

· 综述 ·

胃干细胞调控机制及其在胃类器官构建中的应用研究

范圣先¹ 尹健一² 王剑³ 李幼生³ 管文贤¹ 黎介寿⁴

¹南京大学医学院附属鼓楼医院普通外科 210008; ²约翰霍普金斯大学医学院胃肠内科, 美国马里兰州巴尔的摩 21201; ³上海交通大学医学院附属第九人民医院普通外科 200011; ⁴东部战区总医院普通外科, 南京 200002
通信作者: 黎介寿, Email: ljsnjuedu@126.com

【摘要】 胃干细胞是存在于胃组织中的成体干细胞, 具有自我更新和高度增殖能力, 它有多向分化潜能, 能分化形成各种胃黏膜上皮细胞。胃干细胞在胃黏膜上皮的自我更新和损伤修复过程中发挥至关重要的作用, 其可使胃黏膜上皮处于动态平衡状态, 并维持胃黏膜的完整性。随着对干细胞研究的不断深入, 胃干细胞的应用为胃生理与疾病的研究提供了新的手段。自 2010 年报道胃类器官模型的构建方法以来, 胃类器官迅速成为胃相关疾病研究领域的热点。胃类器官作为一种良好的基础实验模型, 在多方面优于动物实验模型和常规细胞培养模型, 其在细胞成分、组织架构及特定功能等方面与胃上皮组织高度相似, 实现了在体外培养环境中对胃上皮组织的复制。特别是衍生于人体的胃类器官, 为在体外环境中了解机体内胃的真实状况开启了一个新的“窗口”。笔者综述了胃干细胞调控机制的最新研究进展, 总结其在胃类器官构建方面的应用。

【关键词】 干细胞; 胃干细胞; 胃类器官; 模型
基金项目: 国家自然科学基金 (81800452); 中央高校基本科研基金 (021414380301); 黎介寿肠道屏障研究基金 (LJS-201803B)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2019.03.017

Regulatory mechanism of gastric stem cells and their application research in establishment of gastric organoids

Fan Shengxian¹, Yin Jianyi², Wang Jian³, Li Yousheng³, Guan Wenxian¹, Li Jiesshou⁴

¹Department of General Surgery, Nanjing Drum Tower Hospital, Affiliated to Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, China; ²Department of Gastroenterology, Johns Hopkins Medicine, Baltimore 21201, Maryland, US; ³Department of General Surgery, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200011, China; ⁴Department of General Surgery, General Hospital of PLA Eastern Theater Command, Nanjing 200002, China

Corresponding author: Li Jiesshou, Email: ljsnjuedu@126.com

【Abstract】 Gastric stem cells are adult stem cells found in the gastric tissues, which possess high self-renewal capability, proliferation rate and multiple differentiation capability. They can regenerate all the gastric mucosa epithelial cells. Gastric stem cells play an important role in the self-renewal and injury repair, making epithelium of gastric mucosa in the dynamic balance and

maintaining the integrity of gastric mucosa. With the constant deepening of stem cell research, the application of gastric stem cells provides a new means for the study of gastric physiology and diseases. Since the first report by Barker in 2010, gastric organoids have soon become a model of interest and are highly desirable as tools for studying gastric diseases. As an optimal experimental model, gastric organoids are superior to animal model and conventional cell culture. Gastric organoids are comprised of all major types of gastric epithelial cells, represent the architecture and function remarkably similar to those of the gastric epithelium, faithfully recapitulating the functional gastric epithelium ex vivo. Especially gastric organoids derived from the human body, which allow the investigation of the function of human stomach in the ex vivo setting. In this review, research progresses of gastric stem cells and their application in establishment of gastric organoids are summarized.

【Key words】 Stem cell; Gastric stem cell; Gastric organoid; Model

Fund programs: National Natural Science Foundation of China (81800452); Fundamental Research Funds for Central Universities (021414380301); Academician Li Jiesshou's Special Research Fund for Intestinal Barrier (LJS-201803B)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2019.03.017

