

· 基础研究 ·

雌性11 β -HSD1敲除小鼠肠道类器官体外研究

丁菲,夏凡,狄文娟,丁国宪*

南京医科大学第一附属医院老年内分泌科,江苏 南京 210029

[摘要] 目的:研究雌性11 β -HSD1敲除小鼠肠道类器官功能改变。方法:分离年龄性别匹配的C57BL/6J小鼠和11 β -HSD1敲除小鼠的肠道组织。细胞流式定量分析肠道上皮层干细胞、祖细胞、潘氏细胞分别所占比例。实时定量PCR检测干细胞和潘氏细胞的标志基因表达情况。分离小鼠肠上皮隐窝单位进行体外3D类器官培养,观察类器官增殖率及类器官分化程度。免疫荧光染色研究小肠类器官干细胞及潘氏细胞的定位和定量。结果:11 β -HSD1敲除小鼠与野生组相比,其小肠上皮所含潘氏细胞数显著增高,干细胞数目无明显差异,祖细胞数目增多,肠道干细胞标志基因Lgr5在小肠上皮的表达有增高趋势。同时在大肠上皮组织中有类似的结果,11 β -HSD1敲除组大肠干细胞、祖细胞数目及Lgr5基因表达均增高。体外研究结果显示,小肠隐窝成类器官比例有增高趋势,11 β -HSD1敲除组增殖分化出的类器官对比野生组具有更复杂的结构及更多数目的类隐窝区域,但大肠隐窝类器官培养结果未见显著差异。对小肠类器官的干细胞及潘氏细胞染色发现,11 β -HSD1敲除小鼠肠道类器官含有更多的潘氏细胞,干细胞数目亦有增多趋势。结论:11 β -HSD1敲除后小鼠肠道细胞组成发生改变,在小肠上皮组织中,潘氏细胞数目显著增多;在大肠上皮组织中,干细胞、祖细胞数目及干细胞标志基因表达量均显著增加。体外研究显示,11 β -HSD1敲除组小肠类器官包含更多的潘氏细胞,类器官具有更强的增殖及分化能力。

[关键词] 11 β -HSD1;肠道;肠上皮;类器官;迷你肠;干细胞;潘氏细胞

[中图分类号] Q813.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)05-653-06

doi:10.7655/NYDXBNS20190505

In vitro study of intestinal organoids in female 11 β -HSD1 knockout mice

Ding Fei, Xia Fan, Di Wenjuan, Ding Guoxian*

Department of Geriatric Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** To study the changes of intestinal organoids function in female 11 β -HSD1 knockout mice. **Methods:** The intestinal tissues of age-sex matched C57BL/6J mice and 11 β -HSD1 knockout mice were collected. Fluorescence-activated cell sorting analysis and quantifications of the intestinal epithelial stem cells, progenitor cells and Paneth cells. Real-time quantitative PCR was used to detect the expression of marker genes in stem cells and Paneth cells. Crypt units were isolated for primary organoid culture in vitro, and the percentage of organoid per crypt ratio and the number of crypt-domains per organoid were observed. Immunofluorescence staining was performed to study the localization and quantification of stem cells and Paneth cells among organoids. **Results:** Compared with the control group, the number of Paneth cells in the small intestine epithelium of the 11 β -HSD1 knockout mice was significantly increased, the number of stem cells was not significantly different, the number of progenitor cells was increased, and the expression of the intestinal stem cell marker gene Lgr5 in the intestinal epithelium was elevated. Similar results were observed in the epithelium of the large intestine. The number of large intestine stem cells, progenitor cells and gene Lgr5 expression were increased in the 11 β -HSD1 knockout group. In vitro studies showed that the organoid per crypts ratio was increased, and the organoids derived from the 11 β -HSD1 knockout group proliferated and differentiated into more complex structures and consist a greater number of crypt-like domains than the wild group. However, there was no significant difference in the results of colonic crypt organ culture. Immunofluorescence staining of stem cells and Paneth cells of small intestinal organs revealed that the intestinal organoids of 11 β -HSD1 knockout mice contained more Paneth cells, and the number of stem cells also increased although not significant. **Conclusions:** The composition of

