



何灵娟博士，西湖大学生命科学学院特聘研究员、博士生导师，获得国家自然科学基金优秀青年项目资助。课题组主要聚焦于利用和发展基于Cre-loxP和Dre-rox双同源重组酶系统的遗传谱系示踪新技术，研究器官发育与再生过程中细胞的起源和命运。具体研究方向包括：遗传谱系示踪新技术的开发及应用；肝脏、肾脏、皮肤等多种器官再生修复中细胞的起源和命运机制研究；器官再生的细胞及分子机制研究等。

<https://www.westlake.edu.cn/faculty/lingjuan-he.shtml>

遗传谱系示踪技术与组织再生研究

何顺 何灵娟*

(西湖大学生命科学学院, 杭州 310030)

摘要 遗传谱系示踪技术已经成为揭示细胞起源和细胞命运决定的重要工具。近年来,该领域取得了较大的进展,研究者们已经成功构建并优化了一系列新型遗传谱系示踪技术,例如双同源重组酶介导的遗传谱系示踪技术。这些新兴技术为深入研究组织再生过程中的细胞增殖、分化以及转分化等现象提供了宝贵的工具。利用这些技术,研究者们已经成功揭示了一些组织再生过程中的关键细胞亚群和核心信号转导路径。该文致力于总结新型遗传谱系示踪技术的发展,以及它们在肝脏等组织再生研究中的应用,以此为细胞命运决定研究、组织再生研究以及再生医学的应用提供参考和启示。通过拓展这些新型遗传谱系示踪技术的使用,能够提高该领域的研究水平,优化和创新细胞命运决定的研究方法,从而推进再生医学的发展。

关键词 遗传谱系示踪; Dre-rox; Cre-loxP; 组织再生; 肝脏再生

Genetic Lineage Tracing and Tissue Regeneration

HE Shun, HE Lingjuan*

(School of Life Science, Westlake University, Hangzhou 310030, China)

Abstract Genetic lineage tracing technology has become an important tool for uncovering cell origins and determining cell fate. In recent years, significant advancements have been made in this field, with researchers successfully constructing and optimizing a range of new genetic lineage tracing technologies, such as those mediated by dual recombinases. These emerging technologies provide invaluable tools for in-depth studies of cell proliferation, differentiation, and transdifferentiation phenomena during tissue regeneration. Using these technologies, researchers have successfully revealed key cell subpopulations and core signal transduction pathways during tissue regeneration. This article is dedicated to summarizing the development of these new genetic lineage tracing tech-

收稿日期: 2024-08-26

接受日期: 2024-10-10

国家自然科学基金(批准号: 323B2028、32370885、92368103)资助的课题

*通信作者。Tel: 0571-88112076, E-mail: helingjuan@westlake.edu.cn

Received: August 26, 2024

Accepted: October 10, 2024

This work is supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.323B2028, 32370885, 92368103)

*Corresponding author. Tel: +86-571-88112076, E-mail: helingjuan@westlake.edu.cn

nologies and their applications in tissue regeneration research, such as in the liver regeneration, providing insights and references for studies on cell fate determination, tissue regeneration, and applications in regenerative medicine. Expanding the use of these novel genetic lineage tracing techniques can propel the research level in this field, and thereby optimize and innovate methods for studying cell fate determination, thereby advancing the development of regenerative medicine.

Keywords genetic lineage tracing; Dre-rox; Cre-loxP; tissue regeneration; liver regeneration

1 谱系示踪技术的发展

自19世纪末以来,谱系示踪技术作为探索细胞命运与组织发育历程的基石,经历了从直观观察到现代遗传标记的深刻变迁,每一步技术演变均反映了生命科学领域的学术探索与理论突破。

1.1 早期的谱系示踪实验:直观观察法的局限与学术探索

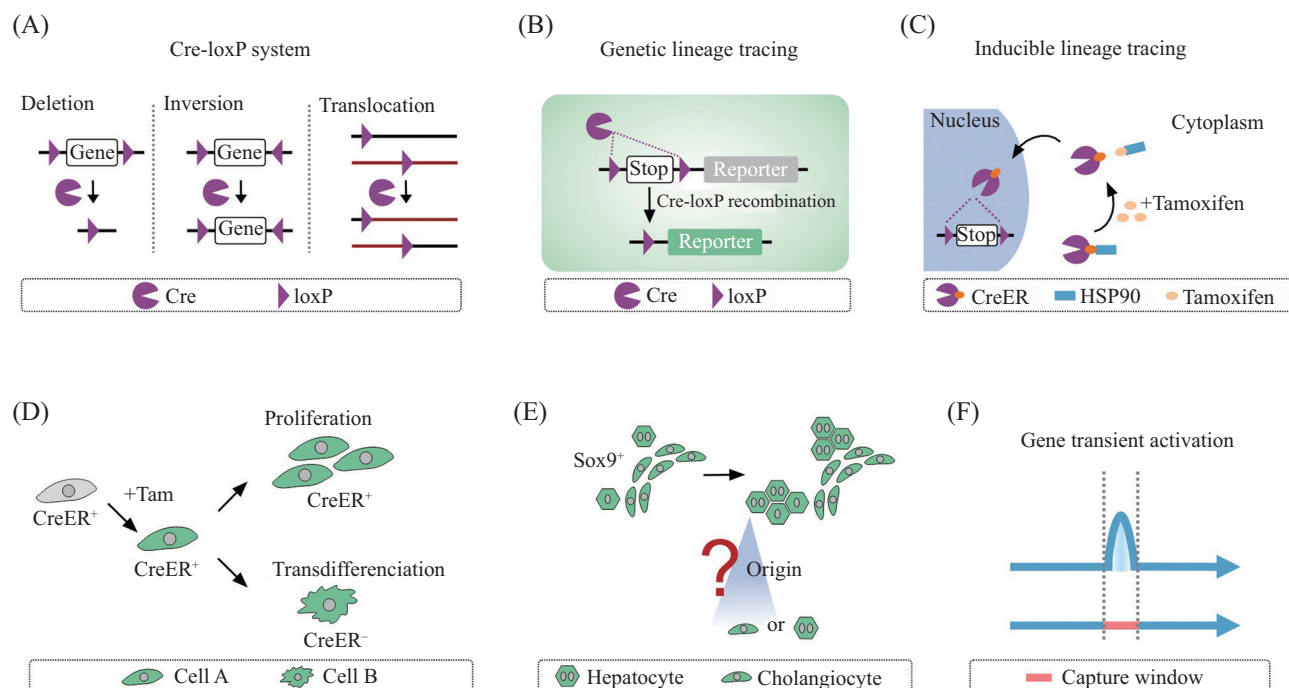
谱系示踪的概念源起于19世纪末的命运图谱实验。CONKLIN等^[1]的开创性工作通过直接观察透明胚胎中的细胞发育情况,首次揭示了细胞的发育轨迹。随着科学技术的演进,慢速摄影技术的应用使研究者得以直接观察并记录胚胎发育的动态过程^[2]。然而,直观观察法虽直观易行,却因研究对象需为透明体且组织结构相对简单,大大限制了其应用范围。为突破直观观察法的局限,科学家探索了外源性染料注射法,即通过标记特定细胞来追踪其增殖、分化与迁移等活动^[3-4]。这一类方法实现了对特定细胞命运的精确观察。然而,利用侵入性手段并引入外源化学物质使得细胞命运示踪的准确性和可靠性大大降低。此外,外源性染料在体内是不可再生的,随着时间推移,其会逐渐被稀释和代谢,无法进行长时程的示踪研究。此外,细胞移植法也是一种常见的示踪方法,常见的例子有,通过将某一基因敲除小鼠骨髓移植到野生型小鼠中,实现对某一基因缺失骨髓细胞命运的观察。另一个著名的例子是,ANVERSA等^[5-7]将c-kit阳性细胞注射到心肌梗死小鼠体内,发现c-kit阳性细胞是心肌干细胞,能够分化为心肌细胞。总之,这种方法通过标记并移植供体细胞至宿主体内,观察其在宿主体内的命运变化,虽然被广泛应用于血液、肌肉和皮肤干细胞的研究^[8-10],但移植的外源细胞在宿主体内的行为可能与正常生理条件下存在显著差异,影响了研究结果的准确性。

