



小肠干细胞的命运调控

亓振, 陈晔光*

清华大学生命科学学院, 生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 清华大学-北京大学生命科学联合中心, 北京 100084

* 联系人, E-mail: ygchen@tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2014-08-26; 接受日期: 2014-09-12

国家自然科学基金(批准号: 31330049, 31221064)和国家重点基础研究发展计划(批准号: 2011CB943803, 2011CBA01104, 2010CB833706)资助项目

doi: 10.1360/052014-135

摘要 小肠上皮具有快速更新的能力, 是研究成体干细胞理想系统. 小肠上皮由绒毛和隐窝两部分组成, 而位于小肠隐窝底部的小肠干细胞是其持续更新的源泉. 近年来, 以 Lgr5 为代表的小肠干细胞标记物的发现、Lgr5+小肠干细胞的分离培养和多种转基因小鼠模型的出现, 极大地促进了对小肠干细胞自我更新和分化调控的研究, 使得人们可以更加深入地认识小肠干细胞命运决定的分子机制. 本文简要综述了近年来人们对 Wnt, BMP, Notch 和 EGF 等信号如何在小肠干细胞命运调控中发挥作用的认知.

关键词

小肠干细胞
Wnt
BMP
Notch
EGF
命运调控

肠道系统的主要功能是消化食物、吸收营养成分和抵御外源致病微生物的入侵. 与这些功能相适应, 小肠上皮是成体哺乳动物中更新速度最快的器官^[1], 在小鼠中整个肠道上皮每 4~5 天就全部更新一次^[2]. 这种持续的更新是由特殊的成体干细胞——小肠干细胞(intestinal stem cell)驱动的.

1 小肠干细胞及其标记物

小肠上皮是由大量重复的、持续自我更新的隐窝-绒毛(crypt-villus)单元组成的(图 1)^[3], 每个绒毛的基部围绕着多个内陷的结构——隐窝(crypt of Lieberkühn). 隐窝是由小肠干细胞及其后代组成的增殖区域, 而绒毛是由各种特化细胞组成的分化区域. 小肠干细胞位于隐窝的底部, 在自我更新的同时, 产生过渡扩增细胞(TA 细胞, transit amplifying cell)^[4]. TA 细胞会快速分裂并逐渐向上迁移, 与此同时分化

成吸收型和分泌型两大类细胞. 前者特指肠上皮细胞(enterocyte), 而后者主要包括潘氏细胞(paneth cell)、杯状细胞(goblet cell)和肠内分泌细胞(enteroendocrine cell). 由 TA 细胞分化形成的潘氏细胞是向下迁移至隐窝底部的, 而肠上皮细胞、杯状细胞和肠内分泌细胞在向上迁移的过程中逐渐成熟, 到达绒毛顶端时便会发生凋亡, 脱落入肠腔^[5,6].

在过去 40 年间, 关于小肠干细胞在隐窝内的具体定位, 主要形成了两种观点. 第一种观点是“干细胞域”假说, 最早是由 Cheng 等人^[7,8]在 1974 年提出的, 另外一种“+4 位干细胞”假说, 是由 Potten 等人^[9]在 1978 年提出的. “干细胞域”假说认为小肠干细胞是位于隐窝底部、镶嵌在潘氏细胞中间的隐窝基部柱状细胞(CBC 细胞, crypt base columnar cell), CBC 细胞与潘氏细胞一起在隐窝底部形成了一个干细胞域, 离开此域的细胞即会开始分化^[10,11]. 而“+4 位干细胞”假说认为, 小肠干细胞位于+4 位(从隐窝底部算

引用格式: 亓振, 陈晔光. 小肠干细胞的命运调控. 中国科学: 生命科学, 2014, 44: 975–984

Qi Z, Chen Y G. Regulation of intestinal stem cell fate. SCIENTIA SINICA Vitae, 2014, 44: 975–984, doi: 10.1360/052014-135

