

领域前沿·中国



周斌, 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心研究员。2002年于浙江大学医学院获本科学位, 2006年于中国协和医科大学获得博士学位, 2006至2010年在美国哈佛大学波士顿儿童医院从事博士后研究。2010年8月至2016年8月在中国科学院上海生命科学研究院营养科学研究所工作, 任研究员、研究组长、博士生导师。2016年9月起在中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所(现中国科学院分子细胞科学卓越创新中心)工作。实验室主要利用遗传谱系示踪技术探索在器官发育和组织再生过程中细胞的起源和命运调控机制。以第一或通讯作者的身份在*Nature*、*Science*、*Nat Med*、*Nat Genet*等国际期刊上发表研究论文。

利用邻近细胞遗传学技术揭示哺乳动物体内 细胞间相互作用

张少华 赵欢 周斌*

(细胞生物学国家重点实验室, 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心/
中国科学院生物化学与细胞生物学研究所, 中国科学院大学, 上海 200031)

摘要 细胞与细胞之间的交流和相互作用是多细胞生物的一项基本特征, 解析细胞之间的相互作用对于深入了解多种生物学过程及其调控机制具有重要意义。但是目前领域内缺乏研究体内细胞互作的技术手段。该团队将人工合成Notch信号通路(synNotch)技术与传统遗传学手段相结合, 建立了邻近细胞遗传学技术, 用于监测细胞间相互作用并永久示踪接触过的细胞。通过构建表达synNotch通路的遗传工具小鼠, 该团队在两种不同类型细胞中分别表达synNotch配体蛋白和受体蛋白, 当相邻细胞配体和受体特异结合后, synNotch信号通路被激活从而开启下游报告基因原件的表达, 实现遗传标记和永久示踪受体细胞。该团队利用邻近细胞遗传学技术揭示了心脏心肌细胞和内皮细胞, 以及肿瘤中肿瘤细胞和内皮细胞之间的动态相互作用。邻近细胞遗传学技术可以解决众多与细胞相互作用相关的重要科学问题, 有助于开拓新的细胞互作研究方向。

关键词 synNotch; 细胞互作; 邻近细胞遗传学; 受体细胞; 配体细胞

Intercellular Genetics Reveals Cell-Cell Interactions in Mammals

ZHANG Shaohua, ZHAO Huan, ZHOU Bin*

(State Key Laboratory of Cell Biology, Center for Excellence in Molecular Cell Science, Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Chinese Academy of Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract Cell-cell communication and interactions are essential for multicellular organisms. Monitoring and elucidation of their interactions is fundamental to understanding the diverse biological processes. However, *in*

*通讯作者。Tel: 021-54920974, E-mail: zhoubin@sibs.ac.cn

*Corresponding author. Tel: +86-21-54920974, E-mail: zhoubin@sibs.ac.cn

in vivo genetic monitoring of cell-cell interactions remains challenging to date. In this study, this group developed a proximal cell genetics, combining synNotch with traditional genetic approaches, to monitor *in vivo* cell-cell interactions, as well as to permanently trace their contact histories. This group generated knock-in mice that expressed synNotch elements, where an artificial Notch ligand was expressed in one cell type (sender cells) and an artificial receptor in another cell type (receiver cells). The specific binding of ligand and receptor between two contacting cells activates synNotch pathway, and initiates the expression of reporter gene in receptor cells, thus enabling genetic labelling and lineage tracing of the receptor cells. Using the proximal cell genetics, this group revealed the dynamic interactions between endothelial cells with cardiomyocytes or tumor cells. This proximal cell genetic approach could be widely applied to understand scientific questions involved with cell-cell interaction, opening new window for study cell-cell communication.

Keywords synNotch; cell interactions; proximal cell genetics; receiver cell; sender cell

1 解析细胞间互作的技术背景

细胞与细胞之间的交流和相互作用是多细胞生物的一项基本特征,在多种生物学过程,包括胚胎发育、免疫应答、干细胞命运决定和肿瘤发生等中发挥着重要的作用^[1-4]。因此,解析细胞与细胞之间的相互作用对于深入了解多种生物学过程及其调控机制具有重要意义。科学家利用现代遗传学的手段,例如遗传示踪、组织特异性基因敲除或过表达等技术,研究器官发育、组织再生与疾病发生发展等过程及其内在的细胞分子机制^[5]。但是这些遗传技术基本上只能针对细胞自身进行操作,无法探究细胞之间的相互关系。最近有研究开发出新技术揭示细胞间相互作用,推进了我们对生物学过程更深刻的认识^[6-14]。例如,在免疫反应过程中,T细胞和树突状细胞会通过受体和配体特异性的识别发生进一步的细胞交流,利用转肽酶可以监测这两种细胞之间的相互作用^[9,12]。此外当在肿瘤细胞中过表达膜透性的荧光蛋白时,这些荧光蛋白会被释放到周围的环境中,并进入肿瘤细胞的邻近细胞,让这些邻近细胞被标记上荧光蛋白,从而达到研究肿瘤细胞与其微环境细胞之间互作的目的^[14]。这些方法都能够标记特定细胞周围的其他细胞,揭示细胞间互作。但是体内细胞互作是瞬时且动态的,已有方法很难对互作的细胞进行长时程追踪,比如,在肿瘤发生过程中,肿瘤细胞会扩散和转移,导致肿瘤细胞与其微环境细胞之间的互作会动态变化^[15],这就需要一套能够永久示踪体内细胞互作的遗传学技术。因此,实现体内捕捉细胞与细胞之间相互交流并解析相关细胞的功能及其分子调控机制,对于阐释体内多种生物学过程至关重要。

