

论著·基础研究

## 小鼠输卵管上皮类器官的构建及表型验证

吴其谦, 胡燕琴, 陈迦勒, 李牧辰, 赵有淦, 伍静文

上海交通大学医学院组织胚胎学与遗传发育学系, 上海市生殖医学重点实验室, 上海 200025

**[摘要]** **目的**·构建野生型 (wild type, WT) 小鼠和 miR-34b/c<sup>-/-</sup>且 miR-449<sup>-/-</sup>双敲除 (double knockout, dKO) 小鼠输卵管上皮类器官的培养体系, 并进行表型验证。**方法**·利用酶消化法和差速贴壁法分离纯化 WT 小鼠和 dKO 小鼠输卵管上皮细胞, 并利用免疫荧光法鉴定得到的输卵管上皮细胞的纯度; 通过计数和直径测量比较 WT 小鼠和 dKO 小鼠输卵管上皮类器官数量、生长速度和生长大小; 利用苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, H-E) 染色和透射电子显微镜 (透射电镜) 对输卵管上皮类器官进行形态和结构观察; 采用免疫荧光法观察并统计纤毛细胞和分泌细胞在 WT 小鼠和 dKO 小鼠输卵管上皮类器官中的比例; 采用免疫组织化学法、实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 和 Western blotting 检测分泌细胞、纤毛细胞相关基因在输卵管上皮类器官中的表达。**结果**·分离纯化得到的输卵管上皮细胞纯度较高。与 WT 小鼠相比, dKO 小鼠输卵管上皮类器官生长更快, 体积更大, 数量也更多; 但 dKO 小鼠输卵管上皮类器官发育较慢, 于培养 28 d 时才出现上皮内陷, 而 WT 小鼠的类器官于培养 16 d 时已经出现。H-E 染色和透射电镜结果显示输卵管上皮类器官呈现出与在体输卵管类似的结构。免疫荧光检测显示 dKO 小鼠输卵管上皮类器官的纤毛细胞显著减少而分泌细胞显著增多 (均  $P < 0.05$ )。免疫组织化学法检测结果显示, dKO 小鼠输卵管上皮类器官的分子表达模式与在体输卵管组织基本一致, 即纤毛细胞标志物乙酰化微管蛋白  $\alpha$  (Ac- $\alpha$ -tubulin)、叉头框 J1 (forkhead box J1, FOXJ1) 表达减少, 分泌细胞标志物配对盒 8 (paired box 8, PAX8) 表达增加; RT-qPCR 结果显示 dKO 小鼠输卵管上皮类器官中 *Foxj1* 和微管蛋白  $\beta 4A$  (tubulin  $\beta$  class IVa, *Tubb4a*) 的 mRNA 水平均降低 (均  $P < 0.05$ ), 而 *Pax8* mRNA 水平升高 ( $P < 0.05$ ); Western blotting 结果显示, dKO 小鼠类器官中 FOXJ1 的蛋白表达水平显著降低, PAX8 表达显著升高 (均  $P < 0.05$ )。**结论**·研究成功构建 WT 小鼠和 dKO 小鼠的输卵管上皮类器官培养体系, 该体系可模拟小鼠在体输卵管的表型。

**[关键词]** 类器官; 输卵管; 上皮细胞; miR-34; miR-449; 基因敲除

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2023.07.007 **[中图分类号]** R-332; Q492.5 **[文献标志码]** A

## Establishment and phenotype verification of mouse oviductal epithelial organoids

WU Qiqian, HU Yanqin, CHEN Jiale, LI Muchen, ZHAO Yougan, WU Jingwen

Department of Histoembryology, Genetics and Developmental Biology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine; Shanghai Key Laboratory of Reproductive Medicine, Shanghai 200025, China

**[Abstract]** **Objective**·To establish a culture system of oviductal epithelial organoids from wild type (WT) mice and miR-34b/c<sup>-/-</sup> and miR-449<sup>-/-</sup> double knockout (dKO) mice, and verify the phenotypes. **Methods**·The oviduct epithelial cells of WT mice and dKO mice were isolated and purified by enzyme digestion and differential adhesion method, and the purity of the isolated oviduct epithelial cells was identified by immunofluorescence staining. The numbers, growth rates and sizes of oviductal epithelial organoids between WT mice and dKO mice were compared by counting and diameter measurement. Hematoxylin-eosin (H-E) staining and transmission electron microscope (TEM) were used to observe the morphology and structure of the oviductal epithelial organoids. The proportions of ciliated cells and secretory cells in the oviductal epithelial organoids from WT mice and dKO mice were observed and counted by immunofluorescence staining. Immunohistochemistry (IHC), real-time quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blotting were used to observe the expression levels of marker genes of ciliated cells and secretory cells in the oviductal epithelial organoids. **Results**·The purity of the isolated and purified oviduct epithelial cells was high. Compared with the organoids from WT mice, the oviductal epithelial organoids from dKO mice grew faster and larger, and were more in number. But they developed more slowly than those from WT mice, as the invaginations of the dKO mice organoids appeared on the 28th day of culture, while the WT mice organoids exhibited the same structures on the 16th day. The oviductal epithelial organoids showed similar structures as those of the oviduct *in vivo* under hematoxylin-eosin (H-E) staining and TEM. Immunofluorescence staining

**[基金项目]** 国家自然科学基金 (81671509)。

**[作者简介]** 吴其谦 (1998—), 男, 硕士生; 电子信箱: garrywuqiqian@163.com。

**[通信作者]** 伍静文, 电子信箱: zpwujw@shsmu.edu.cn。

**[Funding Information]** National Natural Science Foundation of China (81671509).

**[Corresponding Author]** WU Jingwen, E-mail: zpwujw@shsmu.edu.cn.



showed that the ciliated cells of oviductal epithelial organoids from dKO mice were significantly reduced and the secretory cells were significantly increased (both  $P < 0.05$ ). IHC showed that the molecular expression patterns of the oviductal epithelial organoids were consistent with those of the oviducts *in vivo*, *i.e.* the expression levels of ciliated cell markers acetylated  $\alpha$ -tubulin (Ac- $\alpha$ -tubulin) and forkhead box J1 (FOXJ1) decreased, and the expression level of the secretory cell marker paired box 8 (PAX8) increased. RT-qPCR showed that the mRNA levels of *Foxj1* and tubulin  $\beta$  class IV a (*Tubb4a*) decreased (both  $P < 0.05$ ), while *Pax8* increased in the oviductal epithelial organoids of dKO mice ( $P < 0.05$ ). Western blotting results showed that the protein expression level of FOXJ1 in the organoids of dKO mice significantly decreased, while the expression of PAX8 significantly increased (both  $P < 0.05$ ).

**Conclusion** The culture system of oviductal epithelial organoids of WT mice and dKO mice are successfully constructed, which can simulate the phenotypes of mouse oviduct *in vivo*.

**[Key words]** organoid; oviduct; epithelial cell; miR-34; miR-449; gene knockout

输卵管是女性生殖系统中重要的器官,连接卵巢和子宫;自卵巢向子宫方向,小鼠输卵管可分为4个区域,依次为漏斗部(在人体称为伞部)、壶腹部、峡部和输卵管子宫连接处<sup>[1]</sup>。输卵管的管壁包括上皮组织、结缔组织和平滑肌。输卵管上皮分泌细胞产生的输卵管液、纤毛细胞的摆动,以及管壁平滑肌的运动为受精、配子和早期胚胎运输、早期胚胎发育提供必要的支持<sup>[2-3]</sup>。目前对于输卵管的研究大多利用动物模型、二维细胞培养技术以及气液交界(air-liquid interface, ALI)培养系统<sup>[4]</sup>,但均存在较大的局限性。如动物模型周期长,二维细胞培养技术无法模拟在体输卵管各类细胞分化的微环境以及细胞间的相互作用<sup>[5]</sup>等。而ALI培养系统最初主要用于体外模拟气道上皮的培养研究,目前也被证明可用于支持其他类型上皮的培养来模拟在体细胞的功能和分化,比如肠道上皮<sup>[6]</sup>和女性生殖道上皮<sup>[7-9]</sup>。但由于该方法接种培养需要大量的细胞,因此主要应用于大型动物模型输卵管上皮的培养,例如猪<sup>[10]</sup>、牛<sup>[11]</sup>、猴<sup>[12]</sup>等;而小鼠体型小,可获得输卵管上皮细胞数量有限,因此一次培养需要大量小鼠。此外,与体内情况相比,ALI培养系统的细胞在细胞群体组成、细胞周期和增殖,以及免疫能力方面显示出一定的差异<sup>[13]</sup>。是否有更符合生理条件的体外培养系统?近年来,类器官培养技术的建立为小鼠及其他动物模型的输卵管结构和功能的研究提供了方便、可靠的途径<sup>[14]</sup>。

