

# 高分利器 | 当单细胞测序遇到基因修饰小鼠.....

有了单细胞测序数据，如何出其不意，发表高水平文章，冲击CNS，走上人生巅峰呢？用好基因修饰小鼠是您的不二选择。

自2013年单细胞测序技术被Nature Methods杂志评为年度技术之后，已有数百篇CNS因此发表，单单在今年10月份就有至少48篇9分以上的文章见刊，这样的“得分”成就，不得不让人心动。

**单细胞测序技术**主要解决的问题是细胞异质性的问题，其优势在于能够避免Bulk样本的均质化掩盖单细胞的异质性。这类文章的研究思路一般是单细胞测序后获得数据，通过细胞注释，识别每一个细胞的特征，包括细胞类型、功能状态等，后续进行细胞群功能、基因功能、调控网络、发育时序等分析，乃至寻找新的临床标志物和治疗靶点。

然而单细胞测序文章“井喷”的现在，仅仅是测序后进行细胞注释、绘制图谱这样的内容只能发表5分左右的文章，在更高水平的文章中，细胞注释图基本只能作为文章中的Fig.1（图1）出现。有时甚至遇到刚拿到测序数据，别人同主题文章已经online的情况。

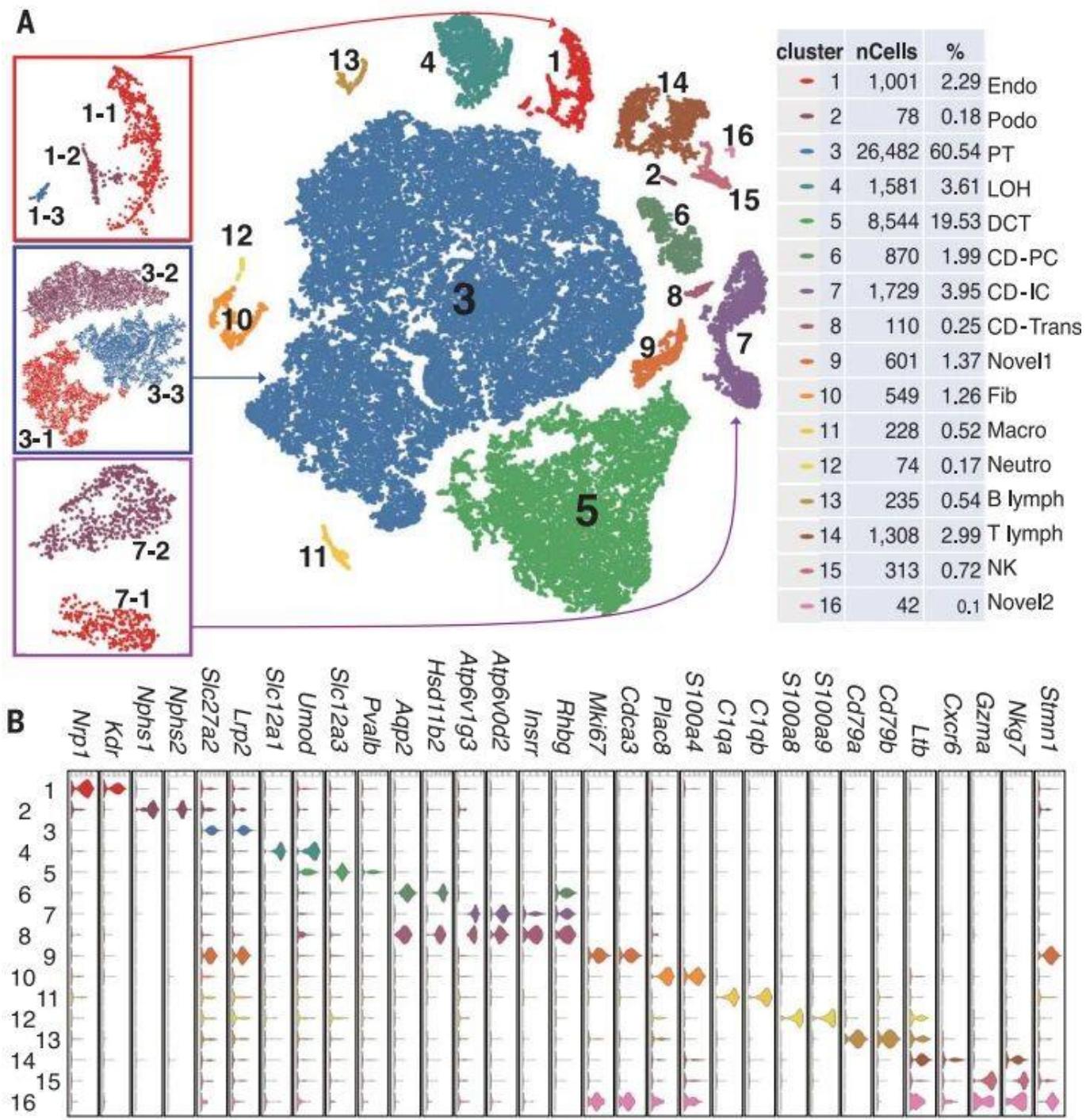


图1 小鼠肾脏细胞注释图谱示例

那有了单细胞测序数据，如何出其不意，发表高水平文章，冲击CNS，走上人生巅峰呢？用好基因修饰小鼠是您的不二选择。

所谓**基因修饰小鼠**是指目的基因被编辑后的小鼠模型，可以达到针对目的基因敲除，过表达，人源化，或敲入修饰元件的目的，因此可以用于对基因功能和细胞群生理作用的进一步探究。