2 邻近细胞遗传学技术的建立

Notch信号通路介导了相邻细胞之间的交流和信号转导^[16-18]。在经典Notch信号通路中,配体细胞表达Notch配体蛋白,受体细胞表达Notch受体蛋白,当细胞相互靠近时,Notch配体和受体蛋白特异性结合,产生的蛋白间牵引拉力引起受体跨膜段的构象改变(图1A)^[18];接着, γ -secretase会水解Notch跨膜段和胞内段的连接肽段,从而释放Notch胞内段的转录因子,这些转录因子入核后会调控基因的表达。基于内源性Notch信号通路的原理,有研究构造了人工合成的Notch配体和受体蛋白,配体和受体蛋白特异性结合会激活受体细胞中的人工合成Notch通路,调控受体细胞转录水平的改变,该技术被称作人工合成Notch信号通路(synNotch)^[6-8,11,19-20]。我们利用synNotch将体内细胞间的接触信息转变为遗传信号,并对接触的细胞进行永久示踪^[21]。我们以心脏心肌细胞和内皮细胞为例,验证synNotch能否在体内监测细胞间的直接接触(图1B和图1C)。我们选择将心肌细胞作为synNotch的配体细胞,内皮细胞作为synNotch的受体细胞,通过同源重组技术构建了心肌细胞表达配体蛋白的工具小鼠*Tnnt2-mGFP*和内皮细胞表达受体蛋白的工具小鼠*Cdh5- α GFP-N-tTA*。*mGFP*是定位在细胞膜上的绿色荧光蛋白, *α GFP-N-tTA*全称是GFP nanobody-Notch transmembrane domain-tTA,作为synNotch的受体蛋白,其中GFP nanobody是特异性识别GFP的纳米抗体,Notch transmembrane domain是Notch的跨膜段,tTA作为胞内段,水解后被释放入核,能够发挥转录调控的作用。接着,我们检测*Tnnt2-mGFP*和*Cdh5- α GFP-N-tTA*两个小鼠能否正常表达synNotch配体

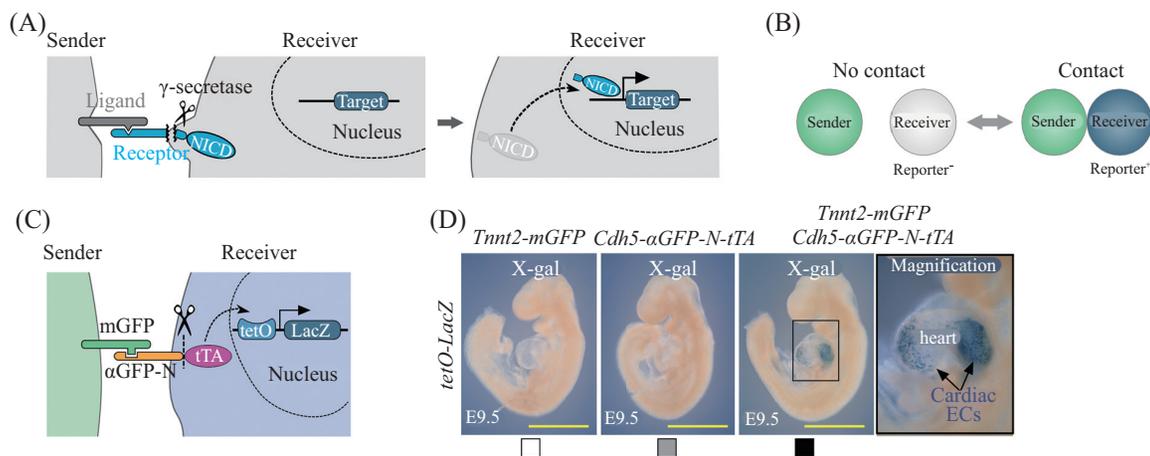
蛋白和受体蛋白。我们取 *Tnnt2-mGFP* 第 9.5 天的胚胎样本, 通过全组织荧光成像, 观察到只有心脏表达 GFP 绿色荧光, 胚胎的其他组织不表达 GFP, 进一步的切片结果表明, 心脏中 GFP 阳性的细胞共表达 TNNT2, 说明这些 GFP 阳性的细胞是心肌细胞。我们也收取了 *Cdh5-αGFP-N-tTA* 第 9.5 天的胚胎样本, 通过共染 Myc-tag 和 CDH5, 发现受体蛋白 αGFP-N-tTA 在内皮细胞中表达。以上结果说明我们成功构建了心肌细胞特异表达 synNotch 配体、内皮细胞特异表达 synNotch 受体的两个小鼠品系。在小鼠早期胚胎心脏中, 内皮细胞和心肌细胞紧密相邻, 表明这两种细胞可能直接接触。我们进一步获得了三基因型小鼠 *Tnnt2-mGFP; Cdh5-αGFP-N-tTA; tetO-nLacZ*, 其中 *tetO-nLacZ* 作为报告元件能响应 tTA 的调控。当内皮细胞与心肌细胞未发生接触时, synNotch 不会被激活; 当两类细胞相互接触时, 心肌细胞膜表面的 mGFP 配体和内皮细胞膜表面的受体特异性结合, 激活 synNotch 信号通路, 受体胞内段的 tTA 进入内皮细胞的细胞核中并结合 TRE 转录调控序列, 激活报告基因 *nLacZ* 的表达, 显示出与心肌细胞接触的内皮细胞 (图 1D)。我们可以看到胚胎心脏中有明显的 X-gal 信号, 在胚胎其他部位检测不到 X-gal 信号, 对照组胚胎 *Tnnt2-mGFP; tetO-nLacZ* 和 *Cdh5-αGFP-N-*

