(diphtheria toxin, DT)剔除Lgr5⁺ISCs后, 肠道结构、隐窝形态能够维持正常; 停止注射DT后, Lgr5⁺ISCs再次出现, 谱系示踪表明, 新生Lgr5⁺ISCs来自于Bmi1⁺ISCs^[25]。放射同样能引起Lgr5⁺ISCs的快速丢失, Bmi1⁺ISCs经放射后快速增殖, 参与肠上皮的修复过程^[15]。这表明, 相对静止的Bmi1⁺ISCs可能是一种ISCs储备, 在肠上皮受损的情况下补充丢失的Lgr5⁺ISCs^[15,25]。此外, +4位干细胞Hopx⁺细胞、mTert⁺细胞也能够Lgr5⁺ISCs受损的情况下生成Lgr5⁺ISCs, 并分化为成熟上皮细胞^[19,26], Lgr5⁺ISCs也

能生成+4位干细胞,这说明活跃的Lgr5⁺ISCs和相对静止的+4位ISCs之间存在双向转化关系^[20]。

Dll1(Delta-like 1)能够标记Lgr5⁺ISCs的子代分泌型祖细胞, Dll1⁺细胞能够生成短命的分泌型细胞。当Lgr5⁺ISCs被辐射杀死, Dll1⁺细胞能够去分化,生成Lgr5⁺ISCs, 参与到再生过程中去^[27]。隐窝+3位有一亚类群Lgr5⁺细胞具有标记滞留特性,这类Lgr5⁺LRCs能同时表达+4位干细胞和分泌型祖细胞的标记分子;它们在生理条件下寿命较短,研究表明,这些Lgr5⁺LRCs并非ISCs,而是PCs的祖细胞,在肠道损伤的情况下, Lgr5⁺LRCs能够去分化成为具有增殖能力的Lgr5⁺ISCs^[28-29]。

1.3 肠道干细胞体外培养生成类器官

单个ISC细胞能够被培养生成具有类似肠上皮结构的类器官(organoid),培养基组成包括R-spondin1(Wnt激动剂)、EGF(epidermal growth factor)、Noggin(BMP抑制剂)及Notch生长因子^[30-31]。Organoid是由单层细胞组成的类似海胆的组织,其隐窝状出芽结构底部定植着PCs与Lgr5⁺ISCs,TA细胞延伸汇入主要由分化的肠细胞组成的中央空腔^[30]。Organoid自我更新过程与肠道上皮相似,细胞在隐窝中增殖、分化、移行最终凋亡后脱落到中央空腔中^[30]。将由单个Lgr5⁺ISC培养获得的organoid移植到结肠上皮受损小鼠上,来自organoid的细胞能够形成形态功能正常的单细胞层上皮组织,并能形成具有自我更新功能的隐窝^[32]。这充分体现了ISCs的自我更新和分化特征。

1.4 两类肠道干细胞共存

研究表明,肠道中同时存在活跃的Lgr5⁺ISCs和相对静止的+4位干细胞^[33],两者具有明显的区别:(1)Lgr5⁺ISCs分散嵌布于隐窝底部的PCs之间,+4位干细胞在最顶部PCs之上,平均位置为+4位。(2)生理条件下Lgr5⁺ISCs较为活跃,处于持续分裂状态,而+4位干细胞相对静止^[14,19];在Lgr5⁺ISCs损伤时,+4位干细胞强烈增殖,参与到肠上皮修复中^[15,19]。(3)Wnt信号能够刺激Lgr5⁺ISCs增殖,而+4位干细胞缺乏对Wnt信号的反应^[15]。

但上述两类ISCs又无法完全割裂:(1)两类ISCs能够表达同一种标记分子^[22-23]。(2)在一定条件下二者之间能够进行相互转化^[19-20,25-26]。(3)Lgr5⁺ISCs与+4位干细胞在体外条件下都具有生成organoid的潜能^[15,22,26]。两类ISCs可能在不同生理条件下发挥各

自作用,共同参与肠上皮细胞稳态的维持。

2 肠道干细胞巢

肠道干细胞巢并非只是ISCs的生存环境,它是由干细胞巢细胞提供给ISCs存活和发挥功能所需因子的支持性微环境^[2]。除了提供ISCs所需生长因子,干细胞巢还能参与到不同营养条件下ISCs功能的调控^[34]。