类器官是由来自哺乳动物器官或组织的多能干细胞或成体干细胞产生的具有类似在体显微结构的三维体外培养细胞簇<sup>[15]</sup>。类器官是一种三维培养细胞的体系,能够模拟器官组成、功能和发育特征,比二维培养的细胞培养系统更符合生理条件。类器官的一个关键特征是它们比哺乳动物模型更易于实验,这有助于更深入地理解器官发生、疾病机制的探讨、药物的

筛选等<sup>[16-17]</sup>。目前已经建立了10余种人类组织来源的正常或肿瘤类器官生物样本库,包括结直肠、肾脏、大脑、肝脏、胰腺、胃、视网膜、肺、前列腺、乳腺等<sup>[18]</sup>。关于输卵管上皮类器官培养的建立,最早见于KESSLER等<sup>[19]</sup>的研究,该研究建立了长期、稳定的三维人输卵管上皮类器官培养体系,表明输卵管上皮成体干细胞在体外可以产生分化的类器官,其中包含纤毛细胞和分泌细胞。随后,XIE等<sup>[20]</sup>也建立了小鼠输卵管上皮类器官的培养体系,验证了类器官培养的长期可持续性以及可以模拟小鼠输卵管上皮细胞的增殖和分化。但利用体外输卵管上皮培养的类器官是否能模拟异常或疾病状态下在体输卵管的结、功能及表型目前未见报道。

本实验室<sup>[21]</sup>及其他研究团队<sup>[22]</sup>的前期研究工作发现miR-34b/c<sup>-/-</sup>和miR-449a/b/c<sup>-/-</sup>双敲除(double knockout, dKO)雌性小鼠不孕,表现为输卵管上皮纤毛细胞显著减少,但排卵及激素水平正常。miR-34b、miR-34c、miR-449a、miR-449b、miR-449c是miR-34/449家族成员,具有高度种属保守性。其中小鼠miR-449a/b/c(统称miR-449),是从13号染色体上一段1642 bp的序列转录加工而来;小鼠miR-34b/c是从9号染色体上一段612 bp的序列转录加工而来。miR-34b/c、miR-449具有共同的种子序列,可结合在相同靶基因mRNA的3'非翻译区(3'UTR),调控靶基因的表达,发挥转录后调控作用,功能之间可以相互代偿,所以需要同时敲除miR-34b/c和miR-449才可观察到异常表型<sup>[23-24]</sup>。dKO雌鼠由于输卵管上皮纤毛细胞减少导致拾卵障碍而不孕,这是否与输卵管上皮纤毛细胞分化障碍有关,其中机制值得探讨。但是利用动物模型在体研究关键分子在输卵管上皮细胞分化中的分子机制存在着较大的局限性,而选择类器官培养系统作为工具将为研究带来便利。这首先需要构建野生型(wild type, WT)小鼠与dKO小鼠输卵

管上皮类器官培养系统, 并进行表型验证, 从而为进一步研究 miR-34b/c 和 miR-449 在输卵管上皮纤毛细胞分化中的机制打下基础。

基于此, 本研究根据文献报道, 结合自身实验条件, 成功构建了 WT 小鼠与 dKO 小鼠输卵管上皮类器官培养模型, 并验证了 dKO 小鼠输卵管上皮来源的类器官可模拟 dKO 小鼠在体输卵管的表型。因此, 本研究不仅可为探讨 miR-34b/c 和 miR-449 在输卵管上皮纤毛细胞分化中的作用机制打下基础, 也可为研究其他关键分子在输卵管上皮细胞增殖和分化中的作用和机制提供良好的体外研究模型。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 雌性 3 周龄 WT 小鼠购于上海斯莱克实验动物有限责任公司, 实验动物生产许可证号为 SCXK (沪) 2018-0003。miR-34/449 dKO 小鼠由 miR-34b/c<sup>+/-</sup> 且 miR-449<sup>-/-</sup> 小鼠交配繁殖而得, miR-34b/c<sup>+/-</sup> 且 miR-449<sup>-/-</sup> 小鼠由本实验室培育鉴定并保存。实验小鼠品系均为 C57BL/6J, 饲养于上海交通大学医学院实验动物科学部, 实验动物使用许可证号为 SYXK (沪) 2018-0027。所用实验小鼠均为 SPF 级。

**1.1.2 主要试剂和仪器** Matrigel 无乳糖脱氢酶增高病毒低生长因子基质胶 (Matrigel® Growth Factor Reduced Basement Membrane Matrix, LDEV-Free) 购自美国 Corning 公司, 胶原蛋白水解酶 I、DMEM/F12 培养基、改进型 DMEM/F12 培养基、4-羟乙基哌嗪乙磺酸、谷氨酰胺、B27 培养添加剂、青霉素-链霉素、细胞恢复液、0.25% 胰蛋白酶-EDTA 购自美国 Gibco 公司, 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自美国 Hyclone 公司, 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA)、脱氧核酸酶 I (DNase I)、rho 相关卷曲螺旋形成蛋白激酶 (rho-associated coiled-coil forming kinase, ROCK) 抑制剂 Y-27632、Triton X-100、抗乙酰化微管蛋白  $\alpha$  (acetylated  $\alpha$ -tubulin, Ac- $\alpha$ -tubulin) 抗体 (T6793) 购自美国 Sigma 公司, 人 Noggin (hNoggin) 重组蛋白、R-脊椎蛋白 1 (R-spondin1) 重组蛋白购自加拿大 StemCell Technologies 公司, 无翅型 MMTV 整合位点家族成员 3A (wingless-type MMTV integration site family, member 3A, Wnt3a)、小鼠成纤维细胞生长因子 10

(mouse fibroblast growth factor 10, mFGF10)、人表皮生长因子 (human epidermal growth factor, hEGF) 购自美国 Peprotech 公司, 选择性  $\gamma$ -分泌酶抑制剂二苯并氮草 (dibenzazepine, DBZ)、转化生长因子  $\beta$  受体 1 激酶抑制剂 IV (TGFBR1 kinase inhibitor IV) 购自美国 MedChem Express 公司, 2 $\times$ Heiff PCR Master Mix (含染料)、过氧化物酶标记驴抗兔 IgG (H+L) (34201ES60)、过氧化物酶标记驴抗小鼠 IgG (H+L) (34101ES60)、Alexa Fluor 488 标记山羊抗小鼠 IgG (H+L) (33206ES60)、Alexa Fluor 594 标记山羊抗兔 IgG (H+L) (33112ES60) 购自翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司, PrimeScript RT Master Mix、TB Green Premix Ex Taq II 购自日本 TaKaRa 公司, RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 抗配对盒 8 (paired box 8, PAX8) 抗体 (10336-1-AP) 购自中国 Proteintech 公司, 抗平滑肌肌动蛋白  $\alpha$ 2 (smooth muscle actin  $\alpha$ 2, ACTA2) 抗体 (ab124964)、抗波形蛋白 (vimentin) 抗体 (ab92547) 购自美国 Abcam 公司, 抗叉头框 J1 (forkhead box J1, FOXJ1) 抗体 (14-9965-82) 购自美国 Invitrogen 公司, 抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (5174) 购自美国 CST 公司。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

梯度 PCR 仪 (X50s; 德国 Eppendorf), NanoDrop 紫外分光光度计 (2000C; 美国 Thermo Fisher Scientific), 化学发光凝胶成像系统 (4000mini; 美国 GE), 荧光显微镜 (BX53; 日本 Nikon), Applied Biosystems 实时荧光定量 PCR 系统 (7500; 美国 ABI), 透射电子显微镜 (透射电镜) (H-7650; 日本日立)。

