

DOI: 10.13376/j.cblls/2016036

文章编号: 1004-0374(2016)02-0275-08



刘志华, 中科院生物物理所“青年千人计划”研究员, 主要研究肠道黏膜特化细胞与肠道菌互作的分子机制及生理意义, 采用无菌动物、悉生动物等模型研究肠道菌对肠道黏膜屏障的调控作用, 旨在揭示肠道菌如何在多细胞水平上调控肠道多种细胞活动进而维持肠道稳态。刘志华研究员在 *Nature Immunology*、*Cell Research* 等重要国际期刊上发表多篇担任第一作者或通讯作者的论文, 其中在肠道菌与宿主共生领域取得的相关研究成果作为封面文章发表在 *Nature Immunology* 上, *Nature Review Immunology* 和 *Nature Immunology* 都有专文对该工作进行了深度解析; 在分子水平揭示了 LRRK2 与炎症性肠炎发生的相关性的成果, 作为封面文章发表在 *Nature Immunology* 上, 被 *Science Signaling* 杂志编辑点评, *Nature Immunology* 和 *Expert Rev Clin Immunol* 都有专文对该工作进行了深度解析。

## 潘氏细胞在肠道稳态中的作用

张馨文<sup>1,2</sup>, 王海方<sup>1,2</sup>, 刘志华<sup>1,3\*</sup>

(1 中国科学院生物物理研究所, 中科院感染与免疫重点实验室, 北京 100101;  
2 中国科学院大学, 北京 100049; 3 中科院生物大分子科教融合卓越中心, 北京 100101)

**摘要:** 肠道稳态对维持肠道正常生理功能具有重要意义。位于肠道上皮隐窝的潘氏细胞是肠道上皮屏障的重要组成部分, 它们分泌大量生物效应分子, 为小肠干细胞提供小生境以及调控肠道菌群。炎症性肠病克罗恩病经常伴随潘氏细胞功能异常, *Nod2*、*Xbp-1*、*Atg16L1*、*KCNN4* 等克罗恩病的易感基因在潘氏细胞中高表达, 并调控潘氏细胞的重要生理活动。对潘氏细胞的研究有望揭示维持肠道稳态的生理机制, 攻克炎症性肠炎等疾病的难关。

**关键词:** 潘氏细胞; 肠道稳态; 干细胞小生境; 炎症性肠炎

**中图分类号:** R392.1      **文献标志码:** A

## The role of Paneth cells in intestinal homeostasis

ZHANG Xin-Wen<sup>1,2</sup>, WANG Hai-Fang<sup>1,2</sup>, LIU Zhi-Hua<sup>1,3\*</sup>

(1 CAS Key Laboratory of Infection and Immunity, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3 CAS Center for Excellence in Biomacromolecules, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract:** Intestinal homeostasis is critical for maintaining normal intestinal physiological function. Paneth cells, which locate in the intestinal epithelial crypts, are important components of the intestinal epithelial barrier. They secrete biological molecules providing niche for intestinal crypt stem cells and regulating intestinal microbiota. Crohn's disease (CD) is often accompanied by Paneth cell dysfunction. Susceptibility genes associated with CD, including *Nod2*, *Xbp-1*, *Atg16L1* and *KCNN4*, are highly expressed in Paneth cells and play important roles in

收稿日期: 2015-01-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(31271521)

\*通信作者: E-mail: zhihualiu@ibp.ac.cn

regulating cellular processes in Paneth cells. Future study on Paneth cells will reveal the mechanisms in maintaining intestinal homeostasis, which may hold the therapeutic potential for inflammatory bowel disease and other related diseases.

**Key words:** Paneth cell; intestinal homeostasis; stem cell niche; inflammatory bowel disease

## 1 肠道稳态的概念和生理意义

肠道稳态 (intestinal homeostasis) 是宿主肠道黏膜和免疫屏障、肠道微生物、营养物质和代谢产物等相互作用而形成的动态平衡状态。肠道稳态对肠道的正常生理功能, 如营养吸收、能量代谢, 及抵御肠道感染等具有重要意义, 而肠道稳态失衡与一些重大疾病密切相关, 如肠道感染、肥胖、II 型糖尿病、炎症性肠炎 (inflammatory bowel disease, IBD)、自闭综合症等疾病<sup>[1-2]</sup>。

已有的证据表明肠道屏障在肠道稳态维持中发挥重要作用。肠道屏障由肠道共生菌、肠道黏液层、肠道上皮及固有层中的多种淋巴细胞共同组成。肠道黏液层覆盖于肠上皮, 由肠上皮细胞分泌, 成为菌群与肠道上皮间的物理屏障, 同时为肠道菌群提供营养物质和生活环境。黏液层中富含由杯状细胞分泌的黏液、潘氏细胞及普通上皮分泌的多种抗菌类物质和 B 细胞分泌的 IgA, 是肠道菌难以跨越的障碍, 有效防止肠道菌与肠道上皮的接触及侵入, 防止炎症的发生。肠上皮细胞包括杯状细胞、潘氏细胞、M 细胞、神经内分泌细胞和吸收性肠上皮细胞, 而肠道上皮细胞之间主要由紧密连接 (tight junction) 相关联, 具有防止细菌及其衍生物侵入的作用。同时, 在肠道上皮及固有层中存在多种肠相关淋巴组织 (gut-associated lymphoid tissue), 如小肠的派尔集合淋巴结 (Peyer's patches)、淋巴滤泡、大肠的结肠节 (colonic patches)。在这些肠相关淋巴组织中存在许多免疫细胞, 如树突细胞、T 淋巴细胞、B 淋巴细胞, 这些淋巴细胞相互协同, 促进机体的免疫耐受反应并参与宿主防御。其中, M 细胞和树突细胞直接感知肠道内容物, 并将来源于肠道菌群的信息传递给其他免疫细胞, 诱导免疫反应或耐受<sup>[3-10]</sup>。

