【基础研究】

脂多糖对小鼠小肠类器官干细胞及通路的干预作用

张林丽[1,2,3]，王　兰[1,2,3]，刘　莉[1,2,3]*
（1. 中国医药工业研究总院，上海 200040；2. 上海市生物物质成药性评价专业技术服务平台，上海 200437；
3. 上海医药工业研究院创新药物与制药工艺国家重点实验室，上海 200437）

摘要：目的 探讨脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）对类器官生长、干细胞及相关通路的影响。**方法** 体外无菌分离、收集 C57BL/6J 小鼠小肠隐窝，培养出具有多芽结构的立体小肠类器官。通过免疫荧光（immunofluorescence，IF）染色鉴定小肠类器官细胞组成。传代后将小肠类器官随机分成对照组（LPS 0 μg/ml）及不同浓度的 LPS 组（30、100 及 300 μg/ml）。观察类器官的生长和形态特征变化，以及 LPS 对类器官的干细胞和增殖细胞影响；比较 RNA 测序和生信分析表征 LPS 诱导后的基因及通路变化。**结果** 培养 D6，小肠隐窝形成具有多个出芽结构伴随肠腔的立体肠类器官。LPS 造模后抑制肠类器官出芽结构形成，肠类器官面积显著减少，且呈现剂量依赖性。IF 染色结果显示，肠干细胞、增殖细胞表达增强、增多，测序出干细胞、增殖相关基因表达显著增加，干细胞通路得到富集。**结论** 初步构建 LPS 诱导的体外肠类器官损伤模型，并揭示损伤后干细胞增强的机制及通路，为肠道疾病的机制研究和有效药物的筛选提供可靠的研究平台。

关键词：脂多糖；类器官；免疫荧光
中图分类号：R-33　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1672-9188（2025）02-0143-009
引用：张林丽, 王兰, 刘莉. 脂多糖对小鼠小肠类器官干细胞及通路的干预作用[J]. 世界临床药物, 2025, 46（2）: 143-151.
DOI：10.13683/j.wph.2025.02.005

Intervention of lipopolysaccharide on stem cells and pathways of small intestinal organoids in mice

ZHANG Linli[1,2,3], WANG Lan[1,2,3], LIU Li[1,2,3]*
（*1. China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200040, China;*
2. State Key Laboratory of New Drug &Pharmaceutical Process, Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200437, China;
3. Shanghai Professional and Technical Service Center for Biological Material Draggability Evaluation, Shanghai 200437, China）

Abstract: ***Objective*** To investigate the effects of lipopolysaccharide（LPS）on organoid growth, stem cells and related pathways. ***Methods*** The intestinal crypts of C57BL/6J mice were aseptically isolated and collected *in vitro*, and the three-dimensional small intestinal organoids with multi-bud structure were cultured. Immunofluorescence staining was used to identify the cell composition of small intestinal organoids. After passage, small intestinal organoids were randomly divided into control group（LPS 0 μg/ml）and different concentrations of LPS groups（30、100 and 300 μg/ml）. The growth and morphological characteristics of organoids, and the changes of stem cells and proliferating cells induced by LPS were observed. Comparative RNA sequencing and bioinformatics analysis were used to characterize the changes in genes and pathways induced by LPS. ***Results*** In D6 culture, small intestinal crypts formed stereoscopic intestinal organoids with multiple budding structures accompanying the intestinal lumen. After modeling, LPS inhibited the formation of intestinal

收稿日期：2024-05-24
作者简介：张林丽，工程师，研究方向：炎症免疫药理、中枢神经系统药理等。
通信作者：刘莉，研究员，博士生导师，研究方向：中药药理学、免疫药理学。

organoid sprout structure, and the area of intestinal organoids was significantly reduced in a dose-dependent manner. IF staining results showed that the expression of intestinal cells and proliferating cells was increased. The comparative RNA sequencing showed that the expression of stem cells and proliferation-related genes was significantly increased, and the stem cells pathway was enriched. ***Conclusion*** The LPS-induced intestinal organoid injury model was initially constructed *in vitro*, and the mechanism and pathway of stem cell enhancement after injury were revealed, providing a reliable research platform for the mechanism research of intestinal diseases and the screening of effective drugs.

Key words: lipopolysaccharide; organoid; immunofluorescence

肠道上皮细胞（intestinal epithelial cells，IECs）在肠道的消化、吸收、分泌功能中发挥重要作用。肠道体外研究体系中各有优缺点，但均无法全面反映肠道功能的多样性和复杂性[1]。肠类器官包含多种肠道功能上皮细胞种类[2—3]，如肠干细胞（intestinal stem cell，ISC）、分泌细胞和吸收细胞等，并具有与体内相似的组织结构、多种细胞类型和功能。在器官发育、疾病发生机制以及病理生理学研究中，类器官较传统细胞培养更具生理相关性[4—5]。各种因素导致的肠道感染每年引起数千万人死亡，早期研究模型由于细胞类型单一等原因未能模拟出类似发病机制，故限制了研究者对感染后 IECs 应激变化、修复方面的认知。为进一步探究炎症肠道疾病下细胞的变化，本研究拟构建小鼠小肠类器官并鉴定其细胞组成，引入脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）进行模型诱导，探讨 LPS 对类器官生长、干细胞及相关通路的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

