

肠道类器官模型检测方法研究进展与初探

王雪¹ 张佳琪^{2*}

¹中医药防治重大疾病基础研究北京市重点实验室, 中国中医科学院医学实验中心, 北京 100700;

²中国中医科学院西苑医院, 北京 100091)

摘要 肠道类器官是由肠道隐窝或干细胞在3D培养条件下生成的具有肠上皮结构和功能的微型空心球体, 目前已被广泛应用于炎症性肠病、肠道损伤再生、肠癌等多种肠道疾病的研究。该文对肠道类器官的常用检测手段进行综述, 并对文献报道较多的实验方法进行初探, 以为类器官相关科研及应用提供参考。

关键词 肠道疾病; 小肠类器官; 检测方法

Research Progress and Preliminary Exploration of Intestinal Organoid Model Detection Methods

WANG Xue¹, ZHANG Jiaqi^{2*}

¹Beijing Key Laboratory of Basic Research on Prevention and Treatment of Major Diseases of Traditional Chinese Medicine, Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

²Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China)

Abstract Intestinal organoids are miniature hollow spheres with intestinal epithelial structure and function generated by intestinal crypts or stem cells under 3D culture conditions. They have been widely used in inflammatory bowel disease, intestinal injury regeneration, intestinal cancer, etc. This article reviews the commonly used detection methods of intestinal organoids, and makes a preliminary exploration of experimental methods that have been reported in the literature, hoping to provide a reference for the scientific research and application of organoid.

Keywords intestinal diseases; small intestine organoid; detection methods

肠道类器官是成体肠道干细胞、诱导多能干细胞或胚胎干细胞在含有R-spondin1、EGF、Noggin、Wnts等生长因子的基质胶中生成的具有完整肠上皮结构的微型空心球体, 这些球体不仅包含原生肠组织几乎全部的细胞类型(肠上皮细胞、肠内分泌细胞、杯状细胞、潘氏细胞等), 而且表现出与在体相似的功能, 如黏液的产生、吸收和分泌等, 为肠道疾病的研究提供了可行、可信的体外模型^[1-2]。肠道

类器官可在体外持续传代并保持稳定的表型和遗传特征, 与动物模型相比, 肠道类器官模型不仅更加直观, 操作也更为简便, 能够更好地模拟微环境、细胞间相互作用和体内生物过程^[3-4]。类器官是具有一定空间结构的三维细胞复合体, 其检测和评估方法有别于传统的2D细胞, 但目前类器官检测手段并不完善, 且相关文献报道也不甚详细, 这无疑阻碍了类器官技术在肠道疾病研究中的应用与推广。因此, 本

收稿日期: 2021-09-14 接受日期: 2021-10-27

中国中医科学院基本科研业务费优秀青年科技人才(创新类)培养专项(批准号: ZZ14-YQ-040)、中国中医科学院科技创新工程(批准号: 2021A01012)和国家自然科学基金(批准号: 81804078)资助的课题

*通讯作者。Tel: 15210595175, Email: zjq405@163.com

Received: September 14, 2021 Accepted: October 27, 2021

This work was supported by Fundamental Scientific Research Fund of China Academy of Chinese Medical Science for Excellent Young Scientific and Technological Talents (Grant No.ZZ14-YQ-040), Science and Technology Innovation Project of China Academy of Chinese Medical Sciences (Grant No.2021A01012), and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81804078)

*Corresponding author. Tel: +86-15210595175, E-mail: zjq405@163.com

文对肠道类器官的常用检测手段进行综述, 并对文献报道较多的实验方法进行初探, 以期对类器官相关科研及应用提供参考。

1 形态结构检测

目前, 基于各种染色技术(包括HE染色、PAS染色、Alcian blue染色、免疫组织化学染色和免疫荧光染色等)的指标分析是目前应用于肠道类器官研究的主要检测手段。鉴于类器官特殊的形态结构和培养环境, 如何有效地从三维培养体系中提取并固定完整的类器官是进行各种染色检测的前提条件与关键步骤。现有研究多采用细胞回收液回收在基质胶中培养的肠道类器官, 该回收液与类器官培养物置于冰上共同孵育后可有效解聚Matrigel胶而不影响类器官的结构与活性, 并能够减少因Matrigel胶残留导致的染色较差和背景信号高等问题^[5]。回收的肠类器官经4%多聚甲醛固定, 可与1.5%~3%低熔点的琼脂糖混匀凝固后进行石蜡包埋, 制备石蜡切片, 或经10%~30%蔗糖溶液脱水后进行OCT包埋制备冰冻切片, 类器官切片后续染色方法与其他组织基本一致^[6-7]。回收的肠道类器官也可以进行整体组织免疫荧光染色, 类器官经固定、通透、一抗孵育、二抗孵育和组织透明化等操作后进行3D显微成像和分析, 能够全面地呈现出类器官的形态结构及分子生物学改变情况^[1]。

