

利用 Cre-Loxp 技术构建标记肝星状细胞的小鼠模型

黄紫薇¹, 赵殿元^{2,3}, 徐龙¹, 唐丽^{1,2,3}

摘要 目的 通过 Cre-Loxp 技术构建转基因小鼠,应用 *Lrat*^{Cre} 工具鼠示踪肝星状细胞分布。方法 将 *Lrat*^{Cre} 小鼠与 *H11*^{LoxP-ZsGreen-Stop-LoxP-tdTomato} 报告基因小鼠交配,通过 PCR 鉴定得 *Lrat*^{Cre} *H11*^{LoxP-ZsGreen-Stop-LoxP-tdTomato} 报告基因小鼠。固定小鼠肝脏切片,借助免疫荧光标记肝脏非实质细胞抗体,通过 Imaris 3D 还原分析肝星状细胞和其他肝脏非实质细胞间的表达与分布,以及进行肝星状细胞的自定位检验。结果 *Lrat*^{Cre} 介导的红色荧光蛋白 tdTomato 的表达可以特异性标记肝星状细胞,并通过肝星状细胞与肝脏巨噬细胞、肝窦内皮细胞的免疫荧光定位为细胞间相互作用分析提供了途径。结论 *Lrat*^{Cre} 可以介导 tdTomato 对肝星状细胞进行示踪,同时可用做肝星状细胞特异性的报告基因工具鼠。

关键词 肝星状细胞;肝脏巨噬细胞;肝窦内皮细胞;报告基因小鼠;Cre-LoxP

中图分类号 R 392-33;R 329.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)07-1065-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.07.001

肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)起源于胚胎发育期间的间皮细胞,位于肝窦的内皮下间隙。其特征是存在含有维生素 A 的脂滴,表达卵磷脂酰乙醇胺转移酶 *Lrat*、结蛋白 *desmin* 等^[1]。HSC、肝窦内皮细胞(liver sinusoidal endothelial cells, LSEC)、肝脏巨噬细胞(Kupffer cells, KC)、肝脏实质细胞(hepatocytes, HC)共同构成肝脏四大细胞群体。Zhou et al^[2]观察到 HSC 与巨噬细胞借助集落刺激因子 1、血小板衍生生长因子作用的双向环路

稳定细胞种群密度;Bonnardel et al^[3]研究表明死亡的 Kupffer 细胞释放的肿瘤坏死因子激活星状细胞和内皮细胞,免疫细胞及其微环境间的相互作用正被研究者们大量区域化解析中。但由于 HSC 在肝脏中占比较低,直接分离纯度不高等特点,相关研究常常受限或者鉴定清晰度不高。该研究使用 Cre-Loxp 技术,将 *H11*^{LoxP-ZsGreen-Stop-LoxP-tdTomato} 小鼠与 *Lrat*^{Cre} 小鼠进行杂交产生新的转基因小鼠,直接定位 HSC 本身,进而研究肝脏中 HSC 的分布以及 HSC 和其他肝脏非实质细胞之间的相互作用情况。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 雄性 *H11*^{LoxP-ZsGreen-Stop-LoxP-tdTomato} 小鼠(Strain NO. T006163),雌性 *Lrat*^{Cre} 小鼠(Strain NO. T006205),体质量均为 20~22 g,购自江苏集萃药康生物有限公司,所有小鼠均在北京生命组学研究所 SPF 级设施内进行饲养,经单位实验动物管理伦理委员会批准(IACUC:20210528-18-MBL)。

1.1.2 仪器与试剂 2720 Thermal Cycler PCR 仪、凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司),Cryotome FSE 型冰冻切片仪(美国 Thermo 公司),超高分辨率共聚焦显微镜成像系统(日本 Nikon 公司),英国牛津仪器 Imaris 分析系统。Mouse Tail Direct PCR Kit(成都福际生物技术有限公司),PCR 引物(北京华大基因),OCT 包埋剂(日本 Sakura 公司),Hochest 染色剂(赛默飞公司),磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)(北京酷来搏科技有限公司),Triton X-100 缓冲液和 Tween-20 缓冲液(北京索莱宝科技有限公司),抗荧光淬灭封片剂(翌圣生物科技有限公司),三溴乙醇(德国 Sigma 公司)。抗体:desmin(英国艾博抗贸易有限公司),F4/80、CD31-AF647(美国 BioLegend 生物科技公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 *Lrat*^{Cre} *H11*^{LoxP-ZsGreen-Stop-LoxP-tdTomato} 小鼠的构建及鉴定策略 FO 代 *Lrat*^{Cre} 小鼠与 *H11*^{LoxP-ZsGreen-Stop-LoxP-tdTomato} 小鼠交配得子代 F1(图 1)。