综合多篇已发表高水平文章，不难发现，通过单细胞测序可以获得新的细胞群及其特异的marker基因，接下来，一方面可以利用基于基因修饰技术的谱系示踪小鼠在体内系统中实现对新细胞群的跟踪分析（即**细胞谱系示踪研究方向**）；另一方面，也可以通过基因修饰技术构建条件性基因敲除或条件性细胞剔除小鼠进行功能研究（即**基因或细胞功能研究方向**）。

以下，将用4个案例（两个方向）来具体说明如何利用基因修饰小鼠来延续单细胞测序课题，希望能给大家带来一点启发。

## 01细胞谱系示踪研究方向

### 案例1

【标题】单细胞转录组鉴定了前列腺远端内凹尖端一种独特的管腔祖细胞类型

【期刊】Nature Genetics (IF=27)

【时间】2020-8-17



## Single-cell transcriptomics identifies a distinct luminal progenitor cell type in distal prostate invagination tips

Wangxin Guo<sup>1,2,12</sup>, Lin Li<sup>1,2,12</sup>, Juan He<sup>1,2</sup>, Zhuang Liu<sup>1,2</sup>, Ming Han<sup>1,2</sup>, Fei Li<sup>1,2</sup>, Xinyi Xia<sup>1,2</sup>, Xiaoyu Zhang<sup>1,2</sup>, Yao Zhu<sup>3,4</sup>, Yu Wei<sup>3,4</sup>, Yunguang Li<sup>1,2</sup>, Rebiguli Aji<sup>1,2</sup>, Hao Dai<sup>1,2</sup>, Hui Wei<sup>1</sup>, Chunfeng Li<sup>1</sup>, Yu Chen<sup>1,5,6,7,8✉</sup>, Luonan Chen<sup>1,9,10✉</sup> and Dong Gao<sup>1,2,11✉</sup>

寻找去势抵抗性前列腺干细胞的研究一直是前列腺研究领域悬而未决的重要科学问题。本文的研究人员通过单细胞转录组测序，发现了三群新的前列腺管腔细胞（Luminal-A、Luminal-B和Luminal-C），分析发现Luminal-C细胞具有前列腺干细胞的潜能，并特异表达Tacstd2、Ck4和Psca。

为了在体内观察这群细胞的分布及特性，研究人员构建了两种Luminal-C细胞特异的谱系示踪小鼠（*Ck4*<sup>CreERT2/+</sup>; *Rosa26*<sup>tdTomato/+</sup> 和 *Psca*<sup>CreERT2/+</sup>; *Rosa26*<sup>EYFP/+</sup>）（南模生物提供），进一步确认了Luminal-C细胞的定位和分布。本文建立的谱系示踪小鼠即是在marker基因启动子下表达CreERT重组酶，并与含有flox-stop小鼠交配，在Tamoxifen诱导重组后获得特异性表达荧光的小鼠。

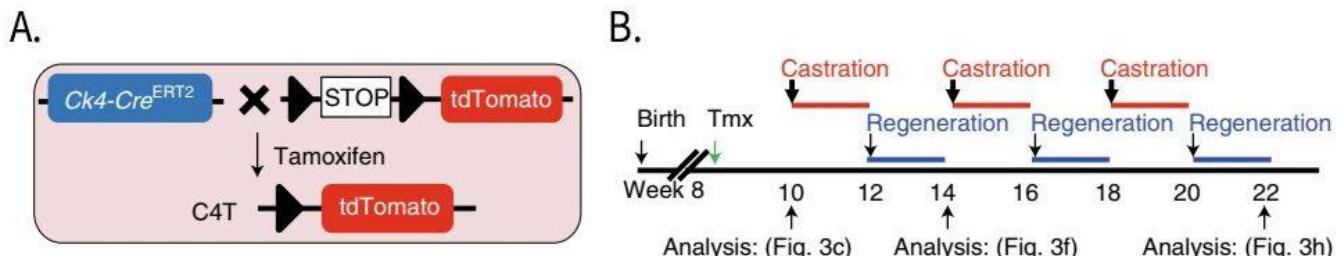


图2 Ck4-Cre鼠的构建和诱导

接着研究人员通过诱导前列腺组织再生，追踪Luminal-C细胞参与的生理活动，发现Luminal-C细胞通过自我更新和分化成Luminal-A和Luminal-B细胞的机制促进前列腺组织的损伤修复。这些实验证明了这群Luminal-C细胞是前列腺的成体干细胞。

