



配套视频

## 第三章 消化系统类器官的构建与应用

### 一、消化系统与胃的结构和功能

#### (一) 消化系统简介

消化系统 (digestive system) 是人体极为重要的系统, 由消化道和消化腺两大部分组成。消化道包括口腔、咽、食管、胃、小肠和大肠。消化腺有小消化腺和大消化腺两种。小消化腺散在分布于消化管各部的管壁内, 大消化腺有唾液腺、肝脏和胰。消化系统是人体八大系统之一。食物在口腔内, 由牙齿咀嚼和唾液腺分泌的淀粉酶进行初步消化。咀嚼面包时产生的甜味, 正是淀粉酶将淀粉分解为麦芽糖所致。随后, 食物通过吞咽动作经食管进入胃、小肠中, 在小肠中完成营养成分的吸收。

#### (二) 胃的结构与功能

胃呈袋状结构, 上端经贲门连接食管, 下端通过幽门与小肠相连。其生理功能主要包括两方面: ①通过胃腔扩张容纳摄入的食物, 实现暂时储存; ②通过胃酸发挥初级灭菌作用——由胃黏膜壁细胞分泌的强酸性胃液 (pH 0.9 ~ 1.5) 能灭活大部分食源性细菌。但值得注意的是, 幽门螺杆菌等特殊病原体可耐受胃酸环境持续存活。此外, 胃黏膜的规律性蠕动配合胃蛋白酶 (pepsin) 的化学分解作用, 可将食物研磨成粒径小于 2 mm 的食糜, 为后续肠道吸收创造有利条件。

胃壁组织结构由内向外依次分为四层。

(1) 黏膜层: 单层柱状上皮细胞持续分泌碱性黏液, 形成厚度 0.5 ~ 1.5 mm 的黏液 - 碳酸氢盐屏障, 该保护机制可有效阻隔胃酸及胃蛋白酶对胃壁的自我消化。

(2) 黏膜下层: 富含血管网与神经网络, 其中迷走神经末梢通过释放乙酰胆碱直接参与胃酸分泌调节。

(3) 肌层: 由内环行肌 (circular muscle)、外纵行肌 (longitudinal muscle) 两层平滑肌构成, 通过每分钟约 3 次的节律性收缩实现机械性消化。

(4) 浆膜层: 作为胃壁最外层, 由间皮细胞构成保护性被膜。

胃腺是胃黏膜内的微小结构, 是胃的基本功能单位, 由多细胞组成, 呈长管状且

自封闭。胃腺的上 1/3 主要由黏液分泌细胞构成，这些细胞分泌的黏液可进一步增强对胃黏膜的保护作用；中段集中分布壁细胞（分泌胃酸）、主细胞（分泌胃蛋白酶原）及胃泌素分泌细胞；底部则含有少量肠嗜铬样细胞（常被称为肥大细胞，即 ECL 细胞）。其中，肠嗜铬样细胞虽数量较少，但在胃酸分泌调节中发挥着关键作用。人体胃酸分泌量的 75% ~ 80% 受其分泌的组胺调控，因此早期的组胺拮抗剂，如西咪替丁、雷尼替丁等，作为  $H_2$  受体的竞争性抑制剂，在临床上被广泛用于抑制胃酸分泌<sup>[1]</sup>。

胃黏膜下层富含大量的神经和血管，这些神经和血管对胃酸分泌起着重要的调节作用。胃酸分泌既受神经递质的影响，例如巴甫洛夫条件反射所揭示的，当视觉或嗅觉感受食物刺激时，迷走神经末梢释放乙酰胆碱直接激活壁细胞，也受血液循环中激素的调控，如胃窦 G 细胞分泌的胃泌素（gastrin）通过门脉循环作用于壁细胞，协同增强泌酸功能。

胃壁肌层由环形肌与纵行肌构成特殊排列。这两层平滑肌的协同作用体现在两方面：①通过张力性收缩维持胃腔基础压力，当过量进食导致胃扩张时，通过肌肉舒张可实现容积调节（餐后胃容积可达 1.5 L）；②产生每分钟 3 次的蠕动波，将经胃酸和酶初步分解的食糜推送至十二指肠，该过程通过“胃泵”机制实现，每次蠕动可推进 5 ~ 15 mL 食糜。