2023-05-29 接收

基金项目:国家自然科学基金杰出青年基金项目(编号:82225009);
国家自然科学基金面上项目(编号:32270941)

作者单位:¹安徽医科大学基础医学院免疫教研室,合肥 230032

²军事科学院军事医学研究院生命组学研究所,北京 102206

³蛋白质组学国家重点实验室,北京蛋白质组研究中心,国家蛋白质科学中心,北京 102206

作者简介:黄紫薇,女,硕士研究生;

徐龙,男,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: xulong@ahmu.edu.cn;

唐丽,女,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: tangli731@163.com

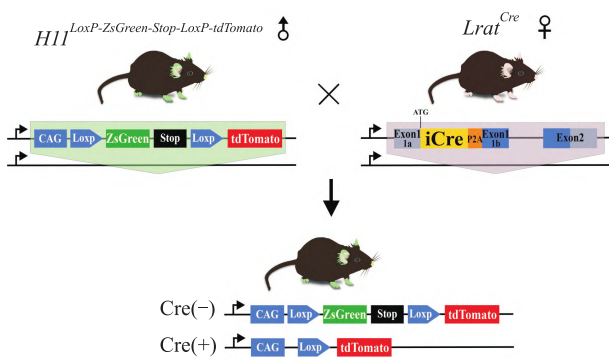


图1 *Lrat^{Cre}* 小鼠与 *H11^{LoxP-ZsGreen-Stop-LoxP-tdTomato}* 小鼠交配得到子代小鼠 *Lrat^{Cre} H11^{LoxP-ZsGreen-Stop-LoxP-tdTomato}* 的构建策略

在2周龄时剪脚趾编号,加入直接鼠尾 PCR 基因组提取试剂,裂解释放基因组,PCR 鉴定小鼠基因型。*Lrat^{Cre}* 上游序列:5'-TGAGCCAAGCACTTTGGCTTC-3';下游序列:5'-TCACATCCTCAGGTTTCAGCAGG-3';反应体系:2 μl 引物,2 μl 蒸馏水,2 μl 鼠尾 DNA 模板,6 μl Mix;反应条件:94 °C、3 min;94 °C、30 s,60 °C、30 s,72 °C、30 s,35 个循环数;72 °C、5 min,20 °C、∞。将 PCR 产物点样于 2.5% 琼脂糖凝胶进行电泳,并显影记录。将 PCR 鉴定得的 *Lrat^{Cre} H11^{LoxP-ZsGreen-Stop-LoxP-tdTomato}* 小鼠及其同窝对照 *H11^{LoxP-ZsGreen-Stop-LoxP-tdTomato}* 小鼠留笼,3 周龄时分笼处理,8 周龄用作实验对象。

1.2.2 肝脏切片样本前处理 *Lrat^{Cre} H11^{LoxP-ZsGreen-Stop-LoxP-tdTomato}* 实验小鼠及其同窝对照 *H11^{LoxP-ZsGreen-Stop-LoxP-tdTomato}* 小鼠称重,用 1.2% 三溴乙醇腹腔注射麻醉小鼠(500 μl/只)。深度麻醉后,将小鼠固定于解剖台打开腹腔,在心尖处扎入针头,快速注入 0.01 mol/L PBS(pH 7.2 ~ 7.4)至肝脏变白,同时剪破下腔静脉。用 PBS 缓冲液灌注约 20 ml,取出整个肝组织,4% 多聚甲醛磷酸缓冲液固定 12 h,之后依次在含 15%、30% 蔗糖的 PBS 溶液中沉糖 12 h,OCT 包埋并于 -80 °C 冰箱保存。使用冰冻切片机制片(厚度 30 μm),贴片,-20 °C 冰箱保存。

1.2.3 免疫荧光法观察肝脏非实质细胞分布 准备试剂:Triton X-100 与 PBS 按照 1 : 500 体积比配制(Buffer 1);Tween-20 与 PBS 按照 1 : 500 体积比配制(Buffer 2);Buffer 2 中按以下终浓度加入其他试剂:甘氨酸(0.3 mmol/L) + 牛血清白蛋白(1%) + 二抗同源血清(10%)(Buffer 3),4 °C 保存。复温:-20 °C 取出冰冻切片置于湿盒中,用组化笔圈出组织,PBS 覆盖组织切片,室温 10 min。通透:吸弃 PBS,使用 Buffer 1 覆盖组织切片,室温 30 min。

