Science | 南模生物助力周斌团队解密成体肝细胞的真正来源

2月26日，国际学术期刊 Science 以 Research Article形式在线发表了中国科学院分子细胞科学卓越创新中心（生物化学与细胞生物学研究所）周斌研究组的研究成果“Proliferation tracing reveals regional hepatocyte generation in liver homeostasis and repair”。南模生物为该研究构建了关键的Ki67-CreXER2小鼠模型。

2月26日，国际学术期刊 ***Science*** 以 Research Article形式在线发表了中国科学院分子细胞科学卓越创新中心（生物化学与细胞生物学研究所）周斌研究组的研究成果“*Proliferation tracing reveals regional hepatocyte generation in liver homeostasis and repair*”。

南模生物为该研究构建了关键的Ki67-CreXER2小鼠模型。

RESEARCH

RESEARCH ARTICLE

LINEAGE TRACING

Proliferation tracing reveals regional hepatocyte generation in liver homeostasis and repair

Lingjuan He[1]*, Wenjuan Pu[1]*, Xiuxiu Liu[1]*, Zhenqian Zhang[1], Maoying Han[1,2], Yi Li[1], Xiuzhen Huang[1], Ximeng Han[1], Yan Li[1], Kuo Liu[1], Mengyang Shi[1], Liang Lai[3], Ruilin Sun[3], Qing-Dong Wang[4], Yong Ji[5], Jan S. Tchorz[6], Bin Zhou[1,2,7,8]†

该研究首次开发了能够长时程示踪体内细胞增殖的新技术，利用该技术研究人员发现了成体肝细胞的来源，为肝脏再生及疾病临床治疗研究提供了新思路。

周斌研究组长期致力于新型遗传谱系示踪技术的开发与应用，在该项研究中，他们建立了一种检测细胞增殖的新技术—ProTracer（Proliferation Tracer）。作为一种遗传学技术，ProTracer突破了传统检测细胞增殖方法的思维模式，利用广泛使用的细胞增殖标记物Ki67，在基于课题组前期开发的Dre-rox和Cre-loxP的双同源重组酶介导的遗传谱系示踪技术（He et al., Nature Medicine 2017）基础上，利用Dre-rox启动Cre同源重酶介导的细胞增殖示踪系统进行遗传标记；构建了**Ki67-CreXER2**小鼠模型。ProTracer犹如一台录像机，一旦启动，可以实现在数月甚至数年内不间断地记录细胞增殖，这对于检测增殖能力较低的细胞以及评估细胞增殖能力的动态变化过程极其有益。并且，ProTracer可以实现直接检测某一特定谱系细胞增殖情况，避免其他类型细胞增殖信号的干扰，提高了信噪比和分辨率，使检测信号更直观，能够实现从器官整体水平上观察细胞增殖。

此外，ProTracer能够实现活体检测细胞增殖，可以在不牺牲动物的情况下，直接在同一个动物上多时间点检测体内细胞增殖，观察细胞增殖的动态变化过程。ProTracer可以广泛地应用于不同组织器官细胞增殖的检测，为发育生物学、肿瘤学、神经科学和再生医学等众多领域的研究提供强大的技术支撑。

