

营养对肠道干细胞增殖分化的调节作用

文 敏^{1,2} 贾 刚^{1*} 赵 华¹ 陈小玲¹ 刘光芒¹

(¹四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 肠道上皮细胞功能的发挥依赖于定植在隐窝底部肠道干细胞(intestinal stem cells, ISCs)正常的增殖和分化。ISCs周边细胞及其相关生长因子共同组成了干细胞巢, 调控ISCs的功能。来自于肠腔中的营养素也能够作用于肠道干细胞, 调节肠道干细胞的增殖功能, 从而影响肠道上皮的形态及功能。以Wnt/ β -catenin等为代表的信号转导途径参与了上述调节过程。该文综述了近年来不同营养素对肠道干细胞增殖分化的影响, 为实现肠道干细胞增殖分化的营养调控提供新的思路。

关键词 肠道干细胞; 增殖; 分化; 营养调控; Wnt; mTOR

Regulation Effect of the Nutrition on the Proliferation and Differentiation of the Intestinal Stem Cells

Wen Min^{1,2}, Jia Gang^{1*}, Zhao Hua¹, Chen Xiaoling¹, Liu Guangmang¹

(¹Animal Nutrition Institute, Sichuan Agricultural University, Yaan 625014, China;

²Tibet Vocational Technical College, Lasa 850000, China)

Abstract The function of the intestinal epithelium is depend on the regular proliferation and differentiation of the intestinal stem cells (ISCs) who reside at the base of the crypt. The surrounding cells and their affiliated growth factors constitute the niche for the ISCs, which regulate the function of the ISCs. The nutrients from the gut lumen can also act on the proliferation and differentiation of the ISCs, which may strongly influence the morphology and function of the intestinal epithelium. The Wnt/ β -catenin and many other signal transduction pathways are involved in this regulation process. This paper briefly reviewed the recent progress in how the different nutrients regulate the proliferation and differentiation of the ISCs, providing new ideas about manipulation the proliferation and differentiation of the ISCs by means of nutrition.

Keywords intestinal stem cell; proliferation; differentiation; nutrition regulation; Wnt; mTOR

肠腔内部被肠上皮覆盖, 肠上皮是动物消化吸收营养物质、抵御外来病原侵害、首过代谢的重要组织。定植在隐窝底部的肠道干细胞(intestinal stem cells, ISCs)不断分裂生成新的肠道干细胞或其子代细胞——过渡扩增细胞(transit amplifying cells, TA细胞), TA细胞在离开隐窝底部后不断增殖并分

化为各类成熟肠上皮细胞, 这些细胞相互挤压推动向肠绒毛顶端迁移, 补充绒毛顶端凋亡脱落的肠上皮细胞^[1]。ISCs处于一个复杂的微环境之中, 来自于干细胞巢、肠内营养及微生物代谢产物、内分泌系统等多方面因素协同调节ISCs功能, 维持肠道上皮稳态, 这种稳态的破坏将导致动物营养不良或者肿

收稿日期: 2016-04-20 接受日期: 2016-08-16

教育部博士点基金(批准号: 20125103110011)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: April 20, 2016 Accepted: August 16, 2016

This work was supported by the Doctoral Foundation of Ministry of Education of China (Grant No.20125103110011) 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: 2016-11-15 10:14:47

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20161115.1014.008.html>

瘤的发生。借助新近建立的干细胞标记、诱导谱系示踪(lineage tracing)、类器官(organoid)培养等技术,研究者能更为精准地研究营养物质对于ISCs功能的调节作用,从细胞层面揭示营养对肠道上皮稳态的维持作用以及与营养相关疾病的发生、发展过程。

1 肠道干细胞及其干细胞巢

1.1 肠道干细胞

Barker等^[2]在 *Lgr5-LacZ* (leucine-rich-repeat-containing G-protein-coupled receptor 5- β -galactosidase gene) 和 *Lgr5^{EGFP-ires-CreERT2}* (enhanced green fluorescent protein-internal ribosome entry site-tamoxifen inducible Cre recombinase) 基因敲入报告小鼠上进行了谱系示踪试验,证明了位于隐窝底部的 *Lgr5*⁺CBC细胞(crypt base columnar cell)就是肠道干细胞,它能够自我更新并不断增殖分化为各类肠道上皮细胞。*Lgr5*⁺CBC细胞持续增殖以维持着生理条件下的肠上皮正常的自我更新,而隐窝+4位上还存在一类相对静止的储备ISCs^[3],在*Lgr5*⁺ISCs细胞受到损伤的情况下,+4位ISCs会快速增殖,参与肠上皮修复。两类ISCs均具有分化为各种成熟肠上皮细胞的能力,在一定条件下两类ISCs能够进行相互转化^[4-5]。