1.2 基于Cre-loxP系统的遗传谱系示踪方法

近二十多年来,遗传谱系示踪技术的迅猛发展,

尤其是基于Cre-loxP系统的遗传谱系示踪方法的建立,标志着细胞命运研究进入了新纪元。遗传谱系示踪方法能够无创地、内源地地标记特定细胞,使得细胞命运示踪的可靠性大大提高。例如,BARKER等^[11]利用Lgr5驱动的示踪工具,发现Lgr5⁺细胞是小肠干细胞,该细胞具有高度增殖和迁移能力,这一工作被认为是利用Cre-loxP系统的谱系示踪研究的经典研究。

基于Cre-loxP的遗传谱系示踪技术的核心在于环化重组酶(cyclization recombination enzyme,简称Cre)与loxP位点的相互作用,其通过Cre对loxP序列的识别与重组,实现对DNA序列的精确操作,为细胞命运研究提供了强有力的学术工具。Cre-loxP系统由Cre与loxP序列构成。Cre蛋白能特异识别loxP位点,并介导loxP序列之间的DNA重排。当两个loxP序列方向一致时,Cre介导的重组将导致两个loxP序列间DNA片段的删除;当loxP序列呈反向排列时,Cre则促使该片段发生颠倒(图1A)^[12-13]。基于这一特性,Cre-loxP系统能够实现对基因序列的多种遗传学操纵,包括特定DNA序列的细胞特异性敲除、激活或插入,极大地提高了基因操纵的灵活性和精确度。在遗传谱系示踪研究中,Cre蛋白通常在特定细胞类型的基因启动子调控下表达,通过与报告基因小鼠进行杂交,激活特定细胞的报告基因转录产生如荧光蛋白tdTomato、LacZ、GFP等产物(图1B)。报告基因小鼠的结构设计为loxP-Stop-loxP-报告蛋白序列,在Cre阴性细胞中,由于Stop终止子的存在,报告蛋白序列无法被转录;而在Cre阳性细胞内,Cre蛋白进入细胞核切除loxP序列间的Stop序列,使报告蛋白得以表达。这一标记一旦发生,无论细胞经历了增殖、迁移还是分化为其他细胞类型,报告蛋白的标记都将永久保留,使得追踪细胞的原始身份与演变轨迹成为可能^[14-16]。通过免疫荧光、流式细胞术等检测方法,研究者可以精确追溯细胞的来源与命运,为深入



A: Cre-loxP介导基因序列重组的示意图。B: 基于Cre-loxP的遗传谱系示踪技术进行细胞标记的示意图。C: 基于Tamoxifen诱导的遗传谱系示踪技术的原理示意图。D: 利用遗传谱系示踪技术追踪细胞增殖和转分化。E: Sox9标记胆管上皮细胞的非特异性引起示踪结果的不准确。F: 基因瞬间激活的表达模式示意图。

A: schematic diagram of Cre-loxP mediated gene sequence recombination. B: schematic diagram of cell marking using Cre-loxP based genetic lineage tracing technology. C: schematic diagram of the principle of Tamoxifen-induced genetic lineage tracing. D: genetic lineage tracing of cell proliferation and transdifferentiation. E: inaccuracy of tracing results due to non-specific marking of Sox9⁺ bile duct epithelial cells. F: the expression pattern diagram of gene transient activation.

图1 基于Cre-loxP系统的遗传谱系示踪方法和其局限性

Fig.1 Genetic lineage tracing method based on Cre-loxP system and its limitations

理解干细胞的自我更新、分化潜能以及组织再生与疾病发展机制提供了强有力的工具。

1.3 时空特异性的谱系示踪方法及其局限

为了实现时空特异性的遗传谱系示踪技术,需要对Cre酶活性进行精细调控。1995年, LITTLEWOOD等^[17]报道了一种通过插入改造的雌激素受体(estrogen receptor, ER)来调控基因表达的方法。基于此,发展了Cre与人的ER的融合体,即CreER^[18]。在该构造中,ER与细胞质中的热休克蛋白90(heat shock protein 90, HSP90)结合,从而使Cre被锚定在细胞质中,不会入核发生同源重组。在给予他莫昔芬(Tamoxifen)诱导后,作为一种雌激素类似物的他莫昔芬将结合ER并介导CreER蛋白进入细胞核进行基因操作(图1C)^[19]。相比于持续激活的Cre系统,CreER工具介导的Cre-loxP系统实现了时空特异性的遗传学操作,极大地提升了基因操作的灵活性,同时避免了基因表达模式变化引起的示踪结果不准确。即在他莫昔芬代谢完成后,标记的细胞群不会随着Cre表

达水平的改变而改变,从而能够准确追踪预先标记的细胞群体的增殖、迁移或转分化(图1D)。此后, FEIL等^[18]在此基础上,又报道了CreERT、CreERT2两种突变的雌激素受体结合的Cre酶系统。其中, CreERT2由于其响应他莫昔芬的效果最强,同时对雌激素响应较低,可以有效避免内源雌激素干扰,是目前最常用于构建小鼠的CreRT变体^[18]。该技术已被广泛应用于研究心脏、肝脏、肺脏、免疫系统、神经系统等多种器官在发育和再生过程中的细胞谱系形成和命运转变^[20-27]。然而, Cre-loxP介导的谱系示踪系统依然面临着数个关键技术局限。

(1) 示踪精度: 谱系示踪的准确性极大依赖于CreER元件插入的基因位点的选择。然而,许多细胞类型缺乏单一的、特异的标记物来将它们与其他细胞谱系区分开来。如果选用的基因表达不具有特异性,将会标记到预期外的细胞类型,从而导致示踪结果的误判。例如,在研究肝脏再生过程中, Sox9被认为在胆管上皮细胞中特异性表达, Sox9阳性胆管

上皮细胞被认为能够通过转分化形成肝细胞来促进肝脏损伤后的修复再生^[28-29]。然而,我们通过*Sox9-CreER*示踪发现,*Sox9*同时标记了部分肝细胞和胆管细胞,因此,单一的*Sox9-CreER*工具无法清晰解释胆管细胞-肝细胞之间的命运转变(图1E)^[30]。

(2) 瞬时基因激活: *Cre-loxP*系统能够有效地追踪细胞转分化现象,但在捕捉基因瞬时激活方面却显得力不从心。例如,在肾脏纤维化过程中的上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)问题,GRANDE等^[31]和LOVISA等^[32]认为上皮细胞可能在某个时间点瞬时激活间充质标记物如 α -SMA的表达,而不是永久转化为 α -SMA阳性的肌成纤维细胞。利用单一的*Cre-loxP*谱系示踪系统捕捉这种瞬时激活的现象具有一定的困难(图1F)。

(3) 多细胞亚型识别: 随着单细胞测序技术的发展和运用,被鉴定出来的细胞亚型越来越多。这些新的细胞亚型通常由多种细胞标记物的组合所定义,传统的示踪技术由于依赖单一启动子驱动,因而,无法追踪这类细胞^[24,33]。

(4) 细胞活动追踪: 传统的遗传谱系示踪技术无法追踪细胞增殖、凋亡、接触等生物学活动^[34-35]。

总的来说,单一基因驱动的*Cre-loxP*系统谱系示踪策略已经无法满足对细胞命运深入研究的需要。因此,我们需要探索并发展更加先进和全面的谱系示踪技术,以便于在更高的维度上理解和揭示生命的复杂性。