干细胞是一类具有自我更新和高度增殖能力的原始细胞, 具有多向分化潜能。在特定条件下, 它可以分化成和自己完全相同的子细胞, 形成人体多种组织的前体细胞; 也可以分化为特定组织中一个或者多个具有特定功能的细胞^[1-2]。根据干细胞的来源及分化潜能可将其分为: 胚胎干细胞和成体干细胞。胚胎干细胞是指受精卵发育到桑椹胚的最原始干细胞, 被认为是全能的。在发育过程中, 其可以分化成诸多特殊类型的细胞, 形成各种组织器官。成体干细胞是指存在于机体已分化组织中具有自我更新、增殖特性和多向分化潜能的未分化细胞, 能够产生特定组织的所有细胞谱系, 以维持特定组织细胞数目的恒定、组织结构的稳定以及对组织损伤的修复^[3-4]。

胃干细胞是存在于胃组织中的成体干细胞, 能分化形成各种胃黏膜上皮细胞, 是胃上皮快速更新的基础^[1]。2002 年, Bjerknes 和 Cheng^[5] 利用 ROSA26 转基因小鼠进行 LacZ 染色

并使用谱系追踪证实成年小鼠的胃黏膜上皮中存在多能干细胞。随后,越来越多的学者对胃干细胞进行了深入的研究。但胃干细胞的定位、功能及其调控机制尚未完全明了。随着对胃干细胞及其调控机制研究的不断深入,以及近年来对基于胃干细胞构建胃类器官研究的兴起,胃干细胞应用及胃类器官构建将为胃生理与疾病的研究提供新的研究平台及治疗手段^[2,6]。

1 胃上皮的自我更新与胃干细胞

解剖学上通常将胃分为胃底部、胃体部和胃窦部^[7]。其中,胃底部和幽门部是胃腺体分布的主要部位,同时也是消化液分泌的主要场所^[8-9]。胃底腺主要位于胃底和胃体的固有层内,是产生胃液的主要腺体。胃底腺由多种腺细胞组成,主要是主细胞、壁细胞、表面黏液细胞和颈黏液细胞。此外,胃底腺还包括少量内分泌细胞和未分化的胃干细胞。幽门腺同样由多种腺细胞组成,其中以表面黏液细胞、颈黏液细胞、内分泌细胞和未分化的胃干细胞为主,而主细胞和壁细胞含量相对较少^[6-7,10]。胃腺体由浅及深依次分为峡部、颈部和底部,其中峡部开口于胃小凹^[11]。胃上皮组织由连续排列的单层柱状上皮细胞构成,解剖学上可分为胃小区和小孔状的胃小凹两个区域。胃小凹及其相连的 3~5 个胃腺体构成一个整体,称为胃小区,是胃黏膜的基本结构单位。组织学上,胃上皮主要由表面黏液细胞组成,表面黏液细胞不断脱落,由胃小凹底部的干细胞增殖补充,每 3~5 d 更新 1 次,损伤时更新速度会加快^[2]。

胃干细胞是存在于胃组织中的成体干细胞,主要有两个重要的生物学特性:(1)自我更新能力。这表现为对称分裂和不对称分裂两种不同的细胞分裂方式。前者产生的两个子代细胞均为干细胞,使得干细胞总数得以增加,在损伤修复过程中发挥重要作用;后者产生的两个子代细胞中一个为干细胞,另一个为前体细胞,前体细胞进一步增殖分化为胃单元的其他类型细胞,由此既保证了干细胞池的稳定,又对衰老、凋亡的细胞进行了补充,从而维持生理状态下胃单元的动态平衡。(2)具有多向分化潜能。胃干细胞可分化为胃单元内所有类型的细胞,这可能与不对称分裂有关。胃干细胞通过这种分裂方式产生的前体细胞向上移行并增殖分化形成表面黏液细胞,向下移行则分化形成主细胞、壁细胞及内分泌细胞,这在正常状态下起到了对胃黏膜上皮细胞更新和损伤修复的作用^[1-2,12]。

胃干细胞定位于胃黏膜上皮管状腺的峡部,大量的前体细胞能够持续由峡部细胞增殖带的干细胞分裂生成。这类新生成的前体细胞具有双向分化的功能:一部分向管状腺上部移动,逐渐分化为表面黏液细胞;另一部分则向管状腺底部移动,逐渐分化成壁细胞、主细胞以及内分泌细胞,最终形成成熟的胃黏膜上皮细胞^[12]。而新近的研究结果表明:胃干细胞不仅仅存在于管状腺的峡部,同时还存在于管状腺的基底部^[1-2]。Kim 和 Shivdasani^[10]通过对小鼠胃上皮细胞进行谱系追踪发现:胃底腺和幽门腺所包含的胃干细胞截然不