ISCs或者隐窝能够被培养,形成具有类似肠道结构的类器官。类器官是由单层细胞组成的海胆样空腔组织,其隐窝状出芽顶端定植着ISCs,其子代细胞——TA细胞延伸汇入由成熟肠上皮细胞组成的类似肠绒毛上皮的中央大空腔中^[6]。相较于单层的肠上皮细胞系,类器官具有以下特征:(1)类器官来自于原代非转化细胞,其体外生物学特性更为接近于在体组织;(2)类器官的绒毛-隐窝结构能够作为指标实时评价营养物质对肠道形态的影响;(3)类器官中ISCs能够分化为各种成熟肠上皮细胞,有利于研究营养物质对ISCs分化过程的影响;(4)类器官具有稳健的生物节律使其更适于作为营养物质对ISCs代谢过程的模型^[7]。鉴于这些生物学特性,类器官被广泛应用于营养物质对ISCs的增殖分化调节、营养及药物吸收和代谢的研究之中^[8-9]。

1.2 肠道干细胞巢

ISCs功能的正常发挥有赖于一个支持性的微环境^[10]。与ISCs紧密连接的潘氏细胞(paneth cells, PCs)、肠上皮肌成纤维细胞(intestinal subepithelial myofibroblasts, ISEMFs)、肠间质细胞(intestinal stromal

cells)等参与了肠道干细胞巢的构建。来自于上述细胞的Wnt、骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)、Notch等信号分子,协同调节ISCs的自我更新、增殖及分化过程^[11-13]。其中,Wnt是ISCs增殖的首要驱动因子,它能够结合到ISCs细胞表面的卷曲蛋白受体(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)上,打散细胞质内由腺瘤性息肉病蛋白(adenomatosis polyposis coli, APC)、脚手架蛋白2(axis inhibition 2, Axin2)、酪氨酸激酶1(casein kinase 1, CK1)和糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 beta, GSK-3 β)等组成的APC破坏复合物(APC destruction complex),抑制APC破坏复合物对 β -联蛋白(β -catenin)磷酸化所引起的分解。 β -catenin转位进入到核内与T细胞因子4(T-cell factor 4, Tcf4)结合后启动靶基因转录,Wnt靶基因包括细胞周期素D1(*cyclin D1*)和原癌基因(cellular Myc, *c-Myc*),二者能驱动细胞增殖的发生^[14]。

2 营养对肠道干细胞增殖分化的调控

2.1 能量

能量限制(calorie restriction, CR)能够显著增加小鼠ISCs数量,但由于TA细胞数量减少,最终引起成熟肠细胞减少和肠绒毛缩短^[15]。CR不能直接影响小鼠ISCs生成类器官的能力,但来自于CR小鼠的PCs与ISCs共培养,能够促进ISCs生成更多的类器官。这表明,CR所引起的ISCs增殖是由PCs所介导。分析其原因发现,CR能够降低PCs磷酸化核糖体蛋白S6[phosphorylated ribosomal protein S6, pS6;是雷帕霉素靶蛋白(mechanistic target of rapamycin, mTOR)激活标志]的含量,抑制或者激活mTOR信号通路能够分别模拟或逆转CR所引起的小鼠ISCs数量增多及其体外生成类器官能力的增强,且CR和雷帕霉素(rapamycin)等抑制mTOR信号通路的处理,对于隐窝或者PCs的作用不具备加性效应。这表明,CR是通过降低PCs的mTOR活力介导其生理作用^[15]。CR未能明显改变PCs的Wnt和Notch的表达,但能促进PCs骨基质抗原1(bone stromal antigen 1, Bst1)的表达^[15]。Bst1能够将NAD⁺转化为环腺苷二磷酸核糖(cyclic ADP ribose, cADPR),cADPR则通过核苷转运蛋白进入响应细胞,激活钙离子信号通道引起内质网中的钙离子释放,促进细胞增殖^[16]。敲减*Bst1*能够降低

CR小鼠隐窝形成类器官的能力, 而外源添加cADPR能够使上述能力得到恢复^[15]。CR有利于ISCs由增殖分化趋向于自我更新, 减少TA细胞的生成数量和及其增殖强度, 在CR条件下保有较大的ISCs库可能有利于其在营养充分时的快速增殖^[15](图1)。