2 增殖活性检测

大部分研究通过观察类器官球状结构形成率与大小, 评判类器官生长情况。肠道类器官分化成熟后可通过出芽方式形成更多的类器官, 因此有研究通过计算类器官的出芽情况, 如未萌芽、1个芽、2个芽、3个芽或更多芽的类器官所占比例, 从而评估肠道类器官的增殖和分化能力^[8]。DNA合成检测是目前检测细胞增殖最准确可靠的方式, FU等^[9]将类器官与Edu荧光探针共同孵育后, 利用温和细胞解离试剂(gentle cell dissociation reagent, GCDR)将类器官从基质胶中释放出来, 并用TrypLE Express酶将其解离成为单细胞悬液, 采用流式细胞仪检测细胞增殖情况。Ki67是增殖细胞特异性表达蛋白, 常作为细胞增殖的标志, 有研究将类器官进行固定-通透-免疫荧光染色等操作后, 利用共聚焦显微镜和Imaris软件对肠道类器官进行三维重构, 并分析每个

类器官中Ki67阳性细胞所占比例来表明细胞增殖能力^[10]。MTT检测通过检测活细胞相关物质的含量间接评价细胞增殖能力, LINDEMANS等^[11]在类器官培养体系中加入MTT溶剂, MTT与活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶反应生成还原终产物甲瓩, 随后使用酸性异丙醇溶解基质胶中的甲瓩, 并根据吸光度值评估类器官活性。

3 肠屏障功能检测

肠黏膜上皮(机械屏障)的完整性是肠道屏障的结构基础, 当机械屏障功能受损时, 肠道通透性增高, 会导致原本不吸收或吸收量极少的物质通过肠道的量增加, 因而肠道通透性增高可间接反映肠道机械屏障功能受损。RALLABANDI等^[12]在培养基中加入25 ng/mL的FITC荧光标记的硫酸葡聚糖(4 kDa), 并在荧光显微镜下持续观察60 min, 通过分析硫酸葡聚糖进入管腔的数量表明肠道类器官的通透性, 进而反映肠屏障功能。基于相同的原理, 有研究在培养基中加入1 mmol/L的荧光黄示踪剂, 选取具有可比直径 $[(80\pm 3)\mu\text{m}]$ 的类器官, 以5 min为成像间隔, 在共聚焦显微镜上进行60 min的延时成像, 并计算每个时间点类器官管腔内外荧光相对强度值(内部荧光/内部荧光+外部荧光), 可视化地对肠道屏障破坏情况进行定量的评估^[13]。

4 肠道类器官基因编辑技术

对肠道类器官进行基因修饰是研究肠道生物过程和疾病模型的重要手段。HORITA等^[14]建立了一种将基因片段引入小鼠小肠类器官的方法, 研究人员利用移液器将回收后的类器官机械分离成隐窝片段, 然后将等体积的隐窝片段、基质胶和包含*mCherry*基因的慢病毒载体混合培养并传代, 重复上述步骤3次后可得到长期稳定表达*mCherry*荧光蛋白的小肠类器官, 为肠道类器官的研究提供了可靠的基因编辑方式。SATO团队^[15]采用电转染的方法将PiggyBac转座子转移到由人结肠类器官解离的单细胞中, 在条件培养基中加入rho相关蛋白激酶(Rho-associated kinase, ROCK)抑制剂和糖原合成酶激酶-3改善单细胞的恢复能力, 并筛选转染成功的单细胞再次形成成熟的类器官, 相比之前病毒转染的方法, 此法省略了病毒载体包装与浓缩纯化的步骤, 同时降低了污染的风险, 可加快研究速度。2020年HANS研