同;在幽门腺中,胃干细胞主要定位于腺体的基底部和峡部,并分别被 Lgr5 和 Sox2 所标记。Barker 等^[13]同样证明 Lgr5 是胃干细胞的主要标志物,在未分化成熟的胃中,Lgr5 主要表达于胃底腺,而在成熟胃中,Lgr5 严格表达于幽门腺。目前普遍认为,活跃的 Lgr5+干细胞是胃上皮自我更新的主要源泉,其可以进一步分化为所有类型的胃黏膜上皮细胞。此外,Kim 和 Shivdasani^[10]在胃腺体的峡部还发现了 Vil1+干细胞,其研究结果显示:Vil1+干细胞在胃黏膜损伤时被激活,并参与胃黏膜上皮的修复过程。而对于胃底部腺体,则主要是定位于管状腺峡部的 Sox2+胃干细胞,同时还包括部分 Troy+、Runx1+、Mist1+及 Lrig1+胃干细胞^[14-16]。胃干细胞分为相对活跃和相对静止的两种类型,前者负责胃上皮的日常更新,后者可帮助胃上皮损伤后的修复,但其具体作用机制仍有待进一步研究阐明^[10,12-13]。

2 胃干细胞的调控

胃干细胞处在一个所谓的“龕”中,这个“龕”由各种细胞因子和细胞外基质组成,为胃干细胞提供最适宜的微环境以增殖、分化为子代细胞。胃干细胞的增殖与分化主要由 5 条信号通路调控,包括 WNT、Notch、EGF、Hedgehog 和 BMP^[1]。这些信号的梯度表达与协调作用对胃上皮的自我更新至关重要。

2.1 WNT 信号通路

WNT 信号通路最早被证实于胚胎发育中起重要作用,其与胚胎干细胞的增殖、分化及迁移过程密切相关。有研究表明:WNT 信号通路是维持胃干细胞“干性”、促进胃干细胞增殖、分化的主要信号通路^[11,17]。WNT 信号在胃干细胞区域高表达,其中 WNT3A 是 WNT 信号通路的主要配体^[13,18]。WNT 信号通路的激活是一个复杂的级联激活过程,首先 WNT 配体与干细胞表面 Frizzled-LRP5/6 受体结合,激活胞质内的散乱蛋白,通过一系列细胞内连锁反应,促使 β -连环蛋白(β -catenin)降解复合体的解离, β -catenin 进入细胞核并与 T 细胞因子 4(T cell factor 4, TCF4)等转录因子结合,进而激活目标基因转录,促进胃干细胞的增殖、分化。 β -catenin 作为一种调节细胞间相互作用的蛋白分子,在 WNT 信号通路中起关键作用。在部分上皮组织的干细胞中, β -catenin 和转录因子 TCF4 表达很高,去除 β -catenin 和 TCF4 可以导致上皮组织中干细胞数量锐减^[11,19]。此外,作为 WNT 信号的放大剂,R-spondin 与 Lgr4/5 的结合可增强 WNT 的信号强度^[20]。

WNT 信号通路对胃干细胞和前体细胞的增殖至关重要,低活化的 WNT 信号通路是维持胃上皮自我更新及动态平衡的关键因素^[21-22]。Sigal 等^[23]使用外源性 R-spondin 干预 Axin2+胃干细胞,间接证实 WNT 信号通路的活化对于干细胞的增殖及内稳态起重要作用。此外,Barker 等^[13]的研究结果同样证实 WNT 信号通路是维持 Lgr5+胃干细胞增殖及稳定的基础,也是促进以 Lgr5+胃干细胞为基础体外构建胃类器官生长的关键环节。而 WNT 信号通路的调控异常可以引

发育上皮自我更新紊乱:(1)WNT 信号通路的过度激活导致胃上皮过度增殖,增加细胞癌变风险,与胃癌的发生密切相关。(2)WNT 信号通路的失活导致胃上皮结构破坏与胃上皮动态平衡紊乱^[11,17]。