### 1.2 方法

**1.2.1 小鼠基因型鉴定** 提取小鼠鼠尾 DNA, 用 PCR 方法检测基因型。PCR 引物序列如下。miR-34bc-KO-F2: 5'-GCGGCCGCATAACTTCGTAT-3'; miR-34bc-Com-L2: 5'-GAGATTTTCGTGGCGCTTAA-3'; miR-34bc-WT-U2: 5'-GCCTCCTGTGAATCGTCATT-3'。PCR 反应体系 (20  $\mu$ L): 10  $\mu$ L 2 $\times$ Heiff PCR Master Mix、0.5  $\mu$ L 引物 miR-34bc-KO-F2、0.5  $\mu$ L 引物 miR-34bc-WT-U2、1  $\mu$ L 引物 miR-34bc-Com-L2, 补双蒸水至 20  $\mu$ L。PCR 反应程序为: 95  $^{\circ}$ C 预变性

2 min; 95 °C变性 30 s, 56 °C退火 30 s, 72 °C延伸 30 s, 33个循环; 72 °C 10 min。配置 1.5%琼脂糖凝胶用于PCR产物电泳。

**1.2.2 小鼠输卵管类器官的培养** 解剖小鼠,取出输卵管,置于磷酸盐缓冲液(PBS,含1%青霉素和链霉素)中,将脂肪剥离干净。用消毒灭菌的剪刀将输卵管在EP管中剪碎成浆糊状后,加入预热的消化液(Hank's溶液+5 mg/mL胶原蛋白水解酶 I +5 U DNase I +双抗),并置于37 °C金属浴中振荡消化120 min(期间每隔30 min取出将组织吹散)。待消化完全后加入培养基(DMEM/F12+10%FBS+双抗)终止消化,200×g离心5 min,弃去消化液后用培养基重复洗涤2次,重悬于2 mL培养基中。将输卵管细胞悬液加入培养皿中于37 °C,5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养1 h。然后吸取培养基,200×g离心5 min,弃上清液;用培养基重悬细胞并计数,每1×10<sup>4</sup>个细胞加入50 μL基质胶于24孔细胞培养皿中,在37 °C、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养30 min后加入500 μL输卵管类器官完全培养基。输卵管类器官完全培养基成分:改进型DMEM/F12培养基、谷氨酰胺添加剂2 mmol/L、HEPES缓冲液10 mmol/L、双抗100 U/mL、1×B27添加剂、hEGF 100 ng/mL、mFGF 100 ng/mL、hNoggin 100 ng/mL、R-spondin1 0.6 μg/mL、Wnt3a 100 ng/mL、TGFBR1 kinase inhibitor IV 0.5 μmol/L。类器官种植和传代后另外添加Y-27632 10 μmol/L。

**1.2.3 输卵管类器官传代** 将培养孔中的培养基沿管壁吸取干净,避免破坏基质胶;向孔中加入1 mL预冷PBS(无钙镁),轻轻摇晃后吸出。再向孔中加入1 mL预冷细胞恢复液,4 °C下孵育30~60 min。用预先湿润的1 mL枪头在孔中轻轻吹打,然后将类器官转移到15 mL离心管中,4 °C 70×g离心5 min,弃上清液;加入预冷的DMEM/F12培养液10 mL重悬沉淀,轻柔吹打洗涤;4 °C 200×g离心5 min,弃上清液。然后以1:2传代,即用25 μL类器官完全培养基重悬类器官沉淀,加入75 μL基质胶,轻轻吹打混匀避免产生气泡,以每孔50 μL种在24孔板中,将24孔板放入培养箱中孵育30 min后取出,再向每孔加入500 μL类器官完全培养基,置入培养箱中继续培养。

**1.2.4 免疫荧光检测** 进行类器官传代的同时,回收部分类器官于1.5 mL EP试管中,250×g离心5 min,弃去多余的上清液。加入适量4%多聚甲醛

于摇床上固定1 h。250×g离心5 min后,弃去多聚甲醛。用预冷的PBS缓冲液洗涤3次,每次5 min。250×g离心5 min,弃去PBS。将类器官沉淀吸出加到冰冻切片的包埋模具中,加入冷冻包埋剂(OCT)放入液氮中冷冻。将WT和dKO小鼠处死并在体视镜下分离出小鼠输卵管,同样加入OCT包埋。将OCT包埋的组织用冰冻切片进行切片,厚度为8 μm。PBS洗掉OCT,滴加0.5%Triton,室温通透20 min;之后用PBS洗3遍,每遍5 min。5%BSA室温封闭1 h后加入用5%BSA稀释的一抗,置于湿盒中4 °C孵育过夜。一抗包括抗PAX8抗体(1:200)、抗Ac-α-tubulin抗体(1:200)、抗ACTA2抗体(1:200)、抗波形蛋白抗体(1:100)。之后用PBS洗3遍,每遍5 min。荧光标记二抗用PBS按1:400进行稀释,室温避光孵育1 h。PBS洗3遍,每遍5 min。用含DAPI的封片剂进行封片并在荧光显微镜下观察。

**1.2.5 RNA的提取和实时荧光定量PCR** 将培养2个月的WT和dKO小鼠输卵管上皮类器官回收,TRIzol提取总RNA并反转录为cDNA。以cDNA为模板进行实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测。以*Gapdh*作为内参,2<sup>-ΔΔCt</sup>法分析mRNA表达水平。按TB Green Premix EX Taq II说明书配置反应体系。反应条件:95 °C 3 min;95 °C 5 s,60 °C 30 s,40个循环。使用的引物序列见表1。

表1 实时荧光定量PCR引物序列

Tab 1 Primer sequences in RT-qPCR

Primer	Sequence (5'→3')
<i>Foxj1</i> -F	AAGGAGGCAGAAATCCGGTG
<i>Foxj1</i> -R	TTGTAGCCTCCCTTGTGCAG
<i>Pax8</i> -F	CCCTTCGCCATAAAGCAGGA
<i>Pax8</i> -R	AGCATGGGGAAAGGCATTGA
<i>Tubb4a</i> -F	AACCCGGCACCATGGACTCTGT
<i>Tubb4a</i> -R	TGCCTGCTCCGGATTGACCAAATA
<i>Ovgp1</i> -F	TGGACCCCTTTCTTTGTACG
<i>Ovgp1</i> -R	TGGACAGCAGTGTTCAGC
<i>Gapdh</i> -F	TGGAAAGCTGTGGCGTGAT
<i>Gapdh</i> -R	GGGTAGGAACACGGAAGGC

Note: *Tubb4a*—tubulin β class IVa; *Ovgp1*—oviductal glycoprotein 1.

**1.2.6 Western blotting 检测蛋白表达水平** 用含蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液提取WT和dKO小鼠输卵管上皮类器官蛋白,BCA试剂盒测定蛋白浓度,

加5×上样缓冲液在95℃金属浴中变性5 min。以每孔蛋白量20 μg上样,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后转至PVDF膜上。5%BSA室温封闭1 h,分别滴加抗FOXJ1抗体(1:1 000)、抗PAX8抗体(1:1 000)、抗GAPDH抗体(1:5 000),4℃孵育过夜,洗膜3次,加入山羊抗兔或山羊抗鼠二抗(1:5 000),室温孵育1 h。洗膜3次后,进行显影曝光,用ImageJ对条带灰度值分析。

**1.2.7 输卵管及其上皮类器官的苏木精-伊红染色** 将输卵管上皮类器官回收,500×g离心5 min,弃上清液,加入4%多聚甲醛,室温固定过夜;同时将WT和dKO小鼠处死并分离出输卵管,用4%多聚甲醛室温固定过夜。之后梯度浓度乙醇脱水,二甲苯透明1 h,石蜡(温度<50℃)浸泡2次,每次1 h;包埋后连续切片,厚度5 μm。脱蜡后,进行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, H-E)染色。

**1.2.8 免疫组织化学检测** 将脱蜡后的输卵管和输卵管上皮类器官切片梯度浓度乙醇水化,抗原修复。室温封闭15 min,弃封闭液,抗Ac-α-tubulin抗体(1:400)、抗PAX8抗体(1:500)、抗FOXJ1抗体(1:400)4℃孵育过夜。辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育15 min, DAB显色,苏木精染核,随后梯度浓度乙醇脱水,二甲苯透明,封片后显微镜下观察。