6 ～ 8 周龄体质量 20 ～ 25 g SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠，购自上海斯莱克实验动物有限公司，实验动物生产许可证号：SCXK（沪）2022-0004；实验动物使用许可证号：SYXK（沪）2019-0027。获得上海医工院药理评价中心伦理委员会批准（A-2023-03-08）。小鼠进入动物房后于独立通风笼中适应性饲养 7 d 后用于实验。室温 22 ～ 24 ℃，相对湿度 40% ～ 70%，12 h 明暗交替，常规饲料喂养。

1.2 试剂

杜尔贝科改良 eagle 培养基（Dulbecco's modified eagle medium，DMEM）/F12 培养基（12634010）、B27 补充剂（12587010）、N2 补充剂（17502048）、4-羟乙基哌嗪乙磺酸（HEPES，15630130）及 *L*- 丙氨酰 -*L*- 谷氨酰胺（GlutaMAX，35050079）购自美国 Gibco 公司。乙酰半胱氨酸（N-acetylcysteine，616-91-1）、牛血清白蛋白（bovine serum albumin，BSA，9048-46-8）购自 Sigma-Aldrich 公司。表皮生长因子（epidermal growth factor，EGF，315-09）、Noggin（120-10C）及 R-Spondin 1（315-32）购自美国 Peprotech 公司。肠类器官培养基包含 DMEM/F12（2660096）、1×N2 补充剂（2450238）及 1×B27 补充剂（2450388）均购自 Gibco；10 mmol/L HEPES（2458415）、1×GlutaMAX（2360314）均购自 Thermo Scientific；50 ng/ml EGF（AF-315-09）、100 ng/ml Noggin（250-38-100）及 500 ng/ml R-Spondin 1（120-38）均购自 PeproTech；（ES0015）购自亦杉生物、1 mmol/L N-acetylcysteine（M5385）购自 AbMole Bioscience。

羊抗兔二抗（SA00013-2）、羊抗小鼠二抗（SA00014-10）购自 Proteintech 公司。基质胶（356231）购自美国 Corning 公司。LPS（9587-44-01）购自美国 InvivoGen 公司。Dispase 分散酶（07913）、温和解离试剂（gentle cell dissociation reagent，GCDR，100-0485）购自美国 Stem cell 公司。Triton X-100（P0096）、抗兔 IgG（P0615）、DAPI（C1006）、4% 多聚甲醛（P0099）购自碧云天。磷酸盐缓冲液

(phosphate buffered solution，PBS，G4202-500 ml)、pH 9 的乙二胺四乙酸 (ethylenediaminetetraacetic acid，EDTA) 抗原修复溶液 (P0084) 购自武汉塞维尔。抗 Ki67 抗体 (ab16667)、抗嗜铬粒蛋白抗体 (chromogranin A，ab283265)、抗溶菌酶抗体 (lysozyme，ab108508) 购自美国 Abcam 公司。闭锁小带蛋白 1 抗体 (zonula occludens-1，ZO-1，sc-33725) 购自日本 Santa Cruze 公司。富含亮氨酸重复序列 G 蛋白偶联受体 5（leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5，Lgr5，bs-20746R) 购自北京博奥森生物技术有限公司。

1.3 小鼠小肠类器官的建立、传代及造模

小鼠异氟烷麻醉后取十二指肠后盲肠前的小肠段，切成 2 mm×2 mm×2 mm 小块，PBS 清洗直至上清液清亮。10 mmol/L EDTA 孵育消化 30 min 加入 PBS 重悬沉淀，取含隐窝的上清液过 70 μm 细胞筛网获得隐窝滤液①，重复加入 PBS 继续重悬沉淀分别生成滤液②～⑥以获得更多隐窝，离心 5 min 弃上清，加入类器官培养基和基质胶重悬隐窝沉淀，以 300 个隐窝 /50 μl 的密度种于 24 孔板，放入 37 ℃培养箱内静置 30 min 待基质胶凝固后，每孔再加入 300 μl 培养基，每隔 2 ～ 3 d 换液 1 次。

培养 6 ～ 8 d 后，肠类器官肠腔呈现黑色，待传代。传代孔中加入 1 ml 温和细胞解离试剂 GCDR 上下吹打 10 次后，室温孵育 10 min。肠类器官解离成小细胞团块，离心 5 min 去除上清液。种板、换液及观察步骤同初次培养。

参考 HUANG 等 [6] 研究，使用类器官培养基配制含 30、100 和 300 μg/ml 的 LPS 的培养基用于模型建立，即不同浓度的 LPS 组，同时设立对照组，以 0 μg/ml 的 LPS 用于模型建立。在肠类器官传代种板时即加入含上述不同浓度 LPS 的培养基继续培养 5 d。

