

- [16] Sun LS, Li G, DiMaggio CJ, et al. Feasibility and pilot study of the Pediatric Anesthesia Neurodevelopment Assessment (PANDA) Project [J]. *J Neurosurg Anesthesiol*, 2012, 24(4):382-388.
- [17] Miller TL, Park R, Sun LS. Report of the Third PANDA Symposium on "Anesthesia and Neurodevelopment in Children" [J]. *J Neurosurg Anesthesiol*, 2012, 24(4):357-361.
- [18] Byrne MW, Ascherman JA, Casale P, et al. Elective procedures and anesthesia in children; pediatric surgeons enter the dialogue on neurotoxicity questions, surgical options, and parental concerns [J]. *J Neurosurg Anesthesiol*, 2012, 24(4):396-400.
- [19] Miller TL, Park R, Sun LS. Report of the Fourth PANDA Symposium on "Anesthesia and Neurodevelopment in Children" [J]. *J Neurosurg Anesthesiol*, 2014, 26(4):344-348.
- [20] Byrne MW, Casale P, Garzon M, et al. Pediatric surgeons and anesthesiologists expand the dialogue on the neurotoxicity question, rationale for early and delayed surgeries, and practice changes while awaiting definitive evidence [J]. *J Neurosurg Anesthesiol*, 2014, 26(4):391-395.
- [21] McCann ME, Schouten AN. Beyond survival; influences of blood pressure, cerebral perfusion and anesthesia on neurodevelopment [J]. *Paediatr Anaesth*, 2014, 24(1):68-73.
- [22] McCann ME, Schouten AN, Dobija N, et al. Infantile postoperative encephalopathy: perioperative factors as a cause for concern [J]. *Pediatrics*, 2014, 133(3):e751-757.
- [23] Rhondali O, Juhel S, Mathews S, et al. Impact of sevoflurane anesthesia on brain oxygenation in children younger than 2 years [J]. *Paediatr Anaesth*, 2014, 24(7):734-740.

(收稿日期:2015-06-23 修回日期:2015-10-07)

• 综述 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.04.044

热量限制与小肠干细胞的研究进展

张 霜^{1,2}, 罗 文¹综述, 张吉翔^{1,2△} 审校

(1. 南昌大学第二附属医院消化内科; 2. 江西省分子医学重点实验室; 江西南昌 330006)

[关键词] 热量限制; 小肠干细胞; Paneth 细胞; 雷帕霉素靶蛋白复合物 1

[中图分类号] R574.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)04-0556-03

小肠是消化和吸收的主要部位, 其上皮由多种细胞组成, 绒毛部上皮含吸收细胞、杯状细胞和少量的内分泌细胞; 小肠腺除上述细胞外, 还有潘氏细胞和小肠干细胞(intestinal stem cell, ISC)。潘氏细胞是小肠腺的特征性细胞, 常三五成群位于小肠腺底部, 与 ISC 相邻, 并且能够影响 ISC 的增殖和分化, 其分泌防御素、溶菌酶, 对肠道微生物有杀灭作用。ISC 位于小肠腺下半部, 细胞可以不断增殖、分化、向上迁移, 补充在绒毛顶端脱落的吸收细胞和杯状细胞; 也可以分化为潘氏细胞和内分泌细胞。小肠上皮细胞在哺乳动物里面是一类具有自我更新能力的细胞, 而且更新周期很短, 绒毛上皮细胞的更新周期为 3~6 d, 比皮肤和骨髓的更新更快, 所以小肠腺里大多数细胞都能很快地增殖、分化, 从而适应绒毛部上皮短暂的更新周期。有研究发现, 在营养素缺乏的情况下, 肿瘤细胞与正常细胞间存在差异性的调节^[1]。肿瘤细胞不能对营养缺乏做出相应的反应, 因此会促进其凋亡, 而正常细胞能适应这一改变。更重要的是, 当营养缺乏与化疗相结合后, 正常细胞可以更好的耐受化疗, 而肿瘤细胞却更易凋亡。该项研究说明适时禁食可以减缓肿瘤的生长并且能够增加各类肿瘤细胞对化疗的敏感性。最近, 有新的报道提出 ISC 在营养缺乏时其数量会增加, 同时对化疗敏感的细胞数量会相对减少^[2], 说明适时禁食可以降低化疗患者的消化道不良反应, 如恶心、呕吐等。热量限制(caloric restriction, CR)对延缓机体衰老、延长寿命、延缓或预防某些年龄相关性疾病都有着重要的作用。目前有新的研究发现, CR 可以导致具有较强再生能力的 ISC 的数量增