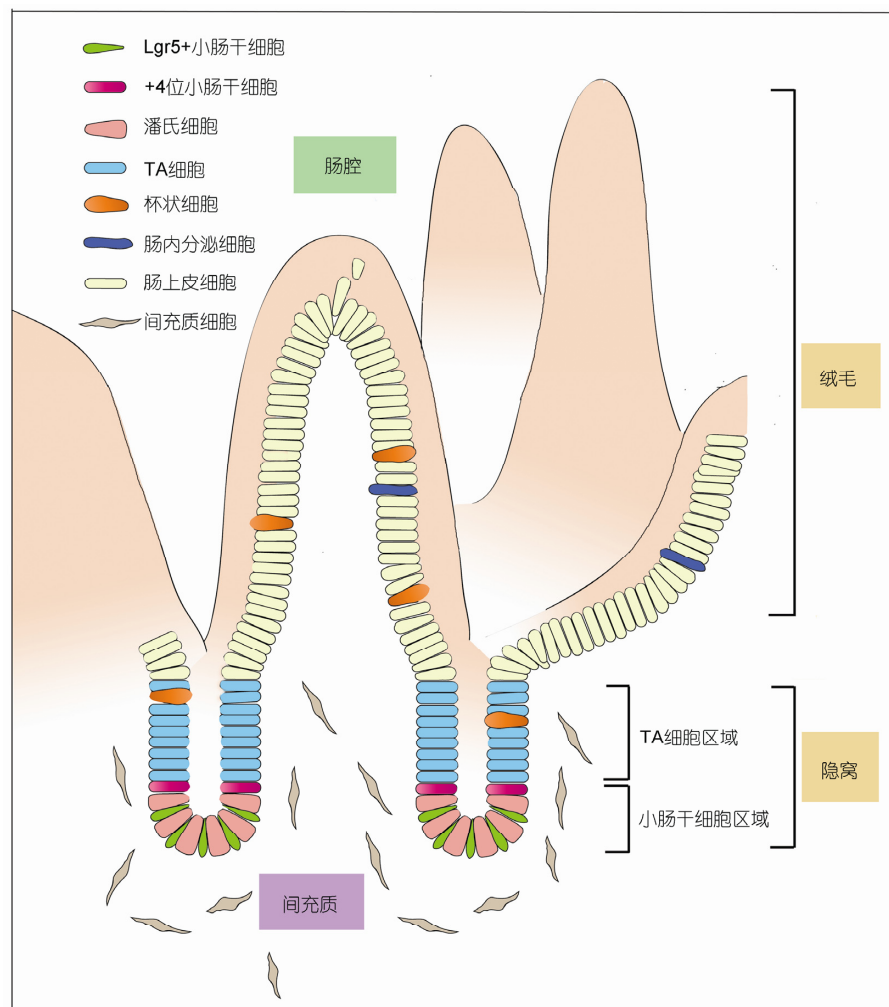


图1 小肠上皮及小肠干细胞模式图

小肠上皮是由大量绒毛和隐窝组成的。Lgr5+小肠干细胞位于隐窝底部，镶嵌分布于潘氏细胞中间，+4位干细胞位于潘氏细胞之上。基底膜、潘氏细胞及周边间充质细胞一起构成了小肠干细胞的微环境。Lgr5+小肠干细胞在自我更新的同时，形成TA细胞，TA细胞快速增殖，分化成潘氏细胞、杯状细胞、肠内分泌细胞和肠上皮细胞等各种小肠特化细胞。其中新分化形成的潘氏细胞会转而向下迁移至隐窝底部，其他特化细胞在向上迁移的过程中逐渐成熟，到达绒毛顶端后发生凋亡，脱落入肠腔。

起的第4个细胞位置，位于潘氏细胞之上)。他们发现这些+4位细胞分裂时，DNA链不对称分离，因此存在DNA标记滞留现象，这与Cairns^[12]在1975年提出的成体干细胞中存在永生DNA链的假说相符，即在成体干细胞中，每条染色体都由永生DNA链和新生DNA链组成，在细胞分裂产生一个新的干细胞(自我更新)和一个即将分化的细胞时，包含永生DNA链的一整套染色体全部分配到新的干细胞中。然而，由于缺乏特异性的干细胞标记物，人们对这两种观点的争议从未间断。直到2007年，第一个小肠干细胞特异的标记物Lgr5(leu-rich-repeat-containing G-protein-

coupled receptor 5)才得到鉴定，自此以后，小肠干细胞的研究得到了迅速发展。

1.1 Lgr5 标记的 CBC 细胞

Wnt 信号是驱动隐窝增殖的主要信号之一^[13]，因此 Wnt 信号通路的靶基因很有可能会标记出小肠干细胞的位置。荷兰科学家 Hans Clevers 研究组利用基因芯片揭示出了人结肠癌细胞系里 Wnt 靶基因表达谱^[14]。在后续的研究中，他们发现其中一个基因 Lgr5 的表达特异性地定位到 CBC 细胞中。在 Lgr5-LacZ 和 Lgr5^{EGFP-ires-CreERT2} 基因敲入的报告小鼠中，

可以明确地观察到 *Lgr5* 特异性地标记出了 CBC 细胞. 随后, 利用谱系追踪(lineage tracing)实验, 明确表明了 *Lgr5* 标记的 CBC 细胞是一类小肠干细胞. 在谱系追踪实验中, 首先标记出单个的 *Lgr5* 的 CBC 细胞, 使其表达 *LacZ*, 此后, 该细胞及其所有的后代都将一直表达 *LacZ*. 利用此方法, 他们发现单个标记出的 *Lgr5* 阳性的 CBC 细胞在进行自我更新的同时, 能分化成 4 种不同类型的特化细胞^[15]. 此外, 单个 *Lgr5* 阳性的 CBC 细胞在体外可以形成小肠类器官, 其中 *Lgr5* 阳性细胞在自我更新的同时, 可以分化成各种类型的特化细胞^[16]. 这些实验明确地表明了 *Lgr5* 标记的 CBC 细胞是小肠干细胞.

对流式分选出的 *Lgr5* 小肠干细胞的基因表达谱的分析, 又揭示出了一系列其他的特异性的小肠干细胞标记基因. 作为 *Wnt* 靶基因的 *Ascl2*(achaete-scute complex homolog 2), 能够特异性地标记出 CBC 细胞, 并且它是小肠干细胞命运决定中最关键的转录因子之一^[17]. 此外, *Olfm4*(olfactomedin 4)也是一个非常特异的小肠干细胞标记物基因^[18]. 到目前为止, *Lgr5* 标记的 CBC 细胞是最为公认的小肠干细胞.

1.2 *Bmi1* 标记的+4 位细胞

在过去的几十年间, 也有大量的研究试图探寻 Potten 等人提出的“+4 位干细胞”. *Bmi1*(*bmi1* polycomb ring finger oncogene)是第一个利用谱系追踪实验鉴定的+4 位干细胞的标记物. *Bmi1* 标记的细胞主要定位在+4 位置, 并且可以分化成各种不同类型的特化细胞^[19]. *Bmi1* 标记的+4 类细胞是一类相对静止的、抵御损伤的干细胞, 在肠道受到辐射后会大量增殖以弥补 *Lgr5* 标记的 CBC 细胞的损失^[20]. *mTert*(telomerase reverse transcriptase)^[21], *Hopx*(*hop* homeobox)^[22] 和 *Lrig1*(leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1)^[23]也被报道可以标记+4 位的干细胞. 然而, 随后的研究表明, *Lgr5* 阳性的 CBC 细胞也会大量表达上述的几种标记物, 这使得“+4 位干细胞”理论更具复杂性. “+4 位干细胞”的身份仍待研究.

关于小肠干细胞身份, 目前较为公认的是一种可塑性理论, 即小肠隐窝内确实存在两类干细胞: *Lgr5* 标记的 CBC 细胞(活跃的小肠干细胞, 负责小肠上皮的日常更新)和储备干细胞(相对静止的“+4 位干细胞”, 负责损伤后的修复), 且两种类型的细胞在特

定条件下可以相互转化^[24].

