

技术与方法

*Cc10*基因敲除小鼠模型的构建及气道炎症表型分析

龙洁¹ 魏丹丹¹ 吴全龙¹ 赵子莹¹ 张亚亚¹ 陈艳焦^{1,2} 杨永清^{1,2} 徐玉东^{1,2*}⁽¹⁾上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院, 上海 200437; ⁽²⁾上海市针灸经络研究所, 上海 200030)

摘要 该研究旨在构建*Cc10*基因敲除小鼠模型, 并利用屋尘螨(HDM)诱导的哮喘模型, 分析*Cc10*基因缺失小鼠的气道炎症表型。采用CRISPR/Cas9技术, 设计并体外转录针对*Cc10*基因2号外显子的sgRNA和Cas9表达载体, 显微注射至受精卵后获得F0代基因敲除小鼠, 通过进一步繁育和筛选, 最终获得稳定遗传的*Cc10*^{-/-}小鼠。利用HDM致敏和激发诱导小鼠过敏性哮喘模型, 通过分析肺泡灌洗液(BALF)中白细胞及其分类计数、2型炎症相关细胞因子、肺组织PAS染色及*Muc5ac* mRNA的表达水平来评估*Cc10*基因缺失对小鼠气道炎症表型的影响。PCR扩增及测序结果显示, *Cc10*基因被成功敲除。Western blot分析表明, *Cc10*^{-/-}小鼠肺组织中CC10蛋白表达缺失。*Cc10*^{-/-}哮喘模型小鼠BALF中白细胞总数显著高于野生型(WT)哮喘模型组, 且各分类细胞(中性粒细胞、淋巴细胞、嗜酸性粒细胞、巨噬细胞和嗜碱性粒细胞)数量均显著增加。*Cc10*^{-/-}哮喘模型小鼠BALF中2型炎症相关细胞因子IL-4、IL-5、IL-13水平显著高于野生型(WT)哮喘模型组。肺组织PAS染色结果显示, *Cc10*^{-/-}哮喘模型小鼠具有更显著的支气管壁增厚、杯状细胞增生等病理变化, PAS染色评分显著高于WT哮喘模型组。PCR结果显示, *Cc10*^{-/-}哮喘模型小鼠肺组织*Muc5ac* mRNA表达水平显著高于WT哮喘模型组。该研究成功构建了*Cc10*基因敲除小鼠模型, 并证明了*Cc10*基因缺失导致哮喘小鼠气道炎症加重, 气道黏液分泌增多, 提示CC10在调控气道炎症中发挥重要作用。该模型将为探索CC10在哮喘及其他呼吸系统疾病中的作用机制提供重要工具。

关键词 *Cc10*; CRISPR/Cas9; 基因敲除小鼠; 哮喘; 炎症; *Muc5ac*

Construction of a *Cc10* Gene Knockout Mouse Model and Phenotypic Analysis of Airway Inflammation

LONG Jie¹, WEI Dandan¹, WU Quanlong¹, ZHAO Ziyang¹, ZHANG Yaya¹,CHEN Yanjiao^{1,2}, YANG Yongqing^{1,2}, XU Yudong^{1,2*}⁽¹⁾Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China; ⁽²⁾Shanghai Research Institute of Acupuncture and Meridian, Shanghai 200030, China)

Abstract This study aimed to construct a *Cc10* gene knockout mouse model and analyzed the airway inflammatory phenotype of *Cc10*-deficient mice using a HDM (house dust mite)-induced asthma model. CRISPR/Cas9 technology was employed to design and transcribe sgRNA (single guide RNA) targeting exon 2 of the *Cc10* gene,

收稿日期: 2024-09-25

接受日期: 2024-12-02

国家自然科学基金(批准号: 81973952、82105013、82374583)和上海市自然科学基金(批准号: 23ZR1459900)资助的课题

*通信作者。Tel: 13611867359, E-mail: xydong0303@126.com

Received: September 25, 2024

Accepted: December 2, 2024

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81973952, 82105013, 82374583) and the Shanghai Natural Science Foundation (Grant No.23ZR1459900)