**1.2.9 透射电镜观察** 用2.5%戊二醛PBS固定液4℃固定输卵管类器官2 h,预冷PBS缓冲液洗涤2次,每次10 min;用1%锇酸PBS固定液4℃固定2 h,预冷双蒸水洗涤2次,每次10 min。30%、50%、70%乙醇(70%乙醇含3%醋酸双氧铀)逐级脱水,每次10 min;于4℃下进行块染。之后按80%、95%、100%、100%乙醇逐级脱水,每次10 min;环氧丙烷置换2次,每次10 min。Epon812包埋液与环氧丙烷1:1混合液浸透2 h, Epon812包埋液与环氧丙烷2:1混合液浸透过夜,纯Epon812包埋液37℃浸透6 h。60℃烘箱内包埋48 h后切片。枸橼酸铅染色后以透射电镜观察。

### 1.3 统计学分析

应用GraphPad Prism 8软件对实验数据进行绘图及统计学分析。定量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 $t$ 检验进行两组间比较。双侧检验,检验水平 $\alpha=0.05$ 。

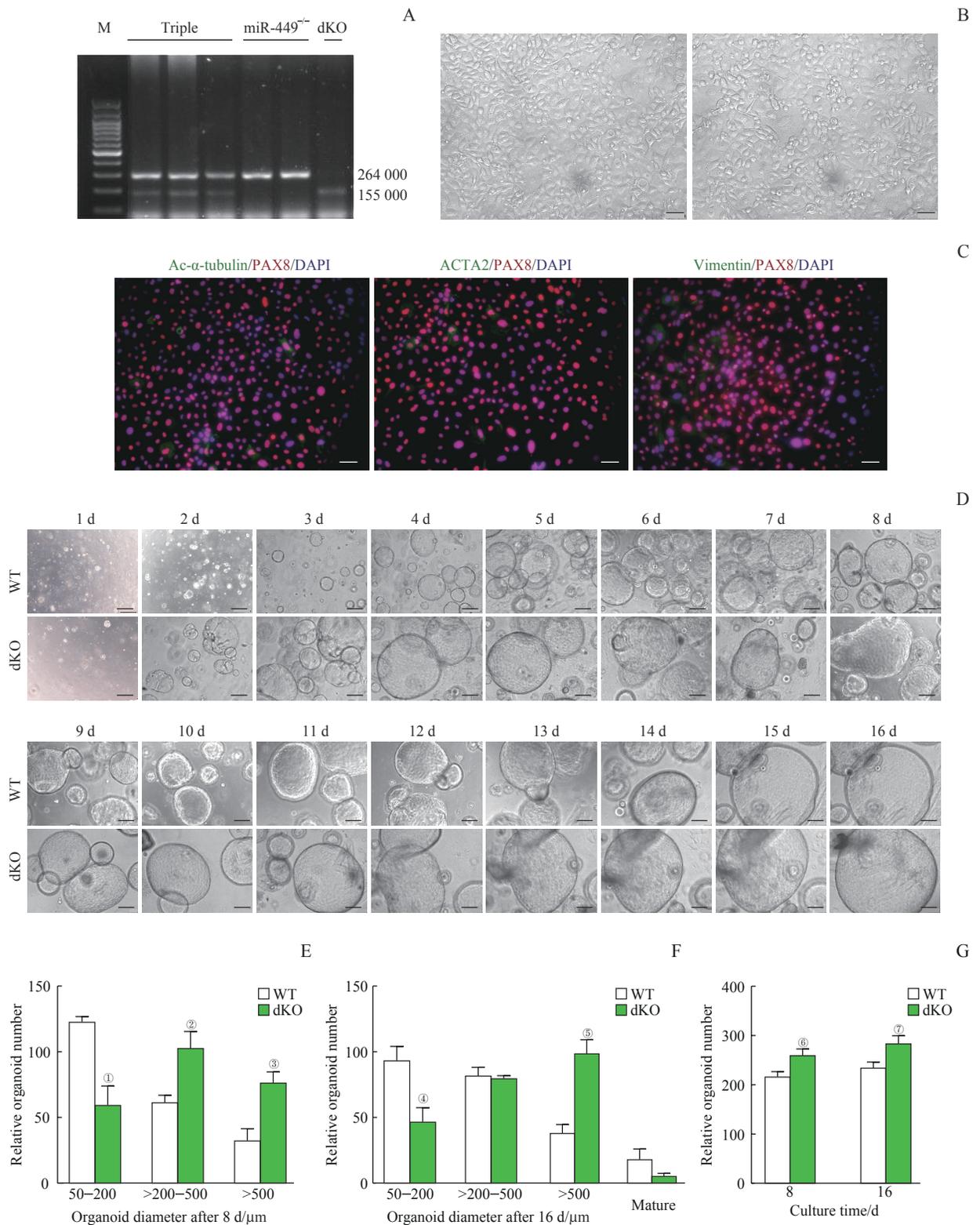
## 2 结果

### 2.1 WT小鼠和dKO小鼠输卵管上皮类器官形态学比较

利用PCR对miR-34b/c<sup>+/+</sup>且miR-449<sup>-/-</sup>小鼠繁殖的后代小鼠进行基因型检测,同时出现264 bp和155 bp条带的为miR-34b/c<sup>+/+</sup>且miR-449<sup>-/-</sup>(Triple)小鼠,出现1条264 bp条带的为miR-449<sup>-/-</sup>小鼠,出现1条155 bp条带的为miR-34b/c<sup>-/-</sup>且miR-449<sup>-/-</sup>(dKO)小鼠(图1A)。我们利用酶消化法将WT小鼠和dKO小鼠输卵管消化成单细胞或十几个细胞团的悬液,同时采用差速贴壁法对输卵管上皮细胞进行纯化。利用成纤维细胞分子标志物波形蛋白、平滑肌细胞分子标志物ACTA2、输卵管上皮分泌细胞分子标志物PAX8和纤毛细胞分子标志物Ac-α-tubulin进行纯化鉴定。结果(图1B)显示,分离纯化的输卵管上皮细胞贴壁后呈鹅卵石样生长,符合上皮细胞体外培养的生长状态。免疫荧光结果(图1C)显示,分离纯化的上皮细胞中90%以上是分泌细胞(PAX8<sup>+</sup>)及少量纤毛细胞(Ac-α-tubulin<sup>+</sup>),平滑肌细胞(ACTA2<sup>+</sup>)和成纤维细胞(vimentin<sup>+</sup>)的数量极其稀少,说明分离的输卵管上皮细胞纯度可达到90%以上,符合后续上皮细胞类器官培养的要求。将分离纯化的输卵管上皮细胞与基质胶混合种植于24孔板中培养,WT小鼠与dKO小鼠都可以形成紧密的球形细胞团。随着培养的进行,输卵管上皮类器官逐渐长大(图1D);与WT小鼠对比,dKO小鼠输卵管上皮类器官生长更快,体积更大(图1E、F),且数量也更多(图1G)。

### 2.2 输卵管上皮类器官的长期培养及传代

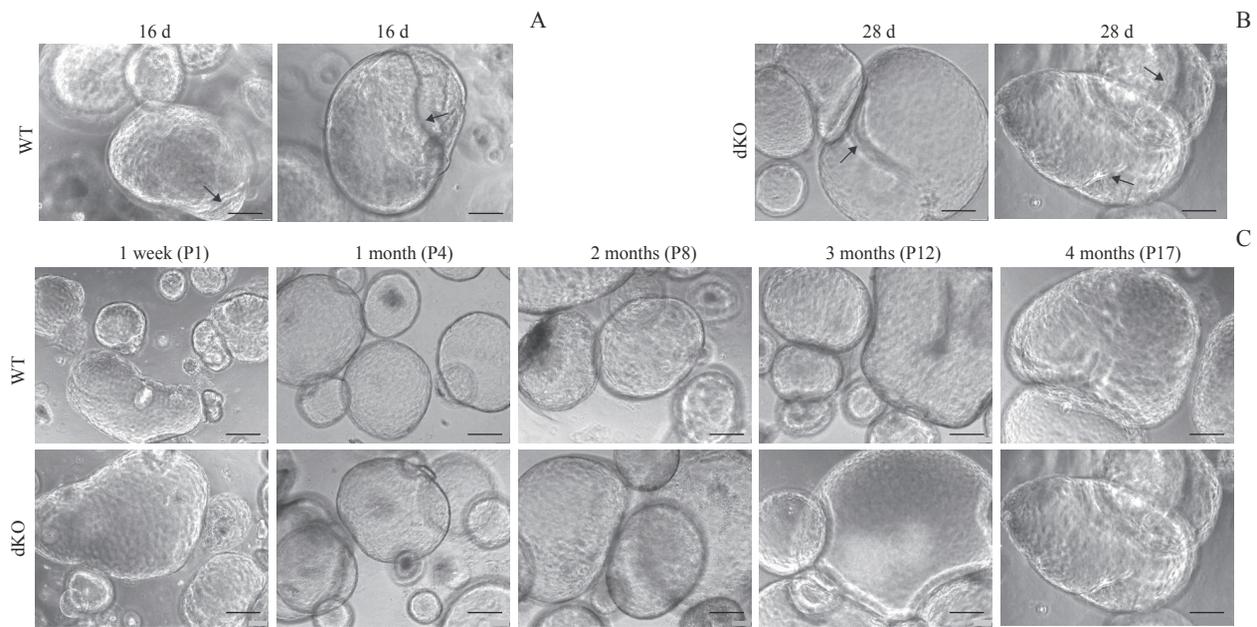
随着输卵管类器官培养时间的延长,WT与dKO小鼠输卵管上皮类器官都可以产生向内凹陷的结构,类似在体输卵管皱襞的表现(图2A、B),这是输卵管上皮类器官成熟的标志,与KESSLER等<sup>[19]</sup>报道的一致。但是相较于WT小鼠,dKO小鼠输卵管上皮类器官发育成熟较慢。WT小鼠输卵管上皮类器官在培养16 d时出现上皮内陷(图2A),而dKO小鼠在培养28 d时才出现内陷结构(图2B)。WT和dKO小鼠输卵管上皮类器官都可以长时间培养传代并存活,在体外至少可以传代17次,生长4个月(图2C)。