## 2 潘氏细胞的发现历史

1745 年, 善于制作医学样品的德国解剖学家 Johann Nathanael Lieberkühn 首次描述了存在于肠中的小肠腺 (intestinal glands), 即隐窝 (crypts of Lieberkühn or crypt)。1872 年, Gustav Schwalbe<sup>[11]</sup> 则在小肠隐

窝内观察到潘氏细胞。1888 年, 奥地利医生约瑟夫·帕内特 (Joseph Paneth) 更形象地描述了潘氏细胞, 它们是存在于小肠上皮隐窝中的一群特殊的圆柱状细胞, 其细胞质中充满了颗粒性物质。为纪念帕内特医生, 人们将这种细胞命名为潘氏细胞 (Paneth cell)<sup>[12]</sup>。接下来的几十年里, 人们通过一些染色的手段分析潘氏细胞的形态和结构, 它们含有丰富的内质网和高尔基复合体, 还有很多分泌性颗粒。但是在很长的一段时间内, 人们都不知道潘氏细胞到底发挥什么作用。直到 20 世纪 60 年代, 科学家们发现, 这些颗粒中包含大量能够调控小肠重要生理机能的生物效应分子, 潘氏细胞分泌的大部分物质是抗菌蛋白质, 这些抗菌蛋白质从小肠隐窝排出, 散布到黏膜层, 协助黏膜免疫屏障行使其功能。鉴于这项发现具有重要意义, 以至于在过去的几十年里, 对潘氏细胞的相关研究进展突飞猛进。后来, 人们发现在胃肠道内, 包括胃和结肠, 也有潘氏细胞的存在。但胃肠道内的潘氏细胞主要是机体对黏膜炎症的一种应答, 人们将这种在非正常区域内存在的潘氏细胞称为化生, 在溃疡性结肠炎和炎症性结肠炎中广泛存在结肠直管的潘氏细胞化生 (colorectal Paneth cell metaplasia, PCM)<sup>[5-9]</sup>。

## 3 潘氏细胞的生理意义

目前认为潘氏细胞在肠道的生理功能包括: (1) 为肠道隐窝内小肠干细胞提供小生境; (2) 向肠腔中分泌大量抑菌活性的蛋白多肽, 调控肠道菌群。

### 3.1 为肠道隐窝内小肠干细胞提供小生境

在成年哺乳动物的组织中, 小肠上皮具有显著的自我更新能力。小肠上皮的更新依赖于小肠隐窝中的干细胞, 由小肠干细胞分化来的祖细胞从隐窝的底部向小肠绒毛迁移, 并不断分化为杯状细胞、丛细胞、神经内分泌细胞、肠上皮细胞等多种细胞。在产生以后, 这些细胞从隐窝迁移到绒毛的顶端, 并逐渐凋亡, 被新的由下端迁移来的细胞所更替。肠上皮细胞的生命周期只有 4~5 d, 这种快速的自我更新被认为对肠道的完整性至关重要。潘氏细胞也是由小肠干细胞分化而来, 但不同于其他细胞, 潘氏细胞产生后不向上迁移, 它们一直定居在隐窝

中, 并且这群细胞的寿命在 1 个月以上<sup>[5]</sup>。

肠道干细胞位于隐窝底部, 然而关于隐窝中哪种细胞是真正的肠道干细胞却存在争议。目前的研究认为可能有两种干细胞的存在。一种是隐窝柱状细胞 (crypt base columnar cell, CBC cell), 这种细胞与潘氏细胞间隔排列在隐窝底部。Wnt 的靶基因 *Lgr5* 是 CBC 细胞最具代表性的标记物, 在 CBC 细胞表面表达。另一种是静止的 +4 细胞, 它们位于潘氏细胞的上方<sup>[13]</sup>, 主要的标记物有 *Bmi-1*、*Hopx*、*mTert* 及 *Lrig1* 等<sup>[14]</sup>。目前人们对 +4 细胞了解不多, 研究表明, CBC 细胞和潘氏细胞之间存在着密切的关系。

大约 40 年前, Cheng 和 Leblond 在电镜下发现隐窝底部细胞不仅有潘氏细胞, 他们捕捉到了 CBC 细胞与潘氏细胞在隐窝底部间隔排列的照片。当 CBC 细胞吞噬放射性材料一段时间后, 在分化的细胞中能检测到放射性标记。因此, Cheng 和 Leblond<sup>[15]</sup> 认为 CBC 细胞就是隐窝的干细胞。后来, Bjerknes 和 Cheng<sup>[16-19]</sup> 的研究又为 CBC 细胞是肠道干细胞提供了新的证据。他们利用化学诱变的方法, 证明了在潘氏细胞上端的一些上皮细胞系都来源于 CBC 细胞。目前认为 CBC 细胞存在于一个干细胞小生境, 它们的子代细胞离开这个区域移到 +5 位置, 起始分化为其他细胞。