*Corresponding author. Tel: +86-13611867359, E-mail: xydong0303@126.com

along with Cas9 expression vectors *in vitro*. Fertilized eggs were microinjected with these components, resulting in the generation of F0 knockout mice. The allergic asthma model was then developed in these mice by sensitization and challenge with HDM. The impact of *Cc10* gene deficiency on airway inflammatory phenotypes was evaluated by assessing leukocyte counts and their classified counts, type 2 inflammation-associated cytokines in BALF (bronchoalveolar lavage fluid), performing PAS staining on lung tissues, and measuring *Muc5ac* mRNA expression levels. PCR amplification and sequencing confirmed the successful knockout of the *Cc10* gene. Western blot analysis demonstrated the absence of CC10 protein expression in the lung tissues of *Cc10*^{-/-} mice. The total leukocyte count in BALF of *Cc10*^{-/-} asthmatic mice was significantly higher than that of the WT (wild-type) counterparts, with notable increases observed in neutrophils, lymphocytes, eosinophils, macrophages, and basophils. The levels of type 2 inflammation-associated cytokines IL-4, IL-5, and IL-13 were significantly higher in the BALF of *Cc10*^{-/-} asthma model mice than in the WT asthma model group. PAS staining of lung tissues revealed that the *Cc10*^{-/-} asthmatic mice exhibited significant pathological changes, including thickened bronchial walls and goblet cell hyperplasia, with PAS staining scores markedly higher than those in WT asthmatic mice. PCR analysis showed that *Muc5ac* mRNA expression levels in the lung tissues of *Cc10*^{-/-} asthmatic mice were significantly elevated compared to WT counterparts. Collectively, this study successfully constructed a *Cc10* gene knockout mouse model and demonstrated that *Cc10* deficiency exacerbates airway inflammation and enhances mucus secretion in asthma. These findings suggest that CC10 plays a crucial role in regulating airway inflammation, and the model provides a valuable tool for investigating the mechanisms of CC10 in asthma and other respiratory diseases.

Keywords *Cc10*; CRISPR/Cas9; gene knockout mice; asthma; inflammation; *Muc5ac*

在复杂多变的自然环境中,空气中的花粉、真菌孢子、屋尘螨(house dust mites, HDM)、尘土颗粒及香烟烟雾等吸入性过敏原不断刺激人体呼吸道,引发呼吸系统的慢性炎症反应,导致诸如支气管哮喘、慢性支气管炎、慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)等疾病,这些疾病严重威胁着人类的生命健康^[1]。呼吸道上皮屏障是人体与外界环境接触的第一道防线,具有黏液纤毛清除和抗菌功能,从鼻腔到支气管主要包括假分层柱状纤毛上皮、杯状细胞、Clara细胞等组成成分^[2]。其中,Clara细胞作为非纤毛支气管分泌细胞,广泛分布于鼻窦、肺、气管和各级支气管等部位的黏膜上皮中,在维持肺部稳态和免疫调节中扮演着关键角色^[3]。

CC10(Clara cell 10-kDa protein; 也被称为Secretoglobulin family 1A member 1; Clara cell secretory protein, CCSP; Clara cell protein 16, CC16; Uteroglobulin等)由*Cc10*基因(也被称为*Scgblal*基因)编码,是一种在呼吸道上皮Clara细胞中高度表达的分泌蛋白^[4]。CC10在正常生理状态下持续产生,并且是肺中最丰富的蛋白质之一^[3]。研究表明,CC10蛋白通过其抗氧化特性保护气道上皮细胞免受氧化损伤^[5],同时

它降低纤维连接蛋白表达水平抑制气道重塑,并参与调节气道炎症反应^[6]。CC10蛋白还参与调节黏液的分泌,帮助维持呼吸道上皮屏障的完整性^[7]。尽管已有研究揭示了CC10在呼吸道慢性炎症性疾病中的重要作用,但其具体机制仍未完全明确。为深入理解CC10在这些疾病中的功能及其作用机制,有必要构建*Cc10*基因敲除模型,以研究其在病理过程中的具体贡献。

近年来,CRISPR/Cas9系统作为一种高效、灵活且快速发展的基因编辑技术,在实现细胞内的精准基因敲除方面得到了广泛应用^[8]。通过设计单向引导RNA(single guide RNA, sgRNA)来靶向特定的DNA序列,并与Cas9核酸酶共同导入靶细胞,sgRNA能引导Cas9定位至靶标位点,在该位点诱导双链DNA断裂,进而通过细胞自身的修复机制实现基因序列的删除或插入^[9]。

