

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.12.002

小鼠肠道类器官三种不同条件培养基的比较研究 *

赵新华 马怡茗 张小利 贺龙梅 汪红英[△]

(国家癌症中心/国家肿瘤临床医学研究中心/中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院,分子肿瘤学国家重点实验室 北京 100021)

摘要 目的:比较三种不同条件培养基对小鼠类器官形态和增殖速度的影响。**方法:**取 C57BL/6 小鼠的小肠和结肠, EDTA 法分离隐窝, 以基质胶包埋, 加入不同小鼠肠道类器官培养基培养 7 天, 使用光学显微镜记录和比较类器官形成率和出芽情况。随后进行二代类器官培养, 使用 TrypLE 将类器官消化为单细胞, 重新包埋和培养, 使用光学显微镜记录和比较不同类器官培养基对二代类器官的培养效率。采用荧光定量 PCR 比较不同条件培养基类器官中干细胞标志物 Lgr5 和分化标志物 MUC2 的表达。使用免疫荧光法检测类器官中 ki-67 的表达。**结果:**对于小肠类器官的培养, 使用条件培养基 1、IntestiCult 条件培养基和 L-WRN 培养基培养结肠类器官的形成率分别为 $(18.2 \pm 4.5) \%$ 、 $(63.8 \pm 4.0) \%$ 和 $(82.1 \pm 8.4) \%$ 。其中使用 IntestiCult 条件培养基培养类器官的出芽率更高。对于结肠类器官的培养, 使用条件培养基 1、IntestiCult 条件培养基和 L-WRN 培养基培养结肠类器官的形成率分别为 $(17.3 \pm 7.3) \%$ 、 $(58.0 \pm 6.1) \%$ 和 $(46.3 \pm 7.4) \%$ 。对于二代类器官的培养, IntestiCult 条件培养基和 L-WRN 培养基都能够支持消化为单细胞后的二代类器官培养。干细胞标志物 Lgr5 和分化细胞(杯状细胞)标志物 MUC2 的表达无明显差异。使用 L-WRN 培养基的类器官 ki-67 阳性比例更高, 增殖速度更快。**结论:**本研究比较了三种不同条件培养基对小鼠类器官形态和增殖速度的影响。经过对比, L-WRN 培养基更有利于小鼠肠道类器官的形成和增殖速度。

关键词:肠道类器官; L-WRN 条件培养基; IntestiCult 条件培养基; 隐窝

中图分类号:R-33; R322.45; Q813 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2021)12-2207-05

Comparison of Mouse Intestinal Organoids Cultured Under Different Conditions*

ZHAO Xin-hua, MA Yi-ming, ZHANG Xiao-li, HE Long-mei, WANG Hong-ying[△]

(State Key Laboratory of Molecular Oncology, National Cancer Center/National Clinical Research Center for Cancer/Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing, 100021, China)

ABSTRACT Objective: To compare the effects of three different media on the morphology and proliferation of mouse organoids. Organoid culture is a new ex vivo research system for studying the differentiation and proliferation of adult intestinal stem cells. **Methods:** The crypts were separated from intestinal and colon of C57BL/6 mice using EDTA digestion buffer, and then embedded with Matrigel. Three different organoid culture medium were added and culture for 7 days. The organoid forming rate and budding number were compared under light microscope. After digesting with TrypLE, single cells were re-entrapped for the second generation culture using different organoid culture medium. The forming rate and budding number of second-generation organoid were compared under light microscope. Realtime-PCR was used to compare the expression of stem cell marker Lgr5 and Differentiation Marker Muc2 in organoids cultured with different conditional medium. Immunofluorescence assay was used to detect the ki-67 positive cells in colon organoids. **Results:** For the cultivation of small intestinal organoid, the formation rate were $(18.2 \pm 4.5) \%$, $(63.8 \pm 4.0) \%$ and $(82.1 \pm 8.4) \%$, respectively, using the conditioned medium 1, IntestiCult medium and L-WRN medium. Moreover, the budding rate and morphology were the best by IntestiCult medium. For colon organoid culture, the formation rate were $(17.3 \pm 7.3) \%$, $(58.0 \pm 6.1) \%$ and $(46.3 \pm 7.4) \%$ in the conditioned medium 1, IntestiCult medium and L-WRN medium respectively. Under L-WRN medium, the colon organoids could form shorter buds, and the morphology was better than other culture conditions. Both IntestiCult conditional medium and L-WRN conditional medium can support the second-generation organoid culture after digestion into single cells. The expression of stem cell marker LGR5 and goblet cell marker Muc2 showed no significant difference under different conditions. The positive rate of ki-67 was higher and the proliferation rate was faster in L-WRN medium. **Conclusions:** This study compared the effects of three different media on the morphology and proliferation of mouse organoids. L-WRN medium was more favorable for the formation and proliferation of intestinal organoids in mice.