2.1 ISC所处的微环境

2.1.1 Wnt Wnt是隐窝增殖的首要驱动信号^[35]。无Wnt配体时,胞浆中 β -catenin(β -链蛋白)被APC(APC destruction complex)磷酸化后分解;当Wnt分子结合到卷曲蛋白受体(Frizzleds)及其辅助受体低密度脂蛋白受体相关蛋白5/6(low density lipoprotein receptor-related protein 5/6, LRP5/6)后,抑制APC对 β -catenin磷酸化引起的分解, β -catenin进入到核内与Tcf4(T-cell factor transcription factors)结合^[36],启动Wnt/Tcf靶基因转录^[2,35];Wnt靶基因包括细胞周期素(*cyclin D1*)^[37]和原癌基因(*cMyc*)^[38],二者均能促进细胞增殖,敲除*cMyc*能够导致隐窝结构消失^[39]。Wnt对于维持ISCs正常增殖具有重要意义,抑制Wnt信号能够迅速引起TA细胞的减少和隐窝结构的消失^[36,40-41];相反,Wnt信号的过度激活能够导致TA细胞过度增殖和隐窝的扩大,甚至肿瘤的发生^[42-44]。由于Wnt对于隐窝稳态具有重要作用,因此机体通过一系列机制将Wnt信号维持在一个正常水平。

Znrf3(zinc and ring finger 3)和Rnf43(homologue ring finger 43)是跨膜E3泛素连接酶(transmembrane E3 ligases),它们能够在散乱蛋白(dishevelled, DVL)的协助下与Frizzleds结合,引起胞吞从细胞表面移除,抑制Wnt信号^[45-47];敲除*Znrf3*和*Rnf43*会引起Wnt信号广泛激活以及隐窝的扩大。*Znrf3*和*Rnf43*自身是Wnt靶基因,由此构成了Wnt信号的负反馈回路^[48]。最近研究发现,R-spondin能够与Lgr4/5复合物结合后使Rnf43和Znrf3从细胞表面移除,防止Frizzleds被分解,增强Wnt信号^[48-49]。

Achaete scute like 2(*Ascl2*)是Wnt的靶基因,肠道中*Ascl2*仅在Lgr5⁺ISCs中表达,转基因表达*Ascl2*将引起隐窝增生及异位,敲除*Ascl2*将引起Lgr5⁺ISCs在几天内消失^[18]。最近研究发现,*Ascl2*能与 β -catenin和Tcf4结合,启动Wnt靶基因的表达;*Ascl2*还能结合到其自身基因的启动子上,促进其表达,构成自我活

化回路(autoactivation loop)^[50]。

2.1.2 BMP 骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)是隐窝生长的负调控因子^[51], 它能够抑制Wnt/ β -catenin信号。BMP配体BMP-2和BMP-4在肠绒毛间质细胞中表达^[52], BMP抑制剂Noggin也在隐窝间质细胞中表达^[53]。转基因表达Noggin能够抑制BMP信号, 导致隐窝的异位形成^[52], 条件性敲除BMP受体*BMPRIa*能够引起肠道干细胞的过度增殖和隐窝数量的增加^[51]。BMP能够防止一种抑癌基因*PTEN*(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten)磷酸化失活, 保持*PTEN*活力; *PTEN*能够通过抑制磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)来抑制Akt以及其下游信号通路激活, 限制 β -catenin活力^[51,54]。

2.1.3 EGF EGF能够调控细胞增殖分化, 肠腔给予EGF对具有营养功能^[55], 对ISCs和祖细胞具有促进增殖降低凋亡的功能^[56]。EGF受体属于受体酪氨酸激酶家族成员, 小肠上皮中存在负调控机制限制EGF信号。在EGF刺激下多亮氨酸重复区免疫球蛋白样蛋白1(leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1, Lrig1)的转录和翻译得到增强; Lrig1能够与EGFR结合, 随后招募c-Cbl(一种E3泛素连接酶)对Lrig1和EGFR进行泛素化, 使二者分解。由此实现了Lrig1对酪氨酸激酶负反馈调节^[57], Lrig1的移除将导致隐窝的快速扩大^[21,58]。

2.1.4 Notch Notch参与ISCs的增殖及其分化调节^[59]。Notch受体和其配体DII1、DII4是通过细胞之间接触发挥作用, Notch受体与配体结合后能够在 γ -secretase的作用下释放出Notch胞内片段(Notch intracellular domain, NICD), NICD转移到核内与转录因子CSL结合引起目标基因的转录, 调控ISCs的增殖及分化^[60]。抑制Notch信号会导致所有增殖细胞向杯状细胞分化^[61-62]。相反, 激活Notch信号将会引起隐窝增殖细胞扩增, 并抑制其向分泌型细胞分化^[63]。

