

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20210578

· 综述 ·

## 基于生物技术的肠道干细胞研究进展

冯珍兰<sup>1,2</sup>, 许沁舒<sup>1</sup>, 何翔<sup>1</sup>, 杜继聪<sup>1</sup>, 蔡建明<sup>1,2\*</sup>

1. 海军军医大学(第二军医大学)海军医学系, 上海 200433
2. 温州医科大学公共卫生与管理学院, 温州 325000

**[摘要]** 肠道干细胞对维持肠上皮各类细胞的稳态十分重要。正常情况下, 位于隐窝基底部的肠道干细胞会不断向隐窝顶部迁移, 在迁移过程中分化形成不同的肠上皮细胞。肠道干细胞大约每3~5 d更新1次, 以维持肠道上皮的更新和损伤后修复。在肠道上皮完整的情况下, 主要由活跃型肠道干细胞维持肠上皮的动态平衡; 在肠道上皮损伤后, 发挥修复作用的主要是静止型肠道干细胞。近年来, 随着生物技术的发展, 关于肠道干细胞的研究一直在不断进展。本文以国内外相关文献为基础, 对应用于肠道干细胞研究中的主要生物技术、新发现的肠道干细胞亚群和标志物及调控因子进行综述。

**[关键词]** 肠道干细胞; 生物标志物; 类器官; 单细胞 RNA 测序

**[中图分类号]** R 329.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2097-1338(2022)07-0792-07

### Intestinal stem cells based on biotechnology: research progress

FENG Zhen-lan<sup>1,2</sup>, XU Qin-shu<sup>1</sup>, HE Xiang<sup>1</sup>, DU Ji-cong<sup>1</sup>, CAI Jian-ming<sup>1,2,\*</sup>

1. Faculty of Naval Medicine, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China
2. School of Public Health and Management, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, Zhejiang, China

**[Abstract]** Intestinal stem cells are very important for maintaining the homeostasis of various kinds of intestinal epithelial cells. Under normal circumstances, intestinal stem cells located at the base of the crypt will continue to migrate to the top of the crypt and differentiate into different intestinal mucosal cells. Intestinal stem cells are renewed every 3-5 d to maintain the renewal and repair of intestinal epithelium after injury. The dynamic balance of intestinal epithelium is mainly maintained by active intestinal stem cells when intestinal epithelium is intact, while the quiescent intestinal stem cells play a major role in repairing intestinal injury when intestinal epithelia is injured. In recent years, with the development of biotechnology, the research on intestinal stem cells has been constantly updated and developed. Based on the relevant literatures at home and abroad, this paper reviews the main biotechnology, newly discovered intestinal stem cell subsets and markers and regulatory factors for intestinal stem cell research.

**[Key words]** intestinal stem cells; biomarkers; organoid; single cell RNA sequencing

[Acad J Naval Med Univ, 2022, 43(7): 792-798]

20世纪70年代左右, 人们开始逐渐认识到肠道上皮中存在着组织特异性肠道干细胞(intestinal stem cell, ISC)<sup>[1]</sup>。通过荧光标记示踪的方法, 将ISC分为活动型肠道干细胞(active intestinal stem cell, A-ISC)和静止型肠道干细胞(quiescent intestinal stem cell, Q-ISC)。其中, A-ISC位于

隐窝底部, 又被称为隐窝基底柱状细胞(crypt base columnar cell, CBC)。CBC特异性表达富含亮氨酸重复序列的G蛋白偶联受体5(leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5, *Lgr5*)基因。Barker等<sup>[2]</sup>通过*Lgr5*-增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)

[收稿日期] 2021-06-07 [接受日期] 2021-08-26

[基金项目] 国家自然科学基金(81903260, 81972978), 上海市青年科技英才扬帆计划(19YF1459100), 军队医学科技青年培育计划(21QNYPY034)。Supported by National Natural Science Foundation of China (81903260, 81972978), Yangfan Plan of Young Science and Technology Talent of Shanghai (19YF1459100), and Incubation Program of Youth Training Project for Military Medical Science and Technology (21QNYPY034).

[作者简介] 冯珍兰, 硕士生。E-mail: bluekite1998@163.com

\*通信作者( Corresponding author ). Tel: 021-81871153, E-mail: cjm882003@163.com

工具鼠进行体内谱系追踪,发现包括帕内特细胞、杯状细胞和肠内分泌细胞等在内的各种成熟细胞均来源于  $Lgr5^+$  细胞<sup>[3]</sup>。Q-ISC 位于隐窝+4 位置,是一类具有潜在增殖活力的休眠细胞,能抵抗损伤等应激,促进肠道上皮的损伤后再生,其高表达多梳无名指癌基因 (*Bmi1 polycomb ring finger oncogene, Bmi1*),同样可分化为不同类型的特化细胞<sup>[4]</sup>。此外,小鼠端粒酶逆转录酶启动子 (mouse telomerase reverse transcriptase, *mTert*)、Hop 同源框 (*Hop homeobox, Hopx*) 和富含亮氨酸重复序列和免疫球蛋白样结构域 1 (*leucine rich repeats and immunoglobulin like domains 1, Lrig1*) 等也被认为是 Q-ISC 的标志物<sup>[5]</sup>。Q-ISC 多在 A-ISC 受到损伤时才会被激活,因此又被称为储备肠干细胞 (*reserve intestinal stem cell, RISC*)。近些年,生物力学、肠类器官培养、基因编辑、单细胞测序等生物学技术的发展为 ISC 研究提供了新的视角,创造了新的机遇。本文以国内外相关文献为基础,对应用于 ISC 研究中的主要生物技术、新发现的 ISC 亚群、标志物和调控因子进行综述。

