

肠道干细胞标记物的研究进展

李梅 童乐 黄玲 唐小涵 张长城 郭煜晖*

(三峡大学国家中医药管理局中药药理科研三级实验室, 三峡大学健康医学院, 宜昌 443002)

摘要 肠道干细胞(intestinal stem cells, ISCs)除了具有自我更新能力和多能性外, 还表现出活跃的增殖、信号活动以及特殊的表观遗传和代谢特征。其主要作用是维护肠道组织的稳态、修复受损的肠道黏膜和调节肠道细胞分化。目前, 主要有两种ISCs, 各自拥有不同的特异性标记物且具有广泛不同的生物学功能, 但都与肠道疾病的发生和发展关系密切。然而, ISCs标记物的缺乏严重限制了对ISCs生物学特性的研究, 阻碍了临床上ISCs及其衍生物用于治疗肠道相关疾病的研究进程。以下就近年来ISCs标记物及肠道诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)的研究进展作一综述, 旨在为临床治疗肠道疾病提供有益线索。

关键词 肠道干细胞; Lgr5; Olfm4; Bmi1; Lrig1

Progresses in the Research of Intestinal Stem Cells Markers

LI Mei, TONG Le, HUANG Ling, TANG Xiaohan, ZHANG Changcheng, GUO Yuhui*

(Third-Grade Pharmacological Laboratory on Traditional Chinese Medicine,

State Administration of Traditional Chinese Medicine, Medical College, China Three Gorges University, Yichang 443002, China)

Abstract In addition to self-renewal and pluripotency, ISCs (intestinal stem cells) also exhibit active proliferation, signaling activities, and special epigenetic and metabolic characteristics. The main role is to maintain the homeostasis of intestinal tissue, repair damaged intestinal mucosa and regulate intestinal cell differentiation. At present, there are two main types of ISCs, each of which has different specific markers and widely different biological functions, but they are closely related to the occurrence and development of intestinal diseases. Nevertheless, the lack of ISCs markers seriously limits the study of the biological characteristics of ISCs and hinders the clinical application of ISCs and its derivatives in the treatment of gut-related diseases. This article reviews the research progress of ISCs markers and intestinal iPSCs (induced pluripotent stem cells) in recent years, intend to provide useful clues for the clinical treatment of intestinal diseases.

Keywords intestinal stem cells; Lgr5; Olfm4; Bmi1; Lrig1

肠道干细胞(intestinal stem cells, ISCs)主要位于肠黏膜隐窝内, 具有持久的增殖和分化能力, 其主要作用是促进肠上皮的持续更新、维持肠黏膜屏障结构和功能的完整以及修复受损的肠道黏膜, 如参与肠道炎症、结直肠癌(colorectal cancer, CRC)等病理过程的发生发展。然而, 特异性的、可靠的ISCs

标记物是获取和培养ISCs的前提和关键。识别和检测ISCs标记物表达和变化, 可以准确鉴定ISCs的存在位置、评价其分化和活性状态、研究其异质性和生物学特性, 为ISCs及肠类器官用于治疗肠道疾病、体外疾病建模、再生医学及药物开发等提供帮助。在本文中, 我们总结了近年来已经发现的几种ISCs

收稿日期:2023-04-09 接受日期: 2023-07-10

国家自然科学基金(批准号: 81873349)资助的课题

*通讯作者。Tel: 15572761298, E-mail: 381977017@qq.com

Received: April 9, 2023 Accepted: July 10, 2023

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81873349)

*Corresponding author. Tel: +86-15572761298, E-mail: 381977017@qq.com

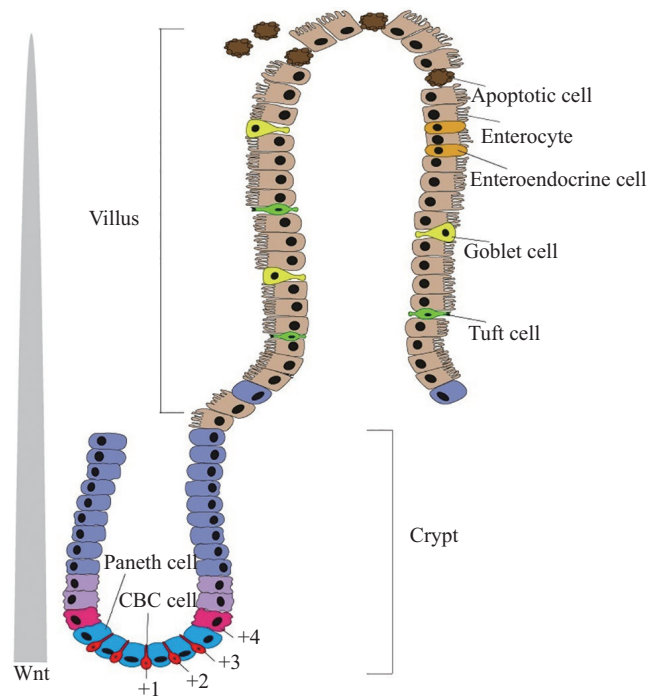


图1 肠道隐窝-绒毛结构(根据参考文献[3]修改)

Fig.1 Intestinal crypt-villus structure (modified from reference [3])

标记物,包括Lgr5、Bmi1和Lrig1等,通过了解这些标记物的生物学功能以及它们在组织稳态过程中的作用,为ISCs及诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)来源肠道类器官用于治疗肠道相关疾病提供更多可能。