Notch能够激活*Hes1*(hairy and enhancer of split 1)表达, *Hes1*随后抑制*Math1*基因转录, 而*Math1*是ISCs向分泌型细胞分化的调控者。*Hes1*缺失能够增加肠道分泌型细胞, 减少肠细胞数量^[64]; 而*Math1*的缺失将导致所有分泌型细胞的缺失^[65]; *Math1*过量表达引起胎鼠肠绒毛变短、TA细胞减少, 分泌型细胞增多以及肠细胞的缺失^[66]。

PCs通过表达DII1、DII4激活ISCs Notch信号通

路, 抑制Lgr5⁺ISCs分化为分泌型细胞; 由于分裂被挤出隐窝底部的TA细胞与PCs之间的接触解除, 部分TA细胞Notch信号关闭, 转而表达*Math1*进入分泌型细胞分化途径, 并为周边Notch⁺TA细胞提供DII1配体; 使周边Notch⁺TA细胞保持Notch激活状态, 抑制*Math1*表达, 维持Notch⁺TA细胞增殖状态并向肠细胞分化^[67]。

2.2 ISCs干细胞巢的细胞组成

2.2.1 潘氏细胞 PCs位于隐窝底部, ISCs分散嵌插于PCs之间, 二者紧密接触^[5]。PCs除了能够合成抗菌物质外, 还能够表达Wnt3、TGF- α 、EGF以及Notch配体DII1和DII4, 几乎涵盖了体外培养维持ISCs生长所需的因子^[31]。通过转基因手段能够敲除大部分PCs, 随之而来的是Lgr5⁺ISCs减少, 但剩下的Lgr5⁺ISCs均簇拥在余下的PCs周围^[31]。

在体外培养体系中, 约6%的Lgr5⁺ISC能生成organoid^[30]; 而通过流式细胞仪分拣得到的Lgr5⁺ISC-PC细胞二聚体约有25%能生成organoid^[31], 添加Wnt3a能够使单个Lgr5⁺ISC生成organoid的效率提高到Lgr5⁺ISC-PC二聚体水平^[31]。诱导敲除小鼠organoids *Atoh1*基因(PCs分化所必需), 能够引起organoids的生长停滞无法传代; 而培养基中补充Wnt3能够使其正常生长^[68]。上述现象表明, PCs通过分泌Wnt3等生长因子参与到干细胞巢的构建当中。

2.2.2 肠间充质细胞 诱导敲除肠上皮*Wnt3*基因的小鼠肠道形态正常, 表明肠上皮来源的Wnt3信号缺失对ISCs功能和Wnt信号维持没有显著影响, 这可能是由于肠间充质细胞(intestinal mesenchymal cells)能够分泌其他Wnt分子, 补偿Wnt3信号的缺失^[68]。敲除*Wnt3*基因的organoids在没有Wnt配体的培养基中表现出生长受阻; 而将其与肠间质细胞培养而来的饲养层共培养, 能够正常传代生长^[68], 这表明肠间充质细胞也参与了肠道干细胞巢的构建。

Lgr5⁺ISCs细胞与肠上皮成纤维细胞(intestinal subepithelial myofibroblasts, ISEMFs)共培养能够生成比Lgr5⁺ISCs单独培养大3.5倍的organoid, 且organoid上有更多隐窝样结构^[69]。ISEMFs能够在缺乏R-spondin1的情况下支持隐窝生成organoid, 而R-spondin1对于体外干细胞培养是必需的, ISEMFs的作用可能与其高度表达R-spondin2有关^[69]。同时, ISEMFs还能提供R-spondins以外的生长因子^[69-70]。隐窝或单个ISC细胞与ISEMFs共培养生成的organoid