2 基于双同源重组酶系统的新型遗传谱系示踪技术的建立和应用

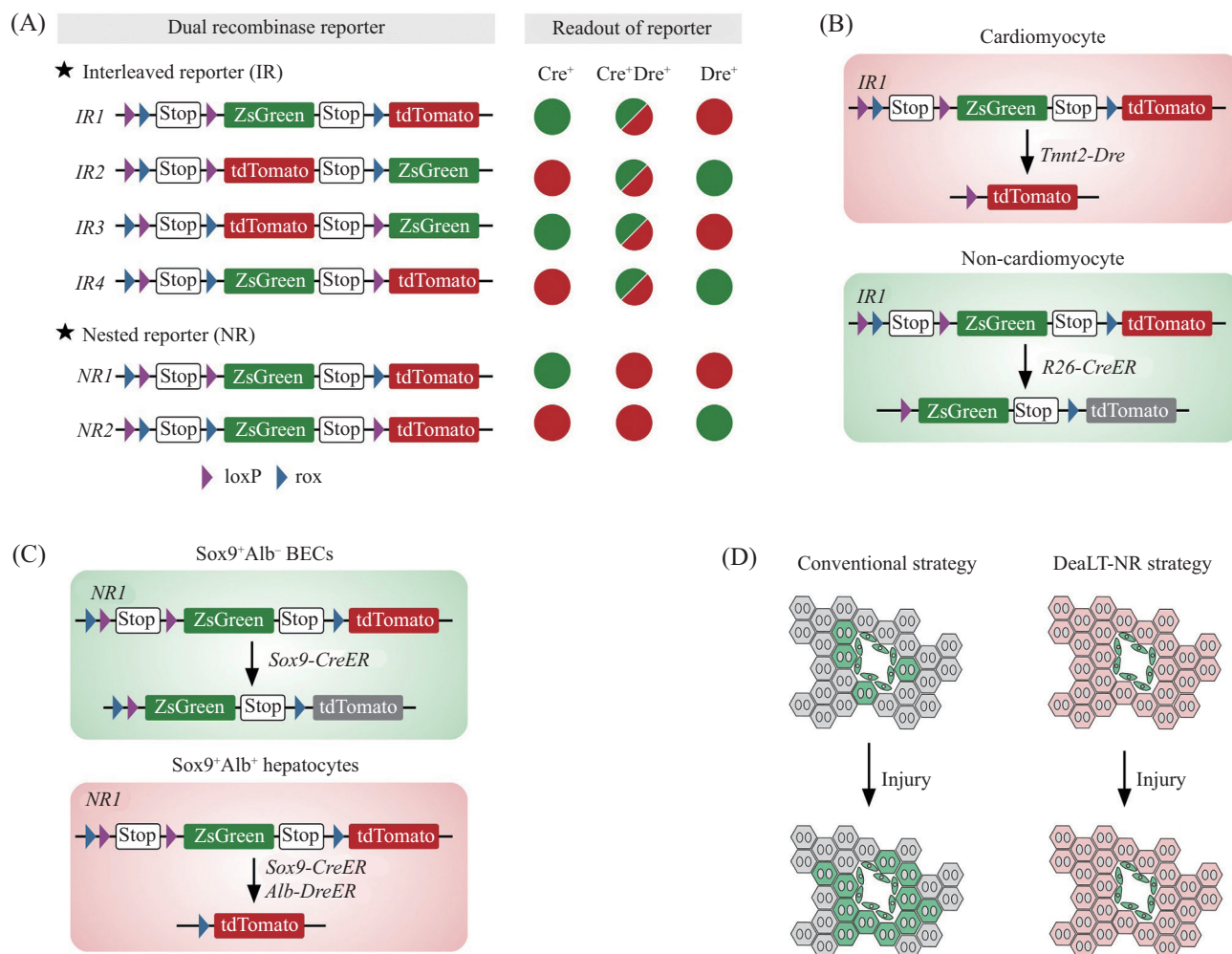
2.1 *Dre-rox/Cre-loxP*双同源重组酶谱系示踪系统(DeaLT)的建立

2017年,我们研究团队对传统的遗传谱系示踪进行了技术革新,即在*Cre-loxP*系统的基础上,引入了*Dre-rox*系统,构建了一种更为精准的谱系示踪工具,将其称为“双同源重组酶激活谱系示踪”(dual recombinase-activated lineage tracing, 简称DeaLT)^[30]。*Dre-rox*系统,作为一种与*Cre-loxP*相似的同源重组系统,利用*Dre*同源重组酶识别并处理*rox*位点,实现序列删除、颠倒和重组^[36]。*Dre-rox*与*Cre-loxP*是一对正交的系统,相互之间极少发生串扰,即*Cre*不会识别*rox*位点,*Dre*也不会识别*loxP*位点,因此这两种系统可以结合起来做到单同源重组酶系统无法实现

的遗传示踪,不仅增强了示踪技术的准确性,还极大地拓展了示踪技术的使用范围。为了确立DeaLT系统的适用性和准确性,我们设计了交错报告基因(interleaved reporter, IR)和嵌合报告基因(nested reporter, NR)两种报告基因小鼠策略,通过布局*loxP*与*rox*位点,确保了细胞命运追踪的精确度。对于IR策略,*loxP*与*rox*位点交错排列,使得*Cre*和*Dre*在双阳性细胞中的作用互斥,即报告基因状态取决于首次遇到的同源重组事件;对于NR策略,两个*loxP*位点与两个*rox*位点以嵌套形式排列,双阳性细胞的报告基因状态取决于外层同源重组事件,增强了追踪的特异性和对多种场景的适应性(图2A)。将这些报告基因与*Cre/Dre*小鼠配合,极大扩展了谱系示踪系统的应用场景并提高了示踪技术的准确性^[30]。下面我们将介绍几种DeaLT系统的应用方法及其在解决具体生物学问题中发挥的作用。

2.2 利用DeaLT技术提高细胞转分化研究的准确性

在过去的二十年里,心肌干细胞一直是心血管研究领域的热点,ANVERSA团队^[5-7]提出了c-Kit阳性干细胞在小鼠心脏损伤修复过程中的心肌细胞分化潜能。这一发现促成了c-Kit阳性细胞作为潜在心肌干细胞的理论,激发了科研人员对其作用机制及干细胞治疗策略的深入探索。然而,一系列基于遗传谱系示踪的实验证据却对c-Kit阳性干细胞向心肌细胞直接转化的观点提出了挑战^[37-41]。我们的研究团队通过细致的*Kit-CreER*检测,揭示了少量心肌细胞本身就表达c-Kit^[30,39],这提示了利用*Kit-CreER*追踪c-Kit阳性干细胞可能存在示踪结果不准确的情况。为了解决这一问题,我们引入了DeaLT技术中的IR系统,将*Tnni3-Dre*小鼠(心肌细胞特异性*Dre*小鼠)与*Kit-CreER*、*IR1*报告基因小鼠结合,这一策略能够实现对c-Kit阳性非心肌细胞的特异性标记和追踪,有效地排除c-Kit阳性心肌细胞对实验结果的干扰。具体来说,*Tnni3-Dre*的持续活性保证了心肌细胞中*Dre-rox*重组的高效进行,该过程将*IR1*报告基因中的*loxP*序列删除,从而有效阻止了后续*Cre-loxP*重组的发生。因此,只有在*TNNI3*阴性的非心肌细胞中,经他莫昔芬诱导后,*Cre-loxP*重组才能顺利进行,并将c-Kit阳性的非心肌细胞用ZsGreen绿色荧光蛋白标记。我们的实验结果表明,在稳态或损伤条件下,c-Kit阳性的非心肌细胞并不会转化形成心肌细胞。这一发现有力地反驳了c-Kit阳性细胞作为心肌干细



A: 双同源重组酶报告基因的结构和输出结果。B: 心肌细胞与非心肌细胞的示踪策略。C: 区分Sox9阳性肝细胞与胆管细胞的示踪策略。D: 传统策略和DeaLT策略的示踪结果差异。

A: structure and readouts of dual recombinases-based reporter. B: tracing strategy for labeling cardiomyocytes and non-cardiomyocytes. C: tracing strategy for distinguishing Sox9 positive hepatocytes and BECs. D: the difference in tracing results between the conventional strategy and DeaLT strategy.