2.2 Notch 信号通路

Notch 信号通路是细胞发生、发展过程中干细胞自我更新和后天组织分化过程中的重要决定因素^[24-25]。Notch 信号通路在胃上皮干细胞区域高表达,是调控胃干细胞增殖与分化的重要信号^[26]。Notch 信号通路由 Notch 受体、Notch 配体、CSL-DNA 结合蛋白、其他效应物 and Notch 调节分子等组成。在哺乳类动物中,有 4 个同源 Notch 受体 (Notch1、Notch2、Notch3 和 Notch4) 和 5 个同源配体 [Delta 样配体 (Dll1、Dll3、Dll4), Serrate 样配体 (Jagged1 和 Jagged2)]^[27-28]。Notch1 和 Notch2 是与配体结合发挥生物学效应的主要受体。所有的同源 Notch 受体都是 I 型跨膜蛋白,均由胞外区、跨膜区和胞内区组成。同源配体也是 I 型跨膜蛋白,Notch 配体与胃干细胞表面 Notch 受体的结合引发 Notch 受体断裂以及 Notch1 胞内段 (Notch1 intracellular domain, NICD) 的释放, NICD 进入细胞核内后与 CSL 等转录因子结合,形成 NICD-CSL 转录激活复合体,进而激活 Notch 靶基因的表达,调节胃干细胞的增殖与分化^[26,28]。

使用 Notch 信号通路抑制剂不仅可以显著抑制胃干细胞的增殖,同时还可以抑制胃底腺和幽门腺前体细胞的增殖;而激活 Notch 信号通路则可以明显促进 Lgr5+ 胃干细胞的增殖,并加快基于胃干细胞构建的胃类器官的生长速度^[26,29-30]。Demitrack 等^[30]和 Gifford 等^[31]通过 Notch 信号通路抑制试验发现,Notch1 和 Notch2 是 Notch 信号通路调节胃干细胞增殖与分化的主要受体。通过对携带 Notch1 信号基因小鼠的胃上皮细胞进行谱系追踪, Demitrack 等^[30]和 Gifford 等^[31]发现 Notch1 信号通路在胃干细胞中处于持续激活状态。此外,他们还发现使用 Notch1 和 Notch2 受体特异性抑制剂阻断人胃类器官 Notch 信号通路可以显著降低类器官的生长速度。这间接表明 Notch 信号通路对人胃类器官的功能维持具有重要作用。Gifford 等^[31]通过阻断 Notch1 和 Notch2 受体后,发现 Notch 信号通路的阻断可以显著促进胃窦部干细胞的分化;而诱导 NICD 表达上调介导的 Notch 信号通路激活可以显著抑制 Lgr5+ 干细胞的分化,这与小肠隐窝区域 Notch 信号通路对小肠干细胞分化的调节截然不同^[29-31]。上述研究结果均表明:Notch 信号通路是调节胃干细胞增殖、分化,以及维持胃干细胞“干性”的关键环节。

2.3 EGF 信号通路

EGF 信号通路被证实是在胃上皮区域高表达,为胃干细胞增殖所必需。EGF 配体与受体结合后能够激活下游的 Ras/Raf/MAPK、PI3K/Akt 等信号通路,进而参与细胞增殖、存活及迁移等过程。Nomura 等^[32]的研究结果表明:EGF 信号通路对胃前体细胞的分化具有重要作用。Bartfeld 和 Clevers^[33]通过体外构建胃类器官模型,阐明 EGF 信号通路对胃干细胞的增殖及分化至关重要。Strand 和 Micchelli^[34]的研究结果表

明:正常状态下 EGF 在胃上皮区域处于低表达,而当胃上皮遭受损伤时,EGF 表达水平显著上调,并显著促进胃干细胞的增殖。

2.4 Hedgehog 信号通路

Hedgehog 信号通路是一条保守而重要的信号通路,广泛参与胚胎的发育以及多种细胞的增殖和分化活动^[35]。Hedgehog 信号通路由 Hedgehog 信号蛋白、Ptch 受体蛋白、Smo 蛋白、Gli 蛋白和下游靶基因等组成。Hedgehog 基因高度保守,在哺乳动物中就发现 3 种同源基因:Sonic hedgehog (Shh)、Indian hedgehog (Ihh) 和 Desert hedgehog (Dhh)^[36]。尽管 Hedgehog 信号通路已经得到广泛关注,但其在胃干细胞领域的作用仍不清楚。Shh 主要由胃壁细胞分泌,在胃上皮的再生以及损伤修复过程中起重要作用^[37]。有研究结果表明:Shh 的表达与胃底腺细胞的分化密切相关,特异性阻断 Hedgehog 信号通路可以显著促进胃上皮细胞增殖^[37-38]。Kang 等^[39]和 Xiao 等^[40]通过构建胃溃疡模型,分别证实阻断 Hedgehog 信号通路不仅可以抑制上皮细胞分化,还可以促进上皮细胞增殖。此外,有研究结果显示:Hedgehog 信号通路主要通过介导 E-钙黏蛋白的表达进而促进上皮细胞分化,特异性阻断 Hedgehog 信号通路可以导致黏液细胞和主细胞数量减少^[41-42]。