本研究旨在利用CRISPR/Cas9技术,以C57BL/6J品系小鼠为遗传背景,构建*Cc10*基因敲除的小鼠模型。利用HDM诱导的过敏性哮喘模型,评估*Cc10*基因缺失对小鼠气道炎症表型的影响,为后续研究CC10在哮喘及其他呼吸系统疾病中的作用机制,以及为开发新的疾病防治策略提供重要的实验动物模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物

6~8周龄野生型(wide type, WT) C57BL/6J小鼠来自北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号: [SCXK(京)2021-0006], 6~8周龄 *Cc10* 基因敲除小鼠由上海南方模式生物科技股份有限公司繁育和饲养。小鼠按照 SPF 级动物要求, 饲养于上海中医药大学实验动物房, 室温 25 °C, 昼夜各 12 h 灯光交替, 自由饮水。所有实验操作均通过上海中医药大学动物实验委员会批准(伦理编号: PZSHUTCM2309080009), 并在特定的无病原体条件下饲养, 符合实验动物护理和使用指南。按随机数字表法将小鼠分为 4 组, WT 正常对照组、*Cc10*^{-/-} 正常对照组均为 4 只, WT 哮喘模型组、*Cc10*^{-/-} 哮喘模型组均为 6 只, *n*=4~6, 雌雄各半。

1.2 主要试剂及仪器

mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra Kit(货号: AM1345)、MEGAscript Kit(货号: AM1354)、MEGAclear Kit(货号: AM1908)、TRIzol 总 RNA 提取试剂(货号: 15596026)、RNA 反转录试剂盒(货号: K1622)、Mouse IL-5 Uncoated ELISA(货号: 88-7054)、Mouse IL-13 Uncoated ELISA(货号: 88-7137) 购自 ThermoFisher Scientific 公司; Mouse IL-4 ELISA MAX Deluxe Set(货号: 431104) 购自美国 Biolegend 公司; *Not I* 限制性内切酶(货号: R3189)、RNA 合成试剂盒 HiScribe T7 High Yield RNA Synthesis Kit(货号: E2040S) 购自美国 New England Biolabs 公司; SYBR[®] Green Realtime PCR Master Mix(货号: QPK-201) 购自日本 TOYOBO 公司; 质粒小量提取试剂盒(货号: D6945) 购自美国 Omega Bio-Tek 公司; 抗小鼠 β -actin 抗体(货号: 3700) 购自美国 Cell Signaling Technology 公司; 抗小鼠 CC10 抗体(货号: ab213203) 购自英国 Abcam 公司; RIPA 裂解液(货号: P0013B)、超敏 ECL 化学发光试剂盒(货号: P0018S)、过碘酸-雪夫(PAS)染色试剂盒(货号: C0142S) 购自上海碧云

天生物技术股份有限公司; cOmplete Mini 蛋白酶抑制剂混合物(货号: 04693124001) 购自德国 Sigma 公司; HDM(货号: XPB91D3A25) 购自美国 GREER 公司。

动物血液细胞分析仪(型号: BC-5300Vet) 购自深圳 Mindray 公司; ChemiDoc XRS+ 成像系统 购自美国 Bio-Rad 公司; LightCycler 96 Instrument(型号: 05815916001) 购自瑞士 Roche 公司。

1.3 设计 sgRNA 及构建表达载体

小鼠 *Cc10* 基因(gene ID: 22287) 定位于第 19 号染色体(Chr 19), 具体位置为 Chr19: 9061006~9065320 bp。敲除针对的转录本 *Scgbla1*-201(ENSMUST00000025554.2) 包含三个外显子和两个内含子, 其编码区包含一个开放阅读框, 表达蛋白全长 96 aa。根据 *Scgbla1* 基因结构, 选择敲除区域 2 号外显子(exon 2), 针对 *Cc10* 基因 intron 1 和 intron 2 分别设计 2 个 sgRNA 靶位点, sgRNA 靶位点序列见表 1。

1.4 体外转录 sgRNA 和 Cas9 表达载体

Cas9 mRNA 表达载体经 *Not I* 酶切线性化, 使用 mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra Kit 进行体外转录, 随后按照 MEGAclean Kit 说明书进行纯化。使用 MEGAscript T7 Transcription Kit 对两个 sgRNA 进行体外转录, 随后使用 MEGAclean Kit 进行纯化。

