

不同区段小鼠小肠类器官体外培养方法建立

秦玉梅, 郭庆斌, 黄微微, 郭世杰, 韩剑众*

(浙江工商大学食品与生物工程学院 杭州 310018)

摘要 肠道是食物营养物质消化吸收的主要器官, 良好的肠道体外培养模型有助于推动新型食物营养物质及功能活性物质的吸收及功效评价方法建立。本文以含有肠道干细胞的肠道隐窝为基础, 通过优化不同区段小肠隐窝分离方法和体外培养基组成, 建立一套完整的不同区段小肠类器官(包括十二指肠、空肠和回肠)培养方法。采用免疫荧光和 RT-PCR 方法进一步证明不同区段小肠类器官与相应肠道组织具有相似结构特征及细胞组成, 而且这些性状在传代过程中具有稳定性。结论: 本文建立的不同区段小肠类器官培养方法, 可能为食品领域研究营养物质功能评价及吸收评价提供良好的体外研究工具。

关键词 小肠; 隐窝; 干细胞; 肠道类器官

文章编号 1009-7848(2022)02-0123-08 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.02.014

小肠作为人体最大的营养物质消化和吸收器官, 由于其在代谢紊乱疾病, 如肥胖及糖尿病的重要作用, 因此人们对肠道营养物质吸收、转运、感受和激素释放的兴趣日益增长^[1]。作为人体更新速度最快的器官之一, 肠道上皮细胞平均寿命为 4~6 d^[2], 肠道上皮更新受到内在和外在因素影响。肠道微生物和食物是影响肠道上皮平衡的主要外在因素, 由于肠道长期暴露于各种饮食成分中, 肠道上皮细胞与饮食成分密切接触, 直接受摄入食物成分的调节, 因此确定饮食成分如何与肠道上皮相互作用至关重要^[3]。一种能够再现体内真实肠道上皮结构及细胞组成的体外研究模型必定成为加速上述研究的宝贵工具。

过去, 用于肠道食物成分吸收和营养物质功能评价的体外模型主要包括: 以离体肠道组织为基础的组织模型和以各种转化的肠道细胞系为基础的细胞模型。以肠道组织为基础的模型, 包括外翻肠囊、尤斯灌注室和离体肠灌注等, 上述模型需要获取离体组织, 在试验对象数量有限情况下无法获得足够质量及数量的组织, 且离体组织功能测试试验有时间限制性, 试验的重复性及稳定性

差。此外, 为了获取足够的数量而大大增加动物使用量, 从而增加试验成本和动物使用伦理风险。以肿瘤细胞系为基础的细胞模型, 包括各种转化的肠道上皮细胞系, 如 Caco-2、HT29 等, 虽然细胞基础上的模型能够克服上述以动物组织为基础的模型的部分缺陷, 但是细胞基础上的模型细胞组成单一, 无法真正再现肠道细胞与细胞之间、细胞与细胞基质之间的相互作用^[4]。目前亟待建立一种有力的肠道体外培养模型。

2007 年, Hans Clever 实验室发现了 Lgr5 标记的肠道干细胞, 此细胞的发现为新型肠道体外研究模型的建立提供了基础^[5], 2009 年, Hans Clever 实验室报道了人和小鼠来源的肠类器官(Organoid)的产生和长期体外培养^[6], 此类器官再现了肠上皮的所有细胞类型组成, 目前该技术被广泛应用于疾病模型、药物筛选、再生医学及干细胞治疗领域^[7-12]。相对于上述领域, 类器官在食品领域的应用研究相对滞后^[13-20]。尤其是在国内, 除了少数医学及药理学研究领域实验室掌握了肠道类器官培养技术外, 在食品研究领域能够熟练掌握上述技术的研究人员较少, 尤其是完善的针对于不同区段的小肠类器官培养方法。本研究以含有肠道干细胞的肠道隐窝为基础, 通过优化隐窝分离方法和类器官培养基组成, 旨在建立一套完整的不同区段小肠类器官培养方法, 并通过免疫荧光及 RT-PCR 验证体外培养类器官再现体内

收稿日期: 2021-02-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(3207161619, 32072218);
浙江省省属高校基本科研业务费项目(JDK21001)