tTA; tetO-nLacZ 中也检测不到 X-gal 信号。通过对胚胎切片并结合免疫染色, 我们发现 X-gal 阳性内皮细胞与心肌细胞紧密接触。因此, 基于 synNotch 的邻近细胞遗传学技术能够用于监测体内细胞间的接触和互作。

为了验证 nLacZ 的表达是通过 synNotch 信号通路调控的, 我们采用 DAPT 抑制 γ-secretase 的酶活性^[22], 在小鼠心脏中几乎检测不到 nLacZ 的信号。为了验证 nLacZ 的表达受到 tTA-TRE 的调控, 我们对小鼠饲喂四环素 Dox, Dox 能抑制转录因子 tTA 结合 TRE 序列^[23], 在小鼠胚胎中检测不到 nLacZ 信号, 结果表明, 该技术能通过 Dox 进行灵活的调控。

我们也能利用邻近细胞遗传学技术监测肝脏中肝细胞和内皮细胞之间的互作。另外, 我们引入 *tetO-tdT* 荧光报告基因小鼠, 更加直观地展现心肌细胞和内皮细胞之间的接触, 同时也能更加便于荧光成像和细胞分选。

在该技术中, 我们利用 GFP 蛋白特异性结合 GFP 纳米抗体从而激活受体细胞中的 synNotch 信号通路, 但是 GFP 与其抗体的结合可能会影响细胞间正常的接触和相互作用。为了降低这部分的影响, 我们采用了亲和力比较低 GFP 纳米抗体 LaG17。另一个常用的 GFP 纳米抗体是 LaG16, LaG17 对 GFP



A: 卡通图展示经典Notch信号通路原理。NICD指Notch胞内段。B: 卡通图展示利用邻近细胞遗传学技术标记相互接触的细胞。C: 邻近细胞遗传标记技术工作原理。虚线箭头代表tTA进入细胞核中并结合tetO序列; 实线箭头代表LacZ启动表达。D: 对完整胚胎进行X-gal染色, 9.5天的胚胎基因型为*Tnnt2-mGFP; tetO-LacZ*, *Cdh5-αGFP-N-tTA; tetO-LacZ*和*Tnnt2-mGFP; Cdh5-αGFP-N-tTA; tetO-LacZ*。箭头指示LacZ阳性的心脏内皮细胞。黄色比例尺代表1 mm。

A: schematic figure showing canonical Notch signal pathway. NICD, Notch intracellular domain. B: illustration showing proximal cell genetics system for genetic labeling of contacting cells. C: schematic showing the overall design of the intercellular genetic labelling system. The dotted arrow indicates that the tTA enters the nucleus and binds to the tetO sequence; the solid arrow represents the LacZ initiation expression. D: whole-mount X-gal staining of E9.5 embryos of *Tnnt2-mGFP; tetO-LacZ*, *Cdh5-αGFP-N-tTA; tetO-LacZ*, *Tnnt2-mGFP; Cdh5-αGFP-N-tTA; tetO-LacZ* embryos. Arrows, LacZ⁺ cardiac ECs. Scale bars: yellow, 1 mm.