2 调控小肠干细胞命运的信号

尽管目前对于小肠干细胞身份的确定仍有争议, 但有一点是人们普遍认可的: 小肠干细胞处于特定的微环境中, 其中, *Wnt*, 骨形成蛋白(bone morphogenetic protein, BMP), *Notch* 和表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)等信号共同调控了小肠干细胞的命运, 即自我更新、增生和分化(图 2).

2.1 小肠干细胞的微环境

小肠干细胞生活在由邻近的小肠细胞、隐窝周边间充质细胞和基底膜组成的微环境中, 该微环境向小肠干细胞提供包括 EGF, *Wnt*, BMP 和 *Notch* 在内的多种信号, 使其维持自我更新、增殖和分化的能力^[25]. 近年来, 潘氏细胞在小肠微环境中的地位日益受到关注. 在隐窝底部, 每个 *Lgr5* 小肠干细胞都与潘氏细胞相互接触, 而潘氏细胞分泌的 EGF, *Wnt3a* 和 *Notch* 等信号配体在小肠干细胞的维持中发挥着重要的作用^[26-28].

2.2 *Wnt* 信号

在小肠隐窝-绒毛轴中, *Wnt* 信号存在梯度递减性, *Wnt* 信号强度高的隐窝部位对应着小肠干细胞区域及增殖细胞所在位置, 而 *Wnt* 信号强度低的绒毛部位对应着分化细胞所在的位置^[29]. 在小肠干细胞微环境中, *Wnt* 配体主要由小肠上皮细胞和隐窝周边间充质细胞分泌^[30,31], 其中, 潘氏细胞分泌的 *Wnt3a* 是 *Wnt* 配体的主要来源^[27].

Wnt 信号通路是一条保守的信号通路, 参与调控了一系列胚胎发育过程以及成体干细胞的自我维持过程^[32]. 在经典 *Wnt* 信号通路中, 当没有 *Wnt* 配体时, 由 *Axin2*(axis inhibition 2), APC(adenomatous polyposis coli), 酪氨酸激酶 1(casein kinase 1, CK1)和糖合成酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase 3 beta, GSK3 β)等组成的降解复合体会促使 β -catenin 的降解, 使其不能进入细胞核. 而当 *Wnt* 配体结合到 Frizzled 受体和低密度脂蛋白受体相关蛋白(LRP)受体后, 降解复合体被打散, β -catenin 进入细胞核与 Tcf(T-cell-specific transcription factor)等转录因子结合, 共同起始 *Wnt* 靶基因的转录^[33].

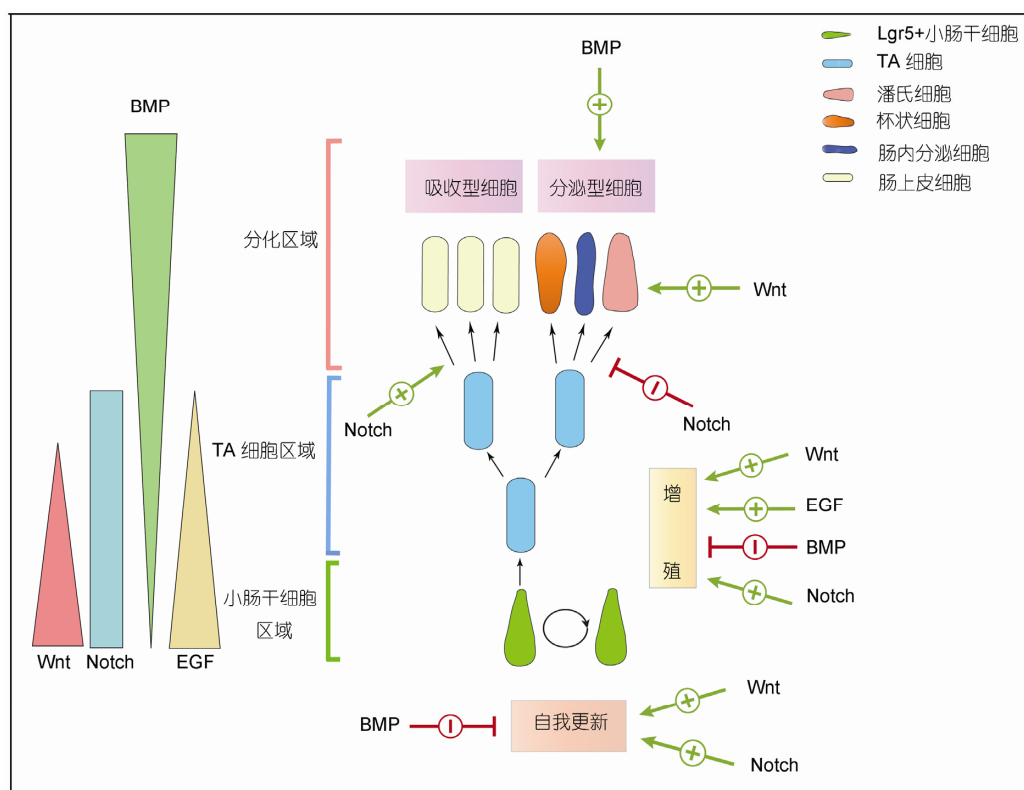


图 2 影响小肠干细胞命运的信号

在小肠上皮隐窝-绒毛轴上, Wnt, Notch, BMP 和 EGF 四条信号通路的活性呈梯度分布, 例如 Wnt 信号通路在隐窝-绒毛轴上逐渐减少. 四条信号通路共同调控着小肠干细胞的命运决定: 自我更新、增殖和分化. 其中, Notch 和 Wnt 信号通路协同促进小肠干细胞自我更新, 而 BMP 信号通路抑制其自我更新; Wnt, Notch, EGF 信号共同促进其增殖, 而 BMP 信号起到抑制作用; 在 TA 细胞区域, Notch 信号在分泌型、吸收型细胞分化决定中起关键作用(抑制分泌型细胞分化, 促进吸收型细胞分化); Wnt 信号促进潘氏细胞的形成, BMP 信号促进分泌型细胞的终末成熟