作者简介: 秦玉梅(1982—), 女, 博士

通信作者: 韩剑众 E-mail: hanjz99@zjgsu.edu.cn

肠道细胞及结构组成特点。

1 材料与方法

1.1 实验动物

8周大雄性 C57BL6/J 小鼠,购自于上海斯泰克实验动物中心。所有动物实验均严格按照浙江工商大学实验动物保护和使用委员会规定,并遵循中国实验动物的护理和使用指南。

1.2 试剂与仪器

无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 磷酸盐缓冲液 (DPBS),吉诺生物技术有限公司;Matrigel 基质 (CB40230C),美国 Corning 公司;1 mol/L HEPES 缓冲液 (15630080)、DMEM/F12 培养基 (11320-033)、青霉素/链霉素溶液 (15140-122)、B27 添加剂 (17504044)、N-2 添加剂 (17502048)、Glutamax 添加剂 (35050-061),美国 Gibco Thermo Fisher Scientific 公司;人类重组 EGF (315-09),美国 Peprotech 公司;Y-27632 二盐酸盐 (Y0503)、N-乙酰基-L-半胱氨酸 (A7250),美国 Sigma Aldrich 公司;R-spondin 条件培养基 (来自于 R-spondin 细胞系),Dr. Jeffery Wittsett 实验室;Noggin 条件培养基 (来自于 HEK-293 Noggin 细胞),Dr. Peihua Jiang 实验室;细胞回收液 (354253),美国 Corning 公司;RNA 抽提试剂盒 (12-183-018A),美国 Invitrogen Thermo Fisher Scientific 公司;VILO 预混液 (11755050)、PCR 试剂盒 (13001013),美国 Thermo Fisher Scientific 公司;4% 多聚甲醛 (BL539A),Biosharp 兰杰柯科技有限公司;SuperBlock 封闭缓冲液 (37515),美国 Thermo Fisher Scientific 公司;OCT 包埋剂 (4583),美国 Sakura Finetek 公司;封片剂 (F6182),美国 Sigma Aldrich 公司。本试验所用抗体信息见表 1。

SP8 激光共聚焦显微镜、DMI8 倒置荧光显微镜,德国徕卡公司;Herace VOPS 250i 二氧化碳培养箱、T100PCR 仪,Thermo 公司;L550 低温离心机,湘仪公司;YCTS-103H 回旋式摇床,上海捷呈实验仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 小肠隐窝分离 8~10 周大雄性 C57BL/6 小鼠 CO_2 处死,腹部剖开获得完整小肠放于 4℃ 预冷的 DPBS 溶液中;去除小肠外壁连接组织后

将小肠纵向剖开,冷 DPBS 清洗后将小肠按照图 1 所示分成十二指肠,空肠,回肠 3 份取 3~4 cm,眼科剪将各段小肠剪成 3~5 mm 小段置于 15 mL 离心管中冷 DPBS 清洗至上清澄清;随后弃上清加入 5 mmol/L EDTA 溶液,摇床 37℃,250 r/min 振荡 10 min;消化后 DPBS 清洗组织一次,弃上清,加入适量 DPBS 振荡 20~30 次,自然沉降后将上清过 100 μm 细胞筛转移至新离心管中,可重复上述振荡收集步骤 1 次,合并上清;将收集上清 250 \times g,4℃ 离心 10 min,去除上清,沉淀中加入少量冷基础培养基【含 1% 谷氨酰胺、1% HEPES、1% 青霉素/链霉素的 DMEM/F12 培养基】,取 10 μL 计数隐窝数量,根据孔板接种数量调整隐窝浓度。