高脂饮食(high-fat diet, HFD)引起的摄食诱导型肥胖(diet-induced obesity, DIO)小鼠血浆中的胰岛素(insulin)和类胰岛素生长因子1(insulin-like growth factor 1, IGF1)以及肠道*IGF1* mRNA水平显著提高, 肠绒毛高度、隐窝密度也显著增加。DIO还能够引起性别决定区Y框蛋白9(sex determining region Y-box 9, Sox9)-EGFP^{Low} ISCs增多、处于S期的ISCs比例增大, 且ISCs扩增与血浆胰岛素水平显著相关^[17]。其他研究也报道, HFD能够引起小鼠肠道CBC干细胞标记分子嗅素蛋白(olfactomedin 4, *Olfm4*)、*Ascl2*(achaete scute-like 2)、*Lgr5*、*Sox9* mRNA上升, 而敲除肠道上皮细胞胰岛素受体能够防止HFD引起的肠道干细胞标记分子mRNA的增加^[18]。HFD也可以通过激活肠道ISCs和TA细胞的过氧化物酶体增殖物激活受体 δ (peroxisome proliferator-activated receptor δ , PPAR δ), 增加小鼠ISCs数量并提升其增殖能力。棕榈酸(HFD主要成分)以及PPAR δ 激动剂处理, 能够显著提高小鼠体内ISCs和TA细胞的数量及二者体外生成类器官的效率, 而敲除肠道PPAR δ 尽管对正常饮食饲喂小鼠ISCs和TA细胞数量及增殖效率未见显著影响, 但由脂肪酸或PPAR δ 激动剂引起的ISCs和TA细胞增加及增殖效率的提高被阻止。研究表明, HFD以及PPAR δ 激动剂能够促进ISCs和TA细胞胞质中的 β -catenin进入到细胞核中, 激活 β -catenin靶基因, 促进细胞增殖甚至肿瘤的发生^[19]。DIO能够显著升高结肠肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF α)的浓度, TNF α 能够诱导GSK-3 β 磷酸化, 降低APC破坏复合物对 β -catenin的磷酸化和降解作用, 增加 β -catenin转位进入细胞核, 继而促进Wnt信号靶基因*c-Myc*和*cyclin D1*的表达, 最终引起结肠干细胞增殖活动的增强^[20](图2)。

mTOR能够通过激活Notch信号改变肠上皮细胞分化趋势, 降低PCs和杯状细胞的数量, 而mTOR和Notch抑制剂能够逆转上述作用^[21]。CR可能通过抑制小鼠肠道mTOR通路增加PCs数量, 增强干细胞巢PCs对ISCs增殖的调节作用^[15]。HFD能够引起小鼠肠道mTOR激活、PCs数量减少^[17,19], ISCs增多可

能是由于长期饲喂HFD能够使ISCs对PCs的依赖性降低, 某些 β -catenin靶基因[如*Jagged1*和*Jagged2*(通常由PCs表达的Notch配体, 能够促进细胞增殖)]在HFD饲喂小鼠的ISCs和TA细胞中表达上调, 暗示这些ISCs和TA细胞能够作为未与PCs接触的ISCs的Notch配体来源, 维持ISCs独立于细胞巢PCs作用的生长^[19]。

2.2 锌

诱导敲除小鼠肠上皮细胞锌转运蛋白4(zinc transporter 4, *ZIP4*)能够引起肠道组织结构及细胞形态的破坏, 肠上皮细胞分裂的减少以及隐窝的发育不良, 最终引起死亡, 类似于人的肠病性肢皮炎(acrodermatitis enteropathica), 通过补充锌能够一定程度上缓解上述过程^[22]。PCs中含有丰富的可移态锌(labile zinc), 锌缺乏或者长时间饥饿能够引起PCs游离锌丢失, 锌螯合剂(dithizone)能够选择性地杀死PCs^[23-24]。敲除*ZIP4*引起PCs中游离锌的减少, 引发PCs的重编程(reprogramming), 降低Sox9和溶菌酶(lysozyme)表达量, 引起杯状细胞黏蛋白(mucin)在PCs中积累^[22]。Sox9能够参与调节小肠上皮细胞增殖和PCs分化并抑制黏蛋白表达, 其表达受到Wnt的调控, *ZIP4*敲除引起的锌水平降低可能通过Wnt信号途径, 参与PCs信号转导^[25-26]。锌能够增加GSK-3 β 磷酸化水平, 造成Wnt信号通路负调控因子APC破坏复合物失活, 引起 β -catenin富集并增强其转位进入核中^[27-28]; 但由于敲除*ZIP4*引起的PCs可移态锌丢失能够降低GSK-3 β 磷酸化水平, 加快 β -catenin周转, 减少Sox9表达, 引起PCs的重编程^[22]。