在小肠中, Wnt 信号维持了小肠干细胞的自我更新和增殖. 在上世纪 90 年代, 人们发现大多数结直肠癌都携带了 APC 基因的突变^[34,35], 而 APC 基因是 Wnt 信号通路的一个关键负调控因子. 在另外一些非 APC 突变的结直肠癌中, 大都携带了 β -catenin 的激活型突变^[36], 而 β -catenin 是 Wnt 信号通路最主要的下游效应因子. 因此, Wnt 信号通路的过度激活与结直肠癌的发生有着紧密的联系, 同时也提示了在小肠上皮的正常更新中 Wnt 信号通路可能也扮演了重要的角色. 第一个直接的证据来自于小肠上皮特异性 *Tcf712*(编码 Tcf4 蛋白, T-cell-specific transcription factor 4)基因敲除的小鼠^[13,37]. 当 *Tcf712* 在小肠上皮中特异性的敲除之后, 小鼠在出生后不久即会死亡. 新生小鼠的肠上皮中不存在增生区域, 而正常情况下, 此增生区域在小鼠出生后会形成隐窝. *Dkk1*

(*dickkopf Wnt signaling pathway inhibitor 1*)是 Wnt 信号通路的抑制因子, 在肠道中过表达 *Dkk1* 后, 也无法形成肠上皮中的增生区域^[38]. 因此, Wnt 信号通路对于小肠干细胞区域的形成是必需的. 而此后的研究也表明, Wnt 信号对于形成之后的小肠干细胞区域的维持是必需的. 在利用病毒感染成体小鼠使其过表达 *Dkk1*^[39]、小肠上皮特异性诱导敲除 *Ctnnb1* 基因(编码 β -catenin 蛋白)的实验中, 都观察到了小肠上皮中隐窝增殖细胞和干细胞区域的消失, 以及整个肠道上皮自我更新的破坏^[40]. 与之一致的是, 当 Wnt 信号的其中一个靶基因 *c-Myc* 在小肠上皮中特异性诱导敲除后, 会迅速导致小肠隐窝的消失^[41]. 相反, Wnt 信号的过度激活会导致小肠上皮隐窝增殖细胞的增多和干细胞区域的扩大, 进而导致结直肠癌. 在 *Apc* 基因敲除的小鼠^[42,43]和小肠特异性激活型

β -catenin 表达的小鼠^[44]中, 都会观察到结直肠癌的形成. 在小肠上皮中诱导表达 Wnt 激动剂 R-spondin 会迅速导致小肠上皮的过度增殖^[45]. *Rnf43* (ring finger protein 43) 和 *Znrf3* (zinc and ring finger 3) 是在小肠干细胞中特异表达的两个功能相近的 Wnt 靶基因, 这两个基因编码跨膜泛素 E3 连接酶, 会导致 Wnt 受体 Frizzled 的降解^[46]. 小肠上皮特异性诱导敲除这两个基因后, 会迅速导致干细胞区域的扩大和 Ki67 阳性增殖细胞的过度增生, 进而导致肿瘤的产生^[47]. 以上研究结果表明, Wnt 信号对于维持小肠干细胞的自我更新和增殖是至关重要的, 且一系列严密的调控机制将 Wnt 信号维持在一个适当的水平.

Wnt 信号还可以通过调控小肠上皮中 EphB-Ephrin B 梯度来划分上皮中不同区域(小肠干细胞区域、TA 细胞区域和分化细胞区域), 将小肠干细胞限制在隐窝底部的微环境中, 从而间接地促进其自我更新和增殖^[48]. 在 Wnt 信号高的隐窝底部, 小肠干细胞表达 Wnt 靶蛋白 EphB2 和 EphB3 受体. 小肠干细胞产生的后代进入 Wnt 信号低的 TA 细胞区域, EphB2 和 EphB3 受体表达下降, 而 Ephrin B 配体表达上调. 表达 EphB 受体的细胞与表达 Ephrin B 配体的细胞会相互排斥: EphB 受体与 Ephrin B 配体结合后, 会激活一种双向信号, 在表达 EphB 受体的细胞中, 受体激活后磷酸化一系列下游信号分子(如 R-Ras 等)调控细胞骨架或细胞连接; 在 Ephrin B 配体表达的细胞中, 配体与 EphB 受体结合后会通过 Src 激酶家族磷酸化一系列调控细胞连接的信号分子; 此外, 细胞接触处 EphB-Ephrin B 复合体的清除对于起始排斥信号是十分重要的, 这是通过复合体的内吞或者 Ephrin B 胞外端的剪切实现的^[49-51]. 通过这种机制, 表达 Ephrin B 配体的细胞受到排斥, 向上迁移, 远离隐窝底部, 而小肠干细胞则被限制在隐窝底部. 此外, 潘氏细胞分化形成后, 不再表达 Ephrin B 配体, 反而表达 EphB3 受体, 受周围细胞排斥, 向下迁移进入隐窝底部. 由此, Wnt 信号通过调控 EphB-Ephrin B 梯度将小肠干细胞定位在隐窝底部的微环境中, 促使其维持自我更新和增殖的状态.

此外, Wnt 信号在维持小肠干细胞自我更新和增殖的同时, 还会影响其分化过程. 一系列研究表明 Wnt 信号在潘氏细胞的分化和成熟中起着重要的作用. 首先, Wnt 信号通路的过度激活会诱导新的潘氏

细胞的形成^[31,52]. 其次, Wnt 信号靶基因 *Sox9* 对于潘氏细胞的形成是至关重要的. 在小肠上皮中敲除 *Sox9* 基因后, 潘氏细胞完全不能形成^[26]. Wnt 信号会诱导小肠干细胞向潘氏细胞的分化, 而潘氏细胞是小肠干细胞微环境中 Wnt 配体的主要来源之一^[27], Wnt 信号又会促进小肠干细胞的自我更新及增殖. 由此在微环境中形成了一种正反馈机制, 在小肠干细胞区域的维持中发挥着重要的作用. 此外, 也有一些研究表明 Wnt 信号通路也与另外两种分泌型细胞(杯状细胞和肠内分泌细胞)的分化有关^[38,43,53].

