

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年毕业于浙江大学医学院并获得MD; 2006年毕业于中国协和医科大学并获得PhD; 2006年至2010年在美国哈佛大学医学院波士顿儿童医院从事博士后研究; 2010年9月起至今在中国科学院工作。周斌研究组主要开发遗传谱系示踪新技术, 研究哺乳动物体内细胞起源及命运调控机制, 代表性研究工作多次在*Cell*、*Nature*、*Science*等国际学术期刊上发表。发现了哺乳动物新生期心脏具有重新生成冠状动脉的能力, 该工作入选“中国科学十大进展”; 解决了国际心血管领域内关于心脏干细胞与心肌再生的重大科学争议; 建立了双重组酶介导的遗传学技术和邻近细胞遗传学技术, 从全新的角度揭示了器官发育与修复再生的调控机制。周斌研究员曾获得国际心脏研究会ISHR——“杰出研究员奖”、国家杰出青年科学基金资助、中国青年科技奖、科学探索奖、新基石研究员等。

利用双同源重组谱系示踪技术揭示肺损后 肺泡干细胞再生起源

刘扩 孟鑫凤 周斌*

(多细胞体系结构与功能重点实验室, 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, 中国科学院大学, 上海 200031)

摘要 肺脏修复再生是肺领域研究热点。在一些肺脏疾病中肺泡上皮结构受损, 需要肺泡上皮干细胞的参与才能完成修复。因此揭示肺泡上皮干细胞的再生起源对肺脏疾病的防治具有重要意义。领域内既往研究一致认为肺泡II型上皮细胞(AT2细胞)属于肺泡上皮干细胞, 不仅可以自我增殖还可以分化为AT1细胞。近年来有研究认为AT2还可以来源于支气管棒状细胞(club细胞)以及AT1细胞。然而这些研究中用来标记club细胞和AT1细胞的传统谱系示踪工具存在非特异性标记问题, 导致这些结论存在重大科学争议。为阐明科学争议, 该团队通过构建一系列更为精准的双同源重组谱系示踪新技术实现了对肺上皮细胞类型的特异性遗传靶向, 并结合多种肺脏损伤模型揭示了新生AT2细胞除来源于AT2细胞自我增殖外, 还可来源于club细胞、支气管肺泡干细胞(BASCs), 而不会来源于AT1细胞, 并阐明Notch信号通路参与调控club细胞和BASCs向AT2细胞命运转分化。阐明AT2细胞再生起源为肺部疾病研究提供重要研究基础, 新开发的双同源重组谱系示踪技术可被广泛应用于发育生物学、遗传学和再生医学相关研究。

关键词 肺脏再生; 细胞遗传谱系示踪; 肺泡干细胞; Notch信号通路; Cre-loxP; Dre-rox

Dual Recombinases-Mediated Genetic Tracing Reveals the Cellular Origin of Alveolar Stem Cells after Lung Injury

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

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

LIU Kuo, MENG Xinfeng, ZHOU Bin*

(Key Laboratory of Multi-Cell Systems, 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 Lung repair and regeneration have emerged as a pivotal area of research in pulmonology. In some lung diseases, the alveolar epithelial structure is damaged and requires the involvement of alveolar stem cells to regenerate the damaged areas. Consequently, elucidating the origins of alveolar stem cells holds immense clinical importance for the prevention and treatment of lung diseases. Previous studies have consistently identified AT2 cells (alveolar epithelial type II cells) as alveolar stem cells, capable of self-renewal and differentiation into AT1 cells. Nevertheless, recent investigations have proposed an alternative hypothesis, suggesting that AT2 cells can also originate from bronchiolar club cells and alveolar AT1 cells. However, the conventional lineage tracing techniques employed in these studies have been plagued with non-specific labeling issues, resulting in inconclusive findings. To address this controversy, this team has developed a suite of more precise dual recombinases-mediated genetic tools for the specific labeling of lung epithelial cell types. By integrating these tools with multiple lung injury models, this article has uncovered that new AT2 cells can originate from club cells and BASCs (bronchoalveolar stem cells), in addition to the self-renewal of AT2 cells, but not from AT1 cells. Furthermore, the study has revealed that the Notch signaling pathway plays a crucial role in regulating the transition of club cells and BASCs into AT2 cells. Elucidating the origins of AT2 cells during lung repair provides novel insights for the treatment of lung diseases. The dual recombination lineage tracing technique established in this article holds vast potential for broader applications in the fields of developmental biology, genetics, and regenerative medicine.

Keywords lung regeneration; cell genetic lineage tracing; alveolar stem cell, Notch signaling pathway; Cre-loxP; Dre-rox

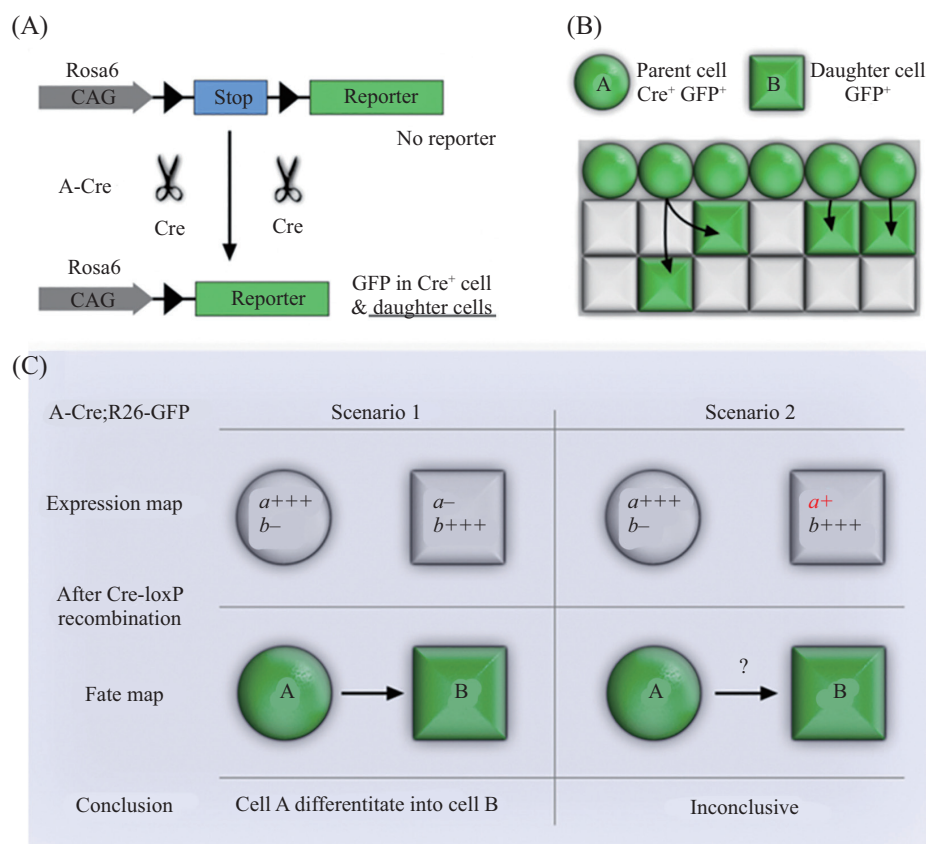
1 细胞遗传谱系示踪技术

细胞遗传谱系示踪(cell genetic lineage tracing)技术被广泛应用于发育生物学、遗传学、再生医学等领域研究。细胞谱系示踪主要基于同源重组酶系统,目前已有多种同源重组酶系统被发现,例如Cre-loxP、Dre-rox、Flp-*frt*、Nigri-*nox*等^[1]。它们的工作原理类似,Cre-loxP系统使用最为广泛。以 α -Cre;*Rosa26-loxP-stop-loxP-GFP*遗传工具为例介绍其工作原理(图1A)。Cre为同源重组酶,受细胞基因启动子 α 驱动表达,loxP为Cre的识别位点,Cre可识别并介导两个同向loxP位点之间发生同源重组,并切除loxP之间的基因序列。loxP-stop-loxP-GFP序列被插在管家基因*Rosa26*位点,当细胞核内无Cre存在时,转录终止stop序列就会阻止基因转录,后侧的荧光报告基因不会表达。当启动子 α 被激活后Cre重组酶会表达并入核介导Cre-loxP重组,切除stop序列,进而激活绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的表达。由于这种切割是发生在基因组水平,无论细胞发生增殖或分化, α^+ 或Cre⁺细胞都会被永久