## 1 ISC 研究中的主要生物技术

生物技术的发展进步推动了 ISC 的研究。其中,水凝胶作为肠道类器官培养的三维支撑结构,支持着肠道类器官的研究,基因编辑技术从基因调控层面增加了 ISC 研究的可控性,而单细胞测序技术则从细胞层面使人们了解了更多未知类型的 ISC 亚型。

**1.1 生物力学技术 (水凝胶)** 水凝胶是一种高度交联、溶胀的亲水聚合物,由于其结构与天然细胞外基质相似,常被用作小肠类器官的培养基质<sup>[6]</sup>。目前常用的小肠类器官培养基质是小鼠肉瘤重组基底膜提取物基质胶 (*matrigel*)。由于基质胶价格昂贵并且成分不明确,限制了其在高通量筛选、再生医学和诊断等方面的应用<sup>[7]</sup>,寻找基质胶的替代物显得十分重要。近年来,植物源的基质水凝胶逐渐被开发利用。2020 年, *Curvello* 等<sup>[8]</sup>报道了一种低成本且成分明确的植物源新型纳米纤维素水凝胶,其力学性能与动物来源的基质胶基本一致,也可作为小肠类器官的培养基质。该水凝胶可通过加入层粘连蛋白 1 和胰岛素样生长因子 1 (*insulin-like growth factor 1, IGF-1*) 来优化培养条件,并且可

通过甘氨酸来调节渗透压。该凝胶中还含有纤连蛋白衍生肽,能够增强小肠类器官与纳米纤维素的黏附作用,提供小肠类器官增殖分化所需的微环境。通过比较转录组分析发现,新型纳米纤维素水凝胶培养的小肠类器官与基质胶中培养的小肠类器官在基因转录水平层面具有良好的相关性。纳米纤维素水凝胶作为一种很有前途的类有机物生长基质,无疑为类器官的培养及 ISC 的研究提供了良好的条件<sup>[9]</sup>。

**1.2 类器官培养技术** 在适当的三维培养条件下,  $Lgr5^+$  ISC 会经历自我更新、分化和形态改变,最终生成包含隐窝样区域和绒毛样上皮的类器官。2009 年, *Sato* 等<sup>[10]</sup>首次成功地在体外将单个 ISC 培养成可生长分化为所有肠道上皮终末细胞的、包含隐窝样区域和绒毛样上皮区域的三维结构,且可无限增殖,准确模拟肠道上皮的生理状态,这为 ISC 的体外研究提供了新的方法。另外 *Serra* 等<sup>[11]</sup>借助类器官培养技术,发现从单个干细胞向类器官发育的组织再生过程需要转录因子 Yes 关联蛋白 1 (*Yes-associated protein 1, YAP1*) 的调控。研究发现只要提供基质、必需生长因子及干细胞刺激分子 Wnt 和 R-反应蛋白 (*R-spondin*),小肠上皮细胞就可以在体外以类器官的形式无限扩张<sup>[12]</sup>。但在固态的细胞外基质中,ISC 的培养则较为复杂,缺乏标准化和质量控制,难以实现高通量化。2020 年, *Brandenberg* 等<sup>[13]</sup>报道了一种自动化的悬浮培养体系,可通过促进干细胞快速聚集,将类器官分为有规则的阵列,该阵列可作为人工壁龛将干细胞聚合为类器官,进一步通过类器官阵列分析技术实时分析聚合物-水凝胶基质内的微腔阵列中数以千计的单个胃肠类器官。以人和小鼠来源的类器官为检验对象的实验结果显示,采用该自动化悬浮培养体系可显著减少类器官的异质性。该技术可用于筛选结直肠癌类器官的抗癌候选药物,并可基于高含量图像的表型分析来探索药物的作用机制。此外,该课题组的另一项研究<sup>[14]</sup>发现,通过优化三维微芯片灌注系统,可诱导 ISC 形成类似肠道的管形类器官。这种具有与体内真实情况相似的管形肠道类器官可以长期保持与真实肠道相似的结构和功能,同时支持微生物的生长。与常规肠道类器官相比,这种类器官寿命更长,同时保留了肠道的主要生理特征和损伤后的再生能力。