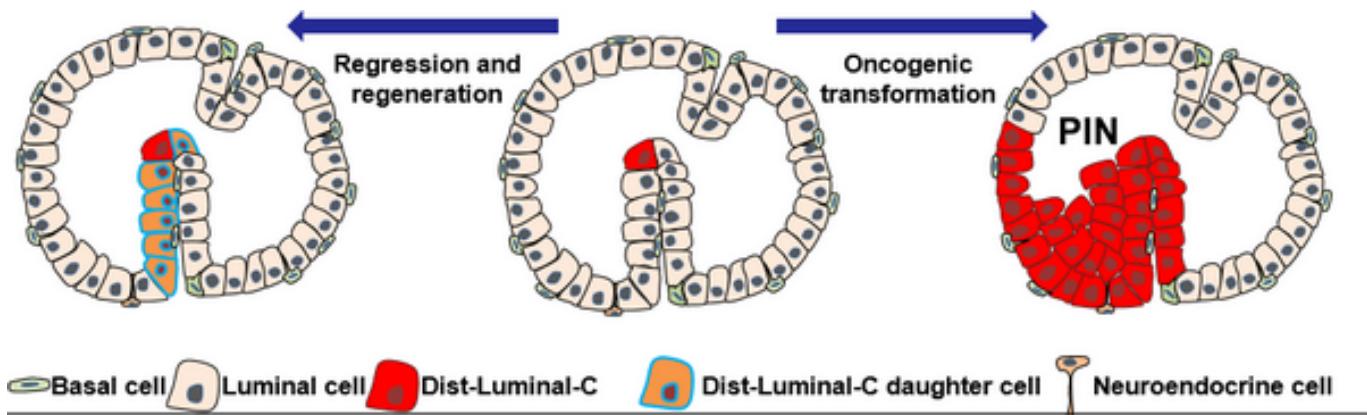


图3 Luminal-C细胞参与前列腺组织的损伤修复和癌变

## 案例2

【标题】通过Ms4a3表达追踪单核细胞谱系演变

【期刊】Cell (IF=36.2)

【时间】2019-9-5

Resource

Cell

## Fate Mapping via Ms4a3-Expression History Traces Monocyte-Derived Cells

Zhaoyuan Liu,<sup>1</sup> Yaqi Gu,<sup>1</sup> Svetoslav Chakarov,<sup>2</sup> Camille Blieriot,<sup>2</sup> Immanuel Kwok,<sup>2</sup> Xin Chen,<sup>1</sup> Amanda Shin,<sup>1</sup> Weijie Huang,<sup>1</sup> Regine J. Dress,<sup>2</sup> Charles-Antoine Dutertre,<sup>2</sup> Andreas Schlitzer,<sup>3</sup> Jinmiao Chen,<sup>2</sup> Lai Guan Ng,<sup>2</sup> Honglin Wang,<sup>1</sup> Zhiduo Liu,<sup>1</sup> Bing Su,<sup>1,4,\*</sup> and Florent Ginhoux<sup>1,2,5,6,\*</sup>

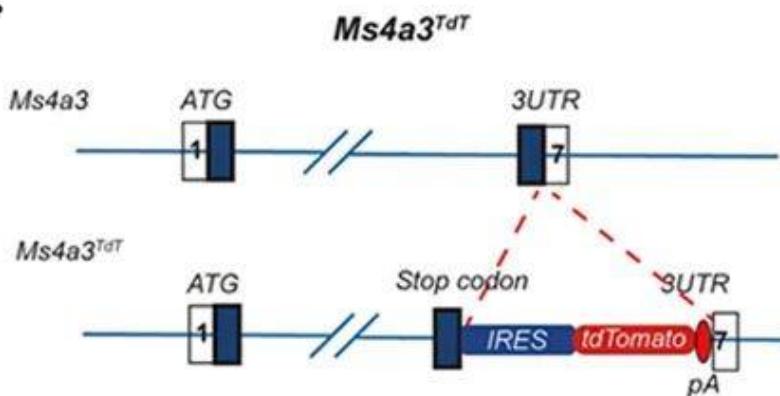
长期以来国际免疫学界关于单核-巨噬细胞来源和更新的不同学说有着较多的争议，文章通过单核细胞前体特异性的遗传学谱系示踪模型，揭示了单核细胞（monocyte）在骨髓中的发育过程以及成体组织巨噬细胞（Tissue-resident macrophage）的更新过程。

研究人员首先利用单细胞测序技术分析了骨髓中单核细胞和树突状细胞前体，发现了在单核细胞前体中特异性表达的基因Ms4a3。研究人员构建了Ms4a3<sup>TdT</sup>，Ms4a3<sup>Cre</sup>和Ms4a3<sup>CreERT2</sup>小鼠（南模生物提供），通过流式分析表达tdTomato的细胞是否表达血系其他类别细胞的标志物，追踪Ms4a3<sup>+</sup>细胞的时空变化。