1 肠道干细胞

在过去的研究中,定义了两种类型的干细胞:循环隐窝基底柱状细胞(the crypt base columnar cell, CBC)和标签保留细胞(label retaining cells, LRCs)。CBCs是位于隐窝底部Paneth细胞之间的长楔形细胞,每天分裂一次,是各种肠道谱系细胞的共同来源;LRCs是慢周期ISCs,位于Paneth细胞上方“+4”位置附近^[1]。以往对ISCs的研究主要集中于沿肠隐窝的位置及其多能性,而越来越多的证据表明ISCs存在于不同的细胞状态中(图1)。

迄今为止,许多研究强调肠道中存在两种干细胞群体。一种是活性干细胞(active ISC, A-ISCs),普遍存在于隐窝基部,以Lgr5为标志,在上皮更新过程中发生有规律的分裂,对损伤或应激敏感;另一种是静止干细胞(quiescent stem cells, Q-ISCs)位于相对于隐窝基部的“+4”位置,以Bmi1为标志,对稳态上皮更新没有贡献或贡献很小,但在损伤或应激后介导

上皮再生^[1]。当受到生理或病理信号作用时,干细胞不断分裂产生祖细胞(或交通放大细胞),再通过多轮分裂迅速扩大并移动到隐窝的内表面,成为成熟的功能性肠道上皮细胞,最终到达绒毛顶端发生凋亡并脱落至肠腔中^[2]。此外,ISCs与其他肠道细胞之间存在一系列复杂的信号调控网络,如Wnt、Notch等信号通路^[3]。

现今,借助干细胞技术和组织工程技术,可以将体细胞来源的iPSCs引导定向分化成特定类型的细胞,以取代存在功能故障的细胞或组织,用于预防和治疗肠道损伤相关疾病。总之,ISCs的作用涉及到肠道生理和病理过程的多个方面,充分发挥其优点并应用于治疗肠道疾病仍需要大量的努力。

2 肠道干细胞标记物

ISCs标记物能在机体发挥适当作用,它是存在于干细胞表面或内部的分子、蛋白质或其他生物分子。越来越多的证据表明,通过识别和检测ISCs标记物,可以准确鉴定ISCs的存在和位置,为进一步研究ISCs的异质性和生物学特性提供有力的手段。目前已经发现的ISCs标记物有Lgr5、Olfm4、Bmi1、Lrig1等。

2.1 活性干细胞标记物

2.1.1 Lgr5 Lgr5(leucine-rich repeat-containing G

protein-coupled receptor 5, 又称Gpr49)编码一个七次跨膜结构域受体, 属于G蛋白偶联受体中的视紫红质样家族(rhodopsin-like family), 它表达于细胞表面, 存在于肠道、毛囊和皮肤等各种组织中^[4]。成年小鼠中进行的谱系追踪实验发现Lgr5⁺CBCs可以生成所有的上皮谱系, 证明Lgr5是CBCs的特异性标记物, 对小肠和结肠稳态再生有很大的贡献, 而小肠的Lgr5⁺细胞比结肠的分裂更活跃反映了两个器官上皮细胞转化率的差异^[5]。Lgr5⁺ISCs的自我更新和高分化潜在在肠黏膜损伤修复中发挥重要作用, 且以Wnt/ β -catenin和Notch信号通路为靶点的联合治疗以及ISCs移植可以为临床治疗溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)开辟新途径^[6]。另外, Lgr5在结肠癌、肝脏肿瘤等都有富集^[7]。基于Lgr5⁺ISCs的发现, 肠类器官体外培养系统随之建立, 人类结肠、腺瘤和腺癌的长期培养方案也得到了发展^[8]。总之, Lgr5作为A-ISCs的标记物毋庸置疑, 可以有效地识别和研究A-ISCs, 调节多种信号通路维持肠隐窝稳态和修复肠道损伤, 在癌症和炎症性肠病(inflammatory bowel diseases, IBD)中具有重要的生物学意义和应用前景。

2.1.2 Olfm4 *Olfm4*(olfactomedin-domain 4, 又称*GW112*或*hGC-1*)基因最初是从粒细胞集落刺激因子处理的人造血髓系细胞中克隆而来, 位于染色体13q14.3上, 属于olfactomedin家族, 是多种信号通路的靶基因; *Olfm4*蛋白是一种分泌性糖蛋白(72 kDa), 参与细胞黏附和迁移, 存在于细胞膜、细胞质、细胞核等, 主要表达在骨髓和胃肠道组织^[9]。*Olfm4*可以调节Wnt信号通路以维持成体干细胞龛, 与Lgr5共表达于肠隐窝底部, 是ISCs的替代标记物, 并已被确定为多种胃肠道肿瘤的预后生物标志物^[9]。*Olfm4*会被分泌到肠道黏液中与防御素结合后发挥抗炎功能, 其表达水平在IBD中会显著上调, 且*Olfm4*缺失会通过基质金属蛋白酶-9依赖的机制显著加重DSS诱导的结肠炎^[10]; 此外, *Olfm4*的消融通过干性和上皮-间充质转化促进癌症转移, 为控制癌症进展提出新途径^[11]。综上所述, *Olfm4*可作为CBCs的特异性标记物, 能参与调节消化系统疾病炎症反应和诊断胃肠道肿瘤, 其临床价值有待进一步开发。

