

# 鸡小肠类器官体外培养体系的优化

李静, 王丽娅, 马丁允, 李森阳, 李娟锋, 孟庆大, 李俊强, 菅复春\*

河南农业大学 动物医学院, 河南 郑州 450002

李静, 王丽娅, 马丁允, 李森阳, 李娟锋, 孟庆大, 李俊强, 菅复春. 鸡小肠类器官体外培养体系的优化[J]. 生物工程学报, 2024, 40(12): 4645-4659.

LI Jing, WANG Liya, MA Dingyun, LI Senyang, LI Juanfeng, MENG Qingda, LI Junqiang, JIAN Fuchun. Optimization of the *in vitro* culture system for chicken small intestinal organoids[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(12): 4645-4659.

**摘要:** 为建立稳定的鸡小肠三维(three-dimensional, 3D)类器官体外培养平台, 本研究从18胚龄的AA肉鸡小肠中收集隐窝细胞, 在L-WRN条件培养基的基础上, 通过调节烟酰胺、N-乙酰半胱氨酸、LY2157299、CHIR99021、Jagged-1、FGF等细胞因子的配比, 对鸡小肠类器官培养条件进行优化, 成功筛选出适合鸡小肠类器官长期稳定生长的培养基。优化结果显示, 添加了1.5  $\mu\text{mol/L}$  CHIR99021后, 类器官的形成效率和类器官直径显著提高; 添加0.5  $\mu\text{mol/L}$  Jagged-1时, 类器官出现少量芽样组织; 添加50 ng/mL FGF-2后, 类器官出芽率显著提高。鸡小肠器官培养基中添加1.5  $\mu\text{mol/L}$  CHIR99021、0.5  $\mu\text{mol/L}$  Jagged-1和50 ng/mL FGF-2能够起到协同作用, 提高类器官的形成效率及增殖分化速度, 细胞干性的维持效果显著提高。采用HE染色、透射电镜、实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction, RT-qPCR)、间接免疫荧光和免疫组化方法对鸡小肠类器官进行形态学、含有的细胞类型和体外培养特性进行研究。结果表明, 体外培养的鸡小肠3D类器官与鸡肠道组织在形态学上保持一致, 并含有各种分化的上皮细胞。综上所述, 本研究成功建立了鸡小肠类器官培养平台, 为后续鸡肠道生理、病理、宿主-病原体相互作用机制和药物研究提供了新方法。

**关键词:** 小肠; 隐窝; 肠干细胞; 鸡小肠类器官

资助项目: 河南省重点研发专项(23111111600); 国家重点研发计划(2023YFD1801200); 国家肉羊产业技术体系(CARS-38)  
This work was supported by the Henan Province Key Research and Development Project (23111111600), the National Key Research and Development Project (2023YFD1801200) and the National Meat Sheep Industry Technology System (CARS-38).

\*Corresponding author. E-mail: jfchun2008@163.com

Received: 2024-04-17; Accepted: 2024-06-28

# Optimization of the *in vitro* culture system for chicken small intestinal organoids

LI Jing, WANG Liya, MA Dingyun, LI Senyang, LI Juanfeng, MENG Qingda, LI Junqiang, JIAN Fuchun\*

College of Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan, China

**Abstract:** In order to establish a stable *in vitro* culture platform for chicken small intestine three-dimensional (3D) organoids, in this study, crypt cells were collected from the small intestine of 18-day-old embryos of AA broilers. On the basis of the L-WRN conditioned medium, we optimized the culture conditions of chicken small intestinal organoids by adjusting the proportions of nicotinamide, N-acetylcysteine, LY2157299, CHIR99021, Jagged-1, FGF, and other cytokines to select the medium suitable for the long-term stable growth of the organoids. The optimization results showed that the addition of 1.5  $\mu\text{mol/L}$  CHIR99021 significantly improved the organoid formation efficiency and organoid diameter. When 0.5  $\mu\text{mol/L}$  Jagged-1 was added, a small amount of bud-like tissue appeared in organoids. After the addition of 50 ng/mL FGF-2, the rate of organoid germination was significantly increased. The 1.5  $\mu\text{mol/L}$  CHIR99021, 0.5  $\mu\text{mol/L}$  Jagged-1, and 50 ng/mL FGF-2 added in the medium can cooperate with each other to improve the formation and speed up the proliferation and differentiation of organoids, while improving the stemness maintenance of cells. The morphology, cell types, and culture characteristics of chicken small intestinal organoids were studied by HE staining, transmission electron microscopy, reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR), indirect immunofluorescence, and immunohistochemistry. The results showed that the 3D organoids of the chicken small intestine cultured *in vitro* were morphologically consistent with the chicken intestinal tissue and contained differentiated epithelial cells. In summary, we successfully established an *in vitro* culture system for chicken small intestinal organoids, providing a new method for the subsequent research on chicken intestinal physiology, pathology, and host-pathogen interaction mechanism and the development of relevant drugs.

**Keywords:** small intestine; crypt; intestinal stem cell; chicken small intestinal organoids

肠道是机体接触各种食物、营养物质、药物、代谢物和病原菌的主要部位<sup>[1]</sup>, 因此肠道内稳态对维持动物健康至关重要。肠上皮是由位于黏膜表面的单层细胞极化形成的, 不仅有助于食物消化和营养吸收, 其物理免疫屏障还可以有效抵御有害物质的侵入<sup>[2]</sup>。肠上皮细胞的这种双重功能是由专门负责营养吸收(肠上皮细胞)、激素分泌(肠内分泌细胞)、抗菌肽分泌(潘氏细胞)、抗寄

生虫免疫(Tuft 细胞)和黏液分泌(杯状细胞)等分化上皮细胞的协调作用来实现的<sup>[3]</sup>。

以往用于肠道体外研究的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细胞系为基础的细胞模型。以肠道组织为基础的模型(尤斯灌流室、离体肠灌注等)重复性和稳定性较差, 需要大量动物, 不仅增加实验成本, 也不符合动物福利的减少、替代和优化的“3R”

(Replacement, Reduction, Refinement)原则。以 Caco-2 等肿瘤细胞系为基础的肠道上皮细胞系,虽然能够克服部分离体动物组织的缺陷,但是其组成单一,无法重现原始肠道各种细胞之间和细胞基质之间的相互作用<sup>[4]</sup>。目前亟须建立一种高效、稳定的肠道体外培养模型。

随着肠道干细胞(intestinal stem cells, ISCs)研究的快速发展,出现了一种新的体外研究组织模型,被称为肠道类器官。肠道类器官不仅能重现原始肠道组织的复杂结构,还可以模拟肠道的生理环境,是目前进行肠道体外研究较精准的模式。如今,小鼠和人肠道类器官逐渐成为一种研究肠道的优选方案。小鼠和人肠道类器官需要在含有 3 种基础生长因子 EGF、Noggin 和 R-spondin 1 的培养基(即 ENR 培养基)中进行培养<sup>[5]</sup>。此外,转化生长因子- $\beta$  受体 I 型激酶抑制剂(LY2157299)、GSK-3 $\alpha/\beta$  抑制剂(CHIR99021)、丝裂原活化蛋白激酶 p38 抑制剂(SB202190)、ROCK 抑制剂 Y-27632、Notch 信号激活剂 Jagged-1 和成纤维细胞因子家族 FGF 也被证明有利于肠道类器官的发育<sup>[6-7]</sup>。有研究表明,鸡肠隐窝培养基中 EGF、Noggin、R-spondin 1 的浓度与小鼠隐窝中的浓度相同<sup>[8]</sup>,且 SB202190、CHIR99021 和鸡血清可以促进鸡肠类器官生长<sup>[9]</sup>,但是目前尚不清楚成纤维细胞因子家族 FGF 和 Notch 信号激活剂 Jagged-1 是否能进一步促进鸡类器官生长。本研究以 L-WRN 条件培养基为基础,探究上述细胞因子单独或联合使用对鸡肠隐窝发育的影响,以期作为鸡肠道类器官培养及相关科学研究提供理论参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

