

· 基础研究 ·

健脾方药提取物对小鼠小肠类器官的干预

王爱萍^{1,2} 陈 曦^{1,2} 郭文峰^{1,2} 巫燕莉^{1,2} 胡 玲^{1,2} 李燕舞^{1,2}

摘要 **目的** 探讨健脾方药四君子汤多糖提取物、黄芪甲苷对小鼠小肠类器官的干预作用。**方法** 取 4~6 周龄小鼠小肠约 20 cm, 经过清洗、剪切、消化, 分离出小肠隐窝细胞团后, 接种于含有多细胞因子的基质胶中, 在基质胶 3D 结构支撑下, 培养形成具有小肠上皮样形态的立体多叶结构, 即小肠类器官。光镜下观察小肠类器官的形态特征; 采用免疫荧光染色后在激光共聚焦显微镜下观察 E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 的表达; 传代 2 天后的小鼠小肠类器官分为 3 组: 对照组、四君子多糖组 (终浓度为 100 mg/L) 以及黄芪甲苷组 (终浓度为 10 μ mol/L), 继续培养 48 h 后观察四君子汤多糖提取物、黄芪甲苷对小鼠小肠类器官出芽生长及增殖细胞核抗原 Ki-67 表达。**结果** 分离出的小鼠隐窝细胞团 1 天类似囊状, 中心具有单个内腔; 2~3 天开始出芽; 4~5 天出芽增多, 管腔结构进一步清晰, 形成小肠类器官, 初步建立了小肠类器官培养模式; 四君子多糖组 (100 mg/L) 小肠类器官出芽数量较对照组明显增多 (2.31 ± 1.60 vs 4.15 ± 1.91 , $P < 0.05$); 黄芪甲苷组较对照组中小肠类器官 Ki-67 表达明显增高。**结论** 小肠类器官模型的构建为探讨肠黏膜修复的病理生理机制及药物干预提供了更完善的体外研究模型。四君子汤多糖提取物、黄芪甲苷的肠黏膜保护作用可能与其促进隐窝干细胞更新能力有关。

关键词 类器官; 隐窝; 3D 培养; 四君子汤多糖提取物; 黄芪甲苷

Intervention of Jianpi Recipe Extract on Small Intestinal Organoids in Mice WANG Ai-ping^{1,2}, CHEN Xi^{1,2}, GUO Wen-feng^{1,2}, WU Yan-li^{1,2}, HU Ling^{1,2}, and LI Yan-wu^{1,2} 1 Pi-Wei Institute, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou (510405); 2 Science and Technology Innovation Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou (510405)

ABSTRACT **Objective** To investigate the intervention effect of polysaccharide from Sijunzi Decoction and Astroglycosides (ASTs) on small intestinal organoids in mice. **Methods** The small intestine of mice aged 4–6 weeks was taken out about 20 cm. After washing, shearing and digesting, the small intestinal crypt cells were isolated and inoculated into matrigel containing various cytokines. Under the support of matrix 3D structure, a three-dimensional multi-leaf structure having a small intestinal epithelial-like morphology, that is, a small intestinal organoid was formed. The morphological characteristics of small intestine organoids were observed under a microscope. The expression of E-cadherin was observed under confocal microscopy after immunofluorescence staining. After 2 days of passage, the small intestinal organoids of the mice were divided into three groups: control group, Sijunzi polysaccharide group (final concentration 100 mg/L) and ASTs group (final concentration 10 μ mol/L), and observed the effect of polysaccharide extract of Sijunzi decoction and ASTs on budding growth and expression of Ki-67 in small intestinal organoids. **Results** The isolated mouse crypt cells were similar to sacs in 1 day, with a single lumen in the center; sprouting began in 2 to 3 days; 4 to 5 days increased budding, and the lumen structure was further clear, forming small intestinal organoids. The intestinal organoids culture model was initially established; the Sijunzi decoction polysaccharide extract group (100 mg/L) was co-cultured for 48 h, and the number of small intestine organoids sprouts was significantly increased compared

基金项目: 广东省普通高校特色创新项目 (No. 2018KTSCX043)

作者单位: 1. 广州中医药大学脾胃研究所 (广州 510405); 2. 广州中医药大学科技创新中心 (广州 510405)

通讯作者: 李燕舞, Tel: 020-36585555, E-mail: liyanwu@gzucm.edu.cn

DOI: 10.7661/j.cjim.20191112.226

with the control group (2.31 ± 1.60 vs. 4.15 ± 1.91 , $P < 0.05$); The expression of Ki-67 in the small intestine organoids was significantly higher in ASTs group than control. Conclusions The construction of the small intestinal organoids model provides a more complete *in vitro* study model for exploring the pathophysiological mechanisms of intestinal mucosal repair and drug intervention. The intestinal mucosal protective effect of Sijunzi Decoction polysaccharide extract and ASTs may be related to its ability to promote crypt stem cell renewal.