1.4 小鼠小肠类器官的形态鉴定

使用尼康 Ts2 倒置显微镜和 CapStudio 软件观察并拍照记录类器官生长及形态特征变化。Image J 软件计算类器官面积。

1.5 小鼠小肠类器官的免疫荧光 (immunofluorescence，IF) 染色

类器官与 1 U/ml Dispase 分散酶在 37 ℃孵育 60 min 以去除基质胶。离心 5 min，弃上清加 4% 多聚甲醛重悬类器官，室温孵育 1 h。加入预冷类器官清洗液 (organoid washing buffer，OWB，含 0.4% Triton X-100 和 0.2% BSA 溶于 PBS 中）将适量的类器官转移到 24 孔板上，4 ℃孵育 30 min。每孔加入 200 μl 一抗，4 ℃孵育过夜：Lgr5、Ki67、Chromogranin A、Lysozyme、ZO-1。洗涤，加二抗室温避光孵育 1 h：山羊抗兔二抗，山羊抗小鼠二抗。洗涤，加 DAPI 室温避光孵育 1 h 后通过尼康活细胞工作站中的激光共聚焦显微镜进行 IF 拍摄。

1.6 小鼠小肠类器官的转录测序及生信分析

去除基质胶后的类器官用 TRIzol 重悬进行 RNA 分离、纯化。提取的信使 RNA 通过逆转录酶 (Invitrogen SuperScrip Ⅱ Reverse Transcriptase，USA) 合成互补 DNA。经过聚合酶链式反应程序形成片段大小为 (300±50)bp 的文库数据。使用 Illumina Novaseq 6000（联川生物）模式为 PE150 进行双端测序。采用 StringTie 软件对基因或转录本进行组装，并用每千个碱基的转录每百万映射读取片段定量，使用 R 包软件对样本间的差异基因进行分析，差异倍数＞ 2 倍或＜ 0.5 倍，且 $P < 0.05$ 定义为显著差异。使用 DAVID 软件对基因进行基因本体论 (gene ontology，GO) 和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG) 基因集富集分析 (gene set enrichment analysis，GSEA)。

1.7 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.0 进行数据统计和分析，数据以 ($\bar{x}\pm s$) 表示，多组间均数比较采用单因素方差分析，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 正常小肠类器官培养建立及传代

如图 1 所示，小肠隐窝培养 1 d 即闭合形成圆形结构，随后 D2 ～ D4 圆形变长形成类肠腔结构。D5 肠腔外凸形成出芽组织，并持续长大。D6 形成具有肠腔和多芽结构的立体类器官。肠类器官传代后，背景更加干净清晰，类器官数目逐步增多，见图 2。肠类器官在此培养条件下可稳定传至多代，并保持肠腔及出芽的立体结构不变，肠类器官建立成功，见图 3。

2.2 小肠类器官 IF 染色

培养成熟的正常小肠类器官 IF 染色结果和明场图（SD-BF）示：干细胞标记 Lgr5 和增殖细胞标记 Ki67 主要分布于肠类器官出芽部位。内分泌细胞标记 chromogranin A 位于肠腔，潘氏细胞标记 lyzsome 分布于出芽部位及肠腔中，详见图 4。

2.3 LPS 对小肠类器官生长状态影响

与对照组相比，LPS 组出芽类器官减少，形态

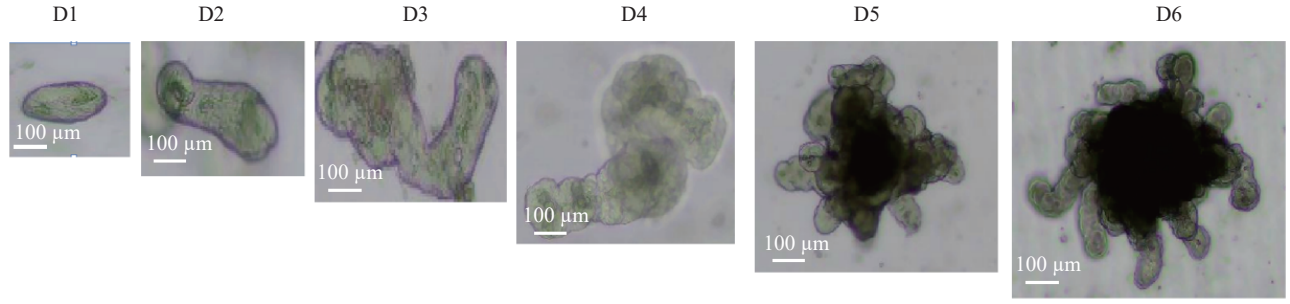


图 1 单个肠隐窝在培养基和基质胶中形成肠类器官（×100）

Figure 1 Individual intestinal crypts form intestinal organoids in the medium and matrigel（×100）