壁细胞是胃腺中的重要功能细胞，其结构特点是胞质内富含大量线粒体。这种高密度的线粒体分布与其功能密切相关——质子泵在泌酸过程中需要持续的能量供应，而线粒体产生的 ATP 正好满足这一需求。质子泵作为壁细胞泌酸的关键蛋白，于 20 世纪 70 年代初由加州大学伯克利分校的研究团队首次发现。值得一提的是，研究者并未对这一重要发现申请专利。此后，基于对质子泵的研究，相继开发出了一系列用于治疗胃酸相关疾病的药物，如 20 世纪 70 年代的西咪替丁及 20 世纪 80—90 年代的奥美拉唑。奥美拉唑在当时的医药市场上表现出色，每年的全球销售额可达 150 亿 ~ 200 亿美元。质子泵在壁细胞中存在动态循环：在非进食期（如餐间时段），质子泵会从顶膜内吞回收至胞内；当再次进食时，这些储存的质子泵可快速重新分布至顶膜，为新一轮胃酸分泌作好准备。

胃酸分泌过程中，胃黏膜壁细胞还会同步分泌一种关键糖蛋白——内因子（intrinsic factor）。内因子能与维生素  $B_{12}$  特异性结合形成复合物，对维生素  $B_{12}$  在回肠末端的吸收起着决定性作用。当胃部因胃癌或萎缩性胃炎等疾病接受大部切除（切除范围超过 2/3）时，不仅胃酸分泌功能受损，内因子的产生也会显著减少。为预防由此导致的维生素  $B_{12}$  吸收障碍及其引发的巨幼细胞贫血，临床上需定期通过肌肉注射补充维生素  $B_{12}$  以维持正常造血功能。

静息状态的胃壁细胞内存在特异的管状囊泡结构。当细胞受到刺激时，这些囊泡迅速与顶膜融合，伴随微绒毛显著延伸。激活后的壁细胞通过质子泵将胃酸分泌至腺腔，同时细胞顶膜面积可扩张至静息期的5~10倍，这一过程伴随着大量水分的内流。然而，胃腺细胞的体外培养仍存在技术瓶颈，主要表现：①原代细胞存活时间有限，分离后需在3~4h完成实验；②培养超过4h后，细胞间连接和极性特征逐渐丧失；③三维腺体结构会不可逆地退化为二维单层。这些特性严重制约了相关研究的开展。

### （三）类器官的定义与发展

类器官是由多种细胞类型组成的三维异质性细胞群体。这类结构能够模拟器官的部分生理功能，并在培养过程中维持一定程度的自我更新能力——新生的细胞谱系可与原有细胞群体形成动态平衡。然而，在长期培养条件下，部分细胞类型会出现选择性丢失现象<sup>[2]</sup>。

在胃肠道干细胞研究中，胃类器官模型具有重要的科学价值。Lgr5是胃肠道（包括肠和胃）干细胞的共有标志物。2009年的开创性研究首次从肠道类器官中分离出Lgr5阳性细胞，通过优化培养条件（包括特定基质胶和维持干细胞特性的培养基），成功诱导这些细胞形成具有三维结构的类器官<sup>[3]</sup>。这些三维结构在培养过程中逐步发育成熟，最终展现出与体内器官相似的部分生理功能。2017年，类器官三维培养技术被列为年度重要方法。该技术突破性地解决了传统动物模型难以观察亚细胞动态变化的局限性：①实现了体外模拟器官功能；②支持细胞器动态变化的可视化研究。这些优势使类器官技术迅速发展成为消化系统生理和细胞生物学研究的新型模式体系。