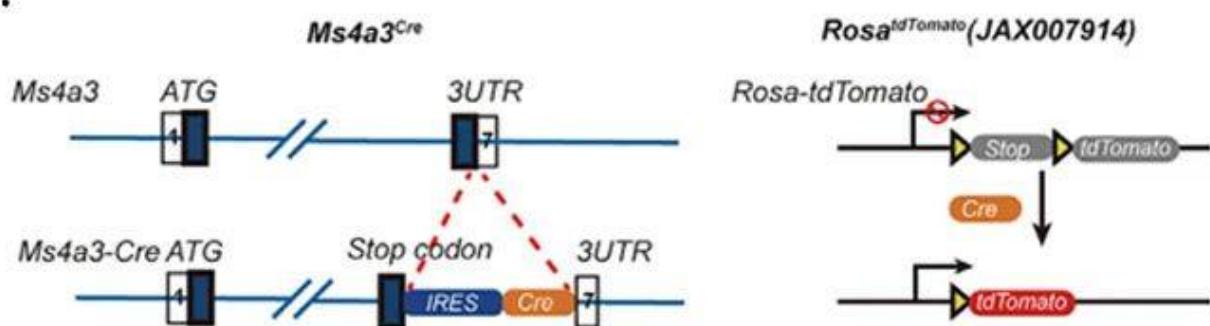
在此使用了3种常规的细胞标记方法，第一种是直接将荧光蛋白偶联在Ms4a3蛋白上，示踪内源性蛋白，另两种基于Cre-loxP系统，在于带有荧光蛋白的floxed鼠交配后获得表达荧光的蛋白的Ms4a3<sup>+</sup>细胞，其中CreERT2小鼠可

以实现在特定时间产生荧光蛋白。

A.



B.



C.

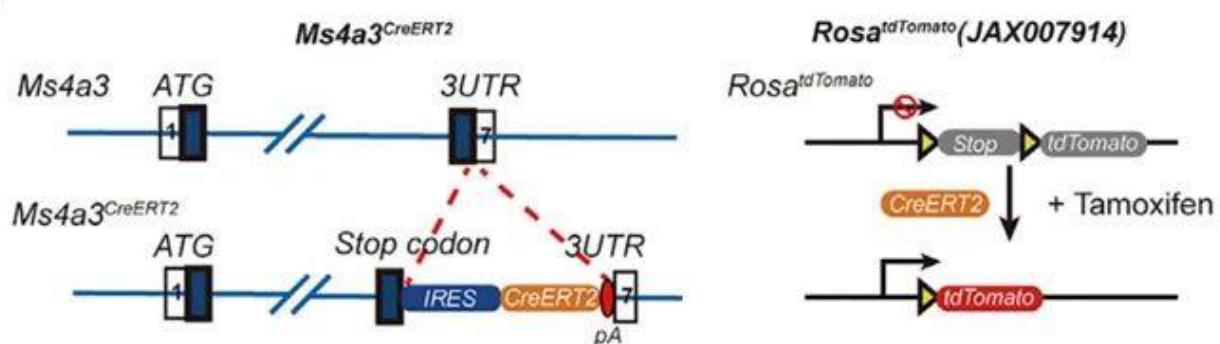


图4 *Ms4a3<sup>TdT</sup>*, *Ms4a3<sup>Cre</sup>*和*Ms4a3<sup>CreERT2</sup>*小鼠的构建

该模型成为阐释单核-巨噬细胞发育的关键工具。通过这些遗传学示踪模型，研究人员详细阐释了单核细胞在骨髓中的发育过程。在骨髓中单核细胞可以通过“1) CMP→GMP→cMoP→单核细胞；2) CMP→MDP→单核细胞”这两条途径产生。