封闭:吸走 Buffer 1,使用 Buffer 3 覆盖组织切片,室温 2 h。一抗染色:吸弃 Buffer 3,将一抗抗体稀释于 Buffer 2 中,覆盖组织切片,封口膜封片,4 °C 染色 12 h。洗涤:PBS 洗 3 次,每次 5 min。二抗染色:将二抗稀释于 Buffer 2 中,室温染色 2 h。洗涤:PBS 洗 3 次,每次 5 min。封片:滴加约 30 μl 抗荧光淬灭封片剂,盖玻片封片,使用激光共聚焦显微镜拍照,每层间距 1.6 μm,共扫描 15 层,厚度约 24 μm。**1.2.4 观察肝脏非实质细胞相互作用** 应用 Imaris 软件对激光共聚焦拍摄原件进行 3D 渲染,得到约 300 μm × 300 μm × 24 μm 的长方体,通过“surface”还原展现细胞原有形态,观察其定位与分布,通过“position of surface statistics”得到 x、y、z 值。

2 结果

2.1 构建 *Lrat^{Cre} H11^{LoxP-ZsGreen-Stop-LoxP-tdTomato}* 小鼠

Lrat^{Cre} 小鼠与 *H11^{LoxP-ZsGreen-Stop-LoxP-tdTomato}* 小鼠交配获得 16 只子代小鼠。子代小鼠 2 周龄时剪脚趾编号,提取基因组 DNA,经 PCR 扩增和电泳后,鉴定出 *Lrat^{Cre}* 小鼠 4 只(1、9、12、15),同窝对照小鼠 WT 小鼠 5 只(3、7、8、10、11)。已知 *Lrat^{Cre}* 扩增条带分子量约 391 bp,琼脂糖凝胶电泳结果见图 2。根据构建策略,表达 *Lrat^{Cre}* 的小鼠亦表达 tdTomato,表示为 *Lrat^{Cre} H11^{LoxP-ZsGreen-Stop-LoxP-tdTomato}* 小鼠,不表达 *Lrat^{Cre}* 的小鼠则表示为 *H11^{LoxP-ZsGreen-Stop-LoxP-tdTomato}*。

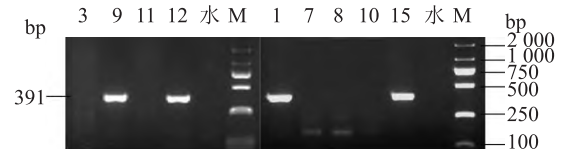


图2 子代小鼠 *Lrat^{Cre} H11^{LoxP-ZsGreen-Stop-LoxP-tdTomato}* 的基因型鉴定结果

M: marker; 1、3、7、8、9、10、11、12、15: 实验小鼠脚号

2.2 HSC 表达与共定位分析 HSC 属于肝脏非实质细胞,被 LSEC 和 HC 包围。其形态不规则,胞体呈圆形或不规则形,数个星状胞突的立体分布和伸展足以覆盖整个肝窦微循环。desmin 属于第三类中间丝蛋白,是 HSC 标记蛋白之一。经过免疫荧光染色,可以看到 *H11^{LoxP-ZsGreen-Stop-LoxP-tdTomato}* 对照小鼠 desmin 标记情况(图 3A), *Lrat^{Cre} H11^{LoxP-ZsGreen-Stop-LoxP-tdTomato}* 实验小鼠 desmin 与 tdTomato 共标记情况(图 3E)。Hochest 染核(图 3B、3F); desmin⁺ HSC 在肝实质中散在分布(图 3D、3H);对

照小鼠不表达 tdTomato(图 3C),实验小鼠 tdTomato⁺可直观表示 HSC 的分布与大小:多呈红色不规则圆点样分布,各点周围分别存在无规律红色丝状线条,符合 HSC 星状胞突特征(图 3G)。

保留实验小鼠 desmin 与 tdTomato 共标记视野,观察二者共定位情况(图 3I)。借助 Imaris 软件 3D 还原图 3I 各细胞及标志物形态,可以看到,粉红透明的不规则形状代表 tdTomato⁺ 表示的 HSC,绿色散在的不规则椭圆体则为 desmin 标记的 HSC(图 3J)。截取诸多 HSC 中的一个,统计其 Imaris 上位置参数,分析共定位位点。可以看到 tdTomato⁺ HSC 重心为 X = 19 450、Y = 2 730、Z = 2 068(图 3K); desmin⁺ HSC 重心为 X = 19 450、Y = 2 726、Z = 2 067(图 3L),综上,基本认定两种标记方法确认的 HSC 为同一个细胞,HSC 标记的 desmin 与 *Lrat*^{Cre} 诱导的 tdTomato⁺ 表达基本重叠,则 *Lrat*^{Cre} *H11*^{LoxP-ZsGreen-Stop-LoxP-tdTomato} 报告基因小鼠能够特异性示踪 HSC。