## 二、胃类器官的构建

### （一）利用原位组织构建胃类器官

利用原位组织构建胃类器官，需借助组织干细胞在体外开展培养工作。该培养过程依赖于特制的胃类器官三维培养体系，其中基质胶发挥着关键作用，能够为细胞提供三维支撑环境。同时，培养体系中还需添加GSK3 $\beta$ 抑制剂和特定的生长因子等必要成分，以维持类器官的正常生理功能。在实验室操作中，通常遵循特定的流程来进行培养（图3-1）。

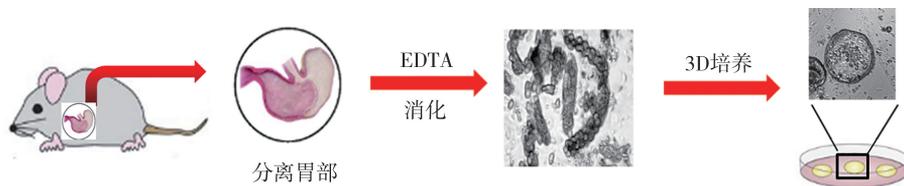


图 3-1 小鼠胃类器官的构建

以小鼠为模式生物进行胃类器官分离培养时，实验操作包含多个步骤。

(1) 准备小鼠：首先，为确保实验的准确性与一致性，需对实验动物进行预处理。让小鼠禁食一段时间，使小鼠的胃进入相对静息的空腹状态，减少胃内食物残留对后续实验的干扰，同时使胃内胃酸及一系列消化酶的释放处于较低水平。

(2) 摘取胃：完成预处理后，开始进行胃的提取操作。在通风良好的环境下，使用二氧化碳将小鼠处死，随后用乙醇溶液擦拭小鼠腹部，以达到消毒和减少微生物污染的目的。剪开腹部皮层，打开腹腔，小心移开周围组织，充分暴露出胃。接着，用75%乙醇溶液对手术器械消毒后，剪断肠以及食道与胃之间的连接，完整取出胃。

(3) 清洁胃：首先将贲门处进行结扎以便后续胃的膨胀，之后轻轻挤压胃体，将胃内容物从幽门挤出。随后将取出的胃从幽门处进行翻转，使胃黏膜朝外，便于后续对胃黏膜上皮细胞的处理。使用镊子夹住幽门部位，用医用缝线对幽门进行结扎。

(4) 膨胀胃：向胃内注入1 mL预冷在冰上的DPBS，进一步清洗胃内残留杂质。之后，将胃放入含有适量乙二胺四乙酸(EDTA)的预冷DPBS中，在摇床上以适当速度振荡1 h左右。EDTA能够破坏细胞间的连接蛋白，使胃上皮细胞之间的连接变得松散，便于后续细胞分离。

(5) 分离胃腺：吸弃离心管中残留缓冲液，加入5 mL胃腺分离缓冲液。用手摇晃15 mL离心管3 min，每次间隔超过1 s。

(6) 观察胃腺：3 min后，取20  $\mu$ L悬浮液，在光学显微镜下观察胃腺，一般20  $\mu$ L的悬浮液含有20 ~ 50个胃腺。

(7) 接种：将含有5 mL胃腺的15 mL离心管放入离心机中，4 $^{\circ}$ C、300  $\times$  g离心5 min，离心后吸弃缓冲液，用适量基质胶重悬胃腺。取50  $\mu$ L基质胶与胃腺的混悬液，滴入24孔板中，使混悬液均匀分布在孔板中心。

(8) 培养：将24孔板放在37 $^{\circ}$ C培养箱中使基质胶固化30 min，配制小鼠胃类器官培养基，每孔加入500  $\mu$ L培养基进行培养。

(9) 观察：通常胃类器官在48 h后形成，呈现中空囊球状(图3-2)。

培养人类胃类器官的方法与小鼠类似，但样本来源有所不同。人类胃类器官的样本主要取自手术切除的胃组织或通过内镜获取的胃黏膜组织。将获取的组织样本使用胶原酶进行消化处理，使组织分散成单个细胞或细胞团。按照与小鼠胃类器官培养相似的方法，将消化后的细胞接种到含有基质胶和特定培养基的培养体系中，在体外进行培养(图3-3)。然而，萎缩性胃炎和胃癌患者的胃上皮细胞在结构和功能上发生显著改变，这使得源自这些患者的胃类器官面临更大的挑战：三维结构构建更为困难，培养稳定性也更难维持。