KEYWORDS organoids; crypt; 3D culture; Sijunzi Decoction polysaccharide; Astroglossides

类器官 3D 培养是一种新兴的研究组织成体干细胞生长、分化、器官形成的体外系统^[1],是将具有干性潜能的细胞进行 3D 培养,从而形成与相应器官类似的组织^[2,3]。类器官的培养首先需要具有干性的细胞,其次需要支持其三维生长的基质^[4]。类器官模型是介于体外细胞培养和体内动物模型的中间形式,能够更好地模拟生物体内细胞间的相互作用^[5,6],且具有自我更新和自我增殖能力,维持了来源组织的生理结构和功能。

小肠类器官培养可在体外生长形成类似绒毛—隐窝的结构,经过传代后,具有稳定的表型和遗传学特性^[7,8],有利于动态监控并研究小肠黏膜损伤修复的生理病理机制^[9]。本研究通过分离小鼠小肠具有干性的隐窝或者干细胞,体外构建小肠类器官模型,分析其形态及其生物学特性,在此基础上探讨健脾方药四君子汤多糖提取物以及黄芪甲苷的干预作用。

材料与方法

1 动物 KM 小鼠,4~6 周龄,体重 20 g 左右,雌雄不限,购自广州中医药大学实验动物中心 SPF 级动物室,动物合格证号: No. 44007200045799,动物实验由广州中医药大学伦理委员会审核通过(No. 2016060)。

2 药物 黄芪甲苷: 购自上海禾午生物科技有限公司,UV $\geq 98\%$,货号: S11029。四君子汤多糖部位的提取、分离及纯化: 四君子汤饮片(人参、炒白术、茯苓、炙甘草各等份,购自广州同康药业有限公司)粉碎,先进行煎煮、水提醇沉、Sevag 法去除蛋白、过 DEAE-52 纤维素柱进一步分离纯化得到四君子汤多糖。

3 主要仪器和试剂 主要仪器: 二氧化碳培养箱(型号: 3111, 厂家: Thermometer Fisher Scientific)。主要试剂: IntestiCult Organoid Growth Medium Mouse Basal Medium (Lot: 18C88837, 购自 STEMCELL)、Gentle Cell Dissociation Reagent (Lot: 17G82529, 购自 STEMCELL)、Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS) without Calcium and Magnesium (Lot: 0411A18, 购自 LE-

AGENE)、DMEM/F-12 with 15 mM HEPES buffer (Lot: 18D89564, 购自 STEMCELL)、Matrigel © GFR and Phenol Red-Free Basement Membrane Matrix (Lot: 7315687, 购自 BD)。

4 研究方法

4.1 小肠隐窝分离、培养 脱颈椎处死小鼠,无菌状态下取出整段小肠,放入冷的 D-PBS(含双抗)中,去除肠外壁薄膜、脂肪、血管,纵向剖开清洗肠腔。将清洗后的肠段剪成 2~3 mm 的小段,并转移到 50 mL 离心管,加入 15 mL 预冷的 D-PBS,吹打 3 次,放置 30 s,使肠碎片自然沉降,吸弃上清液,留下少量的液体覆盖碎片表面;重复此操作 15~20 次,直至上层液清澈。弃上清,加入室温的 cell-dissociation 25 mL,室温震荡 15 min,静置 30 s,弃上清。加入 10 mL 含 0.1% BSA 的冰冷 D-PBS,吹打 3 次,放置 30 s 沉降。取上清过 70 μm 细胞滤器,收集滤液,重复此操作 4 次。将后两次滤液合并,200 $\times g$ /min 离心 5 min。弃上清后加入 10 mL 含 0.1% BSA 冷 D-PBS 重悬,再次离心,收集沉淀。加入 10 mL DMEM/F12,取 1 mL 到六孔板中,镜下观察评估分离的隐窝形态并计数。沉淀隐窝细胞团按 1:1 加入 organoid growth medium 和 metrigel 形成混悬物,加入 24 孔板(50 μL /孔)形成穹顶状。放入二氧化碳培养箱中 10 min,待胶固化后,加入 750 μL 的 organoid growth medium,同时在剩余空孔中加入 750 μL 无菌 D-PBS,保证培养板的湿化,放入二氧化碳培养箱(5% CO_2 , 37 $^{\circ}\text{C}$)中。每周更换培养基 3 次。一周后多聚甲醛固定 metrigel 并石蜡包埋、切片,分别进行 HE、PAS 及免疫荧光染色。传代 2 天后的小鼠小肠类器官分为 3 组: 对照组、四君子多糖组(终浓度为 100 mg/L)以及黄芪甲苷组(终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$)。免疫荧光对 E-cadherin 以及增殖标记物 Ki-67 进行标记。