2.3 LSEC、HSC 表达与分布 LSEC 是高度特化

的内皮细胞,具有特征性的形态和功能,构成网状内皮系统重要组成部分,形成肝脏中最小血管的内层,即肝窦。CD31 又名 PECAM1,主要在胞质表达,可作为内皮细胞标志。肝窦周隙分布的另一细胞类型 HSC,通过释放细胞因子和细胞外基质等成分,可维持肝窦功能和肝脏硬度。经过免疫荧光染色,可看到 LSEC 的区域连结性分布(图 4D、4H);Hochest 染核(图 4B、4F);相比对照小鼠 *H11*^{LoxP-ZsGreen-Stop-LoxP-tdTomato},实验小鼠 *Lrat*^{Cre} *H11*^{LoxP-ZsGreen-Stop-LoxP-tdTomato} 多 tdTomato⁺ 红色圆点样分布(图 4C、4G);同时实验小鼠可以通过 HSC 自定位,观察其与肝脏非实质细胞之一的 LSEC 的交互与表达(图 4A、4E)。观察实验小鼠 CD31 与 tdTomato⁺ 二者相互作用情况(图 4I),可以看到 HSC 胞突缠绕在 LSEC 之间(图 4J),黄色信号即为 LSEC 与 HSC 的重合位点,信号的交叠暗示着两种细胞类型存在着较为紧密的相互作用,为定位分析肝脏纤维化的产生与发展提供了思路。

2.4 KC、HSC 表达与分布 KC 是肝窦状隙的非

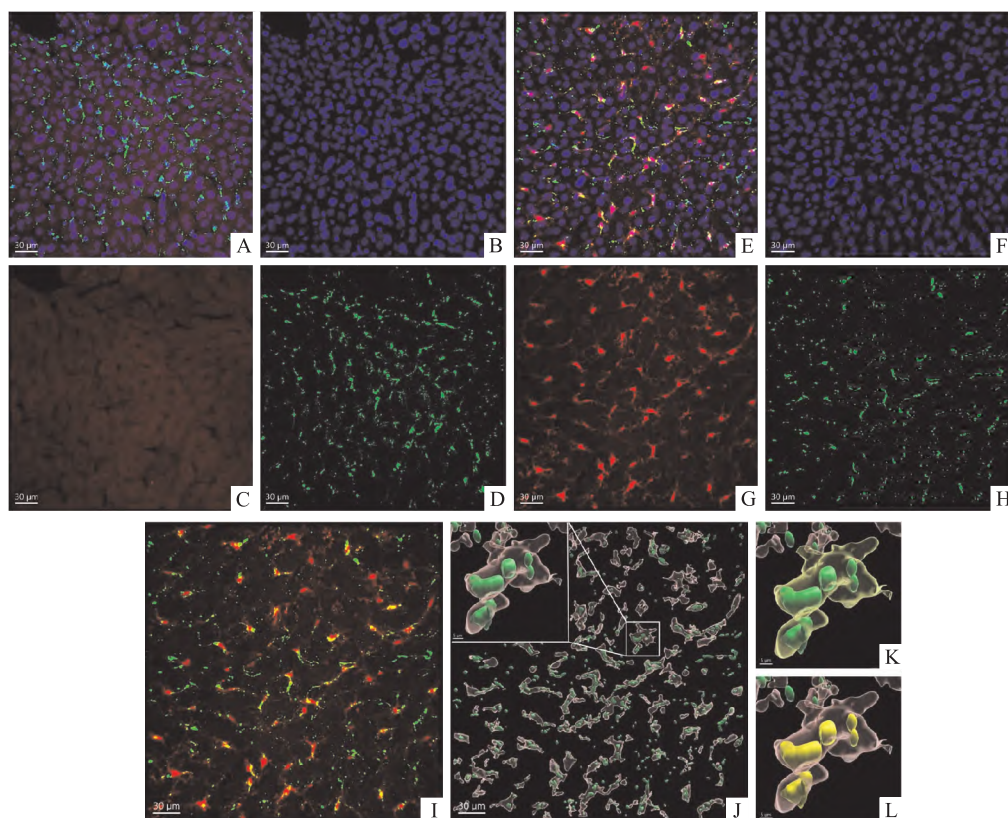


图 3 对照小鼠 *H11*^{LoxP-ZsGreen-Stop-LoxP-tdTomato}、实验小鼠 *Lrat*^{Cre} *H11*^{LoxP-ZsGreen-Stop-LoxP-tdTomato} 的 desmin 染色情况