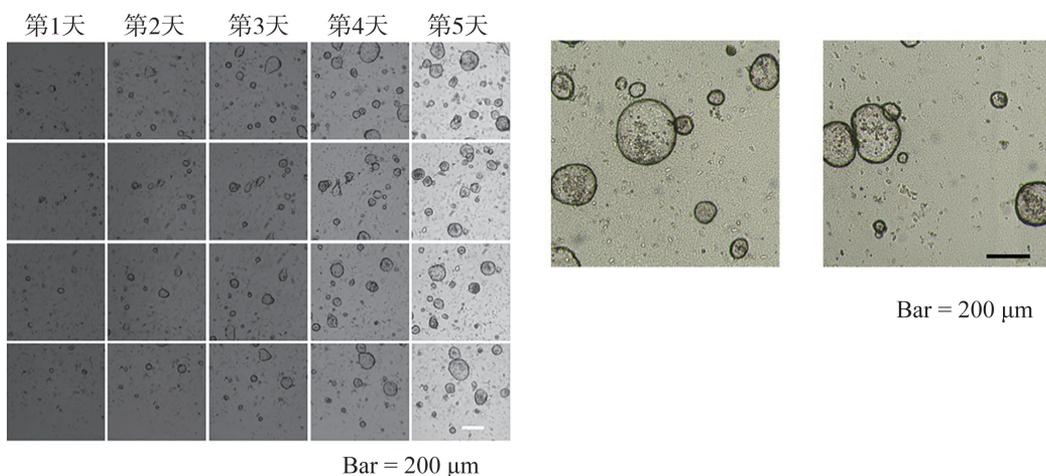


图 3-2 小鼠胃类器官形态

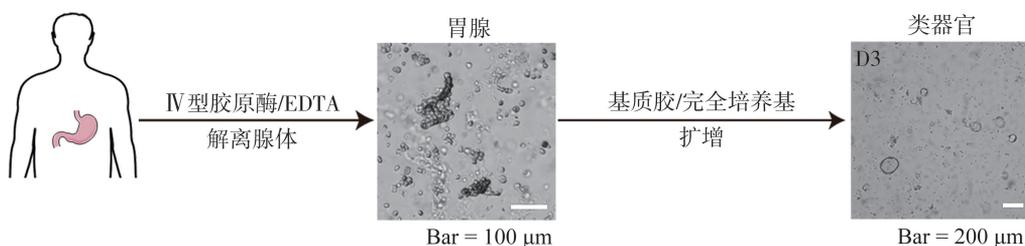


图 3-3 人胃类器官的构建

## (二) 利用胚胎干细胞构建胃类器官

构建胃类器官的另一重要技术路径是胚胎干细胞，其中以 James Wells 实验室的方法最具代表性。该技术的核心流程：获取胚胎干细胞后，在特定培养体系中进行多阶段诱导分化，期间需更换含不同成分的缓冲液并添加特定生长因子。整个分化过程约需 1 个月，且对培养条件要求严格，最终形成具有胃类器官特征的细胞团。分化过程中可通过形态学观察、标志物检测及功能分析实时监测类器官发育。获得初步类器官后，还需进一步验证其功能(如质子泵表达及酸分泌能力)以确保研究适用性。目前，部分公司已提供相关试剂和技术支持，极大便利了此类研究<sup>[4]</sup>。

## 三、胃类器官的鉴定

### (一) 形态学鉴定

胃类器官在形态上类似橄榄球。成熟的小鼠胃类器官直径一般在 200 ~ 300 μm，而人类胃类器官直径相对较大，为 300 ~ 400 μm。通过显微镜观察，可直观了解胃类器官的整体形态、大小及细胞聚集方式等特征。参考课程视频的 32 : 10，是对细