**Note:** A. Different genotypes of mice detected by PCR. Triple (miR-34b/c<sup>-/-</sup> and miR-449<sup>-/-</sup>), miR-449<sup>-/-</sup>, and dKO (miR-34b/c<sup>-/-</sup> and miR-449<sup>-/-</sup>). B. Primary culture of the oviductal epithelial cells (×400, scale bar=50 μm). C. Identification of the purity of the isolated oviductal epithelial cells using immunofluorescent staining. Ac-α-tubulin for showing ciliated cells, PAX8 for showing secretory cells, ACTA2 for showing smooth muscle cells, and vimentin for showing fibroblasts (×400, scale bar=50 μm). D. Phase contrast images of organoids formation and growth from WT mice and dKO mice (×100, scale bar=200 μm). E. The numbers of the organoids with different sizes were counted after 8 d. F. The numbers of the organoids with different sizes were counted after 16 d. G. The total numbers of organoids were counted after 8 d and 16 d. <sup>①</sup>P=0.002, <sup>②</sup>P=0.007, <sup>③</sup>P=0.004, <sup>④</sup>P=0.006, <sup>⑤</sup>P=0.001, <sup>⑥</sup>P=0.011, <sup>⑦</sup>P=0.013, compared with the WT group.

**图1 WT小鼠和dKO小鼠输卵管上皮类器官形态学比较**

**Fig 1 Morphological comparison of oviductal epithelial organoids from WT mice and dKO mice**



**Note:** A/B. Representative mature organoids with epithelial invaginations and foldings (arrows) after 16 d of WT mice (A) and after 28 d of dKO mice (B) ( $\times 100$ , scale bar=200  $\mu\text{m}$ ). C. Oviductal epithelial organoids culture of WT mice and dKO mice could be maintained at least for 4 months and 17 passages (P17) ( $\times 100$ , scale bar=200  $\mu\text{m}$ ).

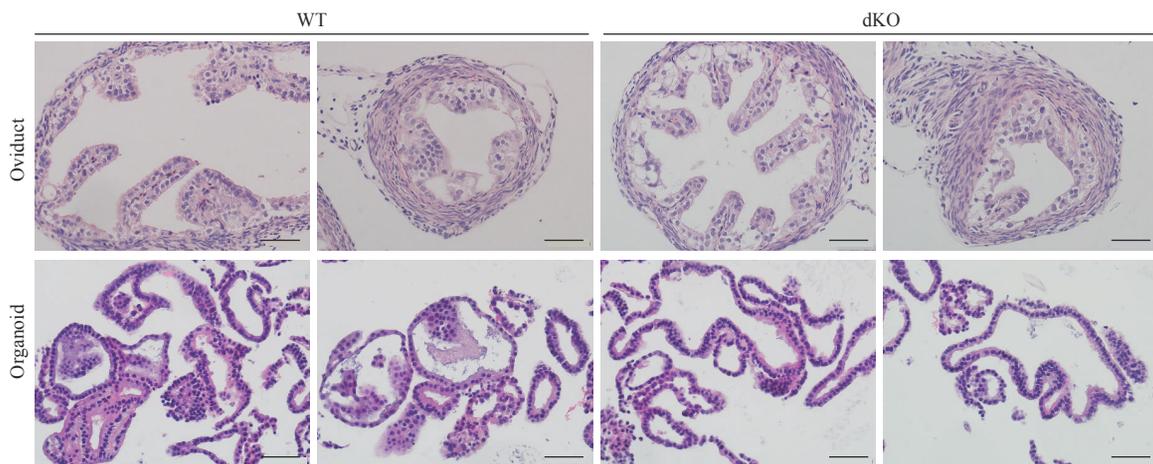
**图2** 输卵管上皮类器官的长期培养及传代

**Fig 2** Long-term culture and passage of oviductal epithelial organoids

### 2.3 输卵管上皮类器官的结构及细胞构成

通过H-E染色,我们发现大多数类器官由单层细胞组成,同时一些类器官表现出复杂的内部折叠结构,类似在体输卵管皱襞的表现(图3)。利用透射电镜观察,我们发现WT小鼠输卵管上皮类器官的纤毛细胞游离面有排列整齐的纤毛,而dKO小鼠输卵管上皮类器官纤毛细胞中基粒排列紊乱且无伸长的纤毛(图4A),这与在体的输卵管表型一致<sup>[22]</sup>。同时,在WT小鼠和dKO小鼠输卵管类器官中都可可见分泌细胞通过胞吐释放的分泌颗粒(图4B)。为进一步明确

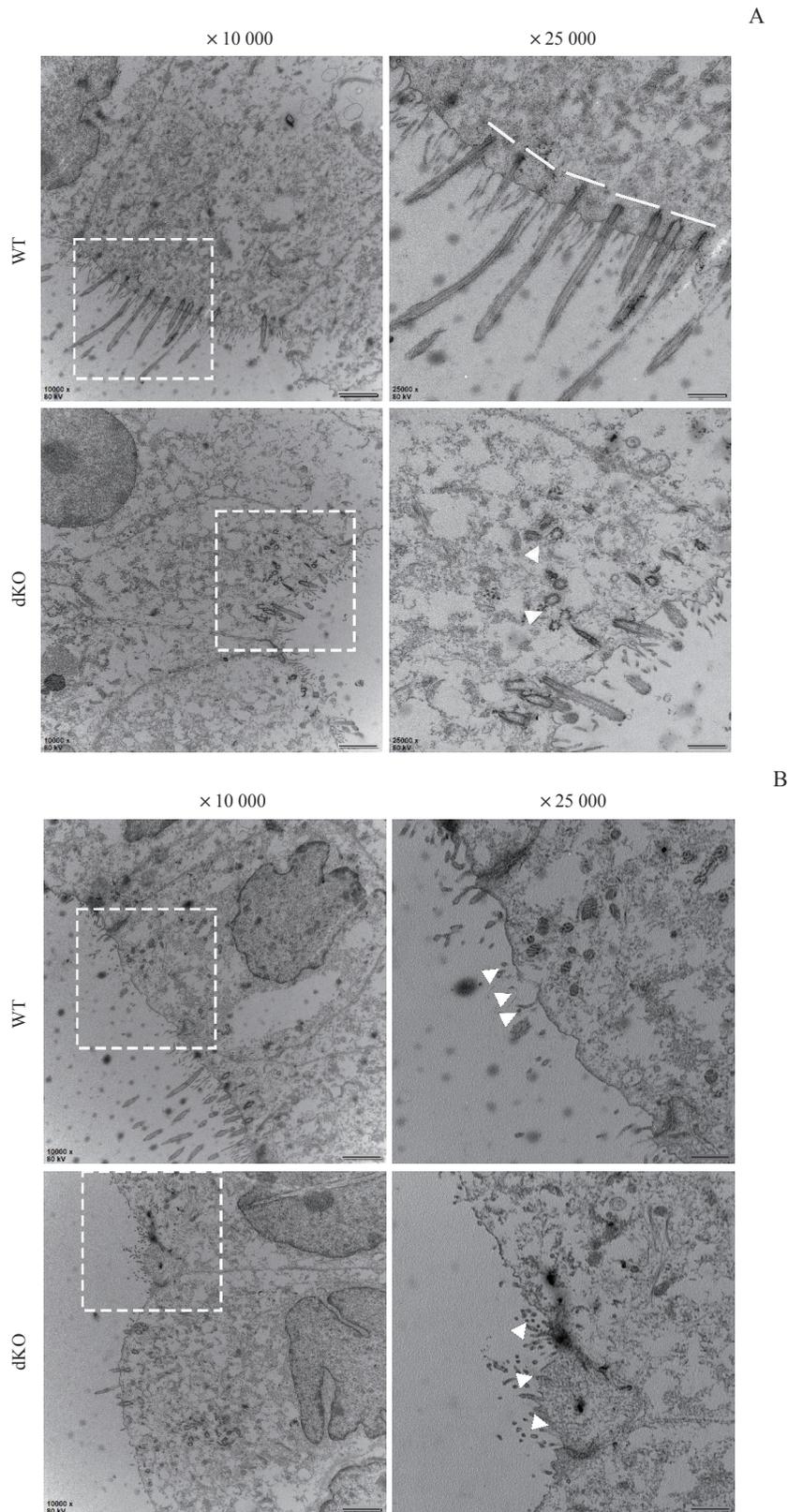
构成输卵管上皮类器官的细胞类型,利用分泌细胞分子标志物PAX8和纤毛细胞分子标志物Ac- $\alpha$ -tubulin对培养类器官(图5A)和输卵管组织(图5B)进行免疫荧光鉴定。免疫荧光结果显示,输卵管组织和类器官中2种细胞特异性分子标志物均为阳性,提示培养类器官主要由分泌细胞和纤毛细胞构成。与WT相比,dKO小鼠输卵管上皮类器官中Ac- $\alpha$ -tubulin<sup>+</sup>的纤毛细胞显著减少(图5C),而PAX8<sup>+</sup>的分泌细胞显著增多(图5D),这与在体dKO小鼠输卵管纤毛细胞显著减少的表型一致<sup>[21-22]</sup>。