Key words: Intestinal organoid; L-WRN conditioned medium; Intesticult conditioned medium; Crypt

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R322.45; Q813 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)12-2207-05

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81672891);

中国医学科学院医学与健康科技创新工程(2016-I2M-1-001; 2017-I2M-1-006; 2019-I2M-1-003)

作者简介: 赵新华(1962-), 男, 主管技师, 主要研究方向: 细胞生物学, 电话: 010-87787384, E-mail: zxh5170@126.com

△ 通讯作者: 汪红英(1973-), 女, 博士生导师, 研究员, 主要研究方向: 肿瘤微环境与肿瘤发生发展, E-mail: hywang330@hotmail.com

(收稿日期: 2020-12-29 接受日期: 2021-01-23)

前言

类器官培养是一种新兴的用来研究组织成体干细胞生长、分化、器官形成的体外研究系统^[1]。2009年,Sato等成功的将Lgr5+肠道干细胞培养成为肠道类器官,包含隐窝样区域和绒毛样上皮区域的三维结构^[2]。类器官中包含了肠道所有的细胞类型,且位置及功能与体内情况基本一致。近年来,肠道类器官被广泛应用于炎症性肠病^[3]、放射性肠炎^[4]以及肠癌^[5]等多种肠道疾病的研究。

目前,肠道类器官培养环境主要分为无血清和含血清两种:在无血清培养基中直接加入各种明确的细胞因子和化学物质^[6],或者收集滋养细胞(feeder cell)的条件培养基(含血清)用于类器官培养。无血清培养基中添加的生长因子价格昂贵,培养成本极高。而滋养细胞(如L-WRN等)能够分泌wnt3a,头蛋白(noggin)和R-脊椎蛋白(R-spondin)等细胞因子,使用其条件培养基极大的降低了实验的成本^[7]。本研究旨在比较上述不同类器官培养基对类器官形成和增殖的影响,为基于肠道类器官相关研究提供条件。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 6-8周龄SPF级雄性C57BL/6小鼠,体重18-20g,购于北京华阜康生物科技有限公司,实验方案通过中国医学科学院肿瘤医院动物伦理委员会审核,实验遵从实验动物3R原则,并给予实验动物人道主义关怀。

1.1.2 实验细胞系 L-WRN细胞系购于ATCC。

1.1.3 实验试剂 DMEM/F12培养基、4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸(HEPES)、L-丙氨酸-L-谷氨酰胺(GlutaMax)、N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine)、双抗(青霉素/链霉素)、B27、N2购自于美国Thermo Fisher公司;细胞因子R-spondin1、Noggin、表皮生长因子(Epidermal growth factor, EGF)和Wnt3a购自于美国R&D systems公司,基质胶(Matrigel™)购自于美国Corning公司;IntestiCult™类器官培养基购于Stem Cell Technology公司。倒置荧光显微镜(德国ZEISS公司)。

L-cell培养基:DMEM高糖培养基加入10%FBS,双抗。基础培养基:DMEM高糖培养基加入10%FBS,双抗,500 μg/mL G418,500 μg/mL 潮霉素。