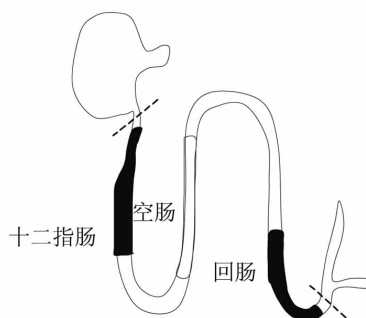


图 1 小肠不同区段示意图

Fig.1 Diagram of different segments of small intestine

1.3.2 隐窝培养及肠类器官传代 按照 24 孔培养板每孔 50 μL 剂量向分离肠道隐窝中加入相应的体积 Matrigel 基质,轻轻吹打形成均匀悬液。将悬液接种于 37℃ 提前预热 24 孔板中,后将培养板置于 37℃ CO_2 培养箱 30 min,最后向每孔中加入 500 μL 完全培养基【85%~87% 基础培养基、3%~5% R-spondin 条件培养基、10% Noggin 条件培养基、1x B27 (%)、1x N2 (%)、50 ng/ml EGF, 1 mmol/L N-acetylcysteine, 10 $\mu\text{mol/L}$ Y-27632】,每 2 d 更换一次完全培养基。倒置显微镜及 Leica CCD 每天观察和记录隐窝形态变化及生长情况。接种 4~6 d 后小肠类器官可用于传代,传代时去除培养基,每孔加 500 μL 冷 DPBS,反复吹打 60~100 次,4℃,300 \times g 离心 5 min,去除上清并加入相应体积 Matrigel 基质,随后按照前述方法接种、

更换培养基及记录类器官生长变化。

1.3.3 免疫荧光 培养第 5 d 类器官, 去除培养基后加入 500 μL 冷细胞回收溶液, 将培养板置于冰上回转式摇床 40 r/min 振荡 1 h; 后 800 r/min 离心机瞬离取沉淀回收类器官; 沉淀中加入 4% 多聚甲醛室温固定 15 min, 随后 0.01% 亚甲基蓝溶液室温孵育 20 min, 离心后沉淀中加入 20% 蔗糖溶液 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; 第 2 天 OCT 包埋剂包埋, Leica 冰冻切片获得类器官冷冻切片, 切片厚度 5 μm 。PBS 清洗玻片, 加入抗原封闭液 (含有 2% 驴血清、0.3%

Triton X-100 的 SuperBlock 封闭溶液) 室温孵 30 min; 加入一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜 (一抗种类及稀释比例如表 1 所示); PBS 清洗 3 次 (每次 5 min) 后加入二抗室温孵育 30 min; PBS 清洗 4 次 (每次 5 min) 后 DAPI 复染, 封片剂封片后 Leica SP8 激光共聚焦显微镜获取图像。隐窝分离试验获取肠段时, 同时取 0.5~1 cm 肠段用于获取冰冻切片, 获取组织 4% 多聚甲醛 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 2 h, PBS 清洗组织 3 次 (每次 5 min), 后续冰冻切片获取、免疫荧光及图像获取方法与类器官相同。

表 1 抗体

Table 1 List of antibodies

抗体名称	抗体来源	货号	公司	稀释比例
E-cadherin	兔	ab53033	Abcam	1:500
E-caderin	山羊	Ab76055	Abcam	1:800
Lysozyme	兔	ab108508	Abcam	1:300
Mucin2	山羊	sc-515032	Santa Cruz	1:200
GLP-1	山羊	Sc-7782	Santa Cruz	1:500
Chr-A(C-12)	鼠	sc-393941	Santa Cruz	1:500
Villin	鼠	Sc-58897	Santa Cruz	1:500
Anti-rabbit IgG-Alexa 488	驴	A11008	Invitrogen	1:1 000
Anti-rabbit IgG-Alexa 555	驴	A31572	Invitrogen	1:1 000
Anti-Mouse IgG-Alexa 594	驴	A31573	Invitrogen	1:1 000
Anti-goat IgG-Alexa 488	驴	A21206	Invitrogen	1:1 000
Anti-goat IgG-Alexa 568	驴	A21432	Invitrogen	1:1 000

1.3.4 RT-PCR 传代培养 5~6 d 小肠类器官, 去除培养基后加入 500 μL 冷细胞回收溶液, 将培养板置于冰上回转式摇床 40 r/min 振荡 1 h; 后 800 r/min 离心机瞬离取沉淀回收类器官。类器官和肠道组织通过 RNA 抽提试剂盒获取 RNA, VILO 合成 cDNA, PCR 试剂盒获得目标产物, 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 结果, 基因测序确定序列正确性。PCR 所用引物如表 2 所示。

2 结果与分析

2.1 不同区段小肠类器官培养

肠道组织的动态平衡是肠道行使各项功能的基础, 肠道中的组织平衡需要位于肠隐窝底部的干细胞在自我更新和分化形成子代祖细胞之间保持动态平衡来调节, 祖细胞进一步分化产生所有成熟肠道细胞类型, 包括潘氏细胞、杯状细胞、内