1.5 获得阳性基因敲除小鼠品系

体外转录的 *Cas9* mRNA 和 sgRNA 被注射到 C57BL/6J 小鼠的受精卵中, 然后将其移植到假孕雌鼠中完成胚胎发育。PCR 和测序鉴定 F0 代小鼠使用的 PCR 引物对为: 正向 -5'-TCC CCG GTG CTG TGA GGT A-3'; 反向 -5'-GGG GGA GTG GAT AGG GGA TTT-3'。选择阳性 F0 代小鼠与野生型 C57BL/6J 小鼠交配以获得 F1 代杂合 *Cc10* 敲除(*Cc10*^{+/-}) 小鼠。鉴定方法同 F0 代小鼠, PCR 反应程序为: 98 °C 预变性 2 min; 98 °C 变性 10 s, 63 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 2 min。F1 代杂合雄性和雌性小鼠相互交配以获得稳定遗传 *Cc10* 基因敲除的 F2 代纯合子(*Cc10*^{-/-}) 小鼠。

表1 sgRNA序列信息
Table 1 sgRNA sequence information

sgRNA靶序列 sgRNA target sequence	序列信息(5'→3') Sequence information (5'→3')	PAM序列 PAM sequence
sgRNA 1	GTG TAA GCT CTG GGG GTT AA	GGG
sgRNA 2	TGG GGA GAA CAC TTG ACC CC	AGG

1.6 *Cc10*^{-/-}基因敲除小鼠基因型检测

选取所有F2代小鼠, 剪取鼠尾并将其置于1.5 mL离心管中, 加入0.5 mL鼠尾裂解液和50 μL蛋白酶K贮存液。将离心管置于杂交炉中, 56 °C反应过夜。室温12 000 r/min离心10 min, 取上清加1 mL无水乙醇混匀, 13 000 r/min离心15 min, 弃上清。然后用70%乙醇洗涤, 4 °C、8 000 r/min离心10 min, 收集沉淀, 加入100 μL灭菌水充分溶解, 从F2代小鼠尾巴提取的基因组DNA作为模板进行PCR鉴定, 鉴定引物P1-5'-GAA TCC AAA GGC AGC TCA GG-3'; P2-5'-CCT CTG ACC TCC ACA TGT GT-3'。PCR条件为: 94 °C预变性3 min; 94 °C变性30 s, 65 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min, 共35个循环, 最后72 °C延伸5 min。PCR扩增产物通过琼脂糖凝胶电泳进行分析, 以验证基因组DNA的PCR鉴定结果。

1.7 Western blot检测肺组织CC10蛋白表达情况

取小鼠肺组织进行研磨, 加入含有蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液, 在冰上裂解1 h后, 以12 000 r/min 4 °C离心10 min, 收集上清液。使用BCA法进行蛋白定量, 取30 μg、60 μg和120 μg的蛋白样品, 与上样缓冲液混匀后, 煮沸5 min进行变性处理。将变性的蛋白样品进行SDS-PAGE电泳, 电泳完成后将蛋白质转移到PVDF膜上。使用5%的脱脂奶粉在室温下封闭1 h。随后, 加入抗小鼠的CC10一抗(稀释度1:1 000), 在4 °C下孵育过夜。孵育结束后, 用TBST洗涤3次, 每次10 min。然后在室温下孵育HRP标记的二抗(稀释度1:2 000) 1 h。再次用TBST洗涤3次, 每次10 min。最后, 在PVDF膜上加入超敏ECL化学发光试剂进行显色, 使用ChemiDoc XRS+成像系统拍摄, 以β-actin蛋白作为内参。

1.8 构建哮喘模型小鼠

为了探究*Cc10*基因敲除对哮喘模型气道炎症表型的影响, 我们将WT小鼠与*Cc10*^{-/-}小鼠随机各分为两组: 正常对照组和哮喘模型组。对于哮喘模型组, 小鼠在第0天和第7天通过鼻腔滴注的方式接受10 μg

的HDM进行致敏。随后, 在第14至18天连续5天, 每天通过鼻腔滴注15 μg的HDM进行激发。最后一次激发后48 h, 对小鼠进行样本取材和分析。对照组小鼠则用等体积的PBS代替HDM进行致敏和激发。

1.9 BALF白细胞计数

结扎一侧肺脏, 将肺泡灌洗管插入小鼠气管, 分2次(0.5 mL和0.5 mL)缓慢向单侧肺内注入1 mL PBS缓冲液(含1% BSA), 反复抽吸3次以上, 3 000 r/min、4 °C离心10 min。BALF细胞沉淀使用200~300 μL的PBS缓冲液重悬, 使用动物血细胞分析仪检测BALF中白细胞总数及分类计数。