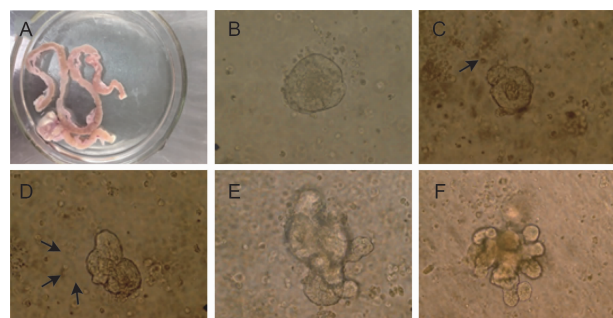
4.2 四君子汤多糖提取物对小肠类器官的影响 传代 2 天后,光镜下可见隐窝细胞团闭合轮廓清晰的圆形,加入四君子汤多糖提取物(终浓度为 100 mg/L)共培养 48 h,光镜下观察类器官形成及出芽数。

4.3 黄芪甲苷对小鼠小肠类器官 Ki-67 表达的影响 传代 2 天后,光镜下可见隐窝细胞团闭合形成轮廓清晰的圆形,加入黄芪甲苷(终浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$)共培养,48 h 后吸掉培养液,将含有小肠类器官的基质胶直接涂在防脱片上,4%的多聚甲醛固定后,细胞免疫荧光观察 Ki-67 的表达。

5 统计学方法 采用 SPSS 19.0 进行统计学分析,所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间的比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

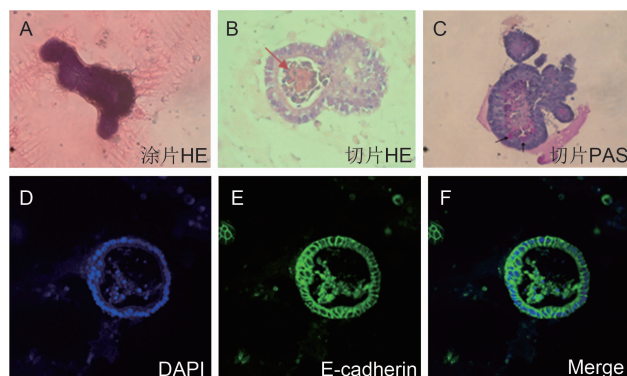
结 果

1 小鼠小肠类器官模型(图 1,2) 培养 3~5 h 后开始闭合形成轮廓清晰的圆形,分离出的小鼠隐窝细胞团 1 天类似囊状,中心具有单个内腔;2~3 天开始出芽;4~5 天出芽增多,管腔结构进一步清晰,形成小肠类器官,即由衬有绒毛样上皮的囊状中心结构与周围隐窝样芽泡状结构组成;传代后培养 5 天即可形成小肠类器官;直接涂片后进行 HE 染色,可见成型的小肠腺



注:A 为取出的小鼠小肠;B 为第 1 天的类器官;C、D 为 2~3 天的类器官,开始出芽(黑色箭头);E 为第 4 天的类器官;F 为第 5 天的类器官

图 1 小鼠小肠类器官形成的动态观察

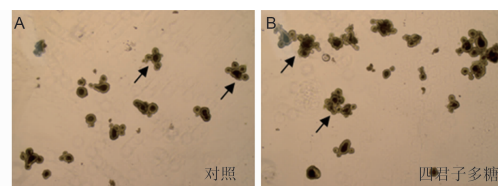


注:A 为直接涂片后进行 HE 染色;B 为切片 HE 染色;C 为切片 PAS 染色;D 为细胞核表达(蓝色荧光);E 为上皮钙黏蛋白 E-cadherin(绿色荧光);F 为 Merge 图