分泌细胞及吸收细胞等^[21]。因此, 肠道干细胞或含有肠道干细胞组织的分离是实现肠道类器官体外培养方法建立的前提。由于单个肠道干细胞分离需要借助特殊标记肠道干细胞的转基因小鼠及流式细胞分选方法, 试验成本高, 因此本研究以含有肠道干细胞的小肠隐窝为对象, 优化了不同区段小肠隐窝的分离方法, 大大缩短隐窝分离所需时间, 从小鼠组织获取到隐窝分离所需时间少于 25 min, 与已报道的方法相比时间缩短了 1~2 倍^[22]。另外此方法还提高了隐窝分离纯度和类器官生成率, 如图 2a~2c 所示, 十二指肠、空肠和回肠均可获得纯度 >80% 的隐窝, 新分离小肠隐窝呈典型的 U 型结构。

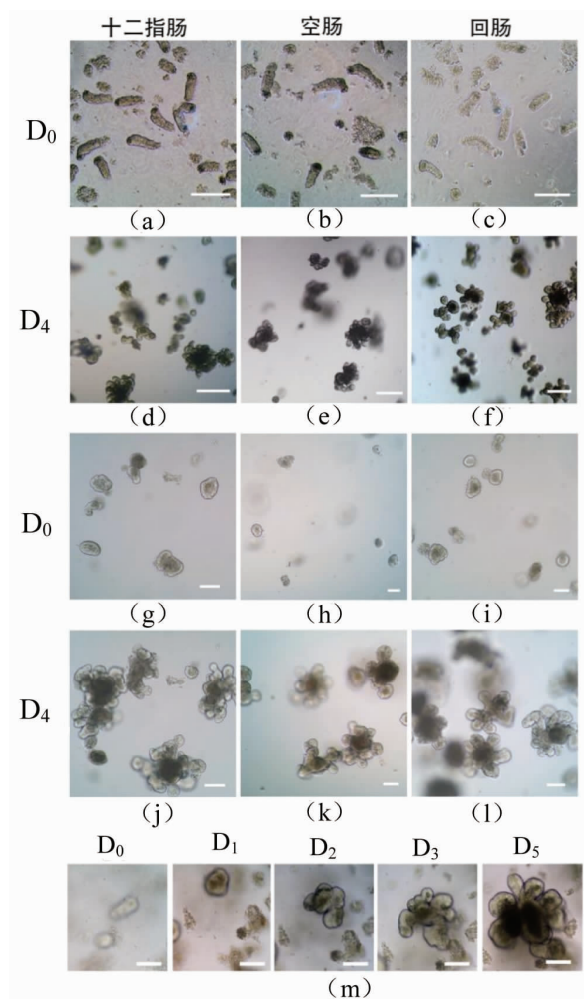
分离的小肠隐窝经过数小时到 1 d 培养形成闭合的囊状结构 (如图 2m), 位于小肠隐窝底部的干细胞向囊状结构四周扩增, 经过增殖与分化过

表2 引物序列

Table 2 Sequences of primers

靶标基因	基因序列(5'→3')
<i>Gapdh</i>	上游引物:GCATGGCCTTCGGTGTCC 下游引物:GATGCCTGCTTCACCACCTTCT
<i>Lgr5</i>	上游引物:TAAAGACGACGGCAACAGTG 下游引物:GATTCGGATCAGCCAGCTAC
<i>Olfm4</i>	上游引物:CCTTAGCATTCGCCGCCAGATC 下游引物:GTTCCACCACGCCACCATGACTAC
<i>Bmi1</i>	上游引物:CACCCACAGTTCCTCACATT 下游引物:TCGAGGTCTACTGGCAAAGGA
<i>Cdx2</i>	上游引物:TGTAAATGCCAGAGCCAACCTGGA 下游引物:AGATCACT GACTCGAACAGCAGCA
<i>Muc2</i>	上游引物:CTGACCAAGAGCGAACACAA 下游引物:CATGACTGGAAGCAACTGGA
<i>Lyz1</i>	上游引物:GAGACCGAAGCACCGACTATG 下游引物:CGGTTTTGACATTGTGTTCCG
<i>Gcg</i>	上游引物:TGAAGACAACGCCACTCAC 下游引物:TGACGTTTGCCAATGTTGTT
<i>Delk1</i>	上游引物:TGAACAAGAAGACGGCTCACTCC 下游引物:GCTGGTGGGTGATGGACTTGG