图2 基于双同源重组酶系统的谱系示踪技术的建立和应用(根据参考文献[30]修改)

Fig.2 Establishment and application of dual recombinases mediated lineage tracing (modified from the reference [30])

胞的假说,提示c-Kit表达的不特异性可能是以往研究中的误导因素。

此外,除了c-Kit阳性细胞以外,Sca-1、ABCG2等曾经也被认为是心肌干细胞的标记物^[42-44]。然而,成体心脏中是否存在任何类型的心肌干细胞,仍然存在较大争议。为了解决这个问题,我们基于DeaLT-IR系统设计了一种新的策略,实现了对所有心肌细胞和非心肌细胞的分别标记,从而能够解析在成体心脏中是否存在任何类型非心肌细胞(包括干细胞)转变为心肌细胞。具体来说,该策略将Tnnt2-Dre小鼠与Rosa26-CreER、IR1小鼠结合,Tnnt2-Dre在心肌细胞中优先启动Dre-rox重组,将心肌细胞标记为tdTomato阳性并移除一个loxP位点,从而避免了在心

肌细胞中Cre-loxP重组的发生;而在非心肌细胞中,Rosa26-CreER介导的Cre-loxP重组则得以发生,将非心肌细胞标记为ZsGreen阳性(图2B)^[45]。这一策略提供了一种不依赖于特定细胞标记物的直接示踪非心肌细胞的方法,证实了成体心脏中非心肌细胞不具有转化为心肌细胞的能力。

DeaLT技术在肝脏研究中的应用也展示了其强大功能。利用DeaLT-NR技术,我们实现了对Sox9阳性胆管上皮细胞的特异性标记(图2C),排除了Sox9阳性肝细胞的干扰,解析了其在肝脏再生修复中的作用^[30],该研究将在后面肝脏再生部分详细阐述。综上所述,DeaLT技术通过解决由单一标记系统引起的假阳性问题,显著提高了细胞转分化研究的准

确性(图2D)。该技术不仅在心肌干细胞领域产生了重要影响,也为其他组织和器官的细胞命运研究开辟了新的路径。

2.3 利用双同源重组系统追踪细胞亚群

随着单细胞测序技术的快速发展,我们对细胞亚群的分类和理解日益深入。然而,仅依靠单一的细胞标记物,往往无法有效追踪新的细胞亚群。以肺脏为例,这是一个复杂的多功能器官,主要执行气体交换的任务。结构上,肺脏可以大致分为气管、支气管、小支气管和肺泡。其中,肺泡主要包含I型和II型肺泡上皮细胞。2002年,GIANGRECO等^[46]提出了一种新的肺泡上皮祖细胞类型,即支气管肺泡干细胞(brchioalveolar stem cell, BASC)。BASC在维持肺脏稳态和损伤修复中起到了重要作用,但由于缺乏适当的谱系追踪工具,这种细胞的体内功能尚未得到明确阐述。BASC的关键特征是同时表达Club细胞标记物CC10(又称Scgb1a1)和AT2细胞标记物Sftpc^[47-48]。为了实现对BASC的特异性标记,LIU等^[33]构建了*Scgb1a1-CreER;Sftpc-DreER;Ai66*三阳性小鼠。在这种小鼠中,*Ai66*报告基因被Cre和Dre双重控制,只有在Scgb1a1和Sftpc双阳性细胞中,报告基因上的两段stop序列才会被删除,其才能表达tdTomato荧光蛋白并标记细胞,这为对BASC及其后代进行遗传谱系追踪提供了可能(图3A和图3B)。实验结果揭示了BASC在气管和肺泡损伤修复过程中的重要作用。此外,单一细胞标记的局限问题还包括选择标记物的特异性。例如,在肝细胞中,*Ccnd1*是在2区肝细胞中特异表达的标记物,但在整个肝组织中,*Ccnd1*也标记其他类型细胞如胆管上皮细胞。为了解决这个问题,我们使用了*Alb-DreER;Ccnd1-RSR-CreER;Rosa26-RFP*工具,使*Ccnd1-RSR-CreER*受到肝细胞特异的*Alb*启动子的控制^[49]。通过这种方式,实现了对Alb和Ccnd1双阳性细胞,即2区肝细胞的特异标记(图3C和图3D)。

2.4 利用双同源重组系统对基因瞬时激活进行遗传谱系追踪

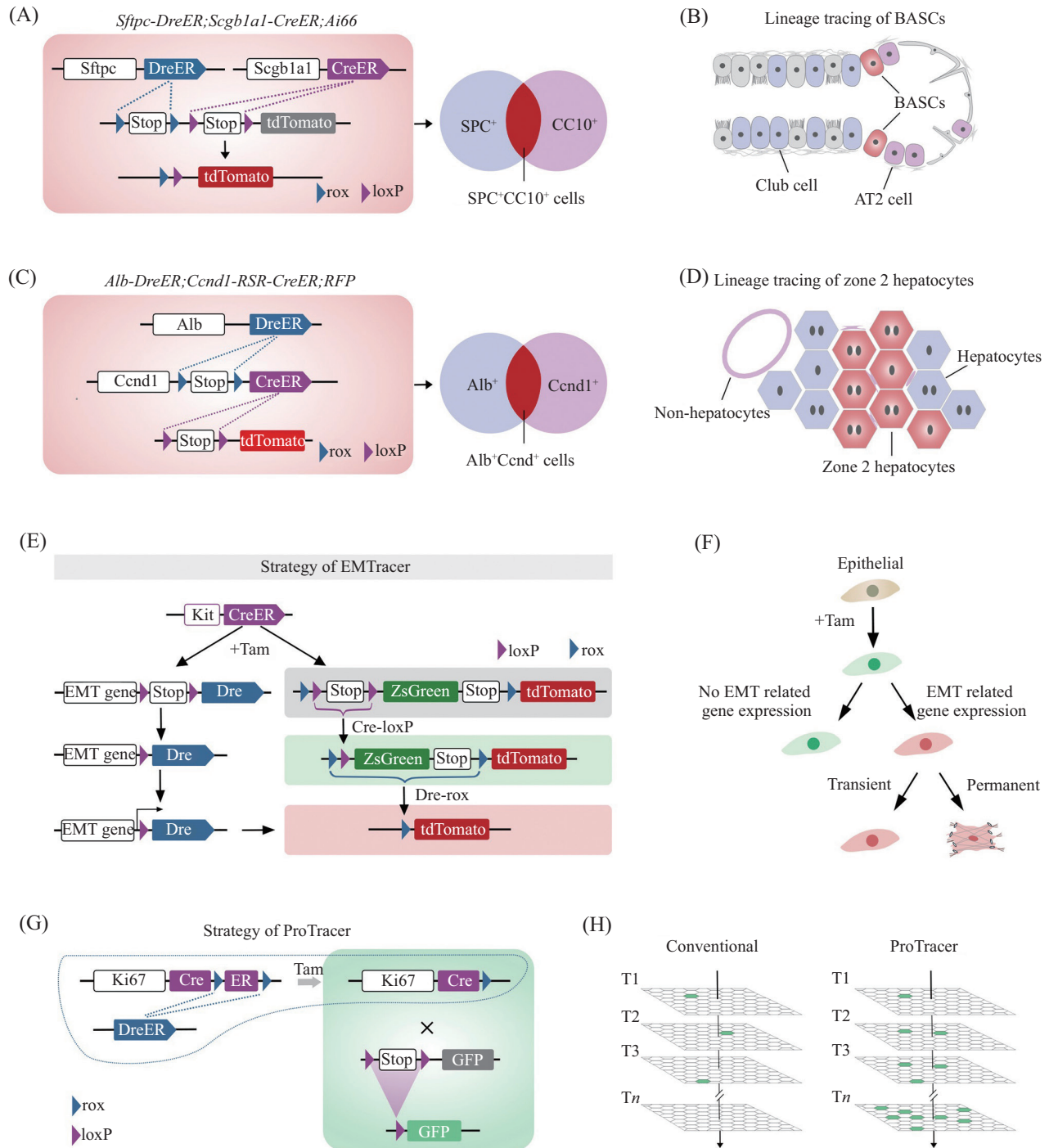
众所周知,EMT在发育、器官纤维化和肿瘤转移等过程中起着至关重要的作用^[50-52]。然而,在某些肿瘤模型中,EMT是暂时的,并且是可逆的;在一些器官纤维化例如肾脏纤维化的过程中,肾小管上皮细胞可能只会经历短暂的间充质基因激活,而不一定发生完全的EMT。这种瞬时的基因表达可能具有重要的