隐窝中的干细胞依赖于 Wnt 信号<sup>[20-22]</sup>。干细胞表面 *Lgr5* 蛋白是 R-spondins 的受体。R-spondins 是 Wnt 信号通路的激动剂。Wnt 构成的信号通路决定干细胞命运并驱使干细胞和 TA 细胞增殖。此外, Wnt 也能驱动潘氏细胞的终末分化。干细胞谱系示踪实验证明了 *Lgr5*<sup>hi</sup> 细胞产生所有的小肠上皮细胞<sup>[23-26]</sup>。另一个表明 CBC 具有干细胞特性的证据是, 在体外, 一个单独的 *Lgr5*<sup>hi</sup> 细胞可以在 3D 基质膜基质培养条件下分化形成一个上皮细胞团, 又名“隐窝小体”<sup>[27]</sup>。维持这个上皮细胞团中干细胞干性需要 4 条信号通路: Wnt 信号通路、上皮生长因子 (epithelial growth factor, EGF) 信号通路、Notch 信号通路及抑制骨形态生成蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 信号通路。这种“隐窝小体”具有体内上皮组织的基本特征。以上的证据支持了 CBC 细胞是干细胞的假说。

潘氏细胞和 CBC 细胞的紧密位置关系使人们猜测潘氏细胞为干细胞提供了重要的小生境。然而, Gordon 实验室先否定了这种假说。他们建立了一个转基因小鼠模型, 在这个模型中, 潘氏细胞特

异地表达白喉毒素, 使大部分潘氏细胞被敲除, 但这并没有影响隐窝中 CBC 细胞的增殖<sup>[28]</sup>。后来随着鉴定出 *Lgr5* 标记以及建立体外隐窝小体系统后, 潘氏细胞为干细胞提供小生境这一假说被重新确立。在体外, 被分选出来的单个 *Lgr5*<sup>hi</sup> CBC 细胞几乎不能生长形成隐窝小体, 然而将潘氏细胞和干细胞同时培养, 干细胞就能分化发育形成隐窝小体。与此同时, 在更多体内小鼠模型中 (其中包括前面所提的 Gordon 模型小鼠) 的深入研究发现, 基因敲除潘氏细胞导致 *Lgr5* 干细胞缺失<sup>[5,28-33]</sup>。在基因表达上, 潘氏细胞除了产生杀菌物质外, 还大量产生 EGF、Wnt3 以及 Notch 配体 Dll4, 为潘氏细胞成为小生境提供了必要条件。综上所述, 潘氏细胞为 *Lgr5*<sup>hi</sup> CBC 干细胞提供必要的小生境信号。

2012 年, Yilmaz 等<sup>[34]</sup> 还提出潘氏细胞为干细胞感受外界营养状态。他们提出, 潘氏细胞是营养状态的“传感器”。在小鼠中热量限制 (calorie restriction) 抑制了潘氏细胞而非肠道干细胞中的 mTORC1 信号, 进而上调了潘氏细胞中环腺苷二磷酸核糖 (cyclic ADP ribose) 的产生。由潘氏细胞分泌的环腺苷二磷酸核糖进而作用于肠道干细胞, 促进干细胞功能。

### 3.2 调控肠道菌群

潘氏细胞中包含大量的内质网和高尔基复合体, 具有强大的分泌蛋白质的功能, 潘氏细胞的主要分泌物是具有杀菌能力的蛋白多肽, 比如  $\alpha$ -防御素、隐窝素相关序列 (cryptdin-related sequence, CRS) 肽、溶菌酶、IIA 型分泌性磷脂酶 A2 (secretory group IIA phospholipase A2)、再生胰岛素衍生蛋白 REG3 $\beta$  及 REG3 $\gamma$ 、血管生成素 4 (angiogenin 4, ANG4) 等<sup>[6]</sup>。

抗菌肽是对抗病原微生物感染的天然免疫反应中重要的效应子,  $\alpha$ -防御素是最早被确认的抗菌肽家族之一<sup>[35]</sup>, 它是吞噬细胞中分泌颗粒的主要成分<sup>[36-38]</sup>。除了吞噬细胞, 多种黏膜中的上皮细胞也分泌  $\alpha$ -防御素<sup>[39-45]</sup>。小鼠潘氏细胞分泌多个亚型防御素, 在体外纯化分析可将它们分为 1~6 的 6 个亚型<sup>[46-48]</sup>。通过组织免疫化学分析发现,  $\alpha$ -防御素特异地表达在潘氏细胞中, 并且被极性分泌到肠腔中。这些被分泌到胞外的  $\alpha$ -防御素被认为有重要的宿主防御功能<sup>[49-51]</sup>。

防御素是一类很小 (15~20 残基) 的富含半胱氨酸的阳离子蛋白质, 是两性分子, 可以通过与细菌细胞膜结合, 在膜上形成跨膜的离子通道, 破坏了膜的完整性, 造成细胞内容物泄漏, 从而杀死细