性标记为GFP,以此实现对靶细胞的谱系追踪(图1A和图1B)^[2]。

传统遗传谱系示踪技术主要依赖于一种同源重组酶系统,因此对靶细胞标记的特异性就取决于启动子表达的细胞特异性。如果启动子 α 特异性表达在A细胞,那么通过谱系示踪实验我们可以明确得出结论:A细胞可以转分化为B细胞。如果启动子 α 除了表达在A细胞还“非特异性”表达在B细胞,那么我们无法准确区分B细胞是起源于A细胞还是起源于起始标记的B细胞。因此这种非特异性标记问题很容易导致谱系示踪假阳性结论(图1C)^[2]。

我们研究团队长期致力于更为精准的谱系示踪新技术开发。若一种同源重组酶Cre-loxP无法实现对靶细胞的特异性标记,那我们引入另一种同源重组酶系统Dre-rox,通过构建双同源重组谱系示踪技术来实现对靶细胞特异性标记,以此规避传统技术的非特异性标记问题。利用双同源重组谱系示踪技术我们已经解决了包括心血管领域、肝脏再生及肺脏再生在内等领域多个重大科学争议,有力地推动



A: 细胞遗传谱系示踪技术原理, 当发生Cre-loxP重组后细胞A被标记为GFP。B: 通过谱系示踪可以监测到细胞A分化为细胞B。C: 若细胞A特异性表达启动子 a , 那么通过谱系示踪可以得出细胞B来源于细胞A的结论, 若启动子少量表达在细胞B, 那么无法得出细胞B来源于细胞A的结论。

A: a schematic diagram showing the cell principle of genetic lineage tracing. After Cre-loxP recombination, cell A is labeled by GFP. B: the differentiation of cell A into cell B can be monitored by genetic lineage tracing. C: if promoter a is specifically expressed in cell A, it can be concluded that cell B is derived from cell A. But if promoter a is non-specifically expressed in cell A, it cannot be concluded that cell B is derived from cell A.

图1 Cre-loxP系统介导的细胞遗传谱系示踪技术(根据参考文献[2]修改)

Fig.1 Cre-loxP-mediated cell genetic lineage tracing (modified from reference [2])

了学科发展^[3-8]。接下来我们将以揭示肺泡上皮干细胞再生起源研究为例^[5], 详细介绍双同源重组新技术的选择与应用, 以期为领域内相关研究提供技术指导。

2 肺脏上皮结构和功能

肺脏作为多功能器官, 对维持人体正常生理功能至关重要。肺脏结构复杂, 从组织解剖位置上自近端至远端可划分为气道、支气管和肺泡结构^[9]。这些结构组成一个层级分支的树状结构, 共同负责空气的传输和气体交换。在这些不同结构区域分布着不同数目和类型的上皮细胞, 并且各自区域含有上皮干细胞或祖细胞, 共同维持着上皮结构的稳定^[9-10]。小鼠具有与人类相似的肺脏结构, 是进行肺脏研究的理想模型。以小鼠为例, 气道上皮为假复层上皮, 主要由基底细胞(basal cell)、棒状细胞(club cell)、

纤毛细胞(ciliated cell)和神经内分泌细胞(neuroendocrine cell)等细胞类型构成。club细胞可以分泌黏液, 该黏液不仅具有排毒作用, 还可以维持呼吸道湿润, 减少外界刺激和损伤。纤毛细胞可以通过摆动利用纤毛结构清除黏附在气道表面的细菌、病毒、尘埃等异物, 从而维持呼吸道清洁。神经内分泌细胞可以通过分泌各种神经递质、神经肽等物质响应环境刺激例如机械刺激、氧气浓度和过敏原等。其中基底细胞作为气道上皮主要干细胞, 在稳态和气道受损后不仅可以自我增殖还可以分化为棒状细胞和纤毛细胞等功能细胞来维持上皮层稳定。有研究发现, 当利用白喉毒素将气道基底细胞清除后, club细胞可以作为干细胞转分化基底细胞, 进而再分化为其他功能性细胞来修复上皮结构^[11]。这项研究指出当亲本细胞(parent cell)缺失时, 它的子代细胞(daughter

cell)可以通过逆向去分化转变为亲本细胞类型去发挥干细胞职能^[11]。支气管上皮主要由club细胞、纤毛细胞和神经内分泌细胞构成。其中club细胞是支气管上皮主要干细胞,当支气管损伤后其可以自我增殖并分化为纤毛细胞促进再生修复^[12]。神经内分泌细胞数目少,虽然在肺稳态不会发生分化,但在支气管损伤后也可以分化为club细胞和纤毛细胞从而参与上皮修复^[13-14]。纤毛细胞属于终末分化细胞,不会发生细胞命运转变,因此其更新主要依赖于基底细胞、club细胞或神经内分泌细胞分化^[15]。

肺泡上皮是气体交换的主要场所,主要由I型肺泡上皮细胞(alveolar type I cell, AT1 cell)和II型肺泡上皮细胞(alveolar type II cell, AT2 cell)构成。AT1细胞形态呈扁平状,占肺泡表面积的95%,主要负责气体交换。AT2细胞形态呈立方形或圆形,占肺泡表面积的5%,可以通过分泌表面活性物质降低肺泡表面张力、防止肺泡塌缩^[16]。AT2细胞属于肺泡干细胞,当肺泡受损后,可以增殖并分化为AT1细胞,从而参与肺泡的修复再生^[17-19]。

3 肺泡干细胞再生起源研究进展

在一些肺部疾病,例如特发性肺纤维化、肺炎、慢性阻塞性肺病、肺气肿等肺病中,AT2肺泡干细胞会持续受损,导致肺部损伤修复障碍^[10]。因此增强AT2细胞生存能力、寻找AT2细胞再生起源对恢复肺部功能结构具有重要意义。对于AT2细胞再生起源研究,之前领域内认为AT2细胞主要来源于肺泡原位AT2干细胞的自我增殖^[17]。有研究进一步发现AT2细胞群存在异质性,其中有一亚群表达Axin2,并揭示Axin2⁺ AT2细胞属于AT2干细胞,在肺损伤(高氧损伤模型和流感损伤模型)后可以再生AT2细胞和AT1细胞进而参与肺泡上皮损伤修复^[18-19]。近年来,关于AT2细胞再生起源陆续有新的观点被提出。有研究发现在支气管末端存在一群p63⁺Krt5⁺干细胞,称为支气管末端干细胞(distal airway stem cell, DASC)^[20]。DASC在流感损伤模型中会迁移至肺泡区域并分化为AT1细胞和AT2细胞促进肺泡再生修复^[20]。也有研究认为在稳态支气管末端存在一小群干细胞,称为谱系阴性干细胞(lineage-negative epithelial stem/progenitors, LNEPs)。在一些肺脏损伤模型(例如流感模型和博来霉素诱导模型)中LNEPs会表达p63和Krt5,并且会迁移至肺泡区域分化为成

熟肺泡上皮细胞类型。这个过程需要Notch信号通路参与,Notch通路抑制会促进LNEPs分化为AT2细胞^[21-22]。另外,有研究提出在支气管和肺泡交界位置存在一群肺上皮干细胞,称为支气管肺泡干细胞(bronchioalveolar stem cells, BASCs),具有同时表达club细胞分子标记Scgb1a1和AT2细胞分子标记Sftpc的特点^[23]。前人研究BASCs主要利用细胞分选和体外培养方式,其在体内是否真实存在缺乏严格遗传学证据证明^[23]。利用双同源重组谱系示踪技术,我们团队^[6,24]以及其他团队^[25]先后证明BASCs属于肺脏多潜能干细胞,当支气管损伤后BASCs会分化为club细胞和纤毛细胞促进支气管上皮修复,当肺泡损伤后BASCs又可以分化为AT2细胞和AT1细胞促进肺泡上皮再生修复。利用单细胞克隆分析技术,我们也发现当给与支气管和肺泡两种损伤后,单个BASC具有向支气管和肺泡双向分化潜能,可以同时分化为club细胞、纤毛细胞、AT2细胞和AT1细胞促进支气管和肺泡再生修复^[24]。

