

【老鼠新发现】巧用谱系示踪技术洞察肝脏再生的秘密

2月14日，国际学术期刊Stem Cell Reports在线发表了中国科学院生物化学与细胞生物学研究所周斌研究组的科研成果“Lineage Tracing Reveals the Bipotency of SOX9+ Hepatocytes during Liver Regeneration”。该研究利用双同源重组系统（Cre-loxP和Dre-rox）结合多种小鼠损伤模型揭示了SOX9+肝细胞可以作为肝损伤后的双能祖细胞，为肝脏的修复和再生研究提供了新的方向和理论基础。

2月14日，国际学术期刊Stem Cell Reports在线发表了中国科学院生物化学与细胞生物学研究所周斌研究组的科研成果“**Lineage Tracing Reveals the Bipotency of SOX9+ Hepatocytes during Liver Regeneration**”。该研究利用双同源重组系统（Cre-loxP和Dre-rox）结合多种小鼠损伤模型揭示了SOX9⁺肝细胞可以作为肝损伤后的双能祖细胞，为肝脏的修复和再生研究提供了新的方向和理论基础。

南模生物为该研究构建了Hnf4a-DreER, R26-RSR-LSL-tdTomato和R26-Confetti2三种重要的小鼠模型。

Stem Cell Reports
Article



OPEN ACCESS

Lineage Tracing Reveals the Bipotency of SOX9⁺ Hepatocytes during Liver Regeneration

Ximeng Han,^{1,2,3,10} Yue Wang,^{1,2,10} Wenjuan Pu,^{1,2} Xiuzhen Huang,^{1,2} Lin Qiu,² Yan Li,^{1,2} Wei Yu,^{1,2} Huan Zhao,^{1,2} Xiuxiu Liu,¹ Lingjuan He,^{1,2} Libo Zhang,^{1,2} Yong Ji,^{4,5} Jie Lu,^{6,*} Kathy O. Lui,⁷ and Bin Zhou^{1,2,3,4,8,9,*}

肝脏被称为人体的“生命塔”，承担着代谢，解毒，免疫，消化等重要的人体机能。肝脏拥有强大的代偿功能，一般轻伤不下火线。但当今社会快速的工作节奏和不规律的生活习惯，使得肝损伤在现代都市人群中正成为一种常态，因此了解肝损伤修复的来龙去脉以搞懂重大肝病的发病及预防机理一直是学术研究热点。

从以往传统的谱系示踪研究来看，重生的肝细胞往往都是从损伤前已经存在的成熟肝细胞演化而来（并非来源于干细胞分化），而在某些特定损伤情况中，成熟肝细胞还可以分化为胆管上皮细胞。但往往这类研究关注的是群体水平的遗传谱系示踪，单个肝细胞是否可以作为双向祖细胞同时产生胆管细胞和肝细胞仍然是未知的。

为了改善谱系示踪精度，研究人员利用基于Cre-loxP和Dre-rox双同源重组的**报告基因小鼠R26-RSR-LSL-**

tdTomato，并结合能特异性标记肝细胞的**Hnf4a-DreER小鼠**和特异性标记SOX9⁺细胞（包括SOX9⁺肝细胞和胆管上皮细胞）的**Sox9-CreER小鼠**，通过交配获得**Hnf4a-DreER; Sox9-CreER;R26-RSR-LSL-tdTomato三基因型小鼠**，同时使用他莫昔芬诱导，来特异性标记SOX9⁺肝细胞（图1）。