初始培养基:DMEM/F12培养基加入20%FBS,双抗,2 mM GlutaMAX™。

1.2 实验方法

1.2.1 L-WRN条件培养基的收集 常规复苏L-WRN细胞,置于L-cell培养基中培养24h,更换为基础培养基,继续培养至细胞融合度95%以上。常规消化传代至2个75 cm²培养瓶,使用L-cell培养基继续培养至细胞长满。此时更换为初始培养基,培养24h后收集培养基至50 mL离心管中,同时在培养瓶中添加新的初始培养基,重复上述收集步骤4次。收集培养基混匀后,2000×g离心5 min,分装,保存于-20℃。

1.2.2 小鼠小肠隐窝提取 小鼠经CO₂麻醉后断颈处死,剪取约10 cm空肠段,冲洗至肠腔干净后,剪为5 mm片段,使用冰冷的含双抗PBS缓冲液剧烈冲洗15次,以去除小肠绒毛,直

至冲洗液澄清。使用含5 mM EDTA的PBS冰浴消化30 min,消化结束去除EDTA消化液,加入10 mL PBS吹打15次,自然沉降后,取悬液过70 μm滤网后离心收集(250×g, 5 min, 4℃)。显微镜下观察隐窝的完整程度,并计数。

1.2.3 小鼠小肠隐窝提取 剪取小鼠全结肠,剖开并冲洗至肠腔干净,剪为5 mm片段。使用含5 mM EDTA的PBS常温消化30 min,消化结束去除EDTA消化液,加入10 mL PBS剧烈吹打,自然沉降后,取悬液过70 μm滤网后离心收集(250×g, 5 min, 4℃)。显微镜下观察隐窝的完整程度,并计数。

1.2.4 小鼠肠道类器官培养 取200个隐窝,离心后使用25 μL类器官培养基重悬,加入25 μL冰冷的Matrigel混匀,接种于预热的24孔板板底中心,立即翻转倒置,于细胞培养箱中静止30 min,使Matrigel凝固。随后分别加入3种不同类器官培养基。条件培养基1(conditioned medium 1, CM-1):DMEM/F12加入1×B27, 1×N2, 2 mM GlutaMax, 1 mM N-acetylcysteine, 100 ng/mL Wnt3a, 100 ng/mL noggin, 500 ng/mL R-spondin1, 50 ng/mL EGF, 500 nM A8301, 10 μM SB202190, 双抗。L-WRN条件培养基:L-WRN条件培养基与初始培养基1:1混合,加入双抗。IntestiCult条件培养基:IntestiCult类器官培养基。每隔3-4天更换培养基。

1.2.5 小鼠类器官的消化与传代 培养7天后,收集类器官球,加入TrypLE消化5 min,完全消化为单细胞,离心重悬后重新包埋、传代培养。

1.2.6 总RNA的提取、mRNA的逆转录和PCR 使用Trizol法提取小鼠结肠组织的总RNA。使用NanoDrop K5600检测提取的总RNA的浓度和纯度。使用Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒(Thermo Scientific)将总RNA逆转录成为cDNA,采用SYBR premix Ex Taq II (TaKaRa Bio Inc., 大连, 中国)进行荧光定量PCR法检测Lgr5和MUC2在小鼠类器官中的表达,详细步骤按试剂盒说明书操作。

1.2.7 细胞免疫荧光 培养7天后,4%多聚甲醛固定30 min, PBS洗3次;加入封闭液室温30 min后,加入ki-67抗体,4℃孵育过夜;PBS洗3次后,加入FITC标记的二抗,室温孵育2 h, PBS洗3次,加入含DAPI的水性封片剂封片。使用正置荧光显微镜记录结果。

1.2.8 统计学分析 实验数据采用Graph Pad Prism 7.0 整理分析,数据符合正态分布,组间比较采用独立样本t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同条件培养基对小肠类器官形成的影响

分别使用不同条件培养基培养7天,结果显示,三种条件培养基均可培养出小肠类器官(图1)。使用条件培养基1(CM-1)的类器官形成率最低,约为(18.2±4.5)%,且球体小,出芽少。使用L-WRN条件培养基和IntestiCult条件培养基的类器官形成率分别为(63.8±4.0)%和(82.1±8.4)%。L-WRN组、IntestiCult组与CM-1组比较差异具有统计学意义($P < 0.001$)(图2)。