生物学意义,但是,由于传统的单Cre-loxP系统难以捕捉这一过程,我们对这一现象的深入理解一直受到限制。针对这一问题,LI等^[53]利用Dre-rox/Cre-loxP双同源重组系统,巧妙地构建了一个诱导遗传系统,用以在体内无缝记录细胞的瞬时基因表达。该系统的核心设计是将loxP-Stop-loxP-Dre序列插入到EMT相关基因,如*N-Cadherin*和*Vimentin*,以构建*EMT gene-LSL-Dre*小鼠。这种小鼠配合相应的CreER小鼠及NR1小鼠,可以精确地追踪EMT基因在细胞中的瞬时激活情况。例如,研究乳腺肿瘤转移模型中Kit阳性的乳腺上皮是否曾经发生了EMT,可以将*Kit-CreER*与*EMT gene-LSL-Dre*和*NR1*结合获得三阳性小鼠,在这个系统中,经他莫昔芬诱导后,Kit-CreER首先被激活,通过Cre-loxP同源重组反应,将*EMT gene-LSL-Dre*中的Stop序列切除,同时在报告基因*NR1*中将ZsGreen前面的Stop序列切除,将细胞标记为ZsGreen阳性。当该细胞发生EMT,激活EMT相关基因时,Dre将会表达并对报告基因进行Dre-rox重组,将细胞标记为tdTomato阳性(图3E)。这个系统实现了对瞬时激活EMT基因的细胞的遗传学标记,为解析这一类细胞群体的细胞命运和作用机制提供了有力的工具。通过配合使用不同的CreER小鼠,该系统可以被应用于检测各种细胞类型的间充质转化或瞬时的间充质基因激活问题(图3F),例如心肌梗死过程中内皮细胞的间充质基因激活问题^[54]。

2.5 基于双同源重组酶系统建立细胞增殖检测工具ProTracer

细胞增殖是组织再生中应对细胞损失的重要修复机制。传统的细胞增殖检测方式主要包括细胞增殖关键蛋白的检测和核苷酸类似物的掺入。细胞增殖关键蛋白如Ki67、PCNA、pH3等常被视为细胞增殖的内源性标记物^[55-57]。BrdU、EdU等核苷酸类似物可以作为DNA合成的原料在细胞增殖时被掺入细胞DNA^[58-59]。然而,无论是内源性增殖标记物的检测还是核苷酸类似物掺入的方法,都存在一些技术限制,例如:(1)对于细胞更新非常缓慢的细胞,如心肌细胞、神经元等,传统方法很难捕捉到细胞增殖活动^[58-59];(2)传统方法无差别地检测所有细胞类型的增殖,缺乏细胞特异性,非目标细胞的增殖信号可能会干扰目标细胞的信号。

2021年,我们开发了基于双同源重组酶系统的细胞增殖检测的遗传示踪工具——ProTracer(proliferation



A、B: 标记SPC和CC10双阳性BASCs的示踪策略。C、D: 标记Alb和Cnd1双阳性2区肝细胞的示踪策略。E: EMTracer的示踪策略示意图。F: EMTracer的不同结果示意图。G: ProTracer的示踪策略示意图。H: 传统策略与ProTracer策略结果的比较示意图。

A,B: tracing strategy for labeling SPC and CC10 double-positive BASCs. C,D: tracing strategy for labeling Alb and Cnd1 double-positive zone 2 hepatocytes. E: schematic diagram of EMTracer strategy. F: schematic diagram of readout of EMTracer. G: schematic diagram of ProTracer strategy. H: schematic diagram comparing between conventional strategy and ProTracer strategy.

图3 多种基于双同源重组酶系统的示踪新技术

Fig.3 Multiple new lineage tracing techniques based on dual recombinases systems

tracer)^[35,60], 该系统可以在长时间窗口内记录细胞增殖的累积, 因而对于检测增殖较为缓慢的细胞极为有益^[61]。此外, 该系统还可以实现细胞特异性增殖的检

测, 提高细胞增殖检测的信噪比和分辨率。具体来说, 该系统基于 *Rosa26-DreER; Ki67-Cre-rox-ER-rox* (*Ki67-CreXER*); *Rosa26-GFP* 三阳性小鼠。经过他莫昔芬诱

导后,该系统被启动,Dre首先驱动Ki67位点的Dre-rox重组,将CreXER中的ER切除,从而使诱导性的CreER转变为组成性表达Cre的活性形式。此后,一旦有细胞发生细胞增殖,Ki67就会被激活,驱动Cre对报告基因进行Cre-loxP重组,标记细胞为GFP阳性(图3G)。由于这个过程发生在基因组中,所有经历过增殖的细胞都将永久携带GFP荧光蛋白,因此可实现对细胞增殖的累积记录(图3H)^[35]。Rosa26-DreER驱动的ProTracer是广谱性的细胞增殖检测系统,任何细胞类型增殖都可以被其检测到,如果要实现细胞特异性细胞增殖的检测,可以将Rosa26-DreER换成细胞特异性表达的DreER,如心肌细胞特异性增殖检测,可将心肌细胞特异性表达的Tnnt2-DreER与Ki67-CreXER、Rosa26-GFP结合,该系统可以实现累积记录心肌细胞等的细胞增殖情况,而不会有其他细胞增殖信号的干扰,从而获得高分辨率的心肌细胞增殖图谱^[34,61]。

3 双同源重组酶谱系示踪技术在肝脏再生中的应用

3.1 胆管与肝细胞的命运转化问题

肝脏是哺乳动物体内再生能力最强的器官。在肝脏损伤后,肝细胞具有显著的增殖能力^[62]。Sox9阳性细胞的高分化潜力有助于肝脏损伤修复过程中的细胞再生^[28-29]。然而,使用Sox9-CreER的谱系示踪实验由于Sox9标记的非特异性其难以用来清晰阐释肝脏损伤过程中胆管细胞向肝细胞的转分化。我们利用Sox9-CreER小鼠进行谱系示踪实验,发现Sox9标记了胆管上皮细胞和肝脏门静脉附近的少量肝细胞,这导致使用单一谱系示踪系统追踪方法无法解释胆管-肝细胞之间的转分化问题。利用DeaLT-NR系统,我们将Alb-DreER、Sox9-CreER与NRI报告基因联合使用,其中Alb是肝细胞特异性标记物白蛋白的编码基因。Alb-DreER;Sox9-CreER;NRI三阳性小鼠在他莫昔芬处理后,Sox9阳性的胆管上皮细胞中发生Cre-loxP重组,细胞被标记为ZsGreen阳性。而在Sox9阳性的肝细胞亚群中,尽管也发生了Cre-loxP重组,但Alb驱动的Dre-rox重组会删除ZsGreen序列并将细胞标记为tdTomato阳性。通过该系统,消除了Sox9阳性肝细胞的影响,得到了清晰的Sox9阳性胆管上皮细胞的命运图谱。实验结果表明,在四氯化碳诱导的肝脏损伤条件下,Sox9阳性的胆管细胞只产生胆管上皮细胞而不会转分化为肝细胞^[30]。此外,

在肝细胞增殖受阻或肝脏遭受极端损伤后,胆管上皮细胞可以转分化为肝细胞。近期,PU等^[25]利用双同源重组系统,定义了一群起源于胆管细胞的具有双向分化潜能的细胞亚群。在严重肝损伤时,这群细胞分别在Notch和Wnt信号的调节下向肝细胞转分化或回到胆管上皮细胞命运。