菌。同时,防御素可以通过与细菌毒素相结合使其发生变性而具有灭活多种细菌毒素的作用<sup>[52]</sup>。而肠道共生菌如何与肠道中大量的具有杀菌能力的防御素共存一直以来都是一个困扰人的问题。最近有研究发现,肠道共生菌通常表达去磷酸酶(LpxF)来去除细菌表面的负电荷,从而抵御防御素等阳离子抗菌类多肽的杀伤<sup>[53]</sup>。

Ayabe等<sup>[54]</sup>研究表明,潘氏细胞分泌的 $\alpha$ -防御素在应对病原菌感染中起着重要作用。革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、脂多糖、胞壁酸、胞壁酰二肽,以及脂类A都能刺激小肠潘氏细胞分泌防御素。活的真菌和原生动物不能刺激潘氏细胞脱颗粒作用。小鼠小肠的潘氏细胞接触到病原菌或者病原菌抗原时在几分钟内会分泌富含抗菌肽的颗粒,从而杀死病原微生物,这种分泌活动是病原菌或病原菌抗原剂量依赖性的。 $\alpha$ -防御素占杀死微生物总抗菌肽活性的70%。

Salzman等<sup>[55]</sup>研究发现,潘氏细胞来源的 $\alpha$ -防御素在建立及维持肠道微生态的平衡中起着重要作用。小鼠的 $\alpha$ -防御素以一种非活化的前体肽形式被合成,必须经过金属蛋白酶7(matrix metalloproteinase 7, MMP7)的切割才能被活化。Salzman的研究利用了DEFA5转基因小鼠和MMP7缺失小鼠<sup>[56]</sup>两种动物模型,DEFA5转基因小鼠表达人的 $\alpha$ -防御素5( $\alpha$ -defensin 5,又名HD-5),是一个 $\alpha$ -防御素过表达模型;MMP7缺失小鼠不能产生有活性的 $\alpha$ -防御素,是一个小肠肠腔中缺失 $\alpha$ -防御素的模型。在这两个小鼠模型中,潘氏细胞的效应因子,如溶菌酶、编码 $\alpha$ -防御素的Defa1和Defcr4等在mRNA的表达水平以及肠道菌的总数都没有明显的变化,而肠道菌的组成却发生了改变。其中DEFA5转基因小鼠中厚壁菌的比例显著降低,而拟杆菌的比例显著升高,但在MMP7缺失小鼠中却得到了相反的结果。这说明肠道菌组成的变化是 $\alpha$ -防御素依赖的,且 $\alpha$ -防御素不影响肠道菌的总数。同时DEFA5转基因小鼠中也几乎检测不到厚壁菌中重要的一员SFB(segmented filamentous bacteria),固有层中TH17细胞的比例和数目也相应地受到了影响。这些都说明潘氏细胞来源的 $\alpha$ -防御素影响了肠道共生菌的组成和肠道稳态。

潘氏细胞不但在微生物刺激下分泌囊泡中的抗菌肽<sup>[57]</sup>,而且潘氏细胞可以通过感受微生物来调控一些抗菌肽的产生。ShipraVaishnava的研究发现肠道菌的存在可以极大水平地提高潘氏细胞中REG3 $\gamma$

的表达<sup>[58]</sup>,而REG3 $\gamma$ 的上调表达依赖于TLR受体的下游接头分子MyD88信号通路,REG3 $\gamma$ 的表达是阻止微生物入侵到宿主组织中所必需的。利用在潘氏细胞中特异地过表达MyD88,研究者发现潘氏细胞通过TLRs-MyD88直接感知微生物,并激活MyD88依赖的抗菌肽,如Reg3 $\gamma$ 等的表达,结果证明了潘氏细胞自身的MyD88信号通路激活足以阻止微生物入侵宿主,并不需要骨髓等其他来源细胞的MyD88信号通路<sup>[59-61]</sup>。这项研究进一步利用了防御素启动子表达白喉毒素(CR2-tox176)的小鼠模型来删除潘氏细胞,发现潘氏细胞被删除的小鼠不能有效地控制肠道共生菌和病原菌入侵到脾脏和黏膜相关淋巴结等组织内<sup>[61]</sup>,从而说明了潘氏细胞来源的抗菌类物质对于控制微生物的入侵和在体内的扩散是非常重要的。

#### 4 潘氏细胞功能异常与疾病发生

炎症性肠炎(inflammatory bowel disease, IBD)是一种慢性肠炎,是肠道稳态失衡的临床表现,主要包括克罗恩病(Crohn's disease, CD)和溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)。炎症性肠炎发病机制复杂,受环境因素、遗传因素及肠道菌群等多种因素的影响。克罗恩病与溃疡性结肠炎在临床上有区别,克罗恩病病变主要侵犯回肠末端,但可累及整个肠道组织<sup>[62]</sup>;而溃疡性结肠炎病变集中在结肠部位。已有的研究表明这两种临床疾病在发病机制上存在相似之处,即肠道免疫系统对肠道菌的不良免疫反应。目前认为肠道上皮屏障功能的下降、先天及获得性免疫反应的失调均参与了炎症性肠炎的发生,这从机制上也反映了炎症性肠炎发生的复杂性。