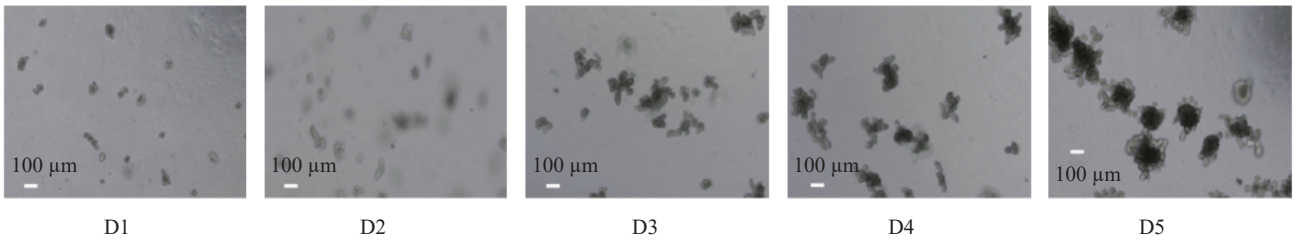


图 2 传代后的肠类器官逐步成长图（×40）

Figure 2 Intestinal organoids growth after passaging（×40）

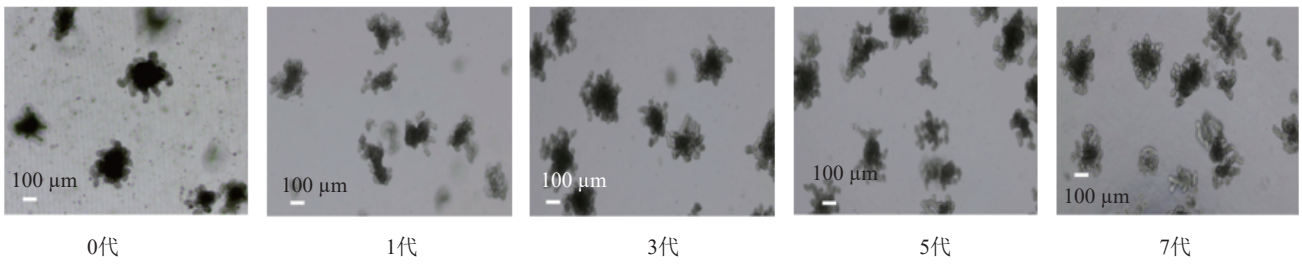


图 3 不同代数的肠类器官形态（×40）

Figure 3 Intestinal organoid morphology of different algebras（×40）

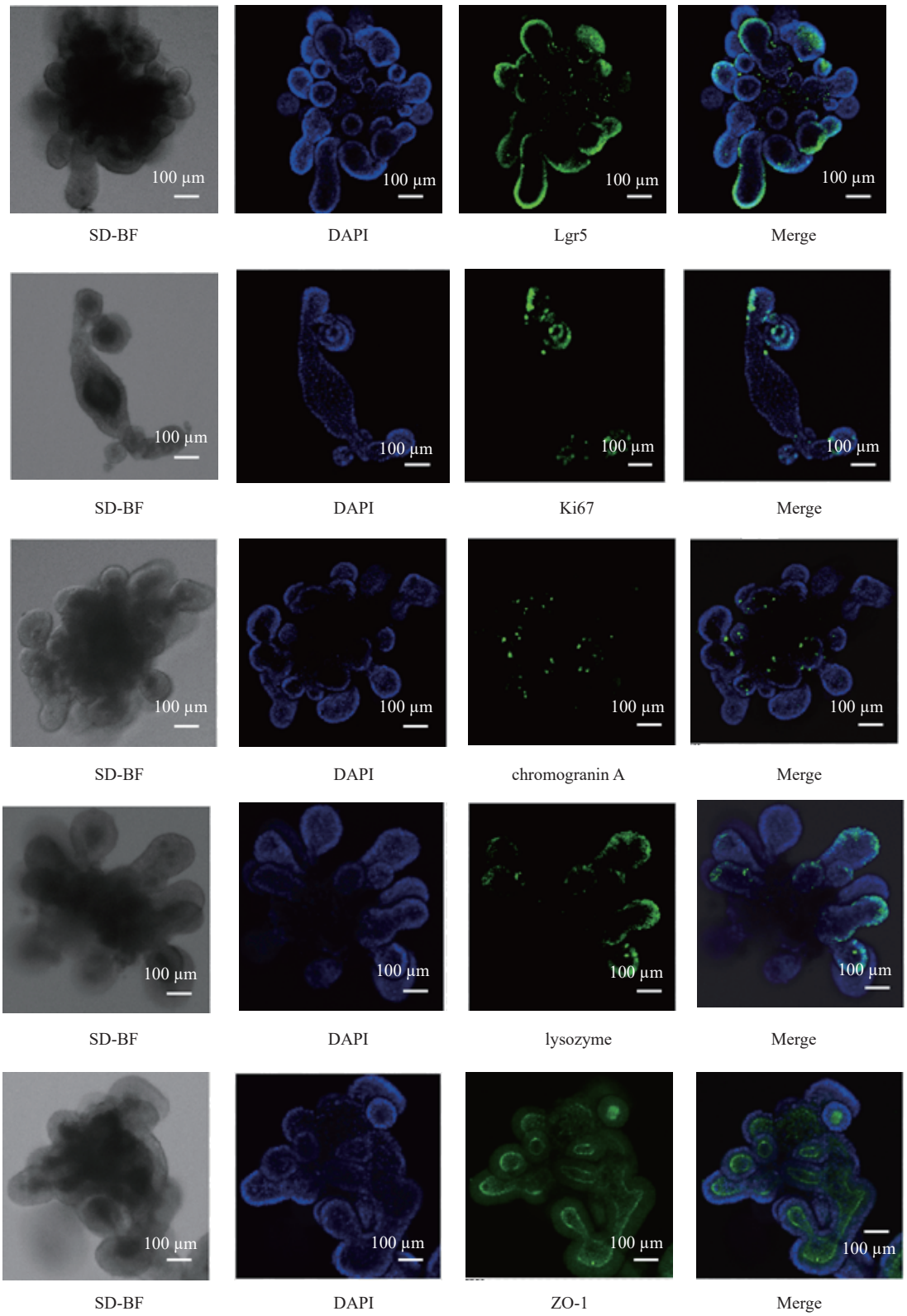


图 4　正常小肠类器官 IF 染色结果（×100）

Figure 4　IF staining results of normal small intestinal organoids（×100）

学呈现圆形为主，见图 5、6，见表 1。

与对照组相比，LPS 100 及 300 μg/ml 组肠类器官面积减小，差异具有统计学意义（$P < 0.05$），见表 2。

2.4 LPS 对小肠类器官干细胞影响

小肠类器官经 LPS 处理后的 IF 结果表明，干细胞标记 Lgr5 的表达增多、增强，增殖细胞标记 Ki67 的表达增多、增强，见图 7。

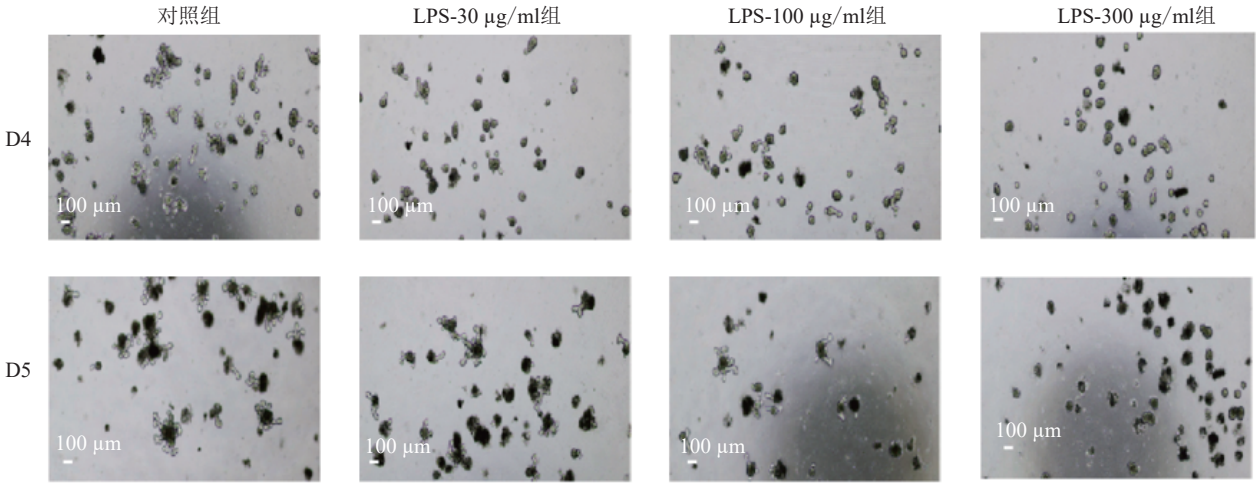