2.1.3 Smoc2 分泌蛋白酸性且富含半胱氨酸(Secreted protein acidic and rich in cysteine, SPARC)相关的模块化钙结合蛋白-2(SPARC-related modular

calcium-binding protein-2, Smoc2), 是一种分泌蛋白, 属于SPARC基质细胞蛋白家族, 广泛表达于不同组织中, 参与调节细胞周期、血管生成、纤维化和组织钙化等多种生物过程^[12]。*Smoc2*在小鼠肠道隐窝及CRC组织中特异表达, 它不是Wnt的靶基因, 但其表达会间接受到Wnt信号活性的影响, *Smoc2*也是CRC进展中的另一候选肿瘤抑制因子, *Smoc2*升高与CRC的活动、增殖和转移密切相关^[13]。*Smoc2*在胃癌等多种恶性肿瘤中的表达及其功能意义也有研究^[14]。总之, *Smoc2*可以标记肠道隐窝中的CBCs, 能介导肠道癌症的发生发展, 可以为治疗肠道相关疾病提供新思路。

2.1.4 Ascl2 *Ascl2*(achaete scutellike 2)是碱性螺旋-环-螺旋(bHLH)转录因子家族的成员, 与DNA结合并调节基因表达, 在控制肠道上皮、神经系统和内分泌腺等多种组织的发育和分化中起着重要作用^[15]。*Ascl2*维持肠上皮ISCs稳态, 其缺失会导致Lgr5⁺ISCs迅速消失, 此外, 非干细胞中*Ascl2*的错误表达也会诱导肠道绒毛隐窝增生和异位^[15]。*Ascl2*通过调节白细胞介素-11受体促进ISCs后代去分化, 从而介导ISCs损伤后的修复与再生, 表明*Ascl2*对隐窝祖细胞去分化来恢复消融的ISCs具有重要性意义^[15]。在结肠腺癌中, *Ascl2*通过下调DUSP4(dual specificity phosphatase 4)的表达间接影响肿瘤干细胞和肿瘤免疫细胞浸润, 且结肠腺癌的免疫治疗敏感性与Wnt/ β -catenin的激活有关^[16]。将干细胞*Ascl2*报告子整合到人类和小鼠基因组中标记ISCs的基础上结合类器官技术, 会为人和小鼠成体干细胞生物学的基础研究提供便利^[17]。简言之, *Ascl2*作为Wnt靶基因, 维持隐窝Lgr5⁺ISCs的干性, 是肠道组织发育和稳态维持的关键调节因子, 需要进一步开发此类干细胞的潜在应用价值。

2.1.5 Rnf43 *Rnf43*(ring finger protein 43, Rnf43)是一种跨膜E3泛素连接酶, 在细胞增殖、分化和迁移等多种细胞过程的调节中起着至关重要的作用, 如通过作为Wnt/ β -catenin信号的基本反馈抑制因子调节CBCs的稳态^[18]。*Rnf43*在保守丝氨酸进行的磷酸化调控是小鼠肠道类器官生长所必需的, 这可能是治疗*Rnf43*突变肿瘤的策略^[19]。人类CRC衍生的类器官携带与MSI-high和*BRAF*^{V600E}突变相关的*Rnf43*移码突变, 说明*Rnf43*突变的类器官依赖于内源性或外源性Wnt配体, 而PORCN抑制剂显著抑制

类器官增殖和异种移植瘤的发生, 这为治疗 *Rnf43* 突变相关 CRC 提供新思路^[20]。有研究试图通过表征突变型与野生型结直肠癌的分子特征, 深入研究 *R-spondin* 和 *Rnf43* 突变基因融合驱动 Wnt 依赖性结直肠癌肿瘤起始的潜在原理, 为临床克服 Wnt 靶向药物和免疫治疗的影响提供策略^[21]。据此推断, *Rnf43* 是 CBCs 的特异性标记物, 其突变类型与致癌潜力相关, 靶向 RNF43 和 Wnt 信号通路是一种潜在的癌症治疗策略。

2.2 静止期干细胞标记物

2.2.1 Bmi1 *Bmi1* 基因最初是在小鼠淋巴瘤前病毒插入筛选中被发现的, 属于 PcG (the Polycomb group) 基因家族, 是 PRC1 (Poly comb repressive complex 1) 的成员之一, 它编码一个 324 个氨基酸的蛋白, 在胚胎发育期间的形态发生和造血过程中发挥重要作用, 主要定位于细胞核^[22]。*Bmi1* 主要表达于“+4”位置, *Bmi1*⁺ 细胞是小肠上皮损伤时的储备干细胞, 可以作为替代并补充完全缺失的 *Lgr5*⁺ISCs, 从而避免活跃循环的 ISCs 耗尽, 防止损伤细胞的积累导致肿瘤的发展, 体外单个 *Bmi1*⁺ISCs 培养也可获得 *Lgr5*⁺ 细胞^[22]。*Bmi1* 通过阻止以细胞周期抑制因子 P16^{INK4a} 蛋白积累为特征的衰老来维持肠道紧密连接、上皮屏障功能和微生物群平衡, 清除衰老肠上皮中细胞周期抑制因子 P16^{INK4a} 蛋白阳性细胞将是维持屏障功能和菌群平衡的新方法^[23]。遗传性或暂时性 *Bmi1* 缺失会导致 Treg 细胞身份的丧失, 扰乱表观基因组, 并将 Treg 细胞转化为 Th1/Th17 样促炎细胞, 而且这一转变与克罗恩病相关的 CD4⁺T 细胞有关^[24]。*Lgr5* 和 *Bmi1* 表达水平随着年龄的增长而增加, 而实验性坏死性小肠结肠炎后 *Lgr5*⁺ISCs 数量较低而 *Bmi1*⁺ISCs 相对保持不变, 说明 *Bmi1*⁺ISCs 会促进其损伤后的组织恢复和再生, 此发现有助于开发靶向药物用于治疗早产儿坏死性小肠结肠炎^[25]。*Bmi1* 也是基本转录因子 3 维持 CRC 干细胞表型和上皮-间充质转化的中间调节因子, 为临床治疗 CRC 提供了新的策略^[26]。总而言之, *Bmi1* 是公认的静止干细胞的标记物, 其在功能上与 *Lgr5*⁺ISCs 具有显著差异, 在胚胎发育、干细胞自我更新、分化和肿瘤发生中起着重要作用。