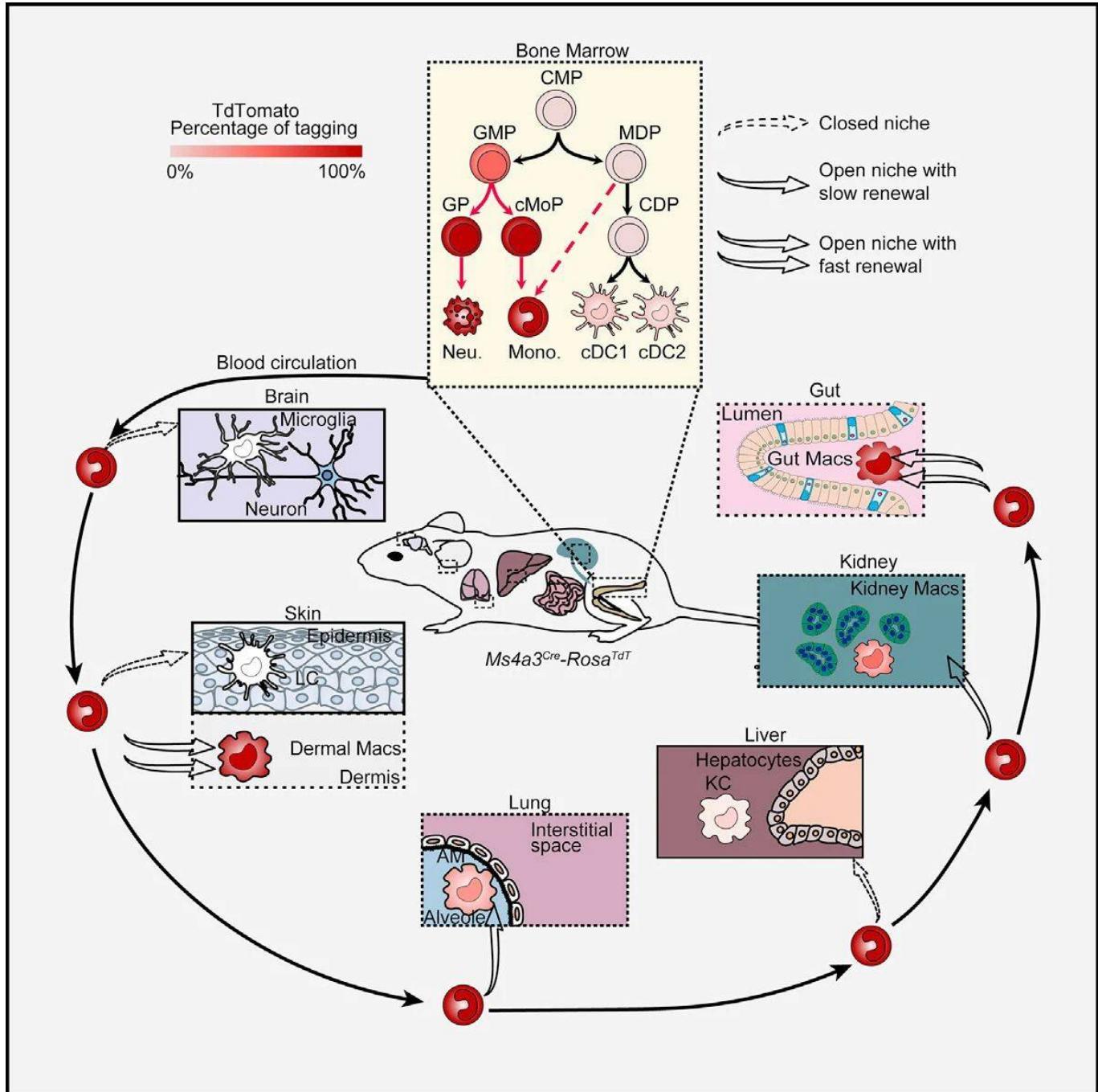


图5 Ms4a3可作为单核细胞和粒细胞的谱系示踪marker基因

## 02 基因或细胞功能研究方向

### 案例3

【标题】补体信号决定B细胞在化疗诱导免疫中的相反作用

【期刊】Cell (IF=36.2)

【时间】2020-3-19

# Complement Signals Determine Opposite Effects of B Cells in Chemotherapy-Induced Immunity

Yiwen Lu,<sup>1,2,6</sup> Qiyi Zhao,<sup>3,6</sup> Jian-You Liao,<sup>1,6</sup> Erwei Song,<sup>1,2</sup> Qidong Xia,<sup>1,2</sup> Jiayao Pan,<sup>1,2</sup> Yihong Li,<sup>1,2</sup> Jiaqian Li,<sup>1,2</sup> Boxuan Zhou,<sup>1,2</sup> Yingying Ye,<sup>1,2</sup> Can Di,<sup>1,2</sup> Shubin Yu,<sup>1,2</sup> Yunjie Zeng,<sup>5</sup> and Shicheng Su<sup>1,2,3,4,7,\*</sup>

在该研究中，作者分别收集了乳腺癌患者接受新辅助化疗前后的肿瘤组织，从4例配对的化疗前后临床标本中，分别分离出总共998和1499个肿瘤浸润B细胞进行单细胞测序。进一步通过流式分析在另外的79对标本中进行验证。发现在化疗前肿瘤浸润B细胞以IL-10<sup>+</sup>的细胞为主，化疗后治疗效果好的病人IL-10<sup>+</sup>肿瘤浸润B细胞明显减少，取而代之的是一群以ICOSL<sup>+</sup>CR2<sup>high</sup>IL-10<sup>-</sup>CD20<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgA<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup>为特征的B细胞亚群。

进一步对细胞亚群进行研究，发现肿瘤浸润ICOSL<sup>+</sup>B细胞的数目与化疗反应性正相关，这群ICOSL<sup>+</sup>B细胞比起ICOSL<sup>-</sup>B细胞更倾向于定位在化疗后形成的三级淋巴样结构中，并且与T细胞直接接触。

既往研究发现肿瘤中ICOSL主要由髓系细胞表达，另一方面滤泡树突状细胞也表达CR2，如何特异检测ICOSL和CR2在B细胞的作用呢？因此，作者构建了ICOSL-floxed 和CR2-floxed 小鼠（南模生物提供），通过与CD19-Cre工具鼠杂交，特异敲除B细胞的ICOSL和CR2。利用该模型，作者发现肿瘤细胞在化疗药物处理后，表面外翻的磷脂酰丝氨酸（Phosphatidylserine, PS）能够引发补体C3活化进而通过CR2激活B细胞，使得B细胞表达ICOSL，诱导CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞分别向辅助T细胞（Th1）及细胞毒性T细胞（CTL）分化，从而促进抗肿瘤免疫。