18 日龄 AA 鸡胚的小肠组织被用于构建鸡

小肠三维(3D)类器官模型。本试验遵守相关动物福利规定,并获得河南农业大学科学伦理委员会批准(批准号为 HNND2024111901)。

#### 1.1.2 主要试剂

BD Growth Factor Reduced Matrigel Matrix 购自 BD Biosciences 公司,DMEM/F12 培养基购自 Hyclone 公司,advanced DMEM/F12 培养基、B-27 添加剂和 N-2 添加剂购自 Gibco 公司, human R-spondin 1、human Noggin 和 human EGF 购自 Peprotech 公司, Y-27632、SB202190、galunisertib、laduviglusib、Jagged-1、FGF2、FGF4 和 FGF10 购自 MCE 公司, Gentle Cell Dissociation Reagent 购自 STEMCELL 公司, Organoid Recovery Solution 购自 bioGenous 公司,类器官冻存液购自上海捷方凯瑞生物技术有限公司,抗肠组织一抗(F-actin、villin、ZO-1、E-cadherin、Ki67、ChgA、MUC2、LYZ 和二抗(CY3 标记山羊抗兔 IgG、CY3 标记山羊抗小鼠 IgG)抗体购自武汉赛维尔生物科技有限公司。

#### 1.1.3 主要仪器

CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(赛默飞世尔科技有限公司)、Qtower2.0 荧光定量 PCR 仪(耶拿公司)、正置荧光显微镜(尼康公司)和透射电子显微镜(Hitachi 公司)等。

#### 1.1.4 主要溶液配制

##### (1) L-WNR 培养基的配制

将 10%胎牛血清、DMEM 高糖培养基、1%青霉素/链霉素双抗、0.5 mg/mL G418 和 0.5 mg/mL 潮霉素 B 按比例混匀,4 °C 保存备用。

##### (2) 组织和隐窝清洗液的配制

1%/5%组织清洗液的配制:在 PBS 中分别添加 1%/5%的环丙沙星、两性霉素 B、青霉素/链霉素双抗和庆大霉素溶液,经 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤后,4 °C 保存备用。

### (3) 鸡小肠隐窝分离液的制备

将 150  $\mu\text{L}$  0.5 mol/L EDTA 溶液置于 30 mL Hanks' 溶液中, 混合均匀, 经 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤, 即可得到含 2.5 mmol/L EDTA 的肠隐窝分离液, 置于 4  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### (4) L-WNR 条件培养基的制备

将  $2 \times 10^7$  个 L-WRN 细胞置于 T75 培养瓶中培养, 待细胞完全长满 T75 培养瓶贴壁融合为止, 弃去旧培养基, 加入 20 mL L-WRN 培养基, 24 h 后收集上清至 1 L 培养瓶中, 连续收集 3 次, 混匀。置于 50 mL 离心管, 800 $\times g$  室温离心 5 min, 收集上清液, 经 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后, -20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。

(5) 制备鸡小肠类器官完全培养基(chicken small intestinal organoids medium, CIOM)

CIOM 0 号培养基成分组成如下: 50% L-WRN 条件培养基和 50% DMEM/F12 基础培养基(含 10% FBS) 1:1 混匀后, 添加 1 $\times$ B-27、1 $\times$ N-2 添加剂、1 mmol/L L-谷氨酰胺、10 mmol/L HEPES、1%青霉素/链霉素、50 ng/mL human EGF、100 ng/mL human Noggin、0.5  $\mu\text{mol/L}$  galunisertib (LY2157299)、10  $\mu\text{mol/L}$  SB202190、0.25%鸡血清和 5  $\mu\text{mol/L}$  Y-27632 (只在培养的前 2 天使用)。

CIOM 1 号培养基: 在 CIOM 0 号培养基的基础上添加 10 mmol/L 的烟酰胺和 500 ng/mL human R-spondin 1。

CIOM 2 号培养基: 在 CIOM 1 号培养基的基础上添加 1 mmol/L 的 N-乙酰半胱氨酸。

CIOM 3 号培养基: 在 CIOM 2 号培养基的基础上添加 3  $\mu\text{mol/L}$  的 CHIR99021。

CIOM 7 号培养基: 在 CIOM 0 号培养基的基础上添加 250 ng/mL 的 PGE<sub>2</sub>, 去除 100 ng/mL human Noggin 和 500 ng/mL human R-spondin 1。

CIOM 9 号培养基: 在 CIOM 3 号培养基的

基础上添加 1  $\mu\text{mol/L}$  的 Jagged-1, 除去 1 mmol/L 的 N-乙酰半胱氨酸。

CIOM 10 号培养基: 在 CIOM 9 号培养基的基础上添加 250 ng/mL 的 PGE<sub>2</sub>。

CIOM 11 号培养基: 改变 50% DMEM/F12 (含 10% FBS) 基础培养基的添加为 50% advanced DMEM/F12 (含 10% FBS)。

CIOM 12 号培养基: 相较于 CIOM 0 号培养基, 不添加 Y-27632。

CIOM 9.1 号培养基: 在 CIOM 9 号培养基的基础上添加 50 ng/mL FGF2。

CIOM 9.2 号培养基: 在 CIOM 9 号培养基的基础上添加 50 ng/mL FGF4。

CIOM 9.3 号培养基: 在 CIOM 9 号培养基的基础上添加 50 ng/mL FGF10。

CIOM 9.4 号培养基: 在 CIOM 9 号培养基的基础上添加 50 ng/mL FGF4 和 50 ng/mL FGF10。

CIOM 9.5 号培养基: 在 CIOM 9 号培养基的基础上添加 50 ng/mL FGF2、50 ng/mL FGF4 和 50 ng/mL FGF10。

## 1.2 方法

### 1.2.1 鸡小肠隐窝细胞的分离

参考 Nash 等<sup>[10]</sup>的隐窝细胞分离方法, 从 18 胚龄的 AA 肉鸡小肠组织分离隐窝干细胞并进行肠类器官培养, 进行相应的优化调整。优化 1: 将清洗液换成含有 5 种抗生素的组织清洗液; 优化 2: 0.2 mg/mL 的胶原酶换成 2.5 mmol/L EDTA 的隐窝分离液; 优化 3: 将大力摇晃分离隐窝改为涡旋振荡 30 s。具体操作步骤如下:

(1) 获取 18 胚龄鸡胚的小肠(小肠前端 10–15 cm)样本, 置于含 1%组织清洗液的 10 cm 培养皿中, 剪开肠道组织, 先用 1%组织清洗液清洗 2 次, 再用 5%组织清洗液清洗 1 次, 随后用 1%组织清洗液清洗 2 次, 取出肠道组织置于

1.5 mL 无菌离心管内。

(2) 将 1.5 mL 无菌离心管内的肠道组织剪碎为 1–2 mm<sup>3</sup> 的碎片, 置于含有 2.5 mmol/L EDTA 隐窝分离液中, 4 °C 消化 30 min。

(3) 将孵育后的肠道组织置于涡旋振荡仪上, 使用最大转速振荡 30 s, 过 70 μm 细胞滤膜后, 收集第一鸡小肠隐窝细胞悬液, 再加入 30 mL D-Hanks 溶液最大转速振荡 30 s, 过 70 μm 细胞滤膜收集第二鸡小肠隐窝细胞悬液。

(4) 采用差速离心法去除单细胞, 即将鸡小肠隐窝细胞悬液先 200×g 离心 5 min, 收集的细胞沉淀加入适量 PBS 后, 转移至 15 mL 离心管中, 50×g 离心 5 min, 最后加入适量的 PBS, 20×g 离心 5 min, 即可收集到干净且密度较高的隐窝细胞。

(5) 用 DMEM/F12 重悬上述隐窝沉淀, 进行隐窝细胞计数。

(6) 采用 CIOM 培养基对鸡小肠隐窝细胞沉淀进行重悬, 再加入未稀释基质胶混合均匀, 两者体积比为 3:1, 得到鸡小肠隐窝细胞悬液, 置于冰上备用。

(7) 对上述鸡小肠细胞悬液进行接种, 先用未稀释基质胶在 24 孔板进行铺胶, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱静置 20–25 min 充分凝固; 再向已铺胶的孔中接种鸡小肠隐窝细胞悬液 50 μL, 每孔 50–80 个隐窝细胞, 细胞培养箱静置 20–25 min; 随后加入 750 μL 预热的 CIOM 培养基进行培养。