潘氏细胞是肠道上皮屏障的重要组成部分,所以,潘氏细胞功能异常在CD发生中发挥作用并不奇怪。首先对一部分CD患者小肠样品的病理分析发现,在这些患者的潘氏细胞中出现胞内囊泡异常<sup>[63]</sup>。对潘氏细胞在CD发生中的作用的更深入的理解来源于CD易感基因的发现。研究发现CD易感基因高表达在潘氏细胞中,从而把对潘氏细胞的研究推向了疾病发病源这一方面<sup>[10]</sup>。目前,研究发现了多个CD易感基因均参与了潘氏细胞的重要生理活动,而对这些基因所参与调控的通路的研究也揭示了这些通路在调控潘氏细胞生理活动中的意义。

Nod2是人们发现的第一个,也是最显著的CD易感基因<sup>[64-66]</sup>。Nod2编码胞壁酰二肽(MDP)的受体,是重要的模式识别分子,在天然免疫反应中发挥重

要作用。在巨噬细胞中, NOD2 识别细菌来源的胞壁酰二肽, 活化免疫反应。Nod2 与 CD 发生相关的主要三种突变体 (R702W、G908R 和 L1007insC) 均导致其不能有效活化下游的免疫反应<sup>[67]</sup>。然而, Nod2 突变导致炎症性肠炎发生的具体作用还在研究中。由于 Nod2 的三种突变均降低 Nod2 活化免疫反应的能力, 所以 Nod2<sup>-/-</sup> 小鼠被广泛用来研究 NOD2 在炎症性肠炎中的作用。在小肠中, Nod2 主要在潘氏细胞及骨髓来源的淋巴细胞中表达<sup>[66]</sup>。Kabayashi 等<sup>[68]</sup> 首先发现 Nod2<sup>-/-</sup> 小鼠潘氏细胞中  $\alpha$ -defensin 的表达下调, 并导致其对李斯特菌的免疫应答水平下降。这个结果跟在患者中的临床研究相符。Wehkamp 等<sup>[69-70]</sup> 发现, 回肠 CD 患者的潘氏细胞  $\alpha$ -defensin 表达量比健康人或者患有其他类型的 IBD 患者显著减少。潘氏细胞中  $\alpha$ -defensin 减少是不受肠道炎症影响的<sup>[70]</sup>, 说明  $\alpha$ -defensin 的减少不是炎症所导致的, 很有可能是一种早期发生的固有的现象。具有 1007fs (SNP13) NOD2 突变的 CD 患者的  $\alpha$ -defensin 水平也有所下降<sup>[71]</sup>。然而, 也有研究没有能够发现 Nod2<sup>-/-</sup> 小鼠在  $\alpha$ -defensin 的产生上存在缺陷, 可能跟小鼠的遗传背景相关<sup>[72-73]</sup>。更多的研究发现, Nod2 可以通过调控肠道菌群发挥作用, 因为 Nod2<sup>-/-</sup> 小鼠的肠道菌群有所改变<sup>[74]</sup>, 而且 Nod2<sup>-/-</sup> 小鼠在感染幽门螺杆菌后, 其回肠出现肉芽肿性损伤, 与 CD 的一种病理状态一致<sup>[75]</sup>。在给 Nod2<sup>-/-</sup> 小鼠的潘氏细胞转入一种  $\alpha$ -defensin HD5 基因后, 这种肉芽肿性损伤得到缓解<sup>[75]</sup>。

CD 的另一个显著的遗传因子是 UPR (unfold-protein response) 转录因子 XBP-1 (X-box binding protein-1), 它是响应内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ER stress) 的关键转录因子。在小鼠上皮敲除 *Xbp1* 导致小鼠出现自发性肠炎, 病理分析发现 *Xbp1* 缺失导致潘氏细胞中出现内质网应激, 潘氏细胞内缺乏溶菌酶及  $\alpha$ -defensin 等的表达<sup>[75-76]</sup>。

除了 *Xbp1*, 还有转录因子 Tcf4 也与 CD 发生有密切关系。转录因子 Tcf4 能够驱动潘氏细胞分化并促进  $\alpha$ -defensin 表达<sup>[77-78]</sup>。在 CD 患者中, Tcf4 表达水平降低与 HD5 表达水平降低有关联<sup>[78]</sup>。CD 中的 Tcf4 表达水平降低并不依赖于非正常的 NOD2 突变, 并且也与组织炎症程度无关。在儿科 CD 的研究中, Tcf4 表达水平降低。其中一项研究显示 HD5 显著性降低<sup>[79-80]</sup>。不过在 CD 中  $\alpha$ -defensin 表达下调从而参与肠炎的发生目前还是有争议的<sup>[81-82]</sup>。