2.2.2 Lrig1 *Lrig1* (leucine rich repeats and immunoglobulin like domains 1) 是一个跨膜蛋白, 属于 LRIG (富含亮氨酸重复序列和免疫球蛋白样结构域)

家族, 是 ErbB 受体家族的诱导负反馈调节因子, 在维持小肠和结肠上皮稳态中发挥功能性作用, 主要通过上调 BMP 信号来调节干细胞静息状态, 表达于多种组织和器官^[27]。谱系定位显示 *Lrig1* 标记的是不同于 *Lgr5*⁺ISCs 的隐窝基部大部分 Q-ISCs, 能在损伤后增殖分裂以补充受损的隐窝, 是肠上皮生长所必需的^[28]。*Lrig1* 是一种多能肿瘤抑制因子, 缺乏 *Lrig1* 的小鼠会发生十二指肠肿瘤, 其肿瘤抑制功能可以用于临床预测病人的生存情况^[29]。因此, *Lrig1* 是一种与 Q-ISCs 密切相关的特异性标记物, 对 *Lrig1* 的研究有助于深入了解 ISCs 的生物学特性, 为治疗肠道癌症开发相关的治疗方法提供了思路。

2.2.3 TERT 端粒酶逆转录酶 (telomerase reverse-transcriptase, Tert) 最初被发现于四膜虫中, 它具有逆转录酶活性, 可以将串联 TTGGGG 重复序列添加到合成的端粒引物上, 在多种组织、器官中发挥重要的作用, 通过占据 Wnt/ β -catenin 靶基因的特定染色质位点来激活 Wnt 信号通路^[30]。*GFP*⁺ 细胞沿隐窝-绒毛轴分布类似于 LRCs, 它可以产生 *Lgr5*⁺ 细胞以及所有分化的肠细胞类型, 并有助于组织损伤后的再生, 证实 *mTert* 标志着缓慢循环的 ISCs^[31]。*Tert* 在缓解由于端粒短小而功能失调的衰老压力和防止 *mTERT*^{+/+} 细胞朝肿瘤细胞转化方面具有保护作用^[32]。衰老小鼠肠道组织病理形态发生改变, 肠道炎症因子表达水平升高, 端粒酶 mRNA 相对表达水平降低, 从而导致干细胞功能障碍。复方珍珠调脂片可能通过抗炎和增强 *Tert* 活性来改善肠道菌群和代谢物异常, 从而发挥延缓肠道衰老的作用, 为中医异病同治理论提供了生物学基础^[33]。*P53* 连续抑制端粒酶活性诱导类器官炎症模型, 再现严重或长期 UC 病例中肠上皮细胞端粒缩短, 羟基积雪草苷改善类器官的端粒完整性并诱导具有丰富杯状细胞的正常隐窝结构, 促进体外细胞增殖、提高异种移植的移植率^[34]。简而言之, *Tert* 是 Q-ISCs 的标记物之一, 提高其活性可以降低炎症反应、延缓衰老, 对治疗因端粒缩短引起的肠道疾病具有重要意义。

2.2.4 Hopx *Hopx* (the homeodomain-only protein homeobox, Hopx) 也被称为 HOP、NECC1、LAGY 等, 是最小的同源结构域蛋白, 在多种组织中广泛表达, 且作为关键转录因子参与调控细胞的增殖和分化^[35]。*Hopx*⁺ 细胞位于隐窝“+4”位置且能分化为所有成熟的肠上皮谱系; 同时在 *Lgr5*⁺ISCs 及其子细胞表面同

样有轻度表达^[35]。在肠道发育过程中, p57通过不依赖周期蛋白依赖性激酶的方式抑制转录因子 *Ascl2* 表达, 以维持 *Hopx*⁺ISC 静息和抑制隐窝底部以外的ISCs表型^[36]。在严重缺血时, 猪上皮显著的愈合能力由抗损伤 *Hopx*⁺ISCs 所驱动, 与其在肠道中的作用相似^[37]。*Hopx* 作为一种肿瘤抑制基因参与调控细胞周期和凋亡、氧化应激和DNA损伤诱导的细胞衰老等多种细胞生物过程^[38]。酮体 β -羟基丁酸酯通过调节 *Hopx* 作用于癌细胞, 表现出抑制上皮细胞增殖和抑制肿瘤生长的能力, 揭示了生酮饮食在干预预防和治疗结直肠癌生长和进展中的潜在作用^[39]。*Hopx* 可用于识别肠道隐窝中的Q-ISCs, 在调节肠道发育和抑制肿瘤方面具有十分重要的作用。