2.3 BMP 信号

与 Wnt 信号相反, BMP 信号在隐窝-绒毛轴上存在梯度递增性. BMP2 和 BMP4 配体主要由绒毛内间充质细胞和隐窝周边间充质细胞分泌, 表达量从上往下递减^[54,55], 而隐窝基底层和周边细胞会分泌 BMP 信号的抑制分子 Noggin 和 Chordin^[56], 从而抑制隐窝的 BMP 信号.

BMP 隶属于转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β) 超家族, 参与调控细胞的增殖、分化和凋亡等诸多过程, 在胚胎发育和成体干细胞维持中发挥着重要的作用^[57,58]. BMP 配体结合 I 型受体 BMPRI 和 II 型受体 BMPRII 后, BMPRII 会磷酸化并激活 BMPRI, 激活后的 BMPRI 会进一步磷酸化 R-Smad (包括 Smad1, Smad5 和 Smad8), R-Smad 进而结合 Co-Smad (Smad4), 共同进入细胞核起始 BMP 下游基因的转录^[59].

BMP 信号抑制小肠干细胞的自我更新和增殖, 拮抗 Wnt 等信号通路, 在限制小肠干细胞的过度激活中发挥着至关重要的作用. 人们最初开始关注 BMP 信号在小肠上皮系统里的作用, 是因为在很多家族性息肉病 (FAP, familial adenomatous polyposis) 患者中发现了 BMP 信号通路的突变, 包括其 I 型受体 BMPRIA 和 SMAD4^[60,61], 而家族性息肉病患者非常易于发生结直肠癌. 在小鼠中, 小肠特异性过表达 Noggin^[54]后, 小肠上皮会新形成大量的异生隐窝(绒毛区域也会形成大量异生隐窝), 增殖区域大量扩增, 非常类似于人类的息肉病. 而在小鼠体内诱导敲除 *Bmpr1a* 也会导致隐窝的过度增生. 有报道认为, BMP 信号可能通过直接抑制 Wnt 信号来影响小肠干细胞的增殖和自我更新^[62]. 总之, BMP 信号通路在抑制隐窝的增殖、异生中发挥着重要的作用.

此外, BMP 信号在分泌型细胞的终末分化中起重要作用. 在小肠上皮特异性 *Bmpr1a* 敲除的小鼠中, 除了观察到隐窝增殖细胞数目增加之外, 还发现三种分泌型细胞(杯状细胞、潘氏细胞和肠内分泌细胞)的终末分化都受到了影响^[63], BMP 信号通路可能影响了该 3 种细胞的终末成熟而不是命运决定.

2.4 Notch 信号

Notch 通路是存在于几乎所有后生动物中的一条极度保守的信号通路, 主要通过细胞-细胞之间的接触发挥作用^[64]. 在哺乳动物中, 位于细胞膜上的 Notch 信号的配体(Jagged1, Jagged3, Dll1, Dll3 和 Dll4)结合到邻近细胞的 Notch 受体(Notch1, Notch2, Notch3 和 Notch4)后, Notch 受体在 γ 分泌酶(γ -secretase)蛋白酶的作用下发生断裂, 由此释放出 Notch 受体胞内域(NCID, Notch intracellular domain), NCID 随后进入细胞核, 结合 Rbpj(recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region)等转录因子, 起始 Notch 信号通路靶基因的转录^[65].

在小肠上皮中, Notch 信号通路的多种配体、受体只在隐窝部位表达, 其信号活性也只存在于隐窝中^[66]. Notch 信号在调控小肠干细胞的分化、自我更新和增殖中都发挥着重要的作用. 首先, Notch 信号通路的活性是分泌型细胞和吸收型细胞命运决定中的关键因素, Notch 信号会抑制分泌型细胞的分化, 并促进吸收型细胞的分化. 小肠上皮中敲除 *Rbpj*^[67], *Notch1* 和 *Notch2*^[68]或者 *Dll1* 和 *Dll4*^[69]后, 都会将隐窝中增殖细胞全部转变为分泌型细胞之一的杯状细胞. 利用 γ -secretase 蛋白酶的抑制剂处理小鼠也会导致类似的现象^[67,70]. 与此相反, 小肠上皮中激活 Notch 信号会抑制分泌型细胞的分化, 并使隐窝中增殖细胞大量扩增^[71,72]. Notch 信号控制分泌型细胞和吸收型细胞分化的具体机制是: Notch 信号会激活下游转录因子 Hes1(hairy and enhancer of split 1), Hes1 表达后会抑制 Math1 转录因子的表达^[73~75], 而 Math1 是分泌型细胞分化的关键转录因子^[76,77]. Hes1 通过抑制 Math1 的表达来阻止分泌型细胞的分化, 并促使细胞处于增殖状态^[67], 以及后期向吸收型细胞的分化. 其次, Notch 信号对于维持小肠干细胞的自我更新和增殖是必需的. 谱系追踪实验表明, 部分 Notch 信号

活跃的细胞可以生成小肠上皮中所有类型的细胞^[78], 即 Notch 信号在小肠干细胞里是处于激活状态的. 小肠干细胞微环境中的潘氏细胞活跃表达 Notch 配体 Dll1 和 Dll4^[16], 而在小肠上皮中共敲除 *Dll1* 和 *Dll4* 基因后会导致小肠干细胞的消失^[69]. Notch 信号的抑制也会导致隐窝中 Ki67 阳性增殖细胞的减少, 此外, 小肠干细胞的标记蛋白 Olfm4 直接受 Notch 信号的调控^[79]. 大量的实验支持如下一个模型: 当 Wnt 信号强度高时(小肠干细胞), 由潘氏细胞介导的 Notch 信号会抑制分泌型细胞的分化, 并与 Wnt 信号协同促进细胞的增殖和维持细胞的自我更新. 而当 Wnt 信号强度低时(TA 细胞), Notch 信号在抑制分泌型细胞分化的同时会促进吸收型细胞的分化^[80].