2.5 BMP 信号通路

在胃上皮细胞和间充质细胞中广泛表达 BMP 信号的受体和配体^[1,43]。BMP 信号通路的激活涉及 BMP 配体与受体结合、Smad1/5/8 磷酸化及其与 Smad4 结合、Smad 复合体进入细胞核以及最终 BMP 靶基因的表达,其异常表达会导致机体发育过程中多种功能的紊乱。Noggin 在小鼠的壁细胞中过表达,可抑制 BMP 信号通路并导致壁细胞数量的显著减少以及增殖的发生,这提示 BMP 是干细胞增殖的重要负调控信号^[44]。Maloum 等^[45]的研究结果表明:BMP 信号的缺失将导致壁细胞数量减少,而内分泌细胞数量增加,提示 BMP 信号通路在胃上皮细胞分化过程中起重要作用。

3 基于胃干细胞构建胃类器官模型

20 世纪末,随着消化道黏膜上皮细胞提取技术的改进,有学者尝试对该细胞进行体外培养;然而,在这些培养体系中,细胞仅能进行短暂的分裂和扩增,在 1~2 周内即停止增殖,无法实现对消化道黏膜上皮细胞长期、稳定的体外培养^[46-47]。直到 2010 年,Barker 等^[13]首次报道了一种利用小鼠胃干细胞构建胃类器官模型的方法。这为胃生理与疾病的研究提供了一种新的平台。

目前,有 3 种较为成熟的胃类器官模型:(1)基于成体干细胞的胃类器官模型,该模型也是目前应用最广泛的胃类器官模型。(2)基于诱导多能干细胞的胃类器官模型。(3)基于胚胎干细胞的胃类器官模型^[8,13]。上述模型实质均为体外模拟胃上皮的微环境,对胃干细胞或多能干细胞进行增殖与分化,形成包含所有类型胃上皮细胞的类器官结构。由于起始材料和细胞来源的不同,基于成体干细胞和多能干细胞

的胃类器官之间也存在差异:(1)除上皮细胞成分外,基于多能干细胞的胃类器官还包含间充质细胞成分,如平滑肌细胞、成纤维细胞等。(2)基于多能干细胞的胃类器官可在体外培养体系中多次传代,但并不具有像基于成体干细胞的胃类器官一样的无限扩增能力。(3)基于成体干细胞的胃类器官在体外接种培养 1~2 周即可稳定成熟,而基于多能干细胞的胃类器官要接近 30~60 d 才能趋于稳定。(4)基于多能干细胞的胃类器官表型更接近胚胎组织而非成体组织^[6]。

基于成体干细胞的胃类器官可以通过消化内镜或外科手术获取胃组织进行 3D 体外培养。为了构建基于成体干细胞的胃类器官原代培养,需使用螯合液处理胃组织标本,获取胃干细胞,并接种至适当的体外培养体系^[33,48]。既往研究结果表明:Lgr5+细胞在体内组织中的表达特性都可经体外培养获得,使用单个 Lgr5+胃干细胞,即足以在体外培养体系中建立胃类器官,说明 Lgr5+胃干细胞是体外构建胃类器官的重要来源^[13]。胃类器官的培养体系包括两部分:基质胶和培养基。基质胶是一种富含层黏连蛋白及胶原蛋白的基质蛋白胶,其成分与许多组织的细胞外基质相似,为胃类器官的体外培养提供三维基质支持^[13,18]。通过在基质胶中添加 Notch 配体 Jagged1,可避免 Notch 信号通路的丢失,促进胃类器官的增殖。胃类器官的培养基分为扩增培养基和分化培养基:扩增培养基富含胃干细胞增殖所必需的生长因子,可模拟胃上皮干细胞增殖信号,用于胃类器官的长期培养与扩增;分化培养基在扩增培养基的基础上,去除 WNT 家族成员 3A(WNT member 3A, WNT3A)等成分,用于诱导干细胞分化为各种类型的终末分化胃上皮细胞。此外,培养基中添加的 Rho 蛋白激酶抑制剂可预防细胞失巢凋亡^[33]。