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81370950)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: dinggx@njmu.edu.cn

intestinal epithelium changed after 11 β -HSD1 mutation. In the small intestinal epithelium, the number of Paneth cells increased significantly. In the large intestinal epithelium, the number of stem cells, progenitor cells and stem cell marker genes increased significantly. In vitro studies have shown that the 11 β -HSD1 knockout group contains more Paneth cells, which have more robust proliferation and differentiation ability.

[Key words] 11 β -HSD1; intestine; intestinal epithelium; organoids; mini-gut; stem cells; Paneth cells

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(05): 653-658]

11 β -羟基类固醇脱氢酶 1 (11 β -hydroxysteroid dehydrogenase, 11 β -HSD1) 是催化惰性 11 酮产物 (可的松) 转化为活性皮质醇的酶, 将可的松还原为激活糖皮质激素受体的活性激素皮质醇, 11 β -HSD1 缺陷的小鼠会表现出炎症状态反应改变且可免受不利代谢的影响^[1]。11 β -HSD1 以组织特异性方式调节糖皮质激素水平^[2], 其在参与糖皮质激素调节免疫和代谢过程中发挥重要作用。11 β -HSD 水平升高与内脏肥胖密切相关^[3], 目前已经明确 11 β -HSD1 在肝脏、脂肪中会引起糖皮质激素浓度增高, 诱导肥胖和糖尿病发生^[4]。选择性抑制 11 β -HSD1 可能成为一个治疗 2 型糖尿病及代谢综合征的潜在靶点^[5]。在世界范围内, 人群中女性肥胖发病率普遍高于男性, 而中年时期是女性发生肥胖尤其是腹型肥胖的重要阶段^[6]。以往的动物实验基于经费成本和时间成本的考虑, 通常使用青年小鼠作为研究对象, 导致机体老化等因素未能纳入研究范畴。本研究从临床出发, 采用中年雌性小鼠作为研究对象以更好地模拟真实世界。肠道作为接触饮食的第一门户, 直接参与感知调节营养物质吸收与代谢等过程, 通过已知的神经和内分泌途径远端调控脑、脂肪等器官功能, 同时还是机体重要的免疫器官, 在调节机体炎症及代谢水平方面发挥关键作用。有研究显示^[7], 肠道 ERAD 通路蛋白 AIDA 编码一种 Aida 基因通过下调小肠中甘油三酯合成的限速酶, 限制小肠吸收脂肪, 从而减少肥胖发生。Aida 基因敲除将导致肠道脂肪吸收增加和严重肥胖。肠道为了解肥胖与代谢综合征的发生机制提供了全新的视野, 本研究从肠道入手, 通过研究糖皮质激素“局部放大器” 11 β -HSD1 对肠道结构及功能的影响, 从而在源头阻止内脏肥胖及相关慢性疾病的发生提供新的临床应用思路。

本研究运用流式细胞分选和 RT-PCR 技术分析上皮细胞的组成和基因标志物的表达情况。利用 3D 类器官原代培养技术在体外培养小鼠肠道上皮层 (迷你肠), 观察干细胞的增殖和分化能力。本实验结果显示, 11 β -HSD1 缺陷小鼠的肠道类器官表

现更有活力、形态更具复杂性, 免疫荧光染色发现其类器官含有更高比例的潘氏细胞。

1 材料和方法

1.1 材料

雌性 C57BL/6J 小鼠和雌性 11 β -HSD1^{-/-} 小鼠, 12 月龄 (南京大学动物模式中心), SPF 级环境, 温度 (23 \pm 1) $^{\circ}$ C。流式细胞仪 BD FACS ARIA II (BD Biosciences 公司, 美国)。荧光定量 PCR 仪 ABI 7000 StepOne-Plus (ABI 公司, 美国)。生长因子 EFG、R-spondin 1、Noggin 和 Wnt3a (Pepro Tech, 公司, 美国), 3D 培养基质 Matrigel 356231 (Corning 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 肠道组织的分离