(8) 前 4 天每隔 2 d 更换 1 次培养基, 从第 5 天时每隔 1 天更换培养基。

(9) 置于倒置显微镜下观察培养结果, 一般培养 5–7 d 得到分化的鸡小肠类器官, 即完成原代培养。

### 1.2.2 鸡小肠 3D 类器官培养、传代、冻存与复苏

按照上述添加了不同种类细胞因子的 CIOM 培养基进行鸡小肠类器官的优化培养, 培养方法和步骤完全一致。前 4 天每隔 2 d 更换一次培养基, 从第 5 天开始每隔 1 d 更换培养基。鸡小肠类器官每隔 5 d 传代 1 次。采用冻存液冻存鸡肠类器官。

复苏: 取出冻存的类器官, 加入预冷的 DMEM/F12 培养基, 缓慢吹打溶解, 转移至含 10 mL 预冷 DMEM/F12 培养基的 15 mL 离心管中, 300×g 离心 3 min, 此步骤确保最大程度去除冻存液; 弃去上清, 按照 1.2.1 步骤中的(6)和(7)进行类器官的接种和培养。

### 1.2.3 3D 类器官 RNA 提取与反转录

采用 Trizol 法提取小肠 3D 类器官 RNA, 按照 RNA-easy Isolation Reagent 使用说明书 (Vazyme, R701) 的 RNA 提取步骤提取总 RNA, 使用 NanoDrop 分光光度计测定 RNA 浓度。小肠 3D 类器官 RNA 反转录: 按照 HiScript III All-in-one RT SuperMix Perfect for qPCR (Vazyme, R333) 说明书反转录 1 μg 总 RNA。配置好反应体系后置于 PCR 仪器中, 反应程序为: 50 °C 15 min, 85 °C 5 s。反转录得到的 cDNA 置于 -20 °C 保存备用。

### 1.2.4 3D 类器官 Real-time qPCR 检测

参考前人研究<sup>[9,11-12]</sup>设计 RT-qPCR 引物, 引物由上海生工科技有限公司合成, 本研究中鸡肠道类器官使用的引物序列见表 1。

按照 TOYOBO 荧光定量试剂盒 (QPX-201) 说明书进行 Real-time qPCR 试验, 反应程序为: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 15 s, 40 个循环。以鸡的内参基因的 C<sub>t</sub> 值为内参值, 根据公式  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  计算目的基因的相对表达量。

表 1 鸡小肠类器官上皮细胞和紧密连接蛋白相关标记基因 RT-qPCR 引物序列

Table 1 RT-qPCR primer sequence of chicken small intestinal organoid epithelial cells and tight junction protein associated marker gene

| Gene           | Forward primer (5'→3')   | Reverse primer (5'→3')     | Primer bank ID |
|----------------|--------------------------|----------------------------|----------------|
| <i>LGR5</i>    | TCAATACCTGAGCGTGCGTT     | TGTGAGTGTCAAACCTCCAGAC     | XM_425441      |
| <i>MUC2</i>    | CCCTGGAAGTAGAGGTGACTG    | TGACAAGCCATTGAAGGACA       | XM_001234581.3 |
| <i>CHGA</i>    | GCTATCTCCCTTCTGTGACAAATG | TGAGTTCTCTCATTGGCACCTTG    | XM_421330      |
| <i>LYZ</i>     | TGAGTTCTCTCATTGGCACCTTG  | CTCCCATCGGTGTTACGGTT       | NM_205281      |
| <i>SI</i>      | GTACGCTACGCTTGGAGGTT     | TGAAGAGTCACATCCATCGCAT     | XM_015291762   |
| <i>MAT2A</i>   | GGGTGTTGGTGCAGGTTTCCTA   | TTCGCTCTTCTGCGACGTTT       | XM_025142868.1 |
| <i>β-actin</i> | CAACACAGTGCTGTCTGGTGGTAC | CTCCTGCTTGCTGATCCACATCTG   | XM_027015741.1 |
| <i>gapdh</i>   | TGTGACTTCAATGGTGACAGC    | GCTATATCCAAACTCATTGTCATACC | NM_204305      |
| <i>Tff2</i>    | GCTGTAGCCCTCATCAGCTC     | TGTGACTTCAATGGTGACAGC      | XM_416743      |
| <i>GAPDH</i>   | CACGCCATCACTATCTTC       | GACTCCACAACATACTCAG        | NM_204305.1    |
| <i>CLDN1</i>   | GTGTGTTTGTGCTGTGA        | ACTCTGTTGCCATACCAT         | NM_001013611.2 |
| <i>CLDN3</i>   | GTCATCTTCCTGCTCTCC       | AGCGGGTGTAGAAATCC          | NM_204202.1    |
| <i>OCLN</i>    | CCAGCGGTTACTACTACA       | CAGGATGACGATGAGGAA         | NM_205128.1    |
| <i>ZO-1</i>    | ATGAATGAAGGATGGTATGG     | GATGTATGTCTGCTGTCTG        | XM_015278981.2 |

### 1.2.5 鸡小肠组织和 3D 类器官的石蜡包埋与固定、HE 染色、过碘酸雪夫染色

取 18 胚龄的 AA 肉鸡小肠组织前 2–3 cm 和原代培养 5 d 的鸡小肠类器官置于 4% 多聚甲醛，室温固定。将收集的样品送至武汉赛维尔生物科技有限公司进行石蜡包埋、固定和切片(厚度 4 μm)制备。

### 1.2.6 鸡小肠 3D 类器官间接免疫荧光、透射电镜检测

采用上述 1.2.5 制备的鸡小肠 3D 类器官石蜡切片进行间接免疫荧光试验。透射电镜样品固定：收集原代培养 5 d 的鸡小肠类器官，加入电镜固定液，4 °C 避光保存。将收集的样品送至武汉赛维尔生物科技有限公司进行透射电镜样品(80 nm 超薄切片)的制备。

### 1.2.7 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0.2 和 SPSS 26 对试验结果进行统计学差异分析。ns: Not significant; #:  $P < 0.05$ ; #:  $P < 0.01$ ; ###:  $P < 0.001$ ; ####:  $P < 0.0001$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 鸡小肠隐窝细胞分离结果

通过本试验隐窝分离方法可得到大量干

净的隐窝细胞(图 1)，用于后续鸡小肠类器官的培养。

### 2.2 鸡小肠 3D 类器官培养基的筛选结果

由图 2 可知，使用不含 R-spondin 1 的 CIOM 0 培养基时，鸡小肠类器官的成长比较缓慢，形成率较低，5–7 d 才出芽，第 11 天可进行传代。说明类器官的生长缓慢，R-spondin 1 具有维持干细胞快速更新的能力。

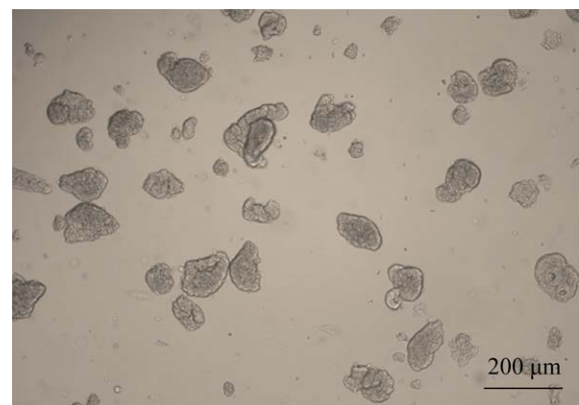


图 1 分离纯化后的隐窝细胞 标尺=200 μm

Figure 1 Isolated and purified crypt cells. Scale bar=200 μm.