加, 此效应是通过 Paneth 细胞中的雷帕霉素靶蛋白复合物 1 (mechanistic target of rapamycin complex 1, mTORC1) 信号作用的调节来介导的。该文就 CR 与 ISC 的关系进行综述。

1 CR

CR 是指在提供生物体充分的营养成分, 确保生物体在不发生营养不良的情况下, 通过减少食物中摄入的脂肪或糖类而减少食物提供的总能量。1935 年美国科学家 Meckay 等^[3] 在实验中首次发现限制热量的摄入, 维持适量的营养, 大鼠的平均寿命和最大寿命都得以延长, 从此, 科学家们开始着力于 CR 方面的研究。

在眼科学方面, 有研究表明 CR 将有望作为辅助治疗年龄相关性眼症的一种治疗手段。Kawashima 等^[4] 发现 CR 可以显著提高大鼠的泪水容积和泪水分泌蛋白的容积, 跟对照组相比, CR 组大鼠的泪腺腺泡单位密度也显著增加, 因此, CR 可以减缓年龄相关性的泪腺功能障碍。最近还有关于 CR 或者模拟 CR 预防和治疗一系列年龄相关性眼部疾病的研究进展, 除干眼症外, 还包括白内障和视网膜病变等^[5]。

在肿瘤学方面, Mizuno 等^[6] 研究发现间断性的 CR 与二十五碳烯酸联合可抑制乳房肿瘤的生长, CR 组小鼠的血清瘦素和胰岛素样生长因子 1 较正常喂养组低, 在实验小鼠中, CR 与二十五碳烯酸联合组的乳房肿瘤发生率最低(15%)。另外, 在神经系统肿瘤中也有关于 CR 方面的研究, Maroon 等^[7] 阐述了关于限制热量生酮饮食对于多形性胶质母细胞瘤 (GBM) 的治疗研究进展, 其中 Zuccoli 等^[8] 报道了一确诊为 GBM 的

65 岁老年女性经常规的放疗和替莫唑胺化疗与限制热量生酮饮食相结合治疗,联合治疗 2 个月后该患者的体质量下降 20%,磁共振检查未发现脑部瘤组织,但是,在停止严格的饮食治疗 10 个星期以后磁共振检查又发现了 GBM 组织,故该种饮食对于 GBM 的治疗起着至关重要的作用,对于脑部其他的恶性肿瘤也有可能发挥作用。

在心血管系统方面,虽然 CR 不能提高心肌缺血性损伤的耐受性,但是可以延缓年龄相关性的心脏和主要血管改变。Ahmet 等^[9]研究发现,跟对照组比,CR 组大鼠的心脏和主动脉纤维化水平明显降低,心肌细胞数量增加,心脏舒张功能障碍也得到相应的缓解,该组大鼠维持了正常的心脏收缩功能和心室-动脉间的耦合,并且由多巴酚丁胺诱导的心动过速也正常,同时,动脉硬化发生率也降低了。最近 Ahn 等^[10]清晰地阐明了 CR 与心脏保护之间的关系,长期将摄入的热量减少 40% 可以促进心脏自体吞噬标记物的表达,该自体吞噬标记物可以通过降低心血管系统疾病和年龄相关性疾病的氧化损伤发挥心脏保护作用。在 CR 的情况下,葡萄糖缺乏,从而抑制 mTOR 的表达,进而诱发自体吞噬过程,起到心脏保护作用。如今,有越来越多的关于 CR 与各种疾病之间的研究,CR 涉及了人体各个器官和系统,在消化系统方面也有关于 CR 的研究。有新的报道指出,CR 可以导致具有较强再生能力的 ISC 的数量增加,此效应是通过 Paneth 细胞中的 mTORC1 信号作用调节来介导的^[11-12]。