C57BL/6J 和 11 β -HSD1^{-/-} 12 月龄雌性小鼠各 6 只, 脱颈法处死后取出小鼠整个肠道并测量长度 (小肠: 从幽门至回盲部连接; 结肠: 从盲肠至直肠)。距幽门 6 cm (十二指肠部分) 丢弃。

1.2.2 肠道上皮细胞流式分析

小鼠肠管以无钙镁 PBS 冲洗后浸入 8 mmol/L EDTA 螯合液, 充分消化后用力震荡使上皮层从固有层分离, 100 μ m 滤网过滤离心后获得上皮细胞, 用 TrypLE Express (Gibco 公司, 美国) 将上皮细胞分散成单细胞, 40 μ m 滤网过滤后离心收集上皮细胞, 镜下观察计数, 加入流式标记抗体: Lgr5/GPR49-APC (R&D System 公司, 美国), CD24-PE (BD Biosciences 公司, 美国), CD326 (EPCAM)-FITC (eBioscience 公司, 美国)。干细胞筛选条件: Lgr5^{hi} CD326/Epcam⁺, 祖细胞筛选条件: Lgr5^{low} Epcam⁺, 潘氏细胞筛选条件: CD24^{hi} Sidescatter^{hi} CD326/Epcam⁺^[8]。

1.2.3 肠道上皮层细胞提取、逆转录和实时定量 PCR

肠上皮总 RNA 通过 TRIzol Reagent (Invitrogen 公司, 美国) 提取。按照试剂盒说明书提取总 RNA 和逆转录 cDNA。以此 cDNA 为模版加入 PCR 引物 (表 1) 和 SYBR Green Real-time PCR Master Mix (Roche 公司, 美国), 总反应体系为 10 μ L。基因表达

以β-actin作为内参。PCR反应条件:95℃ 10 min; 95℃变性15 s, 60℃退火60 s, 40个循环, 60℃~95℃, 温度每升高1℃记录1次荧光值作出熔解曲线(ABI 7000, StepOnePlus公司, 美国)。以2^{-ΔΔCt}法计算定量结果。

表1 PCR引物序列(小鼠)
Table 1 Primer sequences(mice)

基因名称	引物序列(5'→3')
Lgr5	F:GAGTCTGGATTGTCGCAATTG R:GGCCTTGCTGGAAGGTTGAGGA
11β-HSD1	F:CTGGGAGCTTGCTTACAGCATCA R:TGATGCTGTAAGCAAGCTCCAG
β-actin	F:TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT R:CACGATGGAGGGCCGGACTCATC