基于以上结果,进行鸡小肠类器官培养基的优化,优化结果见图3和图4。计算优化培养基原代培养7 d时类器官的形成数量、类器官直径和出芽情况并进行比对,发现CIOM 9培养基培养的小肠类器官形成数量、直径和出芽情况效果最好,但出芽率低于50%,出芽数量较少。参考人肠道类器官培养基组成成分进行鸡

小肠类器官培养基的优化<sup>[13-19]</sup>,在培养时分别加入不同配比的FGF2、FGF4和FGF10,发现添加FGF2的CIOM 9.1培养基,类器官出芽得到显著改善(图3,  $P<0.0001$ ),与CIOM 0培养基相比,类器官的出芽率和类器官形成数量存在显著性差异( $P<0.01$ )。因此使用CIOM 9.1培养基进行后续实验。

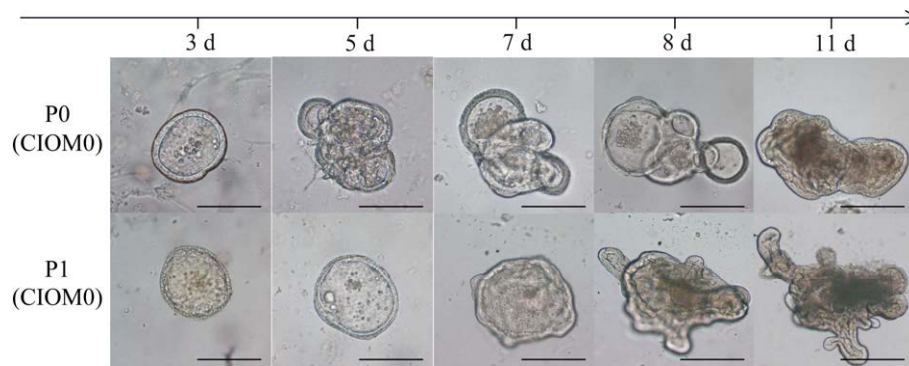


图2 CIOM 0培养基原代(P0代)和P1代小肠类器官不同时间段培养的生长状态图 标尺=200 μm

Figure 2 Growth state of intestinal organoids cultured in primary CIOM 0 culture medium (P0 generation) and P1 generation at different time periods. Scale bar=200 μm.

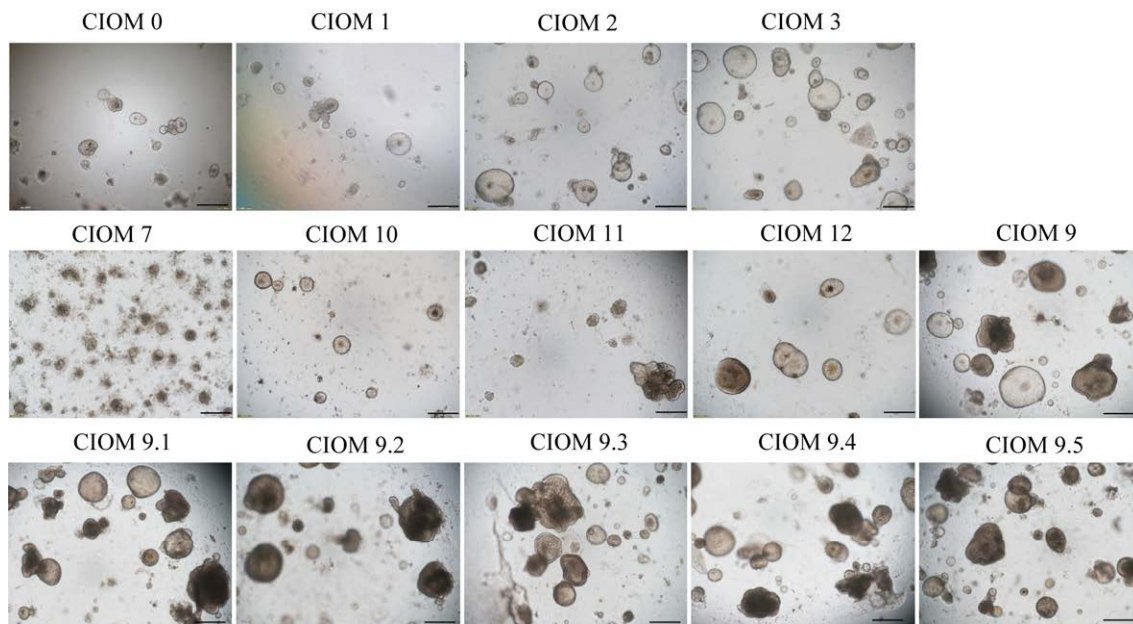


图3 不同CIOM培养基培养至第7天的类器官 标尺=500 μm.

Figure 3 Organoids cultured on different CIOM media to the 7th day. Scale bar=500 μm.

采用 CIOM 9.1 培养基培养鸡隐窝细胞,可连续培养 35 d,传 6 代的鸡小肠 3D 类器官(5 d 传代 1 次),仍保持良好的细胞干性和分化能力(图 5)。原代培养 5 d 的鸡小肠类器官形态各异(图 6),有球形、片状、菜花状、扇形以及梭形等,并且形成的鸡小肠类器官较大,直径 100–2 000  $\mu\text{m}$  不等。综上所述,使用本研究中的鸡小肠类器官培养基可以成功进行鸡小肠类器官的长期稳定培养。

### 2.3 鸡小肠 3D 类器官与鸡肠道组织在形态学上保持一致

对鸡小肠 3D 类器官和原始小肠组织进行形态学观察,HE 染色结果表明,鸡小肠 3D 类器官可以明显观察到类似隐窝-绒毛结构等,与原始小肠组织的形态相似(图 7)。

鸡小肠 3D 类器官透射电镜结果显示,鸡小肠 3D 类器官是由紧密连接的上皮细胞组成(图 8A、8B),并且可以观察到细胞间的紧密连

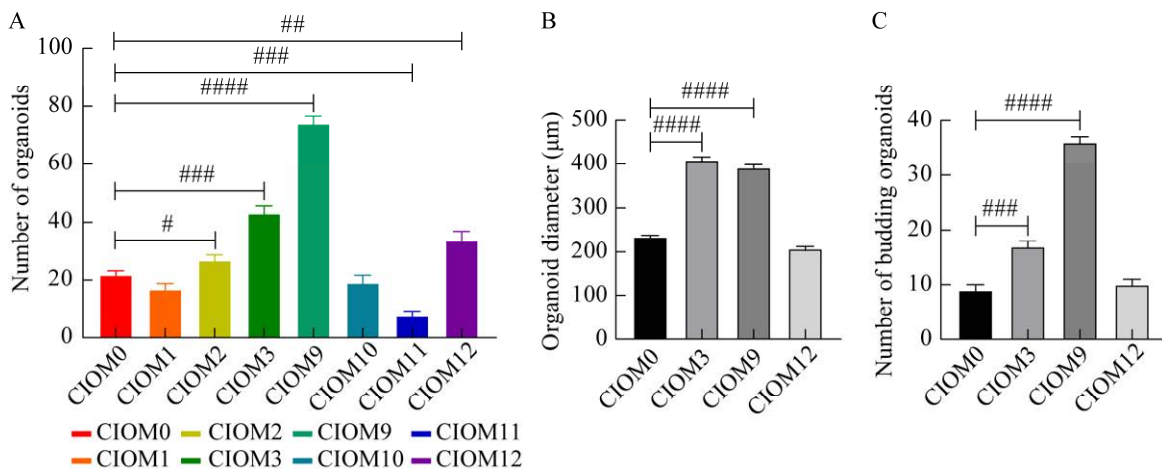


图 4 不同 CIOM 培养基培养第 7 天的鸡小肠类器官数量(A)、类器官直径(B)和出芽情况(C) #:  $P < 0.05$ ; #:  $P < 0.01$ ; #:  $P < 0.001$ ; ####:  $P < 0.0001$

Figure 4 The number (A), diameter (B) and germination (C) of small intestinal organoids of chickens cultured with different CIOM media on day 7. #:  $P < 0.05$ ; #:  $P < 0.01$ ; #:  $P < 0.001$ ; ####:  $P < 0.0001$ .