溶菌酶的表达量大大提高,这说明ISEMFs还能促进PCs分化,间接地为ISCs增殖提供Wnts信号来源^[69]。

条件性敲除肠上皮细胞(包括PCs)和平滑肌细胞(包括ISEMFs)的*Porcn*基因(*Porcupine*, 编码Wnts加工必需的酰基转移酶),能够去除这些细胞分泌的Wnt,但未能对肠道形态、细胞增殖分化及Wnt通路活力造成影响^[71];由此可见,源于肠上皮以及ISEMFs所分泌的Wnts对于肠上皮维持是非必需的,这暗示,体内可能还存在一类小的细胞亚群或者冗余信号来源用以维持生理Wnt信号来源^[71]。Kabiri等^[72]发现,肠基质细胞(intestinal stromal cells)能够分泌Wnt和R-spondin3,支持*Porcn*基因敲除organoids在无R-spondin条件下的生长;但是体内给予*Porcn*抑制剂能够同时影响肠上皮,平滑肌细胞及肠基质细胞,减少隐窝Lgr5⁺ISCs数量,减缓辐射损伤后的恢复速度。

2.3 干细胞巢的稳态调节

2.3.1 PCs的定位 PCs是肠道干细胞巢的重要组成部分,也是唯一一种定植于隐窝底部的成熟肠上皮细胞,它的准确定位对隐窝形态和功能正常发挥具有重要意义。

酪氨酸激酶受体家族成员EphB受体(ephrin type B receptor)及其配体EphrinBs是细胞表面结合分子,表达EphB受体和EphrinBs的细胞表现出强烈的相互排斥^[73]。EphB在隐窝底部的PCs表达,其表达受到Wnt信号的驱动^[74-75];而EphrinB以沿绒毛到隐窝由高到低的梯度在上皮细胞和TA细胞中表达,受到Wnt信号的负调节^[74,76]。在*EphB3*^{-/-}小鼠上,PCs不能有效地定植到隐窝底部,而是混杂着其他细胞向绒毛顶端移行^[76];小鼠体内注射ephrin-B2-Fc重组蛋白同样能阻断EphB信号,引起类似于*EphB3*^{-/-}小鼠的PCs错位分布^[77]。这暗示,PCs产生Wnt,诱导自身产生一个表面受体,该受体驱使其逆着其他细胞运动轨迹向隐窝底部运动。当增殖中的TA细胞被新生细胞机械推动远离隐窝底部时,这些TA细胞接受到的Wnt信号降低,EphB受体表达减少、EphrinB配体表达提高,受到PCs排斥,由此向上迁移远离隐窝底部^[67]。

2.3.2 ISC竞争干细胞区域 与PCs接触对于维持Lgr5⁺ISCs特性是必需的^[31]。通过对单个Lgr5⁺ISC的谱系示踪,发现ISCs每天对称分裂,生成的子细胞竞争由PCs组成的有限干细胞巢空间^[64,78-79]。

TAM能够诱导*Lgr5-EGFP-Ires-CreERT2/R26R-Confetti*转基因小鼠Lgr5⁺ISCs随机表达四种颜色的荧光蛋白中的一种。如果ISCs是非对称分裂,每次分裂生成一个ISC和一个子代TA细胞,理论上单个隐窝中各色条带的比例将会一致;而实际是,ISCs呈对称分裂,随机生成两个ISCs或者两个TA细胞,子代细胞相互推挤竞争干细胞巢,随着时间延伸,隐窝变成单色的单细胞克隆^[64]。Lopez-Garcia等^[78]认为,所有ISCs增殖潜力相同,当某个ISC离开干细胞巢能够通过相邻细胞复制得到补充;ISCs克隆之间相互推挤,直到某个克隆占据整个隐窝底部或者被挤出干细胞巢。干细胞替换速率与细胞分裂速度接近表明,ISCs中性竞争和对称分裂对于干细胞稳态维持具有重要作用^[64,78]。在体显微谱系示踪观察到,尽管隐窝中有很多细胞都具有干细胞潜能,外周的ISCs也可能迂回隐窝底部,只有位于隐窝底部中央区域的细胞才能长时间保持干细胞特性^[80-81]。

3 总结与展望

ISC从功能上可以分为两类:生理条件下的活跃的CBCs和相对静止的参与损伤修复的+4位干细胞,二者共同发挥作用保证肠道稳态。以Lgr5所标记的CBCs是目前最为接受的ISCs^[33]。单个ISC离体培养仍然具有增殖分化活力,能够生成具有类似肠上皮结构的organoid。多种细胞来源的多种信号分子参与ISCs增殖分化调节。单个ISC的干细胞潜能似乎相同,它们通过对称分裂竞争由PCs等细胞组成的细胞巢,但位于隐窝底部中央的ISCs具有更大的竞争优势。