胃类器官与胃上皮组织在细胞成分、组织架构及特定功能等方面高度相似。分化的胃类器官包含主细胞、壁细胞、表面黏液细胞、颈黏液细胞及内分泌细胞等所有类型的终末分化胃上皮细胞^[6-7]。形态学上,胃类器官呈现由单层上皮细胞构成的球体结构,其中心为腔体,内含细胞碎片及细胞分泌物,外周与基质胶接触。Sebrell 等^[49]的研究结果显示:胃类器官并非静止不动,而是在原地不停地蠕动,但其移动的物理距离有限。此外,Sebrell 等^[49]还观察到类器官长出类似伪足样的结构,这可能是类器官自转运动的潜在原因。类器官腔内聚集着液体,推测是来自上皮细胞的分泌物。当液体积聚到一定程度时,类器官将发生破溃,内容物随之被释放,囊腔塌陷,此后不久类器官可再次呈现球体结构;不仅如此,不同的类器官之间还可以发生相互融合,如此动态循环。

4 小结

综上,胃干细胞生活在特定的微环境中,包括多种 WNT、Notch、EGF、Hedgehog 和 BMP 在内的信号通路,严格地调控胃干细胞的命运,维持胃干细胞的自我更新状态。由胃干细胞衍生来的胃类器官模型,进一步证明了上述信号通路在胃干细胞的维持和命运决定中的重要作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Han ME, Oh SO. Gastric stem cells and gastric cancer stem cells [J]. *Anat Cell Biol*, 2013, 46(1): 8-18. DOI: 10.5115/acb.2013.46.1.8.
- [2] Mills JC, Shivdasani RA. Gastric epithelial stem cells [J]. *Gastroenterology*, 2011, 140(2): 412-424. DOI: 10.1053/j.gastro.2010.12.001.
- [3] Bacakova L, Zarubova J, Travnickova M, et al. Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells - a review [J]. *Biotechnol Adv*, 2018, 36(4): 1111-1126. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2018.03.011.
- [4] Hemmat S, Lieberman DM, Most SP. An introduction to stem cell biology [J]. *Facial Plast Surg*, 2010, 26(5): 343-349. DOI: 10.1055/s-0030-1265015.
- [5] Bjerknes M, Cheng H. Multipotential stem cells in adult mouse gastric epithelium [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002, 283(3): G767-777. DOI: 10.1152/ajpgi.00415.2001.
- [6] Pompaiha M, Bartfeld S. Gastric Organoids: An Emerging Model System to Study Helicobacter pylori Pathogenesis [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2017, 400: 149-168. DOI: 10.1007/978-3-319-50520-6_7.
- [7] Merker SR, Weitz J, Stange DE. Gastrointestinal organoids: How they gut it out [J]. *Dev Biol*, 2016, 420(2): 239-250. DOI: 10.1016/j.ydbio.2016.08.010.
- [8] McCracken KW, Catú EM, Crawford CM, et al. Modelling human development and disease in pluripotent stem-cell-derived gastric organoids [J]. *Nature*, 2014, 516(7531): 400-404. DOI: 10.1038/nature13863.
- [9] Eicher AK, Berns HM, Wells JM. Translating Developmental Principles to Generate Human Gastric Organoids [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2018, 5(3): 353-363. DOI: 10.1016/j.jcmgh.2017.12.014.
- [10] Kim TH, Shivdasani RA. Stomach development, stem cells and disease [J]. *Development*, 2016, 143(4): 554-565. DOI: 10.1242/dev.124891.
- [11] Van Camp JK, Beckers S, Zegers D, et al. Wnt signaling and the control of human stem cell fate [J]. *Stem Cell Rev*, 2014, 10(2): 207-229. DOI: 10.1007/s12015-013-9486-8.
- [12] Brittan M, Wright NA. Gastrointestinal stem cells [J]. *J Pathol*, 2002, 197(4): 492-509. DOI: 10.1002/path.1155.
- [13] Barker N, Huch M, Kujala P, et al. Lgr5(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units in vitro [J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 6(1): 25-36. DOI: 10.1016/j.stem.2009.11.013.
- [14] Arnold K, Sarkar A, Yram MA, et al. Sox2(+) adult stem and progenitor cells are important for tissue regeneration and survival of mice [J]. *Cell Stem Cell*, 2011, 9(4): 317-329. DOI: 10.1016/j.stem.2011.09.001.
- [15] Hayakawa Y, Ariyama H, Stancikova J, et al. Mist1 Expressing Gastric Stem Cells Maintain the Normal and Neoplastic Gastric Epithelium and Are Supported by a Perivascular Stem Cell Niche [J]. *Cancer Cell*, 2015, 28(6): 800-814. DOI: 10.1016/j.ccell.2015.10.003.
- [16] Matsuo J, Kimura S, Yamamura A, et al. Identification of Stem Cells in the Epithelium of the Stomach Corpus and Antrum of Mice [J]. *Gastroenterology*, 2017, 152(1): 218-231. e14. DOI: 10.1053/j.gastro.2016.09.018.
- [17] Flanagan DJ, Austin CR, Vincan E, et al. Wnt Signalling in Gastrointestinal Epithelial Stem Cells [J]. *Genes (Basel)*, 2018, 9