关于肺损后AT2细胞的再生来源一直属于领域内研究热点。最近有国际权威期刊提出了全新的概念,认为AT1细胞和club细胞也可以通过转分化AT2细胞促进肺再生^[26-29,31-33]。首先对于AT1细胞,PSTEIN团队^[26]首先报道AT1细胞在肺切模型中可以转分化AT2细胞从而促进肺泡再生。随后,MORRISEY团队^[27-28]先后报道在高氧损伤模型及左肺结扎诱导的肺泡张力缺失模型中同样可以观测到AT1细胞转分化为AT2细胞。细胞分裂周期蛋白42(cell division cycle 42, CDC42)蛋白在依赖于肌动蛋白细胞骨架的细胞过程,例如细胞迁移、细胞极性和细胞命运决定等中发挥重要作用。蛋白酪氨酸激酶2(protein tyrosine kinase 2, PTK2)在介导细胞接触、细胞迁移方面同样发挥重要调控作用。MORRISEY团队^[28]进一步发现,在AT1细胞中敲除*Cdc42*或*Ptk2*基因会导致细胞机械应力减小,直接促使AT1细胞转分化为AT2细胞。Krüppel样因子5(Kruppel-like factor 5, KLF5)属于一种锌指转录调节因子,MORRISEY团队^[29]同样发现在AT1细胞中敲除*Klf5*基因也会诱导AT1细胞转分化为AT2细胞。对于肺癌起源,以往研究发现在支气管club细胞和肺泡AT2细胞中过表达致癌基因*Kras*^{G12D}均可以诱导其恶性扩增并发展为肺癌^[30]。近期DESAI团队^[31]在*Nature*期刊报道在AT1细胞中过表达*Kras*^{G12D}也可诱导其重编程为AT2干细胞,这

项研究提出 AT1 细胞是一种新的肺腺癌细胞起源。对于 club 细胞, CHAPMAN 团队^[32]通过类器官培养和细胞移植等技术发现 club 细胞存在一个 H2-K1^{high} 干细胞亚群, 可以在肺损伤后分化为 AT2 细胞促进肺泡修复再生。LEE 团队^[33]进一步通过体内谱系示踪实验报道在博来霉素诱导的肺损伤模型中, club 细胞会迁移至肺泡区域分化为 AT2 细胞促进肺泡再生。以上这些报道均属于肺脏干细胞研究突破性发现, 极大地推进了肺脏再生领域研究发展。然而, 这些研究中用来标记 AT1 细胞的遗传工具 *Hopx-CreER* 和 club 细胞遗传工具 *Scgb1a1-CreER* 的特异性未被严格评估, 利用其所得出的实验结论存在质疑。然而, 我们前期研究发现这些遗传工具具有非特异性标记问题^[5], 说明 AT2 细胞是否能来源于 AT1 细胞或 club 细胞确实存在科学争议, 领域内亟需构建更为精准的谱系示踪新技术对这些争议进行阐明。

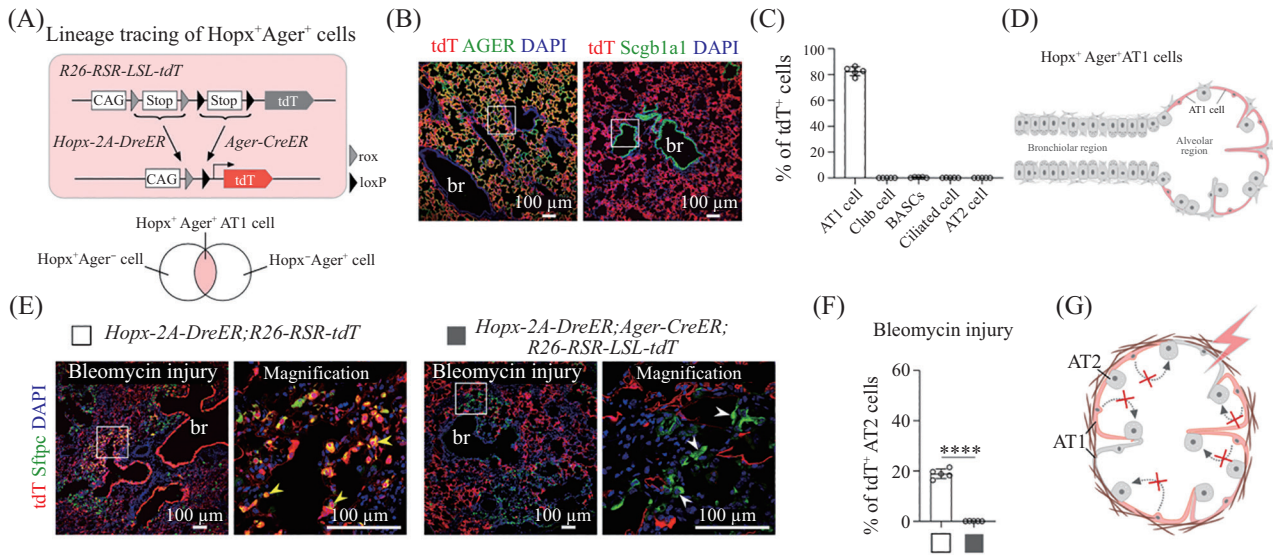
4 肺损伤后 AT1 细胞不会转分化为 AT2 细胞

为了阐明 AT2 细胞是否可以来源于 AT1 细胞或 club 细胞, 我们对领域内普遍使用的 AT1 细胞标记工具 *Hopx-CreER* 进行了系统性鉴定^[26-29,31]。对稳态下成体 *Hopx-CreER;R26-tdT* 工具小鼠进行肺脏切片及免疫荧光染色分析, 发现其除了标记 AT1 细胞外, 还“非特异性”标记约 66% club 细胞、约 92% ciliated 细胞、约 12% BASCs 和约 0.24% AT2 细胞。由于之前研究已经提出 BASCs、club 细胞和 AT2 细胞在肺脏损伤后可以贡献给 AT2 细胞, 因此这些“非特异性”标记细胞会对 *Hopx-CreER;R26-tdT* 的谱系示踪结果产生很大干扰^[5]。同时我们也构建了 *Hopx-2A-DreER* 工具小鼠, 也验证了在 *Hopx-2A-DreER;R26-RSR-tdT* 小鼠中同样发现非特异性标记问题。tdT 除了标记 AT1 细胞外, 还“非特异性”标记 club 细胞、ciliated 细胞和少部分 BASCs^[5]。另外, 我们也发现领域内另一种 AT1 遗传工具 *Ager-CreER* 除了标记 AT1 细胞也会“非特异性”标记一部分 AT2 细胞和少量 BASCs^[34]。通过这些实验, 我们揭示基于 *Hopx* 基因或 *Ager* 基因的传统单同源重组酶驱动的谱系示踪技术具有非特异性标记问题, 因此无法利用其对 AT1 细胞进行严格的谱系示踪研究。亟需构建谱系示踪新技术对其 AT1 细胞可塑性重新进行研究。