图1 邻近细胞遗传学技术监测细胞间互作(根据参考文献[21]修改)

Fig.1 Intercellular genetic monitoring of cell-cell interactions (modified from reference [21])

的亲和力是LaG16的1/70^[6,24], 这可以大大降低其对细胞间黏附的影响。

3 邻近细胞遗传学技术实现细胞互作永久示踪

从以上数据可知, 基于synNotch的邻近细胞遗传学技术能够指示细胞间的实时相互作用, 并将细胞间的接触信息转变为可控的遗传信号。但是当细胞分离后, 转录因子tTA将不再入核, 随着荧光蛋白的降解, 细胞很快会失去荧光标记。因此, 我们接下来将探究如何实现体内细胞相互作用的永久示踪。

谱系示踪技术利用Cre-LoxP重组, 使细胞永久表达荧光蛋白, 实现对细胞的永久追踪^[5]。我们将Cre-LoxP重组系统引入到synNotch信号通路中, 从而让synNotch的瞬时激活转变为永久性的遗传改变。为了验证该想法是否可行, 我们以心肌细胞和内皮细胞相互作用为例, 获得了*Tnnt2-mGFP;Cdh5-αGFP-N-tTA;tetO-Cre;R26-tdT*四基因型小鼠(图2A)。*tetO-Cre*会受到tTA的调控, 表达出Cre重组酶, 这与*tetO-nLacZ*受tTA调控的原理一致; 接着, Cre重组酶作用在报告基因*R26-tdT*上发生Cre-loxP重组, 使报告基因永久地表达tdT红色荧光蛋白, 从而达到示踪细胞的目的。在小鼠胚胎早期, 心脏中的心内膜内皮细胞与心肌细胞紧密接触, 由于心肌细胞和内皮细胞分别作为synNotch的配体细胞和受体细胞, 因此, 心内膜内皮细胞将被永久地标记为tdT阳性(图2B~图2D)。在胚胎发育到9.0天后, 部分心内膜内皮细胞迁移离开心肌细胞^[25-26], 形成房室垫, 并随着胚胎的发育重塑产生心脏瓣膜。我们收取该四基因型小鼠出生后的肝脏样本, 发现几乎全部的心脏内皮细胞被标记上, 同时位于瓣膜的间充质细胞也被标记上。这些间充质细胞是由心内膜内皮细胞发生EndoMT转变而来的, 远离心肌细胞, 也不再激活内皮细胞的特征基因*Cdh5*, 但持续表达tdT荧光蛋白, 证明与心肌细胞接触过的内皮细胞经历过Cre-loxP重组介导的遗传操作表达出荧光标记蛋白, 这些被标记的内皮细胞及其子代细胞即使发生了命运转变也会被永久标记上。因此, 我们将*tetO-Cre;R26-tdT*引入synNotch后, 通过细胞间的直接接触实现了对邻近细胞的遗传示踪。

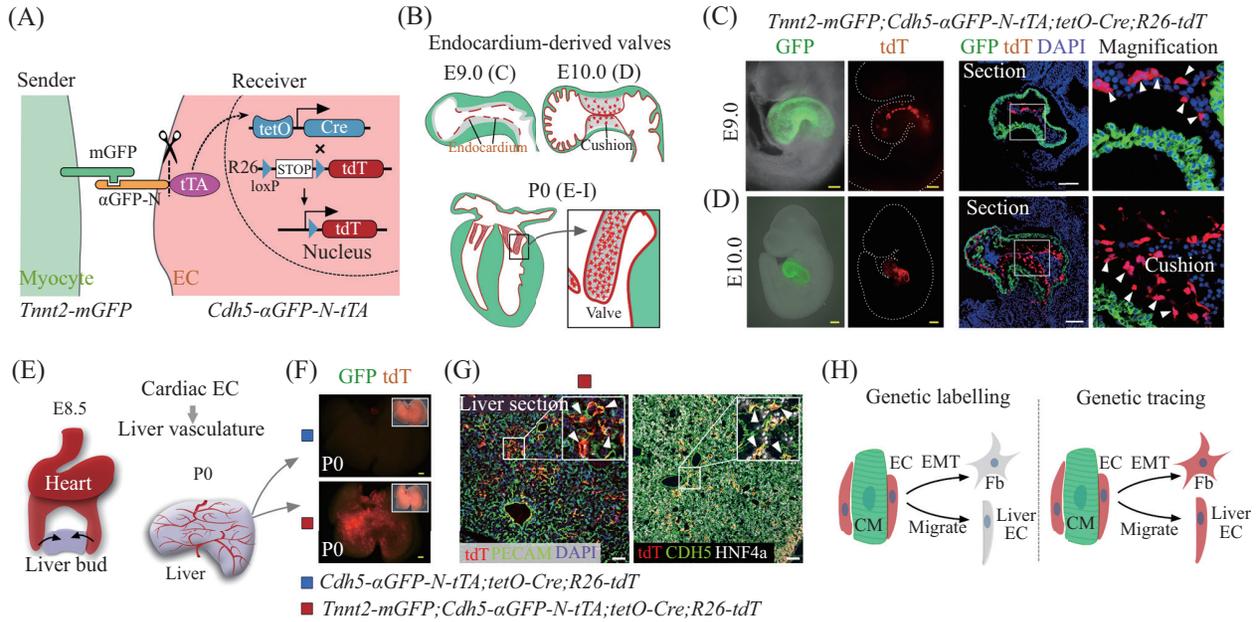
我们收取以上四基因型小鼠出生后的肝脏样本, 发现肝脏中存在部分被标记为tdT阳性的内皮细