**1.3 基因编辑技术** 基因编辑技术能够精确地

对生物体基因组特定的目标基因进行修饰,成簇规则间隔短回文重复序列相关蛋白9 (clustered regularly interspersed short palindromic repeats-associated protein 9, CRISPR-Cas9) 基因编辑可高效地改造生物体基因构成。自2012年以来,CRISPR-Cas9 基因编辑技术发展迅速,目前在肠道类器官与ISC的研究中也得到了广泛的应用。研究表明,CRISPR 碱基编辑器可应用于小鼠和人类的肠道器官,既可以敲除基因,也可以纠正致病突变<sup>[15]</sup>。Roper 等<sup>[16]</sup>运用CRISPR-Cas9 基因编辑技术特异性敲除结肠上皮细胞的 *Apc* 和 *Trp53* 基因以诱导小鼠形成原位肿瘤,另外发现将 *Apc* 编辑的结肠类器官原位移植同样可以诱导小鼠形成原位肿瘤。此外,他们还发现在小鼠远端结肠接种 *Apc*<sup>ΔΔ</sup>、*Kras*<sup>G12D/+</sup>、*Trp53*<sup>ΔΔ</sup> (AKP) 小鼠结肠类器官和人结肠癌类器官后会转移至肝脏。利用CRISPR-Cas9 基因编辑技术和类器官原位移植技术,可明确结肠癌发生过程中 *Lgr5*<sup>+</sup> ISC 的克隆动态,探索结肠癌发生过程中癌基因的连续激活情况。Drost 等<sup>[17]</sup>将CRISPR-Cas9 基因编辑技术用于体外培养的人类ISC,先后导入了4个常见的结肠癌基因突变 (*Apc*、*P53*、*Kras* 和 *Smda4*),以建立结肠癌类器官。研究结果显示携带这4种突变的ISC在Wnt、R-反应蛋白和表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 不存在的情形下仍然能够生长,表明结肠癌很有可能是通过多个癌基因连续突变而产生的。这些研究表明,CRISPR-Cas9 编辑类器官技术的发展大大提高了ISC研究的可控性。

#### 1.4 单细胞测序技术

在单细胞水平上对整个转录组进行测序是由Eberwine等开创的,通过使用体外转录线性扩增和PCR指数扩增来扩增单个细胞的cDNA,以获得高密度DNA微阵列芯片<sup>[18]</sup>,随后该技术被用于单细胞RNA测序 (single-cell RNA sequencing, scRNA-seq)。目前,单细胞测序技术已广泛应用于ISC研究中,并已鉴别出多种未知的ISC亚群<sup>[19]</sup>。Elmentaite 等<sup>[20]</sup>对4~12岁健康儿童的小肠进行黏膜活检,使用10× Genomics 技术进行单细胞测序分析,结果显示3个发育阶段 (胚胎、胎儿和儿童) 均包含7种主要细胞类型,但在细胞组成上有显著差异。进一步探究与人类绒毛形成有关的机制和信号通路发现,不同细胞之间特异性的相互作用是通过骨形态发生蛋白

(bone morphogenetic protein, BMP)、血小板衍生生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF)、Notch、Wnt 和成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF) 等信号通路实现的。该研究提供了人类胚胎、胎儿和儿童健康肠道及炎症性肠道疾病的单细胞图谱,剖析了肠道发育过程中上皮细胞动态的转录变化。通过对比体外组织和体外胎儿类器官的转录组,揭示了类器官培养物在培养皿中的成熟过程。同时, Bahar Halpern 等<sup>[21]</sup>通过激光显微切割联合单细胞测序技术揭示了小鼠肠道隐窝-绒毛轴间充质细胞的空间分布特征,发现了一类位于绒毛顶端、表达干细胞标记 *Lgr5*<sup>+</sup> 的特络细胞 (villus tip telocyte, VTT), 该种细胞不同于隐窝 *Lgr5*<sup>+</sup> ISC, 可分泌 BMP2、BMP4 和 Wnt5a, 并通过这些通路调控肠道细胞稳态, 而清除 VTT 将会导致绒毛顶端肠细胞基因表达的显著改变, 进而影响肠道功能。另外, Biton 等<sup>[22]</sup>通过单细胞RNA测序发现, *Lgr5*<sup>+</sup>ISC 中存在2个高表达主要组织相容性复合体 II (major histocompatibility complex class II, MHC II) 类分子的细胞亚群, MHC II 类分子与 *Lgr5* 双阳性的ISC在与CD4<sup>+</sup>辅助性T细胞 (helper T cell, Th) 共培养时, 可表现为非常规的抗原提呈细胞, 提示Th细胞和 *Lgr5*<sup>+</sup> ISC 间的相互作用可以协调组织对外界信号的广泛应答。

## 2 ISC 新亚群和标志物的发现

因为各类生物技术的发展, 不断地有新的ISC亚群和标志物被发现, 再生干细胞 (revival stem cell, revSC)、分子伴侣非经典前折叠素 RPB5 相互作用因子 (unconventional prefoldin RPB5 interactor, URI) 等的发现使人们对ISC结构表达的认识更加深入。