1.2.4 肠道上皮分离隐窝、原代培养和免疫荧光染色
小鼠处死后即刻分离出2 cm肠管并纵行切开,将小肠腔面的黏液及绒毛完整刮除后,用含100 U/mL青霉素,10 mg/mL链霉素的无钙镁HBSS-缓冲液清洗4~5次直至上清液澄清。将处理过的小肠组织放入8 mmol/L EDTA消化液中,冰上孵育直至充分整合(30~60 min),用5 mL移液枪用力吹打,直至50%~80%的隐窝单位从固有层脱落,收集富集隐窝的吹打液,70 μm过滤,800 r/min离心5 min,获得隐窝沉淀。将隐窝单位与液体状态的基质胶Matrigel按10~15个/μL混合,将含有隐窝单位的Matrigel滴在24孔培养板的孔中心,形成半球状,聚合成固态的3D立体结构。加入现配的完全培养液DMEM/F12(Gibco公司,美国)、N2 Supplement(Life Technologies公司,美国)、B27 Supplement(Life Technologies公司,美国)、GlutaMAX(Gibco公司,美国)、1 μmol/L N-乙酰半胱氨酸(Sigma-Aldrich,美国)、100 U/mL青霉素、100 μg/mL链霉素(Gibco公司,美国)、50 ng/mL EGF(Pepro Tech公司,美国)、1 μg/mL R-spondin1(Pepro Tech公司,美国)和100 ng/mL Noggin(Pepro Tech公司,美国),大肠类器官培养液另加100 ng/mL WNT-3a(Pepro Tech公司,美国)^[9-10]。置于5% CO₂, 37℃细胞孵育箱培养,每天观察,每48 h更换1次培养液。培养6 d后,移除培养液,PBS清洗后加入2%多聚甲醛-2%戊二醛固定,将固定过的Matrigel移入20%蔗糖溶液,直至沉底(过夜3 d),OCT包埋,液氮冷冻后切片,切片厚度10 μm,0.2 mol/L甘氨酸溶液淬灭15 min,0.15% Triton破膜15 min,3% BSA室温封闭1~2 h。Lgr5/GPR49兔一抗(1:200,Novus Bio-

logicals公司,美国)或Lysozyme兔一抗(1:200,R&D System公司,美国)4℃孵育过夜。Cy[™]3-conjugated IgG羊二抗(1:200,Jackson Immuno Research公司,美国)室温孵育1.5~2.0 h,DAPI染核^[11-13]。

1.3 统计学方法

采用SPSS16.0统计软件,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组比较应用独立样本t检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 分离小鼠肠道组织和细胞

从幽门及直肠处切断肠管完整分离出小鼠肠道组织(图1A,H),两组肠道长度未见显著差异(图1C,I)。流式细胞分析发现,11β-HSD1敲除小鼠与野生组相比,其小肠上皮所含潘氏细胞数显著增高(图1D),干细胞数目无明显差异(图1E),祖细胞数目增多(图1F),肠道干细胞标志基因Lgr5在小肠上皮的表达有增高趋势(图1G)。同时在大肠上皮组织中有类似结果,11β-HSD1敲除组大肠干细胞、祖细胞数目及Lgr5基因表达均增高(图1J、K、L)。