**Note:** Comparison of the histology structure of the oviducts and the oviductal epithelial organoids from WT mice and dKO mice after 2 months of culture (scale bar=50  $\mu\text{m}$ ).

**图3** 光学显微镜下输卵管上皮类器官的结构(H-E染色,  $\times 400$ )

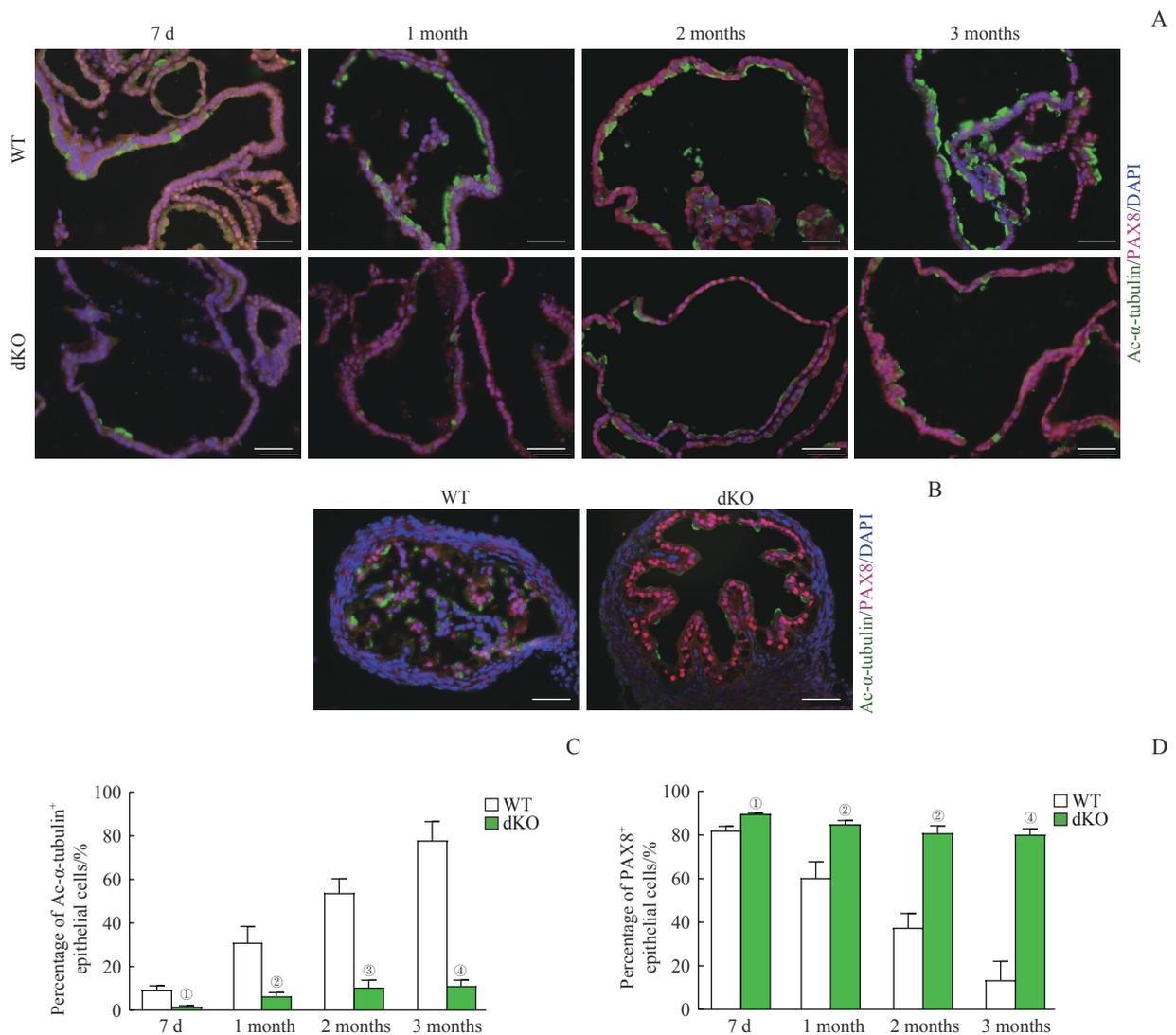
**Fig 3** Structure of the oviductal epithelial organoids under light microscopy (H-E staining,  $\times 400$ )



**Note:** A. Transmission electron microscopic images of the ciliated cells of oviductal epithelial organoids of WT mice and dKO mice after 2 months of culture (×10 000, scale bar=1 μm). The images on the right are the magnification ones in the dotted box on the left (×25 000, scale bar=500 nm). The white line showing the arrangement of the basal bodies, and the white arrows showing multiple disorganized centrioles. B. Transmission electron microscopic images of the secretory cells of oviductal epithelial organoids of WT mice and dKO mice after 2 months of culture (×10 000, scale bar=1 μm). The images on the right are the magnification ones in the dotted box on the left (×25 000, scale bar=500 nm). The white arrows showing the exocytosis granules by the secretory cells.

**图4** 输卵管上皮类器官中纤毛细胞和分泌细胞的微观结构

**Fig 4** Microstructures of ciliated cells and secretory cells in the oviductal epithelial organoids



**Note:** A/B. Co-immunofluorescent staining of Ac- $\alpha$ -tubulin (showing ciliated cells) and PAX8 (showing secretory cells) in the organoid sections (A) and the oviducts (B) of WT mice and dKO mice ( $\times 400$ , scale bar=50  $\mu\text{m}$ ). C/D. Quantification of ciliated cells (C) and secretory cells (D) of the organoids from WT mice and dKO mice across different culture time. ① $P=0.004$ , ② $P=0.005$ , ③ $P=0.001$ , ④ $P=0.000$ , compared with the WT group.