通过对比, 我们发现 *Hopx-2A-DreER* 与 *Ager-CreER* 非特异性标记的细胞类型具有“互斥”特点, 即 *Hopx-2A-DreER* “非特异性”标记细胞类型主要是

ciliated 细胞和 club 细胞, 而 *Ager-CreER* “非特异性”标记细胞类型主要是 AT2 细胞和 BASCs。因此, 我们提出是否可以利用双同源重组酶驱动的谱系示踪新技术来解决此难题。基于这个“互斥”特点, 我们利用交叉标记策略 (intersectional strategy)^[6] 尝试对 *Hopx⁺Ager⁺* AT1 细胞进行特异性标记 (图 2A)。这个交叉标记策略的双同源重组报告系统序列结构是 *Rosa26-rox-stop-rox-loxP-stop-loxP-tdTomato* (简称为 *R26-RSR-LSL-tdT*)。在这个系统中, 只有细胞中同时发生 *Dre-rox* 和 *Cre-loxP* 重组, 后面的报告基因 *tdT* 才会表达 (图 2A)。通过小鼠配繁我们获得 *Hopx-2A-DreER;Ager-CreER;R26-RSR-LSL-tdT* 三基因型小鼠, 注射他莫昔芬后收取肺脏样本进行体内验证, 成功证明其可实现对约 80% *Hopx⁺Ager⁺* AT1 细胞特异性标记 (图 2B~图 2D)。然而, 结合多种肺损伤模型 (肺切、博来霉素和高氧损伤模型), 我们并未检测到肺损伤后 AT1 细胞转分化为 AT2 细胞 (图 2E~图 2G)。

上述策略只是标记 *Hopx⁺Ager⁺* AT1 细胞亚群, 为了更高效地标记所有 AT1 细胞, 我们尝试利用嵌套策略 (nested strategy) 来对 AT1 细胞进行研究^[3]。这个嵌套策略双报告系统序列结构是 *Rosa26-loxP-rox-stop-rox-ZsGreen-stop-loxP-tdTomato* (简称为 *R26-NR2*)。在这个系统中, rox 识别位点位于内侧, loxP 识别位点位于 rox-stop-rox-ZsGreen 外侧, 当细胞内发生 *Dre-rox* 重组后该细胞会被标记为 ZsGreen, 当再次发生 *Cre-loxP* 重组后 ZsGreen 和 Stop 序列均会被切除, 细胞最终被标记为 tdTomato (图 3A)。我们前期实验已经证明 *Hopx-2A-DreER* 除了标记 AT1 细胞外, 还“非特异性”标记 club 细胞、ciliated 细胞、BASCs 和少部分 AT2 细胞。而 *Sox2-CreER* 工具可以标记 club 细胞和 ciliated 细胞, *Sftpc-CreER* 工具可以标记 AT2 细胞和 BASCs, 因此为“封闭”这些“非特异性”标记细胞类型, 我们构建了双同源重组“嵌套策略”遗传工具: *Hopx-2A-DreER;Sox2-CreER;Sftpc-CreER;R26-NR2* 四基因型工具小鼠。在此策略中, *Hopx⁺* AT1 细胞发生 *Dre-rox* 重组后会被特异性标记为 ZsGreen, 而“非特异性”标记的 club 细胞、ciliated 细胞、BASCs 及 AT2 细胞由于再次发生 *Cre-loxP* 重组均会被统一标记为 tdTomato (图 3B)。通过验证, 我们发现这一策略是可行的, 可以高效、特异性标记约 98% AT1 细胞, 而 AT2 细胞、club 细胞、ciliated 细胞和 BASCs 均被标记为 tdTomato (图 3C 和图 3D)。然



A: 利用交叉标记策略对Hopx⁺Ager⁺ AT1细胞进行特异性标记。B: *Hopx-2A-DreER; Ager-CreER; R26-RSR-LSL-tdT*小鼠经他莫昔芬诱导后收取肺脏切片进行免疫荧光共染tdT、AGER或Scgblal。C: 统计tdT标记的肺上皮细胞类型。D: 卡通图表示利用交叉策略实现对AT1细胞特异性标记。E: 对*Hopx-2A-DreER; R26-RSR-tdT*对照组小鼠和*Hopx-2A-DreER; Ager-CreER; R26-RSR-LSL-tdT*实验组小鼠进行博来霉素损伤。4周后, 收取肺脏样本进行tdT和Sftpc免疫荧光染色。F: 统计tdT标记的AT2细胞比例。*****P*<0.000 1。G: 卡通示意图展示AT1细胞不会转分化为AT2细胞。

A: a schematic diagram showing the intersectional genetic strategy for lineage tracing of Hopx⁺Ager⁺ AT1 cells. B: immunostaining of tdT, AGER, and Scgblal on lung sections of *Hopx-2A-DreER; Ager-CreER; R26-RSR-LSL-tdT* mice after tamoxifen treatment. C: quantification of the percentage of pulmonary epithelial cells that are labeled by tdT. D: schematic diagram illustrating the AT1 cells are specifically labeled by intersectional genetic strategy. E: immunostaining of tdT and Sftpc on lung sections of *Hopx-2A-DreER; R26-RSR-tdT* mice and *Hopx-2A-DreER; Ager-CreER; R26-RSR-LSL-tdT* mice after bleomycin injury. F: quantification of the percentage of AT2 cells labeled by tdT. *****P*<0.000 1. G: AT1 cells do not differentiate into AT2 cells after bleomycin injury.

图2 利用交叉标记策略揭示肺损伤后AT1细胞不会转变为AT2细胞(根据参考文献[5]修改)

Fig.2 Intersectional genetics reveal that AT1 cells do not generate AT2 cells after lung injuries (modified from reference [5])

而结合多种肺损伤(肺切损伤和博来霉素损伤)模型, 我们仍然未检测到新生AT2细胞来源于AT1细胞(图3E~图3G)。近期也有研究团队发现Hopx⁺Igf1bp2⁺ AT1细胞在肺切损伤模型中不会转分化为AT2细胞, 我们的研究结论也与该报道一致^[35]。因此, 通过构建两种双同源重组谱系示踪新技术, 我们揭示了AT1细胞不具备可塑性, 在肺损伤修复中不会转分化为AT2细胞, 解决了这一重要科学争议。

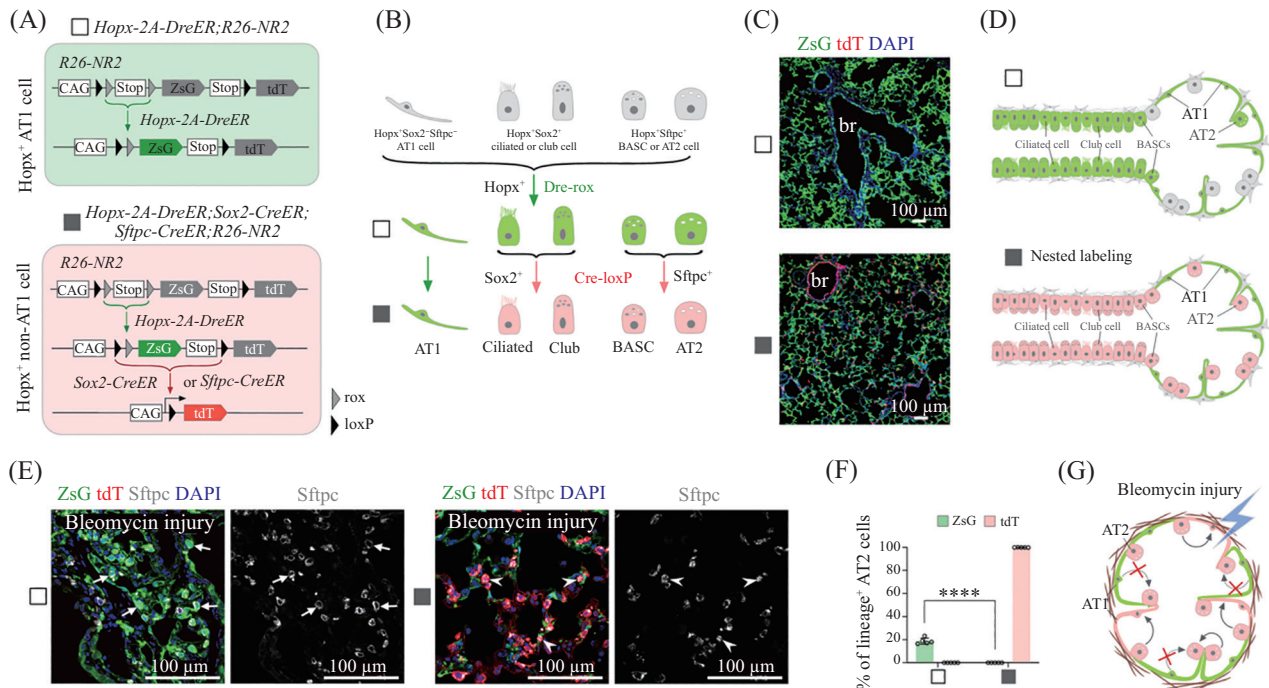
5 肺损伤后club细胞参与肺泡上皮再生修复

针对领域内普遍使用的club细胞遗传工具*Scgblal-CreER*^[12], 我们同样进行了系统验证。通过验证, 我们发现*Scgblal-CreER; R26-tdT*工具同样具有非特异性标记问题, 其除了标记club细胞外还会“非特异性”标记BASCs和少量AT2细胞, 这会对club细胞的谱系示踪结果产生干扰。因此我们基于Cre-loxP和Dre-rox构建了另一种双同源重组报告系统, 结构为Rosa26-rox-stop-rox-ZsGreen-loxP-stop-loxP-tdTomato(简称为*R26-TLR*)^[36]。在此系统中, 当细胞内发生Cre-loxP重