究组^[16]建立了不依赖同源臂的基因编辑技术,以非同源性末端接合(non-homologous end joining, NHEJ)为蓝本建立了新颖、稳健的基因敲入技术CRISPR-HOT,破除了之前技术对于特定细胞周期的依赖,提高了基因编辑的效率,而且也去除了基因编辑方式对于TP53活性抑制的依赖,为成体干细胞来源的类器官可视化研究提供了重要的工具平台。

5 肠道类器官检测方法初探结果

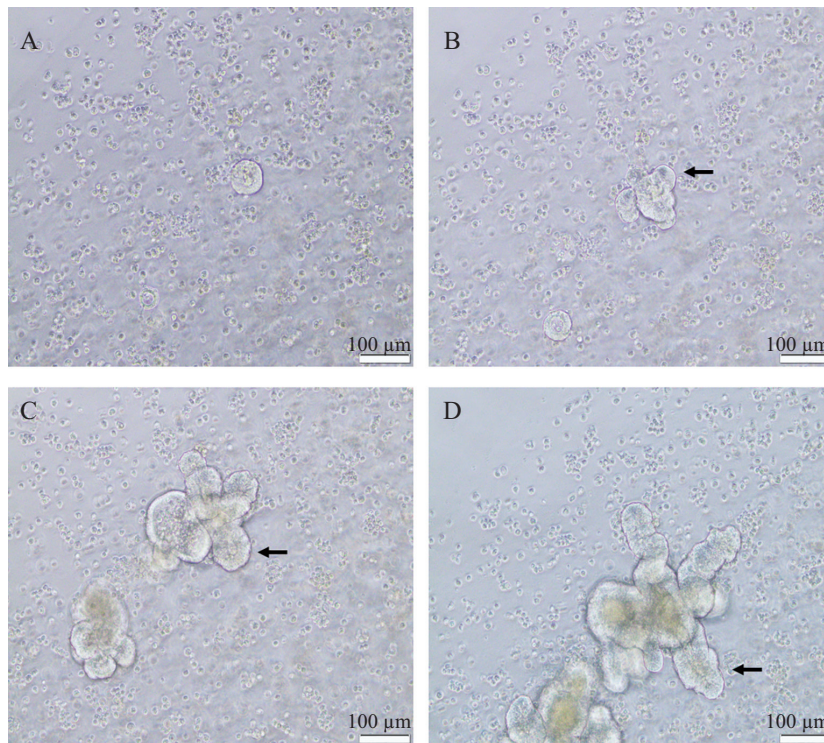
5.1 小肠类器官培养体系的建立

分离C57BL/6小鼠近胃端长度约20 cm小肠组织,纵向剖开后用预冷的PBS彻底清洗。将洗净的小肠剪成2 mm左右的小段并转移至离心管,用新鲜的冷PBS反复吹打清洗15~20次,直至上清液澄清。弃去上清液,将组织片段重悬于GCDR(Stemcell, Cat No.07174)中,并将其置于摇床上室温孵育15 min。组织片段经重力沉降约30 s后弃上清,加入含有0.1% BSA的冷PBS并反复吹打数次,使用70 μm 滤网过滤上清液,此步骤重复3次。将滤液收集到干净的锥形管中,290 $\times\text{g}$

离心5 min后收集沉淀。用含有0.1% BSA的冷PBS重悬沉淀,200 $\times\text{g}$ 离心3 min,收集沉淀重悬于预冷的DMEM/F-12中。计数,以每微升Matrigel(Corning, Cat No.356231)30个隐窝的密度计算接种体积,用基质胶重悬隐窝。取50 μL 基质胶接种到提前预热的培养板中央,含隐窝的基质胶形成液滴状。将接种好的培养板置于37 $^{\circ}\text{C}$ 静置10 min,待基质胶完全凝固后,在液滴周边加入750 μL 的类器官完全培养基(IntestiCult, Stemcell, Cat No.06005)。培养板在37 $^{\circ}\text{C}$ 和5% CO_2 条件下进行培养,每周进行3次完全换液。光学显微镜下观察小肠类器官生长情况,隐窝分离培养24 h后形成球状结构(图1A),培养第3至5天后小肠类器官开始萌芽(图1B和图1C箭头所示),在培养第7天时类器官形成复杂的多叶结构,类似小肠的隐窝和绒毛(图1D箭头所示)。