程,培养第3~5 d 闭合囊状结构转变为具有多个向外凸起芽体的立体结构(如图2d~2f和2m),即形成典型的小肠类器官结构,而且不同区段小肠具有相似生长特征,本方法获得的类器官的生长特性与Sato等^[6]报道的生长特性一致,然而成熟类器官结构形成速度更快,这可能来自于培养基及成分的差异性。另外,在培养过程中随着培养时间增加类器官形成的芽体数量也不断增加,由于每个芽体都能独立成长形成新的肠道类器官,所以芽体被认为是小肠隐窝的类似结构,并且Fuller等^[23]提出类器官出芽个数的多少可作为类器官生长能力和分化能力的重要评价指标,本文建立的类器官培养方法可以很好的保留来源于肠道组织中肠道干细胞的增殖分化特征。图2g~2i结果证实,小肠类器官经传代后芽体从类器官结构中解离出来,经过2 h培养后与原代隐窝培养形成闭合的囊状结构,同时经过3~5 d培养形成典型类器官结构(如图2j~2l)。与以往的组织体外研究模型相比,以肠道干细胞为基础的类器官培养,具有可传代性,而且经过多次传代后类器官仍保持相



注:(a)~(c)为分离的十二指肠、空肠、回肠隐窝;(d)~(f)为培养第4天典型十二指肠、空肠、回肠类器官形态;(g)~(i)为传代13代后培养2 h后十二指肠、空肠、回肠形态;(j)~(l)为传代后培养第4天十二指肠、空肠、回肠类器官形态。(m)为小肠类器官生长变化图。标尺:(a)~(c)、(g)~(i)和(m)为50 μm ; (d)~(f)和(j)~(l)为100 μm 。