A - D:对照小鼠 Hoechst(B)、tdTomato(C)、desmin(D)和合成图(A);E - H:实验小鼠 Hoechst(F)、tdTomato(G)、desmin(H)和合成图(E);I:实验小鼠 tdTomato 与 desmin 合成图;J:Imaris 3D 还原 tdTomato 与 desmin 的形态与分布;K:选定细胞 tdTomato 所在重心位置;L:选定细胞 desmin 所在重心位置;A - J: ×40;K、L: ×240

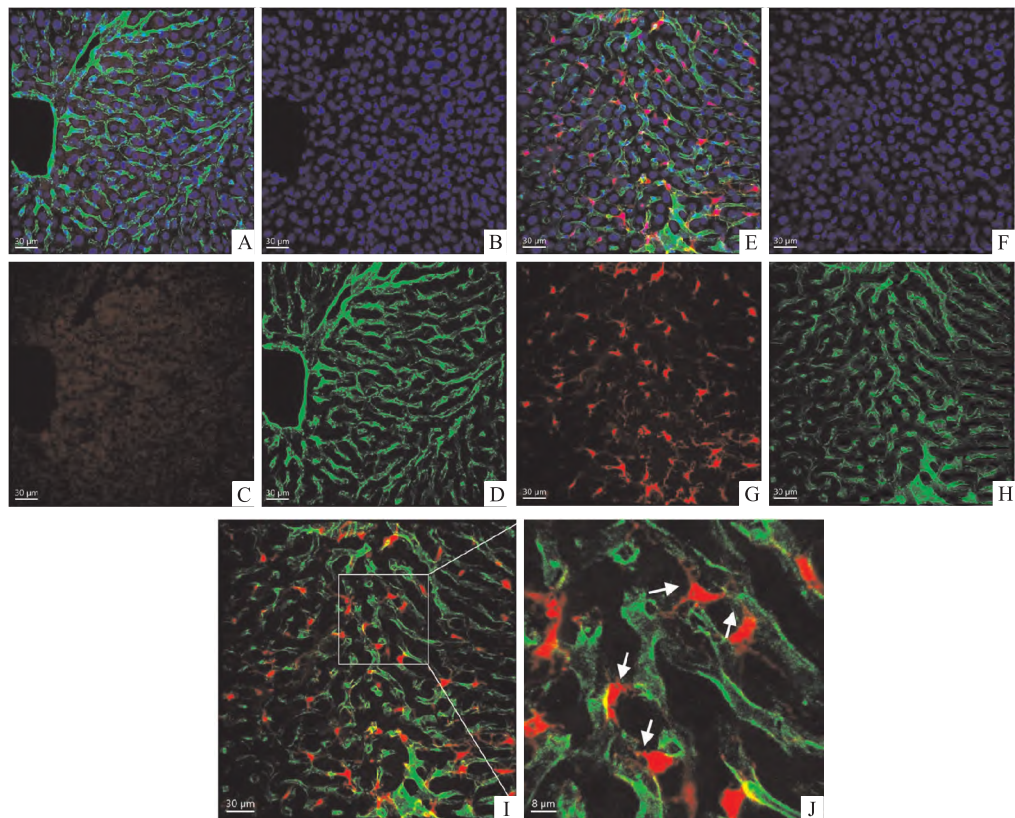


图4 对照小鼠 $H11^{LoxP-ZsGreen-Stop-LoxP-tdTomato}$ 、实验小鼠 $Lrat^{Cre} H11^{LoxP-ZsGreen-Stop-LoxP-tdTomato}$ 的 CD31 染色情况

A - D: 对照小鼠 Hoechst (B)、tdTomato (C)、CD31 (D) 和合成图 (A); E - H: 实验小鼠 Hoechst (F)、tdTomato (G)、CD31 (H) 和合成图 (E); I: 实验小鼠 tdTomato 与 CD31 的形态与分布; J: 图 I 放大区域; 白色箭头: HSC、LSEC 接触位点; A - I: $\times 40$; J: $\times 150$

实质细胞,也是肝内重要的天然免疫细胞。Kupffer 极化和 HSC 活化在慢性肝损伤炎症和纤维化的始动和持续过程中发挥重要作用。免疫荧光染色后研究 KC、HSC 的相互接触与各自分布(图 5A、5E),可观察到 Hoechst 染核皆呈深蓝色(图 5B、5F); F4/80⁺ 标记的绿色 KC 在肝脏组织中散在分布,细胞形态多不规则(图 5D、5H); tdTomato⁺ 代表的 HSC 仍仅存在于 $Lrat^{Cre} H11^{LoxP-ZsGreen-Stop-LoxP-tdTomato}$ 实验小鼠中(图 5G), $H11^{LoxP-ZsGreen-Stop-LoxP-tdTomato}$ 对照小鼠中不存在 Tdtomato 的特异性标记(图 5C),进一步证实小鼠模型构建成功。且通过 KC 和 HSC 的红绿信号共定位可以直接观察到二者非实质细胞间的相互作用(图 5I), KC、HSC 间的包绕交联是细胞通讯等功能得以发挥的基础(图 5J),是研究细胞间表型、功能改变后细胞分布及相互作用的良好模型。