胞的肌动蛋白（actin）进行检测，看到类器官的顶膜结构产生。

#### （二）细胞组成及增殖活性鉴定

对于不同培养天数的胃类器官，需要对其细胞组成和增殖活性进行鉴定。通过对具有增殖活性的细胞进行染色测定，例如 Ki67 和 EdU，可以了解类器官在培养过程中的细胞生长情况。同时，对胃类器官中的主细胞、壁细胞等标志性蛋白进行染色鉴定，能够明确类器官中不同功能细胞的存在和分布情况。例如，使用针对主细胞特异性蛋白的抗体进行免疫荧光染色，在荧光显微镜下观察，若出现特定的荧光信号，则表明类器官中存在主细胞。通过这些鉴定方法，可以证明在培养过程中，胃类器官能够维持细胞的多样性和正常的增殖能力。

#### （三）功能性鉴定

功能性鉴定是胃类器官鉴定的关键环节，通过多种实验手段评估胃类器官是否具备胃的相关生理功能。其中，利用吡啶橙（adenosine orange，一种弱碱，在质子化后颜色会由绿色变为红色）进行功能性检测是一种常用方法。将吡啶橙加入胃类器官培养体系中，观察其颜色变化情况。当胃类器官受到组胺刺激时，如果类器官中的壁细胞具有正常功能，会分泌胃酸，使周围环境 pH 降低，吡啶橙发生质子化，颜色由绿变红。通过测定变红区域的数量及亮度变化，可以定量衡量类器官对组胺刺激的应答情况。若能观察到明显的颜色变化，说明胃类器官中的壁细胞存在组胺受体，并且能够在组胺刺激下正常分泌胃酸，从而证明胃类器官具备一定的胃酸分泌功能<sup>[5]</sup>。此外，还可以通过免疫荧光检测胃类器官中其他标志物的定位及阳性表达情况。例如，检测一些与胃酸分泌调节相关的信号通路蛋白的表达和定位，进一步了解胃类器官的功能完整性和信号传导机制。通过这些功能性鉴定方法，能够全面评估胃类器官是否能够模拟真实胃组织的生理功能，为其在后续研究中的应用提供有力依据。

## 四、胃类器官的应用

#### （一）胃类器官在病毒入侵研究中的应用

胃类器官为研究病毒感染机制提供了重要的体外模型。通过该模型可模拟 SARS 等病毒对胃及相关组织的感染过程。研究人员通过微量注射技术，将病毒引入胃类器官体系，使病毒能够从顶膜侵染肠道细胞，以此探究病毒的感染途径和机制。实验中发现，将病毒直接注入底膜与将病毒添加到基质胶中所引发的病毒感染过程及胃类器官的反应存在显著差异。基于这些差异，研究人员定义了原发性感染和继发性感染两种不同的感染模式。原发性感染通常指病毒首次直接侵入胃类器官，继发性感染则是在病毒感染过程中后续出现的不同感染表现形式。这种对感染模式的定义有助于深入

理解病毒在胃类器官中的感染过程和机制<sup>[1]</sup>。

### （二）结合转基因动物对有丝分裂与细胞极化进行研究

分离转基因模式动物的胃组织体外构建类器官同样具有重要的研究意义。在敲入乙酰转移酶的 TIP60 小鼠的胃部组织所构建的类器官模型中，处于有丝分裂的细胞在类器官水平能够反映出纺锤体定位差错表型。通过三维视角对器官形态进行观察，可以清晰地了解类器官在不同遗传学背景下的形态变化和细胞结构特征。这种研究方式为探究细胞有丝分裂过程中的异常现象及遗传因素对细胞和器官发育的影响提供了新的思路和方法，有助于深入理解细胞生物学和发育生物学的相关机制。

### （三）化合物研究

利用人胃类器官对一系列化合物进行研究，为药物研发和细胞生物学研究提供了重要平台。例如，利用促进有丝分裂细胞形成双极纺锤体的马达蛋白 Eg5 的抑制剂，可以研究有丝分裂过程中纺锤体形成的机制及其对细胞分裂的影响。此外，利用胃类器官对 BI2536（一种蛋白激酶 PLK1 的抑制剂）进行研究。BI2536 已被应用于临床，但目前最大的问题在于对造血细胞本身存在影响。通过胃类器官研究该抑制剂，有助于深入了解其作用机制和副作用产生的原因，为优化药物性能和寻找更有效的治疗方案提供依据。