图2 不同区段小肠类器官原代及传代培养

Fig.2 Primary and subculture of small intestinal organoids in different section

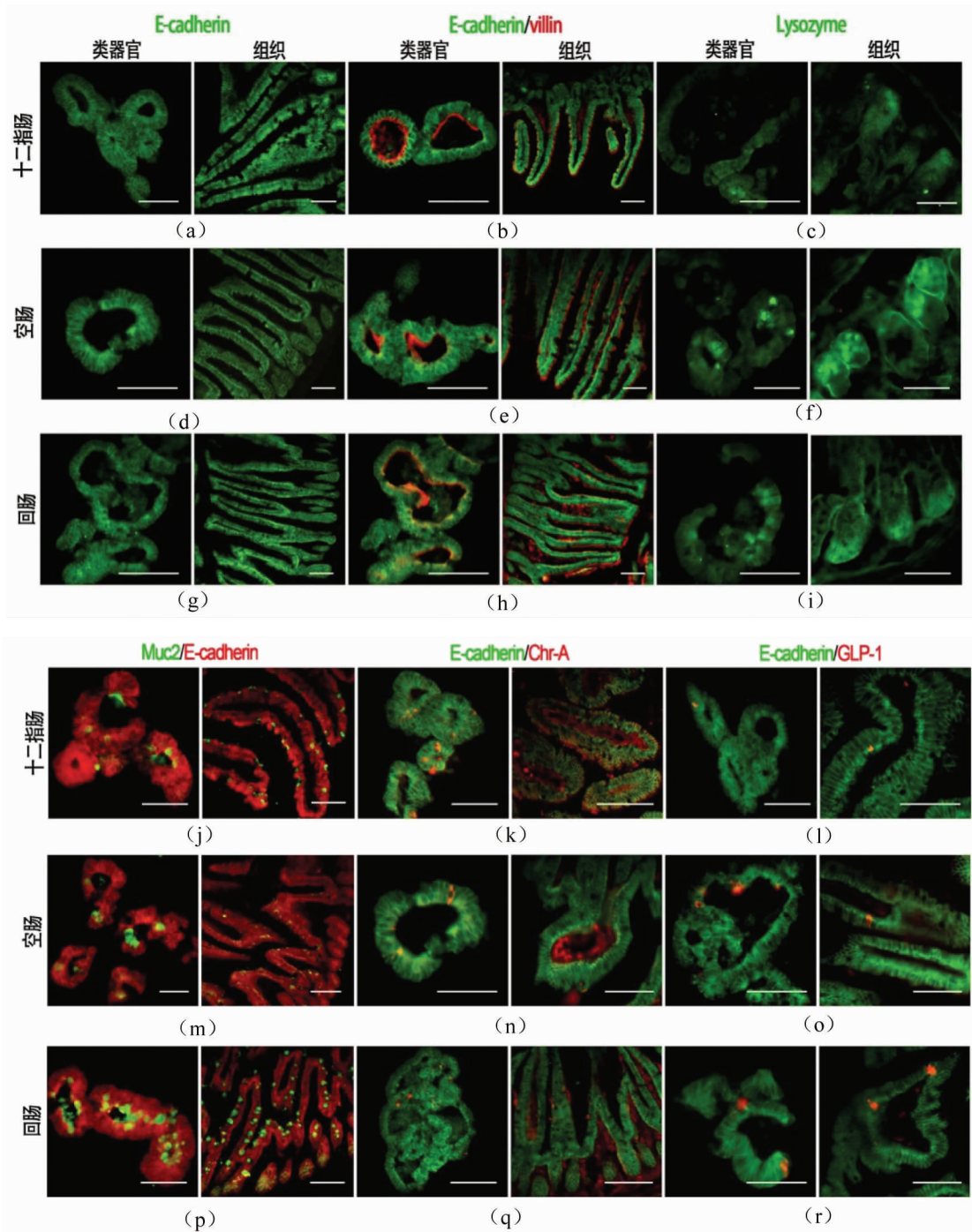
同的生长特性(如图2g~2l),具有表型结构稳定性。

2.2 小肠类器官再现体内肠道上皮结构特征及细胞组成

肠道上皮是一个多细胞组成结构,除了位于隐窝底部的肠道干细胞外,肠上皮细胞主要包括2大类:吸收细胞和分泌细胞。分泌细胞主要包括杯状细胞、潘氏细胞、内分泌细胞和簇状细胞

等^[24]。每种类型细胞具有特定的基因和蛋白构成,行使特定的功能,与非肠道上皮细胞相比,肠道上皮细胞普遍表达钙黏蛋白(E-cadherin);肠道内分

泌细胞表达有嗜铬粒蛋白 A (Chromogrin A,Chr-A), 肠道内分泌细胞包括表达有胰高血糖素样肽-1(GLP-1)的 L-型细胞,表达有抑胃肽(GIP)



注:利用 E-cadherin、Villin、Lysozyme、Mucin2、ChromograninA 和 GLP-1 抗体分别标记肠道上皮细胞、吸收细胞、潘氏细胞、杯状细胞、内分泌细胞及 L 型细胞。(a)~(c)、(j)~(l)为十二指肠代表性免疫荧光图;(d)~(f)、(m)~(o)为空肠代表性免疫荧光图;(g)~(i)、(p)~(r)为回肠代表性免疫荧光图。标尺:小肠类器官标尺为 100 μm,小肠组织标尺为 50 μm。

图 3 免疫荧光分析不同区段小肠类器官及小肠上皮细胞组成

Fig.3 Representative immune-fluorescence images of organoid and tissue of different segment of small intestine

的 I 型细胞等；肠道杯状细胞表达有黏液素 (Mucin2)；能够产生用于维持肠道干细胞平衡的生长因子及产生抗菌肽的肠道潘氏细胞表达有溶菌酶 (Lysozyme)；肠道吸收细胞表达有钙依赖性肌动蛋白结合蛋白 Villin。利用上述特定细胞蛋白表达特征，本研究利用特定蛋白抗体结合免疫荧光分析了肠道类器官与相应肠道上皮细胞组成。如图 3a、3d 和 3g 所示的上皮钙黏蛋白 (E-cadherin) 标记的小肠类器官与小肠组织结果表明，肠道类器官与小肠组织上皮具有结构一致性，由单层上皮细胞组成，而且上皮层环绕形成一个闭合的腔体结构。而蛋白 Villin、Lysozyme、Muc2、ChrA 及 GLP-1 结果表明，小肠类器官与体内小肠组织具有相同的多细胞组成特点。上述特征克服了以改造的细胞系为体外研究模型的细胞单一的缺点，而且细胞改造的过程中也可能导致部分基因性状的改变。如图 4 所示，RT-PCR 分析了肠道组织及具有相同来源不同代次肠道类器官特征细胞基因表达组成，结果与上述免疫荧光结果一致，表明肠道类器官与肠道组织具有相同细胞组成，而且这种组成具有代次稳定性。上述特征综合表明，与肿瘤细胞系相比，肠道类器官具有肿瘤细胞系的可传代和传代稳定性特征，而且同时也克服了肠道来源肿瘤细胞系的细胞种类单一及肠道组织不可传代性缺点，为基于类器官的食物与肠道相互作用试验数据的收集提供可靠的体外研究模型。