3 讨论

本实验通过 $Lrat^{Cre}$ 小鼠与 $H11^{LoxP-ZsGreen-Stop-LoxP-tdTomato}$ 小鼠杂交获得了 $Lrat^{Cre} H11^{LoxP-ZsGreen-Stop-LoxP-tdTomato}$ 实验小鼠和其同窝对照

$H11^{LoxP-ZsGreen-Stop-LoxP-tdTomato}$ 小鼠,用于 HSC 与 LSEC、KC 的定位和相互作用研究,以及 HSC 自身荧光标记蛋白 desmin 的共定位研究。可以观察到:① HSC 占肝脏细胞总数的 5% ~ 10%^[4],多在肝窦间隙中分布,呈梭形或多边形,常伸出数个星状胞突包绕着肝血窦。desmin 作为经典的 HSC 表面标志物之一,被 Nitou et al^[5] 确定其在 HSC 表达。此外,HSC 还伸出胞突与 KC、邻近的星状细胞相接触。② LSEC 位于肝血窦表面,是肝脏非实质细胞中数量最多的一种细胞,胞质高表达 CD31^[6]。其缺少基底膜,具有窗孔结构、细胞通透性较高等特点,决定了 LSEC 与肝脏微环境中各类型细胞的紧密联系^[7],实验结果显示部分 HSC 与 LSEC 存在空间的交联情况。③ KC 形态不规则,常以板状或丝状伪足附着在内皮细胞表面或伸出伪足穿过内皮细胞窗孔或内皮细胞间隙伸至窦周隙^[8], CD64、VSIG4 和 F4/80 可作为成熟 KC 的表面标志物。可直观看到 KC、HSC 都定位在肝脏窦周隙,存在明显的勾连缠绕,存在相互作用。④ desmin 标记的 HSC 与 tdTomato 标记的 HSC 共定位一致,且亦可直观看到 tdTomato、desmin 的信号交

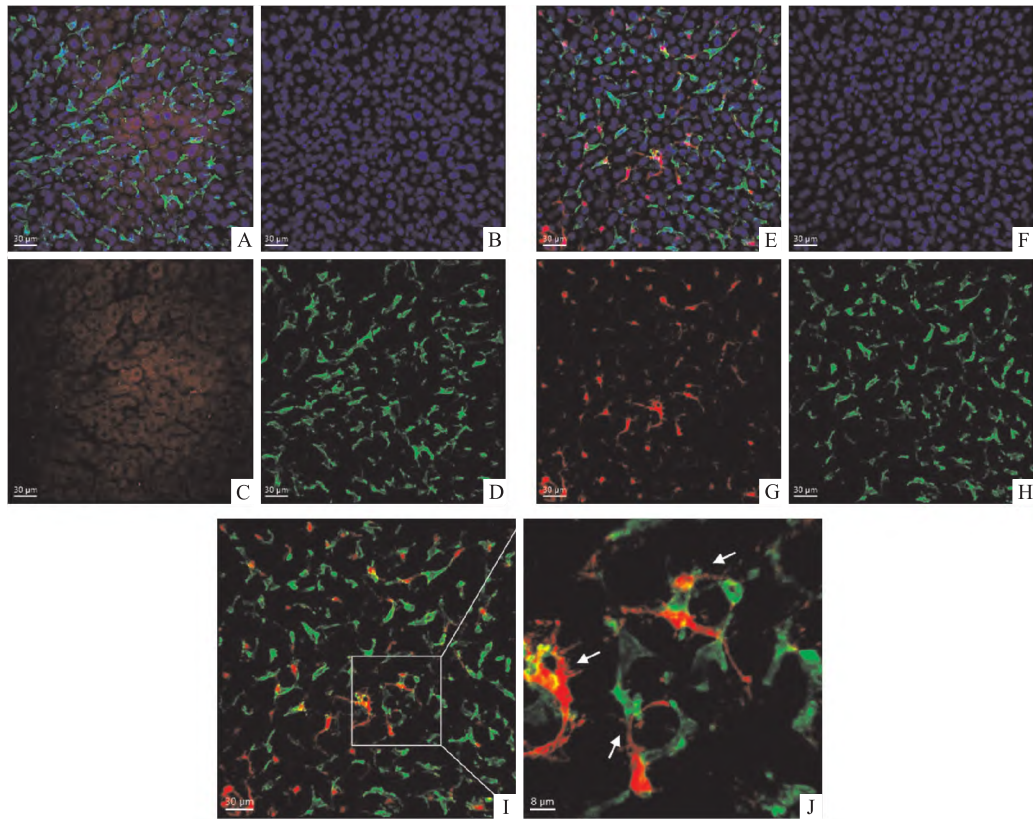


图5 对照小鼠 $H11^{LoxP-ZsGreen-Stop-LoxP-tdTomato}$ 、实验小鼠 $Lrat^{Cre} H11^{LoxP-ZsGreen-Stop-LoxP-tdTomato}$ 的 F4/80 染色情况