图 5 LPS 处理 D4、D5 小肠类器官形态变化（×40）

Figure 5 The morphological changes of small intestinal organoids in D4 and D5 were treated by LPS（×40）

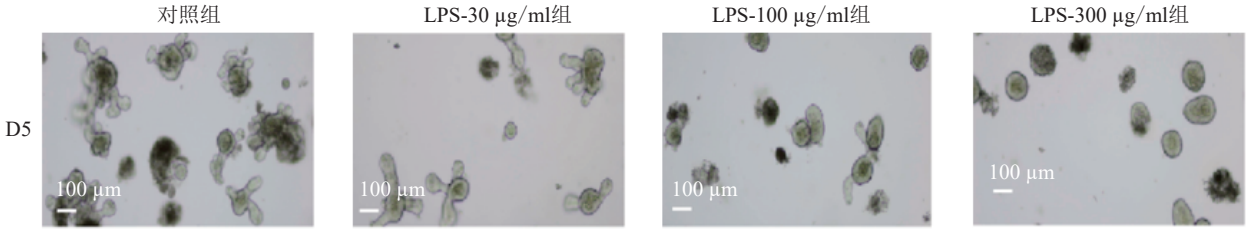


图 6 D5 出芽类器官数量（×100）

Figure6 Number of budding organoids in D5（×100）

表 1 LPS 处理出芽小肠类器官比率（$\bar{x}\pm s$，单位：%）

Table1 The ratio of small intestinal organoids to budding treated by LPS（$\bar{x}\pm s$, unit: %）

组别	D4出芽类器官比例/%	D5出芽类器官比率/%
对照组	40.75±5.34	48.58±7.99
LPS-30 μg/ml组	32.27±5.89	19.57±2.86**
LPS-100 μg/ml组	21.76±8.02	14.10±4.95***
LPS-300 μg/ml组	5.26±3.07***	0.00±0.00***

注：与对照组相比，**P<0.01，***P<0.001。

Note: vs. control group, **P<0.01, ***P<0.001.