现有标记分子仍不能从功能上完全区分ISCs,各种被标记细胞之间存在一定交集;Lgr5⁺ISCs和+4位干细胞之间在特定条件下能够进行转换,哪些信号分子参与了上述过程仍不明确;ISCs的分化过程受到多种信号调节,它们之间是如何形成网络保证肠上皮稳态;现有干细胞巢对ISCs的调控研究大部分都基于Lgr5⁺ISCs,干细胞巢对+4位干细胞调控作用的研究还相对薄弱;此外,ISCs所处环境较为特殊,除干细胞巢本身以外,肠腔、血液、肠道神经和免疫系统共同作用于ISCs;哪些营养成分、生长因子、抗原物质参与了ISCs功能的调控,继而影响动物肠道形态与功能,仍有待于深入研究。

参考文献 (References)

- 1 Barker N, van de Wetering M, Clevers H. The intestinal stem cell. *Genes Dev* 2008; 22(14): 1856-64.
- 2 van der Flier LG, Clevers H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol* 2009; 71: 241-60.
- 3 Bjerknes M, Cheng H. Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors. *Gastroenterology* 1999; 116(1): 7-14.
- 4 Kozar S, Morrissey E, Nicholson AM, van der Heijden M, Zecchini HI, Kemp R, *et al.* Continuous clonal labeling reveals small numbers of functional stem cells in intestinal crypts and adenomas. *Cell Stem Cell* 2013; 13(5): 626-33.
- 5 Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, *et al.* Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* 2007; 449(7165): 1003-7.
- 6 Marshman E, Booth C, Potten CS. The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays* 2002; 24(1): 91-8.
- 7 Li L, Xie T. Stem cell niche: Structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005; 21: 605-31.
- 8 Yeung TM, Chia LA, Kosinski CM, Kuo CJ. Regulation of self-renewal and differentiation by the intestinal stem cell niche. *Cell Mol Life Sci* 2011; 68(15): 2513-23.
- 9 Kretzschmar K, Watt FM. Lineage tracing. *Cell* 2012; 148(1/2): 33-45.
- 10 Cheng H, Leblond C. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine V. Unitarian theory of the origin of the four epithelial cell types. *Am J Anat* 1974; 141(4): 537-61.
- 11 Potten CS, Hume WJ, Reid P, Cairns J. The segregation of DNA in epithelial stem cells. *Cell* 1978; 15(3): 899-906.
- 12 Cheng H, Leblond C. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine I. Columnar cell. *Am J Anat* 1974; 141(4): 461-79.
- 13 Potten CS, Owen G, Booth D. Intestinal stem cells protect their genome by selective segregation of template DNA strands. *J Cell Sci* 2002; 115(11): 2381-8.
- 14 Sangiorgi E, Capecchi MR. *Bmi1* is expressed *in vivo* in intestinal stem cells. *Nat Genet* 2008; 40(7): 915-20.
- 15 Yan KS, Chia LA, Li X, Ootani A, Su J, Lee JY, *et al.* The intestinal stem cell markers *Bmi1* and *Lgr5* identify two functionally distinct populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(2): 466-71.
- 16 van der Flier LG, Haegebarth A, Stange DE, van de Wetering M, Clevers H. *OLFM4* is a robust marker for stem cells in human intestine and marks a subset of colorectal cancer cells. *Gastroenterology* 2009; 137(1): 15-7.
- 17 Zhu L, Gibson P, Curre DS, Tong Y, Richardson RJ, Bayazitov IT, *et al.* Prominin 1 marks intestinal stem cells that are susceptible to neoplastic transformation. *Nature* 2009; 457(7229): 603-7.
- 18 van der Flier LG, van Gijn ME, Hatzis P, Kujala P, Haegebarth A, Stange DE, *et al.* Transcription factor achaete scute-like 2 controls intestinal stem cell fate. *Cell* 2009; 136(5): 903-12.
- 19 Montgomery RK, Carlone DL, Richmond CA, Farilla L, Kranendonk ME, Henderson DE, *et al.* Mouse telomerase reverse transcriptase (*mTert*) expression marks slowly cycling intestinal stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(1): 179-84.