2 ISC

ISC 根据其是否表达表面蛋白 Lgr5 可分为两种,一种是 Lgr5⁺ 的干细胞,另一种是 Lgr5⁻ 的干细胞^[13]。Lgr5⁺ 的干细胞较 Lgr5⁻ 的干细胞多,大部分位于小肠腺底部,其更新周期较快,以补充比邻的脱落的上皮细胞,Lgr5⁻ 的干细胞位于 Lgr5⁺ 的干细胞之上,其更新周期相对较慢,它在特殊的环境下可以和 Lgr5⁺ 的干细胞相互转换^[14-15],Tian 等^[16]发现 Lgr5⁺ 的干细胞在小鼠体内完全缺失时并不会影响 ISC 内环境的稳定,说明其并非是小肠内环境稳定所必需的一种细胞,原因是 Lgr5⁻ 的干细胞可以补充丢失掉的 Lgr5⁺ 的干细胞。另外,Lgr5⁻ 的干细胞还可以在小肠腺内表达一些分子标记物(如 Bmi1、mTert)^[17-18]。Altmann^[19]早在 1972 年就发现大鼠在饥饿状态下小肠各段绒毛面积均会减少,其中十二指肠绒毛面积减少最大(40%);而回肠绒毛所受影响最小(14%),饥饿处理后的大鼠其绒毛上皮细胞的形成减少,可能是因为饥饿状态下小肠腺里干细胞的分化会减少。但是,对大鼠重新喂料以后十二指肠绒毛面积增加了 20%,空肠绒毛面积也增加了 14%;当重新喂料联合甲氨蝶呤处理后,绒毛面积并无增加,说明可能是甲氨蝶呤抑制了小肠腺里干细胞的有丝分裂,从而导致干细胞不能有效地分化为绒毛上皮细胞。随后 Dunel-Erb 等^[20]发现,长时间禁食的大鼠空肠黏膜层会显著减少,包括部分绒毛的消失和小肠腺数量的减少,尽管空肠黏膜层在形态学上发生了巨大的改变,但是在重新喂料 3 d 后,大鼠空肠黏膜层的结构得以迅速而完整的恢复,其中 ISC 的有丝分裂在该恢复过程中起着至关重要的作用。

Clevers^[21]报道指出,Lgr5⁺ 的 ISC 在 CR 的情况下能够重塑小肠上皮结构。通常情况下,ISC 的增殖与分化处于动态平衡状态,一部分分化为小肠腺上皮细胞和 Paneth 细胞,小肠腺上皮细胞在小肠腺内停留 2 d 后会向绒毛侧翼区生长,从而参与消化和吸收,最后在第 5 天时于绒毛顶端脱落,然而 Paneth 细胞不参与此过程,而是停留在小肠腺底部,它们在此可以存

在 2 个月之久;另一部分则增殖成为新的 ISC。但是在 CR 的情况下,ISC 的这种增殖与分化的平衡态将被打破,干细胞增殖的数量增加,使干细胞区得以扩大,而相应的分化减少,而由小肠腺移行到绒毛区上皮细胞也随之减少,故相应的绒毛区面积缩小,最终将导致食物的消化和吸收下降。

新的实验发现,从 CR 组小鼠中分离得到的小肠腺形成类器官的能力是随意喂养组小鼠的 2 倍^[2],说明 CR 能增加干细胞的活力,因为在小肠腺内只有干细胞具有自我更新和分化形成类器官所需的各种细胞类型的能力,故 CR 可以增加 ISC 的数量并促进其再生能力。CR 使 ISC 数量增加的过程是以牺牲干细胞的分化为代价,即由分化形成的成熟的肠细胞减少而相应的绒毛区缩短。总之,哺乳动物的 ISC 在不同的营养状态下会改变其增殖、分化模式。机体在饥饿状态或是 CR 的情况下,ISC 的数量会增加,这将有利于机体在持续很长时间的食物匮乏状态下快速适应大量的食物。维持足够量的 ISC,一旦机体有充足的食物摄入,可以为小肠快速再生做好准备,使小肠黏膜层在短短的几天时间内能够恢复到禁食前的形态。