表 2 LPS 处理对肠类器官面积影响（$\bar{x}\pm s$，单位：μm²）

Table 2 The effect of LPS treatment on intestinal organoid area（$\bar{x}\pm s$, unit: μm²）

组别	类器官面积
对照组	28 125±4 031.30
LPS-30 μg/ml组	20 354.87±2 685.33
LPS-100 μg/ml组	18 102.80±1 504.27*
LPS-300 μg/ml组	13 585.15±1 672.47***

注：与对照组相比，*P<0.05，***P<0.001。

Note: vs. control group, *P<0.05, ***P<0.001.

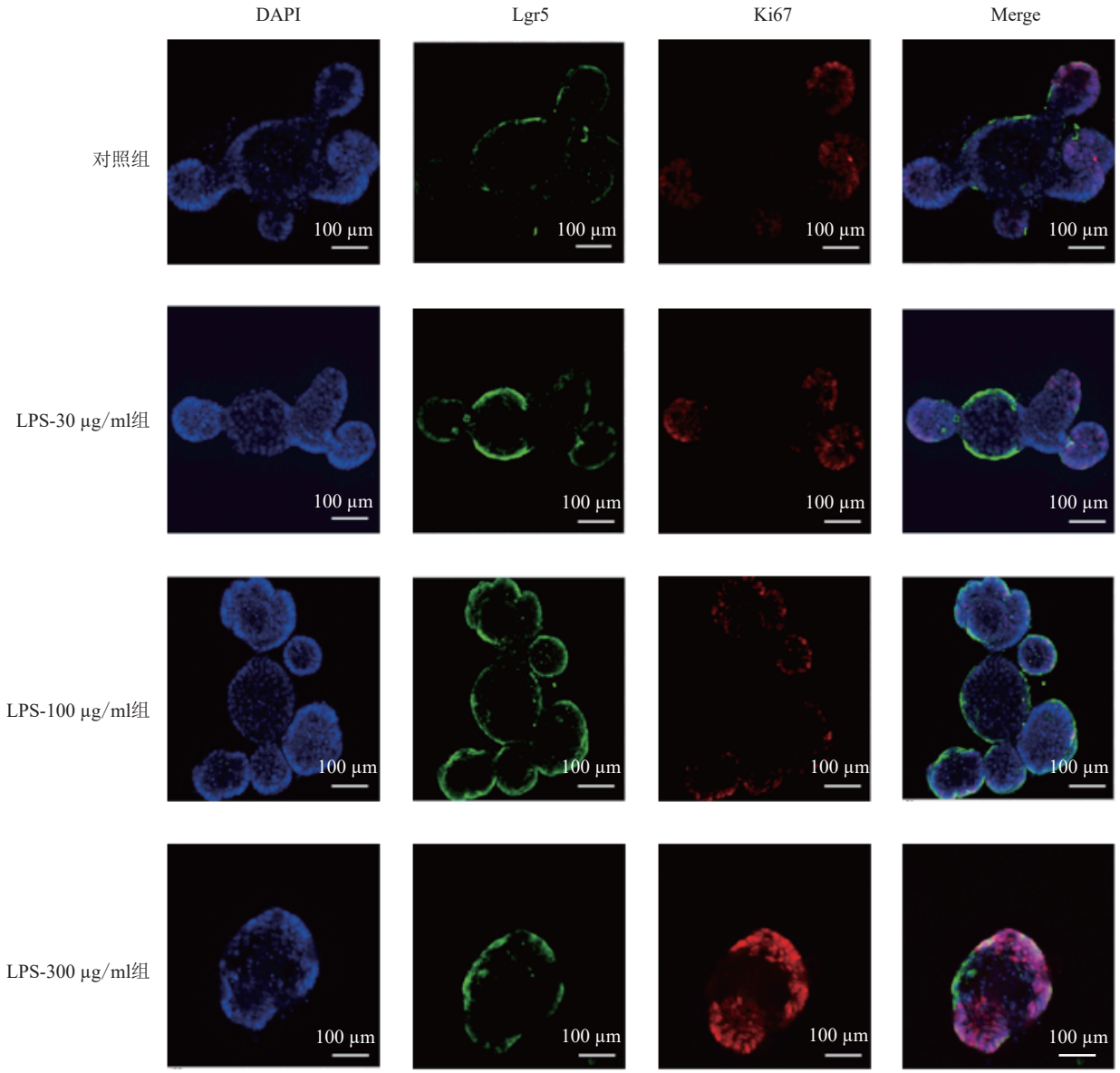


图 7　LPS 处理对小肠类器官的干细胞和增殖细胞的影响（×100）

Figure 7　The effects of LPS treatment on stem cells and proliferating cells in small intestinal organoids（×100）