2.2 体外培养肠道类器官增殖分化能力改变

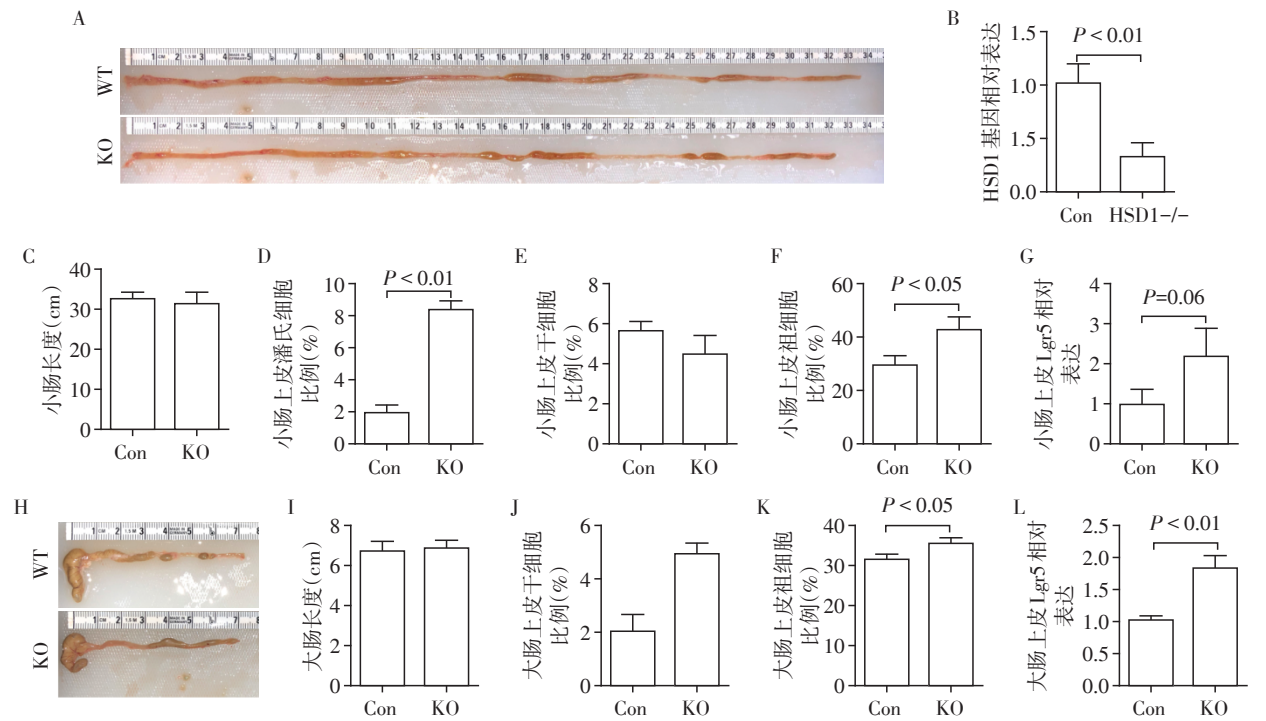
肠道上皮是体内更新代谢最快的组织之一,其干细胞及干细胞微环境是调节组织增殖代谢的中心环节^[14]。为探究11β-HSD1基因敲除对小鼠肠道干细胞增殖分化能力的影响,利用3D类器官原代培养技术进行了体外研究(图2A、B),结果显示11β-HSD1敲除组小肠隐窝成类器官比例有增高趋势(图2D),11β-HSD1敲除组增殖分化出的类器官对比野生组具有更复杂的结构及更多数目的类隐窝区域(图2C、E),但大肠隐窝类器官培养结果未见显著差异(图2B、F)。

2.3 小肠类器官干细胞和潘氏细胞比例改变

潘氏细胞特异性地存在于小肠隐窝,是肠道干细胞微环境的重要组成部分,潘氏细胞通过激活WNT信号对干细胞增殖起支持作用,同时潘氏细胞还可以分泌抑菌肽抵御抗原,从而维持肠道环境稳态^[15]。为进一步探究体外培养的肠道类器官的细胞构成,对小肠6 d龄类器官进行免疫荧光染色分析其干细胞与潘氏细胞所占比例发现,11β-HSD1敲除小鼠肠道类器官含更高比例的潘氏细胞,干细胞数目亦有增多趋势(图3)。

3 讨论

糖皮质激素在脂肪重新分布、内脏脂肪蓄积中



A: 小肠大体形态,左侧为小肠近段,右侧为小肠远端;B: 肠道组织HSD1 基因表达量(n=4~5);C: 小肠长度定量(n=6);D: 小肠上皮潘氏细胞流式分选结果(n=3);E: 小肠上皮干细胞流式分选结果(n=3);F: 小肠上皮祖细胞流式分选结果(n=3);G: 小肠上皮 Lgr5 基因表达量(n=5);H: 大肠大体形态;I: 大肠长度定量(n=6);J: 大肠上皮干细胞流式分选结果(n=3);K: 大肠上皮祖细胞流式分选结果(n=3);L: 大肠上皮 Lgr5 基因表达量(n=5)。