- 20 Takeda N, Jain R, LeBoeuf MR, Wang Q, Lu MM, Epstein JA. Interconversion between intestinal stem cell populations in distinct niches. *Science* 2011; 334(6061): 1420-4.
- 21 Powell AE, Wang Y, Li Y, Poulin EJ, Means AL, Washington MK, *et al.* The pan-ErbB negative regulator *Lrig1* is an intestinal stem cell marker that functions as a tumor suppressor. *Cell* 2012; 149(1): 146-58.
- 22 van Landeghem L, Santoro MA, Krebs AE, Mah AT, Dehmer JJ, Gracz AD, *et al.* Activation of two distinct *Sox9*-EGFP-expressing intestinal stem cell populations during crypt regeneration after irradiation. *Am J Physiol-Gastr L* 2012; 302(10): G1111-32.
- 23 Munoz J, Stange DE, Schepers AG, van de Wetering M, Koo BK, Itzkovitz S, *et al.* The *Lgr5* intestinal stem cell signature: Robust expression of proposed quiescent 'cell' markers. *EMBO J* 2012; 31(14): 3079-91.
- 24 Li L, Clevers H. Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *Science* 2010; 327(5965): 542-5.
- 25 Tian H, Biehs B, Warming S, Leong KG, Rangell L, Klein OD, *et al.* A reserve stem cell population in small intestine renders *Lgr5*-positive cells dispensable. *Nature* 2011; 478(7368): 255-9.
- 26 Norifumi Takeda RJ. Interconversion between intestinal stem cell populations in distinct niches. *Science* 2011; 334(6061): 1420-4.
- 27 van Es JH, Sato T, van de Wetering M, Lyubimova A, Nee AN, Gregorieff A, *et al.* *Dll1*+ secretory progenitor cells revert to stem cells upon crypt damage. *Nat Cell Biol* 2012; 14(10): 1099-104.
- 28 Roth S, Franken P, Sacchetti A, Kremer A, Anderson K, Sansom O, *et al.* Paneth cells in intestinal homeostasis and tissue injury. *PloS One* 2012; 7(6): e38965.
- 29 Buczacki SJ, Zecchini HI, Nicholson AM, Russell R, Vermeulen L, Kemp R, *et al.* Intestinal label-retaining cells are secretory precursors expressing *Lgr5*. *Nature* 2013; 495(7439): 65-9.
- 30 Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, *et al.* Single *Lgr5* stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche. *Nature* 2009; 459(7244): 262-5.
- 31 Sato T, van Es JH, Snippert HJ, Stange DE, Vries RG, van den Born M, *et al.* Paneth cells constitute the niche for *Lgr5* stem cells in intestinal crypts. *Nature* 2011; 469(7330): 415-8.
- 32 Yui S, Nakamura T, Sato T, Nemoto Y, Mizutani T, Zheng X, *et al.* Functional engraftment of colon epithelium expanded *in vitro* from a single adult *Lgr5*(+) stem cell. *Nat Med* 2012; 18(4): 618-23.
- 33 Barker N, van Oudenaarden A, Clevers H. Identifying the stem cell of the intestinal crypt: Strategies and pitfalls. *Cell Stem Cell* 2012; 11(4): 452-60.
- 34 Yilmaz OH, Katajisto P, Lamming DW, Gultekin Y, Bauer-Rowe KE, Sengupta S, *et al.* mTORC1 in the Paneth cell niche couples intestinal stem-cell function to calorie intake. *Nature* 2012; 486(7404): 490-5.
- 35 Clevers H, Nusse R. Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell* 2012; 149(6): 1192-205.
- 36 van Es JH, Haegebarth A, Kujala P, Itzkovitz S, Koo BK, Boj SF, *et al.* A critical role for the Wnt effector *Tcf4* in adult intestinal homeostatic self-renewal. *Mol Cell Biol* 2012; 32(10): 1918-27.
- 37 Tetsu O, McCormick F. β -Catenin regulates expression of cyclin