通常pS6只存在于肠绒毛顶端的肠细胞, 在隐窝中弱染色。肠上皮*ZIP4*被诱导敲除后, pS6逐渐在肠绒毛顶端消失, 并在隐窝中表达增强。这表明, *ZIP4*敲除后肠绒毛上皮细胞蛋白质的合成快速降低, 进而引起肠绒毛的形态学破坏^[22]。敲除*ZIP4*引起肠道IGF1表达增加, 能够激活隐窝mTOR信号, 增强隐窝细胞蛋白质合成, 而mTOR在隐窝中的激活可能只是隐窝发育不良引起的补偿反应^[29], 由于ISCs的 β -catenin信号受损, 并不能引起ISCs分裂的增加^[22], PCs重编程引起的细胞巢功能损伤也能进一步影响ISCs功能的正常发挥^[11,22]。

2.3 维生素D₃

维生素D₃(1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃, VD₃)能够通过抑制Wnt信号通路控制肿瘤的发生^[30]。长期

饲喂高脂、低钙、低VD₃日粮(new western diet 1, NWD1)容易引发小鼠散发型肠道肿瘤^[31]。NWD1还能够引起很多问题,例如:(1)小肠绒毛和结肠隐窝中Wnt信号激活水平提升,范围扩大;(2)肠道上皮细胞吸收型细胞标记表达增加而分泌型细胞标记降低;(3)小肠绒毛和结肠隐窝中PCs细胞标记异位表达^[32-33]。这些由NWD1日粮诱发的促肿瘤效应,能够通过提高饮食中VD₃和钙水平得到控制。

相较于常规AIN76A(American institute of nutrition 76A)日粮饲喂小鼠,饲喂NWD1小鼠的肠道Lgr5⁺ISCs数量及其增殖活力显著降低;饲喂补充VD₃和Ca后的NWD1的小鼠肠道Lgr5⁺ISCs数量及增殖活力表现正常;饲喂小鼠NWD1只有血清VD₃显著降低。这暗示,VD₃对于Lgr5⁺ISCs正常功能的发挥具有重要作用。敲除Lgr5⁺ISCs上维生素D受体(vitamin D receptor, *VDR*)后,隐窝底部Lgr5⁺ISCs增殖活力降低^[34]。上述结果表明,只有在日粮中含有较高水平的VD₃并且Lgr5⁺ISCs的VDR信号通路未受破坏的情况下,Lgr5⁺ISCs的增殖功能才能得以正常的发挥。Lgr5⁺ISCs的生物学功能及其在肿瘤发育过程中的作用受到日粮组成的影响,而对于那些在低VD₃水平下易发生结肠肿瘤的个体而言,Lgr5⁺ISCs可能没有发挥其在常规日粮条件下维持肠上皮稳态或者在肿瘤发生中那样的主导作用^[34]。在低VD₃日粮饲喂条件下,储备ISCs或者PCs可能重新进入细胞周期,获得干细胞活力,参与维持肠上皮稳态和肿瘤的发生^[34]。

2.4 谷氨酰胺

谷氨酰胺(glutamine, Gln)是肠上皮细胞增殖和生长的重要能量来源^[35]。饮水中添加丙氨酰谷氨

酰胺二肽(alanyl-glutamine, Ala-Gln)能够防止由于日粮营养不足(低蛋白低脂肪)引起的小鼠空肠隐窝减少。相较于其他非必需氨基酸[丙氨酸(alanine)、天冬氨酰(asparagine)、谷氨酸(glutamate)、甘氨酸(glycine)、丝氨酸(serine)],在培养基中补充Gln或Ala-Gln能够显著加快类器官上隐窝状出芽结构的生成速率,去除Gln能够引起类器官隐窝状出芽结构的萎缩和细胞增殖减少,再次补充Gln能够激活mTOR信号通路、恢复细胞增殖和促进隐窝再生^[7]。

2.5 细菌代谢产物

胞壁酰二肽(muramyl dipeptide, MDP)能够在氧化应激条件下促进小鼠Lgr5⁺ISCs增殖、防止凋亡。这一保护作用是由Lgr5⁺ISCs模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)核苷酸结合寡聚化结构域蛋白2(nucleotide-binding oligomerization 2, Nod2)所介导的^[36]。Lgr5⁺ISCs胞质中Nod2水平远高于PCs,Lgr5⁺ISCs Nod2被MDP激活后,产生强烈的细胞保护作用以对抗氧化应激引起的细胞凋亡。无论PCs是否参与培养,MDP均能促进野生型Lgr5⁺ISCs增殖生成类器官,但对Nod2敲除型Lgr5⁺ISCs无上述作用。这表明,MDP促进Lgr5⁺ISCs生成类器官的作用仅仅依赖于自身的Nod2,而非通过PCs介导^[36]。Nod2敲除型小鼠表型正常,提示在肠道稳态条件下,细菌可能未对ISCs发挥有益作用,但在肠道受损情况下,微生物可以通过MDP对ISCs起到保护作用,防止氧化应激引起的死亡^[36]。