### 2.1 revSC 肠道上皮的更新

一般由位于隐窝基底部的多能 *Lgr5*<sup>+</sup> CBC 维持<sup>[23]</sup>。但在辐射损伤后 *Lgr5*<sup>+</sup> CBC 数目显著下降, 肠道上皮却仍然可以更新, 这表明存在 *Lgr5*<sup>+</sup> CBC 以外的ISC促进肠道上皮再生, 这类可以修复肠道损伤的干细胞被称为储备干细胞 (reserve stem cells, RSC)<sup>[24]</sup>。之前一些观点认为CBC和RSC是相互排斥的<sup>[25]</sup>, 但 Muñoz 等<sup>[26]</sup>联合运用转录组学和蛋白质组学的方法研究 *Lgr5*<sup>+</sup> CBC, 发现并非如此。他们利用2个微阵列平台对荧光激活细胞分选仪 (fluorescence

activated cell sorter, FACS) 分选的  $Lgr5^{+}$  干细胞及其分化细胞进行转录图谱分析, 揭示了 384 个特殊基因的 mRNA 干细胞特征, 随后运用定量质谱法在同一群细胞中鉴定出了 ISC 中富含的 278 种蛋白质, 发现  $Lgr5^{+}$  同样是 RSC 的标志物,  $Lgr5^{+}$  和 RSC 均有利于促进肠道损伤修复<sup>[27]</sup>。此外, 吸收细胞<sup>[28]</sup>、分泌细胞<sup>[4]</sup>、慢循环  $Lgr5^{+}$  细胞<sup>[29]</sup> 等的祖细胞均有助于促进肠道上皮细胞再生。受 Hippo 信号调控的转录调节因子 YAP1 在肠上皮的再生过程中也同样具有重要意义。为了研究  $Lgr5^{+}$  CBC 丢失后肠道上皮再生的机制, Ayyaz 等<sup>[30]</sup> 通过单细胞 RNA 测序, 在电离辐射后小鼠再生肠道组织中发现了一种特殊的静默 revSC, 其组成为凝聚素-单个异形干细胞簇 2c (clusterin-singly profiled stem cell cluster 2c, CLU-SSC2c) 细胞, 这类细胞在肠稳态条件下很难被检测到, 一般在肠道损伤状态下被激活, 被激活后可先后分化为肠道中包括  $Lgr5^{+}$  CBC 等几乎所有的主要细胞类型。采用电离辐射损伤、靶向去除  $Lgr5^{+}$  CBC 或用右旋葡聚糖硫酸钠 (dextran sulphate sodium, DSS) 处理小鼠肠道组织后, revSC 可在转录因子 YAP1 的调控下通过重建  $Lgr5^{+}$  CBC 细胞池来促进肠损伤状态下肠道上皮的再生, 最终促进肠道功能的恢复。同时, 位于受损肠壁下的细胞也可在干细胞功能受损时分泌 R-反应蛋白 3, 让剩余健康细胞承担起干细胞的任务, 最终修复受损区域的组织<sup>[31]</sup>。

2.2 URI Gstaiger 等<sup>[32]</sup> 在对动物细胞进行免疫沉淀实验时发现了 URI。URI 蛋白是异六聚体分子伴侣 URI 前折叠蛋白样复合物的  $\alpha$  类亚基, 可以调节包括转录因子 (雌激素受体  $\alpha$  和芳香族化合物受体)、酶 (蛋白磷酸酶  $1\gamma$  和 N-乙酰氨基葡萄糖转移酶) 和肿瘤抑制因子 (副纤维蛋白) 等的功能, 可在有害的环境刺激下维持细胞和蛋白质的动态平衡<sup>[33]</sup>。Chaves-Pérez 等<sup>[34]</sup> 在体外细胞培养过程中发现高 URI 水平可保护肠道细胞免受 DNA 损伤。为了考察 URI 是否在肠道上皮辐射损伤修复的过程中也发挥着同样重要的作用, 该研究通过构建小鼠模型发现 URI 主要在肠隐窝中的特定休眠干细胞群 (Lieberkühn 隐窝) 中表达; 受到大剂量电离辐射后, 高表达 URI 的小鼠存活率为 100%, 野生型小鼠存活率仅为 30%, 而 URI 敲除小鼠存活率为 0%, 这表明表达 URI 的干细胞样

“休眠”细胞可抵抗辐射损伤。此外, 在隐窝和过渡扩增 (transit-amplifying, TA) 细胞之间的 “+4” 位置, 还存在着一种静止或慢分裂的标记保留细胞 (label-retaining cell, LR)。LR 是一种具有与帕内特细胞类似分泌表型的  $Lgr5^{+}$  细胞, 在 ISC 耗尽时可作为 RSC<sup>[35]</sup>。URI 在 LR 中同样高表达, 构成兼性干细胞池, 可以抵抗电离辐射, 对电离辐射后肠上皮的再生至关重要<sup>[35]</sup>。减少 URI 的表达会使 LR 增殖活跃, 加重个体 DNA 的损伤, 从而使个体对电离辐射变得敏感<sup>[36]</sup>。若敲除 URI 会导致 LR 死亡和肠道结构的破坏, 并进一步导致胃肠道综合征的发生。若肠上皮过表达 URI, 可以保护小鼠 LR, 促进辐射后的肠道再生。这些结果均表明 URI 对肠道上皮辐射损伤修复有着重要的意义。

### 3 ISC 的调节因子

ISC 的稳态平衡离不开各类调节因子, 正是因为各类生物技术的发展, 各类调节因子也被发现和提出, 其中肝激酶 B1 (liver kinase B1, LKB1)、胆汁酸和环状 RNA (circ-RNA) 最具代表性。