5.2 小肠类器官病理染色结果

吸除培养基,用4%多聚甲醛重悬生长数天的小肠类器官和基质胶,将混合物转移至离心管,放在冰上孵育1 h。4 $^{\circ}\text{C}$ 离心机中1 500 r/min离心5 min收集

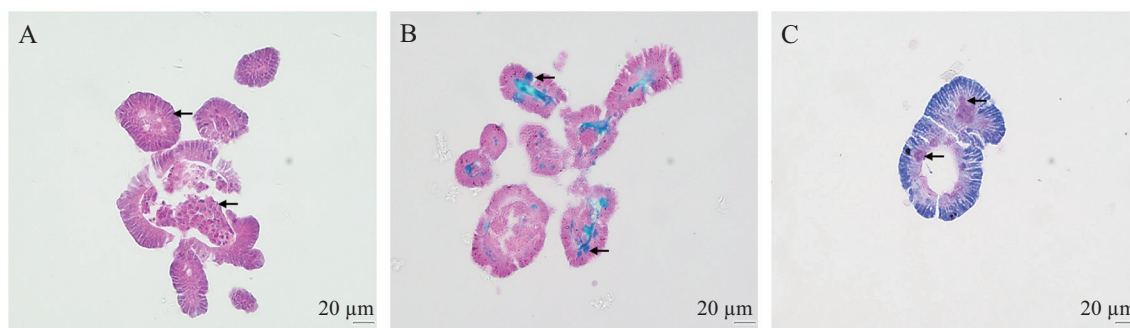


A: 培养1天的小肠类器官; B、C: 培养3天和5天的小肠类器官,开始出芽(黑色箭头); D: 培养7天的小肠类器官,形成类似小肠隐窝和绒毛的多叶结构(黑色箭头)。

A: small intestine organoids cultured for 1 day; B,C: small intestine organoids cultured for 3 and 5 days, beginning to bud (black arrow); D: small intestine organoids cultured for 7 days, forming crypts and the leafy structure of the villi (black arrow).

图1 光学显微镜下小肠类器官形成过程

Fig.1 The formation of small intestine organoids under an optical microscope



A: 小肠类器官HE染色(箭头指示单层肠上皮细胞和囊腔结构); B: 小肠类器官Alcian blue染色(箭头指示酸性黏蛋白); C: 小肠类器官PAS染色(箭头指示杯状细胞及黏液物质)。

A: HE staining of small intestine organoids (black arrow shows monolayer intestinal epithelial cells and cystic structure); B: Alcian blue staining of small intestine organoids (black arrow shows acid mucin); C: PAS staining of small intestine organoids (black arrow shows goblet cells and mucus material).

图2 病理染色检测小肠类器官形态结构

Fig.2 Pathological staining to detect the morphology and structure of small intestine organoids

沉淀,用预冷的PBS清洗3次去除基质胶。然后将样本转移至30%蔗糖溶液,4 °C孵育过夜。第二天收集类器官沉淀,与3%低熔点的琼脂糖混悬后迅速将其转移到模具(PCR管切掉管的下半部分剩余的圆环)中,4 °C孵育1 h以上以确保琼脂糖固化。取出固化好的琼脂糖包埋块继续在OCT胶中包埋,将样品切成约5 μm厚度的冰冻切片,进行HE染色、Alcian blue染色和PAS染色。HE染色结果可见小肠类器官主要是由单层极化柱状肠上皮细胞构成的,其中心具有囊腔结构,内含凋亡的上皮细胞;Alcian blue染色和PAS染色显示小肠类器官中分布着分化成熟的杯状细胞(图2,黑色箭头所示蓝色和紫红色),能够产生并分泌黏液后进入囊腔。病理染色结果表明,体外培养的小肠类器官具备了肠上皮的基本结构和功能。