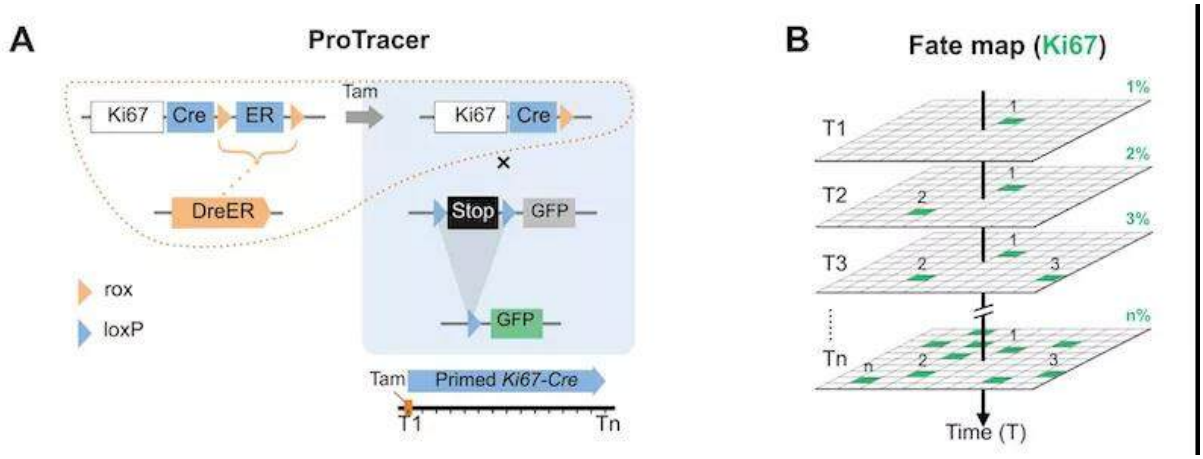

Fig.1 Generation and characterization of Ki67-CrexER mice. A. Schematic showing ProTracer strategy. B. Schematic showing a Ki67 fate map.

周斌研究组利用ProTracer研究了在成体肝脏生理稳态和损伤再生过程中肝细胞的来源。

目前，在肝脏领域，这是一个亟待解决且具有争议的重要科学问题。尽管在某些极其严重的肝损伤情况下，胆管细胞可以转分化贡献形成肝细胞，但是在肝脏生理稳态和损伤再生过程中的肝细胞的更新主要依赖原有肝细胞的自我增殖。肝脏的基本结构单位是肝小叶，肝小叶中的肝细胞由于代谢功能和基因表达等的不同具有较大的异质性，从肝门静脉区到肝中央静脉区大体可分为三区：门静脉周围肝细胞（E-CAD+，Zone1）、中间区肝细胞（E-CAD-GS-，Zone 2）和中央静脉周围肝细胞（GS+，Zone 3）。

有研究认为不同区域的肝细胞增殖能力显著不同，但究竟哪些肝细胞亚群对新生肝细胞起主要贡献仍存在较大争议，目前主要有以下几种理论：

1）肝细胞流动理论（肝细胞由门静脉侧向中央静脉侧流动，Liver 1985）；
2）中央静脉周围肝细胞理论（Axin2+肝细胞，Nature 2015）；
3）门静脉周围肝细胞理论（Sox9+肝细胞，Cell 2015）；
4）分散式理论（Terthigh肝细胞，Nature 2018）；
5）广泛分布式理论（肝细胞无差别增殖，Cell Stem Cell 2020）。

以往的这些研究均是依赖单个分子标记分析肝脏中某一肝细胞亚群的扩增能力，缺少对肝脏整体水平上对所有肝细胞增殖能力的分析，犹如盲人摸象，观察的是事物的局部而非整体，因此很难做出一个全面准确的判断。