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)作为TLR4(toll-like receptor 4)激活剂,能够引起小鼠Lgr5⁺ISCs或者类器官增殖降低,细胞凋亡增加,而敲除小鼠Lgr5⁺ISCs

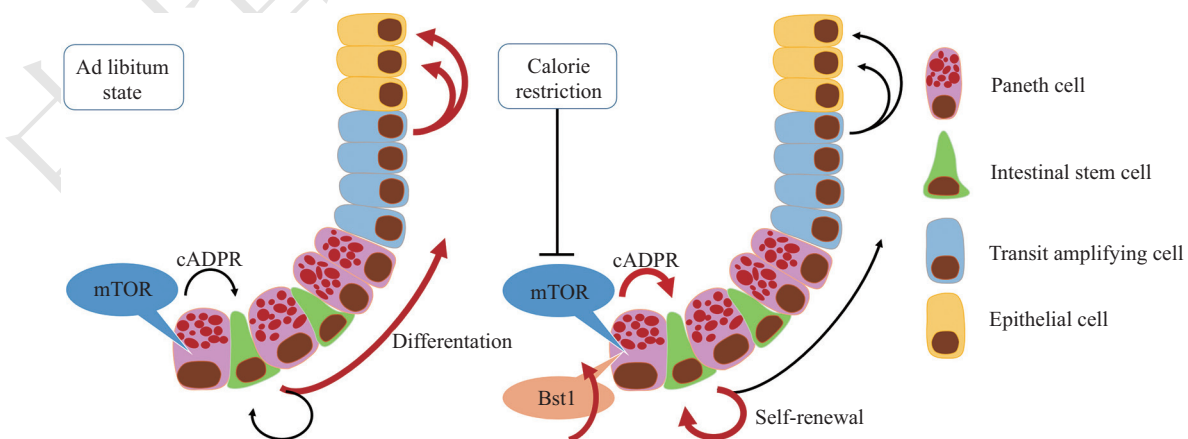


图1 能量限制促进ISCs自我更新(根据参考文献[15]修改)

Fig.1 Calorie restriction facilitate the self-renewal of ISC (modified from reference [15])

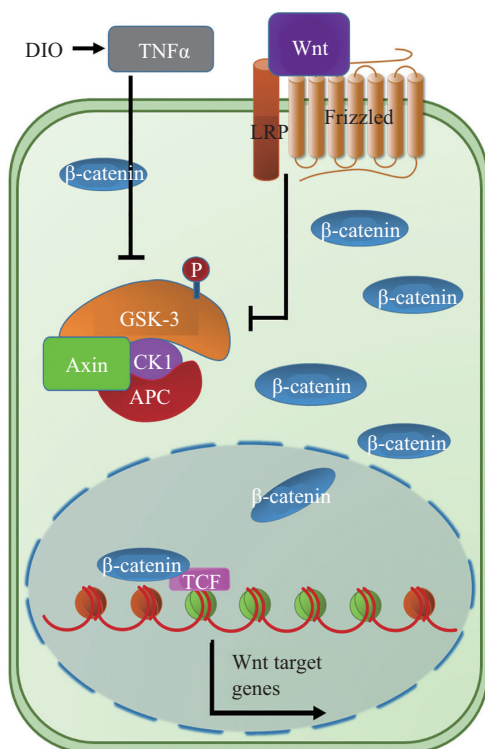


图2 高脂饮食通过TNFα激活ISCs Wnt信号通路

Fig.2 High fat diet activate the Wnt signaling pathway of intestinal stem cells through TNFα