3 结论

本文通过分离含有肠道干细胞的肠道隐窝，经过体外培养能够形成与供体结构和细胞组成相似的肠道类器官，类器官具有可传代性，而且不同代次之间具有生长表型和细胞组成稳定性，可以为食品领域营养物质及功效成分功能评价，甚至吸收评价提供更加真实的体外研究工具。

参 考 文 献

[1] MAUDE L G, SOPHIE T, DORIANE A, et al. Intestinal plasticity in response to nutrition and gastrointestinal surgery[J]. *Nutrition Reviews*, 2019, 77

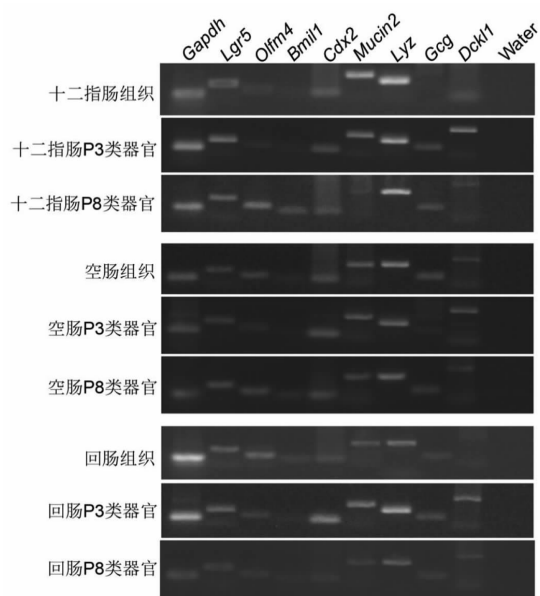


图 4 不同类型肠道上皮细胞标志蛋白编码基因在十二指肠、空肠、回肠组织及同源 P3、P8 代类器官的表达
Fig.4 Expression of coding genes of marker proteins of different types of intestinal epithelial cells duodenum, jejunum and ileum tissue, organoids of homologous passage 3 and passage 8

(3): 129-143.

- [2] WILLIAMS J M, DUCKWORTH C A, BURKITT M D, et al. Epithelial cell shedding and barrier function: A matter of life and death at the small intestinal villus tip[J]. *Veterinary Pathology*, 2015, 52 (3): 445-455.
- [3] CAI T S, QI Y J, JERGENS A, et al. Effects of six common dietary nutrients on murine intestinal organoid growth[J]. *PLoS One*, 2018, 13 (2): e0191517.
- [4] PEARCE S C, COIA H G, KARL J P, et al. Intestinal *in vitro* and *ex vivo* models to study host-microbiome interactions and acute stressors[J]. *Frontiers in Physiology*, 2018, 9: 1584.
- [5] BARKER N, VAN ES J H, KUIPERS J, et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*[J]. *Nature*, 2007, 449 (7165): 1003-1007.
- [6] 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]. *International*