2.2 不同条件培养基对结肠类器官形成的影响

分离小鼠结肠,每孔接种200个形态完整的结肠隐窝,分

别使用不同条件培养基培养 6 天。结果显示,三种条件培养基均可培养出结肠类器官(图 3)。使用 CM-1 的类器官形成率最低(17.3 ± 7.3 %),且球体增殖慢,基本无出芽。使用 L-WRN 条件培养基和 IntestiCult 条件培养基的类器官形成率均达到

(58.0 ± 6.1 %)和 (46.3 ± 7.4 %),且有较短出芽。L-WRN 组、IntestiCult 组与 CM-1 组比较差异具有统计学意义($P < 0.001$) (图 4)。

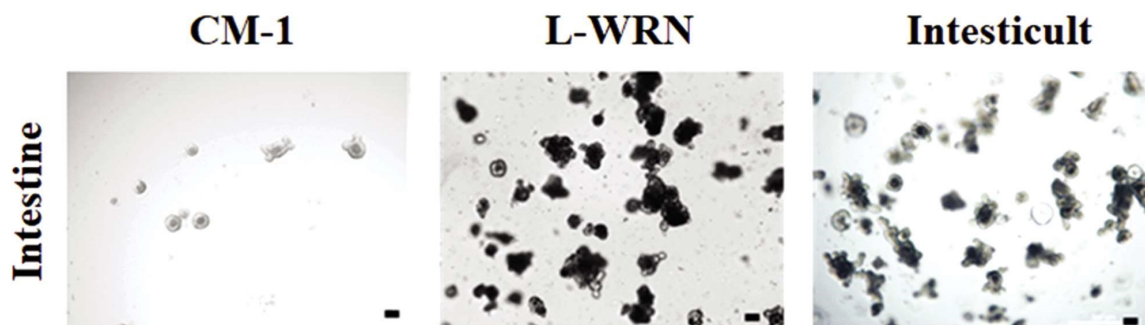


图 1 使用不同条件培养基培养小肠类器官

Fig.1 Culture of small intestinal organoid using different conditional medium

Note: Scale bars, 50 μ m.

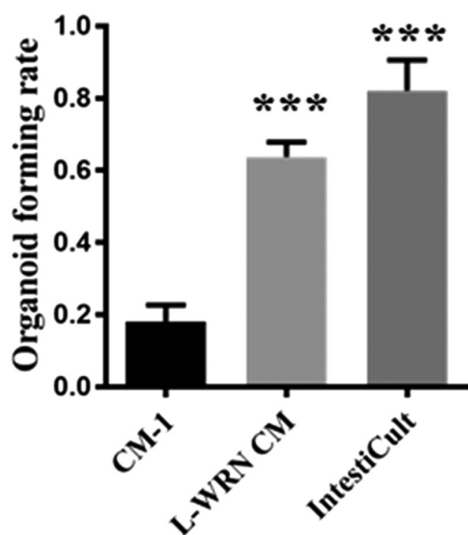


图 2 使用不同条件培养基培养小肠类器官的形成率

Fig.2 The formation rate of small intestinal organoid

Note: Data were expressed as $\bar{x} \pm SD$, $n=3$. *** $P < 0.001$, compared with group CM-1.

2.3 不同条件培养基对二代类器官形成的影响

为探索最佳培养条件,我们进一步对小肠和结肠类器官进行消化和传代培养,并分别用三种不同条件培养基进行培养。结果显示,CM-1 不能支持二代类器官的形成,而 L-WRN 条件培养基和 IntestiCult 条件培养基都能够成功培养二代类器官(图 5)。其中,L-WRN 条件培养基的小肠和结肠二代类器官形成率更高。

2.4 不同条件培养基对类器官干细胞标志物的影响

为明确不同条件培养基对类器官中肠道干细胞及其分化的影响,采用荧光定量 PCR 检测干细胞标志物 Lgr5 和分化细胞(杯状细胞)标志物 MUC2 的表达。结果显示 L-WRN 组和 IntestiCult 组对类器官干细胞和分化细胞比例无显著影响(图 6)。