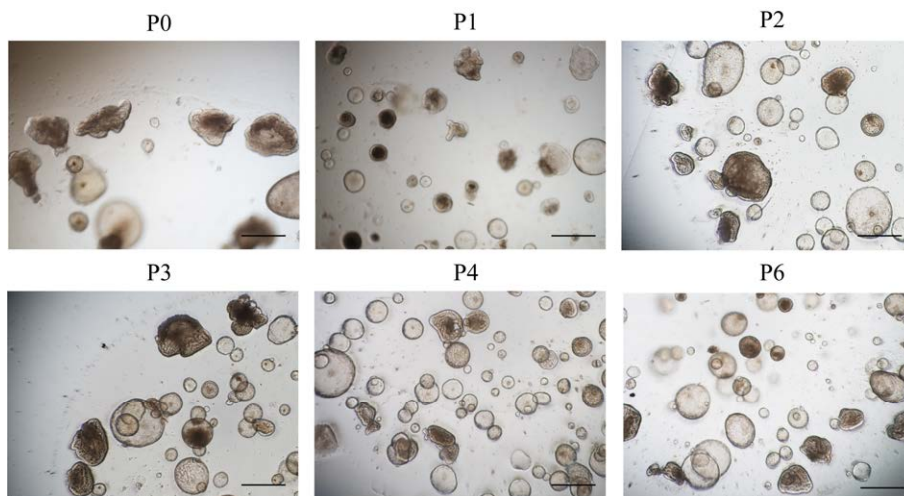


图 5 CIOM 9.1 类器官培养基的传代培养 标尺=500  $\mu\text{m}$

Figure 5 Passage culture of CIOM 9.1 organoid medium. Scale bar=500  $\mu\text{m}$ .



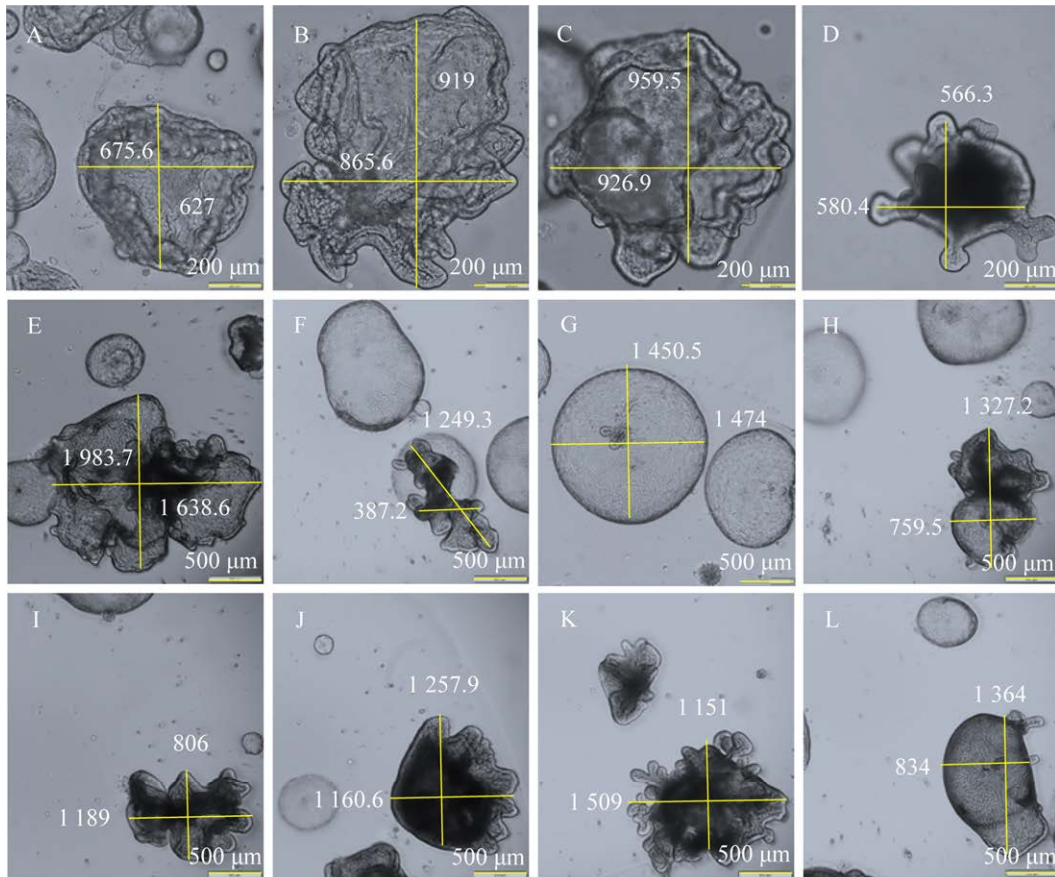


图 6 CIOM 9.1 培养基原代培养第 5 天的类器官形态 黄色线条代表类器官的直径, 单位:  $\mu\text{m}$ 。

Figure 6 Organoid morphology on the 5th day of primary culture in CIOM 9.1 medium. The yellow lines represent the diameter of the organoids, unit:  $\mu\text{m}$ .

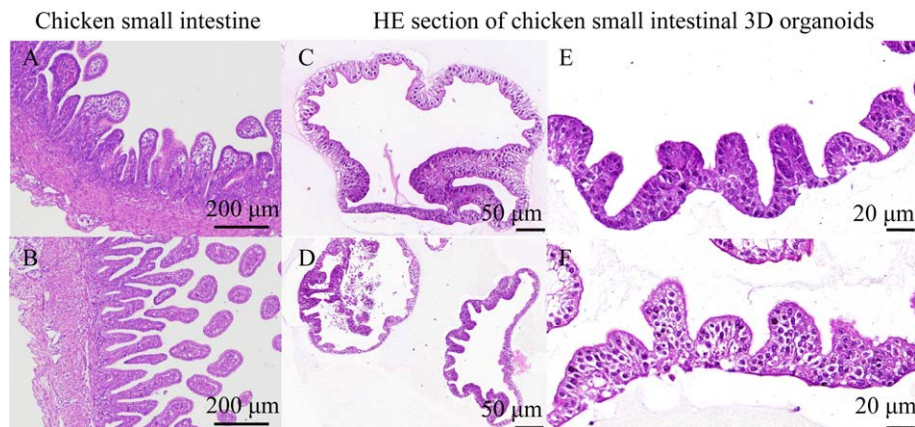


图 7 鸡胚小肠组织和 3D 类器官组织 HE 染色 A-B: 鸡小肠 HE 切片. C-F: 鸡小肠 3D 类器官切片

Figure 7 HE staining of primary tissues and 3D organoids of chicken embryos' small intestine. A-B: Chicken small intestine HE section. C-F: Chicken small intestine 3D organoid section.

接和桥粒结构(图 8C), 以及完整的上皮细胞内富含高尔基体、线粒体、细胞核、内质网等各种细胞器, 在上皮细胞顶端可见大量排列整齐的微绒毛(图 8A)。

## 2.4 鸡小肠 3D 类器官的表征

为了表征鸡小肠 3D 类器官上皮细胞的多样性, 进行各种细胞类型标记基因的表达检测, 将原代培养 7 d 的鸡小肠 3D 类器官进行间接免疫荧光染色和爱尔新蓝-过碘酸-雪夫染色(Alcian Blue-Periodic Acid-Schiff, AB-PAS)(图 9 和图 10)。

结果显示, 骨架蛋白 F-actin 阳性, 表明细胞

富含 F-肌动蛋白; 顶端刷缘蛋白(villin)的阳性, 表明吸收肠上皮细胞的存在; F-actin 和 villin 表达位点被普遍确认是识别基底向外和顶端向外类器官的结构差异。本研究表明, 鸡小肠类器官是顶端向内的结构。肠上皮细胞间起黏附作用的 E-cadherin 和紧密连接的 ZO-1 蛋白均呈阳性结果, 两者可以一起形成细胞间连接的结构, 共同维持细胞间连接的稳定性和完整性, 从而保持细胞的形态和功能。小肠组织和 3D 类器官的过碘雪夫酸染色均呈阳性(图 10), 说明构建的 3D 类器官可以产生黏液蛋白, 表明有杯状细胞的存在。

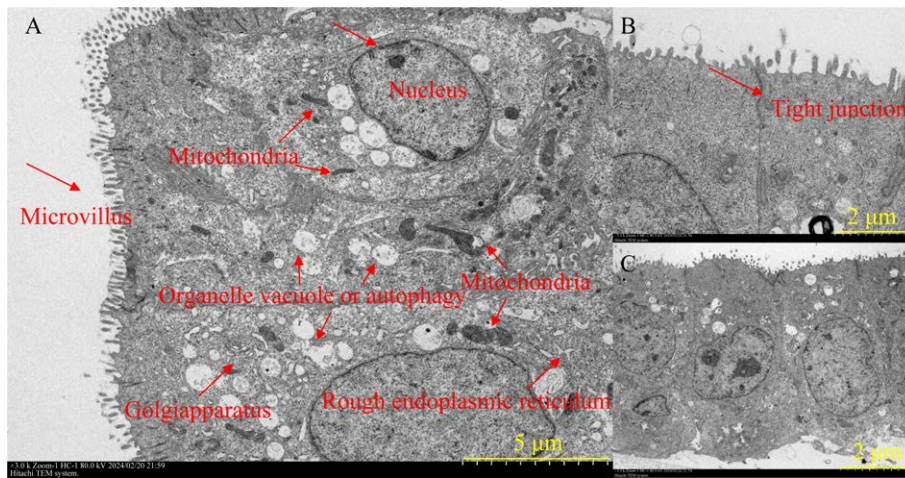


图 8 原代培养 5 d 的鸡小肠 3D 类器官透射电镜图片 A: 上皮细胞微绒毛和细胞器. B: 上皮细胞紧密连接. C: 排列整齐的鸡小肠类器官上皮细胞

Figure 8 Transmission electron microscopy images of 3D organoids in chicken small intestine after 5 days of primary culture. A: Epithelial microvilli and organelles. B: Epithelial cell tight junction. C: Chicken small intestinal organoid epithelial cells arranged neatly.