Atg16L1 和 Irgm 这两个参与细胞自噬的基因

与 CD 发生相关<sup>[83]</sup>, 并在潘氏细胞中发挥重要作用, 暗示了细胞自噬对潘氏细胞正常生理功能的重要性。Atg16L1 基因突变的 CD 患者的肠道菌群有所改变<sup>[84]</sup>, 而且他们的潘氏细胞颗粒异常。在小鼠中低表达 Atg16L1 蛋白, 也会出现类似上述的现象<sup>[63,84]</sup>。Irgm 编码免疫相关的 GTP 酶家族 M (IRGM), 并参与调控细胞异源自噬 (xenophagy)。有意思的是, Irgm 基因的一个与 CD 相关的同义突变解除 miR-196 对其在蛋白质水平的调控, 从而干扰了潘氏细胞对异源自噬的正常调控<sup>[85-86]</sup>。值得关注的是, Thachil 等<sup>[87]</sup> 发现一些 CD 患者中潘氏细胞的自噬被特异地激活, 而这种状态与黏膜炎症和 Atg16L1 或者 Irgm 的突变无关, 这个结果暗示了除了 Atg16L1 和 Irgm 之外, 可能有更多的自噬相关基因参与了 CD 的病理机制, 而目前我们并不知道是哪些基因。此外, 有研究发现细胞自噬和内质网应激在潘氏细胞中存在代偿作用。在肠上皮同时敲除 *Atg16L1* 和 *Xbp1*, 小鼠会形成比单独敲除这两个基因中的任意一个更为严重的自发性肠炎<sup>[87-88]</sup>。

全基因组关联分析显示 *KCNN4* 也是一个 CD 的易感基因, 它编码 Ca<sup>2+</sup> 激活的 K<sup>+</sup> 通道 KCa3.1。KCa3.1 通道异常会阻断潘氏细胞颗粒的分泌, 并且很可能导致小肠隐窝潘氏细胞分泌的抗菌肽不足<sup>[89]</sup>。

综上所述, 诸多研究发现了潘氏细胞功能异常与 CD 发生密切相关, 这与潘氏细胞在维持肠道稳态中的重要作用是一致的。目前已知有上百个基因被发现与 CD 发生相关, 而目前只研究了其中一小部分基因。对更多易感基因展开研究有望发现更多机制参与炎症性肠炎的发生。对潘氏细胞展开深入研究, 有望揭示肠道屏障功能的维持机制。着眼于如何修复肠道屏障有望成为炎症性肠炎的防治的新思路。

#### [参 考 文 献]

- [1] Wei X, Yang Z, Rey FE, et al. Fatty acid synthase modulates intestinal barrier function through palmitoylation of mucin 2. *Cell Host Microbe*, 2012, 11: 140-52
- [2] Hsiao EY, McBride SW, Hsien S, et al. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell*, 2013, 155: 1451-63
- [3] Maloy KJ, Powrie F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature*, 2011, 474: 298-306
- [4] Garrett WS, Gordon JI, Glimcher LH. Homeostasis and

- inflammation in the intestine. *Cell*, 2010, 140: 859-70
- [5] Clevers HC, Bevins CL. Paneth cells: maestros of the small intestinal crypts. *Annu Rev Physiol*, 2013, 75: 289-311
- [6] Bevins CL, Salzman NH. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9: 356-68
- [7] Porter EM, Bevins CL, Ghosh D, et al. The multifaceted Paneth cell. *Cell Mol Life Sci*, 2002, 59: 156-70
- [8] Tanaka M, Saito H, Kusumi T, et al. Spatial distribution and histogenesis of colorectal Paneth cell metaplasia in idiopathic inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol*, 2001, 16: 1353-9
- [9] Simmonds N, Furman M, Karanika E, et al. Paneth cell metaplasia in newly diagnosed inflammatory bowel disease in children. *BMC Gastroenterol*, 2014, 14: 93
- [10] Wehkamp J, Stange EF. Paneth's disease. *J Crohns Colitis*, 2010, 4: 523-31
- [11] Schwable G. Beiträge zur Kenntnis der Driisen in den Darmwandungen ins besondere der Bruner'schen Driisen. *Arch Mikrosk Anat*, 1872, 8: 92
- [12] Paneth J. Ueber die secernirenden Zellen des Dünndarm-Epithels. *Archiv für mikroskopische Anatomie*, 1887, 31: 113-91
- [13] Barker N, van de Wetering M, Clevers H. The intestinal stem cell. *Genes Dev*, 2008, 22: 1856-64
- [14] Sato T, Clevers H. Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: mechanism and applications. *Science*, 2013, 340: 1190-4
- [15] Cheng H, Leblond CP. 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: 537-61
- [16] Bjerknes M, Cheng H. Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors. *Gastroenterology*, 1999, 116: 7-14
- [17] Bjerknes M, Cheng H. Multipotential stem cells in adult mouse gastric epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002, 283: G767-G777
- [18] 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
- [19] Bjerknes M, Cheng H. The stem-cell zone of the small intestinal epithelium. V. Evidence for controls over orientation of boundaries between the stem-cell zone, proliferative zone, and the maturation zone. *Am J Anat*, 1981, 160: 105-12
- [20] Korinek V, Barker N, Willert K, et al. Two members of the Tcf family implicated in Wnt/ $\beta$ -catenin signaling during embryogenesis in the mouse. *Mol Cell Biol*, 1998, 18: 1248-56
- [21] Pinto D, Clevers H. Wnt control of stem cells and differentiation in the intestinal epithelium. *Exp Cell Res*, 2005, 306: 357-63
- [22] Kuhnert F, Davis CR, Wang HT, 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: 266-71
- [23] Carmon KS, Gong X, Lin Q, 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: 11452-7
- [24] Barker N, van Es JH, Kuipers J, et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature*, 2007, 449: 1003-7
- [25] de Lau W, Barker N, Low TY, et al. Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signaling. *Nature*, 2011, 476: 293-7
- [26] Kim KA, Kakitani M, Zhao J, et al. Mitogenic influence of human R-spondin1 on the intestinal epithelium. *Science*, 2005, 309: 1256-9
- [27] Sato T, Vries RG, Snippert HJ, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche. *Nature*, 2009, 459: 262-5
- [28] Garabedian EM, Roberts LJ, McNevin MS, et al. Examining the role of Paneth cells in the small intestine by lineage ablation in transgenic mice. *J Biol Chem*, 1997, 272: 23729-40
- [29] Shroyer NF, Wallis D, Venken KJT, et al. Gfi1 functions downstream of Math1 to control intestinal secretory cell subtype allocation and differentiation. *Genes Dev*, 2005, 19: 2412-7
- [30] Bastide P, Darido C, Pannequin J, et al. Sox9 regulates cell proliferation and is required for Paneth cell differentiation in the intestinal epithelium. *J Cell Biol*, 2007, 178: 635-48
- [31] Mori-Akiyama Y, Van den Born M, Van Es JH, et al. SOX9 is required for the differentiation of paneth cells in the intestinal epithelium. *Gastroenterology*, 2007, 133: 539-46
- [32] Sato T, van Es JH, Snippert HJ, et al. Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature*, 2011, 469: 415-8
- [33] Geiser J, Venken KJT, De Lisle RC, et al. A mouse model of acrodermatitis enteropathica: loss of intestine zinc transporter ZIP4 (Slc39a4) disrupts the stem cell niche and intestine integrity. *PLoS Genetics*, 2012, 8: e1002766
- [34] Yilmaz ÖH, Katajisto P, Lamming DW, et al. mTORC1 in the Paneth cell niche couples intestinal stem-cell function to calorie intake. *Nature*, 2012, 486: 490-5
- [35] Lehrer RI, Ganz T, Selsted ME. Defensins: endogenous antibiotic peptides of animal cells. *Cell*, 1991, 64: 229-30
- [36] Ganz T, Lehrer RI. Antimicrobial peptides of leukocytes. *Curr Opin Hematol*, 1997, 4: 53-8
- [37] Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, et al. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest*, 1985, 76: 1427-35
- [38] Martin E, Ganz T, Lehrer RI. Defensins and other endogenous peptide antibiotics of vertebrates. *J Leukoc Biol*, 1995, 58: 128-36
- [39] Schonwetter BS, Stolzenberg ED, Zasloff MA. Epithelial antibiotics induced at sites of inflammation. *Science*, 1995, 267: 1645-8
- [40] Goldman MJ, Anderson GM, Stolzenberg ED, et al.