2.5 不同条件培养基对类器官增殖速度的影响

采用免疫荧光染色法检测结肠类器官中的 ki-67 表达,比较不同条件培养基下的增殖速度。使用 L-WRN 组的 ki-67 阳性细胞比例显著高于 IntestiCult 组。

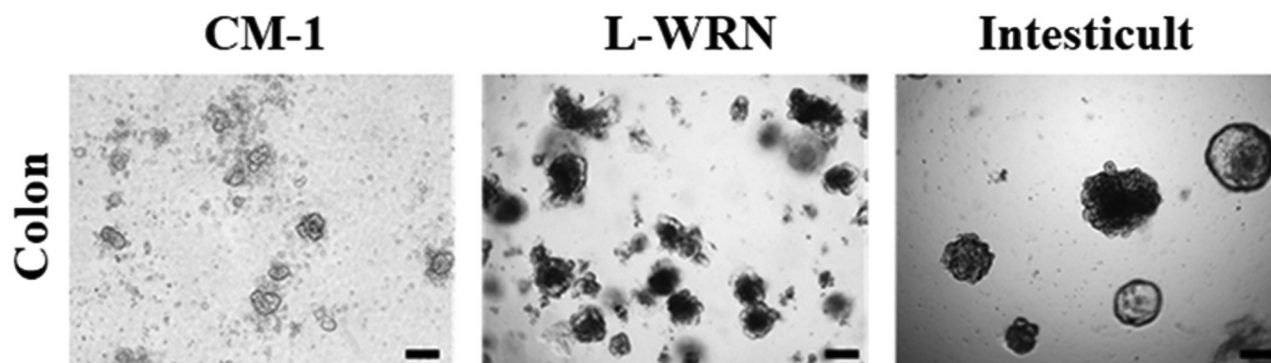


图 3 使用不同条件培养基培养结肠类器官

Fig.3 Culture of colon organoid using different conditional medium

Note: Scale bars, 100 μ m.

3 讨论

肠道负责营养的吸收和消化,具有复杂的细胞类型。小肠上皮层由隐窝和绒毛构成。小肠干细胞排列在隐窝底部,能够

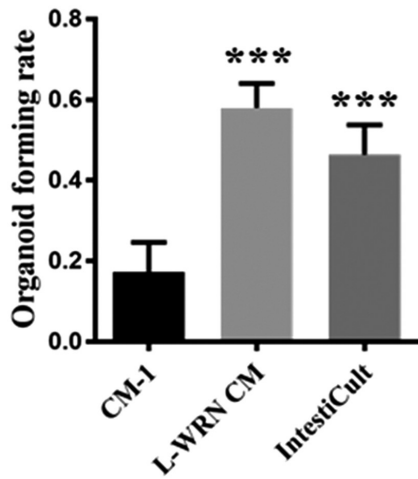


图4 不同条件培养基培养结肠类器官的形成率

Fig.4 The formation rate of colon organoid

Note: Data were expressed as $\bar{x} \pm SD$, $n=3$. *** $P<0.001$, compared with group CM-1.

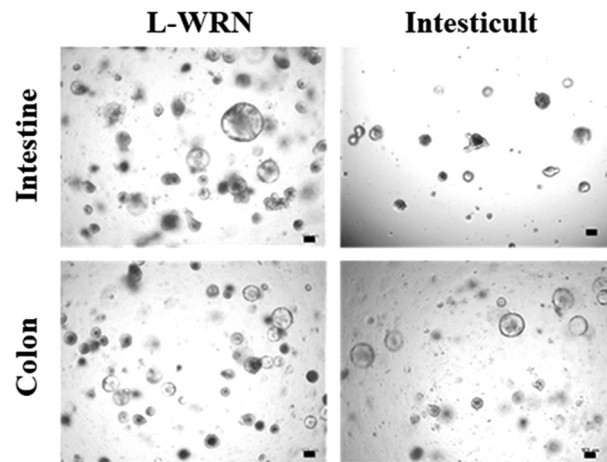


图5 不同条件培养基培养二代类器官

Fig.5 Representative images of second generation organoid from colon and intestinal

Note: Scale bars, 50 μm .