胞, 但是并没有检测到肝脏中存在表达mGFP的细胞, 意味着这部分tdT阳性的内皮细胞是由心脏内皮细胞迁移到肝脏形成的(图2E~图2H)。这一现象在以前的研究^[27]中也曾被报道, 证明邻近细胞遗传示踪技术的精准性。这些内皮细胞在肝脏后期发育过程中会形成肝窦内皮细胞, 明显区别于心脏内皮细胞, 说明不同组织微环境会对细胞在形态结构、生理功能甚至命运决定等产生影响。

4 利用邻近细胞遗传学技术追踪肿瘤血管内皮细胞

细胞间互作也在各种疾病发生发展过程中扮演着重要角色。以肿瘤为例, 在肿瘤发生过程中, 肿瘤细胞会分泌细胞外因子, 招募周围组织中的血管迁移至肿瘤^[28-30]。与肿瘤细胞的互作会赋予内皮细胞新的特性, 这些特性让肿瘤血管内皮细胞与正常内皮细胞相比具有明显差异^[30]。接着, 我们利用邻近细胞遗传学技术解析肿瘤血管内皮细胞与肿瘤细胞之间的相互作用, 并永久示踪肿瘤血管内皮细胞。我们构建了过表达mGFP的肿瘤细胞系, 并将该肿瘤细胞移植到小鼠*Cdh5-αGFP-N-tTA;tetO-Cre;R26-tdT*皮下, 因此, 在该模型中, 肿瘤细胞为配体细胞, 内皮细胞为受体细胞。内皮细胞迁移进入肿瘤并接触肿瘤细胞后, 会被永久标记为tdT阳性。在肿瘤早期阶段(移植肿瘤第7天), 我们发现肿瘤中几乎全部的内皮细胞都被标记为tdT, 通过对小鼠注射BS lectin证实这些肿瘤血管与小鼠的正常血管连通。肿瘤外周有一层富含成纤维细胞和巨噬细胞的外包膜, 在肿瘤早期阶段, 我们没有在外包膜中检测到tdT标记的内皮细胞。然而在肿瘤发展的后期(移植肿瘤第14天), 我们发现外包膜中超过一半的内皮细胞被标记上tdT。但是外包膜中没有表达mGFP的肿瘤细胞, 意味着这些tdT阳性的内皮细胞可能从肿瘤内部迁出(图3)。

为了进一步揭示肿瘤细胞对肿瘤血管内皮细胞的影响, 我们通过流式细胞分选分离出了三群内皮细胞: 肿瘤内部tdT阳性内皮细胞、肿瘤外包膜中tdT阳性内皮细胞和tdT阴性内皮细胞。我们接着对这三群内皮细胞进行RNA测序, 分析基因表达差异。测序数据表明, 这三群内皮细胞各自成群, 具有明显差异。相对于肿瘤外包膜中tdT阴性的内皮细胞, tdT阳性内皮细胞(从肿瘤中迁出进入外包膜的内皮



A: 图示邻近细胞遗传示踪技术的原理。B: 卡通图表示胚胎心脏房室垫和瓣膜的形成。红色指示心内膜及经过EMT产生的子代细胞, 绿色表示心肌细胞。C、D: *Tnnt2-mGFP; Cdh5-αGFP-N-tTA; tetO-Cre; R26-tdT* 胚胎的完整胚胎荧光成像以及切片后免疫荧光共染色GFP和tdT。E: 卡通图表示胚胎8.5天时心脏内皮细胞迁移到肝芽, 并形成肝脏血管内皮细胞。F: 对肝脏进行完整组织的荧光成像。G: 肝脏切片免疫荧光共染tdT和PECAM, 或者tdT, CDH5和HNF4a。箭头指示tdT阳性的内皮细胞。H: 左侧卡通图表示通过邻近细胞遗传标记技术标记和心肌细胞接触的内皮细胞; 右侧卡通图表示通过邻近细胞遗传示踪技术永久追踪和心肌细胞接触的内皮细胞。Fb, 成纤维细胞; EMT, 内皮向间充质的转变。黄色比例尺为400 μm; 白色比例尺为100 μm。