3.1 LKB1 LKB1 是一种生物能量感受器, 可以调节细胞的新陈代谢, 既往研究发现其对维持造血干细胞和肌肉的稳态具有十分重要的意义<sup>[37]</sup>。其对 ISC 的意义也逐渐引起人们的关注, Gao 等<sup>[38]</sup> 研究发现敲除 LKB1 会使小鼠部分肠隐窝丧失 ISC, 通过细胞实验发现, 人结肠腺癌细胞 Ls174t 敲除 LKB1 会导致 *Atoh1* 基因表达、黏液分泌增加, 而敲除 *Atoh1* 则会抑制黏液分泌, 表明缺失 LKB1 的 ISC 会上调 *Atoh1* 的表达从而使 ISC 表现出分泌细胞相关基因表达特征, 破坏 ISC 的稳态。通常情况下, ISC 的稳态是由一些旁分泌信号 (如 Wnt 和 Notch) 来调控的<sup>[39]</sup>, 然而 LKB1 缺失所导致的 *Atoh1* 表达增高却并不依赖于 Notch 和 Wnt 信号通路。受细胞代谢可能在小鼠的 ISC 功能中发挥关键作用<sup>[40]</sup> 的启示, 该课题组通过筛选调节糖酵解、氧化磷酸化、蛋白酶体降解相关的化合物, 发现丙酮酸脱氢酶激酶 (pyruvate dehydrogenase kinase, PDK) 抑制剂二氯乙酸酯 (dichloroacetate, DCA) 能抑制 LKB1 缺失后 *Atoh1* 的上调。PDK 主要通过抑制丙酮酸脱氢酶来抑制氧化磷酸化和细胞呼吸, 进而导致代谢谱改变, 耗氧量降低。该课题组通过实验发现 LKB1 敲除细胞的耗氧量会降低

(36.4±6.1)%, 而采用DCA处理LKB1敲除细胞后可以部分恢复耗氧量, 这表明LKB1敲除细胞的耗氧量的改变是PDK介导的<sup>[41]</sup>。另一方面通过免疫组织化学染色发现Lkb1<sup>Lgr5-KO</sup>小鼠隐窝基底中PDK4的表达显著增加, 提示在ISC中LKB1可通过PDK4抑制*Atoh1*转录, 从而抑制ISC向分泌细胞分化, 以维持ISC的稳态<sup>[38]</sup>。

**3.2 胆汁酸** 胆汁酸是肠道中含量最丰富的代谢物之一。近年来有观点认为胆汁酸是一种可能具有系统内分泌功能的多功能信号因子和代谢整合因子<sup>[42]</sup>。胆汁酸受体G蛋白偶联受体5 (the G protein-coupled bile acid receptor 5, TGR5) 激动剂 (TGR5 agonist, TGA5) 在整个胃肠道都有表达<sup>[43]</sup>。TGA5的缺失与肥胖、动脉粥样硬化、肝硬化、炎症等代谢性疾病密切相关, 多项研究表明胆汁酸-TGA5在肠道稳态中发挥着重要作用<sup>[44]</sup>。关于胆汁酸-TGA5在肠道内分泌细胞和免疫调节细胞方面的调节功能已经有较为深入的研究<sup>[45]</sup>。研究发现, 溃疡性结肠炎患者的胆汁酸水平会下降, 而通过直肠给药的方式将石胆酸注入溃疡性结肠炎患者体内可以逆转胆汁酸水平的下降, 通过构建小鼠模型研究发现ISC中TGR5功能的丧失会导致DSS诱导的结肠炎进展<sup>[46]</sup>。与此同时, Sorrentino等<sup>[47]</sup>也通过scRNA-seq和类器官技术发现胆汁酸-TGR5主要通过激活SRC/YAP和下游靶基因来调控ISC功能。

**3.3 circ-RNA** circ-RNA是一类特殊的非编码RNA分子, 呈封闭环状结构, 不受RNA外切酶影响, 表达较其他RNA分子更加稳定。circ-RNA在多种生物学过程中均发挥着重要作用, 其中对ISC的调节也有十分重要的作用<sup>[48]</sup>。Zhu等<sup>[49]</sup>研究发现, Lgr5<sup>+</sup>ISC中的circ-RNA circPan3可通过隐窝2型天然淋巴细胞 (group 2 innate lymphoid cell, ILC2) 促进ISC的自我更新。该课题组采用流式细胞术从Lgr5-绿色荧光蛋白-内部核糖体进入位点-Cre重组酶雌激素受体配体结合区突变体2 (Lgr5-green fluorescent protein-internal ribosome entry site-cyclization recombination enzyme estrogen receptor tamoxifen 2, Lgr5<sup>GFP-IRES-creERT2</sup>) 报告基因小鼠小肠隐窝中分离出Lgr5-GFP<sup>+</sup>ISC和Lgr5-GFP<sup>-</sup>ISC, 选择了10个在Lgr5-GFP<sup>+</sup>ISC中高表达的circ-RNA, 通过qPCR