2.2.5 MEX3A *Mex3A* (Mex-3 RNA binding family member A, *Mex3a*) 是一种RNA结合蛋白(RNA binding protein, RBPs), 可作为E3泛素连接酶控制基因表达, 属于MEX3(muscle excess)蛋白家族, 它是人类和小鼠之间的同源基因, 可参与转录后调控, 在胚胎发育、上皮稳态和肿瘤发生中发挥重要作用^[40]。在小鼠中, *Mex3a* 标记了一个位于“+3/+4”隐窝位置的缓慢增殖ISCs, 在稳态条件下, *Mex3a*^{hi} 可以产生 *Lgr5*⁺ISCs, 也可以分化为其他所有肠道谱系的细胞; 当化疗或照射损伤肠上皮时, *Mex3a*^{hi} 细胞可以抵抗化疗或辐射的有害影响, 并参与受损隐窝的再生^[41]。有研究通过对 *Mex3a* 缺失小鼠模型详细表征, 发现 *Mex3a* 的缺失会导致隐窝中过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR)信号通路的异常激活, 进而导致 *Wnt*/ β -catenin通路的降低和 *Lgr5*⁺ISCs丢失, 最终引起小鼠出生生长迟缓和出生后死亡^[42]。此外, *Mex3a* 被报道在不同起源的肿瘤疾病的发生发展中发挥着复杂多样的作用, 可作为促进肿瘤增殖和迁移的新型生物标记物^[43]。总之, *Mex3a* 标志着 *Bmi1*⁺ISCs, 作为维持肠道稳态的关键调控因子在肠道上皮细胞发育、损伤后再生过程中至关重要。

3 待确定的干细胞标记物

Dcamkl-1 (doublecortin-like and CAM kinase -like 1, *Dcamkl-1*, 也称 *DCLK1*) 是CAMK家族的丝氨酸和硫氨酸激酶, 在调节微管和介导磷酸化依赖的信号转导通路中发挥重要作用, 是簇状细胞的标记物, 而作为肠道干细胞特异性标记物有待明确^[44]; 然而它在

癌症组织中过度表达, 是胃肠道肿瘤干细胞的标志物, 有助于开发基于 *DCLK1* 的新型小分子抑制剂^[45]。近期有研究提出 *DCLK1* 可以通过葡萄糖代谢途径作为潜在的抗肿瘤靶点^[46]。另外, *EphB2* (ephrin type-B receptor 2, *EphB2*) 是Eph受体家族的重要成员, 它控制着细胞在肠上皮生态位内的定位, 与其配体 *EphrinB* 的结合可以激活多种信号通路; *EphB2* 富集于ISCs, 且单个 *EphB2*^{hi} 细胞可以生成类器官^[47]。基于以上讨论, 我们可以得出如下结论: 细胞的特异性标记物在生物学研究中扮演着至关重要的角色, 对于 *Dcamkl-1*、*EphB2* 是肠干细胞特异性标记物存在争议, 需要进一步证明。

4 诱导多能干细胞及其应用

诱导多能干细胞是指已被重编程为类胚胎细胞状态的体细胞, 具有高扩增性和多能性, 能分化成特定的细胞类型且具有可塑性及自我更新能力, 在疾病建模、再生医学、药物筛选等多个领域具有重要价值, 而且诱导多能干细胞的应用避免了使用胚胎干细胞的相关伦理问题^[48]。iPSCs细胞可以进行培养和分化, 产生所有肠上皮细胞类型, 其构建的类器官可以在体外重建隐窝-绒毛极性结构, 能模拟肠道发育和形态特征, 即使经过多次传代培养也能保持肠上皮的体内特性, 具有传统动物模型和细胞培养系统无法比拟的优势^[49]。

iPSCs可以更密切地反映肠上皮的正常生理或疾病发病机制, 且具有作为移植细胞来源的潜力, 如在囊性纤维化(cystic fibrosis, CF)、感染性腹泻、IBD、肠癌等疾病的研究中发挥重要作用。iPSCs有可能作为遗传疾病CF患者来源的组织, 以评估来自同一个体不同细胞类型的CF治疗, 并作为筛选新的治疗干预措施的体外模型^[50]。iPSCs制备的自然杀伤细胞易修饰且具有强大的细胞毒性、高扩张能力、更高的持久性和靶标特异性, 可用于肿瘤的免疫治疗^[51]。人源性iPSCs可以为嵌合抗原受体T细胞的发展提供无限的T细胞来源, 极大地促进了肿瘤患者的细胞治疗及相关临床研究^[52]。使用iPSC来源的组织为人类肠道类器官疗法走向临床提出了一个详细的路线图草案, 把广泛的基础研究经验转化为临床应用, 为目前尚未满足的医疗需求提供新的解决方案^[53]。用大鼠回肠来源的类器官代替天然结肠上皮生成的功能性“小肠化结肠”具有吸收功能并显著改善肠道衰竭, 为短肠综

合征治疗提供了可行的策略^[54]。人肠类器官共培养系统也是一种很有潜力的为以肠屏障功能障碍为靶点的新型IBD药物开发工具^[55]。

肠道iPSCs及其相关来源的培养物也作为疾病模型应用于其他系统疾病。如使用人iPSC衍生的小肠上皮细胞(iPSC-SIEC)构建新型冠状病毒肺炎(COVID-19)感染模型,在感染后其紧密连接标记物、跨上皮电阻的表达降低,促炎基因的表达上升,表明iPSC-SIEC是阐明COVID-19病理学和药物开发的有用体外模型^[56]。将人潜能干细胞来源的迷走神经嵴细胞和后肠球体结合在具有神经元成分的人肠类器官中,进而产生有神经支配的肠道类器官,为研究人类肠神经病的发生发展和病理生理学提供新的机遇^[57]。总之,iPSCs作为临床前模型已结合基因组学、材料科学与工程学,被广泛应用于肠道发生、肠道转运生理、肠屏障、病原体-宿主相互作用等研究中,在促进人类肠道疾病生物学研究发展方面具有巨大潜力。