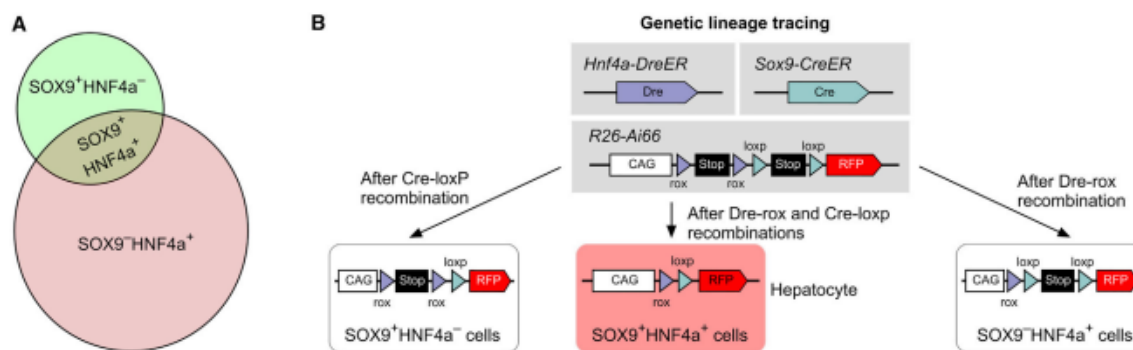


图1 SOX9⁺肝细胞遗传谱系示踪策略

通过组织免疫荧光检测，被红色（RFP）标记上的目标细胞，是位于肝门静脉区域的SOX9⁺HNF4a⁺细胞，且其明显区别于CK19⁺细胞（胆管上皮细胞），证明此策略能特异性地标记示踪SOX9⁺肝细胞。

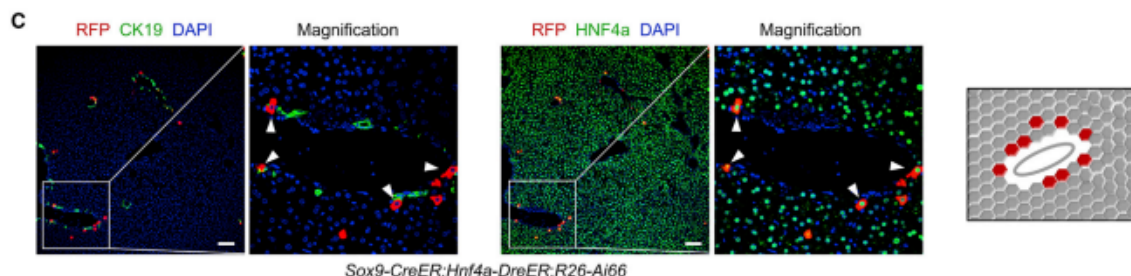


图2双重组酶系统的SOX9⁺&HNF4a⁺细胞的遗传谱系示踪，证明此策略能特异性地标记示踪SOX9⁺肝细胞。

利用该示踪系统，研究人员发现在不同的损伤模型中SOX9⁺肝细胞将有不同的分化方向。例如，若采用CCl₄诱导，在肝脏损伤后，SOX9⁺肝细胞可以代偿性生长增殖（图3），而若采用胆管结扎手术（BDL）或DDC诱导的胆汁淤积模型，在肝脏损伤后，SOX9⁺肝细胞数量则会显著下降，其部分分化成为CK19⁺胆管上皮细胞（图4）。