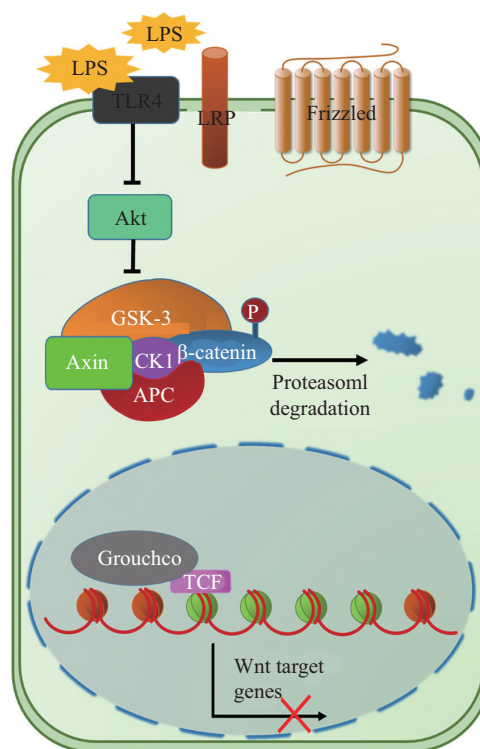


图3 TLR4介导LPS引起的ISCs β-catenin降解

Fig.3 TLR4 mediate the LPS induced β-catenin degradation of intestinal stem cells

TLR4后, LPS处理未能影响其凋亡和增殖^[37]。早期研究中也发现, LPS处理能够激活TLR4, 显著影响新生小鼠回肠细胞的增殖, 但LPS对TLR4敲减型小鼠肠细胞或TLR4突变型肠细胞却无增殖抑制作用, 而激活β-catenin能够逆转上述现象。TLR4激活能够引起新生小鼠回肠上皮细胞蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)磷酸化水平降低, Akt是GSK-3β上游的负调控因子, Akt去磷酸化后降低了其对GSK-3β磷酸化作用, 使GSK-3β的激酶活力增强导致β-catenin被磷酸化后降解, 最终表现为肠细胞增殖活力降低^[38](图3)。但在另一试验中, 小鼠肠上皮细胞过量表达TLR4能够引起Wnt/β-catenin信号通路激活, 促进结肠上皮细胞增殖、隐窝加深、Lgr5⁺细胞异位扩增, 并逐渐发展为肿瘤^[39]。不同的研究结果可能源自于动物模型的差异, 前者小鼠经注射LPS引起猛烈的宿主免疫反应, 而后者未受外源LPS刺激, 仅仅是TLR4的过表达还不足以引发剧烈的免疫应激^[40]。

上述研究证明, ISCs能够表达TLR4和Nod2等模式识别受体并被配体激活, 但二者的表现出完全相反的效应, LPS能够激活TLR4诱发ISCs死亡, 而MDP激活Nod2表现出对ISCs的细胞保护作用。在

肠道中两类细菌产物都存在, 只是浓度不同, 各自按照自身的浓度抵消对方的作用^[40]。

3 结语与展望

肠道上皮组织稳态有赖于ISCs保持自我更新(维持干细胞库)和分化为子代细胞(TA细胞并最终分化为各类成熟肠上皮细胞)之间的动态平衡。现有研究表明, ISCs与肠道内容物紧密接触, 受到营养成分的直接调控。营养素除了通过mTOR等经典营养感受器进行信号整合调控ISCs增殖分化, 也可能通过其他特异性受体传递到Wnt/β-catenin信号通路发挥调节作用, GSK-3β作为重要的调控因子参与了mTOR和Wnt信号的互作^[41-42]。进入体内的养分能够引起内分泌的变化继而影响ISC功能以及肠道形态和功能。例如, 胰岛素能在多水平上促进Wnt靶基因表达, 它能将PAK-1(p-21-activated protein kinase-1)磷酸化使其激活, 增强β-catenin核转位并结合到c-Myc启动子上, 促进肠上皮细胞增殖^[43-44]。而IGFBP-3(insulin-like growth factor binding protein-3)能够通过其受体TMEM219(transmembrane protein 219), 增强结肠ISCs生成类器官的促凋亡基因、降低抗凋亡基

因的表达,促进结肠干细胞凋亡^[45-46]。

ISCs受到来自于干细胞巢、肠道养分及微生物产物、内分泌、免疫系统^[47]等多方面因素的作用,这些因素共同影响肠道的形态及功能的发挥,在研究营养素对ISCs影响的过程中也需要充分考虑到其他因素的互作效应。目前,关于营养素对ISCs的调节过程的研究仍不够充分,已被研究的营养素种类还比较有限,且多建立在极端病理条件下,缺少更为精准的剂量学效应,营养素之间的互作效应也未被考虑,通过营养所介导的肠上皮与其他器官之间的交互效应仍待进一步研究。现有实验多以转基因小鼠、体外培养的组织器官为研究模型,与动物的正常营养代谢过程仍然存在一定差异。如何将现有的研究成果应用于动物生产、人的营养实践仍有待进一步探讨。