2.5 EGF 信号

EGF 受体包括 EGFR, ErbB-2, ErbB-3 和 ErbB-4 四种, 隶属于受体酪氨酸激酶家族, 与生长因子 EGF 结合后激活一系列下游信号通路(PI3K/Akt, PLC γ /PKC 和 Ras/Raf/Mek/Erk 等通路), 调控细胞的增殖和分化^[81,82].

EGF 信号促进小肠干细胞和 TA 细胞的增殖^[83,84]. 在隐窝中, EGF 的下游通路 Ras/Raf/Mek/Erk 是处于激活状态的^[85]. 在小肠上皮中还存在一系列负调控机制限制 EGF 信号, 防止其过度激活. 例如, *Lrig1* 是 EGF 信号的负反馈调控因子, 在小肠隐窝的增殖细胞内大量表达, 小肠特异性地敲除 *Lrig1* 基因后会导致隐窝增殖区域扩增, 导致小肠肿瘤的发生^[85,86].

2.6 生长因子与小肠干细胞的体外培养

以往对小肠干细胞的研究大多依赖于转基因小鼠, 但小鼠实验需要耗费大量的资源和时间. *Lgr5* 标记的小肠干细胞的发现和对上述几种信号通路的研究, 使得体外培养小肠干细胞成为了可能. 在 2009 年, Hans Clevers 研究组建立了小肠干细胞的体外培养系统^[16]. 在 R-spondin-1, EGF, Noggin 和 Notch 生长因子存在的情况下, 单个分离的 *Lgr5* 阳性小肠干细胞可以在基质胶中形成小肠类器官, 这种小肠类器官与体内小肠上皮在形态和细胞组成上非常类似, 小肠干细胞在其中不仅可以自我更新, 也可以分化成各种小肠特化细胞. 其中, R-spondin-1 是 Wnt 信号的增强剂, 可以与 *Lgr5* 和 *Lgr4* 受体结合放大 Wnt 信

号^[87,88]. 小肠干细胞体外培养系统的建立, 进一步证明了上述四条信号通路在小肠干细胞的维持和命运决定中的重要作用.

3 总结和展望

由于具有快速更新的能力和简单的生理结构, 小肠上皮已经成为了成体干细胞研究中的模式系统. 而近年来, *Lgr5* 等小肠干细胞特异性标记物的发现, 使人们可以更加深入、直观地探讨小肠干细胞的特性, 促使小肠干细胞的研究进入了蓬勃发展阶段.

小肠干细胞生活在特定的微环境中, 其中多种包括 *Wnt*, *BMP*, *Notch* 和 *EGF* 在内的信号, 严格地调控着小肠干细胞的命运. 在小肠干细胞区域, *Wnt* 信号与 *Notch* 信号协同维持着小肠干细胞的自我更新状态, *BMP* 信号起着相反的作用, 限制小肠干细胞的活性; 在小肠干细胞区域和 TA 细胞区域, *Wnt* 信号和 *EGF* 信号共同促进小肠干细胞及其后代的增殖, 而

BMP 信号则起拮抗作用, 防止细胞的过度增生; 在 TA 细胞区域, *Notch* 信号决定了分泌型和吸收型细胞的分化方向; *BMP* 信号促进三种分泌型细胞的终末成熟; *Wnt* 信号通路促进潘氏细胞的分化, 而后者在小肠干细胞微环境的形成中发挥着至关重要的作用. 总之, 一系列信号在小肠的自我稳定中发挥着重要的调控作用, 而这些信号的异常与小肠疾病特别是结直肠癌的发生、发展有着密不可分的关系.

目前为止, 虽然人们对小肠自我更新的调控有一定的了解, 但是还有许多问题没有解决. 例如, 调控小肠干细胞信号通路的具体机制; *Lgr5* 小肠干细胞与 +4 位小肠干细胞对于上述信号通路的响应有何不同; 不同信号在小肠干细胞微环境中如何协同来调控小肠干细胞的命运. 总之, 对信号通路调控小肠干细胞命运的进一步了解, 不仅可以使人们更加深入了解其内在机制, 为人们认识其他成体干细胞提供重要的借鉴, 更为包括肠癌在内的肠相关疾病的治疗以及干细胞医学提供崭新的线索.

参考文献

- 1 Heath J P. Epithelial cell migration in the intestine. *Cell Biol Int*, 1996, 20: 139–146
- 2 Potten C S. Kinetics and possible regulation of crypt cell populations under normal and stress conditions. *Bull Cancer*, 1975, 62: 419–430
- 3 Barker N, van de Wetering M, Clevers H. The intestinal stem cell. *Genes Dev*, 2008, 22: 1856–1864
- 4 Hermiston M L, Gordon J I. Organization of the crypt-villus axis and evolution of its stem cell hierarchy during intestinal development. *Am J Physiol*, 1995, 268: G813–822
- 5 van der Flier L G, Clevers H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol*, 2009, 71: 241–260
- 6 Hall P A, Coates P J, Ansari B, et al. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *J Cell Sci*, 1994, 107 (Pt 12): 3569–3577
- 7 Cheng H, Leblond C P. 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: 537–561
- 8 Cheng H, Leblond C P. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. I. Columnar cell. *Am J Anat*, 1974, 141: 461–479
- 9 Potten C S, Hume W J, Reid P, et al. The segregation of DNA in epithelial stem cells. *Cell*, 1978, 15: 899–906
- 10 Bjerknes M, Cheng H. The stem-cell zone of the small intestinal epithelium. III. Evidence from columnar, enteroendocrine, and mucous cells in the adult mouse. *Am J Anat*, 1981, 160: 77–91
- 11 Bjerknes M, Cheng H. The stem-cell zone of the small intestinal epithelium. I. Evidence from paneth cells in the adult mouse. *Am J Anat*, 1981, 160: 51–63
- 12 Cairns J. Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature*, 1975, 255: 197–200
- 13 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: 379–383
- 14 van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, et al. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell*, 2002, 111: 241–250
- 15 Barker N, van Es J H, Kuipers J, et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature*, 2007, 449: 1003–1007
- 16 Sato T, Vries R G, Snippert H J, et al. Single *Lgr5* stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche. *Nature*,