组, 该细胞会被标记为tdTomato; 当细胞内发生Dre-rox重组, 该细胞会被标记为ZsGreen; 当细胞内同时发生Cre-loxP和Dre-rox重组, 该细胞会被标记为tdTomato和ZsGreen, 从而展现出黄色荧光标记(图4A)。因此利用此原理, 我们构建了*Scgblal-CreER; Sftpc-DreER; R26-TLR*三基因型工具小鼠。通过体内验证, 我们证实club细胞、BASCs和AT2细胞分别被特异性标记为tdTomato⁺、tdTomato⁺ZsGreen⁺和ZsGreen⁺, 我们分别称之为Club-tracer、BASC-tracer和AT2-tracer。以此解决了传统技术的非特异性标记问题(图4B和图4C)。

结合多种肺损伤模型, 我们发现这三种细胞群对肺泡再生的贡献程度根据肺泡损伤的程度不同表现出显著性差异。在肺切损伤模型中, AT2细胞主要依赖于自我更新, club细胞和BASCs的贡献非常少, 两者贡献加起来低于2%。在博来霉素诱导的肺损伤模型中, 新生AT2细胞除自我更新外还来源于club细胞(约27%)和BASCs(约11%)(图4D和图4E)。

为进一步挖掘club细胞对肺泡上皮修复的潜力, 我们改进了双同源重组报告系统, 在rox-stop-rox序



A、B: 利用嵌套标记策略对AT1细胞进行特异性标记。C: 对*Hopx-2A-DreER;R26-NR2*小鼠和*Hopx-2A-DreER;Sox2-CreER;Sftpc-CreER;R26-NR2*小鼠肺脏切片进行ZsG和tdT免疫荧光染色。D: 卡通图表示利用嵌套策略实现对AT1细胞特异性标记。E: 对小鼠进行博来霉素损伤4周后收取肺脏样本进行tdT、ZsG和Sftpc免疫荧光染色。F: 统计tdT和ZsG标记的AT2细胞比例。**** $P < 0.0001$ 。G: 卡通示意图展示AT1细胞不会转化为AT2细胞。

A,B: a schematic diagram showing the nested genetic strategy for lineage tracing of AT1 cells. C: immunostaining of tdT and ZsG on lung sections of *Hopx-2A-DreER;R26-NR2* mice and *Hopx-2A-DreER;Sox2-CreER;Sftpc-CreER;R26-NR2* mice after tamoxifen treatment. D: schematic diagram illustrating the AT1 cells are specifically labeled by ZsG and the non-AT1 cells are labeled by tdT with nested genetic strategy. E: immunostaining of tdT, ZsG, and Sftpc on lung sections after bleomycin injury. F: quantification of the percentage of AT2 cells labeled by tdT or ZsG. **** $P < 0.0001$. G: AT1 cells do not generate AT2 cells after bleomycin injury.

图3 肺损伤后AT2细胞不会来源于AT1细胞(根据参考文献[5]修改)

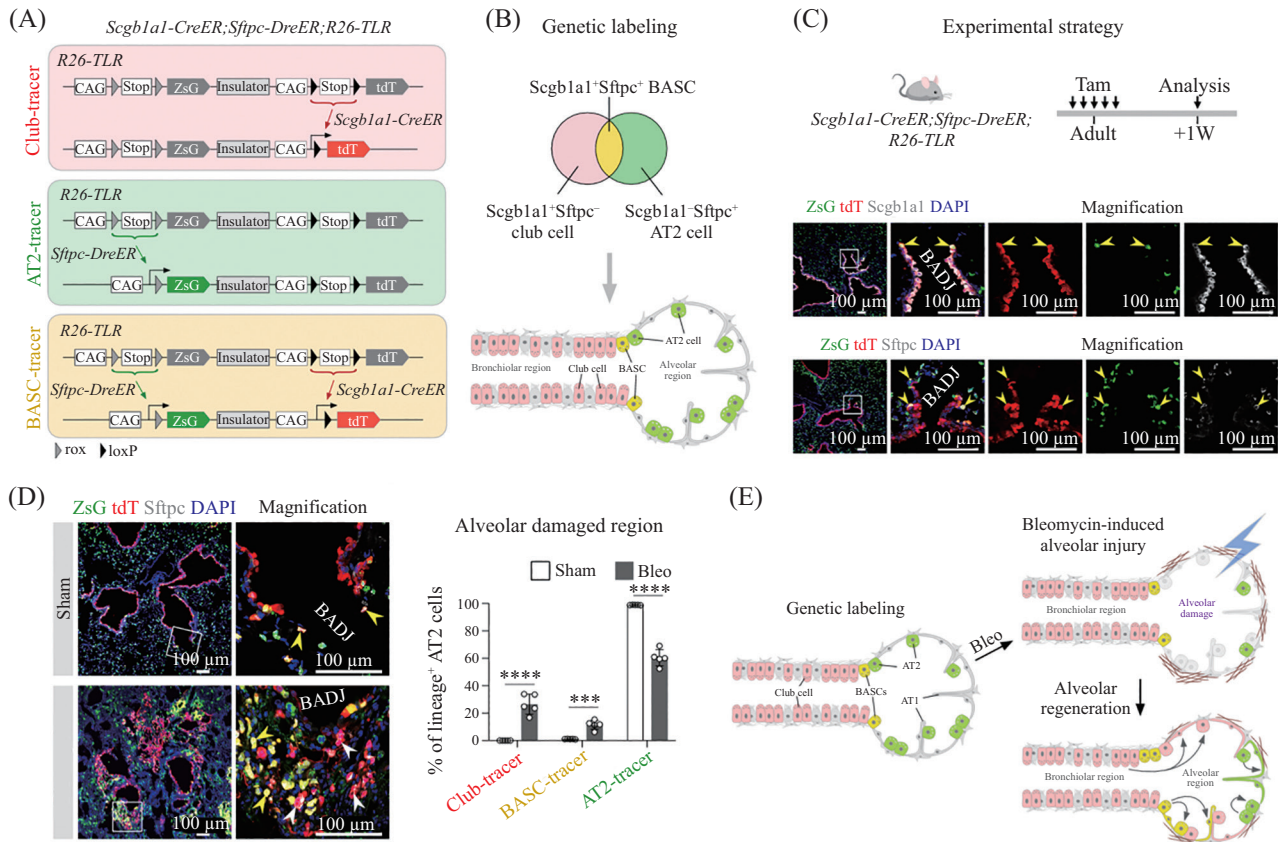
Fig.3 AT1 cells do not generate AT2 cells after lung injury (modified from reference [5])