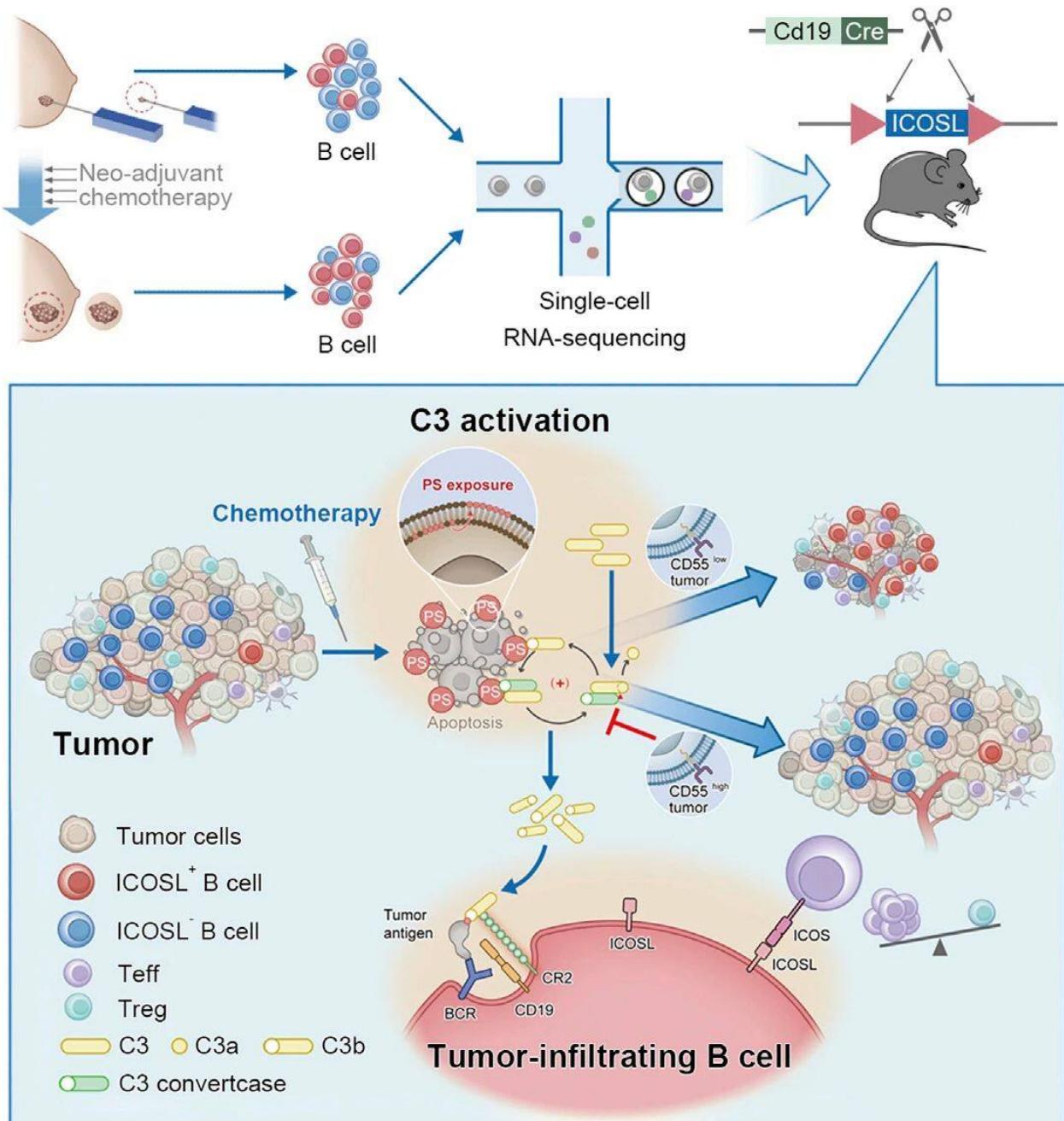


图6 ICOSL<sup>+</sup>B细胞促进抗肿瘤免疫

#### 案例4

【标题】Sca1<sup>+</sup>动脉血管干细胞产生新生平滑肌用于动脉修复和再生

【期刊】Cell Stem Cell (IF=20)

【时间】2020-3-19

# Arterial Sca1<sup>+</sup> Vascular Stem Cells Generate De Novo Smooth Muscle for Artery Repair and Regeneration

Juan Tang,<sup>1,12</sup> Haixiao Wang,<sup>1,12</sup> Xiuzhen Huang,<sup>1,12</sup> Fei Li,<sup>1,12</sup> Huan Zhu,<sup>1</sup> Yan Li,<sup>1</sup> Lingjuan He,<sup>1</sup> Hui Zhang,<sup>2</sup> Wenjuan Pu,<sup>1</sup> Kuo Liu,<sup>1,2</sup> Huan Zhao,<sup>1</sup> Jacob Fog Bentzon,<sup>3,4</sup> Ying Yu,<sup>5</sup> Yong Ji,<sup>6,7</sup> Yu Nie,<sup>8</sup> Xueying Tian,<sup>9</sup> Li Zhang,<sup>10,\*</sup> Dong Gao,<sup>1,11,\*</sup> and Bin Zhou<sup>1,2,9,11,13,\*</sup>