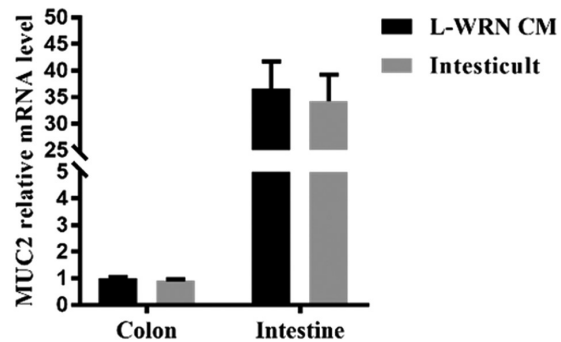
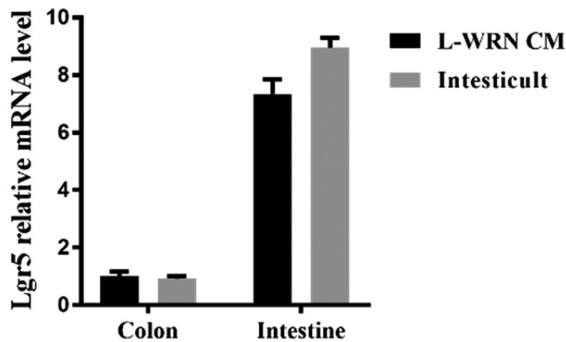


图6 荧光定量PCR检测小鼠肠道类器官中干细胞和分化标志物的表达

Fig.6 The mRNA levels of stem cell marker and goblet cell marker were detected by real-time PCR.

Note: Data were expressed as $\bar{x} \pm SD$, $n=5$.

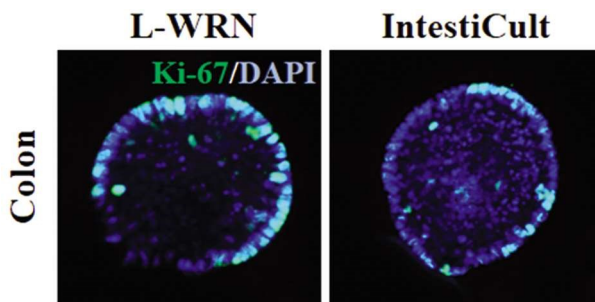


图7 免疫荧光染色检测 ki-67 表达

Fig.7 Immunofluorescence staining of ki-67 in colon organoids cultured with L-WRN and IntestiCult conditional medium

分化成为各种不同功能的肠上皮细胞 (intestinal epithelial cell, IEC),并沿绒毛向其顶部移动,最终凋亡脱落。终末分化的肠上皮细胞可分为分泌型和吸收型。其中分泌型包含内分泌细胞,杯状细胞和隐窝中的潘氏细胞^[8]。与之相比,结肠上皮无绒毛结构,无潘氏细胞存在,其他细胞类型与小肠基本相同^[9]。

细胞培养是体外研究肠道功能和疾病的重要工具。在过去几十年中,单层培养的癌细胞系或永生化细胞系已广泛应用于胃肠道研究。然而,正常组织通常不能在标准组织培养基中长期生长,而永生化细胞系的遗传特征在培养过程中发生变化。

2009年Sato等首先报道建立了小鼠肠道类器官培养系统,使用动物来源的基质胶(Matrigel)作为支架,同时添加头蛋白(noggin,骨形态发生蛋白信号通路抑制因子)、Wnt3a和R-脊椎蛋白(R-spondin,Wnt信号通路激动剂)的无血清培养环境支撑小鼠肠道上皮的三维生长。小肠上皮由隐窝和绒毛构成。肠道干细胞位于隐窝底部,与潘氏细胞间隔排列^[10]。其中,Lgr5+隐窝基底柱状细胞(crypt base columnar cell,CBC)为快速增殖干细胞,每24小时分裂一次^[11],产生短暂扩增细胞(Transient amplify cell,TA)。TA细胞继续分化增殖生成潘氏细胞、杯状细胞、神经内分泌细胞、Tuft细胞和吸收细胞等各种不同成熟肠道上皮细胞^[12]。结直肠上皮没有绒毛和潘氏细胞,CBC与行使潘氏细胞功能的Reg4+分泌细胞间隔排列^[13]。肠道类器官具有与隐窝类似的结构,可以在体外连续传代培养8个月以上,解决了肠道上皮细胞无法在体外稳定培养传代的问题^[2]。肠道类器官技术的出现,被广泛应用于肠道干细胞^[14,15]、肠道损伤修复^[16,17]与再生^[18]和肠道肿瘤^[19]等多种疾病的研究。