图 2 小鼠小肠类器官的形态特性

管样结构;HE 染色后光镜下可见清晰的上皮细胞围绕形成的腺腔结构(红色箭头标记)及隐窝细胞团,显示肠道类器官是由单层极化柱状上皮细胞构成;PAS 染色显示肠道类器官粘液分泌细胞的产生及黏液分泌后进入腔,还有分化成熟的杯状细胞(黑色箭头指示);维持细胞间结构完整及极性的上皮钙黏蛋白 E-cadherin(绿色荧光)在类器官石蜡切片上有表达。

2 四君子汤多糖提取物对小鼠小肠类器官生长的影响(图 3) 小肠类器官进行传代,加入四君子汤多糖提取物(100 mg/L)共培养 48 h 后,发现小肠类器官出芽数量较对照组明显增多[(2.31 ± 1.60) vs (4.15 ± 1.91) , $P < 0.05$]。



注:A 为对照组;B 为四君子多糖组

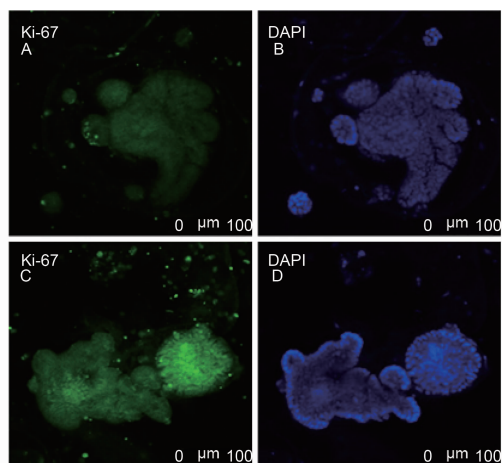
图 3 四君子多糖提取物对小鼠小肠类器官生长的影响

3 黄芪甲苷对小鼠小肠类器官 Ki-67 表达的影响(图 4) 通过激光共聚焦显微镜可见小肠类器官的增殖标记物 Ki-67 的表达(绿色荧光),黄芪甲苷干预 48 h 后较正常对照组中小肠类器官 Ki-67 的表达明显增高。

讨 论

小肠上皮的更新速度在成体哺乳动物各器官中是最快的。小肠干细胞位于隐窝的底部,分布在潘氏细胞间,能够快速增殖产生过渡扩增(transit amplifying, TA)细胞^[10],这些细胞沿着隐窝纵轴向上迁移至隐窝上部,同时继续增殖、分化为肠上皮细胞、潘氏细胞、肠内分泌细胞和杯状细胞等。潘氏细胞成熟后下移至隐窝底部,其他各细胞则沿隐窝—绒毛轴(crypt-villus)上移至绒毛顶部,并死亡脱落入肠腔中^[11,12]。小鼠成体肠干细胞培养形成的类器官主要表现为芽生结构,在体外形成类似 crypt-villus 结构,由单层的类似绒毛细胞的结构相连接,并且分化形成各种肠黏膜细胞和腺腔结构。

3D 培养类器官技术在研究机体生理病理学、基因治疗、构建疾病模型及药物筛选等方面均有广阔的应用前景^[13]。小鼠胃类器官和小肠类器官可分别作为可靠的模拟胃上皮和肠上皮结构、功能的体外研究模型,用于后续的实验研究^[14,15]。



注: A 为对照组 Ki-67 的表达(绿色荧光); B 为对照组细胞核表达(蓝色荧光); C 为黄芩甲苷组 Ki-67 的表达(绿色荧光); D 为黄芩甲苷组 Ki-67 细胞核表达(蓝色荧光)

图 4 黄芩甲苷对小鼠小肠类器官 Ki-67 表达的影响

四君子汤及黄芪在临床胃肠黏膜损伤相关疾病中应用广泛并具有独特疗效。已有研究表明:四君子汤及黄芪在胃肠黏膜损伤修复、提高肠道黏膜免疫功能、调节胃肠运动以及抗肿瘤方面发挥重要作用,能提高脾虚大鼠肠黏膜屏障功能,减轻应激引起的胃肠黏膜损伤^[16]。目前尚未见四君子汤多糖提取物、黄芩甲苷对肠道隐窝干细胞生长、分化研究的报道。