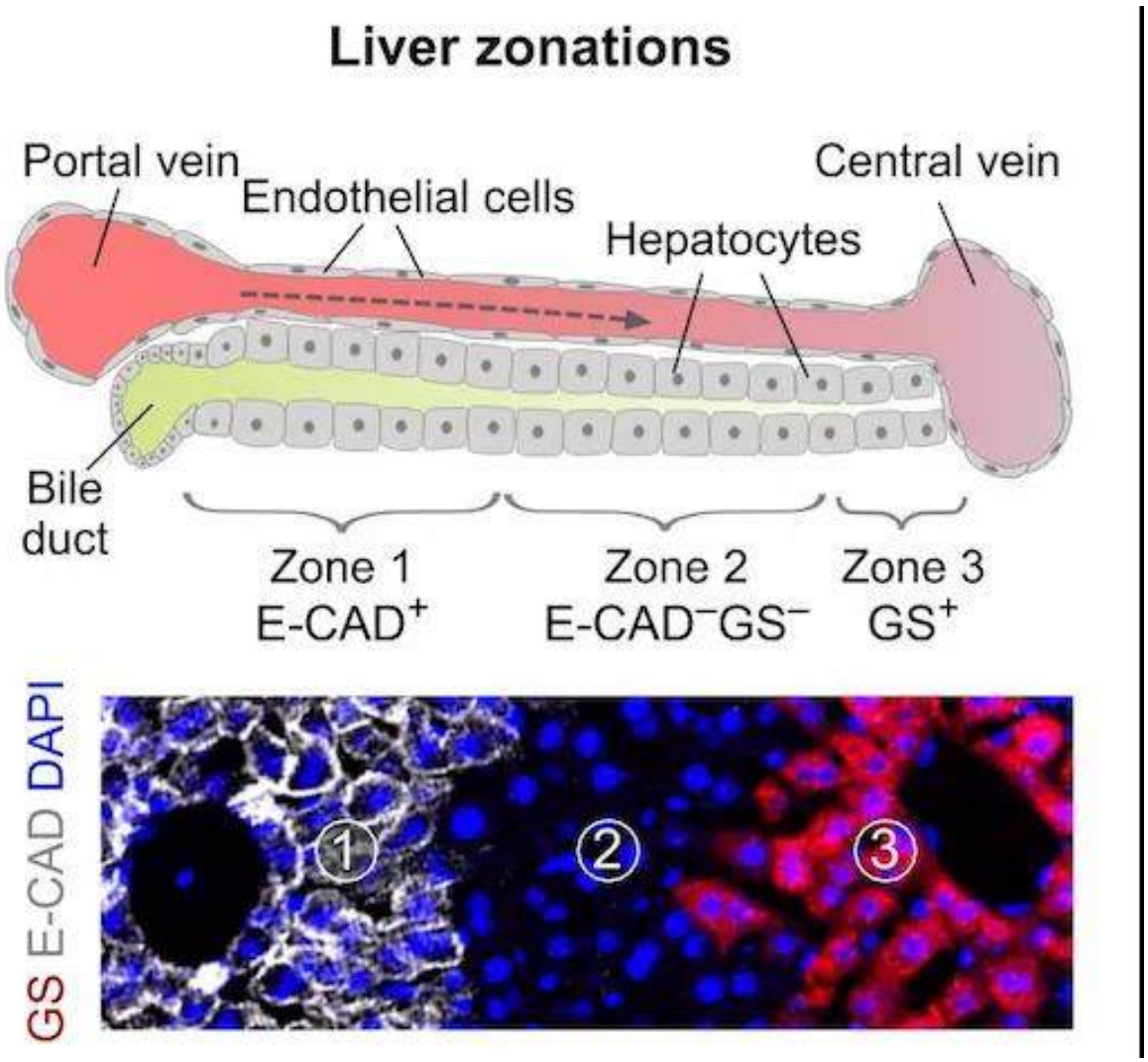

Fig.2 Schematic showing three liver zones from the periportal to the pericentral region. Lower panel shows immunostaining for glutamine synthetase (GS) and E-cadherin (E-CAD). 1, 2, and 3 indicate zone 1 (E-CAD+), zone 2 (E-CAD-GS-), and zone 3 (GS+), respectively. Dashed arrow indicates blood flow.

周斌研究组突破以往的研究模式，即不再依赖单一分子标记追踪某一肝细胞亚群的扩增情况，而是利用ProTracer技术去直接标记新生的肝细胞，不仅可以实现对所有肝细胞类群进行分析，还可以直观精准地展现出新生肝细胞的来源。研究人员首先采用广谱性的ProTracer（所有类型细胞的增殖都能够被检测）在成体启动细胞增殖的记录，并在启动后的多个不同时间点检测肝细胞的增殖信号，结合E-CAD和GS等肝细胞分区标记基因免疫荧光共染色，发现在生理稳态过程中肝细胞通过缓慢的增殖维持自我更新。意外的是，新生的肝细胞并非来源于以往报道的任何一个类群，而是主要来源于肝小叶中的中间区域（E-CAD-GS-，Zone 2）。