目前,肠道类器官培养环境主要分为无血清和含血清两种。本研究显示直接在无血清培养基中直接加入生长因子和化学物质的培养基培养效率最低,不同公司制备的细胞因子存在质量和活性差异,不能保证类器官培养效率的一致性。而

IntestiCult™ 类器官培养基是 Stem Cell Technology 公司与美国 Hans Clever 实验室共同开发的小鼠小肠类器官无血清培养基。与实验室自行配置培养基相比,其质量控制更加严格,培养效果稳定。本研究显示 IntestiCult™ 培养基能够非常有效的支撑小鼠小肠类器官的培养,但这一商售培养基的价格依然非常昂贵,限制了大规模使用的可能。2013 年,Hiroyuki Miyoshi 等构建了以 L-WRN 细胞条件培养基为基础的小鼠肠道类器官有血清培养系统^[7]。L-WRN 细胞以小鼠皮下结缔组织细胞 L-细胞为亲本,通过改造强制其分泌 Wnt-R-spindin3 和 noggin 三种细胞因子。该体系使用含 10%胎牛血清的条件培养基,能够在体外支持类器官连续传代培养 150 天以上(超过 50 代)^[7],极大的降低类器官培养成本。本研究结果显示,L-WRN 条件培养基同时适合于小肠和结肠类器官的培养。此外,L-WRN 条件培养基还可以应用于肠道肿瘤类器官的培养,在药物敏感性筛查层面发挥重要作用^[5,20]。类器官培养还可以进行 CRISPR-Cas9 基因编辑,而该技术的使用必须经由二代类器官的培养^[21-23]。本研究显示,L-WRN 条件培养基能够更有效的支撑肠道二代类器官的形成。进一步研究显示,该培养方法不影响类器官中干细胞和分化细胞的比例,但可显著提高类器官增殖速度。因此,该方法成本低,更适用于大规模的培养和应用。

肠道类器官培养是当下研究的焦点课题,相关研究领域正在蓬勃发展。其不仅是研究肠道发育^[24,25]和生理病理过程的有效工具^[26,27],还可用于药物筛选^[19,28-30],为肠道相关的基础和转化医学研究搭建起全新的研究平台。

参考文献(References)