图1 小鼠肠道组织大体形态、上皮细胞构成及基因表达

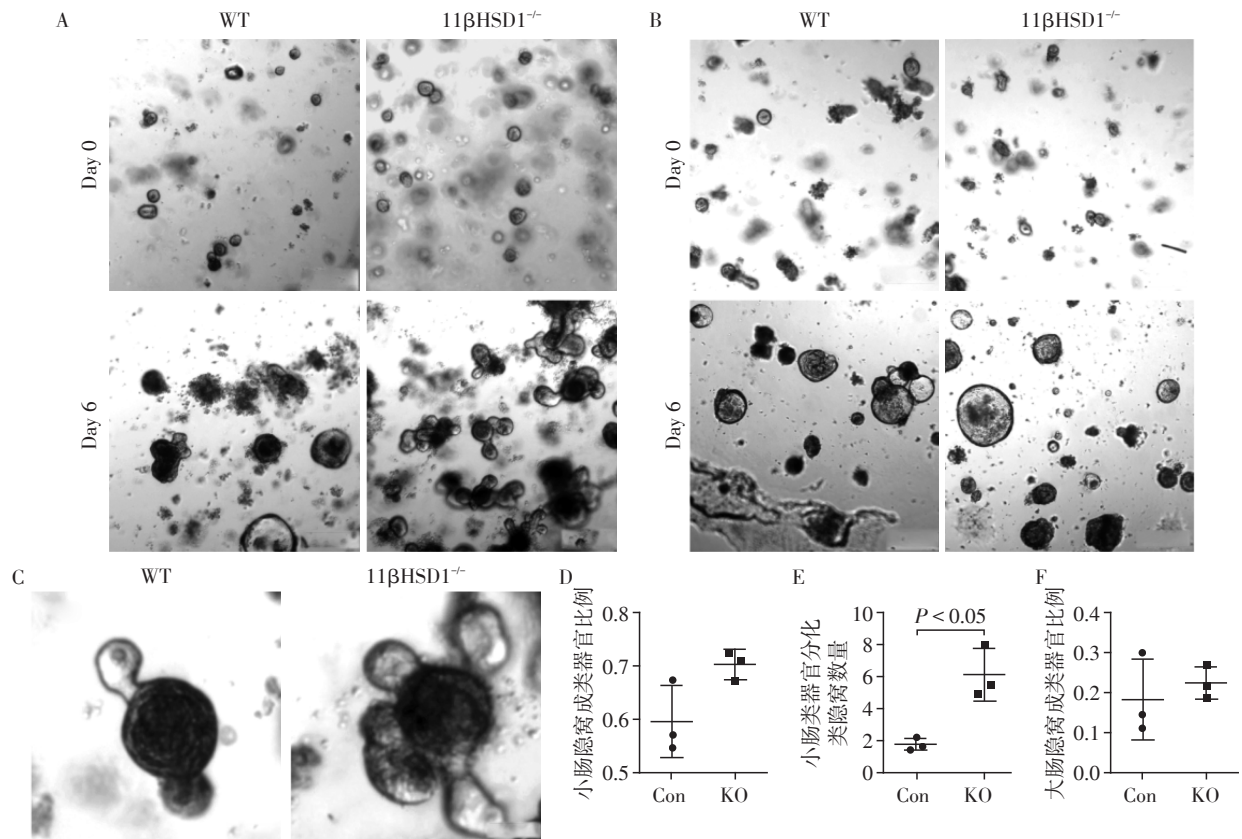
Figure 1 Morphology, epithelial cell composition and gene expression of mouse intestinal tissue