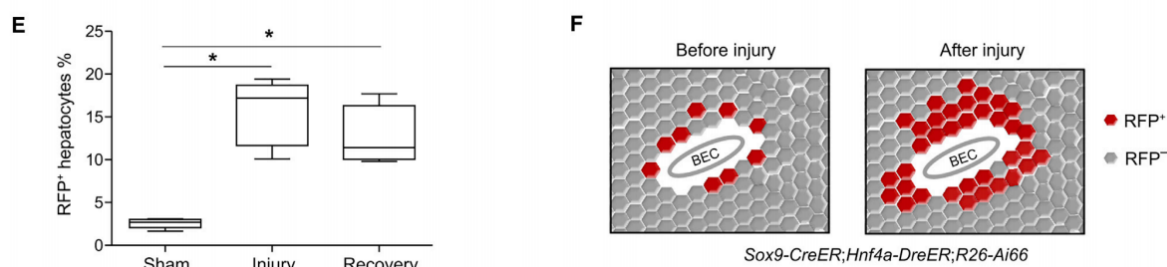


图3 CCl4诱导肝损伤导致SOX9⁺肝细胞代偿性生长扩展

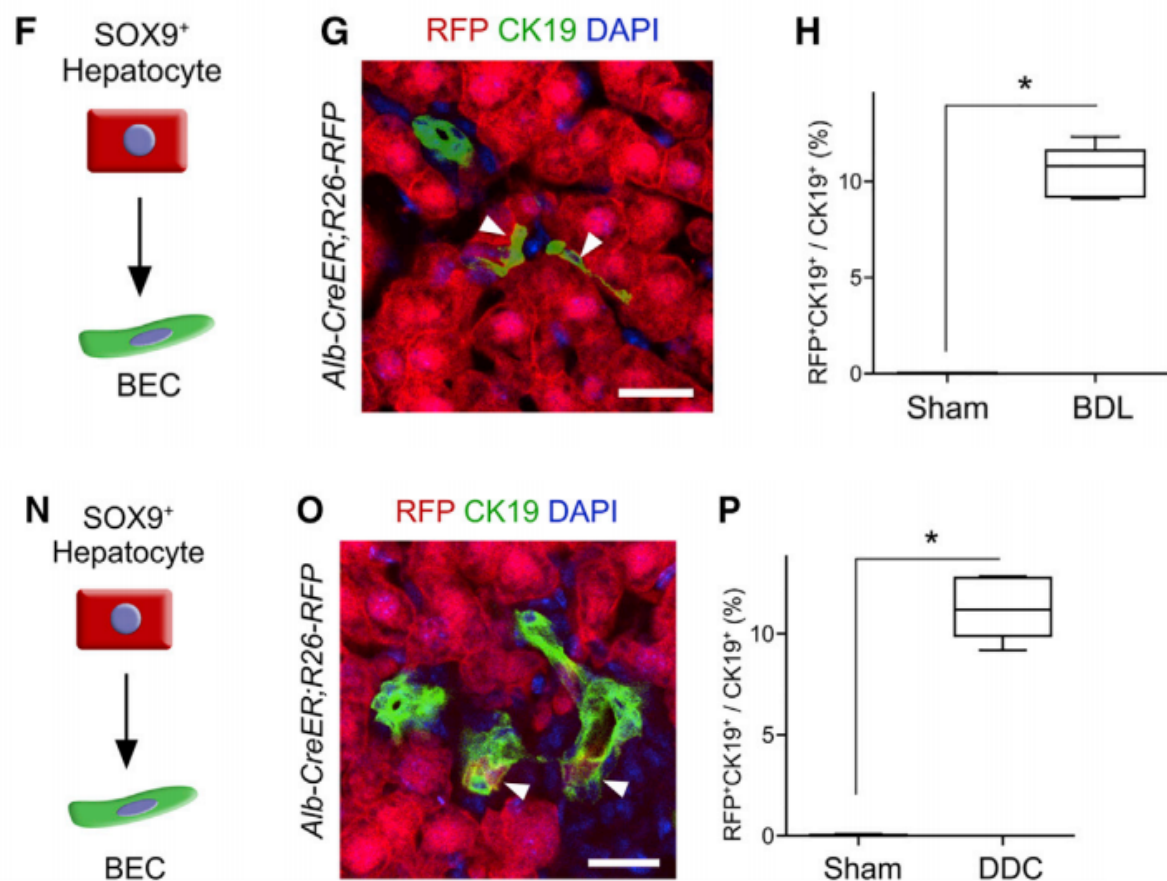


图4 BDL或DDC诱导肝损伤导致SOX9⁺肝细胞具有产生胆管上皮细胞倾向

随着研究层次进阶，研究人员又构建了一种新的基于双系统可用于克隆分析的新报告小鼠R26-Confetti2（图5），当该小鼠与Cre和Dre小鼠三者杂交时，其三种荧光蛋白YFP，GFP和RFP将以随机稀疏的方式标记Cre⁺&Dre⁺细胞，以用于克隆分析。