3.2 新生肝细胞的来源问题

肝脏的基本功能单元是肝小叶。血液由肝门静脉流入肝脏,然后顺着血管分支,流经每一个肝小叶。肝小叶大体上呈六边形,六边形的中心为中央静脉,六角则为门静脉和胆管。未经过滤的血液从门静脉的六角流向中央静脉,形成了门静脉-中央静脉轴。沿着这一轴线,血液中的氧含量和营养物质等呈梯度变化,从而为不同位置的肝细胞创造出各异的微环境^[63]。门静脉-中央静脉轴上的肝细胞大致分为1区、2区、3区三个区域,它们的基因表达和功能存在异质性^[35,63],例如,1区位于门静脉附近的肝细胞主要负责糖原合成,而3区位于中央静脉附近的肝细胞则主要负责脂质合成。

肝细胞具有较强的增殖能力,实验证明,对小鼠施行75%的肝切除手术后,仅用两周时间,其肝脏就能迅疾恢复至原本的质量,这充分展示了肝细胞的强大再生能力^[64],而这种再生主要源于肝细胞自身的增殖^[62]。那么不同分区肝细胞在增殖能力上是否具有差异,在肝脏维持稳态和损伤修复过程中,哪部分的肝细胞主要生成新生肝细胞?此前这一直是肝脏再生领域一个非常重要但具有争议的科学问题(图4A)。

在20世纪80年代,ZAJICEK等^[65]通过氘化胸苷掺入的方法发现新生肝细胞主要在门静脉附近生成,然后逐渐迁移至中央静脉附近,这一模型被称为流动模型。随着遗传谱系示踪技术的发展,研究者们开始尝试用这一技术解决这个问题。WANG等^[66]发现,中央静脉附近的Axin2阳性肝细胞会生成新生肝细胞,并逐渐扩展到门静脉附近。FONT-BURGADA等^[28]则发现新生肝细胞的来源是门静脉附近的Sox9阳性肝细胞。然而,也有一些研究者认为肝细胞再生没有明显的区位性。LIN等^[67]利用Tert-CreER小鼠发现,Tert高表达的肝细胞具备显著的高再生能力,而这些Tert高表达的肝细胞在肝小叶上的分布广泛,无明显区位性。CHEN等^[68]利用克隆分析方法,也支持新生肝细胞没有显著区位性,认为不同区域的肝细胞都具有相似的增殖潜力。研究者们使用

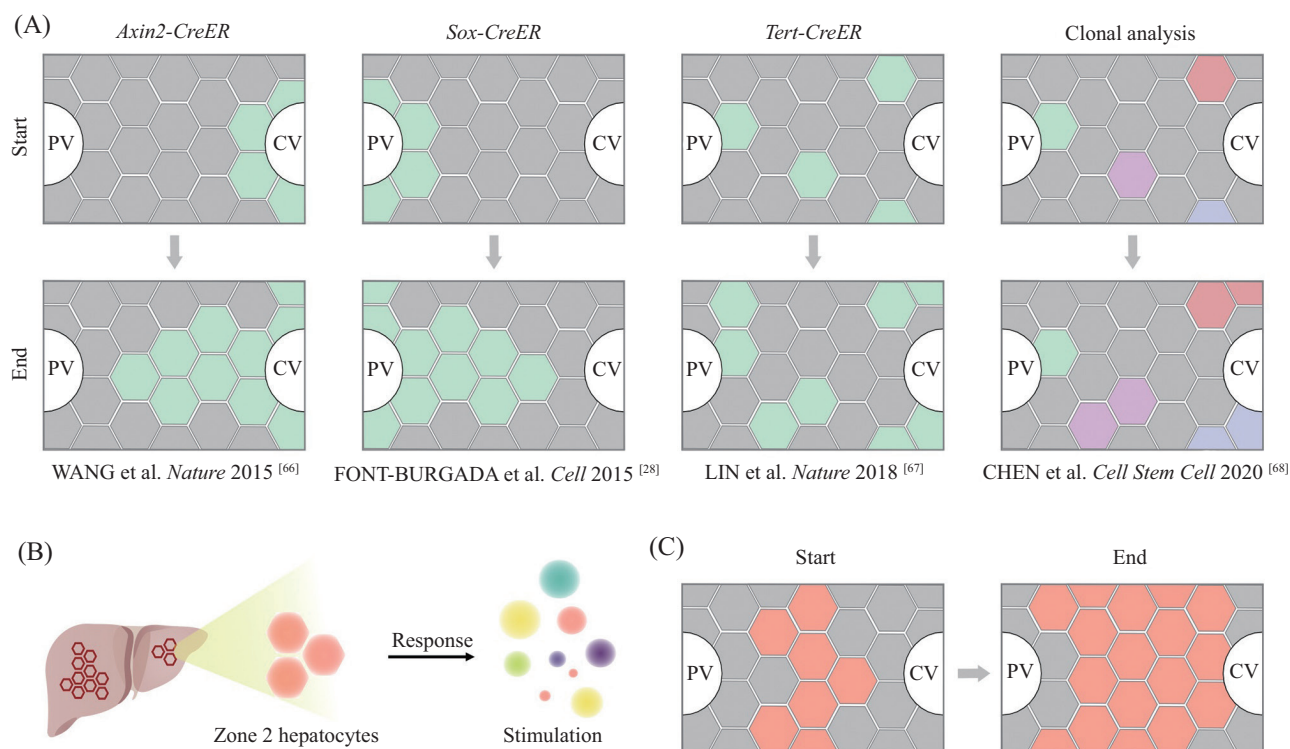


图4 肝脏再生中的遗传谱系示踪研究

不同的遗传谱系示踪工具,得到了不同的结论,这是因为单一的遗传谱系示踪系统只能关注特定标记的细胞的命运,无法揭示完整的增殖图谱。2021年,我们利用ProTracer技术记录了生理稳态和损伤再生中肝细胞的增殖图谱。研究发现成体肝脏在生理稳态中,新生肝细胞主要起源于2区肝细胞的增殖,同时,在不同的损伤再生条件下,2区肝细胞对于肝脏修复具有重要的作用^[35]。同期,WEI等^[21]利用了多种标记不同肝细胞亚群的CreER工具,也发现了2区肝细胞具有更高的增殖潜力。得益于遗传谱系示踪的发展,新生肝细胞的来源问题逐渐被解析,明确了2区肝细胞作为新生肝细胞的主要来源,是肝细胞中最为重要的亚群。

3.3 2区肝细胞遗传学工具的发展

尽管2区肝细胞在肝脏生理稳态维持和损伤再生过程中具有重要作用,但是却一直缺乏能够特异性标记2区肝细胞的特异性遗传工具,主要由于缺乏能够特异性表达在2区肝细胞的标记基因。为了解析2区肝细胞在体内的细胞命运和生物学功能,2区肝细胞特异的遗传学工具亟需被开发。以往的

免疫染色实验发现, CCND1表达在2区肝细胞中^[21]。然而, CCND1除了表达在肝细胞中, 还表达在大量非肝细胞中, 因此基于CCND1构建的传统遗传谱系示踪工具无法实现对2区肝细胞的特异性标记和追踪。2023年, 我们利用双同源重组酶系统, 开发了2区肝细胞特异的遗传学操纵工具^[49]。通过 *Alb-DreER; Ccnd1-RSR-CreER; Rosa26-RFP* 三阳性小鼠, 实现了对CCND1高表达的2区肝细胞的特异性标记, 并揭示了2区肝细胞在怀孕诱发的肝脏增大中的重要作用。此外, LIN等^[69]利用 *IGFBP2-CreER* 小鼠标记2区肝细胞, 揭示了2区肝细胞在应对药物损伤、肝脏切除、衰老等多种刺激时, 作为新生肝细胞主要来源参与肝脏修复的重要作用(图4B和图4C)。值得注意的是, 尽管在雌性小鼠中, CCND1可以作为高效特异的2区肝细胞标记物, 但基于CCND1的二区遗传学工具在雄性小鼠中更倾向于标记靠近1区的部分二区细胞, 并标记了少量的1区肝细胞。这提示了性别差异和性激素可能对肝细胞增殖偏好有重要作用。此外, *IGFBP2-CreER* 小鼠标记的肝细胞也偏向1区并有约50%与1区肝细胞