- Human  $\beta$ -defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell*, 1997, 88: 553-60
- [41] Quayle AJ, Porter EM, Nussbaum AA, et al. Gene expression, immunolocalization, and secretion of human defensin-5 in human female reproductive tract. *Am J Pathol*, 1998, 152: 1247-58
- [42] Valore EV, Park CH, Quayle AJ, et al. Human  $\beta$ -defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J Clin Invest*, 1998, 101: 1633-42
- [43] Bals R, Goldman MJ, Wilson JM. Mouse  $\beta$ -defensin 1 is a salt-sensitive antimicrobial peptide present in epithelia of the lung and urogenital tract. *Infect Immun*, 1998, 66: 1225-32
- [44] Bals R, Wang X, Wu Z, et al. Human  $\beta$ -defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J Clin Invest*, 1998, 102: 874-80
- [45] Diamond G, Bevins CL.  $\beta$ -Defensins: endogenous antibiotics of the innate host defense response. *Clin Immunol Immunopathol*, 1998, 88: 221-5
- [46] Ouellette AJ, Hsieh MM, Nosek MT, et al. Mouse Paneth cell defensins: primary structures and antibacterial activities of numerous cryptdin isoforms. *Infect Immun*, 1994, 62: 5040-7
- [47] Selsted ME, Miller SI, Henschen AH, et al. Enteric defensins: antibiotic peptide components of intestinal host defense. *J Cell Biol*, 1992, 118: 929-36
- [48] Eisenhauer PB, Harwig SS, Lehrer RI. Cryptdins: antimicrobial defensins of the murine small intestine. *Infect Immun*, 1992, 60: 3556-65
- [49] Ganz T. Defensins and host defense. *Science*, 1999, 286: 420-1
- [50] Selsted ME, Ouellette AJ. Defensins in granules of phagocytic and non-phagocytic cells. *Trends Cell Biol*, 1995, 5: 114-9
- [51] Bevins CL, Martin-Porter E, Ganz T. Defensins and innate host defence of the gastrointestinal tract. *Gut*, 1999, 45: 911-5
- [52] Kudryashova E, Quintyn R, Seveau S, et al. Human defensins facilitate local unfolding of thermodynamically unstable regions of bacterial protein toxins. *Immunity*, 2014, 41: 709-21
- [53] Cullen TW, Schofield WB, Barry NA, et al. Gut microbiota. Antimicrobial peptide resistance mediates resilience of prominent gut commensals during inflammation. *Science*, 2015, 347: 170-5
- [54] Ayabe T, Satchell DP, Wilson CL, et al. Secretion of microbicidal  $\alpha$ -defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat Immunol*, 2000, 1: 113-8
- [55] Salzman NH, Ghosh D, Huttner KM, et al. Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. *Nature*, 2003, 422: 522-6
- [56] Wilson CL, Ouellette AJ, Satchell DP, et al. Regulation of intestinal  $\alpha$ -defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. *Science*, 1999, 286: 113-7
- [57] Salzman NH, Hung K, Haribhai D, et al. Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nat Immunol*, 2010, 11: 76-83
- [58] Cash HL, Whitham CV, Behrendt CL, et al. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science*, 2006, 313: 1126-30
- [59] Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R. Regulation of spontaneous intestinal tumorigenesis through the adaptor protein MyD88. *Science*, 2007, 317: 124-7
- [60] Brandl K, Plitas G, Schnabl B, et al. MyD88-mediated signals induce the bactericidal lectin RegIII  $\gamma$  and protect mice against intestinal *Listeria monocytogenes* infection. *J Exp Med*, 2007, 204: 1891-900
- [61] Vaishnava S, Behrendt CL, Ismail AS, et al. Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 20858-63
- [62] Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. *New Engl J Med*, 2009, 361: 2066-78
- [63] Cadwell K, Liu JY, Brown SL, et al. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature*, 2008, 456: 259-63
- [64] Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 2001, 411: 599-603
- [65] Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 2001, 411: 603-6
- [66] Ogura Y, Lala S, Xin W, et al. Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. *Gut*, 2003, 52: 1591-7
- [67] Chamaillard M, Philpott D, Girardin SE, et al. Gene-environment interaction modulated by allelic heterogeneity in inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 3455-60
- [68] Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, et al. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science*, 2005, 307: 731-4
- [69] Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, et al. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal  $\alpha$ -defensin expression. *Gut*, 2004, 53: 1658-64
- [70] Wehkamp J, Salzman NH, Porter E, et al. Reduced Paneth cell  $\alpha$ -defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 18129-34
- [71] Cho JH. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8: 458-66
- [72] Robertson SJ, Zhou JY, Geddes K, et al. Nod1 and Nod2 signaling does not alter the composition of intestinal bacterial communities at homeostasis. *Gut Microbes*, 2013, 4: 222-31
- [73] Shanahan MT, Carroll IM, Grossniklaus E, et al. Mouse Paneth cell antimicrobial function is independent of Nod2. *Gut*, 2014, 63: 903-10
- [74] Petnicki-Ocwieja T, Hrnčir T, Liu YJ, et al. Nod2 is required for the regulation of commensal microbiota in the intestine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 15813-8
- [75] Biswas A, Liu YJ, Hao L, et al. Induction and rescue of Nod2-dependent Th1-driven granulomatous inflammation