列后额外插入了 *p21* 基因序列, 可以在 Dre-rox 重组后同时诱导细胞过表达 *p21* 蛋白(图5A)。*p21* 蛋白是细胞周期抑制因子, 我们前期研究发现细胞过表达 *p21* 蛋白可抑制细胞增殖^[37]。为封闭 BASCs 和 AT2 细胞的增殖能力, 使之不能参与再生修复, 以此激发 club 细胞的可塑性潜力, 我们最终构建了双同源重组系统, 即 *Sftpc-DreER;R26-rox-p21-GFP;Scgblal-CreER;R26-LZL-tdT* 四基因型遗传工具。在这个系统内, club 细胞内会发生 Cre-loxP 被标记为 tdTomato, AT2 细胞内会发生 Dre-rox 重组被标记为 GFP 并表达 *p21* 蛋白, BASCs 内同时发生 Cre-loxP 和 Dre-rox 重组被标记为 tdTomato 和 GFP 并表达 *p21* 蛋白(图5B)。通过体内验证, 我们证明此策略是可行的。因此, 再结合博来霉素损伤模型, 我们尝试挖掘 club 细胞的可塑性潜能。收取博来霉素损伤4周后的肺脏进行分析, 发现 AT2 细胞和 BASCs 原本的修复能力成功被

抑制, 并发现 club 细胞大量转分化为新生 AT2 细胞和 AT1 细胞, 统计显示损伤区域约 47% AT2 细胞起源于 club 细胞(图5C)。进一步, 收取损伤后 8 个月修复的肺脏进行分析, 我们惊奇地发现约 82% AT2 细胞起源于 club 细胞(图5C和图5D)。我们发现某些损伤严重的肺叶中, club 细胞来源的肺泡上皮细胞可以覆盖绝大部分肺泡区域。通过以上实验, 我们揭示当 AT2 细胞和 BASCs 修复能力被抑制时, club 细胞会成为新生 AT2 细胞主要来源, 参与肺泡上皮再生修复。通过以上多种双同源重组谱系示踪新技术, 我们阐明了 club 细胞可作为干细胞参与肺泡上皮再生修复, 解决了这一重要科学争议。

6 Notch 信号通路参与 club 细胞和 BASCs 向 AT2 细胞转分化

利用谱系示踪新技术, 我们揭示 club 细胞和



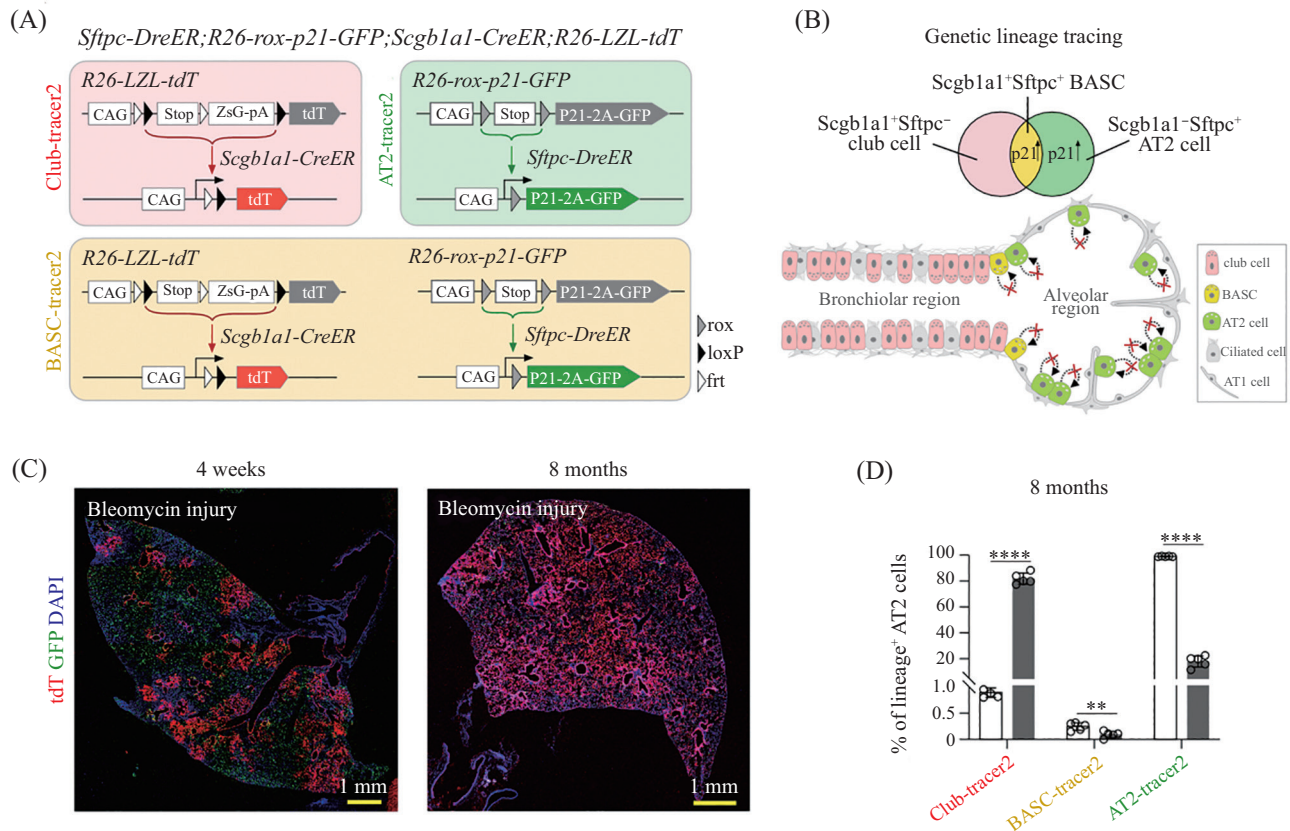
A、B: 利用双同源重组谱系示踪同时对club细胞、BASCs和AT2细胞进行特异性标记。C: 对*Scgb1a1-CreER;Sftpc-DreER;R26-TLR*小鼠肺脏切片进行ZsG、tdT、Scgb1a1或Sftpc免疫荧光染色。D: 对小鼠进行博来霉素损伤后的肺脏样本进行tdT、ZsG和Sftpc免疫荧光染色及统计分析。*** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ 。E: 卡通示意图展示肺泡损伤后club细胞和BASCs会迁移至肺泡区域分化为AT2和AT1细胞促进肺泡修复再生。
A,B: schematic diagrams showing intersectional genetics for simultaneous and specific labeling of club cells, BASCs, and AT2 cells. C: immunostaining of tdT, ZsG, Scgb1a1, and Sftpc on lung sections of *Scgb1a1-CreER;Sftpc-DreER;R26-TLR* mice after tamoxifen treatment. D: immunostaining of tdT, ZsG, and Sftpc on lung sections after bleomycin injury and quantification of the percentage of AT2 cells labeled by tdT or ZsG. *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$. E: cartoon image showing club cells and BASCs give rise to AT2 cells and AT1 cells after bleomycin injury.

图4 club细胞参与肺泡再生修复(根据参考文献[5]修改)

Fig.4 club cells contribute to alveolar epithelial cells during lung repair (modified from reference [5])

BASCs在博来霉素诱导的肺损伤模型中可以迁移至肺泡区域,并分化为肺泡上皮细胞促进肺泡再生修复。那么在分子机制上,是何种信号通路调控club细胞及BASCs向AT2细胞发生细胞命运转变呢?这两种分子调控机制之间又有什么区别?为了进一步探究这一科学问题,我们对*Scgb1a1-CreER;Sftpc-DreER;R26-TLR*工具小鼠进行博来霉素损伤,修复4周后并分选Club-tracer、BASC-tracer和AT2-tracer标记细胞进行单细胞转录组测序(scRNA-seq)分析。分析显示Club-tracer标记的细胞可以被划分为多个细胞亚群(cell cluster),包括起始标记的club细胞亚群,还有细胞分化终点的AT2细胞、AT1细胞亚群,以及多种中间态细胞亚群。这些细胞亚群具有不同的基因表达特点,拟时序分析揭示这些细胞亚群之

间具有紧密的谱系联系,细胞命运转变路径从club细胞亚群经中间态细胞分化为AT2细胞和AT1细胞。另外,根据基因表达情况,BASC-tracer标记的细胞也可被划分为多个细胞亚群,包括起始标记的BASC亚群,还有细胞分化后的AT2细胞、AT1细胞亚群,以及中间态细胞亚群。这些细胞亚群在基因表达谱系上同样具有连贯性,拟时序分析显示细胞分化谱系起始于BASC-细胞,然后经过中间态细胞可依次分化为AT2细胞和AT1细胞。进一步通过与Club-tracer对比,我们发现BASC-tracer中的AT2细胞在基因表达上更接近于AT2-tracer中的AT2细胞。因为BASC的特征之一是同时表达club细胞和AT2细胞分子标记,我们前期研究也揭示BASC的基因表达处于club细胞和AT2细胞之间,这暗示BASC可能会更快