5 总结

ISCs能够促进隐窝增殖活性,一个隐窝通常包含6个独立的干细胞和两种不同类型ISCs,分别为A-ISCs和Q-ISCs,且具有不同的标记物。由于ISCs的起源和干细胞龛的调节作用,在隐窝中还存在其他具有不同标记的功能亚群^[58]。ISC独特的信号活动的变化会改变增殖状态,进而驱动表观遗传和代谢的变化,最终调节ISCs的多能性和自我更新能力^[59]。目前,Lgr5、Olfm4、Smoc2、Ascl2、Rnf43是A-ISCs公认的特异性标记物,Bmi1、Lrig1、Tert、Hopx、MEX3A可作为Q-ISCs的标记物,而Dcamk1-1、EphB2等作为特异性标记物还需要更强有力的实验室证据支持。另外Musashi1(RNA binding protein Musashi1, Msi1)、Sox9[(Sry related HMG box)-9, Sox9]会以不同水平表达在Lgr5⁺ISCs和静止期ISCs,提示Musashi1和Sox9也是潜在的ISCs标记物,对维持干细胞状态和分化起着关键作用,且能作为抗癌药物新兴靶点^[60-61]。

这些标记物中包含了跨膜蛋白、分泌蛋白、转录因子、信号分子和酶等,能通过多种方式调节肠道发育、维持肠道组织稳态和恢复受损肠道,在体外模拟肠道发育、再生中发挥重要作用。而且,iPSCs及iPSCs来源的肠道类器官可以用于研究各种

肠道感染性疾病、遗传性疾病、癌症等,大大加快治疗靶点的发现以及药物研发进程,最终为患者带来新的治疗方法,但肠道iPSC及其来源类器官的应用仍处于起步阶段,需要更广泛的研究来证实。总之,目前我们对ISCs表面标记物的了解还不够,需要发现更多新的特异性标记物来鉴定和获得不同状态的ISCs,从而更好地使用ISCs及其衍生物治疗肠道疾病。

6 存在的问题及展望

标记物的缺乏使得对ISCs的生物学特性的研究充满挑战和局限,难以开发新的治疗方法和药物来治疗肠道相关疾病和提高肠道健康水平。近年来,将以ISCs为基础的体外类器官培养应用于IBD、因化疗和放疗导致的肠道损伤是消化系统领域研究的热点之一^[62]。其中,可以克服临床应用所面临的伦理问题,但其致癌性、异质性、免疫原性仍是需要优先解决的问题^[62]。实际上,以ISCs为基础的再生医学在治疗肠道疾病方面处于早期发展阶段,而以类器官为基础的组织工程技术正在迅速兴起并有望推动下一代再生医学的发展,如有研究提出未来肠道类器官移植有望同内镜的微创疗法进行结合治疗肠道疾病^[63]。随着生物技术的不断发展和对ISCs研究的深入,我们有望发现、筛选和利用更多的特异性ISCs、iPSCs标记物。未来研究的重点包括结合各种生物技术以发现高度特异性或阶段特异性的标志物,规范和完善肠道不同ISCs来源的类器官体外培养技术和方案以提高安全性和有效性,从而更好地利用ISCs及其衍生物在体外模拟肠道疾病和再生,并进一步探究不同状态时的ISCs之间的相互作用机制及其标记物之间的联系。

参考文献 (References)

- [1] BEUMER J, CLEVERS H. Cell fate specification and differentiation in the adult mammalian intestine [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(1): 39-53.
- [2] MCCARTHY N, KRAICZY J, SHIVDASANI R A. Cellular and molecular architecture of the intestinal stem cell niche [J]. *Nat Cell Biol*, 2020, 22(9): 1033-41.
- [3] GEHART H, CLEVERS H. Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16(1): 19-34.
- [4] LEUNG C, TAN S H, BARKER N. Recent advances in Lgr5⁺ stem cell research [J]. *Trends in Cell Biology*, 2018, 28(5): 380-91.