- of the ileum. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 14739-44
- [76] Kaser A, Lee AH, Franke A, et al. XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell*, 2008, 134: 743-56
- [77] van Es JH, Jay P, Gregorieff A, et al. Wnt signalling induces maturation of Paneth cells in intestinal crypts. *Nat Cell Biol*, 2005, 7: 381-6
- [78] Wehkamp J, Wang G, Kübler I, et al. The Paneth cell  $\alpha$ -defensin deficiency of ileal Crohn's disease is linked to Wnt/Tcf-4. *J Immunol*, 2007, 179: 3109-18
- [79] Perminow G, Beisner J, Koslowski M, et al. Defective Paneth cell-mediated host defense in pediatric ileal Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*, 2009, 105: 452-9
- [80] Zilbauer M, Jenke A, Wenzel G, et al. Intestinal  $\alpha$ -defensin expression in pediatric inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 2011, 17: 2076-86
- [81] Simms LA, Doecke JD, Walsh MD, et al. Reduced  $\alpha$ -defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease. *Gut*, 2008, 57: 903-10
- [82] Bevins CL, Stange EF, Wehkamp J. Decreased Paneth cell defensin expression in ileal Crohn's disease is independent of inflammation, but linked to the NOD2 1007fs genotype. *Gut*, 2009, 58: 882-3
- [83] Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, et al. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet*, 2007, 39: 596-604
- [84] Frank DN, Robertson CE, Hamm CM, et al. Disease phenotype and genotype are associated with shifts in intestinal-associated microbiota in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*, 2011, 17: 179-84
- [85] Brest P, Lapaquette P, Mograbi B, et al. Risk predisposition for Crohn disease. *Autophagy*, 2011, 7: 786-7
- [86] Brest P, Lapaquette P, Souidi M, et al. A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn's disease. *Nat Genet*, 2011, 43: 242-5
- [87] Thachil E, Hugot JP, Arbeille B, et al. Abnormal activation of autophagy-induced crinophagy in Paneth cells from patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*, 2012, 142: 1097-9.e4
- [88] Adolph TE, Tomczak MF, Niederreiter L, et al. Paneth cells as a site of origin for intestinal inflammation. *Nature*, 2013, 503: 272-6
- [89] Simms LA, Doecke JD, Roberts RL, et al. KCNN4 gene variant is associated with ileal Crohn's disease in the Australian and New Zealand population. *Am J Gastroenterol*, 2010, 105: 2209-17