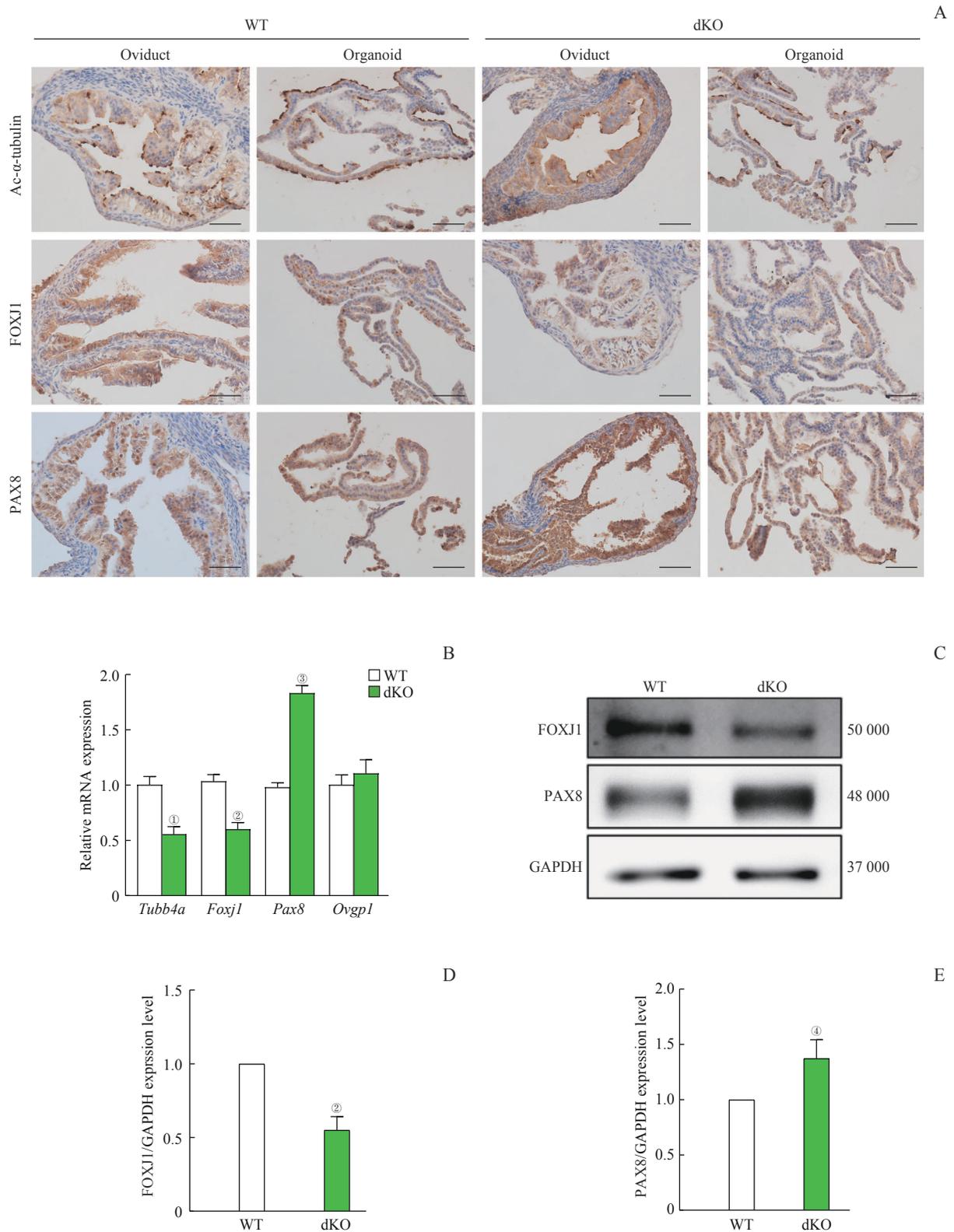
图5 输卵管上皮类器官的细胞构成

Fig 5 Cell composition of the oviductal epithelial organoids

## 2.4 纤毛细胞与分泌细胞相关基因在输卵管上皮类器官中的表达

我们对培养的输卵管上皮类器官分泌细胞和纤毛细胞相关分子标志物的表达进行检测。首先用免疫组织化学法检测输卵管组织和输卵管上皮类器官中 Ac- $\alpha$ -tubulin、FOXJ1 和 PAX8 的蛋白表达, 结果(图 6A)显示无论是 dKO 小鼠输卵管组织, 还是 dKO 小鼠输卵管上皮类器官中 Ac- $\alpha$ -tubulin、FOXJ1 的表达均较 WT 小鼠减少, 而 PAX8 的表达增加, 说明输卵管上皮类器官的分子表达模式与在体输卵管组织基本一致。然后利用 RT-qPCR 检测发现,

*Foxj1*、*Tubb4a* (纤毛细胞分子标志物) 和 *Pax8*、*Ovgpl* (分泌细胞分子标志物) 在 2 种输卵管类器官中均表达; 与 WT 小鼠类器官相比, dKO 小鼠类器官中 *Foxj1*、*Tubb4a* 的 mRNA 表达水平显著下降 (均  $P<0.05$ ), 而 *Pax8* 的 mRNA 表达水平显著升高 ( $P<0.05$ ) (图 6B)。利用 Western blotting 检测发现, dKO 小鼠输卵管上皮类器官中 FOXJ1 的蛋白表达水平显著降低, PAX8 表达显著升高 (均  $P<0.05$ , 图 6C~E), 这与小鼠在体输卵管组织的表型一致<sup>[21-22]</sup>, 说明培养的小鼠输卵管上皮类器官可以模拟在体输卵管上皮细胞的增殖和分化。



**Note:** A. Expression and localization of Ac- $\alpha$ -tubulin, FOXJ1, and PAX8 in the oviductal tissues and oviductal epithelial organoids of WT mice and dKO mice using immunohistochemical staining ( $\times 400$ , scale bar=50  $\mu\text{m}$ ). B. The expression levels of ciliated cell- and secretory cell-related genes of the oviductal epithelial organoids from WT mice and dKO mice detected by RT-qPCR. *Tubb4a* and *Foxj1* for ciliated cells. *Pax8* and *Ovgpl* for secretory cells. C–E. Western blotting analysis of FOXJ1 and PAX8 protein levels of oviductal epithelial organoids from WT mice and dKO mice (C) with quantitative analysis of FOXJ1 (D) and PAX8 (E). <sup>①</sup> $P=0.002$ , <sup>②</sup> $P=0.001$ , <sup>③</sup> $P=0.000$ , <sup>④</sup> $P=0.018$ , compared with the WT group..

**图 6** 纤毛细胞与分泌细胞相关基因在输卵管上皮类器官中的表达

**Fig 6** Expression levels of ciliated cell- and secretory cell-related genes in oviductal epithelial organoids

### 3 讨论

本研究成功建立了WT小鼠和dKO小鼠输卵管上皮类器官培养体系。该输卵管上皮类器官可以在体外稳定传代至少17代,长期生长,比原代细胞培养和气液交界培养更有优势,在光学显微镜和电镜下均呈现出与在体输卵管类似的结构,且与在体输卵管组织的Ac- $\alpha$ -tubulin、FOXJ1和PAX8的表达趋势一致,表明构建成功的输卵管上皮类器官可以很好地保持在体输卵管的组织结构特征和分子表达特性。相对于WT小鼠,dKO小鼠输卵管上皮类器官表现出纤毛细胞数量显著减少,纤毛细胞相关分子标志物表达显著下降的表型,与dKO小鼠在体输卵管表型一致,这说明该输卵管上皮类器官能够模拟在体输卵管上皮细胞的增殖和分化。

目前对输卵管上皮类器官的研究大多是基于正常人或小鼠进行,但对于输卵管上皮类器官是否能够模拟在体输卵管的疾病表型目前未见报道。本实验室<sup>[21]</sup>及其他研究小组<sup>[22]</sup>前期的研究发现miR-34/449高表达于小鼠输卵管中,且dKO雌鼠表现为输卵管上皮纤毛细胞显著减少,输卵管拾卵障碍而导致不孕的疾病表型,说明miR-34/449在输卵管上皮纤毛细胞的分化过程中发挥重要调控作用进而影响小鼠生育。本研究的dKO小鼠输卵管上皮类器官较WT小鼠的类器官生长速度更快,体积更大,数目更多,分泌细胞数目增加而纤毛细胞数目减少,也进一步提示敲除miR-34/449可能影响输卵管上皮细胞的增殖和分化,这需要进一步的实验探讨。因此,本研究成功构建的WT小鼠和dKO小鼠输卵管上皮类器官培养体系可为后续分子机制、功能验证奠定基础。

输卵管上皮类器官培养体系的构建,可为研究关键分子在输卵管上皮细胞增殖和分化中的作用和机制研究提供良好的体外研究模型,在发育生物学、生殖医学和肿瘤生物学领域发挥重要作用。比如利用输卵管上皮类器官培养系统来模拟输卵管上皮细胞的增殖和分化。研究<sup>[25-26]</sup>证明,异常增殖分化的输卵管上

皮细胞是高级别浆液性卵巢癌 (high-grade serous ovarian carcinoma, HGSC) 的主要细胞起源。利用输卵管上皮类器官培养体系,可为体外HGSC的疾病模型建立提供研究基础,为HGSC的易感基因筛查、药物筛选、药物毒理研究提供支撑等<sup>[27-28]</sup>。

本研究成功构建了不同基因型输卵管上皮类器官培养系统,并验证其能够模拟在体输卵管的表型,为进一步研究miR-34/449在输卵管上皮纤毛细胞分化中的作用和机制奠定了基础,也为研究其他关键分子在输卵管上皮细胞增殖和分化中的作用和机制提供了有用的体外研究模型。后续我们将对该输卵管上皮类器官进行进一步的功能验证,检测输卵管上皮类器官中纤毛细胞的运动功能和分泌细胞的分泌和营养功能。

#### 利益冲突声明/Conflict of Interests

所有作者声明不存在利益冲突。

All authors disclose no relevant conflict of interests.