- [5] SALEHZADEH S, HASANZAD M, KADIJANI A, et al. The expression analysis of intestinal cancer stem cell marker Lgr5 in colorectal cancer patients and the correlation with histopathological markers [J]. *J Gastrointest Cancer*, 2020, 51(2): 591-9.
- [6] ZHENG L, DUAN S L, WEN X L, et al. Molecular regulation after mucosal injury and regeneration in ulcerative colitis [J]. *FrontMol Biosci*, 2022, 9: 996057.
- [7] CAO W, LI M, LIU J, et al. LGR5 marks targetable tumor-initiating cells in mouse liver cancer [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1961.
- [8] CORRÒ C, NOVELLASDEMUNT L, LI V S W. A brief history of organoids [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2020, 319(1): C151-65.
- [9] WANG X Y, CHEN S H, ZHANG Y N, et al. Olfactomedin-4 in digestive diseases: a mini-review [J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(17): 1881-7.
- [10] WANG X, CHEN S, WANG J, et al. Olfactomedin-4 deletion exacerbates DSS-induced colitis through a matrix metalloproteinase-9-dependent mechanism [J]. *Int J Biol Sci*, 2023, 19(7): 2150-66.
- [11] MA H W, KIM J M, KIM D H, et al. Olfactomedin 4 produces dysplasia but suppresses metastasis of colon cancer [J]. *Cancer Gene Ther*, 2023, 30(5): 694-703.
- [12] GAO Q, MOK H P, ZHUANG J. Secreted modular calcium-binding proteins in pathophysiological processes and embryonic development [J]. *Chin Med J*, 2019, 132(20): 2476-84.
- [13] JANG B G, KIM H S, BAE J M, et al. SMOC2, an intestinal stem cell marker, is an independent prognostic marker associated with better survival in colorectal cancers [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 14591.
- [14] HYUN C L, PARK S J, KIM H S, et al. The intestinal stem cell marker SMOC2 Is an independent prognostic marker associated with better survival in gastric cancer [J]. *Anticancer Res*, 2021, 41(7): 3689-98.
- [15] MURATA K, JADHAV U, MADHA S, et al. Ascl2-dependent cell dedifferentiation drives regeneration of ablated intestinal stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 26(3): 377-90, e6.
- [16] WU L, SUN S, QU F, et al. ASCL2 affects the efficacy of immunotherapy in colon adenocarcinoma based on single-cell RNA sequencing analysis [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 829640.
- [17] HEINZ M C, OOST K C, Snippert H J G. Introducing the stem cell ASCL2 reporter STAR into intestinal organoids [J]. *STAR protoc*, 2020, 1(3): 100126.
- [18] COLOZZA G, PARK S Y, KOO B K. Clone wars: from molecules to cell competition in intestinal stem cell homeostasis and disease [J]. *Exp Mol Med*, 2022, 54(9): 1367-78.
- [19] TSUKIYAMA T, ZOU J, KIM J, et al. A phospho-switch controls RNF43-mediated degradation of Wnt receptors to suppress tumorigenesis [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4586.
- [20] YAMAMOTO D, OSHIMA H, WANG D, et al. Characterization of RNF43 frameshift mutations that drive Wnt ligand- and R-spondin-dependent colon cancer [J]. *J Pathol*, 2022, 257(1): 39-52.
- [21] SEEBER A, BATTAGLIN F, ZIMMER K, et al. Comprehensive analysis of r-spondin fusions and RNF43 mutations implicate novel therapeutic options in colorectal cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2022, 28(9): 1863-70.
- [22] YAN K S, CHIA L A, Li X, et al. The intestinal stem cell markers Bmi1 and Lgr5 identify two functionally distinct populations [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(2): 466-71.
- [23] ZHOU J, HOU C, CHEN H, et al. P16^{INK4a} deletion ameliorates damage of intestinal epithelial barrier and microbial dysbiosis in a stress-induced premature senescence model of Bmi-1 deficiency [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 671564.
- [24] GONZALEZ M M, BAMIDELE A O, SVINGEN P A, et al. BMI1 maintains the Treg epigenomic landscape to prevent inflammatory bowel disease [J]. *J Clin Invest*, 2021, 131(12): e140755.
- [25] HOSFIELD B D, SHELLEY W C, MESFIN F M, et al. Age disparities in intestinal stem cell quantities: a possible explanation for preterm infant susceptibility to necrotizing enterocolitis [J]. *Pediatr Surg Int*, 2022, 38(12): 1971-9.
- [26] ZHOU W, YUN Z, WANG T, et al. BTF3-mediated regulation of BMI1 promotes colorectal cancer through influencing epithelial-mesenchymal transition and stem cell-like traits [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 187: 800-10.
- [27] HERDENBERG C, HEDMAN H. Hypothesis: do lrig proteins regulate stem cell quiescence by promoting BMP signaling [J]? *Stem Cell Rev Rep*, 2023, 19(1): 59-66.
- [28] HOPTON R E, JAHAHN N J, ZEMPER A E. The role of Lrig1 in the development of the colonic epithelium [J]. *bioRxiv*, 2023, doi: 10.1101/2023.05.02.539114.
- [29] JI Y, KUMAR R, GOKHALE A, et al. LRIG1, a regulator of stem cell quiescence and a pleiotropic feedback tumor suppressor [J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 82: 120-33.
- [30] DRATWA M, WYSOCZAŃSKA B, ŁACINA P, et al. TERT-regulation and roles in cancer formation [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 589929.
- [31] MONTGOMERY R K, CARLONE D L, RICHMOND C A, et al. Mouse telomerase reverse transcriptase (mTert) expression marks slowly cycling intestinal stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(1): 179-84.
- [32] SUN L, CHIANG J Y, CHOI J Y, et al. Transient induction of telomerase expression mediates senescence and reduces tumorigenesis in primary fibroblasts [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(38): 18983-93.
- [33] SHENGHUA P, ZIQIN Z, SHUYU T, et al. An integrated fecal microbiome and metabolome in the aged mice reveal anti-aging effects from the intestines and biochemical mechanism of FuFang zhenshu TiaoZhi (FTZ) [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 121: 109421.
- [34] STOCK A J, AYYAR S, KASHYAP A, et al. Boosting NAD ameliorates hematopoietic impairment linked to short telomeres *in vivo* [J]. *Geroscience*, 2023, doi: 10.1007/s11357-023-00752-2.
- [35] LIU Y, ZHANG W. The role of HOPX in normal tissues and tumor progression [J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(1): BSR20191953.
- [36] CREFF J, NOWOSAD A, PREL A, et al. p57Kip2 acts as a transcriptional corepressor to regulate intestinal stem cell fate and proliferation [J]. *Cell Rep*, 2023, 42(6): 112659.
- [37] STEWART A S, SCHAAF C R, LUFF J A, et al. HOPX⁺ injury-resistant intestinal stem cells drive epithelial recovery after severe intestinal ischemia [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2021, 321(5): 588-G602.