### （四）幽门螺杆菌研究

胃类器官可用于研究幽门螺杆菌的感染机制和对胃酸分泌的影响。通过微量注射技术，将幽门螺杆菌或其毒素注入胃类器官，模拟幽门螺杆菌在临床上对胃黏膜的感染过程，即模拟其对顶膜的侵染过程。之后利用组胺刺激胃类器官，观察其对胃酸分泌的影响。研究表明，幽门螺杆菌早期处理对胃酸分泌具有抑制作用。进一步研究发现，幽门螺杆菌的 VacA 毒素在宿主细胞膜上形成通道，导致细胞外钙内流，从而激活细胞内的钙依赖性水解酶。在正常胃的壁细胞底膜绒毛中，微丝呈点状分布，而在被幽门螺杆菌感染的细胞中，其细胞骨架发生崩塌。这些研究结果有助于深入了解幽门螺杆菌的致病机制，为开发针对幽门螺杆菌感染的治疗方法提供理论基础<sup>[5, 6]</sup>。

## 五、重难点解析

### 1. 消化系统类器官构建面临的挑战

（1）细胞功能成熟问题：体外培养消化系统类器官主要依靠干细胞增殖扩建，如何使干细胞形成具有类似体内生理功能的分化型细胞是一大挑战。以肠道类器官为例，目前较难获得功能成熟的细胞类型。

（2）临床样本问题：临床样本尤其是胃的活检样本起始量少，如何在小样本量

的情况下，尽量反映胃炎等疾病进展过程是个难题。并且，从临床角度看，若要构建更复杂的消化系统类器官，如整合肌肉等结构，模拟体内物理环境，也面临诸多挑战。

(3) 类器官标准化与资源共享问题：类器官研究可与工程化、微流控芯片结合，以保证类器官的标准化和资源共享。然而，目前在这方面还存在不足，如不同类器官通过微流控整合研究整合生理学的相关工作尚待完善。同时，临床样本瓶颈问题突出，有效获取样本的方法有限，从手术组织尤其是疾病旁正常组织取样，虽可作对比，但需要内镜医生与患者更好地配合，且类器官用于大量筛选存在困难。

### 2. 联合类器官的设想与经验

(1) 临床应用设想：从临床需求出发，期望构建用于药敏测试和模拟治疗反应的联合类器官体系，特别是免疫治疗方面。目前多是将免疫细胞与肿瘤类器官联合培养观察杀伤效果，理想情况是克服血管化难题，模拟免疫细胞穿过物理屏障接触肿瘤细胞的过程，但目前该过程模拟存在较大不足。

(2) 免疫细胞与类器官互作研究：传统类器官研究多关注上皮细胞，而体内消化道上皮细胞与免疫细胞存在诸多互作。目前有很多研究拓展到免疫细胞与类器官共培养领域，体外培养类器官的优势在于可将不同种类免疫细胞分开，研究其在特定疾病情况下与上皮细胞的具体互作功能。

(3) 构建复杂联合类器官的思考：构建联合类器官面临诸多挑战，如免疫细胞与上皮细胞共培养时，免疫细胞偏好的微环境与上皮细胞偏好的微环境如何达到良好整合，以保证免疫细胞的量和活性能够模拟真实情况。此外，未来类器官血管化、肌肉化、神经化是值得研究的方向，但要考虑与类器官标准化、产品化、工业化的结合，避免成本过高。同时，可通过获取患者免疫治疗前后样本，研究免疫细胞与肿瘤细胞的互动关系，但除类器官培养外，关键还在于明确免疫治疗起效及协同作用机制。