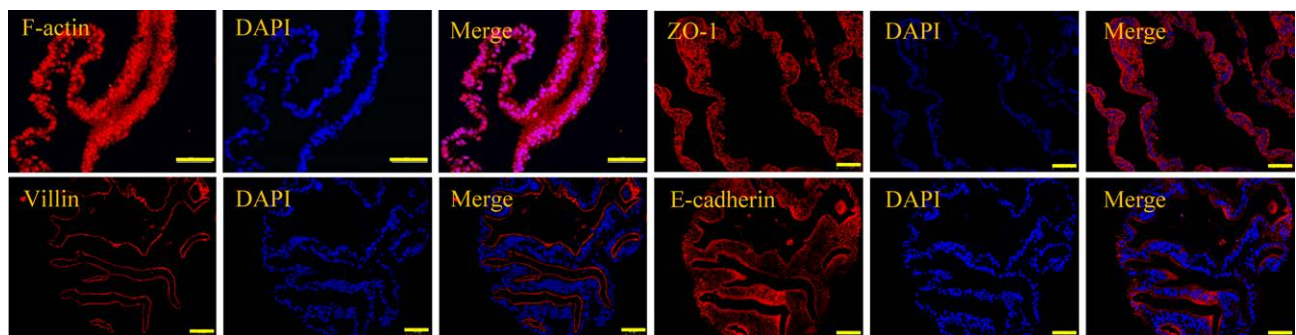


图 9 鸡小肠类器官的表征 标尺=50 μm

Figure 9 Characterization of small intestinal organoids of chicken. Scale bar=50 μm.



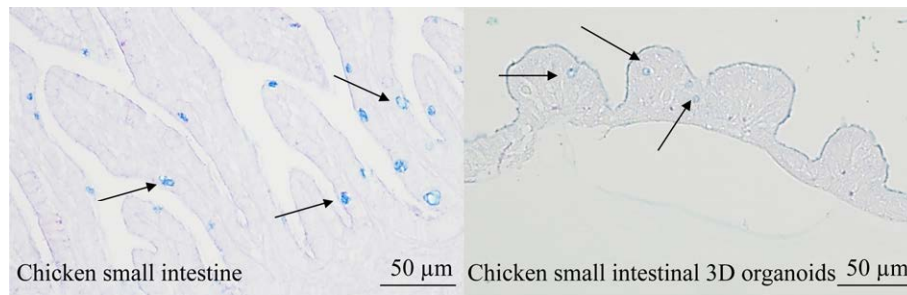


图 10 肠道组织和肠 3D 类器官 AB-PAS 染色 黑色箭头所指为杯状细胞

Figure 10 AB-PAS staining of intestinal tissue and intestinal 3D organoids. The black arrow indicates goblet cells.

### 2.5 鸡小肠 3D 类器官体外培养的遗传特性

采用 RT-qPCR 方法对体外 P0 代和 P4 代鸡小肠 3D 类器官的遗传特性进行研究。P4 代与 P0 代相比, 小肠 3D 类器官肠干细胞标记基因 *LGR5* 和祖细胞标记基因 *Tff2* mRNA 表达水平显著升高, 吸收性肠上皮细胞 *SI* 和肠内分泌细胞标记基因 *CHGA* mRNA 表达水平显著降低, 潘氏细胞标记基因 *LYZ*、紧密连接相关蛋白 (*ZO-1*、*OCLN*、*CLDN1* 和 *CLDN3*) 基因表达量差异无统计学意义(图 11)。这可能与小肠类器官的分化程度有关。

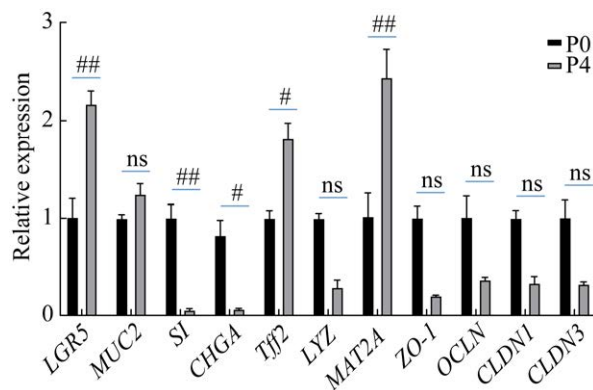


图 11 P0 代和 P4 代鸡小肠 3D 类器官不同上皮细胞和紧密连接相关基因的相对表达量

Figure 11 Relative expression levels of different epithelial cells and closely connected related genes in 3D organoids of small intestine in P0 and P4 generations. ns: Not significant; #:  $P < 0.05$ ; ##:  $P < 0.01$ .

### 3 讨论与结论

目前, 关于禽肠道类器官的报道较少。与哺乳类动物的肠类器官不同, 禽肠类器官培养过程中较少出现出芽样的隐窝。目前, 鸡小肠类器官培养条件尚未统一, 在培养过程中原代不易培养成功且生长缓慢, 出芽率较低。而常规添加的各种生长因子价格昂贵, 并且各种生长因子在不同批次之间的效果也不一致, 导致鸡小肠类器官的培养效果差异巨大、稳定性差。

肠类器官培养系统主要是由 WNT 和 Notch 两大主信号通路调控的。本研究测量了各种细胞因子和化合物不同配比联合使用对鸡小肠类器官的平均形成数量、类器官直径和出芽情况的影响。结果表明, 当使用不含 R-spondin 1 的培养基时, 鸡小肠类器官的生长速度缓慢、形成率较低、出芽时间长。说明鸡小肠类器官的存活和快速生长离不开 WNT 激动剂 R-spondin 1, 但不含 R-spondin 1 时鸡小肠类器官也能生长, 这种情况只在鸡肠道类器官出现, 具体原因仍待进一步研究。基于此, 在培养基中添加 R-spondin 1、烟酰胺和 N-乙酰半胱氨酸时, 发现鸡小肠类器官形成效率和出芽率基本无变化。在 L-WRN 条件培养基的制备和稀释时, 有些添加的基础培养基为 advanced DMEM/F12 或 DMEM/F12, 本研究结果表明, 使用 DMEM/F12 培养基进行鸡小肠类器官的培养

效果较好。Pierzchalska 等<sup>[20]</sup>研究发现, 添加 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  前列腺素  $\text{E}_2$  ( $\text{PGE}_2$ ) 可替代 WRN 培养体系中的 R-spondin 1 和 Noggin 而不影响类器官球的生长。但本研究添加 250  $\text{ng}/\text{mL}$   $\text{PGE}_2$  时, 类器官全部死亡, 可能是由于本研究添加的  $\text{PGE}_2$  浓度较低。进一步优化培养基成分, 在此培养基中添加 1.5  $\mu\text{mol}/\text{L}$  的 GSK-3 $\alpha/\beta$  抑制剂 CHIR99021 后, 类器官的形成效率和大小明显增加了 1 倍左右, 这与 Zhao 等<sup>[21]</sup>研究的添加 3  $\mu\text{mol}/\text{L}$  CHIR99021 可以显著增加鸡肠类器官的平均大小一致。但研究中发现添加 1.5  $\mu\text{mol}/\text{L}$  CHIR99021 就可以满足需要, 进一步降低了类器官的培养成本。