- 2009, 459: 262–265
- 17 van der Flier L G, van Gijn M E, Hatzis P, et al. Transcription factor achaete scute-like 2 controls intestinal stem cell fate. *Cell*, 2009, 136: 903–912
- 18 van der Flier L G, Haegebarth A, Stange D E, et al. OLFM4 is a robust marker for stem cells in human intestine and marks a subset of colorectal cancer cells. *Gastroenterology*, 2009, 137: 15–17
- 19 Tian H, Biehs B, Warming S, et al. A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable. *Nature*, 2011, 478: 255–259
- 20 Yan K S, Chia L A, Li X, et al. The intestinal stem cell markers Bmi1 and Lgr5 identify two functionally distinct populations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 466–471
- 21 Montgomery R K, Carlone D L, Richmond C A, et al. Mouse telomerase reverse transcriptase (mTert) expression marks slowly cycling intestinal stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 179–184
- 22 Takeda N, Jain R, LeBoeuf M R, et al. Interconversion between intestinal stem cell populations in distinct niches. *Science*, 2011, 334: 1420–1424
- 23 Powell A E, Wang Y, Li Y, et al. The pan-ErbB negative regulator Lrig1 is an intestinal stem cell marker that functions as a tumor suppressor. *Cell*, 2012, 149: 146–158
- 24 Clevers H. The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment. *Cell*, 2013, 154: 274–284
- 25 Barker N. Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15: 19–33
- 26 Bastide P, Darido C, Pannequari J, et al. Sox9 regulates cell proliferation and is required for paneth cell differentiation in the intestinal epithelium. *J Cell Biol*, 2007, 178: 635–648
- 27 Sato T, van Es J H, Snippert H J, et al. Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature*, 2011, 469: 415–418
- 28 Geiser J, Venken K J T, De Lisle R C, et al. 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: e1002766
- 29 Vries R G J, Huch M, Clevers H. Stem cells and cancer of the stomach and intestine. *Mol Oncol*, 2010, 4: 373–384
- 30 Gregorieff A, Pinto D, Begthel H, et al. Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine. *Gastroenterology*, 2005, 129: 626–638
- 31 Farin H F, Van Es J H, Clevers H. Redundant sources of Wnt regulate intestinal stem cells and promote formation of paneth cells. *Gastroenterology*, 2012, 143: 1518–1529
- 32 Logan C Y, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2004, 20: 781–810
- 33 Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*, 2006, 127: 469–480
- 34 Groden J, Thliveris A, Samowitz W, et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell*, 1991, 66: 589–600
- 35 Kinzler K W, Nilbert M C, Su L K, et al. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science*, 1991, 253: 661–665
- 36 Morin P J, Sparks A B, Korinek V, et al. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science*, 1997, 275: 1787–1790
- 37 van Es J H, Haegebarth A, Kujala P, et al. A critical role for the Wnt effector Tcf4 in adult intestinal homeostatic self-renewal. *Mol Cell Biol*, 2012, 32: 1918–1927
- 38 Pinto D, Gregorieff A, Begthel H, et al. Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev*, 2003, 17: 1709–1713
- 39 Kuhnert F, Davis C R, Wang H T, 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: 266–271
- 40 Fevr T, Robine S, Louvard D, et al. Wnt/beta-Catenin is essential for intestinal homeostasis and maintenance of intestinal stem cells. *Mol Cell Biol*, 2007, 27: 7551–7559
- 41 Muncan V, Sansom O J, Tertoolen L, et al. Rapid loss of intestinal crypts upon conditional deletion of the Wnt/Tcf-4 target gene c-Myc. *Mol Cell Biol*, 2006, 26: 8418–8426
- 42 Oshima M, Oshima H, Kitagawa K, et al. Loss of apc heterozygosity and abnormal tissue building in nascent intestinal polyps in mice carrying a truncated Apc gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 4482–4486
- 43 Sansom O J, Reed K R, Hayes A J, et al. Loss of Apc *in vivo* immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes Dev*, 2004, 18: 1385–1390
- 44 Harada N, Tamai Y, Ishikawa T, et al. Intestinal polyposis in mice with a dominant stable mutation of the beta-catenin gene. *EMBO J*, 1999, 18: 5931–5942