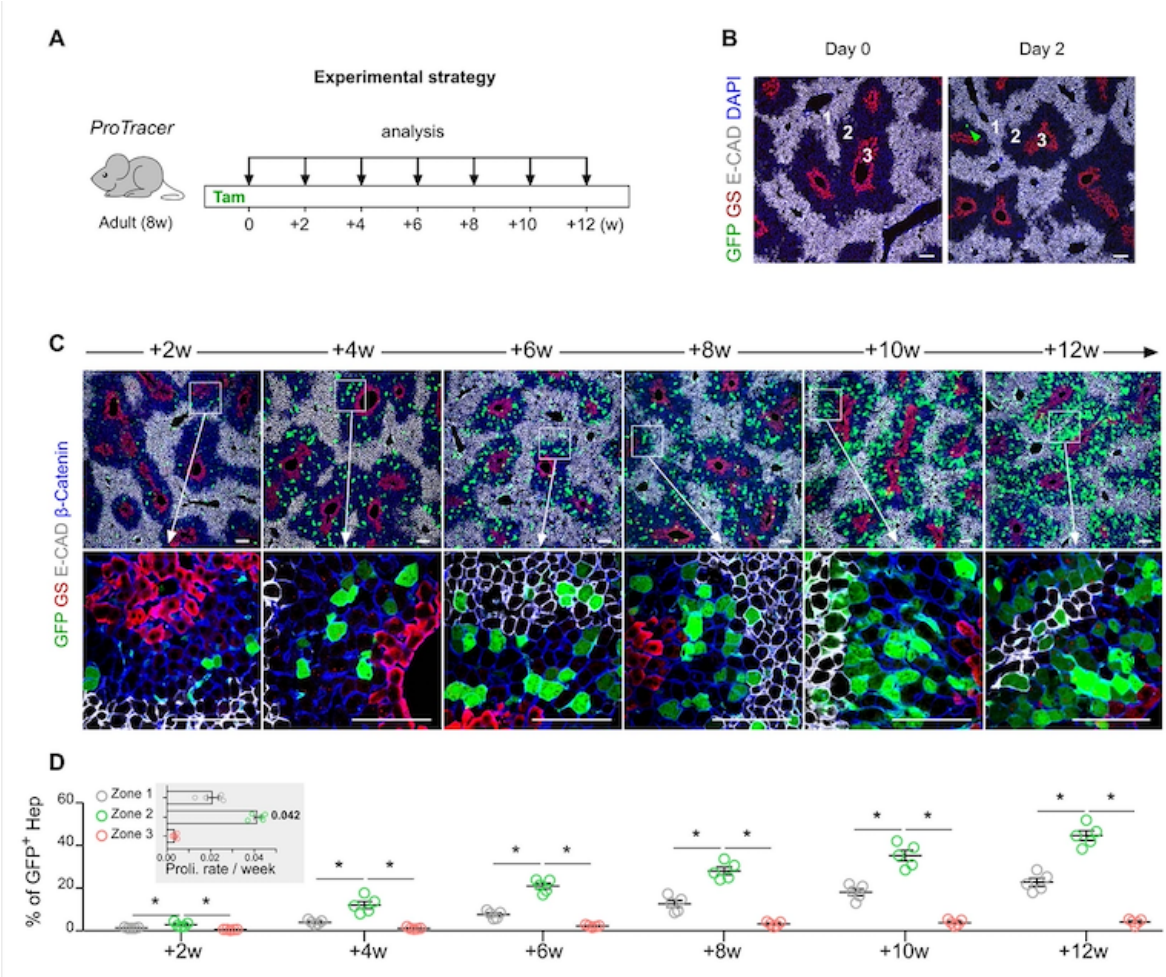

Fig.3 ProTracer reveals highly regional hepatocyte proliferation in the liver lobule. A. Schematic showing the experimental strategy using ProTracer (R26-DreER;Ki67-CrexER;R26-GFP). B. Immunostaining for GFP, GS, and E-CAD on liver sections at baseline (day 0) and day 2 after Tam treatment. Arrowhead indicates GFP+ hepatocyte. C. Immunostaining for GFP, GS, E-AD, and b-catenin on liver sections collected at weeks 2, 4, 6, 8, 10, and 12 after Tam treatment. D. Quantification of the percentage hepatocytes (Hep) expressing GFP in each zone of the liver lobule.