验证了它们在Lgr5-GFP<sup>+</sup>ISC中高表达; 随后用从C57BL/6小鼠小肠分离的CD45<sup>+</sup>免疫细胞和Lgr5-GFP<sup>+</sup>ISC进行类器官形成实验, 发现CD45<sup>+</sup>免疫细胞增强了Lgr5-GFP<sup>+</sup>ISC的类器官形成能力。同时, 与敲除其他9个circ-RNAs相比, 敲除circPan3会显著减少类器官的形成数量, 这表明circPan3通过免疫细胞促进Lgr5-GFP<sup>+</sup>ISC的自我更新。进一步研究发现circPan3在小鼠Lgr5-GFP<sup>+</sup>ISC和人Lgr5<sup>+</sup>ISC中都呈高表达。这说明C57BL/6小鼠ISC中circPan3的缺失会损害免疫细胞介导的Lgr5-GFP<sup>+</sup>ISC的自我更新和上皮再生。

#### 4 小结

肠道隐窝干细胞的自我更新能力和肠道上皮细胞的屏障功能在维持肠道稳态、阻挡肠道微生物入侵和损伤修复中发挥着重要作用, 通过适当调控ISC可以保护肠道免受各种损害。生物力学、肠类器官培养、单细胞测序技术、基因编辑等各类生物实验技术在ISC研究中都发挥了重要作用。随着生物技术的发展, revSC、URI等新的ISC亚群和标志物不断被发现, LKB1、胆汁酸、circ-RNA等调控因子的提出丰富了人们对ISC的认知。但是对ISC的研究仍然任重道远, 需要进一步地发展与丰富。

#### [参考文献]

- [1] POTTEN C S, KOVACS L, HAMILTON E. Continuous labelling studies on mouse skin and intestine[J]. Cell Tissue Kinet, 1974, 7: 271-283.
- [2] BARKER N, VAN OUDENAARDEN A, CLEVERS H. Identifying the stem cell of the intestinal crypt: strategies and pitfalls[J]. Cell Stem Cell, 2012, 11: 452-460.
- [3] FERNANDEZ VALLONE V, LEPROVOTS M, RIBATALLADA-SORIANO D, GERBIER R, LEFORT A, LIBERT F, et al. LGR5 controls extracellular matrix production by stem cells in the developing intestine[J/OL]. EMBO Rep, 2020, 21: e49224. DOI: 10.15252/embr.201949224
- [4] YAN K S, GEVAERT O, ZHENG G X Y, ANCHANG B, PROBERT C S, LARKIN K A, et al. Intestinal enteroendocrine lineage cells possess homeostatic and injury-inducible stem cell activity[J/OL]. Cell Stem Cell, 2017, 21: 78-90.e6. DOI: 10.1016/j.stem.2017.06.014.
- [5] ZHANG Z G, HUANG J. Intestinal stem cells-types and markers[J]. Cell Biol Int, 2013, 37: 406-414.
- [6] CURVELLO R, GARNIER G. Cationic cross-linked