- 45 Kim K A, Kakitani M, Zhao J S, et al. Mitogenic influence of human R-spondin1 on the intestinal epithelium. *Science*, 2005, 309: 1256–1259
- 46 Hao H X, Xie Y, Zhang Y, et al. ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner. *Nature*, 2012, 485: 195–200
- 47 Koo B K, Spit M, Jordens I, et al. Tumour suppressor RNF43 is a stem-cell E3 ligase that induces endocytosis of Wnt receptors. *Nature*, 2012, 488: 665–669
- 48 Batlle E, Henderson J T, Beghtel H, et al. Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell*, 2002, 111: 251–263
- 49 Pasquale E B. Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signalling and beyond. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10: 165–180
- 50 Wilkinson D G. Multiple roles of EPH receptors and ephrins in neural development. *Nat Rev Neuroscience*, 2001, 2: 155–164
- 51 Noren N K, Pasquale E B. Eph receptor-ephrin bidirectional signals that target Ras and Rho proteins. *Cell Signal*, 2004, 16: 655–666
- 52 Andreu P, Peignon G, Slomianny C, et al. A genetic study of the role of the Wnt/beta-catenin signalling in paneth cell differentiation. *Dev Biol*, 2008, 324: 288–296
- 53 Nakamura T, Tsuchiya K, Watanabe M. Crosstalk between Wnt and Notch signaling in intestinal epithelial cell fate decision. *J Gastroenterol*, 2007, 42: 705–710
- 54 Haramis A P, Beghtel H, van den Born M, et al. *De novo* crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine. *Science*, 2004, 303: 1684–1686
- 55 Hardwick J C H, Van den Brink G R, Bleuming S A, et al. Bone morphogenetic protein 2 is expressed by, and acts upon, mature epithelial cells in the colon. *Gastroenterology*, 2004, 126: 111–121
- 56 Kosinski C, Li V S, Chan A S, 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: 15418–15423
- 57 Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*, 1998, 67: 753–791
- 58 Zhang J, Li L. BMP signaling and stem cell regulation. *Dev Biol*, 2005, 284: 1–11
- 59 Hardwick J C, Kodach L L, Offerhaus G J, et al. Bone morphogenetic protein signalling in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8: 806–812
- 60 Howe J R, Bair J L, Sayed M G, et al. Germline mutations of the gene encoding bone morphogenetic protein receptor 1A in juvenile polyposis. *Nat Genet*, 2001, 28: 184–187
- 61 Howe J R, Roth S, Ringold J C, et al. Mutations in the SMAD4/DPC4 gene in juvenile polyposis. *Science*, 1998, 280: 1086–1088
- 62 He X C, Zhang J W, Tong W G, et al. BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling. *Nat Genet*, 2004, 36: 1117–1121
- 63 Auclair B A, Benoit Y D, Rivard N, et al. Bone morphogenetic protein signaling is essential for terminal differentiation of the intestinal secretory cell lineage. *Gastroenterology*, 2007, 133: 887–896
- 64 Artavanis-Tsakonas S, Rand M D, Lake R J. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*, 1999, 284: 770–776
- 65 Kopan R, Ilagan M X G. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell*, 2009, 137: 216–233
- 66 Schroder N, Gossler A. Expression of Notch pathway components in fetal and adult mouse small intestine. *Gene Expr Patterns*, 2002, 2: 247–250
- 67 van Es J H, van Gijn M E, Riccio O, et al. Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature*, 2005, 435: 959–963
- 68 Riccio O, van Gijn M E, Bezdek A C, et al. Loss of intestinal crypt progenitor cells owing to inactivation of both Notch1 and Notch2 is accompanied by derepression of CDK inhibitors p27Kip1 and p57Kip2. *EMBO Rep*, 2008, 9: 377–383
- 69 Pellegrinet L, Rodilla V, Liu Z, et al. Dll1- and Dll4-mediated notch signaling are required for homeostasis of intestinal stem cells. *Gastroenterology*, 2011, 140: 1230–1240
- 70 Milano J, McKay J, Dagenais C, 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: 341–358
- 71 Fre S, Huyghe M, Mourikis P, et al. Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature*, 2005, 435: 964–968
- 72 Stanger B Z, Datar R, Murtaugh L C, et al. Direct regulation of intestinal fate by Notch. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 12443–12448
- 73 Jensen J, Pedersen E E, Galante P, et al. Control of endodermal endocrine development by Hes-1. *Nat Genet*, 2000, 24: 36–44
- 74 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: 348–352
- 75 Ueo T, Imayoshi I, Kobayashi T, et al. The role of Hes genes in intestinal development, homeostasis and tumor formation. *Development*,

- 2012, 139: 1071–1082
- 76 Yang Q, Bermingham N A, Finegold M J, et al. Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine. *Science*, 2001, 294: 2155–2158
- 77 VanDussen K L, Samuelson L C. Mouse atonal homolog 1 directs intestinal progenitors to secretory cell rather than absorptive cell fate. *Dev Biol*, 2010, 346: 215–223
- 78 Vooijs M, Ong C T, Hadland B, et al. Mapping the consequence of Notch1 proteolysis *in vivo* with NIP-CRE. *Development*, 2007, 134: 535–544
- 79 VanDussen K L, Carulli A J, Keeley T M, et al. Notch signaling modulates proliferation and differentiation of intestinal crypt base columnar stem cells. *Development*, 2012, 139: 488–497
- 80 Medema J P, Vermeulen L. Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature*, 2011, 474: 318–326
- 81 De Luca A, Carotenuto A, Rachiglio A, et al. The role of the EGFR signaling in tumor microenvironment. *J Cell Physiol*, 2008, 214: 559–567
- 82 Normanno N, De Luca A, Bianco C, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene*, 2006, 366: 2–16
- 83 Estivariz C F, Jonal C R, Gu L H, et al. Gut-trophic effects of keratinocyte growth factor in rat small intestine and colon during enteral refeeding. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 1998, 22: 259–267
- 84 Marchbank T, Goodlad R A, Lee C Y, et al. Luminal epidermal growth-factor is trophic to the small-intestine of parenterally fed rats. *Clin Sci (Lond)*, 1995, 89: 117–120
- 85 Wong V W Y, Stange D E, Page M E, et al. Lrig1 controls intestinal stem-cell homeostasis by negative regulation of ErbB signalling. *Nat Cell Biol*, 2012, 14: 401–408
- 86 Powell A E, Wang Y, Li Y N, et al. The Pan-ErbB negative regulator Lrig1 is an intestinal stem cell marker that functions as a tumor suppressor. *Cell*, 2012, 149: 146–158
- 87 de Lau W, Barker N, Low T Y, et al. Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. *Nature*, 2011, 476: 293–297
- 88 Carmon K S, Gong X, Lin Q S, et al. R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/beta-catenin signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 11452–11457

Regulation of Intestinal Stem Cell Fate

QI Zhen & CHEN YeGuang

State Key Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology, Tsinghua-Peking Center for Life Sciences, School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China

The remarkable ability of rapid self-renewal has made the intestinal epithelium become an ideal model for the study of adult stem cell regulation. The intestinal epithelium is organized into villus and crypts, and a population of intestinal stem cells located at the base of crypts is responsible for this constant self-renewal throughout the life. Recently, identification of the intestinal stem cell marker Lgr5, isolation and *in vitro* culture of Lgr5+ intestinal stem cells and the use of transgenic mouse models have significantly facilitated the studies of intestinal stem cell homeostasis and differentiation and greatly expanded our knowledge of the regulatory mechanisms underlying the intestinal stem cell fate determination. In this review, we summarize the current understanding of how signaling from Wnt, BMP, Notch and EGF in the stem cell niche modulates the intestinal stem cell fate.

intestinal stem cells, Wnt, BMP, Notch, EGF, fate determination

doi: 10.1360/052014-135