- [38] CASPA GOKULAN R, YAP L F, PATERSON I C. HOPX: a unique homeodomain protein in development and tumor suppression [J]. *Cancers*, 2022, 14(11): 2764.
- [39] KHOZIANOVA S, ROZENBERG G, LEVY M. Ketogenic diet and beta-hydroxybutyrate in colorectal cancer [J]. *DNA Cell Biol*, 2022, 41(12): 1007-11.
- [40] CHATTERJI P, RUSTGI A K. RNA binding proteins in intestinal epithelial biology and colorectal cancer [J]. *Trends Mol Med*, 2018, 24(5): 490-506.
- [41] LIAO Z, HU C, GAO Y. Mechanisms modulating the activities of intestinal stem cells upon radiation or chemical agent exposure [J]. *J Radiat Res*, 2022, 63(2): 149-57.
- [42] PEREIRA B, AMARAL A L, DIAS A, et al. MEX3A regulates Lgr5⁺ stem cell maintenance in the developing intestinal epithelium [J]. *EMBO Rep*, 2020, 21(4): e48938.
- [43] LEDERER M, MÜLLER S, GLASS M, et al. Oncogenic potential of the dual-function protein MEX3A [J]. *Biology*, 2021, 10(5): 415.
- [44] HENDEL S K, KELLERMANN L, HAUSMANN A, et al. Tuft cells and their role in intestinal diseases [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 822867.
- [45] 陈玉平, 李柯良, 盛春泉, 等. 双肾上腺皮质激素样激酶1小分子抑制剂的研究进展[J]. *药理学报*(CHEN Y P, LI K L, SHENG C Q, et al. Research progress of small molecule inhibitors of doublecortin-like kinase 1 [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*), 2022, 57(10): 2914-20.
- [46] LU Q, FENG H, CHEN H, et al. Role of DCLK1 in oncogenic signaling [J]. *Int J Oncol*, 2022, 61(5): 137.
- [47] TAKASE Y, FUJISHIMA K, TAKAHASHI T. The 3D culturing of organoids from murine intestinal crypts and a single stem cell for organoid research [J]. *J Vis Exp*, 2023, doi: 10.3791/65219.
- [48] ABOUL-SOUD M A M, ALZAHIRANI A J, MAHMOUD A. Induced pluripotent stem cells (iPSCs)-roles in regenerative therapies, disease modelling and drug screening [J]. *Cells*, 2021, 10(9): 2319.
- [49] BROOKS I R, GARRONE C M, KERINS C, et al. Functional genomics and the future of iPSCs in disease modeling [J]. *Stem Cell Reports*, 2022, 17(5): 1033-47.
- [50] SILVA I A L, LASELVA O, LOPES-PACHECO M. Advances in preclinical *in vitro* models for the translation of precision medicine for cystic fibrosis [J]. *J Pers Med*, 2022, 12(8): 1321.
- [51] KARAGIANNIS P, KIM S I. iPSC-Derived natural killer cells for cancer immunotherapy [J]. *Mol Cells*, 2021, 44(8): 541-8.
- [52] SADEQI NEZHAD M, ABDOLLAHPOUR-ALITAPPEH M, REZAEI B, et al. Induced pluripotent stem cells (iPSCs) provide a potentially unlimited t cell source for CAR-T cell development and off-the-shelf products [J]. *Pharm Res*, 2021, 38(6): 931-45.
- [53] KASENDRA M, TROUTT M, BRODA T, et al. Intestinal organoids: roadmap to the clinic [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2021, 321(1): G1-10.
- [54] SUGIMOTO S, KOBAYASHI E, FUJII M, et al. An organoid-based organ-repurposing approach to treat short bowel syndrome [J]. *Nature*, 2021, 592(7852): 99-104.
- [55] ANGUS H C K, BUTT A G, SCHULTZ M, et al. Intestinal organoids as a tool for inflammatory bowel disease research [J]. *Front Med*, 2019, 6: 334.
- [56] YAMADA S, NODA T, OKABE K, et al. SARS-CoV-2 induces barrier damage and inflammatory responses in the human iPSC-derived intestinal epithelium [J]. *J Pharmacol Sciences*, 2022, 149(3): 139-46.
- [57] LOFFET E, BROSSARD L, MAHE M M. Pluripotent stem cell derived intestinal organoids with an enteric nervous system [J]. *Methods Cell Biol*, 2020, 159: 175-99.
- [58] ZHANG Z, HUANG J. Intestinal stem cells - types and markers [J]. *Cell Biol Int*, 2013, 37(5): 406-14.
- [59] BAULIES A, ANGELIS N, LI V S W. Hallmarks of intestinal stem cells [J]. *Development*, 2020, 147(15): dev182675.
- [60] TRIPATHI S K, SAHOO R K, BISWAL B K. SOX9 as an emerging target for anticancer drugs and a prognostic biomarker for cancer drug resistance [J]. *Drug Discov Today*, 2022, 27(9): 2541-50.
- [61] FOROUZANFAR M, LACHINANI L, DORMIANI K, et al. Intracellular functions of RNA-binding protein, Musashi1, in stem and cancer cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 193.
- [62] SILVA-PEDROSA R, SALGADO A J, FERREIRA P E. Revolutionizing disease modeling: the emergence of organoids in cellular systems [J]. *Cells*, 2023, 12(6): 930.
- [63] SUGIMOTO S, KOBAYASHI E, KANAI T, et al. In vivo intestinal research using organoid transplantation [J]. *Keio J Med*, 2022, 71(4): 73-81.