- (4). pii: E178. DOI:10.3390/genes9040178.
- [18] Flanagan DJ, Schwab RH, Tran BM, et al. Isolation and Culture of Adult Intestinal, Gastric, and Liver Organoids for Cre-recombinase-Mediated Gene Deletion [J]. *Methods Mol Biol*, 2016 [Epub ahead of print]. DOI:10.1007/7651_2016_14.
- [19] Korinek V, Barker N, Moerer P, et al. Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4 [J]. *Nat Genet*, 1998, 19(4):379-383. DOI:10.1038/1270.
- [20] de Lau W, Barker N, Low TY, et al. Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling [J]. *Nature*, 2011, 476(7360):293-297. DOI:10.1038/nature10337.
- [21] Kim BM, Buchner G, Miletich I, et al. The stomach mesenchymal transcription factor Barx1 specifies gastric epithelial identity through inhibition of transient Wnt signaling [J]. *Dev Cell*, 2005, 8(4):611-622. DOI:10.1016/j.devcel.2005.01.015.
- [22] Willet SG, Mills JC. Stomach Organ and Cell Lineage Differentiation: from Embryogenesis to Adult Homeostasis [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2016, 2(5):546-559. DOI:10.1016/j.jcmgh.2016.05.006.
- [23] Sigal M, Logan CY, Kapalczyńska M, et al. Stromal R-spondin orchestrates gastric epithelial stem cells and gland homeostasis [J]. *Nature*, 2017, 548(7668):451-455. DOI:10.1038/nature23642.
- [24] Bray SJ. Notch signalling in context [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17(11):722-735. DOI:10.1038/nrm.2016.94.
- [25] Demitrack ES, Samuelson LC. Notch regulation of gastrointestinal stem cells [J]. *J Physiol*, 2016, 594(17):4791-4803. DOI:10.1113/JP271667.
- [26] Demitrack ES, Samuelson LC. Notch as a Driver of Gastric Epithelial Cell Proliferation [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2017, 3(3):323-330. DOI:10.1016/j.jcmgh.2017.01.012.
- [27] Kopan R, Ilagan MX. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism [J]. *Cell*, 2009, 137(2):216-233. DOI:10.1016/j.cell.2009.03.045.
- [28] Katoh M, Katoh M. Notch signaling in gastrointestinal tract (review) [J]. *Int J Oncol*, 2007, 30(1):247-251.
- [29] Demitrack ES, Gifford GB, Keeley TM, et al. Notch signaling regulates gastric antral LGR5 stem cell function [J]. *EMBO J*, 2015, 34(20):2522-2536. DOI:10.15252/embj.201490583.
- [30] Demitrack ES, Gifford GB, Keeley TM, et al. NOTCH1 and NOTCH2 regulate epithelial cell proliferation in mouse and human gastric corpus [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2017, 312(2):G133-G144. DOI:10.1152/ajpgi.00325.2016.
- [31] Gifford GB, Demitrack ES, Keeley TM, et al. Notch1 and Notch2 receptors regulate mouse and human gastric antral epithelial cell homeostasis [J]. *Gut*, 2017, 66(6):1001-1011. DOI:10.1136/gutjnl-2015-310811.
- [32] Nomura S, Settle SH, Leys CM, et al. Evidence for repatterning of the gastric fundic epithelium associated with Ménétrier's disease and TGF α overexpression [J]. *Gastroenterology*, 2005, 128(5):1292-1305.
- [33] Bartfeld S, Clevers H. Organoids as Model for Infectious Diseases: Culture of Human and Murine Stomach Organoids and Microinjection of *Helicobacter Pylori* [J]. *J Vis Exp*, 2015, (105):e53359. DOI:10.3791/53359.
- [34] Strand M, Micchelli CA. Regional control of *Drosophila* gut stem cell proliferation: EGF establishes GSSC proliferative set point & controls emergence from quiescence [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11):e80608. DOI:10.1371/journal.pone.0080608.