A: schematic showing proximal cell genetics strategy for permanent genetic tracing of cardiac endothelial cells (ECs) that have contacted cardiomyocytes (CMs). B: illustration of the development of the endocardial cushion and cardiac valves (red). Green indicates CMs. C, D: whole-mount fluorescence images *Tnnt2-mGFP; Cdh5-αGFP-N-tTA; tetO-Cre; R26-tdT* embryos, and immunostaining for tdT and GFP on their embryonic sections. E: illustration showing that ECs from the developing heart migrate to liver bud at E8.5 and subsequently contribute to liver vasculature. F: whole-mount fluorescence images of P0 livers. G: immunostaining for tdT and PECAM on P0 liver sections. Arrowheads, tdTomato+ECs. Control (blue box) is *Cdh5-αGFP-N-tTA; tetO-Cre; R26-tdT*. H: illustration showing genetic labelling of ECs based on their contact with CMs (left) and lineage tracing of ECs based on their contact history with CMs (right). Fb, fibroblast; EMT, endothelial-to-mesenchymal transition. Scale bars: yellow, 400 μm; white, 100 μm.

图2 邻近细胞遗传学技术追踪接触过心肌细胞的内皮细胞(根据参考文献[21]修改)

Fig.2 Intercellular genetic tracing of endothelial cells that have contacted with cardiomyocytes (modified from reference [21])

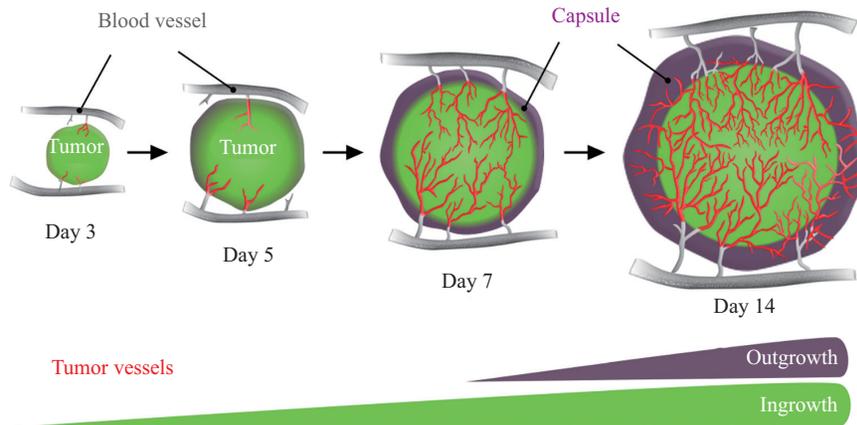
细胞)具有转移和浸润、促血管生成以及炎症反应等特征, 这些都是典型的肿瘤血管的特征, 说明与肿瘤细胞的互作会影响肿瘤血管内皮细胞, 即使内皮细胞迁移出肿瘤, 这种影响仍然会维持下去。

5 邻近细胞遗传学技术相关工具的开发和拓展

以上实验结果主要集中在心血管领域, 证明邻近细胞遗传标记和示踪技术在小鼠体内是可行的。为了进一步推广该技术的应用范围, 我们分别构建了由Cre重组酶诱导表达synNotch配体的小鼠 *R26-mGFP* 和synNotch受体的小鼠 *H11-αGFP-N-tTA*。 *R26-mGFP* 工具鼠可以搭配特定细胞类型的Cre小鼠品系, 经过Cre-LoxP重组后, 特定类型细胞表达mGFP, 成为配体细胞。 *H11-αGFP-N-tTA* 工具鼠结合

特定Cre小鼠后, 特定类型细胞表达αGFP-N-tTA, 成为受体细胞。因此, 我们可以利用这两个小鼠品系, 使任何类型细胞成为synNotch配体细胞或受体细胞。

为了让该系统只需搭配特定Cre小鼠品系就能研究体内细胞间相互作用, 我们进行了更进一步的改造优化。我们将序列tetO-rox-stop-rox-tdT-insulator-CAG-loxP-αGFP-N-tTA-pA-loxP-mGFP插入到小鼠基因组Tigre位点^[31], 构建了Tigre-synNotch小鼠。在该小鼠中, 所有细胞都会表达αGFP-N-tTA, 成为受体细胞。当搭配细胞特异性基因驱动的Cre小鼠时, Cre-loxP重组会在基因组上切掉αGFP-N-tTA-pA序列, 使细胞启动并表达mGFP, 因此, Cre阳性的细胞成为配体细胞。Cre阴性的细胞不会发生Cre-loxP重组, 这些细胞持续表达αGFP-N-tTA蛋白,



在肿瘤发生发展形成外包膜过程中,周围正常组织中的血管会迁移进入肿瘤并被标记为tdT阳性,接着这些tdT阳性的肿瘤血管会迁移进入肿瘤外包膜。

Illustration showing that vessels expand from peripheral into tumor (ingrowth) and tdT⁺ vessels expand out of tumor into the peripheral capsule (outgrowth) during tumor growth and formation of its capsule.