- Weekly Journal of Science, 2009, 459 (7244): 262–265.
- [7] ANGUS H C K, BUTT A G, SCHULTZ M, et al. Intestinal organoids as a tool for inflammatory bowel disease research[J]. *Frontiers in Medicine*, 2019, 6: 334.
- [8] SINGH A, POLING H M, SPENCE J R, et al. Gastrointestinal organoids: A next generation tool for modeling human development[J]. *AJP Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2020, 319(3): G375–G381.
- [9] BARTFELD S, CLEVERS H. Stem cell-derived organoids and their application for medical research and patient treatment[J]. *Journal of Molecular Medicine*, 2017, 95(7): 1–10.
- [10] DROST J, CLEVERS H. Translational applications of adult stem cell-derived organoids[J]. *Development*, 2017, 144(6): 968–975.
- [11] LIU F K, HUANG J, NING B, et al. Drug discovery via human-derived stem cell organoids[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2016, 7: 334.
- [12] SUN J. Intestinal organoid as an *in vitro* model in studying host-microbial interactions[J]. *Frontiers in Biology*, 2017, 12(2): 94–102.
- [13] JATTAN J, RODIA C, LI D, et al. Using primary murine intestinal enteroids to study dietary TAG absorption, lipoprotein synthesis, and the role of apoC-III in the intestine[J]. *Journal of lipid research*, 2017, 58(5): 853–865.
- [14] LIU Y L, GUO S G, XIE C Y, et al. Uridine inhibits the stemness of intestinal stem cells in 3D intestinal organoids and mice[J]. *RSC Advances*, 2020, 10(11): 6377–6387.
- [15] WILSON S S, TOCCHI A, HOLLY M K, et al. A small intestinal organoid model of non-invasive enteric pathogen-epithelial cell interactions[J]. *Mucosal Immunology*, 2015, 8(2): 352–361.
- [16] KAR S K, HEE B V D, LOONEN L M P, et al. Effects of undigested protein-rich ingredients on polarised small intestinal organoid monolayers[J]. *Journal of Animal Ence and Biotechnology*, 2020, 11: 51.
- [17] SORRENTINO G, PERINO A, YILDIZ E, et al. Bile acids signal via TGR5 to activate intestinal stem cells and epithelial regeneration[J]. *Gastroenterology*, 2020, 159(3): 956–968.
- [18] WANG Z B, LI J, WANG Y, et al. Dietary vitamin A affects growth performance, intestinal development and functions in weaned piglets by affecting intestinal stem cells[J]. *Journal of Animal Science*, 2020, 98(2): 2.
- [19] XIE Y, DING F, DI W J, et al. Impact of a highfat diet on intestinal stem cells and epithelial barrier function in middleaged female mice[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2020, 21(3): 1133–1144.
- [20] XU D, ZHANG Y W, WU J F, et al. Tu913 role of dietary and non-digestible carbohydrates in gut microecosystem and intestinal mucus degradation[J]. *Gastroenterology*, 2020, 158(6): S-1216.
- [21] BEUMER J, CLEVERS H. Regulation and plasticity of intestinal stem cells during homeostasis and regeneration[J]. *Development*, 2016, 143(20): 3639.
- [22] MIZUTANI T, CLEVERS H. Primary intestinal epithelial organoid culture[J]. *Intestinal Stem Cells*, 2020, 2171: 185–200.
- [23] FULLER M K, FAULK D M, SUNDARAM N, et al. Intestinal crypts reproducibly expand in culture[J]. *Journal of Surgical Research*, 2012, 178(1): 48–54.
- [24] PARK J H, KOTANI T, KONNO T, et al. Promotion of intestinal epithelial cell turnover by commensal bacteria: Role of short-chain fatty acids[J]. *PLoS One*, 2016, 11(5): e0156334.

Establishment of *ex Vivo* Culture Method of Small Intestinal Organoids of Different Segments of Mouse

Qin Yumei, Guo Qingbin, Huang Weiwei, Guo Shijie, Han Jianzhong*

(School of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018)

Abstract Intestinal tract is the major organ for digestion and absorption of food nutrients. The establishment of an effective intestinal *ex vivo* model is helpful to promote the development of a novel evaluation system for absorption and effi-

cacy of food nutrients and functional active substances. Based on the intestinal crypt containing intestinal stem cells, we created an integrated set of organoid culture of different intestinal segments (including duodenum, jejunum and ileum) of mouse through optimizing the isolation method of intestinal crypt from different intestinal segment and the composition of culture medium. In addition, RT-PCR and immunofluorescence results demonstrated that the organoids derived from different segment recapitulate the structural characteristics and cell composition of corresponding intestinal tissues. These characters had high stability during *in vitro* repeated passage. In short, the establishment of organoid culture of different intestinal segment may provide a promising *ex vivo* model for the evaluation of absorption and function of food nutrients in the food research field.

Keywords small intestine; crypt; stem cell; intestinal organoid