- [35] Konstantinou D, Bertaux-Skeirik N, Zavros Y. Hedgehog signaling in the stomach [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2016, 31:76-82. DOI:10.1016/j.coph.2016.09.003.
- [36] Katoh Y, Katoh M. Hedgehog signaling pathway and gastrointestinal stem cell signaling network (review) [J]. *Int J Mol Med*, 2006, 18(6):1019-1023.
- [37] van den Brink GR, Hardwick JC, Tytgat GN, et al. Sonic hedgehog regulates gastric gland morphogenesis in man and mouse [J]. *Gastroenterology*, 2001, 121(2):317-328.
- [38] van den Brink GR, Hardwick JC, Nielsen C, et al. Sonic hedgehog expression correlates with fundic gland differentiation in the adult gastrointestinal tract [J]. *Gut*, 2002, 51(5):628-633.
- [39] Kang DH, Han ME, Song MH, et al. The role of hedgehog signaling during gastric regeneration [J]. *J Gastroenterol*, 2009, 44(5):372-379. DOI:10.1007/s00535-009-0006-1.
- [40] Xiao C, Feng R, Engevik AC, et al. Sonic Hedgehog contributes to gastric mucosal restitution after injury [J]. *Lab Invest*, 2013, 93(1):96-111. DOI:10.1038/labinvest.2012.148.
- [41] Xiao C, Ogle SA, Schumacher MA, et al. Hedgehog signaling regulates E-cadherin expression for the maintenance of the actin cytoskeleton and tight junctions [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2010, 299(6):G1252-1265. DOI:10.1152/ajpgi.00512.2009.
- [42] Xiao C, Ogle SA, Schumacher MA, et al. Loss of parietal cell expression of Sonic hedgehog induces hypergastrinemia and hyperproliferation of surface mucous cells [J]. *Gastroenterology*, 2010, 138(2):550-561, 561. e1-8. DOI:10.1053/j.gastro.2009.11.002.
- [43] Medema JP, Vermeulen L. Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer [J]. *Nature*, 2011, 474(7351):318-326. DOI:10.1038/nature10212.
- [44] Shinohara M, Mao M, Keeley TM, et al. Bone morphogenetic protein signaling regulates gastric epithelial cell development and proliferation in mice [J]. *Gastroenterology*, 2010, 139(6):2050-2060. e2. DOI:10.1053/j.gastro.2010.08.052.
- [45] Maloum F, Allaire JM, Gagné-Sansfaçon J, et al. Epithelial BMP signaling is required for proper specification of epithelial cell lineages and gastric endocrine cells [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2011, 300(6):G1065-1079. DOI:10.1152/ajpgi.00176.2010.
- [46] Evans GS, Flint N, Somers AS, et al. The development of a method for the preparation of rat intestinal epithelial cell primary cultures [J]. *J Cell Sci*, 1992, 101(Pt 1):219-231.
- [47] Whitehead RH, Demmler K, Rockman SP, et al. Clonogenic growth of epithelial cells from normal colonic mucosa from both mice and humans [J]. *Gastroenterology*, 1999, 117(4):858-865.
- [48] Bertaux-Skeirik N, Centeno J, Gao J, et al. Oncogenic Transformation of Human-Derived Gastric Organoids [J]. *Methods Mol Biol*, 2016 [Epub ahead of print]. DOI:10.1007/7651_2016_4.
- [49] Sebrell TA, Sidar B, Bruns R, et al. Live imaging analysis of human gastric epithelial spheroids reveals spontaneous rupture, rotation and fusion events [J]. *Cell Tissue Res*, 2018, 371(2):293-307. DOI:10.1007/s00441-017-2726-5.

(收稿日期: 2019-01-14)

本文引用格式

范圣先, 尹健一, 王剑, 等. 胃干细胞调控机制及其在胃类器官构建中的应用研究 [J]. *中华消化外科杂志*, 2019, 18(3):287-291. DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2019.03.017.

Fan Shengxian, Yin Jianyi, Wang Jian, et al. Regulatory mechanism of gastric stem cells and their application research in establishment of gastric organoids [J]. *Chin J Dig Surg*, 2019, 18(3):287-291. DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2019.03.017.