此外有研究表明, CHIR99021 在小鼠类器官中可促进干细胞中的自我更新<sup>[22-23]</sup>; 在海兰鸡中, CHIR 可上调 3 周龄海兰鸡空肠隐窝类器官中 *Olfm4* 和 *Lgr5* (干细胞生物标志物) mRNA 的表达水平<sup>[8]</sup>; 相反, 也有研究发现 CHIR99021 处理增加了鸡肠上皮细胞的分化, 减少了潘氏细胞和杯状细胞的分化<sup>[9]</sup>。目前尚不清楚为何 CHIR99021 对鸡和小鼠的肠道类器官发育产生的影响相反。一般来说, 类器官直径与干细胞增殖有关。采用目前的培养基培养鸡小肠隐窝时, 类器官几乎不出芽, 当在培养基中添加 0.5  $\mu\text{mol}/\text{L}$  Jagged-1, 不添加 N-乙酰半胱氨酸时, 鸡小肠类器官的出芽情况出现好转, 与原始不添加 R-spondin 1 的培养基相比, 类器官的形成效率和出芽率增加了 3 倍, 但出芽率仍不足 50%。Jagged-1 作为 Notch 信号的配体, 通过旁分泌信号在肠干细胞再生中发挥重要作用<sup>[24]</sup>。有研究显示, Jagged-1 在培养早期对小鼠 ISC 的体外扩增至关重要<sup>[25]</sup>。在隐窝培养基中添加 1  $\mu\text{mol}/\text{L}$  Jagged-1 可以促进猪隐窝细胞的良好生长<sup>[26]</sup>。在本研究中, 添加成纤维细胞生长因子后, 发现鸡肠类器官的出芽率有所提高, 且

出现大量芽样组织。当分别添加 FGF2、FGF4、FGF10 或联合添加时, 鸡小肠类器官形成效率和出芽率无明显变化, 基于经济考虑, 将添加 50  $\text{ng}/\text{mL}$  FGF2 作为本研究的最优培养基。

已知 Wnt 和 FGF 信号明确内胚层走向中/后肠命运(后分化)。前人对小鼠和鸡的研究表明, Wnt 和 FGF 信号通路是抑制前发育和促进后内胚层形成至中肠和后肠的必要条件<sup>[13-14]</sup>。在后肠发育机制研究中, 发现 FGF4 促进中胚层扩张和形态发生<sup>[15]</sup>。Ameri 等<sup>[16]</sup>探讨 FGF2 在小鼠和人类前肠内胚层形成中的作用, 发现 FGF2 在人类前肠内胚层模式中的功能是保守的。然而, 高浓度 FGF2 对前肠-中肠的后分化活性表明, FGF4 在低等脊椎动物中的作用可能在进化过程中被 FGF2 所取代, 这种差异可能是由于之前的小鼠和鸡研究只检测了低 FGF2 浓度(1-10  $\text{ng}/\text{mL}$ ) 的原因<sup>[13,17]</sup>。前人研究报道称 FGF10 对于小鼠十二指肠<sup>[18]</sup>和盲肠<sup>[19]</sup>的正常发育至关重要。采用免疫染色法对 FGF10 低形态的分化分析表明, FGF10 对上皮和间质的分化并不关键, 但在隐窝形成中起重要作用<sup>[27]</sup>。而本研究使用的 FGF2 浓度较高, 鸡属于低等动物, 所以添加 FGF2 和 FGF4 后无明显变化, 具体机制仍待进一步探索。

本研究采用 L-WRN 条件培养基, 未添加 Wnt-3A 细胞因子, 添加了更低量的 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路激活剂 CHIR99021 (1.5  $\mu\text{mol}/\text{L}$ )、Y-27632 (5  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) 和 Notch 信号激活剂 Jagged-1 (0.5  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ), 此外还添加了成纤维细胞因子家族的 FGF-2 (50  $\text{ng}/\text{mL}$ ), 不仅大大减少类器官的培养成本, 并且添加的这几种成分能够相互配合起到协同作用, 提高类器官的形成效率、快速增殖和分化, 显著提高细胞干性的维持效果。

本研究对鸡小肠类器官的隐窝分离方法进行改进, 首先采用 5 种抗生素清洗肠道组织,

EDTA 消化肠道组织后, 涡旋振荡仪振荡后收集隐窝细胞, 最后采用差速离心法收集到干净且密度较高的隐窝细胞, 能够减少类器官培养时的污染, 大大提高了鸡小肠类器官样本的成功率。

本研究成功地培养出了鸡小肠隐窝衍生可以出芽的小肠类器官, 并能稳定传代。连续传代 35 d, 3D 类器官肠腔周围独特的隐窝和绒毛结构可以长期保持(传代达到 6 代以上)。通过对鸡小肠 3D 类器官和原始鸡肠组织进行形态学比较可知, HE 切片染色的鸡小肠 3D 类器官可以明显地看到类似的隐窝绒毛样结构, 透射电镜可以看到鸡小肠 3D 类器官是由紧密连接的上皮细胞组成, 可以看到细胞间的紧密连接和桥粒结构、大量排列整齐的微绒毛等, 重现了部分肠道的原始拓扑结构。AB-PAS 染色发现, 鸡小肠 3D 类器官与原始小肠组织一样均呈阳性, 表明构建的小肠类器官可以像肠道一样分泌黏蛋白, 具有抵御病原微生物的作用。本研究首次对顶端向内的鸡小肠 3D 类器官进行 HE 切片染色、透射电镜和 AB-PAS 染色观察。与 Nash 等<sup>[10]</sup>建立的顶端向外的鸡漂浮类器官一样, 均能观察到细胞间的紧密连接和排列整齐的微绒毛; 此外, 通过间接免疫荧光实验在鸡小肠类器官中还发现肠细胞(villin、F-actin)和肠黏附连接的 E-cadherin 和细胞间连接的 ZO-1 蛋白标记物, 表明类器官在 ISCs 分化过程中包含多种细胞类型; 未检测到肠内分泌细胞(*ChgA*)、Paneth 细胞(*LYZ*)、干细胞(*SOX9*)和杯状细胞(*MUC2*)的标记物, 同样也未检测到增殖标志物 *Ki67*, 与 Kang 等<sup>[28]</sup>检测结果一致, 这可能都是因为类器官鉴定中使用了不合适的抗体。本研究采用 RT-qPCR 方法对鸡小肠类器官体外培养特性研究, 进一步证明了鸡小肠类器官与原始肠道组织具有相似的细胞组成, 而且这些性

状可以稳定传代; 结果表明, 随着传代次数的增加, 小肠 3D 类器官干细胞相关标记基因 *LGR5* 和 *Tff2* mRNA 表达水平显著升高, 分化的肠上皮细胞相关标记基因 *SI* 和 *CHGA* mRNA 表达水平显著降低。这种基因水平表达的变化可能与传代过程中类器官的细胞干性和分化程度相关。

综上所述, 本研究以 L-WRN 条件培养基为基础, 通过筛选不同细胞因子单独或联合使用对鸡肠隐窝发育的影响, 成功优化出了适合鸡小肠类器官生长的培养基。构建的鸡小肠 3D 类器官从结构上与体内肠道组织相仿, 具有较接近肠道的生理功能, 为鸡肠道系统的研究提供了有价值的体外模型, 具有一定的应用潜力。

## REFERENCES

- [1] OLAYANJU A, JONES L, GRECO K, GOLDRING CE, ANSARI T. Application of porcine gastrointestinal organoid units as a potential *in vitro* tool for drug discovery and development[J]. *Journal of Applied Toxicology: JAT*, 2019, 39(1): 4-15.
- [2] PETERSON LW, ARTIS D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2014, 14: 141-153.
- [3] PANEK M, GRABACKA M, PIERZCHALSKA M. The formation of intestinal organoids in a hanging drop culture[J]. *Cytotechnology*, 2018, 70(3): 1085-1095.
- [4] PEARCE SC, COIA HG, KARL JP, PANTOJA-FELICIANO IG, ZACHOS NC, RACICOT K. Intestinal *in vitro* and *ex vivo* models to study host-microbiome interactions and acute stressors[J]. *Frontiers in Physiology*, 2018, 9: 1584.
- [5] SATO T, STANGE DE, FERRANTE M, VRIES RGI, van ES JH, van den BRINK S, van HOUTDT WJ, PRONK A, van GORP J, SIERSEMA PD, CLEVERS H. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium[J]. *Gastroenterology*, 2011, 141(5): 1762-1772.