2.5　LPS 对小肠类器官干性基因和通路的影响

与对照组相比，LPS 100 μg/ml 组的 *Lgr5*、*Axin2*、Achaete-scute 家族 bHLH 转录因子（Achaete-scute family bHLH transcription factor，ASCL）2、Y 染色体性别决定区盒转录因子 9（sex determining region Y chromosome box transcription factor，SOX）9、Wnt 家族成员（Wnt family member，*Wnt*）3、*Wnt9b*、分裂同源物（hairy and enhancer of split，HES）1 基因表达显著增加，见表 3。干细胞多能性相关信号通路、Hippo 信号通路以及 Wnt 信号通路呈现富集，见图 8。

3　讨论

本研究从肠隐窝建立起小肠类器官，随着培养时间增加呈现形态学变化，与 SERRA 等[7] 研究基

表 3 LPS 处理增加干性基因表达 ($\bar{x}\pm s$)
Table 3 LPS treatment increased dry gene expression ($\bar{x}\pm s$)

基因	对照组	LPS-100 μg/ml
Lgr5	6.19±0.68	18.75±0.75***
Axin2	19.80±2.82	46.56±1.79***
ASCL2	4.40±0.37	9.90±1.59*
SOX9	13.05±1.78	41.82±4.35**
Wnt 3	1.79±0.25	4.05±0.82*
Wnt 9b	0.16±0.03	0.50±0.16*
Hes1	9.97±0.54	22.10±2.31**

注：与对照组相比，*P<0.05，**P<0.01，***P<0.005。
Note: vs. control group, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.005.

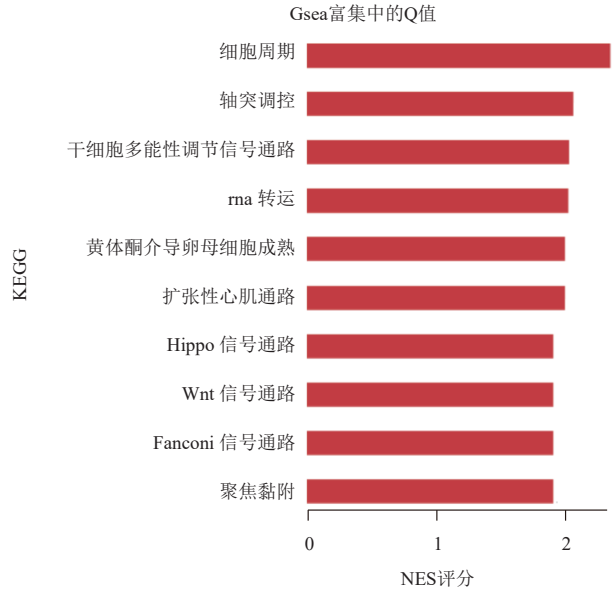


图 8 KEGG 富集
Figure 8 KEGG enrichment

本一致。IF 染色结果显示，建立的肠类器官包含干细胞及多种肠上皮细胞，其细胞类型组成与体内相似，与前人研究结果相似[8—10]。小肠组织相对容易获得，隐窝含量高、类器官培养周期短，可大量生成、传代及冻存并保持遗传稳定，为肠道发育、疾病造模、肠道代谢及修复再生等研究提供良好平台[11—18]。

细菌感染是肠道感染性疾病最常见病因，LPS 作为革兰氏阴性细菌细胞壁外壁的组成成分，常被用于体外、体内的造模研究。类器官常用的造模途径包括显微注射、培养基中添加及分裂期感染几种[19]。前期研究关注类器官使用 LPS 造模后早期炎症因子的改变[20—21]，本研究关注损伤后相关细胞的修复反应，故造模后持续观察 5 d。结果显示，100 μg/ml 的 LPS 可引起肠类器官形态学改变，出芽类器官比率显著减少，同时面积显著减少，与正常组相比，呈现显著的统计学差异，表明模型建立成功。进一步 IF 结果显示，LPS 100 及 300 μg/ml 组肠干细胞 Lgr5 和增殖细胞 Ki67 的表达增多，且不仅出现于出芽部位。对 LPS 100 μg/ml 组进一步转录测序发现，LPS 造模后，干性基因如 *Lgr5*、*Axin2*、*ASCL2* 以及增殖有关基因如 *Wnt3*、*Wnt9b* 的表达显著增加。GSEA 后的 KEGG 通路分析表明，干细胞多能性相关的信号通路、Hippo 信号通路以及 Wnt 信号通路呈现富集。有研究[22—23]显示，肠道受损后，部分潘氏细胞重新获取多能干性并呈现干细胞类似功能，或是附近的干细胞后代去分化后恢复干细胞功能，表明干细胞及其功能的维护是损伤后的首要反应。本研究结果也表明，受到 LPS 损伤小肠类器官形态学发生改变恢复至早期状态，但可通过增殖和干性通路的作用来保持及提升增殖性能与干性功能。

4 结论

综上所述，体外类器官肠损伤模型的构建为肠功能障碍、炎症性肠病建模提供有效工具，亦为抗炎或免疫抑制等治疗策略提供更多的平台选择。

参考文献：

[1] RAHMAN S, GHIBOUB M, DONKERS JM, *et al*. The progress of intestinal epithelial models from cell lines to gut-on-chip[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(24): 13472.