- nanocellulose-based matrices for the growth and recovery of intestinal organoids[J]. *Biomacromolecules*, 2021, 22: 701-709.
- [7] KIM T H, LI F G, FERREIRO-NEIRA I, HO L L, LUYTEN A, NALAPAREDDY K, et al. Broadly permissive intestinal chromatin underlies lateral inhibition and cell plasticity[J]. *Nature*, 2014, 506: 511-515.
- [8] CURVELLO R, KERR G, MICATI D J, CHAN W H, RAGHUWANSHI V S, ROSENBLUH J, et al. Engineered plant-based nanocellulose hydrogel for small intestinal organoid growth[J/OL]. *Adv Sci (Weinh)*, 2020, 8: 2002135. DOI: 10.1002/advs.202002135.
- [9] HIROTA A, ALMUSAWI S, NATERI A S, ORDÓÑEZ-MORÁN P, IMAJO M. Biomaterials for intestinal organoid technology and personalized disease modeling[J]. *Acta Biomater*, 2021, 132: 272-287.
- [10] SATO T, VRIES R G, SNIPPERT H J, VAN DE WETERING M, BARKER N, STANGE D E, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche[J]. *Nature*, 2009, 459: 262-265.
- [11] SERRA D, MAYR U, BONI A, LUKONIN I, REMPLER M, CHALLET MEYLAN L, et al. Self-organization and symmetry breaking in intestinal organoid development[J]. *Nature*, 2019, 569: 66-72.
- [12] YAN K S, JANDA C Y, CHANG J L, ZHENG G X Y, LARKIN K A, LUCA V C, et al. Non-equivalence of Wnt and R-spondin ligands during Lgr5<sup>+</sup> intestinal stem-cell self-renewal[J]. *Nature*, 2017, 545: 238-242.
- [13] BRANDENBERG N, HOEHNEL S, KUTTLER F, HOMICKSKO K, CERONI C, RINGEL T, et al. High-throughput automated organoid culture via stem-cell aggregation in microcavity arrays[J]. *Nat Biomed Eng*, 2020, 4: 863-874.
- [14] NIKOLAEV M, MITROFANOVA O, BROGUIERE N, GERALDO S, DUTTA D, TABATA Y, et al. Homeostatic mini-intestines through scaffold-guided organoid morphogenesis[J]. *Nature*, 2020, 585: 574-578.
- [15] GEURTS M H, DE POEL E, AMATNGALIM G D, OKA R, MEIJERS F M, KRUISSELBRINK E, et al. CRISPR-based adenine editors correct nonsense mutations in a cystic fibrosis organoid biobank[J/OL]. *Cell Stem Cell*, 2020, 26: 503-510.e7. DOI: 10.1016/j.stem.2020.01.019.
- [16] ROPER J, TAMMELA T, CETINBAS N M, AKKAD A, ROGHANIAN A, RICKELT S, et al. *In vivo* genome editing and organoid transplantation models of colorectal cancer and metastasis[J]. *Nat Biotechnol*, 2017, 35: 569-576.
- [17] DROST J, VAN JAARVELD R H, PONSIOEN B, ZIMBERLIN C, VAN BOXTEL R, BUIJS A, et al. Sequential cancer mutations in cultured human intestinal stem cells[J]. *Nature*, 2015, 521: 43-47.
- [18] XIE D, CHEN C C, PTASZEK L M, XIAO S, CAO X Y, FANG F, et al. Rewirable gene regulatory networks in the preimplantation embryonic development of three mammalian species[J]. *Genome Res*, 2010, 20: 804-815.
- [19] GRÜN D, LYUBIMOVA A, KESTER L, WIEBRANDS K, BASAK O, SASAKI N, et al. Single-cell messenger RNA sequencing reveals rare intestinal cell types[J]. *Nature*, 2015, 525: 251-255.
- [20] ELMENTAITE R, ROSS A D B, ROBERTS K, JAMES K R, ORTMANN D, GOMES T, et al. Single-cell sequencing of developing human gut reveals transcriptional links to childhood Crohn's disease[J/OL]. *Dev Cell*, 2020, 55: 771-783.e5. DOI: 10.1016/j.devcel.2020.11.010.
- [21] BAHAR HALPERN K, MASSALHA H, ZWICK R K, MOOR A E, CASTILLO-AZOFEIFA D, ROZENBERG M, et al. Lgr5<sup>+</sup> telocytes are a signaling source at the intestinal villus tip[J/OL]. *Nat Commun*, 2020, 11: 1936. DOI: 10.1038/s41467-020-15714-x.
- [22] BITON M, HABER A L, ROGEL N, BURGINS G, BEYAZS, SCHNELLA, et al. Thelper cell cytokines modulate intestinal stem cell renewal and differentiation[J/OL]. *Cell*, 2018, 175: 1307-1320.e22. DOI: 10.1016/j.cell.2018.10.008.
- [23] BARKER N, VAN ES J H, 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[J]. *Nature*, 2007, 449: 1003-1007.
- [24] TAKEDA N, JAIN R, LEBOEUF M R, WANG Q H, LU M M, EPSTEIN J A. Interconversion between intestinal stem cell populations in distinct niches[J]. *Science*, 2011, 334: 1420-1424.
- [25] YAN K S, CHIA L A, LI X N, OOTANI A, SU J, LEE J Y, et al. The intestinal stem cell markers Bmi1 and Lgr5 identify two functionally distinct populations[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 466-471.
- [26] MUÑOZ J, STANGE D E, SCHEPERS A G, VAN DE WETERING M, KOO B K, ITZKOVITZ S, et al. The Lgr5 intestinal stem cell signature: robust expression of proposed quiescent '+4' cell markers[J]. *EMBO J*, 2012, 31: 3079-3091.
- [27] METCALFE C, KLJAVIN N M, YBARRA R, DE SAUVAGE F J. Lgr5<sup>+</sup> stem cells are indispensable for radiation-induced intestinal regeneration[J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 14: 149-159.
- [28] TETTEH P W, BASAK O, FARIN H F, WIEBRANDS K, KRETZSCHMAR K, BEGTHEL H, et al. Replacement of lost Lgr5-positive stem cells through plasticity of their enterocyte-lineage daughters[J]. *Cell Stem Cell*, 2016, 18: 203-213.
- [29] BARRIGA F M, MONTAGNI E, MANA M, MENDEZ-LAGO M, HERNANDO-MOMBLONA X,