重合。因此,基于此类2区肝细胞遗传学工具,肝细胞异质性和2区肝细胞的独特生物学特性有待被深入理解。

4 总结与展望

近年来,随着遗传谱系示踪技术的不断发展,研究者对组织再生和细胞亚群的理解不断深入。传统的单系统遗传谱系示踪技术存在精确性差等技术局限,新型双同源重组酶系统的发展为该领域提供了一系列更加精确、应用场景更多样的遗传学工具。本文总结了数种双同源重组酶系统的应用方法并举例说明了其在解决细胞命运问题方面的强大能力。然而该领域依然面临着一系列挑战。首先,基于荧光蛋白的遗传谱系示踪技术能够追踪的细胞有限。尽管诸如DeaLT等类似系统,以及“Conffeti”等报告基因的开发大大提高了谱系示踪的分辨率^[70-71],对于体内巨大的细胞数量仍显不足。近几年,研究者开发的细胞条形码技术在这方面具有巨大优势。通过报告基因的大量随机同源重组,生成了巨大数量的DNA序列标签,保证了每个细胞产生的标签序列几乎不会重复,就像商品上的条形码,具有唯一性^[72-73]。利用这一技术,研究者解析了造血细胞发育过程中的精准命运图谱^[74-75],但這些细胞条形码技术在实质器官中的应用还有待进一步发展。其次,尽管荧光素酶等报告基因使我們可以在活体无损的情况下检测报告基因表达,但由于其分辨率过低,几乎无法得到有效信息。成像技术的发展,例如组织深度成像的双光子、多光子显微技术以及长时间活体成像仪器的开发,都将有助于谱系示踪技术的深入应用。此外,谱系示踪系统的扩展性较强,在已有的遗传学示踪工具的基础上,引入基因的表达操纵、体内基因文库筛选等将帮助研究者深入了解细胞命运转化背后的分子调控机制以及靶向干预手段。本实验室将以新型遗传谱系示踪技术开发研究为基础,结合疾病模型、成像技术等,深入解析组织再生中的细胞命运及其背后的内在机理。

参考文献 (References)

[1] CONKLIN E G. The organization and cell-lineage of the ascidian egg [J]. J Acad Nat Sci Phila, 1905, 12: 1-19.
[2] MIO Y, MAEDA K. Time-lapse cinematography of dynamic changes occurring during *in vitro* development of human embryos

[J]. Am J Obstet Gynecol, 2008, doi: 10.1016/j.ajog.2008.07.023.
[3] AXELROD D. Carbocyanine dye orientation in red cell membrane studied by microscopic fluorescence polarization [J]. Biophys J, 1979, 26(3): 557-73.
[4] WEISBLAT D A, SAWYER R T, STENT G S. Cell lineage analysis by intracellular injection of a tracer enzyme [J]. Science, 1978, 202(4374): 1295-8.
[5] ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTI S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium [J]. Nature, 2001, 410(6829): 701-5.
[6] KAJSTURA J, ROTA M, WHANG B, et al. Bone marrow cells differentiate in cardiac cell lineages after infarction independently of cell fusion [J]. Circ Res, 2005, 96(1): 127-37.
[7] LANZA R, MOORE M A, WAKAYAMA T, et al. Regeneration of the infarcted heart with stem cells derived by nuclear transplantation [J]. Circ Res, 2004, 94(6): 820-7.
[8] JENSEN K B, DRISKELL R R, WATT F M. Assaying proliferation and differentiation capacity of stem cells using disaggregated adult mouse epidermis [J]. Nat Protoc, 2010, 5(5): 898-911.
[9] LEMISCHKA I R, RAULET D H, MULLIGAN R C. Developmental potential and dynamic behavior of hematopoietic stem cells [J]. Cell, 1986, 45(6): 917-27.
[10] O'ROURKE K P, LOIZOU E, LIVSHITS G, et al. Transplantation of engineered organoids enables rapid generation of metastatic mouse models of colorectal cancer [J]. Nat Biotechnol, 2017, 35(6): 577-82.
[11] BARKER N, VAN ES J H, KUIPERS J, et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5* [J]. Nature, 2007, 449(7165): 1003-7.
[12] NAGY A. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring [J]. Genesis, 2000, 26(2): 99-109.
[13] RODRÍGUEZ C I, BUCHHOLZ F, GALLOWAY J, et al. High-efficiency deleter mice show that *FLPe* is an alternative to *Cre-loxP* [J]. Nature Genet, 2000, 25(2): 139-40.
[14] LIU K, JIN H W, 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, 295(19): 6413-24.
[15] ZHAO H, ZHOU B. Dual genetic approaches for deciphering cell fate plasticity *in vivo*: more than double [J]. Curr Opin Cell Biol, 2019, 61: 101-9.
[16] TIAN X Y, PU W T, ZHOU B. Cellular origin and developmental program of coronary angiogenesis [J]. Circ Res, 2015, 116(3): 515-30.
[17] LITTLEWOOD T D, HANCOCK D C, DANIELIAN P S, et al. A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins [J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23(10): 1686-90.
[18] FEIL R, WAGNER J, METZGER D, et al. Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 237(3): 752-7.
[19] METZGER D, ALI S, BORNERT J M, et al. Characterization of the amino-terminal transcriptional activation function of the human estrogen receptor in animal and yeast cells [J]. J Biol Chem, 1995, 270(16): 9535-42.
[20] LAN Y, ZHANG X, LIU S, et al. Fate mapping of *Spp1* expression reveals age-dependent plasticity of disease-associated