A - D:对照小鼠 Hoechst (B)、tdTomato (C)、F4/80 (D) 和合成图 (A); E - H:实验小鼠 Hoechst (F)、tdTomato (G)、F4/80 (H) 和合成图 (E); I:实验小鼠 tdTomato 与 F4/80 的形态与分布; J:选定图 I 放大区域;白色箭头:KC、HSC 接触位点;A - I: $\times 40$; J: $\times 150$

叠,但 tdTomato 标记的还原度更胜于 desmin 的胞质蛋白标记,则说明了该工具鼠的适用性较好,清晰度较高。⑤ HSC、LSEC、KC 三种细胞类型的免疫荧光染色结果中 $Lrat^{Cre} H11^{LoxP-ZsGreen-Stop-LoxP-tdTomato}$ 实验小鼠的特定性表达 tdTomato 证实了该工具鼠构建的成功与特异性。以上全部结果证实该报告基因小鼠可精确示踪 HSC 的表达与分布,以及表示与 KC、LSEC 的良好作用关系。

HSC 是肝脏纤维化、肝癌等发生发展的重要因素。慢性肝病期间,HSC 激活并转分化为肌成纤维细胞的过程,在实验和人类肝损伤中被认为是肝纤维化的中心细胞驱动程序^[9]。然而,HSC 的一般标记的定义是相当复杂的。实际应用中,围绕 HSC 自身标志物展开的小鼠模型仍然较少,在之前的研究中,Collagen-driven Cre 或者 Wtl^{Cre} 不能追踪肌成纤维细胞的特定细胞来源或间皮细胞, $hGFAP^{Cre}$ 小鼠不能有效标记 HSC 或产生胶原的肌成纤维细胞^[10], $GFAP^{Cre}$ 小鼠靶向 HSC 的水平较低,以及有关纤维化和 HSC 衰老在肝癌发生中的争议较多^[11]。最终有研究者借助 $Lrat^{Cre}$ 的新转基因小鼠,证明在

中毒性、胆汁淤滞性和脂肪肝疾病模型中,HSC 可产生 82% ~ 96% 的肌成纤维细胞^[10]。近期更有研究者证实 $Lrat^{Cre}$ 小鼠交配 $Trp53^{fl/fl}$ 或 $Rela^{fl/fl}$ 小鼠后,HSC 中 Trp53 和 Rela mRNA 水平降低了 93% ~ 99%^[12]。有关 HSC 的现有研究中,使用 $Lrat^{Cre}$ 小鼠进行 HSC 的敲除或追踪等逐步成为研究者的共识。

围绕 $H11^{LoxP-ZsGreen-Stop-LoxP-tdTomato}$ 报告基因小鼠,国内研究应用较少,刘慧等^[13] 构建 $Gad2^{tdTomato}/non-Gad2^{ZsGreen}$ 小鼠用于示踪全脑 γ 氨基丁酸能神经元分布及形态。本研究借助报告基因小鼠实现了 HSC 的靶向定位,对照小鼠 $H11^{LoxP-ZsGreen-Stop-LoxP-tdTomato}$ 、实验小鼠 $Lrat^{Cre} H11^{LoxP-ZsGreen-Stop-LoxP-tdTomato}$ 与不含报告基因的正常小鼠相比,在体质量、体长等方面无明显差异,但外部瞳孔、外耳廓、脚趾皮肤、尾巴皮肤等部位可观察到绿光。打开腹腔后可以发现小鼠肌肉组织、心脏、肝脏、肾脏、肠等均呈现绿色,肠系膜荧光绿色尤为明显。这些大体观察现象与之前相关报道^[14]一致。

Cre-Loxp 系统生成的小鼠可提供组织或器官中

细胞的信息,是了解组织发育、探索调节细胞命运的机制和疾病发生发展的强有力工具^[15]。总的来说,*Lrat^{Cre}*小鼠与 *H11^{LoxP-ZsGreen-Stop-LoxP-tdTomato}*小鼠的杂交构建,既保证了 HSC 标志物应用的典型性,又实现了特异性的荧光表达,可以用做 HSC 发育分化、稳态维持及功能研究的工具鼠。