参考文献 (References)

- Clevers H. The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment. *Cell* 2013; 154(2): 274-84.
- 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.
- Sangiorgi E, Capecchi MR. *Bmi1* is expressed *in vivo* in intestinal stem cells. *Nat Genet* 2008; 40(7): 915-20.
- 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.
- Norifumi Takeda RJ. Interconversion between intestinal stem cell populations in distinct niches. *Science* 2011; 334(6061): 1420-4.
- 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.
- Moore SR, Guedes MM, Costa TB, Vallance J, Maier EA, Betz KJ, *et al.* Glutamine and alanyl-glutamine promote crypt expansion and mTOR signaling in murine enteroids. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2015; 308(10): G831-39.
- Sato T, Clevers H. Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: Mechanism and applications. *Science* 2013; 340(6137): 1190-4.
- Lancaster MA, Knoblich JA. Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. *Science* 2014; 345(6194): 1247125.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 2006; 127(3): 469-80.
- 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.
- Podesta M, Benvenuto F, Pitto A, Figari O, Bacigalupo A, Bruzzone S, *et al.* Concentrative uptake of cyclic ADP-ribose generated by BST-1+ stroma stimulates proliferation of human hematopoietic progenitors. *J Biol Chem* 2005; 280(7): 5343-9.
- Mah AT, Van Landeghem L, Gavin HE, Magness ST, Lund PK. Impact of diet-induced obesity on intestinal stem cells: Hyperproliferation but impaired intrinsic function that requires insulin/IGF1. *Endocrinology* 2014; 155(9): 3302-14.
- Andres SF, Santoro MA, Mah AT, Keku JA, Bortvedt AE, Blue RE, *et al.* Deletion of intestinal epithelial insulin receptor attenuates high-fat diet-induced elevations in cholesterol and stem, enteroendocrine, and Paneth cell mRNAs. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2015; 308(2): G100-11.
- Beyaz S, Mana MD, Roper J, Kedrin D, Saadatpour A, Hong SJ, *et al.* High-fat diet enhances stemness and tumorigenicity of intestinal progenitors. *Nature* 2016; 531(7592): 53-8.
- Liu Z, Brooks RS, Ciappio ED, Kim SJ, Crott JW, Bennett G, *et al.* Diet-induced obesity elevates colonic TNF-alpha in mice and is accompanied by an activation of Wnt signaling: A mechanism for obesity-associated colorectal cancer. *J Nutr Biochem* 2012; 23(10): 1207-13.
- Zhou Y, Rychahou P, Wang Q, Weiss HL, Evers BM. TSC2/mTORC1 signaling controls Paneth and goblet cell differentiation in the intestinal epithelium. *Cell Death Dis* 2015; 6: e1631.
- Geiser J, Venken K, De Lisle RC, Andrews GK. A mouse model of acrodermatitis enteropathica: Loss of intestine zinc transporter ZIP4 (*Slc39a4*) disrupts the stem cell niche and intestine integrity. *PLoS Genet* 2012; 8(6): e1002766.
- Elmes ME. The Paneth cell population of the small intestine of the rat-effects of fasting and zinc deficiency on total count and on dithione-reactive count. *J Pathol* 1976; 118(3): 183-91.
- Sawada M, Takahashi K, Sawada S, Midorikawa O. Selective killing of Paneth cells by intravenous administration of dithione in rats. *Int J Exp Pathol* 1991; 72(4): 407.
- Blache P, van de Wetering M, Duluc I, Domon C, Berta P, Freund JN, *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.
- van Es JH, Jay P, Gregorieff A, van Gijn ME, Jonkhoeer S, Hatzis P, *et al.* Wnt signalling induces maturation of Paneth cells in intestinal crypts. *Nat Cell Biol* 2005; 7(4): 381-6.
- An WL, Bjorkdahl C, Liu R, Cowburn RF, Winblad B, Pei JJ. Mechanism of zinc-induced phosphorylation of p70S6 kinase and glycogen synthase kinase 3beta in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Neurochem* 2005; 92(5): 1104-15.