图3 邻近细胞遗传学技术追踪肿瘤细胞与内皮细胞相互作用(根据参考文献[21]修改)

Fig.3 Intercellular genetic tracing of tumor cell-EC interaction (modified from reference [21])

保持着受体细胞的状态。Cre阴性的受体细胞和Cre阳性细胞接触后,会被标记为tdT荧光。通过*Tigre-synNotch*,我们能够标记与特定细胞接触的所有其他细胞。

为了验证*Tigre-synNotch*是否可行,我们将其与*Tie2-Cre;CAG-Dre*小鼠繁育,得到*Tie2-Cre;CAG-Dre;Tigre-synNotch*胚胎。*Tie2-Cre*小鼠中内皮细胞表达Cre重组酶^[32],*CAG-Dre*小鼠全身细胞表达Dre重组酶^[33]。因此,在*Tie2-Cre;CAG-Dre;Tigre-synNotch*胚胎中,内皮细胞通过Cre-loxP重组表达mGFP成为配体细胞,其他类型细胞通过和内皮细胞的接触被标记为tdT红色,比如在胚胎大脑中周细胞被标记为tdT阳性,在心脏中心肌细胞被标记为tdT阳性,在肝脏中肝细胞被标记为tdT阳性,在肺脏中肺成纤维细胞被标记为tdT阳性。对于胚胎*CAG-Dre;Tigre-synNotch*,由于没有表达mGFP的配体细胞,我们几乎检测不到tdT的信号,证明*Tie2-Cre;CAG-Dre;Tigre-synNotch*胚胎中的tdT信号是通过mGFP激活受体细胞synNotch通路实现的。因此,当搭配特定Cre小鼠品系时,*Tigre-synNotch*能够监测一种细胞与其接触的所有其他类型细胞间的互作。

6 总结与展望

合成生物学领域可以通过人工合成信号通路实现体外相邻细胞的标记和转录调控,遗传学领域可以通过遗传操控元件实现特定细胞的示踪及基因

表达调控。在该工作中,我们结合了合成生物学技术和传统遗传学手段,建立了邻近细胞遗传标记技术和邻近细胞遗传示踪技术。邻近细胞遗传标记技术用于捕捉细胞之间的实时接触,将细胞接触信息转变为遗传信号,反映出细胞之间的动态相互作用;我们引入*tetO-Cre*工具鼠,基于Cre-loxP重组系统,建立了邻近细胞遗传示踪技术,用于永久记录细胞之间的相互作用,示踪曾经接触过的细胞。借助邻近细胞遗传标记技术,我们直观地揭示了小鼠体内不同细胞间的动态相互作用,包括心肌细胞和内皮细胞、肝细胞和内皮细胞以及肿瘤细胞和内皮细胞的互作;我们发现了心脏中的内皮细胞在早期胚胎发育过程中会迁移到肝脏,并首次揭示了肿瘤血管内皮细胞会迁移到肿瘤外包膜的现象。

邻近细胞遗传学技术可以解决众多与细胞互作相关的重要科学问题,比如追踪特定位置来源的细胞,特别是胚胎不同部位产生的造血干细胞对于各个器官的贡献情况;利用干细胞与微环境细胞之间的接触标记微环境细胞,从而解析干细胞微环境的功能;在同一组织内根据位置的不同将巨噬细胞分类,可以将和不同类型细胞接触的巨噬细胞分为不同类别;肿瘤发生早期肿瘤细胞对微环境细胞的影响等。因此,邻近细胞遗传学技术的建立有助于开拓新的研究方向,对细胞相互作用如何调控发育、组织稳态、疾病及修复再生等过程的深入研究提供重要技术支持。

参考文献 (References)