- D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999; 398(6726): 422-6.
- 38 He T-C, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, *et al.* Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 1998; 281(5382): 1509-12.
- 39 Muncan V, Sansom OJ, Tertoolen L, Pheesse TJ, Begthel H, Sancho E, *et al.* Rapid loss of intestinal crypts upon conditional deletion of the Wnt/Tcf-4 target gene c-Myc. *Mol Cell Biol* 2006; 26(22): 8418-26.
- 40 Pinto D, Gregorieff A, Begthel H, Clevers H. Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev* 2003; 17(14): 1709-13.
- 41 Fevr T, Robine S, Louvard D, Huelsken J. Wnt/beta-catenin is essential for intestinal homeostasis and maintenance of intestinal stem cells. *Mol Cell Biol* 2007; 27(21): 7551-9.
- 42 Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, *et al.* Constitutive transcriptional activation by a β -catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science* 1997; 275(5307): 1784-7.
- 43 Bienz M, Clevers H. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* 2000; 103(2): 311-20.
- 44 Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, *et al.* Activation of β -catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in β -catenin or APC. *Science* 1997; 275(5307): 1787-90.
- 45 Hao HX, Xie Y, Zhang Y, Charlat O, Oster E, Avello M, *et al.* ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner. *Nature* 2012; 485(7397): 195-200.
- 46 Koo BK, Spit M, Jordens I, Low TY, Stange DE, van de Wetering M, *et al.* Tumour suppressor RNF43 is a stem-cell E3 ligase that induces endocytosis of Wnt receptors. *Nature* 2012; 488(7413): 665-9.
- 47 Jiang X, Charlat O, Zamponi R, Yang Y, Cong F. Dishevelled promotes Wnt receptor degradation through recruitment of ZNRF3/RNF43 E3 ubiquitin ligases. *Mol Cell* 2015; 58(3): 522-33.
- 48 de Lau W, Peng WC, Gros P, Clevers H. The R-spondin/Lgr5/Rnf43 module: Regulator of Wnt signal strength. *Genes Dev* 2014; 28(4): 305-16.
- 49 Carmon KS, Gong X, Lin Q, Thomas A, Liu Q. R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/ β -catenin signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(28): 11452-7.
- 50 Schuijers J, Junker JP, Mokry M, Hatzis P, Koo BK, Sasselli V, *et al.* Ascl2 acts as an R-spondin/Wnt-responsive switch to control stemness in intestinal crypts. *Cell Stem Cell* 2015; 16(2): 158-70.
- 51 He XC, Zhang J, Tong W-G, Tawfik O, Ross J, Scoville DH, *et al.* BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt- β -catenin signaling. *Nat Genet* 2004; 36(10): 1117-21.
- 52 Haramis A-PG, Begthel H, van den Born M, van Es J, Jonkheer S, Offerhaus GJA, *et al.* *De novo* crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine. *Science* 2004; 303(5664): 1684-6.
- 53 Kosinski C, Li VS, Chan AS, Zhang J, Ho C, Tsui WY, *et al.* Gene expression patterns of human colon tops and basal crypts and BMP antagonists as intestinal stem cell niche factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(39): 15418-23.
- 54 Tian Q, He XC, Hood L. Bridging the BMP and Wnt pathways by PI3 Kinase/Akt and 14-3-3? *Cell Cycle* 2005; 4(2): 218-9.
- 55 Marchbank T, Goodlad RA, Lee CY, Playford RJ. Luminal epidermal growth factor is trophic to the small intestine of parenterally fed rats. *Clin Sci* 1995; 89(2): 117-20.
- 56 Suzuki A, Sekiya S, Gunshima E, Fujii S, Taniguchi H. EGF signaling activates proliferation and blocks apoptosis of mouse and human intestinal stem/progenitor cells in long-term monolayer cell culture. *Lab Invest* 2010; 90(10): 1425-36.
- 57 Gur G, Rubin C, Katz M, Amit I, Citri A, Nilsson J, *et al.* LRIG1 restricts growth factor signaling by enhancing receptor ubiquitylation and degradation. *EMBO J* 2004; 23(16): 3270-81.
- 58 Wong VW, Stange DE, Page ME, Buczacki S, Wabik A, Itami S, *et al.* Lrig1 controls intestinal stem-cell homeostasis by negative regulation of ErbB signalling. *Nat Cell Biol* 2012; 14(4): 401-8.
- 59 VanDussen KL, Carulli AJ, Keeley TM, Patel SR, Puthoff BJ, Magness ST, *et al.* Notch signaling modulates proliferation and differentiation of intestinal crypt base columnar stem cells. *Development* 2012; 139(3): 488-97.
- 60 Ranganathan P, Weaver KL, Capobianco AJ. Notch signalling in solid tumours: A little bit of everything but not all the time. *Nat Rev Cancer* 2011; 11(5): 338-51.
- 61 Milano J, McKay J, Dagenais C, Foster-Brown L, Pognan F, Gadiant R, *et al.* Modulation of notch processing by gamma-secretase inhibitors causes intestinal goblet cell metaplasia and induction of genes known to specify gut secretory lineage differentiation. *Toxicol Sci* 2004; 82(1): 341-58.
- 62 van Es JH, van Gijn ME, Riccio O, van den Born M, Vooijs M, Begthel H, *et al.* Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* 2005; 435(7044): 959-63.
- 63 Fre S, Huyghe M, Mourikis P, Robine S, Louvard D, Artavanis-Tsakonas S. Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature* 2005; 435(7044): 964-8.
- 64 Snippert HJ, van der Flier LG, Sato T, van Es JH, van den Born M, Kroon-Veenboer C, *et al.* Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells. *Cell* 2010; 143(1): 134-44.
- 65 Shroyer NF, Helmrath MA, Wang VY, Antalffy B, Henning SJ, Zoghbi HY. Intestine-specific ablation of mouse atonal homolog 1 (Math1) reveals a role in cellular homeostasis. *Gastroenterology* 2007; 132(7): 2478-88.
- 66 VanDussen KL, Samuelson LC. Mouse atonal homolog 1 directs intestinal progenitors to secretory cell rather than absorptive cell fate. *Dev Biol* 2010; 346(2): 215-23.
- 67 Clevers H. The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment. *Cell* 2013; 154(2): 274-84.
- 68 Farin HF, van Es JH, Clevers H. Redundant sources of Wnt regulate intestinal stem cells and promote formation of Paneth cells. *Gastroenterology* 2012; 143(6): 1518-29.
- 69 Lei NY, Jabaji Z, Wang J, Joshi VS, Brinkley GJ, Khalil H, *et al.* Intestinal subepithelial myofibroblasts support the growth of intestinal epithelial stem cells. *PLoS One* 2014; 9(1): e84651.
- 70 Fritsch C, Swietlicki EA, Lefebvre O, Keding M, Iordanov H, Levin MS, *et al.* Epimorphin expression in intestinal myofibroblasts induces epithelial morphogenesis. *J Clin Invest* 2002; 110(11): 1629-41.