A, B: 利用双同源重组谱系示踪同时对club细胞、BASCs和AT2细胞进行特异性标记并在club细胞和BASCs中过表达p21蛋白。C、D: 对*Sftpc-DreER;R26-rox-p21-GFP;Scgb1a1-CreER;R26-LZL-tdT*小鼠进行博来霉素损伤后4周和8个月的肺脏样本进行tdT和GFP免疫荧光染色及统计分析。*** $P<0.01$, **** $P<0.0001$ 。

A,B: schematic diagrams showing genetic labeling of club cells, BASCs, and AT2 cells and induce p21 expression in club cells and BASCs. C,D: immunostaining and quantification of the percentage of tdT and ZsG on lung sections of *Sftpc-DreER;R26-rox-p21-GFP;Scgb1a1-CreER;R26-LZL-tdT* mice after 4 weeks and 8 months bleomycin injury. *** $P<0.01$, **** $P<0.0001$ 。

图5 肺泡极端损伤下club细胞能再生大部分肺泡(根据参考文献[5]修改)

Fig.5 club cells regenerate the majority of alveolar epithelium after severe alveolar injury (modified from reference [5])

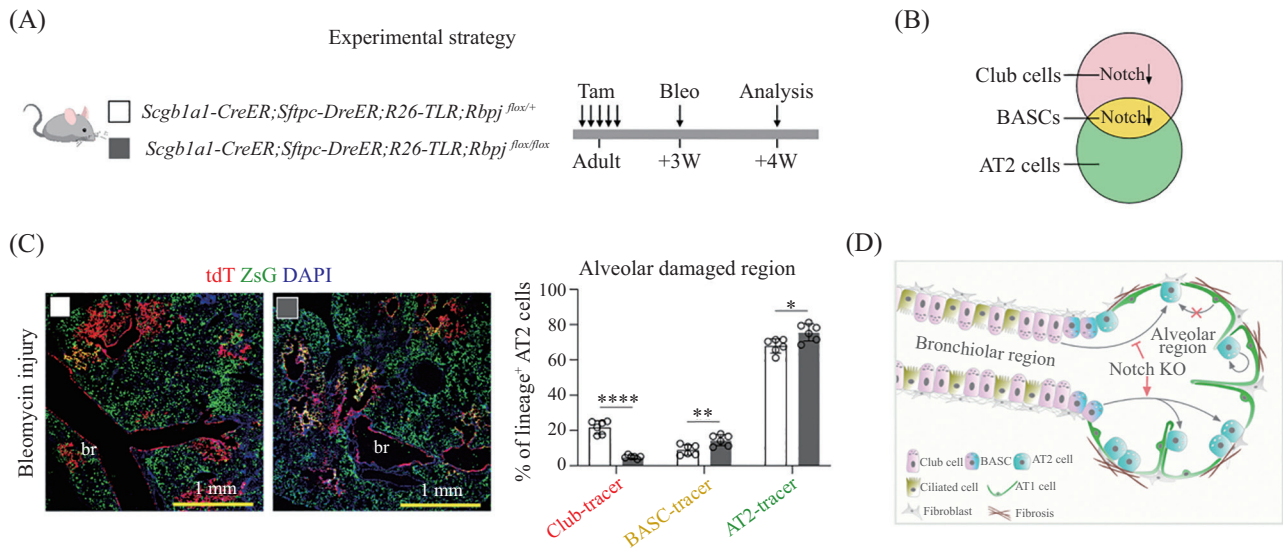
地响应损伤并转分化为更加成熟的AT2细胞。

通过进一步生信分析, 我们发现在club细胞及BASCs向AT2细胞转分化过程中Notch信号通路相关蛋白表现下调趋势, 暗示Notch信号通路可能参与这两种细胞命运转变。我们构建的双同源重组谱系示踪新技术不仅可应用于细胞特异性遗传标记, 还可以结合条件性基因敲除技术进行细胞特异性基因敲除。RBPJ是Notch信号通路关键核转录因子, 敲除*Rbpj*可抑制Notch信号通路转导。因此, 为了进一步验证Notch信号通路在体内的调控作用, 我们结合*Rbpj^{lox/lox}*条件性敲除小鼠, 构建了*Scgb1a1-CreER;Sftpc-DreER;R26-TLR;Rbpj^{lox/lox}*工具小鼠, 可在体内示踪Club-tracer、BASC-tracer和AT2-tracer的同时实现在club细胞和BASCs中特异性敲除Notch信号通路相关因子(对照组小鼠基因型为: *Scgb1a1-*

CreER;Sftpc-DreER;R26-TLR;Rbpj^{lox/+})(图6A和图6B)。对以上小鼠进行博来霉素损伤, 4周后收取肺脏组织进行切片免疫荧光分析及流式细胞分析, 我们发现与对照组相比, Notch信号通路相关因子敲除后会显著性抑制club细胞向AT2细胞转变, 反而会促进BASCs向AT2细胞转变(图6C)。我们的研究证实肺损伤后club细胞可作为干细胞来源补充受损的AT2细胞, 并且首次在功能层面上揭示club细胞与BASCs属于两种不同细胞类型, 它们不仅具有不同基因的表达特点, 而且在向AT2细胞转分化过程中受Notch信号通路相反的调控(图6D)。

7 总结与展望

在器官发育与再生领域的研究主要包括体外细胞实验与体内细胞谱系研究。由于体外环境不可



A, B: 实验策略。对club细胞、BASCs和AT2细胞标记的同时在club细胞和BASCs中特异性敲除Notch信号通路相关因子。C: 取对小鼠进行博来霉素损伤后4周的肺脏样本进行tdT和ZsG免疫荧光染色及统计分析。 $*P<0.05$, $**P<0.01$, $****P<0.0001$ 。D: 卡通图展示肺泡损伤后, 新生AT2细胞除了来源于AT2自我增殖外还来源于club细胞和BASCs, 而不会来源于AT1细胞。抑制Notch通路会减少club细胞向AT2细胞转分化, 而会促进BASCs向AT2细胞转分化。

A,B: schematic diagrams showing genetic labeling of club cells, BASCs, and AT2 cells and induce p21 expression in club cells and BASCs. C: immunostaining of tdT and ZsG on lung sections and quantification of the percentage of AT2 cells labeled by tdT or ZsG at 4 weeks post bleomycin injury. $*P<0.05$, $**P<0.01$, $****P<0.0001$. D: cartoon image showing after alveolar injury, the AT2 cells could originate from club cells and BASCs, but not from AT1 cells. Knock-out Notch signaling inhibits the transition of club cells into AT2 cells but promotes the transition of BASCs into AT2 cells.