3 CR 使 ISC 数量增加的机制

最近 Yilmaz 等^[2]详细地阐述了 CR 使 ISC 数量增加的过程。限制热量的摄入能够抑制 Paneth 细胞里 mTORC1 特异性的信号通路,同时可以导致 Bst1 (bone stromal antigen-1) 的表达增加,Bst1 的功能是作为一种胞外酶使得 NAD⁺ 向 cADPR(cyclic ADP ribose)转化,cADPR 是 ISC 对 CR 作出应答时刺激 ISC 数量增加的一个必需的旁分泌因子。该研究中还发现,CR 时 ISC 的增加与 Paneth 细胞的增加同步,说明干细胞和 Paneth 细胞在应对 CR 时可能有协同作用。另外,从 CR 组小鼠分离得到的 Lgr5⁺ 的 ISC 和 Paneth 细胞共培养后形成类器官的能力是随意喂养组的 3 倍,Lgr5⁻ 的 ISC 与从 CR 组小鼠分离得到的 Paneth 细胞共培养后也能形成类器官,说明 Paneth 细胞在 ISC 的再生过程中有着重要的作用。

mTOR 是调节细胞生长和增殖的一个重要的信号通路,它的调节与人类许多疾病都有关系,包括肿瘤和糖尿病等,其中 mTORC1 是生物体营养状态的一个重要感受器^[22]。Yilmaz 等^[2]通过 mTORC1 在小肠内的活力标记物磷酸化的 S6 证实了 CR 对 ISC 和 Paneth 细胞的影响是通过 Paneth 细胞里的 mTORC1 信号介导的。他们分别用 mTORC1 的激活剂 Rheb2 和其负调控因子 TSC1 来激活和抑制该信号,结果发现当抑制 mTORC1 信号时,在 CR 的情况下可以有效地促进 ISC 的增殖。用雷帕霉素作用于小鼠后,小鼠体内的干细胞和 Paneth 细胞增殖频率提高了 1.5 倍,并且从体内分离得到的小肠腺具有形成类器官的能力,小肠腺的集落生成也随之增加。无论是 CR 还是雷帕霉素,它们都不是直接作用于 ISC,而是通过抑制 Paneth 细胞里的 mTORC1 信号来发挥作用的。

Bst-1 在骨髓间质细胞中表达,可促进前体定向造血干细胞的增殖^[23],它是一种胞外酶,可促使 NAD⁺ 向 cADPR 转化,cADPR 是一个旁分泌的效应器,它可以通过核昔转运蛋白激活 Ca²⁺ 信号从而记录应答细胞并且还具有促进细胞增殖的功能。实验表明 CR 可以增加 Bst-1 的 mRNA 和蛋白的表达,若用 siRNAs 敲除 Bst-1 的 mRNA 则 CR 的小肠腺形成类器官的能力消失,如果外源性的加入 cADPR 又可以重新恢复 Bst-1 缺失时的 CR 效应。综上所述,CR 促进小肠干细胞数量增加的机制是通过抑制 Paneth 细胞里的 mTORC1 信号,并且促进胞外酶 Bst-1 的表达。故用 mTORC1 的抑制因子雷帕霉素或是 Bst-1 的替代物 cADPR 均可以模拟 CR 效应使 ISC 的数量

增加。

4 展 望

如今明确知道 CR 可以使 ISC 的数量增加,并且用 mTORC1 的抑制因子雷帕霉素或是 Bst-1 的替代物 cADPR 均可以模拟 CR 达到相同的效果。那么 CR 或是雷帕霉素也许可以通过提高患者肠再生能力来改善由于营养吸收不良、炎症或肿瘤导致的肠道功能紊乱;另外,免疫抑制剂雷帕霉素还有望被用来靶向治疗放疗或化疗引起的各种肠道病变,例如:放射性肠炎。相反,如果用 mTORC1 的激活剂 Rheb2 持续激活 Paneth 细胞中的 mTORC1 信号对于肠萎缩可能有一定的影响。但是目前仍不是很清楚,除了 mTORC1 信号通路外,是否还有其他的信号通路介导了该过程,有研究报道,在 Paneth 细胞完全缺失的情况下,若额外补充 Wnt 也不会影响 ISC 的增殖、分化^[24-25]。在接下来的工作中仍需进一步探讨 mTORC1 信号是否会直接调节 Bst-1 的表达,cADPR 又是如何传递信号给 ISC 使其再生能力增强,一旦 ISC 接收到 cADPR 传递的信息以后除了数量上会增加外,其功能上是否也会发生一系列的变化,有待进一步研究。