- 71 San Roman AK, Jayewickreme CD, Murtaugh LC, Shivdasani RA. Wnt secretion from epithelial cells and subepithelial myofibroblasts is not required in the mouse intestinal stem cell niche *in vivo*. *Stem Cell Rep* 2014; 2(2): 127-34.
- 72 Kabiri Z, Greicius G, Madan B, Biechele S, Zhong Z, Zaribafzadeh H, *et al.* Stroma provides an intestinal stem cell niche in the absence of epithelial Wnts. *Development* 2014; 141(11): 2206-15.
- 73 Frisén J, Holmberg J, Barbacid M. Ephrins and their Eph receptors: Multitalented directors of embryonic development. *EMBO J* 1999; 18(19): 5159-65.
- 74 Sansom OJ, Reed KR, Hayes AJ, Ireland H, Brinkmann H, Newton IP, *et al.* Loss of *Apc in vivo* immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes Dev* 2004; 18(12): 1385-90.
- 75 Andreu P, Colnot S, Godard C, Gad S, Chafey P, Niwa-Kawakita M, *et al.* Crypt-restricted proliferation and commitment to the Paneth cell lineage following *Apc* loss in the mouse intestine. *Development* 2005; 132(6): 1443-51.
- 76 Batlle E, Henderson JT, Beghtel H, van den Born MM, Sancho E, Huls G, *et al.* β -Catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell* 2002; 111(2): 251-63.
- 77 Holmberg J, Genander M, Halford MM, Anneren C, Sondell M, Chumley MJ, *et al.* EphB receptors coordinate migration and proliferation in the intestinal stem cell niche. *Cell* 2006; 125(6): 1151-63.
- 78 Lopez-Garcia C, Klein AM, Simons BD, Winton DJ. Intestinal stem cell replacement follows a pattern of neutral drift. *Science* 2010; 330(6005): 822-5.
- 79 Schepers AG, Vries R, van den Born M, van de Wetering M, Clevers H. *Lgr5* intestinal stem cells have high telomerase activity and randomly segregate their chromosomes. *EMBO J* 2011; 30(6): 1104-9.
- 80 Ritsma L, Ellenbroek SI, Zomer A, Snippert HJ, de Sauvage FJ, Simons BD, *et al.* Intestinal crypt homeostasis revealed at single-stem-cell level by *in vivo* live imaging. *Nature* 2014; 507(7492): 362-5.
- 81 Walther V, Graham TA. Location, location, location! The reality of life for an intestinal stem cell in the crypt. *J Pathol* 2014; 234(1): 1-4.