- [6] RING DB, JOHNSON KW, HENRIKSEN EJ, NUSS JM, GOFF D, KINNICK TR, MA ST, REEDER JW, SAMUELS I, SLABIAK T, WAGMAN AS, HAMMOND ME W, HARRISON SD. Selective glycogen synthase kinase 3 inhibitors potentiate insulin activation of glucose transport and utilization *in vitro* and *in vivo*[J]. *Diabetes*, 2003, 52(3): 588-595.
- [7] GÖTTLICHER M, MINUCCI S, ZHU P, KRÄMER OH, SCHIMPF A, GIAVARA S, SLEEMAN JP, COCO FL, NERVI C, PELICCI PG, HEINZEL T. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells[J]. *The EMBO Journal*, 2001, 20(24): 6969-6978.
- [8] LI J, LI J Jr, ZHANG SY, LI RX, LIN X, MI YL, ZHANG CQ. Culture and characterization of chicken small intestinal crypts[J]. *Poultry Science*, 2018, 97(5): 1536-1543.
- [9] WANG YL, HOU QH, WU YQ, XU YW, LIU Y, CHEN J, XU LL, GUO YM, GAO S, YUAN JM. Methionine deficiency and its hydroxy analogue influence chicken intestinal 3-dimensional organoid development[J]. *Animal Nutrition (Zhongguo Xu Mu Shou Yi Xue Hui)*, 2022, 8(1): 38-51.
- [10] NASH TJ, MORRIS KM, MABBOTT NA, VERVELDE L. Inside-out chicken enteroids with leukocyte component as a model to study host-pathogen interactions[J]. *Communications Biology*, 2021, 4: 377.
- [11] HOLTHAUS D, DELGADO-BETANCOURT E, AEBISCHER T, SEEBER F, KLOTZ C. Harmonization of protocols for multi-species organoid platforms to study the intestinal biology of *Toxoplasma gondii* and other protozoan infections[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021, 10: 610368.
- [12] 许笑. 丁酸梭菌改善坏死性肠炎患鸡肠黏膜屏障机制的初步研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学博士学位论文, 2022.  
XU X. Preliminary studies on the roles of *Clostridium butyricum* for ameliorating gut mucosal barrier of broiler chickens with necrotic enteritis[D]. Yangling: Doctoral Dissertation of Northwest A&F University, 2022 (in Chinese)
- [13] WELLS JM, MELTON DA. Early mouse endoderm is patterned by soluble factors from adjacent germ layers[J]. *Development*, 2000, 127(8): 1563-1572.
- [14] DESSIMOZ J, OPOKA R, KORDICH JJ, GRAPIN-BOTTON A, WELLS JM. FGF signaling is necessary for establishing gut tube domains along the anterior-posterior axis *in vivo*[J]. *Mechanisms of Development*, 2006, 123(1): 42-55.
- [15] SPENCE JR, MAYHEW CN, RANKIN SA, KUCHAR MF, VALLANCE JE, TOLLE K, HOSKINS EE, KALINICHENKO VV, WELLS SI, ZORN AM, SHROYER NF, WELLS JM. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue *in vitro*[J]. *Nature*, 2011, 470: 105-109.
- [16] AMERI J, STÅHLBERG A, PEDERSEN J, JOHANSSON JK, JOHANNESSEN MM, ARTNER I, SEMB H. FGF2 specifies hESC-derived definitive endoderm into foregut/midgut cell lineages in a concentration-dependent manner[J]. *Stem Cells*, 2010, 28(1): 45-56.
- [17] KUMAR M, JORDAN N, MELTON D, GRAPIN-BOTTON A. Signals from lateral plate mesoderm instruct endoderm toward a pancreatic fate[J]. *Developmental Biology*, 2003, 259(1): 109-122.
- [18] KANARD RC, FAIRBANKS TJ, de LANGHE SP, SALA FG, del MORAL PM, LOPEZ CA, WARBURTON D, ANDERSON KD, BELLUSCI S, BURNS RC. Fibroblast growth factor-10 serves a regulatory role in duodenal development[J]. *Journal of Pediatric Surgery*, 2005, 40(2): 313-316.
- [19] BURNS RC, FAIRBANKS TJ, SALA F, de LANGHE S, MAILLEUX A, THIERY JP, DICKSON C, ITOH N, WARBURTON D, ANDERSON KD, BELLUSCI S. Requirement for fibroblast growth factor 10 or fibroblast growth factor receptor 2-IIIb signaling for cecal development in mouse[J]. *Developmental Biology*, 2004, 265(1): 61-74.
- [20] PIERZCHALSKA M, GRABACKA M, MICHALIK M, ZYLA K, PIERZCHALSKI P. Prostaglandin E<sub>2</sub> supports growth of chicken embryo intestinal organoids in Matrigel matrix[J]. *BioTechniques*, 2012, 52(5): 307-315.
- [21] ZHAO D, FARNELL MB, KOGUT MH, GENOVESE KJ, CHAPKIN RS, DAVIDSON LA, BERGHMAN LR, FARNELL YZ. From crypts to enteroids: establishment and characterization of avian intestinal organoids[J]. *Poultry Science*, 2022, 101(3): 101642.
- [22] YE SD, TAN L, YANG RQ, FANG B, QU S, SCHULZE EN, SONG HY, YING QL, LI P. Pleiotropy of glycogen synthase kinase-3 inhibition by CHIR99021 promotes self-renewal of embryonic stem



- cells from refractory mouse strains[J]. PLoS One, 2012, 7(4): e35892.
- [23] LINDEBOOM RG, van VOORTHUIJSEN L, OOST KC, RODRÍGUEZ-COLMAN MJ, LUNA-VELEZ MV, FURLAN C, BARAILLE F, JANSEN PW, RIBEIRO A, BURGERING BM, SNIPPERT HJ, VERMEULEN M. Integrative multi-omics analysis of intestinal organoid differentiation[J]. Molecular Systems Biology, 2018, 14(6): e8227.
- [24] VanDUSSEN KL, CARULLI AJ, KEELEY TM, PATEL SR, PUTHOFF BJ, MAGNESS ST, TRAN IT, MAILLARD I, SIEBEL C, KOLTERUD Å, GROSSE AS, GUMUCIO DL, ERNST SA, TSAI YH, DEMPSEY PJ, SAMUELSON LC. Notch signaling modulates proliferation and differentiation of intestinal crypt base columnar stem cells[J]. Development, 2012, 139(3): 488-497.
- [25] WANG FC, SCOVILLE D, HE XC, MAHE MM, BOX A, PERRY JM, SMITH NR, LEI NY, DAVIES PS, FULLER MK, HAUG JS, McCLAIN M, GRACZ AD, DING S, STELZNER M, DUNN JCY, MAGNESS ST, WONG MH, MARTIN MG, HELMRATH M, LI LH. Isolation and characterization of intestinal stem cells based on surface marker combinations and colony-formation assay[J]. Gastroenterology, 2013, 145(2): 383-395.e1-21.
- [26] LI XG, ZHU M, CHEN MX, FAN HB, FU HL, ZHOU JY, ZHAI ZY, GAO CQ, YAN HC, WANG XQ. Acute exposure to deoxynivalenol inhibits porcine enteroid activity *via* suppression of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway[J]. Toxicology Letters, 2019, 305: 19-31.
- [27] SALA FG, CURTIS JL, VELTMAAT JM, del MORAL PM, LE LT, FAIRBANKS TJ, WARBURTON D, FORD H, WANG K, BURNS RC, BELLUSCI S. Fibroblast growth factor 10 is required for survival and proliferation but not differentiation of intestinal epithelial progenitor cells during murine colon development[J]. Developmental Biology, 2006, 299(2): 373-385.
- [28] KANG TH, LEE SI. Establishment of a chicken intestinal organoid culture system to assess deoxynivalenol-induced damage of the intestinal barrier function[J]. Journal of Animal Science and Biotechnology, 2024, 15(1): 30.

(本文责编 郝丽芳)