图6 Notch信号通路在club细胞和BASCs向AT2细胞转分化中承担相反的调控作用(根据参考文献[5]修改)

Fig.6 Notch signaling distinct regulates the cell fate conversion of club cells and BASCs into AT2 cells (modified from reference [5])

控, 无法准确模拟体内微环境, 因此将体外结论进行体内验证是一项重要且不可或缺的步骤。而对体内进行细胞研究往往不可避免地会使用到细胞遗传谱系示踪技术。我们已经指出传统遗传谱系示踪技术具有细胞靶向精度低的问题, 其对靶细胞的“非特异性”标记容易造成争议性结论。因此对遗传工具进行特异性标记检验是开展谱系示踪研究的重要前提。双同源重组谱系示踪新技术已被证明可以规避传统技术“非特异性”标记问题, 相关研究揭示或阐明多个领域内重大科学争议, 彰显出新技术在谱系示踪领域巨大的应用潜力。

传统技术的非特异性靶向缺陷, 导致领域内关于肺泡干细胞再生来源一直存在科学争议。利用更为精准的双同源重组谱系示踪新技术, 我们阐明了科学争议, 揭示了肺损伤后新生AT2细胞除了自我更新外, 还可来源于club细胞和BASCs, 而不会来源于AT1细胞, 并阐明了参与其中的分子调控机制。阐明肺泡干细胞再生来源不仅为临床肺脏疾病的诊治提供了新的研究基础和突破口, 新开发的谱系示踪新技术, 也为器官发育、再生医学及遗传学等研究

提供了新的技术方法。

参考文献 (References)

- [1] LIU K, JIN H, ZHOU B. Genetic lineage tracing with multiple DNA recombinases: a user's guide for conducting more precise cell fate mapping studies [J]. J Biol Chem, 2020, doi: 10.1074/jbc.REV120.011631.
- [2] TIAN X, PU W T, ZHOU B. Cellular origin and developmental program of coronary angiogenesis [J]. Circ Res, 2015, 116(3): 515-30.
- [3] HE L J, LI Y, LI Y, et al. Enhancing the precision of genetic lineage tracing using dual recombinases [J]. Nat Med, 2017, 23(12): 1488-98.
- [4] PU W, ZHU H, ZHANG M, et al. Bipotent transitional liver progenitor cells contribute to liver regeneration [J]. Nat Genet, 2023, 55(4): 651-64.
- [5] LIU K, MENG X, LIU Z, et al. Tracing the origin of alveolar stem cells in lung repair and regeneration [J]. Cell, 2024, doi: 10.1016/j.cell.2024.03.010.
- [6] LIU Q, LIU K, CUI G, et al. Lung regeneration by multipotent stem cells residing at the bronchioalveolar-duct junction [J]. Nat Genet, 2019, 51(4): 728-38.
- [7] LI Y, HE L, HUANG X, et al. Genetic lineage tracing of non-myocyte population by dual recombinases [J]. Circulation, 2018, 138(8): 793-805.
- [8] LI Y, LÜ Z, HE L, et al. Genetic tracing identifies early segrega-

- tion of the cardiomyocyte and nonmyocyte lineages [J]. *Circ Res*, 2019, 125(3): 343-55.
- [9] BASIL M C, KATZEN J, ENGLER A E, et al. The cellular and physiological basis for lung repair and regeneration: past, present, and future [J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 26(4): 482-502.
- [10] BASIL M C, ALYSANDRATOS K D, KOTTON D N, et al. Lung repair and regeneration: advanced models and insights into human disease [J]. *Cell Stem Cell*, 2024, 31(4): 439-54.
- [11] TATA P R, MOU H M, PARDO-SAGANTA A, et al. Dedifferentiation of committed epithelial cells into stem cells *in vivo* [J]. *Nature*, 2013, 503(7475): 218-23.
- [12] RAWLINS E L, OKUBO T, XUE Y, et al. The role of Scgbl1⁺ Clara cells in the long-term maintenance and repair of lung airway, but not alveolar, epithelium [J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(6): 525-34.
- [13] SONG H, YAO E, LIN C, et al. Functional characterization of pulmonary neuroendocrine cells in lung development, injury, and tumorigenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(43): 17531-6.
- [14] OUADAH Y, ROJAS E R, RIORDAN D P, et al. Rare pulmonary neuroendocrine cells are stem cells regulated by Rb, p53, and Notch [J]. *Cell*, 2019, 179(2): 403-16, e23.
- [15] RAWLINS E L, OSTROWSKI L E, RANDELL S H, et al. Lung development and repair: contribution of the ciliated lineage [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(2): 410-7.
- [16] HOGAN B L, BARKAUSKAS C E, CHAPMAN H A, et al. Repair and regeneration of the respiratory system: complexity, plasticity, and mechanisms of lung stem cell function [J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(2): 123-38.
- [17] BARKAUSKAS C E, CRONCE M J, RACKLEY C R, et al. Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(7): 3025-36.
- [18] NABHAN A N, BROWNFIELD D G, HARBURY P B, et al. Single-cell Wnt signaling niches maintain stemness of alveolar type 2 cells [J]. *Science*, 2018, 359(6380): 1118-23.
- [19] ZACHARIAS W J, FRANK D B, ZEPP J A, et al. Regeneration of the lung alveolus by an evolutionarily conserved epithelial progenitor [J]. *Nature*, 2018, 555(7695): 251-5.
- [20] ZUO W, ZHANG T, WU D Z, et al. p63⁺Krt5⁺ distal airway stem cells are essential for lung regeneration [J]. *Nature*, 2015, 517(7536): 616-20.
- [21] VAUGHAN A E, BRUMWELL A N, XI Y, et al. Lineage-negative progenitors mobilize to regenerate lung epithelium after major injury [J]. *Nature*, 2015, 517(7536): 621-5.
- [22] XI Y, KIM T, BRUMWELL A N, et al. Local lung hypoxia determines epithelial fate decisions during alveolar regeneration [J]. *Nat Cell Biol*, 2017, 19(8): 904-14.
- [23] KIM C F, JACKSON E L, WOOLFENDEN A E, et al. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer [J]. *Cell*, 2005, 121(6): 823-35.
- [24] LIU K, TANG M, LIU Q, et al. Bi-directional differentiation of single bronchioalveolar stem cells during lung repair [J]. *Cell Discov*, 2020, doi: 10.1038/s41421-019-0132-8.
- [25] SALWIG I, SPITZNAGEL B, VAZQUEZ-ARMENDARIZ A I, et al. Bronchioalveolar stem cells are a main source for regeneration of distal lung epithelia *in vivo* [J]. *EMBO J*, 2019, doi: 10.15252/embj.2019102099.
- [26] JAIN R, BARKAUSKAS C E, TAKEDA N, et al. Plasticity of Hopx⁺ type I alveolar cells to regenerate type II cells in the lung [J]. *Nat Commun*, 2015, doi: 10.1038/ncomms7727.
- [27] PENKALA I J, LIBERTI D C, PANKIN J, et al. Age-dependent alveolar epithelial plasticity orchestrates lung homeostasis and regeneration [J]. *Cell Stem Cell*, 2021, 28(10): 1775-89.
- [28] SHIRAIISHI K, SHAH P P, MORLEY M P, et al. Biophysical forces mediated by respiration maintain lung alveolar epithelial cell fate [J]. *Cell*, 2023, 186(7): 1478-92, e15.
- [29] LIBERTI D C, LIBERTI III W A, KREMP M M, et al. Klf5 defines alveolar epithelial type 1 cell lineage commitment during lung development and regeneration [J]. *Dev Cell*, 2022, 57(14): 1742-57, e5.
- [30] XU X, ROCK J R, LU Y, et al. Evidence for type II cells as cells of origin of K-Ras-induced distal lung adenocarcinoma [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(13): 4910-5.
- [31] JUUL N H, YOON J K, MARTINEZ M C, et al. KRAS(G12D) drives lepidic adenocarcinoma through stem-cell reprogramming [J]. *Nature*, 2023, 619(7971): 860-7.
- [32] KATHIRIYA J J, BRUMWELL A N, JACKSON J R, et al. Distinct airway epithelial stem cells hide among club cells but mobilize to promote alveolar regeneration [J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 26(3): 346-58, e4.
- [33] CHOI J, JANG Y J, DABROWSKA C, et al. Release of Notch activity coordinated by IL-1β signalling confers differentiation plasticity of airway progenitors via Fosl2 during alveolar regeneration [J]. *Nat Cell Biol*, 2021, 23(9): 953-66.
- [34] CHUNG M I, HOGAN B L M. Ager-CreER(T2): a new genetic tool for studying lung alveolar development, homeostasis, and repair [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2018, 59(6): 706-12.
- [35] WANG Y, TANG Z, HUANG H, et al. Pulmonary alveolar type I cell population consists of two distinct subtypes that differ in cell fate [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(10): 2407-12.
- [36] LIU K, TANG M, JIN H, et al. Triple-cell lineage tracing by a dual reporter on a single allele [J]. *J Biol Chem*, 2020, 295(3): 690-700.
- [37] PU W, HAN X, HE L, et al. A genetic system for tissue-specific inhibition of cell proliferation [J]. *Development*, 2020, doi: 10.1242/dev.183830.