[2] YANG L, WANG X, ZHOU X, *et al*. A tunable human intestinal organoid system achieves controlled balance between self-renewal and differentiation[J]. Nat Commun, 2025, 16(1): 315.

[3] GHORBANINEJAD M, ASADZADEH-AGHDAEI H, BAHARVAND H, *et al*. Intestinal organoids: a versatile platform for modeling gastrointestinal diseases and monitoring epigenetic alterations[J]. Life Sci, 2023, 319: 121506.

[4] CHEN Y, WANG Y. Innovations in intestinal organoid technology featuring an open apical surface[J]. Eur Jo Cell Biol, 2025, 104(2): 151476.

[5] SITTIPO P, LEE Y. The application of intestinal organoids and their co-culture systems in the study of gastrointestinal diseases[J]. Organoid, 2022, doi:10.51335/organoid.2022.2.e3.

[6] HUANG S, ZHANG S, CHEN L, *et al*. Lipopolysaccharide induced intestinal epithelial injury: a novel organoids-based model for sepsis *in vitro*[J]. Chin Med J(Engl), 2022, 135(18): 2232-2239.

[7] SERRA D, MAYR U, BONI A, *et al*. Self-organization and symmetry breaking in intestinal organoid development[J]. Nature, 2019, 569(7754): 66-72.

[8] LEE SA, LEE HJ, GU NY, *et al*. Evaluation of porcine intestinal organoids as an *in vitro* model for mammalian orthoreovirus 3 infection[J]. J Vet Sci, 2023, 24(4): e53.

[9] ALLAIRE JM, POON A, CROWLEY SM, *et al*. Interleukin-37 regulates innate immune signaling in human and mouse colonic organoids[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 8206.

[10] TAKAHASHI T, FUJISHIMA K, KENGAKU M. Modeling intestinal stem cell function with organoids[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(20): 10912.

[11] SPRANGERS J, ZAALBERG IC, MAURICE MM. Organoid-based modeling of intestinal development, regeneration, and repair[J]. Cell Death Differ, 2021, 28(1): 95-107.

[12] SARVESTANI SK, SIGNS S, HU B, *et al*. Induced organoids derived from patients with ulcerative colitis recapitulate colitic reactivity[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 262.

[13] HE GW, LIN L, DEMARTINO J, *et al*. Optimized human intestinal organoid model reveals interleukin-22-dependency of paneth cell formation[J]. Cell Stem Cell, 2022, 29(9): 1333-1345.

[14] ANGUS HCK, BUTT AG, SCHULTZ M, *et al*. Intestinal organoids as a tool for inflammatory bowel disease research[J]. Front Med(Lausanne), 2020, 6: 334.

[15] QU M, XIONG L, LYU Y, *et al*. Establishment of intestinal organoid cultures modeling injury-associated epithelial regeneration[J]. Cell Res, 2021, 31(3): 259-271.

[16] LAMERS MM, BEUMER J, VAN DER VAART J, *et al*. SARS-CoV-2 productively infects human gut enterocytes[J]. Science, 2020, 369(6499): 50-54.

[17] NIE J, LIAO W, ZHANG Z, *et al*. A 3d co-culture intestinal organoid system for exploring glucose metabolism[J]. Curr Res Food Sci, 2023, 6: 100402.

[18] SUGIMOTO S, KOBAYASHI E, FUJII M, *et al*. An organoid-based organ-repurposing approach to treat short bowel syndrome[J]. Nature, 2021, 592(7852): 99-104.

[19] AGUILAR C, ALVES DA SILVA M, SARAIVA M, *et al*. Organoids as host models for infection biology – a review of methods[J]. Exp Mol Med, 2021, 53(10): 1471-1482.

[20] FENG S, ACHOUTE L, MARGOLSKEE RF, *et al*. Lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokine expression in taste organoids[J]. Chem Senses, 2020, 45(3): 187-194.

[21] SHAO C, YANG X, JING Y, *et al*. The stemness of hepatocytes is maintained by high levels of lipopolysaccharide via yap1 activation[J]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12(1): 342.

[22] HE GW, LIN L, DEMARTINO J, *et al*. Optimized human intestinal organoid model reveals interleukin-22-dependency of paneth cell formation[J]. Cell Stem Cell, 2022, 29(9): 1333-1345.

[23] MURATA K, JADHAV U, MADHA S, *et al*. Ascl2-dependent cell dedifferentiation drives regeneration of ablated intestinal stem cells[J]. Cell Stem Cell, 2020, 26(3): 377-390.

（编辑：沈佳婕）