为了排除非肝细胞增殖信号的干扰，研究人员在广谱性ProTracer技术的基础上，结合肝细胞特异性表达的基因Albumin（Alb）启动子，开发了肝细胞特异性的ProTracer技术。肝细胞特异性的ProTracer仅标记肝细胞的增殖，能够实现直接在肝脏器官整体水平上展现肝细胞增殖。

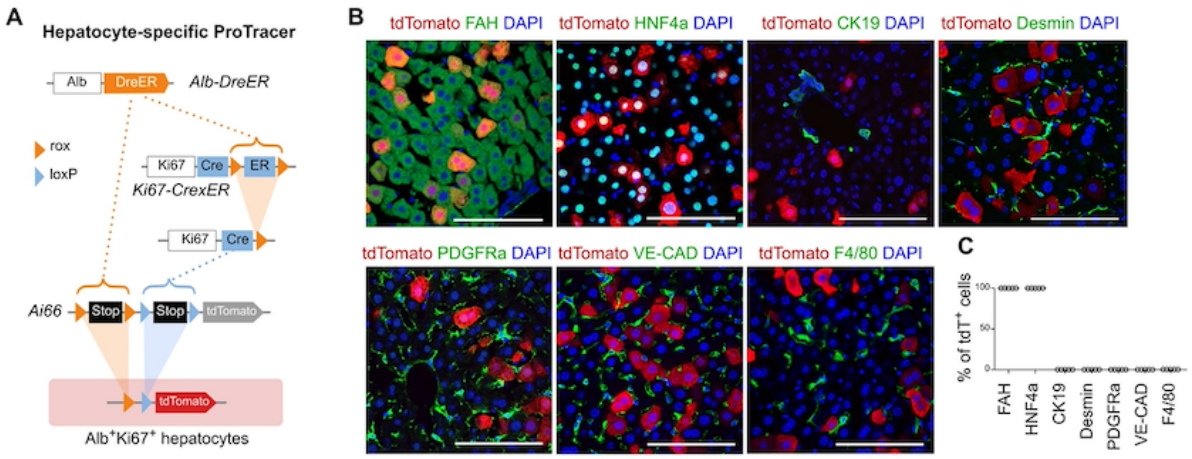

Fig.4 Hepatocyte-specific ProTracer identifies highly regional hepatocyte generation during homeostasis. A. Schematic showing the experimental strategy used for hepatocyte-specific tracing of cell proliferation. B. Immunostaining for tdTomato, FAH, HNF4a, CK19, Desmin, PDGFRa, VE-CAD, and F4/80 on liver sections. Tissues were collected at 6 weeks after Tam induction. C. Quantification of the percentage of tdTomato+ (tdT+) cells expressing different cell lineage markers.

将肝细胞特异性ProTracer在成体启动后，研究人员将肝脏的全标本进行了荧光拍照，发现被tdTomato红色荧光标记的增殖的肝细胞呈现出一圈圈类似“甜甜圈”的形状（图A），说明肝细胞增殖具有区域偏好性，肝脏组织切片的免疫荧光染色结果进一步证实了增殖的肝细胞位于肝小叶的中间区域，即E-CAD-GS-的Zone 2（图B）。此外，周斌组还开发了活体检测肝细胞增殖的ProTracer技术，利用该技术他们检测了同一个小鼠个体在多个不同时间点肝细胞的增殖及其动态变化过程，这也是世界上首次实现活体检测细胞增殖。