本实验成功建立了小鼠肠道类器官原代培养及传代培养模型,其形态结构与在体小肠腺体结构类似,利用小肠类器官的球状结构形成率、每个类器官出芽个数评判类器官的生长情况^[17],可以体外评估肠黏膜干性细胞的增殖、分化能力。研究发现,四君子汤多糖提取物干预后的小肠类器官出芽数明显高于对照组,提示四君子汤多糖提取物可能有助于小肠隐窝细胞增殖,提高其生长、分化能力。黄芩甲苷干预后的小肠类器官的 Ki-67 表达明显增强,提示黄芩甲苷可促进小肠类器官 Ki-67 表达,有助于小肠隐窝细胞的增殖,提高小肠的更新能力。益气健脾方药四君子汤多糖提取物、黄芩甲苷的肠黏膜保护作用可能与其促进隐窝干细胞更新能力有关。类器官的培养在国内尚在起步阶段,是国内相关领域工作的开端,后续将基于该平台做更多的深入探索。

利益冲突:所有研究人员声明本文不存在任何利益冲突关系。

参 考 文 献

[1] 王楚, 高建军, 华国强. 肠道类器官在精准医学中的应用

- [J]. 中国科学: 生命科学, 2017, 47(2): 171-179.
- [2] Mizumoto H, Ishihara K, Nakazawa K, et al. A new culture technique for hepatocyte organoid formation and long-term maintenance of liver-specific functions [J]. Tissue Eng Part C Methods, 2008, 14(2): 167-175.
- [3] Pastula A, Middelhoff M, Brandtner A, et al. Three-dimensional gastrointestinal organoid culture in combination with nerves or fibroblasts: a method to characterize the gastrointestinal stem cell niche [J]. Stem Cells Int, 2016: 3710836.
- [4] Leushacke M, Barker N. Ex vivo culture of the intestinal epithelium: strategies and applications [J]. Gut, 2014, 63(8): 1345-1354.
- [5] 查娟民, 林倩, 李华善, 等. 采用人肿瘤类器官研究阻断 Wnt 信号治疗大肠癌的可行性 [J]. 中国现代医生, 2016, 54(27): 5-8.
- [6] Clevers H. Modeling development and disease with organoids [J]. Cell, 2016, 165(7): 1586-1597.
- [7] Sato T, Stange DE, Ferrante M, et al. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium [J]. Gastroenterology, 2011, 141(5): 1762-1772.
- [8] Cao L, Kuratnik A, Xu W, et al. Development of intestinal organoids as tissue surrogates: Cell composition and the Epigenetic control of differentiation [J]. Molecular Carcinogenesis, 2015, 54(3): 189-202.
- [9] 高云, 赵九龙, 高俊, 等. 肠类器官的研究与应用 [J]. 国际消化病杂志, 2017, 37(2): 87-91.
- [10] 覃艳艳, 刘宇, 柳长柏, 等. 类器官培养的研究进展 [J]. 广东医学, 2016, 37(18): 2827-2828.
- [11] Koo BK, Clevers H. Stem cells marked by the R-spondin receptor LGR5 [J]. Gastroenterology, 2014, 147(2): 289-302.
- [12] de Lau W, Peng WC, Gros P, et al. The R-spondin/Lgr5/Rnf43 module: regulator of Wnt signal strength [J]. Genes Dev, 2014, 28(4): 305-316.
- [13] 董娇, 王帅. 三维条件下类器官培养的研究进展 [J]. 广西医学, 2017, 39(5): 700-702, 707.
- [14] 丁菲, 夏凡, 狄文娟, 等. 雌性 11 β -HSD1 敲除小鼠肠道类器官体外研究 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2019, 39(5): 30-35.
- [15] 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.
- [16] 张博. 脾虚大鼠肠黏膜屏障功能变化及四君子汤对其影响的实验研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2014.
- [17] Fuller MK, Faulk DM, Sundaram N, et al. Intestinal crypts reproducibly expand in culture [J]. J Surg Res, 2012, 178(1): 48-54.

(收稿: 2018-09-14 在线: 2019-12-24)

责任编辑: 白霞