长久以来，对于成体哺乳动物体内是否存在Sca1<sup>+</sup>血管平滑肌干细胞及其在损伤中的作用，一直没有出现直接的验证文章。在本项研究中，研究人员首先将获得的小鼠股动脉细胞利用单细胞转录组测序，分析发现Sca1主要表达在血管的内皮细胞、血管外基质细胞和脂肪细胞等部位。接着研究人员利用Sca1-CreER谱系示踪系统，通过免疫荧光染色和流式分析，发现在股动脉中Sca1主要标记血管中的部分内皮细胞，血管外侧的PDGFR $\alpha$ 和PDGFR $\beta$ 基质细胞以及少量的脂肪细胞，不标记血管平滑肌细胞。

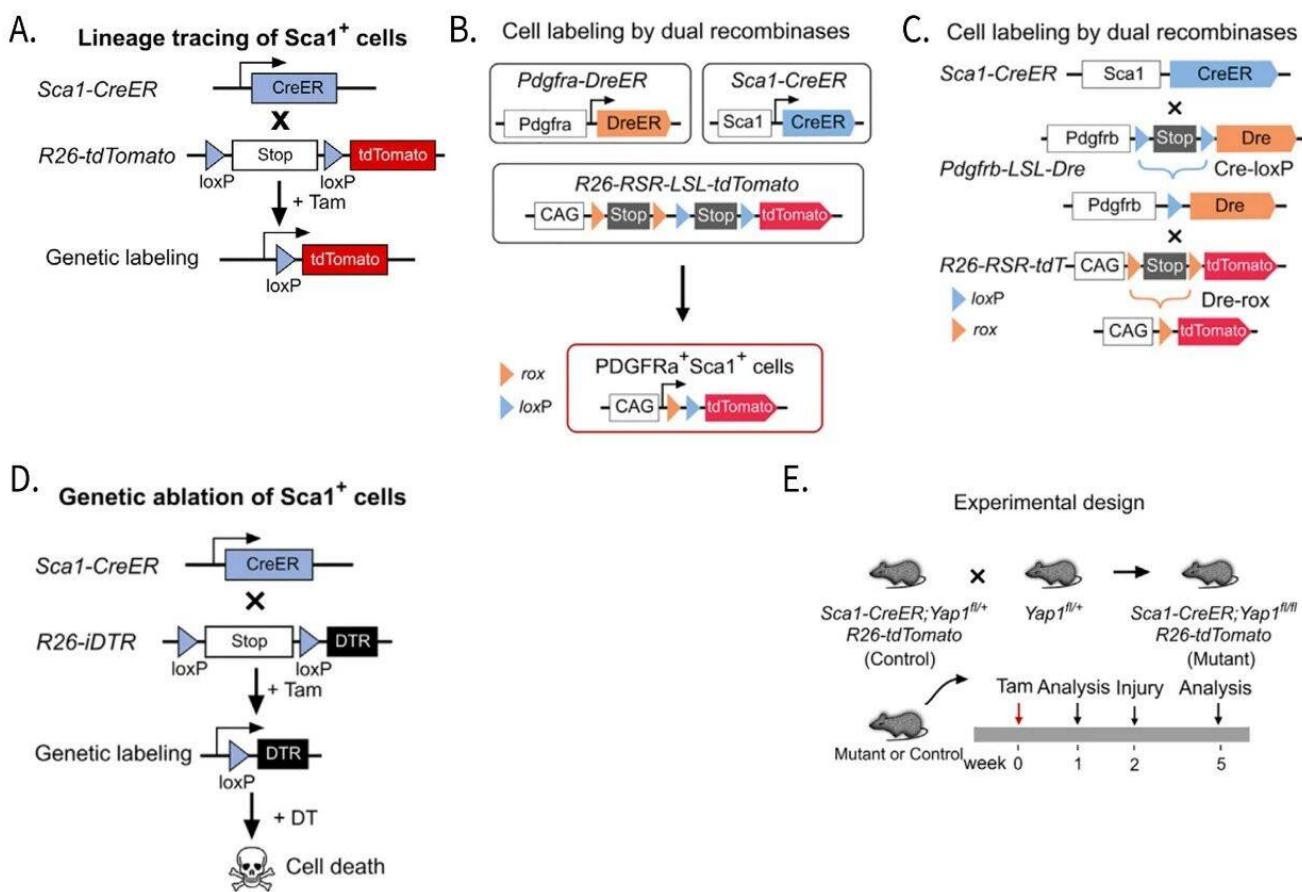


图7 研究人员构建的细胞谱系示踪小鼠、条件性细胞剔除小鼠和条件性基因敲除小鼠

那Sca1<sup>+</sup>细胞是否能分化为平滑肌细胞呢？研究人员构建了两种血管损失小鼠模型，发现在严重损伤的情况下，利用Sca1-CreER谱系示踪系统可以检测到Sca1<sup>+</sup>细胞转分化为成熟的（SMA<sup>+</sup>SM22<sup>+</sup>SM-MHC<sup>+</sup>CNN1<sup>+</sup>）平滑肌细胞。由于血管中的Sca1标记了多种细胞，科研人员利用多种Cre和Dre示踪小鼠，发现严重血管损伤模型中Sca1<sup>+</sup>PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>细胞是可以转分化为平滑肌细胞，而其它类型细胞不可以。