- microglia-like cells after brain injury [J]. *Immunity*, 2024, 57(2): 349-63,e9.
- [21] WEI Y, WANG Y G, JIA Y, et al. Liver homeostasis is maintained by midlobular zone 2 hepatocytes [J]. *Science*, 2021, 371(6532): eabb1625.
- [22] LIU Z, GU Y, CHAKAROV S, et al. Fate mapping via Ms4a3-expression history traces monocyte-derived cells [J]. *Cell*, 2019, 178(6): 1509-25,e19.
- [23] YIN J, MEI Q, PRINZ M, et al. Fate mapping reveals compartment-specific clonal expansion of mononuclear phagocytes during kidney disease [J]. *Kidney Int*, 2023, 104(3): 605-10.
- [24] LIU K, MENG X, LIU Z, et al. Tracing the origin of alveolar stem cells in lung repair and regeneration [J]. *Cell*, 2024, 187(10): 2428-45,e20.
- [25] 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.
- [26] GUENTHNER C J, MIYAMICHI K, YANG H H, et al. Permanent genetic access to transiently active neurons via TRAP: targeted recombination in active populations [J]. *Neuron*, 2013, 78(5): 773-84.
- [27] WANG L L, SERRANO C, ZHONG X, et al. Revisiting astrocyte to neuron conversion with lineage tracing *in vivo* [J]. *Cell*, 2021, 184(21): 5465-81,e16.
- [28] FONT-BURGADA J, SHALAPOUR S, RAMASWAMY S, et al. Hybrid periportal hepatocytes regenerate the injured liver without giving rise to cancer [J]. *Cell*, 2015, 162(4): 766-79.
- [29] YANGER K, ZONG Y W, MAGGS L R, et al. Robust cellular reprogramming occurs spontaneously during liver regeneration [J]. *Genes Dev*, 2013, 27(7): 719-24.
- [30] 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.
- [31] GRANDE M T, SÁNCHEZ-LAORDEN B, LÓPEZ-BLAU C, et al. Snail1-induced partial epithelial-to-mesenchymal transition drives renal fibrosis in mice and can be targeted to reverse established disease [J]. *Nat Med*, 2015, 21(9): 989-97.
- [32] LOVISA S, LEBLEU V S, TAMPE B, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis [J]. *Nat Med*, 2015, 21(9): 998-1009.
- [33] LIU Q Z, LIU K, CUI G Z, et al. Lung regeneration by multipotent stem cells residing at the bronchioalveolar-duct junction [J]. *Nature Genet*, 2019, 51(4): 728-38.
- [34] PU W, ZHANG M, LIU X, et al. Genetic proliferation tracing reveals a rapid cell cycle withdrawal in preadolescent cardiomyocytes [J]. *Circulation*, 2022, 145(5): 410-2.
- [35] HE L, PU W, LIU X, et al. Proliferation tracing reveals regional hepatocyte generation in liver homeostasis and repair [J]. *Science*, 2021, 371(6532): eabc4346.
- [36] ANASTASSIADIS K, FU J, PATSCH C, et al. Dre recombinase, like Cre, is a highly efficient site-specific recombinase in *E. coli*, mammalian cells and mice [J]. *Dis Model Mech*, 2009, 2(9/10): 508-15.
- [37] MOLKENTIN J D. Letter by Molkentin regarding article, "the absence of evidence is not evidence of absence: the pitfalls of Cre knock-ins in the c-Kit locus" [J]. *Circ Res*, 2014, 115(8): E21-E3.
- [38] HOPPER R K, MOONEN J, DIEBOLD I, et al. In pulmonary arterial hypertension, reduced BMPR2 promotes endothelial-to-mesenchymal transition via HMGA1 and its target Slug [J]. *Circulation*, 2016, 133(18): 1783-94.
- [39] LIU Q Z, YANG R, HUANG X Z, et al. Genetic lineage tracing identifies *in situ* Kit-expressing cardiomyocytes [J]. *Cell Res*, 2016, 26(1): 119-30.
- [40] SULTANA N, ZHANG L, YAN J Y, et al. Resident c-kit⁺ cells in the heart are not cardiac stem cells [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 10.
- [41] VAN BERLO J H, KANISICAK O, MAILLET M, et al. c-kit⁺ cells minimally contribute cardiomyocytes to the heart [J]. *Nature*, 2014, 509(7500): 337-41.
- [42] HENNING R J. Stem cells in cardiac repair [J]. *Future Cardiol*, 2011, 7(1): 99-117.
- [43] OH H, BRADFUTE S B, GALLARDO T D, et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(21): 12313-8.
- [44] PFISTER O, OIKONOMOPOULOS A, SERETI K I, et al. Role of the ATP-binding cassette transporter *Abcg2* in the phenotype and function of cardiac side population cells [J]. *Circ Res*, 2008, 103(8): 825-35.
- [45] LI Y, HE L J, HUANG X Z, et al. Genetic lineage tracing of non-myocyte population by dual recombinases [J]. *Circulation*, 2018, 138(8): 793-805.
- [46] GIANGRECO A, REYNOLDS S D, STRIPP B R. Terminal bronchioles harbor a unique airway stem cell population that localizes to the bronchoalveolar duct junction [J]. *Am J Pathol*, 2002, 161(1): 173-82.
- [47] KIM C F B, 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.
- [48] 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, 38(12): 16.
- [49] HE S, GUO Z, ZHOU M, et al. Spatial-temporal proliferation of hepatocytes during pregnancy revealed by genetic lineage tracing [J]. *Cell Stem Cell*, 2023, 30(11): 1549-58,e5.
- [50] KUPPE C, IBRAHIM M M, KRANZ J, et al. Decoding myofibroblast origins in human kidney fibrosis [J]. *Nature*, 2021, 589(7841): 281-6.
- [51] YUAN Q, TAN R J, LIU Y. Myofibroblast in kidney fibrosis: origin, activation, and regulation [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1165: 253-83.
- [52] DAVIS F M, STEWART T A, THOMPSON E W, et al. Targeting EMT in cancer: opportunities for pharmacological intervention [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2014, 35(9): 479-88.
- [53] LI Y, LÜ Z, ZHANG S H, et al. Genetic fate mapping of transient cell fate reveals N-cadherin activity and function in tumor metastasis [J]. *Dev Cell*, 2020, 54(5): 593-607,e5.
- [54] ZHANG S, LI Y, HUANG X, et al. Seamless genetic recording of transiently activated mesenchymal gene expression in endothelial cells during cardiac fibrosis [J]. *Circulation*, 2021, 144(25): 2004-20.
- [55] ELMACI İ, ALTINOZ M A, SARI R, et al. Phosphorylated

- histone H3 (PHH3) as a novel cell proliferation marker and prognosticator for meningeal tumors: a short review [J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2018, 26(9): 627-31.
- [56] JURÍKOVÁ M, DANIHEL L, POLÁK Š, et al. Ki67, PCNA, and MCM proteins: markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer [J]. *Acta Histochem*, 2016, 118(5): 544-52.
- [57] URRUTICOECHEA A, SMITH I E, DOWSETT M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23(28): 7212-20.
- [58] LEHNER B, SANDNER B, MARSCHALLINGER J, et al. The dark side of BrdU in neural stem cell biology: detrimental effects on cell cycle, differentiation and survival [J]. *Cell Tissue Res*, 2011, 345(3): 313-28.
- [59] LEVKOFF L H, MARSHALL G P, 2ND, ROSS H H, et al. Bromodeoxyuridine inhibits cancer cell proliferation *in vitro* and *in vivo* [J]. *Neoplasia*, 2008, 10(8): 804-16.
- [60] LIU X, WENG W, HE L, et al. Genetic recording of *in vivo* cell proliferation by ProTracer [J]. *Nat Protoc*, 2023, 18(7): 2349-73.
- [61] LIU X, PU W, HE L, et al. Cell proliferation fate mapping reveals regional cardiomyocyte cell-cycle activity in subendocardial muscle of left ventricle [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 5784.
- [62] MATSUMOTO T, WAKEFIELD L, TARLOW B D, et al. *In vivo* lineage tracing of polyploid hepatocytes reveals extensive proliferation during liver regeneration [J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 26(1): 34-47, e3.
- [63] BEN-MOSHE S, ITZKOVITZ S. Spatial heterogeneity in the mammalian liver [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16(7): 395-410.
- [64] MITCHELL C, WILLENBRING H. A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice [J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(7): 1167-70.
- [65] ZAJICEK G, OREN R, WEINREB M Jr. The streaming liver [J]. *Liver*, 1985, 5(6): 293-300.
- [66] WANG B, ZHAO L, FISH M, et al. Self-renewing diploid Axin2⁺ cells fuel homeostatic renewal of the liver [J]. *Nature*, 2015, 524(7564): 180-5.
- [67] LIN S, NASCIMENTO E M, GAJERA C R, et al. Distributed hepatocytes expressing telomerase repopulate the liver in homeostasis and injury [J]. *Nature*, 2018, 556(7700): 244-8.
- [68] CHEN F, JIMENEZ R J, SHARMA K, et al. Broad distribution of hepatocyte proliferation in liver homeostasis and regeneration [J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 26(1): 27-33, e4.
- [69] LIN Y H, WEI Y, ZENG Q, et al. IGFBP2 expressing midlobular hepatocytes preferentially contribute to liver homeostasis and regeneration [J]. *Cell Stem Cell*, 2023, 30(5): 665-76, e4.
- [70] PONTES-QUERO S, HEREDIA L, CASQUERO-GARCÍA V, et al. Dual ifgMosaic: a versatile method for multispectral and combinatorial mosaic gene-function analysis [J]. *Cell*, 2017, 170(4): 800-14, e18.
- [71] DEKONINCK S, HANNEZO E, SIFRIM A, et al. Defining the design principles of skin epidermis postnatal growth [J]. *Cell*, 2020, 181(3): 604-20, e22.
- [72] VANHORN S, MORRIS S A. Next-generation lineage tracing and fate mapping to interrogate development [J]. *Dev Cell*, 2021, 56(1): 7-21.
- [73] KEBSCHULL J M, ZADOR A M. Cellular barcoding: lineage tracing, screening and beyond [J]. *Nat Methods*, 2018, 15(11): 871-9.
- [74] PEI W, FEYERABEND T B, RÖSSLER J, et al. Polylox barcoding reveals haematopoietic stem cell fates realized *in vivo* [J]. *Nature*, 2017, 548(7668): 456-60.
- [75] RODRIGUEZ-FRATICELLI A E, WOLOCK S L, WEINREB C S, et al. Clonal analysis of lineage fate in native haematopoiesis [J]. *Nature*, 2018, 553(7687): 212-6.