- SEVILLANO M, et al. Mex3a marks a slowly dividing subpopulation of Lgr5<sup>+</sup> intestinal stem cells[J/OL]. *Cell Stem Cell*, 2017, 20: 801-816.e7. DOI: 10.1016/j.stem.2017.02.007.
- [30] AYYAZ A, KUMAR S, SANGIORGI B, GHOSHAL B, GOSIO J, OULADAN S, et al. Single-cell transcriptomes of the regenerating intestine reveal a revival stem cell[J]. *Nature*, 2019, 569: 121-125.
- [31] HARNACK C, BERGER H, ANTANAVICIUTE A, VIDAL R, SAUER S, SIMMONS A, et al. R-spondin 3 promotes stem cell recovery and epithelial regeneration in the colon[J/OL]. *Nat Commun*, 2019, 10: 4368. DOI: 10.1038/s41467-019-12349-5.
- [32] GSTAIGER M, LUKE B, HESS D, OAKELEY E J, WIRBELAUER C, BLONDEL M, et al. Control of nutrient-sensitive transcription programs by the unconventional prefolin URI[J]. *Science*, 2003, 302: 1208-1212.
- [33] CHAVES-PÉREZ A, THOMPSON S, DJOUDER N. Roles and functions of the unconventional prefolin URI[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1106: 95-108.
- [34] CHAVES-PÉREZ A, YILMAZ M, PERNA C, DE LA ROSA S, DJOUDER N. URI is required to maintain intestinal architecture during ionizing radiation[J/OL]. *Science*, 2019, 364: eaaq1165. DOI: 10.1126/science.aaq1165.
- [35] CLEVERS H. The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment[J]. *Cell*, 2013, 154: 274-284.
- [36] KOLLIGS F T, HU G, DANG C V, FEARON E R. Neoplastic transformation of RK3E by mutant beta-catenin requires deregulation of Tcf/Lef transcription but not activation of c-myc expression[J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19: 5696-5706.
- [37] GURUMURTHY S, XIE S Z, ALAGESAN B, KIM J, YUSUF R Z, SAEZ B, et al. The Lkb1 metabolic sensor maintains haematopoietic stem cell survival[J]. *Nature*, 2010, 468: 659-663.
- [38] GAO Y J, YAN Y, TRIPATHI S, PENTINMIKKO N, AMARAL A, PÄIVINEN P, et al. LKB1 represses ATOH1 via PDK4 and energy metabolism and regulates intestinal stem cell fate[J/OL]. *Gastroenterology*, 2020, 158: 1389-1401.e10. DOI: 10.1053/j.gastro.2019.12.033.
- [39] CLEVERS H, BATLLE E. SnapShot: the intestinal crypt [J/OL]. *Cell*, 2013, 152: 1198-1198.e2. DOI: 10.1016/j.cell.2013.02.030.
- [40] CHEN L, VASOYA R P, TOKE N H, PARTHASARATHY A, LUO S, CHILES E, et al. HNF4 regulates fatty acid oxidation and is required for renewal of intestinal stem cells in mice[J/OL]. *Gastroenterology*, 2020, 158: 985-999.e9. DOI: 10.1053/j.gastro.2019.11.031.
- [41] DE MEY S, DUFAIT I, JIANG H, CORBET C, WANG H, VAN DE GUCHT M, et al. Dichloroacetate radiosensitizes hypoxic breast cancer cells[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: E9367. DOI: 10.3390/ijms21249367.
- [42] CHAUDHARI S, DEVLIN A. Intestinal co-culture system to study TGR5 agonism and gut restriction[J/OL]. *BIO-PROTOCOL*, 2021, 11: e3948. DOI: 10.21769/BioProtoc.3948.
- [43] ALEMI F, POOLE D P, CHIU J, SCHOONJANS K, CATTARUZZA F, GRIDER J R, et al. The receptor TGR5 mediates the prokinetic actions of intestinal bile acids and is required for normal defecation in mice[J]. *Gastroenterology*, 2013, 144: 145-154.
- [44] CHÁVEZ-TALAVERA O, TAILLEUX A, LEFEBVRE P, STAELS B. Bile acid control of metabolism and inflammation in obesity, type 2 diabetes, dyslipidemia, and nonalcoholic fatty liver disease[J/OL]. *Gastroenterology*, 2017, 152: 1679-1694.e3. DOI: 10.1053/j.gastro.2017.01.055.
- [45] HUI S C, HUANG L, WANG X L, ZHU X H, ZHOU M, CHEN M T, et al. Capsaicin improves glucose homeostasis by enhancing glucagon-like peptide-1 secretion through the regulation of bile acid metabolism via the remodeling of the gut microbiota in male mice[J]. *FASEB J*, 2020, 34: 8558-8573.
- [46] SINHA S R, HAILESELASSIE Y, NGUYEN L P, TROPINI C, WANG M, BECKER L S, et al. Dysbiosis-induced secondary bile acid deficiency promotes intestinal inflammation[J/OL]. *Cell Host Microbe*, 2020, 27: 659-670.e5. DOI: 10.1016/j.chom.2020.01.021.
- [47] SORRENTINO G, PERINO A, YILDIZ E, EL ALAM G, BOU SLEIMAN M, GIOIELLO A, et al. Bile acids signal via TGR5 to activate intestinal stem cells and epithelial regeneration[J/OL]. *Gastroenterology*, 2020, 159: 956-968.e8. DOI: 10.1053/j.gastro.2020.05.067.
- [48] PIWECKA M, GLAŽAR P, HERNANDEZ-MIRANDA L R, MEMCZAK S, WOLF S A, RYBAK-WOLF A, et al. Loss of a mammalian circular RNA locus causes miRNA deregulation and affects brain function[J/OL]. *Science*, 2017, 357: eaam8526. DOI: 10.1126/science.aam8526.
- [49] ZHU P P, ZHU X X, WU J Y, HE L Y, LU T K, WANG Y Y, et al. IL-13 secreted by ILC2s promotes the self-renewal of intestinal stem cells through circular RNA circPan3[J]. *Nat Immunol*, 2019, 20: 183-194.

[本文编辑] 魏莎莎, 孙 岩