最后，研究人员建立了**R26-DTR**小鼠和**YAP<sup>f/f</sup>**小鼠发现，在特异性剔除Sca1<sup>+</sup>细胞后，或者敲除Sca1<sup>+</sup>细胞中的YAP基因，都会减少分化的平滑肌细胞。这项研究证明Sca1<sup>+</sup>PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>细胞具有转分化潜能，同时阐明YAP基因在转分化中起到了重要的作用，为血管损伤重塑研究提供了新的研究方向及理论基础。

综上所述，单细胞测序技术是为了在更高分辨率的细胞水平上的研究，归根到底仍然是需要聚焦到一个marker基因，或者是表达这个marker基因的细胞群上，而通过基因修饰小鼠，可以更加清楚和真实的记录细胞和基因在体内的特征和功能，高分文章也就手到擒来。

对于生信分析小白来说，寻找marker基因的过程，不甚友好，在此推荐两个数据库，**Mouse cell atlas**和**Sc2disease**。Mouse cell atlas是浙大郭国冀团队对小鼠近50种器官组织的40余万个单细胞进行了系统性的单细胞转录组分析制作而成的小鼠细胞图谱，而SC2disease是西北工业大学彭佳杰教授课题组开发建立的，包含目前已检测的22种疾病的单细胞转录组数据，在这两个网站上直接搜索感兴趣的组织、器官、疾病，可以轻松get特定细胞群的marker基因。

网址如下：

<http://bis.zju.edu.cn/MCA/index.html>

<http://easybioai.com/sc2disease/>

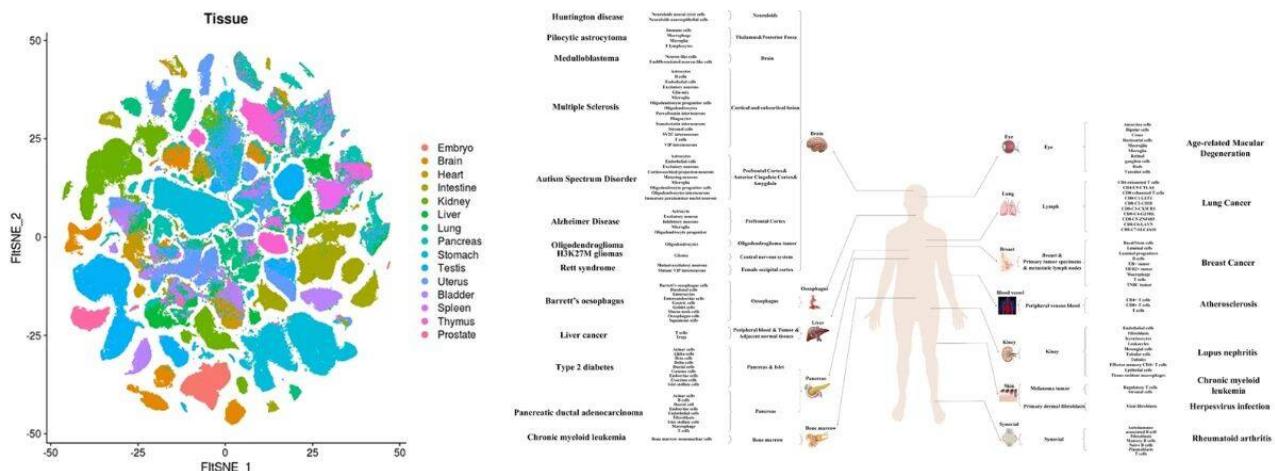


图8 Mouse cell atlas(左)和Sc2disease (右) 数据库数据示例

南模生物具有成熟的基因修饰小鼠制备平台，欢迎大家前来定制你的专属基因修饰小鼠，并可提供超过200种自主产权Cre及荧光工具鼠和500余种自主产权成品Flox小鼠，有效缩短您的实验周期。

## Reference

- [1] Park J , Shrestha R , Qiu C , et al. Single-cell transcriptomics of the mouse kidney reveals potential cellular targets of kidney disease[J]. Science, 2018, 360(6390):eaar2131.

- [2] Guo W , Li L , He J , et al. Single-cell transcriptomics identifies a distinct luminal progenitor cell type in distal prostate invagination tips[J]. *Nature Genetics*, 2020(951-61).
- [3] Liu Z , Gu Y , Chakarov S , et al. Fate Mapping via Ms4a3-Expression History Traces Monocyte Derived Cells[J]. *Cell*, 2019, 178(6):1509-1525.
- [4] Lu YW , Zhao QY , Liao JY , et al. Complement Signals Determine Opposite Effects of B Cells in Chemotherapy-Induced Immunity[J]. *Cell*, 2020, 180(6):1081-1097.
- [5] Tang et al., Arterial Sca1+ Vascular Stem Cells Generate De Novo Smooth Muscle for Artery Repair and Regeneration, *Cell Stem Cell* (2019), <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.11.010>.