起关键作用。调节糖皮质激素代谢的关键酶 11β-HSD1 不仅存在于脂肪组织中,同样在肠上皮组织中表达。Dupare 等^[16]利用肠道上皮 MyD88 特异敲除鼠研究发现,敲除鼠能量消耗增加、脂肪量和炎症减少,从而降低肥胖及糖尿病的发生,而免疫细胞 MyD88 敲除则不能改变肥胖。因而,认为肠道上皮功能在肥胖、炎症等疾病发生发展中起关键作用。故本研究讨论了 11β-HSD1 敲除鼠在肠道原位细胞构成的差异及体外增殖分化潜能的变化。根据实验结果发现,11β-HSD1 基因敲除干预后的小鼠肠道在体内体外都明显含有更多的潘氏细胞。在小肠上皮组织中,干细胞数目未见明显差异,祖细胞数目增多,肠道干细胞标志基因 Lgr5 在小肠上皮的表达有增高趋势但无显著差异,结合类器官培养结果显示,11β-HSD1 敲除组在体外培养 6 d 后表现出更强的增殖和分化能力。对小肠类器官的干细胞及潘氏细胞染色发现,11β-HSD1 敲除小鼠肠道类器官含有更多的潘氏细胞,干细胞数目有增多趋势。另外在大肠上皮组织中干细胞、祖细胞数目及 Lgr5 基因表达均增高,但在培养实验中没有得到验证。

潘氏细胞是小肠中高度特化的上皮细胞,它在隐窝中与干细胞共存,通过分泌生长因子参与维持和调节上皮干细胞和祖细胞功能,并参与多种肠道生理功能调节^[17]。有研究显示,热卡限制会导致肠道干细胞和潘氏细胞增多,mTORC1 和 SIRT1 表达增高导致干细胞增多,但是有趣的是干细胞并不直接感受热卡限制信号,而是通过潘氏细胞感知能量变化,从而影响干细胞功能^[18]。11β-HSD1 敲除鼠在场上皮干细胞和潘氏细胞数目及功能变化方面有类似于热卡限制的表型。此前已有研究表明 11β-HSD1 可能是治疗肥胖及代谢综合征的一个潜在靶点。肠道作为接触饮食的第一门户,肠道组织局部 11β-HSD1 改变可能通过影响肠道干细胞及干细胞微环境进而影响肥胖及并发症发生发展。仍需进一步的功能研究来揭示肠道 11β-HSD1 在代谢中的确切作用。

[参考文献]

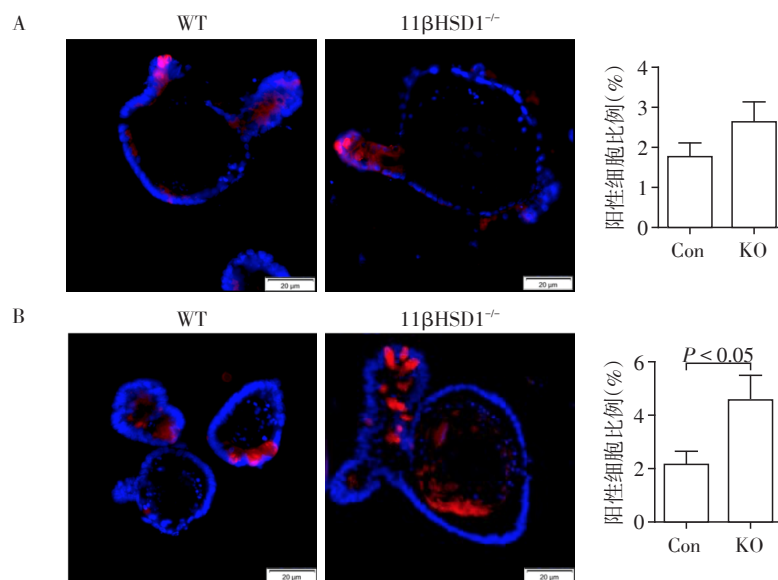
[1] Seckl JR, Walker BR. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1-a tissue-specific amplifier of glucocorticoid action[J]. Endocrinology, 2001, 142(4): 1371-1376



A: 野生组与11 β -HSD1敲除组小肠隐窝原代培养6 d($\times 50$, $n=3$); B: 野生组与11 β -HSD1敲除组大肠隐窝原代培养6 d($\times 50$, $n=3$); C: 典型的小肠类器官代表图, 中心为类肠腔区域, 周围为类隐窝区域($\times 200$); D: 小肠隐窝6 d成类器官比率定量($n=3$); E: 小肠类器官6 d分化类隐窝区域数定量; F: 大肠隐窝6 d成类器官比率定量。