5.3 小肠类器官全组织免疫荧光检测结果

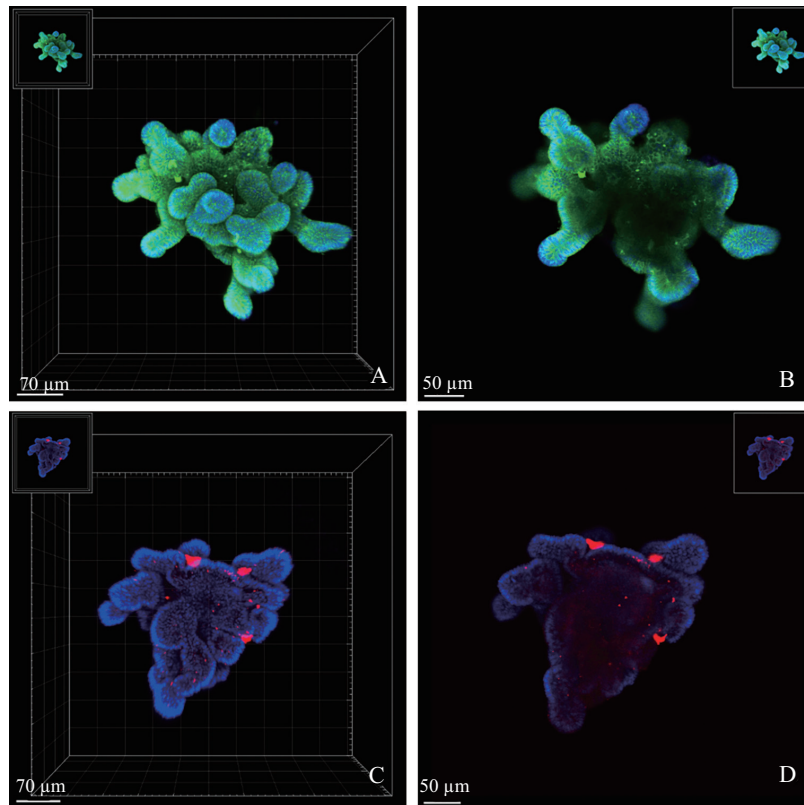
小肠类器官全组织免疫荧光染色采用CytoVista 3D细胞透明/染色试剂盒(Invitrogen, Cat No.V11325)处理。用4%多聚甲醛将类器官在4 °C固定过夜, PBS清洗2次,进行组织通透(类器官依次置于以下试剂中,并处理相应的时间:50%甲醇浸泡10 min,80%甲醇浸泡10 min,100%甲醇浸泡10 min,20% DMSO/甲醇浸泡10 min,80%甲醇浸泡10 min,50%甲醇浸泡10 min, PBS浸泡10 min,最后置于2% Triton X-100中处理10 min);通透后的类器官置于抗体渗透缓冲液中室温孵育30 min;加入封闭液,37 °C条件下孵育30 min;弃封闭液,加入E-钙黏蛋白(E-cadherin)或黏蛋白2(Mucin 2)一抗抗体(1:200),37 °C条件下孵育1 h; PBS洗5次(10 min/次),加入荧光二抗(1:500)并在37 °C

条件下孵育1 h; PBS洗5次(10 min/次),用CytoVista 3D细胞培养透明试剂孵育5~10 min;采用双光子扫描显微镜(日本, Olympus公司)对小肠类器官进行Z轴扫描,步进2 μm,然后通过显微图像分析软件Imaris对类器官进行三维重建和分析。荧光结果显示,类器官中广泛分布着对维持上皮细胞形态和结构完整性起主要作用的E-cadherin(图3A和图3B,绿色荧光),同时散在分布着对肠黏膜起保护作用的Mucin 2(图3C和图3D,红色荧光),这种三维染色方法可以更直观地检测和分析各种信号在小肠类器官中的表达分布情况。

6 结语和展望

自2009年Hans在*Nature*首次报道了在体外将Lgr5⁺肠道干细胞培养成具备小肠绒毛和隐窝结构的肠道类器官以来^[7],该模型已被广泛应用于肠道相关疾病的研究中,并在2013年和2017年分别被*Science*和*Nature Methods*杂志评为年度“十大突破”技术之一。肠道类器官模型包含所有类型的肠上皮细胞,并具有水、离子吸收和转运等生理功能,实现了在体外培养环境中对肠上皮组织的复制,在肠道生理病理学基础研究、疾病建模、药物筛选与开发、再生医学等领域显示出巨大的应用前景。目前,肠道类器官模型在国内相关领域的工作刚刚起步,本文对现有的肠道类器官检测手段进行了概述,并建立了小鼠肠道类器官模型,详述检测方法和结果,以促进该模型在肠道疾病研究中的深入探索。

利益冲突声明:所有研究人员声明本文不存在任何



A: E-钙黏蛋白(绿色荧光)三维水平成像; B: E-钙黏蛋白(绿色荧光)二维水平成像; C: 黏蛋白2(红色荧光)三维水平成像; D: 黏蛋白2(红色荧光)二维水平成像。

A: E-cadherin (green fluorescence) three-dimensional imaging; B: E-cadherin (green fluorescence) two-dimensional imaging; C: Mucin 2 (red fluorescence) three-dimensional imaging; D: Mucin 2 (Red fluorescence) two-dimensional imaging.