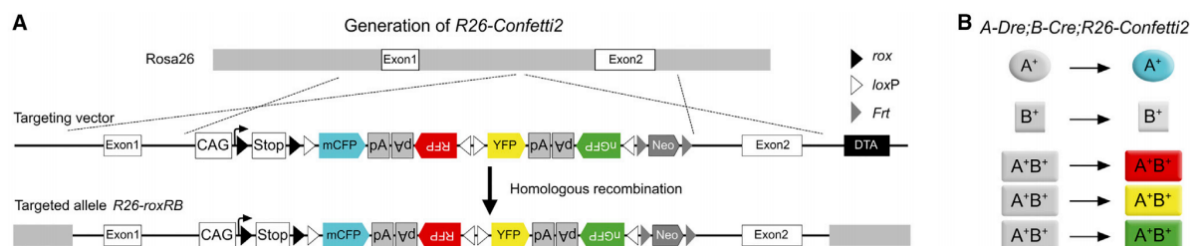


图5 R26-Confetti2小鼠构建策略

研究人员对**Hnf4a-DreER; Sox9-CreER; R26-Confetti2**三基因小鼠进行DDC诱导肝损伤，利用该克隆分析系统发现其细胞标记为三种不同的克隆：肝细胞，胆管上皮细胞以及包含肝细胞和胆管上皮细胞的混合克隆（图6）。这揭示了**Sox9⁺**的肝细胞亚群在单个细胞水平上确实具有双向分化的潜能，其在肝损伤和修复期间可以同时分化成肝细胞和胆管上皮细胞。

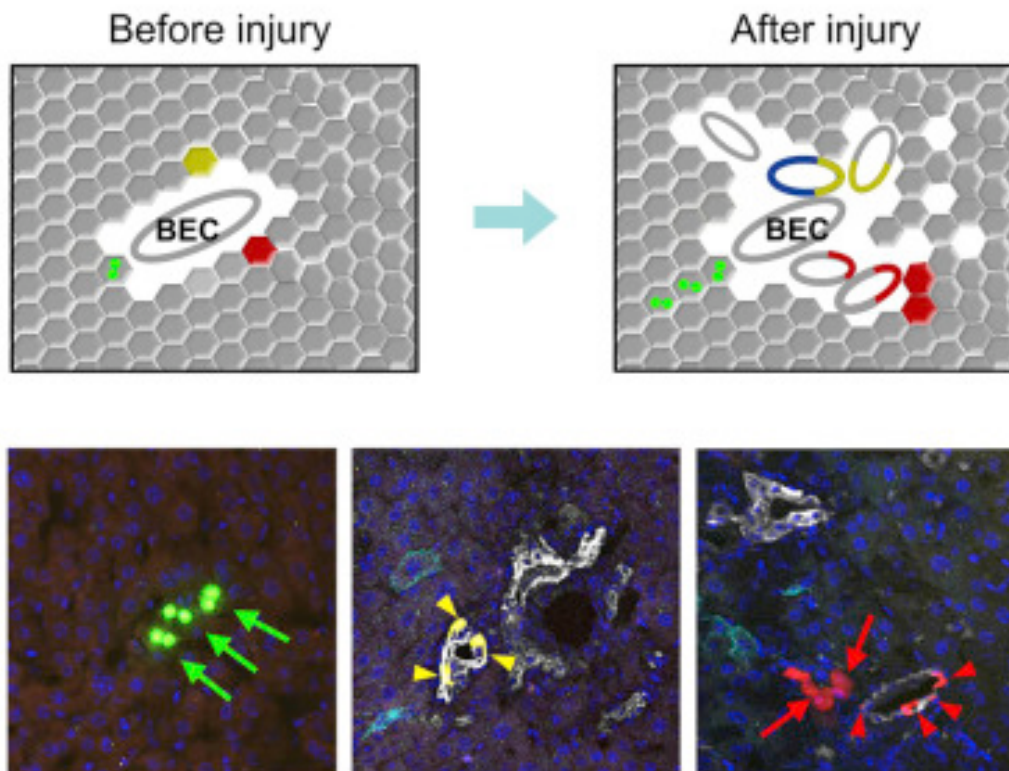


图6 肝损伤后双能SOX9⁺肝细胞分化克隆鉴定

基于SOX9⁺肝细胞在肝损伤修复中双向分化的独特能力，它们很有可能成为未来治疗重大肝病的重要药物靶标。