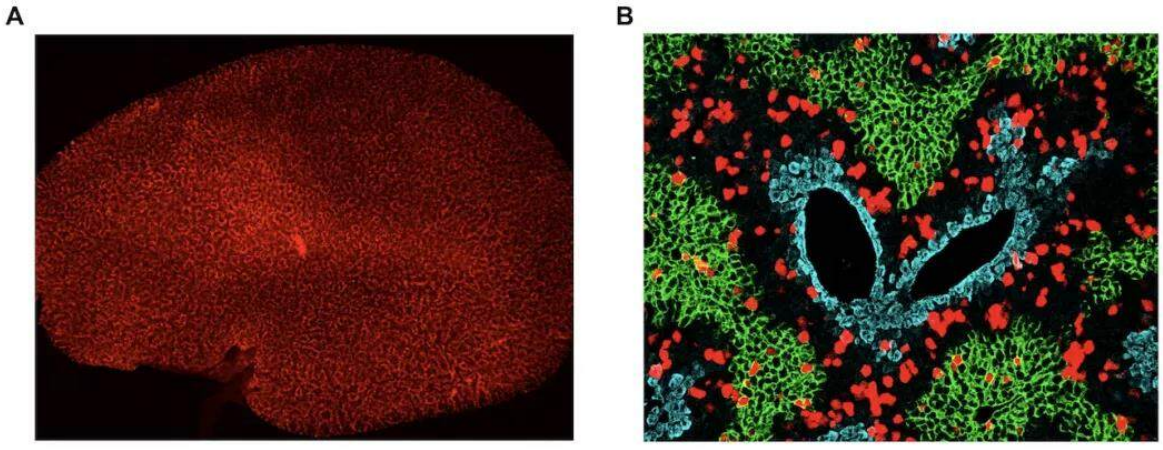

Fig.5 A.利用肝细胞特异性的ProTracer标记增殖肝细胞的成体小鼠肝脏。tdTomato+的增殖肝细胞呈现出一圈圈的类似“甜甜圈”的形状。B.利用ProTracer揭示成体肝脏中新生肝细胞（tdTomato+）主要来源于E-CAD-GS- Zone 2。E-CAD（绿色）；GS（青色）。

为了研究肝脏损伤再生过程中新生肝细胞的来源，研究人员利用ProTracer技术结合肝切、胆管结扎和CCl4

等多种肝损伤模型，发现在肝切模型中，位于Zone 1的肝细胞起始肝脏再生过程，然后Zone 2 的肝细胞迅速增殖。而在胆管结扎和CCl4急性损伤模型中，则是位于Zone 2的肝细胞起始肝脏再生过程。此外，研究人员利用广谱性ProTracer系统地描绘了肝脏再生过程中其他类型细胞的增殖情况，如胆管上皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞、巨噬细胞。

综上，该研究的亮点在于开发了一种检测细胞增殖的遗传新技术——ProTracer，以全新的视角研究了成体肝细胞的来源，突破了传统思维模式和技术局限性，直观地展现了所有肝细胞类群的增殖情况，首次发现肝小叶中间区域（Zone 2）的肝细胞是成体肝脏在生理稳态中新生肝细胞的主要细胞来源，同时揭示了不同损伤再生模型中新生肝细胞的来源，准确回答了成体肝细胞来源这一重要科学问题。该研究为肝脏损伤修复再生研究开辟了新思路，为肝脏疾病的治疗提供了新的理论基础。

此外，新开发的ProTracer技术具有长时间不间断检测细胞增殖的能力，可以特异性地标记某种特定细胞谱系的细胞增殖，并且实现了不牺牲样品直接活体检测细胞增殖，从多个维度刷新了细胞增殖检测的能力和范围，可以广泛应用于不同组织器官细胞增殖的检测，为发育生物学、肿瘤学、神经科学和再生医学等众多领域的研究提供强大技术支撑。

中国科学院分子细胞科学卓越创新中心（生物化学与细胞生物学研究所）周斌研究组副研究员何灵娟博士（现就职于西湖大学）、博士后蒲文娟、博士研究生刘秀秀为该论文的共同第一作者，周斌研究员为该论文通讯作者。该工作得到了瑞士诺华医学生物研究所的Jan S. Tchorz教授、南京医科大学季勇教授、瑞典阿斯利康 Qing-Dong Wang博士和上海南方模式生物公司的孙瑞林博士及其团队的大力支持。该工作也得到分子细胞科学卓越创新中心动物平台和细胞分析技术平台的大力支持，并得到来自中科院、基金委、科技部以及上海市科委等部门的经费支持。

*本文转载自干细胞者说公众号