图3 小肠类器官全组织免疫荧光染色

Fig.3 Whole tissue immunofluorescence staining of small intestine organoids

利益冲突关系。

作者贡献分布: 王雪完成实验设计、数据整理和论文撰写; 张佳琪完成论文审校。

参考文献 (References)

- [1] SATO T, STANGE D E, FERRANTE M, et al. Long term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium [J]. *Gastroenterology*, 2011, 141(5): 1762-72.
- [2] ZUR BRUEGGE T F, LIESE A, DONATH S, et al. Intestinal organoids in colitis research: focusing on variability and cryopreservation [J]. *Stem Cells Int*, 2021, 2021: 9041423.
- [3] ZACHOS N C, KOVBASNJUK O, FOULKE-ABEL J, et al. Human enteroids/colonoids and intestinal organoids functionally recapitulate normal intestinal physiology and pathophysiology [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(8): 3759-66.
- [4] WU X, LI Z, ZHANG H, et al. Modeling colorectal tumorigenesis using the organoids derived from conditionally immortalized mouse intestinal crypt cells [J]. *Genes Dis*, 2021, 8(6): 814-26.
- [5] PLEGUEZUELOS-MANZANO C, PUSCHHOF J, BRINK S V D, et al. Establishment and culture of human intestinal organoids derived from adult stem cells [J]. *Curr Protoc Immunol*, 2020, 130(1): e106.
- [6] SARVESTANI S K, SIGNS S, HU B, et al. Induced organoids derived from patients with ulcerative colitis recapitulate colitic reactivity [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 262.
- [7] SON Y S, KI S J, THANAVEL R, et al. Maturation of human intestinal organoids in vitro facilitates colonization by commensal lactobacilli by reinforcing the mucus layer [J]. *FASEB J*, 2020, 34(8): 9899-910.
- [8] WANG B, RONG X, PALLADINO E, et al. Phospholipid remodeling and cholesterol availability regulate intestinal stemness and tumorigenesis [J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 22(2): 206-20.
- [9] FU T, COULTER S, YOSHIHARA E, et al. FXR regulates intestinal cancer stem cell proliferation [J]. *Cell*, 2019, 176(5): 1098-112.
- [10] SEBERT M, DENADAI-SOUZA A, QUARANTA M, et al. Thrombin modifies growth, proliferation and apoptosis of human colon organoids: a protease-activated receptor 1- and protease-activated receptor 4-dependent mechanism [J]. *Br J Pharmacol*, 2018, 175(18): 3656-68.
- [11] LINDEMANS C A, CALAFIORE M, MERTELSMANN A M, et al. Interleukin-22 promotes intestinal-stem-cell-mediated epithelial regeneration [J]. *Nature*, 2015, 528: 560-4.
- [12] RALLABANDI H R, YANG H, OH K B, et al. Evaluation of intestinal epithelial barrier function in inflammatory bowel diseases using murine intestinal organoids [J]. *Tissue Eng Regen Med*,

- 2020, 17(5): 641-50.
- [13] BARDENBACHER M, RUDER B, BRITEN-LAURENT N, et al. Investigating intestinal barrier breakdown in living organoids [J]. *J Vis Exp*, 2020, 157: 10.
- [14] HORITA N, TSUCHIYA K, HAYASHI R, et al. Fluorescent labelling of intestinal epithelial cells reveals independent long-lived intestinal stem cells in a crypt [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 454(4): 493-9.
- [15] FUJII M, MATANO M, NANKI K, et al. Efficient genetic engineering of human intestinal organoids using electroporation [J]. *Nat Protoc*, 2015, 10(10): 1474-85.
- [16] ARTEGIANI B, HENDRIKS D, BEUMER J, et al. Fast and efficient generation of knock-in human organoids using homology-independent CRISPR-Cas9 precision genome editing [J]. *Nat Cell Biol*, 2020, 22(3): 321-31.
- [17] SATO T, VRIES R G, SNIPPERT H J, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche [J]. *Nature*, 2009, 459(7244): 262-5.