#### 伦理批准和动物权利声明/Ethics Approval and Animal Right

本研究涉及的所有动物实验均已通过上海交通大学医学院科学伦理委员会的审核批准(文件号A2022-076)。所有实验过程均遵照《实验动物饲养管理与使用委员会标准》的条例进行。

All experimental animal protocols in this study were reviewed and approved by Scientific Ethics Committee of Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (Approval Letter No. A2022-076), and all experimental animal protocols were carried out following *The Guidelines of Institutional Animal Care and Use Committee*.

#### 作者贡献/Authors' Contributions

伍静文负责实验设计;吴其谦、胡燕琴、陈迦勒、李牧辰和赵有淦参与了实验操作;伍静文和吴其谦参与了论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意了最终稿件的提交。

The study was designed by WU Jingwen. The experiments were conducted by WU Qiqian, HU Yanqin, CHEN Jiale, LI Muchen and ZHAO Yougan. The manuscript was drafted and revised by WU Jingwen and WU Qiqian. All the authors have read the last version of the paper and consented for submission.

• Received: 2023-01-11

• Accepted: 2023-06-20

• Published online: 2023-07-28

### 参·考·文·献

[1] LI S, WINUTHAYANON W. Oviduct: roles in fertilization and early embryo development[J]. *J Endocrinol*, 2017, 232(1): R1-R26.

[2] TALBOT P, SHUR B D, MYLES D G. Cell adhesion and fertilization: steps in oocyte transport, sperm-zona pellucida

- interactions, and sperm-egg fusion[J]. *Biol Reprod*, 2003, 68(1): 1-9.
- [3] KÖLLE S, DUBIELZIG S, REESE S, et al. Ciliary transport, gamete interaction, and effects of the early embryo in the oviduct: *ex vivo* analyses using a new digital videomicroscopic system in the cow[J]. *Biol Reprod*, 2009, 81(2): 267-274.
- [4] CHEN S, SCHOEN J. Air-liquid interface cell culture: from airway epithelium to the female reproductive tract[J]. *Reprod Domest Anim*, 2019, 54(Suppl 3): 38-45.
- [5] CUI Y T, ZHAO H Q, WU S W, et al. Human female reproductive system organoids: applications in developmental biology, disease modelling, and drug discovery[J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2020, 16(6): 1173-1184.
- [6] KLASVOGT S, ZUSCHRATTER W, SCHMIDT A, et al. Air-liquid interface enhances oxidative phosphorylation in intestinal epithelial cell line IPEC-J2[J]. *Cell Death Discov*, 2017, 3: 17001.
- [7] ANDREI G, DURAFFOUR S, VAN DEN OORD J, et al. Epithelial raft cultures for investigations of virus growth, pathogenesis and efficacy of antiviral agents[J]. *Antiviral Res*, 2010, 85(3): 431-449.
- [8] LI D D, LI H, WANG Y, et al. Development and characterization of a polarized human endometrial cell epithelia in an air-liquid interface state[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 209.
- [9] LEVANON K, NG V, PIAO H Y, et al. Primary *ex vivo* cultures of human fallopian tube epithelium as a model for serous ovarian carcinogenesis[J]. *Oncogene*, 2010, 29(8): 1103-1113.
- [10] CHEN S, PALMA-VERA S E, KEMPISTY B, et al. *In vitro* mimicking of estrous cycle stages: dissecting the impact of estradiol and progesterone on oviduct epithelium[J]. *Endocrinology*, 2018, 159(9): 3421-3432.
- [11] ZHU M B, IWANO T, TAKEDA S. Fallopian tube basal stem cells reproducing the epithelial sheets *in vitro*-stem cell of fallopian epithelium[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(9): 1270.
- [12] RAJAGOPAL M, TOLLNER T L, FINKBEINER W E, et al. Differentiated structure and function of primary cultures of monkey oviductal epithelium[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2006, 42(8/9): 248-254.
- [13] DVORAK A, TILLEY A E, SHAYKHIEV R, et al. Do airway epithelium air-liquid cultures represent the *in vivo* airway epithelium transcriptome?[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011, 44(4): 465-473.
- [14] ALZAMIL L, NIKOLAKOPOULOU K, TURCO M Y. Organoid systems to study the human female reproductive tract and pregnancy[J]. *Cell Death Differ*, 2021, 28(1): 35-51.
- [15] ROSSI G, MANFRIN A, LUTOLF M P. Progress and potential in organoid research[J]. *Nat Rev Genet*, 2018, 19(11): 671-687.
- [16] CLEVERS H. Modeling development and disease with organoids[J]. *Cell*, 2016, 165(7): 1586-1597.
- [17] HUCH M, KNOBLICH J A, LUTOLF M P, et al. The hope and the hype of organoid research[J]. *Development*, 2017, 144(6): 938-941.
- [18] MEBARKI M, BENNACEUR A, BONHOMME-FAIVRE L. Human-cell-derived organoids as a new *ex vivo* model for drug assays in oncology[J]. *Drug Discov Today*, 2018, 23(4): 857-863.
- [19] KESSLER M, HOFFMANN K, BRINKMANN V, et al. The Notch and Wnt pathways regulate stemness and differentiation in human fallopian tube organoids[J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 8989.
- [20] XIE Y, PARK E S, XIANG D X, et al. Long-term organoid culture reveals enrichment of organoid-forming epithelial cells in the fimbrial portion of mouse fallopian tube[J]. *Stem Cell Res*, 2018, 32: 51-60.
- [21] WU J W, BAO J Q, KIM M, et al. Two miRNA clusters, miR-34b/c and miR-449, are essential for normal brain development, motile ciliogenesis, and spermatogenesis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(28): E2851-E2857.
- [22] YUAN S Q, WANG Z Q, PENG H Y, et al. Oviductal motile cilia are essential for oocyte pickup but dispensable for sperm and embryo transport[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(22): e2102940118.
- [23] LOUKAS I, SKAMNELOU M, TSARIDOU S, et al. Fine-tuning multiciliated cell differentiation at the post-transcriptional level: contribution of miR-34/449 family members[J]. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2021, 96(5): 2321-2332.
- [24] MERCEY O, POPA A, CAVARD A, et al. Characterizing isomiR variants within the microRNA-34/449 family[J]. *FEBS Lett*, 2017, 591(5): 693-705.
- [25] LABIDI-GALY S I, PAPP E, HALLBERG D, et al. High grade serous ovarian carcinomas originate in the fallopian tube[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1093.
- [26] PERETS R, WYANT G A, MUTO K W, et al. Transformation of the fallopian tube secretory epithelium leads to high-grade serous ovarian cancer in *Brc1; Tp53; Pten* models[J]. *Cancer Cell*, 2013, 24(6): 751-765.
- [27] ISHIGURO T, OHATA H, SATO A, et al. Tumor-derived spheroids: relevance to cancer stem cells and clinical applications[J]. *Cancer Sci*, 2017, 108(3): 283-289.
- [28] ZHANG S, DOLGALEV I, ZHANG T, et al. Both fallopian tube and ovarian surface epithelium are cells-of-origin for high-grade serous ovarian carcinoma[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 5367.

[本文编辑] 瞿麟平