- [1] DANEMAN R, ZHOU L, KEBEDE A A, et al. Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis [J]. *Nature*, 2010, 468(7323): 562-6.
- [2] HOYTEMA VAN KONIJNENBURG D P, REIS B S, PEDICORD V A, et al. Intestinal epithelial and intraepithelial t cell crosstalk mediates a dynamic response to infection [J]. *Cell*, 2017, 171(4): 783-94, e13.
- [3] BUTCHER E C, PICKER L J. Lymphocyte homing and homeostasis [J]. *Science*, 1996, 272(5258): 60-6.
- [4] BALKWILL F R, CAPASSO M, HAGEMANN T. The tumor microenvironment at a glance [J]. *J Cell Sci*, 2012, 125(Pt 23): 5591-6.
- [5] TIAN X, PU W T, ZHOU B. Cellular origin and developmental program of coronary angiogenesis [J]. *Circ Res*, 2015, 116(3): 515-30.
- [6] MORSUT L, ROYBAL K T, XIONG X, et al. Engineering customized cell sensing and response behaviors using synthetic notch receptors [J]. *Cell*, 2016, 164(4): 780-91.
- [7] ROYBAL K T, WILLIAMS J Z, MORSUT L, et al. Engineering T cells with customized therapeutic response programs using synthetic Notch receptors [J]. *Cell*, 2016, 167(2): 419-32, e16.
- [8] HE L, HUANG J, PERRIMON N. Development of an optimized synthetic Notch receptor as an *in vivo* cell-cell contact sensor [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(21): 5467-72.
- [9] PASQUAL G, CHUDNOVSKIY A, TAS J M J, et al. Monitoring T cell-dendritic cell interactions *in vivo* by intercellular enzymatic labelling [J]. *Nature*, 2018, 553(7689): 496-500.
- [10] BRANON T C, BOSCH J A, SANCHEZ A D, et al. Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID [J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(9): 880-7.
- [11] TODA S, BLAUCH L R, TANG S K Y, et al. Programming self-organizing multicellular structures with synthetic cell-cell signaling [J]. *Science*, 2018, 361(6398): 156-62.
- [12] GE Y, CHEN L, LIU S, et al. Enzyme-mediated intercellular proximity labeling for detecting cell-cell interactions [J]. *J Am Chem Soc*, 2019, 141(5): 1833-7.
- [13] WANG J, LIU Y, LIU Y, et al. Time-resolved protein activation by proximal decaging in living systems [J]. *Nature*, 2019, 569(7757): 509-13.
- [14] OMBRATO L, NOLAN E, KURELAC I, et al. Metastatic-niche labelling reveals parenchymal cells with stem features [J]. *Nature*, 2019, 572(7771): 603-8.
- [15] LEE C K, JEONG S H, JANG C, et al. Tumor metastasis to lymph nodes requires YAP-dependent metabolic adaptation [J]. *Science*, 2019, 363(6427): 644-9.
- [16] KADESCH T. Notch signaling: the demise of elegant simplicity [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2004, 14(5): 506-12.
- [17] KOPAN R, ILAGAN M X. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism [J]. *Cell*, 2009, 137(2): 216-33.
- [18] SPRINZAK D, LAKHANPAL A, LEBON L, et al. Cis-interactions between Notch and Delta generate mutually exclusive signalling states [J]. *Nature*, 2010, 465(7294): 86-90.
- [19] ROYBAL K T, RUPP L J, MORSUT L, et al. Precision tumor recognition by T cells with combinatorial antigen-sensing circuits [J]. *Cell*, 2016, 164(4): 770-9.
- [20] SRIVASTAVA S, SALTER A I, LIGGITT D, et al. Logic-gated ROR1 chimeric antigen receptor expression rescues T cell-mediated toxicity to normal tissues and enables selective tumor targeting [J]. *Cancer Cell*, 2019, 35(3): 489-503, e8.
- [21] ZHANG S, ZHAO H, LIU Z, et al. Monitoring of cell-cell communication and contact history in mammals [J]. *Science*, 2022, 378(6623): eabo5503.
- [22] VOOIJS M, ONG C T, HADLAND B, et al. Mapping the consequence of Notch1 proteolysis *in vivo* with NIP-CRE [J]. *Development*, 2007, 134(3): 535-44.
- [23] ZHU Z, ZHENG T, LEE C G, et al. Tetracycline-controlled transcriptional regulation systems: advances and application in transgenic animal modeling [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2002, 13(2): 121-8.
- [24] FRIDY P C, LI Y, KEEGAN S, et al. A robust pipeline for rapid production of versatile nanobody repertoires [J]. *Nat Methods*, 2014, 11(12): 1253-60.
- [25] DE LA POMPA J L, EPSTEIN J A. Coordinating tissue interactions: Notch signaling in cardiac development and disease [J]. *Dev Cell*, 2012, 22(2): 244-54.
- [26] DEL MONTE-NIETO G, RAMIALISON M, ADAM A A S, et al. Control of cardiac jelly dynamics by NOTCH1 and NRG1 defines the building plan for trabeculation [J]. *Nature*, 2018, 557(7705): 439-45.
- [27] ZHANG H, PU W, TIAN X, et al. Genetic lineage tracing identifies endocardial origin of liver vasculature [J]. *Nat Genet*, 2016, 48(5): 537-43.
- [28] CARMELIET P, JAIN R K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis [J]. *Nature*, 2011, 473(7347): 298-307.
- [29] POTENTE M, MAKINEN T. Vascular heterogeneity and specialization in development and disease [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18(8): 477-94.
- [30] POTENTE M, GERHARDT H, CARMELIET P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis [J]. *Cell*, 2011, 146(6): 873-87.
- [31] ZENG H, HORIE K, MADISEN L, et al. An inducible and reversible mouse genetic rescue system [J]. *PLoS Genet*, 2008, 4(5): e1000069.
- [32] KISANUKI Y Y, HAMMER R E, MIYAZAKI J, et al. Tie2-Cre transgenic mice: a new model for endothelial cell-lineage analysis *in vivo* [J]. *Dev Biol*, 2001, 230(2): 230-42.
- [33] HE L, LI Y, LI Y, et al. Enhancing the precision of genetic lineage tracing using dual recombinases [J]. *Nat Med*, 2017, 23(12): 1488-98.