参考文献

- [1] Tsuchida T, Friedman S L. Mechanisms of hepatic stellate cell activation [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2017, 14(7): 397-411.
- [2] Zhou X, Franklin R A, Adler M, et al. Circuit design features of a stable two-cell system [J]. *Cell*, 2018, 172(4): 744-57. e717.
- [3] Bonnardel J, T'Jonck W, Gaublonne D, et al. Stellate cells, hepatocytes, and endothelial cells imprint the Kupffer cell identity on monocytes colonizing the liver macrophage niche [J]. *Immunity*, 2019, 51(4): 638-54.
- [4] Khomich O, Ivanov A V, Bartosch B. Metabolic hallmarks of hepatic stellate cells in liver fibrosis [J]. *Cells*, 2019, 9(1): 24.
- [5] Nitou M, Ishikawa K, Shiojiri N. Immunohistochemical analysis of development of desmin-positive hepatic stellate cells in mouse liver [J]. *J Anat*, 2000, 197(4): 635-46.
- [6] Gracia-Sancho J, Caparrós E, Fernández-Iglesias A, et al. Role of liver sinusoidal endothelial cells in liver diseases [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18(6): 411-31.
- [7] Shetty S, Lalor P F, Adams D H. Liver sinusoidal endothelial cells—gatekeepers of hepatic immunity [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2018, 15(9): 555-67.
- [8] Guilliams M, Bonnardel J, Haest B, et al. Spatial proteogenomics reveals distinct and evolutionarily conserved hepatic macrophage niches [J]. *Cell*, 2022, 185(2): 379-96.
- [9] Acharya P, Chouhan K, Weiskirchen S, et al. Cellular mechanisms of liver fibrosis [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 671640.
- [10] Mederacke I, Hsu C C, Troeger J S, et al. Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology [J]. *Nat Commun*, 2013, 4(1): 2823.
- [11] Kocabayoglu P, Lade A, Lee Y A, et al. β -PDGF receptor expressed by hepatic stellate cells regulates fibrosis in murine liver injury, but not carcinogenesis [J]. *J Hepatol*, 2015, 63(1): 141-7.
- [12] Filliol A, Saito Y, Nair A, et al. Opposing roles of hepatic stellate cell subpopulations in hepatocarcinogenesis [J]. *Nature*, 2022, 610(7931): 356-5.
- [13] 刘慧, 李淑娇, 王瑞青, 等. 利用 Cre-LoxP 技术构建标记 GABA 能神经元的转基因小鼠 [J]. *神经解剖学杂志*, 2021, 37(6): 615-22.
- [14] Muzumdar M D, Tasic B, Miyamichi K, et al. A global double-fluorescent Cre reporter mouse [J]. *Genesis*, 2007, 45(9): 593-605.
- [15] Kim H, Kim M, Im S K, et al. Mouse Cre-LoxP system; general principles to determine tissue-specific roles of target genes [J]. *Lab Anim Res*, 2018, 34(4): 147-59.

Constructing transgenic mice to label hepatic stellate cells by Cre-Loxp technology

Huang Ziwei¹, Zhao Dianyuan^{2,3}, Xu Long¹, Tang Li^{1,2,3}

¹*Dept of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032;*

²*Institute of Lifeomics, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 102206;*

³*State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Proteome Research Center, National Center for Protein Sciences, Beijing 102206)*

Abstract Objective To trace and investigate the distribution of hepatic stellate cells by Cre-Loxp technology of *Lrat^{Cre}* mice. **Methods** *Lrat^{Cre}* mice were mated with *H11^{LoxP-ZsGreen-Stop-LoxP-tdTomato}* reporter mice and genotype of their progeny was identified by PCR. The liver sections were fixed, the antibody of liver non-parenchymal cells was labeled with immunofluorescence, and the expression and distribution of liver stellate cells and other liver non-parenchymal cells were analyzed by Imaris 3D reduction, as well as positively identify dual positioning of hepatic stellate cells. **Results** *Lrat^{Cre} H11^{LoxP-ZsGreen-Stop-LoxP-tdTomato}* reporter mice specifically expressed red fluorescent protein tdTomato in hepatic stellate cells, providing a way to analyze the interactions between hepatic stellate cells, Kupffer cells and liver sinusoidal endothelial cells by immunofluorescence localization. **Conclusion** *Lrat^{Cre}* strain as a specific reporter mouse for hepatic stellate cells can be used to trace hepatic stellate cells.

Key words hepatic stellate cells; Kupffer cells; hepatic sinusoidal endothelial cells; reporter mouse; Cre-LoxP