### 3. 显微注射技术通量低及黏膜和平滑肌结合类器官相关问题

(1) 提高药物筛选通量的方法：针对显微注射技术通量低，难以用于大规模药物筛选的问题，可采用二维类器官培养，使底膜暴露在外，类似上皮细胞在体外形成极化的三维培养，如 Caco2、MDCK 细胞（人的结肠癌上皮细胞和狗的肾脏细胞均为永生化细胞系）培养，通过细胞间连接实现离子交换的选择性，从而用于大规模筛选，但需注意类器官与细胞系的差异，类器官是模拟正常生理的异质性培养，包含多种细胞，而细胞系为单一细胞。

(2) 黏膜和平滑肌结合类器官的策略：构建黏膜和平滑肌结合类器官是一个开放问题。若将黏膜和平滑肌类器官分别制备后结合，面临诸多问题，如来源问题（是否使用同一患者来源，成体干细胞来源的黏膜层与 iPSC 来源的平滑肌在共培养时可

能出现平滑肌过度增殖问题)、结合方式问题(如平滑肌条与消化道相关的球状物如何结合,是球外裹平滑肌还是平滑肌条上黏球等)。有观点认为可通过将构建好的胃肠类器官放置在可牵拉系统中,给其施加力的刺激来模拟平滑肌收缩,而不一定直接将平滑肌包裹在类器官外。也有人提出不成熟的想法,即结合3D打印技术,利用平滑肌结构特点,通过3D打印构建肌肉浆膜层结构,将生理化器官与上皮细胞类器官整合,但该方法代价可能较大。

#### 4. 消化系统类器官研究所需仪器

(1) 具备机械力刺激与成像功能的仪器:希望开发一种仪器,能将类器官埋在可拉伸的基质中,对类器官施加机械力刺激(如拉伸或挤压),同时具备成像功能,可设置拉伸幅度,解决目前在对类器官施加机械力刺激时材料选择和操作方面的难题。

(2) 类器官支架(holder)及相关拓展仪器:目前类器官培养缺乏支架,导致操作不便。若开发出类器官支架,可将类器官连同基质胶固定在支架上,方便移动、转移,利于成像等操作,且该支架可在不同类器官培养中推广。在此基础上,还可建立真正的三维微流控技术,用于消化系统类器官研究,模拟消化道有进有出的过程,并进行高通量筛选,这对于研究营养吸收等功能十分重要。

(3) 代谢质谱与介观尺度成像仪器:类器官模式体系为定量生物学提供良好模式,结合微流控和代谢质谱,可监控类器官在稳态、刺激及应答病原微生物时代谢产物变化,且代谢质谱有利于本身技术发展,因为现有大量质谱主要针对大分子修饰,分辨率已很高。此外,类器官在合理尺寸下可进行介观尺度成像,观察细胞谱系变化及细胞分化和分裂过程,需要能实现从微米到亚微米(10~30 nm)尺度成像的仪器,以观察蛋白质机器、细胞器等在过程中的变化,推动类器官模式体系从经典细胞生物学向可视化生理学方向发展。

## 参考文献

- [1] WANG W, YANG F, LIN J, et al. Modeling of COVID-19 disease disparity in gastric organoids reveals the spatiotemporal dynamics of SARS-CoV-2 infectivity[J]. *J Mol Cell Biol*, 2022, 14(2): mjac007.
- [2] CORRÒ C, NOVELLASDEMUNT L, LI V S W. A brief history of organoids[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2020, 319(1): C151-C165.
- [3] 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]. *Nature*, 2009, 459(7244): 262-265.
- [4] BRODA T R, MCCracken K W, WELLS J M. Generation of human antral and fundic gastric organoids from pluripotent stem cells[J]. *Nat Protoc*, 2019, 14(1): 28-50.

- [ 5 ] YAO X, SMOLKA A J. Gastric parietal cell physiology and Helicobacter pylori-induced disease[J]. *Gastroenterology*, 2019, 156(8): 2158-2173.
- [ 6 ] XU A, WANG X, YE Z, et al. Modeling lipopolysaccharide-elicited inflammation using 3D mouse gastric organoids[J]. *Cell Biol Int*, 2025.

( 姚雪彪 )