- 28 McClung JP, Tarr TN, Barnes BR, Scrimgeour AG, Young AJ. Effect of supplemental dietary zinc on the mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway in skeletal muscle and liver from post-absorptive mice. *Biol Trace Elem Res* 2007; 118(1): 65-76.
- 29 Inoki K, Kim J, Guan KL. AMPK and mTOR in cellular energy homeostasis and drug targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2012; 52: 381-400.
- 30 Larriba MJ, Gonzalez-Sancho JM, Barbachano A, Niell N, Ferrer-Mayorga G, Munoz A. Vitamin D is a multilevel repressor of Wnt/b-Catenin signaling in cancer cells. *Cancers (Basel)* 2013; 5(4): 1242-60.
- 31 Newmark H, Yang K, Lipkin M, Kopelovich L, Liu Y, Fan K, *et al.* A Western-style diet induces benign and malignant neoplasms in the colon of normal C57Bl/6 mice. *Carcinogenesis* 2001; 22(11): 1871-5.
- 32 Yang K, Kurihara N, Fan K, Newmark H, Rigas B, Bancroft L, *et al.* Dietary induction of colonic tumors in a mouse model of sporadic colon cancer. *Cancer Res* 2008; 68(19): 7803-10.
- 33 Wang D, Peregrina K, Dhima E, Lin EY, Mariadason JM, Augenlicht LH. Paneth cell marker expression in intestinal villi and colon crypts characterizes dietary induced risk for mouse sporadic intestinal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(25): 10272-7.
- 34 Peregrina K, Houston M, Daroqui C, Dhima E, Sellers RS, Augenlicht LH. Vitamin D is a determinant of mouse intestinal Lgr5 stem cell functions. *Carcinogenesis* 2015; 36(1): 25-31.
- 35 Nakajo T, Yamatsuji T, Ban H, Shigemitsu K, Haisa M, Motoki T, *et al.* Glutamine is a key regulator for amino acid-controlled cell growth through the mTOR signaling pathway in rat intestinal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 326(1): 174-80.
- 36 Nigro G, Rossi R, Commere PH, Jay P, Sansonetti PJ. The cytosolic bacterial peptidoglycan sensor Nod2 affords stem cell protection and links microbes to gut epithelial regeneration. *Cell Host Microbe* 2014; 15(6): 792-8.
- 37 Neal MD, Sodhi CP, Jia H, Dyer M, Egan CE, Yazji I, *et al.* Toll-like receptor 4 is expressed on intestinal stem cells and regulates their proliferation and apoptosis via the p53 up-regulated modulator of apoptosis. *J Biol Chem* 2012; 287(44): 37296-308.
- 38 Sodhi CP, Shi XH, Richardson WM, Grant ZS, Shapiro RA, Prindle T, *et al.* Toll-like receptor-4 inhibits enterocyte proliferation via impaired β -catenin signaling in necrotizing enterocolitis. *Gastroenterology* 2010; 138(1): 185-96.
- 39 Santaolalla R, Sussman DA, Ruiz JR, Davies JM, Pastorini C, Espana CL, *et al.* TLR4 activates the beta-catenin pathway to cause intestinal neoplasia. *PLoS One* 2013; 8(5): e63298.
- 40 Nigro G, Sansonetti PJ. Microbiota and gut stem cells cross-talks: A new view of epithelial homeostasis. *Curr Stem Cell Rep* 2015; 1(1): 48-52.
- 41 McCubrey JA, Steelman LS, Bertrand FE, Davis NM, Abrams SL, Montalto G, *et al.* Multifaceted roles of GSK-3 and Wnt/beta-catenin in hematopoiesis and leukemogenesis: Opportunities for therapeutic intervention. *Leukemia* 2014; 28(1): 15-33.
- 42 Inoki K, Ouyang H, Zhu T, Lindvall C, Wang Y, Zhang X, *et al.* TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell* 2006; 126(5): 955-68.
- 43 Sun J, Khalid S, Rozakis-Adcock M, Fantus IG, Jin T. P-21-activated protein kinase-1 functions as a linker between insulin and Wnt signaling pathways in the intestine. *Oncogene* 2009; 28(35): 3132-44.
- 44 Sun J, Wang D, Jin T. Insulin alters the expression of components of the Wnt signaling pathway including TCF-4 in the intestinal cells. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1800(3): 344-51.
- 45 Baxter RC. Insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3): Novel ligands mediate unexpected functions. *J Cell Commun Signal* 2013; 7(3): 179-89.
- 46 D'Addio F, La Rosa S, Maestroni A, Jung P, Orsenigo E, Nasr MB, *et al.* Circulating IGF-I and IGFBP3 levels control human colonic stem cell function and are disrupted in diabetic enteropathy. *Cell stem cell* 2015; 17(4): 486-98.
- 47 Hanash AM, Dudakov JA, Hua G, O'Connor MH, Young LF, Singer NV, *et al.* Interleukin-22 protects intestinal stem cells from immune-mediated tissue damage and regulates sensitivity to graft versus host disease. *Immunity* 2012; 37(2): 339-50.