参考文献

- [1] Lee C, Raffaghello L, Brandhorst S, et al. Fasting cycles retard growth of tumors and sensitize a range of cancer cell types to chemotherapy[J]. *Sci Transl Med*, 2012, 4(124):124-127.
- [2] Yilmaz ÖH, Katajisto P, Lamming DW, et al. mTORC1 in the Paneth cell niche couples intestinal stem-cell function to calorie intake [J]. *Nature*, 2012, 486(7404):490-495.
- [3] Mccay C, Crowell MF, Maynard L. The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size[J]. *J Nutr*, 1935, 10(1):63-79.
- [4] Kawashima M, Kawakita T, Okada N, et al. Calorie restriction; a new therapeutic intervention for age-related dry eye disease in rats[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 397(4):724-728.
- [5] Kawashima M, Ozawa Y, Shinmura K, et al. Calorie restriction (CR) and CR mimetics for the prevention and treatment of age-related eye disorders[J]. *Exp Gerontol*, 2013, 48(10):1096-1100.
- [6] Mizuno NK, Rogozina OP, Seppanen CM, et al. Combination of intermittent calorie restriction and eicosapentaenoic acid for inhibition of mammary tumors[J]. *Cancer Prev Res*, 2013, 6(6):540-547.
- [7] Maroon J, Bost J, Amos A, et al. Restricted calorie ketogenic diet for the treatment of glioblastoma multiforme [J]. *J Child Neurol*, 2013, 28(8):1002-1008.
- [8] Zuccoli G, Marcello N, Pisanello A, et al. Metabolic management of glioblastoma multiforme using standard therapy together with a restricted ketogenic diet; case report [J]. *Nutr Metab*, 2010, 33(7):1-7.
- [9] Ahmet I, Tae HJ, De Cabo R, et al. Effects of calorie restriction on cardioprotection and cardiovascular health [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 51(2):263-271.
- [10] Ahn J, Kim J. Nutritional status and cardiac autophagy[J]. *Diabetes Metab J*, 2013, 37(1):30-35.
- [11] Harris TE, Thorner MO. Caloric restriction in mTORC1 control of intestinal homeostasis[J]. *Cell Metab*, 2012, 16(1):6-8.
- [12] Kim TH, Shivdasani RA. Stem cell niches: famished paneth cells, gluttonous stem cells[J]. *Curr Biol*, 2012, 22(14):R579-580.
- [13] Barker N, Van Es JH, Kuipers J, et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5[J]. *Nature*, 2007, 449(7165):1003-1007.
- [14] Takeda N, Jain R, Leboeuf MR, et al. Interconversion between intestinal stem cell populations in distinct niches[J]. *Science*, 2011, 334(6061):1420-1424.
- [15] Yan KS, Chia LA, Li X, et al. The intestinal stem cell markers Bmi1 and Lgr5 identify two functionally distinct populations[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2012, 109(2):466-471.
- [16] Tian H, Biehs B, Warming S, et al. A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable[J]. *Nature*, 2011, 478(7368):255-259.
- [17] Montgomery RK, Carlone DL, Richmond CA, et al. Mouse telomerase reverse transcriptase (mTert) expression marks slowly cycling intestinal stem cells[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2011, 108(1):179-184.
- [18] Sangiorgi E, Capecchi MR. Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells[J]. *Nat Genet*, 2008, 40(7):915-920.
- [19] Altmann GG. Influence of starvation and refeeding on mucosal size and epithelial renewal in the rat small intestine[J]. *Am J Anat*, 1972, 133(4):391-400.
- [20] Dunel-Erb S, Chevalier C, Laurent P, et al. Restoration of the jejunal mucosa in rats refed after prolonged fasting [J]. *Comp Biochem Physiol Part A Mol Integr Physiol*, 2001, 129(4):933-947.
- [21] Clevers H. The paneth cell, caloric restriction, and intestinal integrity[J]. *New Engl J Med*, 2012, 367(16):1560-1561.
- [22] Sarbassov DD, Ali SM, Sabatini DM. Growing roles for the mTOR pathway[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2005, 17(6):596-603.
- [23] Podest M, Benvenuto F, Pitto A, et al. Concentrative uptake of cyclic ADP-ribose generated by BST-1⁺ stroma stimulates proliferation of human hematopoietic progenitors[J]. *J Biological Chem*, 2005, 280(7):5343-5349.
- [24] Durand A, Donahue B, Peignon G, et al. Functional intestinal stem cells after Paneth cell ablation induced by the loss of transcription factor Math1 (Atoh1)[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2012, 109(23):8965-8970.
- [25] Kim TH, Escudero S, Shivdasani RA. Intact function of Lgr5 receptor-expressing intestinal stem cells in the absence of Paneth cells[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2012, 109(10):3932-3937.