- [1] 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
- [2] 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
- [3] Nakanishi Y, Reina-Campos M, Nakanishi N, et al. Control of Paneth Cell Fate, Intestinal Inflammation, and Tumorigenesis by PKC λ mbda/iota[J]. Cell Rep, 2016, 16(12): 3297-3310
- [4] Yan K S, Chia L A, Li X, et al. The intestinal stem cell markers Bmi1 and Lgr5 identify two functionally distinct populations [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(2): 466-471
- [5] van de Wetering M, Francies H E, Francis J M, et al. Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients [J]. Cell, 2015, 161(4): 933-945
- [6] Urbischek M, Rannikmae H, Foets T, et al. Organoid culture media formulated with growth factors of defined cellular activity [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 6193
- [7] Miyoshi H, Stappenbeck T S. In vitro expansion and genetic modification of gastrointestinal stem cells in spheroid culture [J]. Nat Protoc, 2013, 8(12): 2471-2482
- [8] Pellegrinet L, Rodilla V, Liu Z, et al. Dll1- and dll4-mediated notch signaling are required for homeostasis of intestinal stem cells[J]. Gastroenterology, 2011, 140(4): 1230-1240
- [9] van der Heijden M, Vermeulen L. Stem cells in homeostasis and cancer of the gut[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 66
- [10] Sato T, van Es J H, Snippert H J, et al. Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts [J]. Nature, 2011, 469(7330): 415-418
- [11] 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
- [12] de Sousa E M F, de Sauvage F J. Cellular Plasticity in Intestinal Homeostasis and Disease[J]. Cell Stem Cell, 2019, 24(1): 54-64
- [13] Sasaki N, Sachs N, Wiebrands K, et al. Reg4+ deep crypt secretory cells function as epithelial niche for Lgr5+ stem cells in colon[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016, 113(37): E5399-E5407
- [14] Beyaz S, Mana M D, Roper J, et al. High-fat diet enhances stemness and tumorigenicity of intestinal progenitors [J]. Nature, 2016, 531(7592): 53-58
- [15] Chiacchiera F, Rossi A, Jammula S, et al. Polycomb Complex PRC1 Preserves Intestinal Stem Cell Identity by Sustaining Wnt/ β -Catenin Transcriptional Activity [J]. Cell Stem Cell, 2016, 18(1): 91-103
- [16] Taniguchi K, Wu L W, Grivennikov S I, et al. A gp130-Src-YAP module links inflammation to epithelial regeneration[J]. Nature, 2015, 519(7541): 57-62
- [17] Yan K S, Gevaert O, Zheng G, et al. Intestinal Enteroendocrine Lineage Cells Possess Homeostatic and Injury-Inducible Stem Cell Activity[J]. Cell Stem Cell, 2017, 21(1): 78-90
- [18] Sugimoto S, Ohta Y, Fujii M, et al. Reconstruction of the Human Colon Epithelium In Vivo[J]. Cell Stem Cell, 2018, 22(2): 171-176
- [19] Sato T, Stange D E, Ferrante M, et al. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium[J]. Gastroenterology, 2011, 141(5): 1762-1772
- [20] Han Y, Duan X, Yang L, et al. Identification of SARS-CoV-2 inhibitors using lung and colonic organoids[J]. Nature, 2020
- [21] Roper J, Tammela T, Akkad A, et al. Colonoscopy-based colorectal cancer modeling in mice with CRISPR-Cas9 genome editing and organoid transplantation[J]. Nat Protoc, 2018, 13(2): 217-234
- [22] Fujii M, Clevers H, Sato T. Modeling Human Digestive Diseases With CRISPR-Cas9-Modified Organoids [J]. Gastroenterology, 2019, 156(3): 562-576
- [23] Roper J, Tammela T, Cetinbas N M, et al. In vivo genome editing and organoid transplantation models of colorectal cancer and metastasis [J]. Nat Biotechnol, 2017, 35(6): 569-576
- [24] Serra D, Mayr U, Boni A, et al. Self-organization and symmetry breaking in intestinal organoid development [J]. Nature, 2019, 569(7754): 66-72
- [25] Yan K S, Janda C Y, Chang J, et al. Non-equivalence of Wnt and R-spondin ligands during Lgr5(+) intestinal stem-cell self-renewal[J]. Nature, 2017, 545(7653): 238-242
- [26] Roerink S F, Sasaki N, Lee-Six H, et al. Intra-tumour diversification in colorectal cancer at the single-cell level [J]. Nature, 2018, 556(7702): 457-462
- [27] Serra D, Mayr U, Boni A, et al. Self-organization and symmetry breaking in intestinal organoid development [J]. Nature, 2019, 569(7754): 66-72
- [28] Ganesh K, Wu C, O'Rourke K P, et al. A rectal cancer organoid platform to study individual responses to chemoradiation [J]. Nat Med, 2019, 25(10): 1607-1614
- [29] Schnalzger T E, de Groot M H, Zhang C, et al. 3D model for CAR-mediated cytotoxicity using patient-derived colorectal cancer organoids[J]. EMBO J, 2019, 38(12): e100928
- [30] Li Y, Tang P, Cai S, et al. Organoid based personalized medicine: from bench to bedside[J]. Cell Regen, 2020, 9(1): 21