图2 肠道3D类器官培养及形态分析

Figure 2 3D-culture and morphological analysis of intestinal organoids



A: 野生组与11 β -HSD1敲除组小肠原代6 d类器官干细胞免疫荧光染色($\times 200$)及定量分析($n=3$); B: 野生组与11 β -HSD1敲除组小肠原代6 d类器官潘氏细胞免疫荧光染色($\times 200$)及定量分析($n=3$)。红色荧光:Lgr5/Lysozyme; 蓝色荧光:DAPI。

图3 小肠类器官干细胞和潘氏细胞免疫荧光染色定量分析

Figure 3 Immunofluorescence staining and quantifications of stem cells and Paneth cells from the small intestinal organoids

[2] Chapman K, Holmes M, Seckl J. 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenases: intracellular gate-keepers of tissue glucocorticoid action[J]. *Physiol Rev*, 2013, 93(3):1139-1206

[3] 杨洁,童佩,奚玲等. 11 β /HSD1与糖脂代谢异常的相关关系研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(4):464-469

[4] Hughes KA, Webster SP, Walker BR. 11-Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β -HSD1) inhibitors in Type 2 diabetes mellitus and obesity[J]. *Exp Opin Investigational Drugs*, 2008, 17(4):481-496

[5] Anderson A, Walker BR. 11 β -HSD1 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes and cardiovascular disease[J]. *Drugs*, 2013, 73(13):1385-1393

[6] Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, et al. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2008 [J]. *JAMA*, 2010, 303(3):235-241

[7] Luo H, Jiang M, Lian G, et al. AIDA selectively mediates downregulation of fat synthesis enzymes by ERAD to retard intestinal fat absorption and prevent obesity[J]. *Cell Metab*, 2018, 27(4):843-853

[8] Hiroyuki Miyoshi, Thaddeus S. Stappenbeck. In vitro expansion and genetic modification of gastrointestinal stem cells in spheroid culture [J]. *Nature Protocols*, 2013, 8(12):2471-2482

[9] Yilmaz ÖH, Katajisto P, Lamming, et al. mTORC1 in the Paneth cell niche couples intestinal stem-cell function to calorie intake[J]. *Nature*, 2012, 486(7404):490-495

[10] Nick Barker, Johan H van Es, Jeroen Kuipers, et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5 [J]. *Nature*, 2007, 449(7165):1003-1007

[11] Barker N. Adult intestinal stem cells:critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(1):19-33

[12] McCracken KW, Catá EM, Crawford CM, et al. Modelling human development and disease in pluripotent stem-cell-derived gastric organoids [J]. *Nature*, 2014, 516(7531):400-404

[13] VanDussen KL, Marinshaw JM, Shaikh N, et al. Development of an enhanced human gastrointestinal epithelial culture system to facilitate patient-based assays [J]. *Gut*, 2015, 64(6):911-920

[14] Alonso S, Yilmaz ÖH. Nutritional regulation of intestinal stem cells[J]. *Annu Rev Nutri*, 2018, 38:273-301

[15] Sato T, van Es JH, Snippert HJ, et al. Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts [J]. *Nature*, 2011, 469(7330):415-419

[16] Duparc T, Plovier H, Marrachelli VG, et al. Hepatocyte MyD88 affects bile acids, gut microbiota and metabolome contributing to regulate glucose and lipid metabolism [J]. *Gut*, 2017, 66(4):620-632

[17] Clevers HC, Bevins CL. Paneth cells: maestros of the small intestinal crypts [J]. *Annu Rev Physiol*, 2013, 75:289-311

[18] Igarashi M, Guarente L. mTORC1 and SIRT1 cooperate to foster expansion of gut adult stem cells during calorie restriction [J]. *Cell*, 2016, 166(2):436-450

[收稿日期] 2018-12-13