1.10 2型细胞因子检测

ELISA反应板中加入100 μL/孔的捕获抗体溶液, 4 °C孵育过夜。然后加入封闭液室温封闭1 h, 洗板后加入100 μL/孔标准品、BALF上清, 室温孵育2 h。再次洗板后加入100 μL/孔的检测抗体溶液, 室温孵育1 h。洗板后加入100 μL/孔链霉亲和素-HRP溶液, 室温孵育30 min。洗板后进行显色反应, 终止反应后酶标仪读取450 nm波长处的吸光度(D)值。

1.11 肺组织PAS病理染色

用4%多聚甲醛溶液对小鼠肺组织进行常温固定48 h, 常规石蜡包埋。将石蜡切片脱蜡水化后, 用1%过碘酸溶液避光孵育10 min, 以氧化组织中的多糖结构。然后滴加雪夫试剂, 室温下避光反应30 min, 将玻片浸泡于ddH₂O中并置于摇床洗涤5 min。然后用0.5%苏木精溶液复染30 s, 用流水冲洗5 min。样品通过无水乙醇脱水和二甲苯透明处理后, 用中性树脂胶封片。采用光学显微镜观察PAS染色的肺组织切片, 随机选取10个视野进行拍照, 并以半定量的方式评分(0, 无染色; 1, 轻微; 2, 中等; 3, 重度; 4, 极其重度), 然后计算平均值。

1.12 *Muc5ac* mRNA表达水平检测

利用TRIzol提取肺组织RNA并测定其浓度和纯度, 取1 μg total RNA为模板, 使用RNA反转录试

表2 引物设计与引物序列
Table 2 Primer design and primer sequence

引物 Primer	序列信息(5'→3') Sequence information (5'→3')
<i>Gapdh</i> forward strand	CAT CAC TGC CAC CCA GAA GAC TG
<i>Gapdh</i> reverse strand	ATG CCA GTG AGC TTC CCG TTC AG
<i>Muc5ac</i> forward strand	CCA CTT TCT CCT TCT CCA CAC C
<i>Muc5ac</i> reverse strand	GGT TGT CGA TGC AGC CTT GCT T

剂盒将RNA反转录为cDNA。然后以cDNA为模板,使用SYBR® Green Realtime PCR Master Mix试剂盒在LightCycler 96实时荧光定量PCR系统中进行RT-qPCR。以*Gapdh*作为内参,引物序列如表2所示。PCR反应条件为:95 °C预变性30 s;三步法40个循环进行扩增:95 °C变性15 s,60 °C退火15 s,72 °C延伸45 s;熔解曲线分析:95 °C变性10 s,65 °C结合60 s,97 °C升温1 s,37 °C降温30 s。相对表达量计算使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法处理。

1.13 统计分析方法

数据均采用均数±标准误(mean±SEM)表示。对于符合正态分布且方差齐性的数据,采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)来分析组间差异,并使用最小显著差异法(least-significant difference, LSD)进行两两组间比较分析;当方差不齐时,则采用Games-Howell检验来进行两两组间比较分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 *Cc10*基因敲除小鼠的构建策略

*Cc10*基因敲除小鼠的构建及基因型鉴定策略如

图1所示。小鼠*Cc10*基因位点有1个转录本,共包含3个exon,其中exon 2编码区为188 bp,是第一个会导致移码突变的外显子,编码大部分蛋白(约占总蛋白的2/3),并且编码蛋白涵盖重要结构域。因此,利用CRISPR/Cas9编辑技术敲除*Cc10*基因exon 2区域,使CC10蛋白因读码框移码无法正确翻译,造成基因功能缺失。

2.2 *Cc10*^{-/-}小鼠的获得

Cas9 mRNA和sgRNA混合后经显微注射受精卵获得目的基因蛋白读码框移码的F0代阳性小鼠,由于F0代嵌合体特性,故与野生型C57BL/6J小鼠交配,经PCR鉴定并通过产物测序确定获得稳定遗传的F1代小鼠,即缺失556个碱基对,插入4个碱基“GGGG”,造成目的基因蛋白读码框移码突变,F1代DNA测序峰图如图2所示。最后,通过F1代小鼠自交获得F2代*Cc10*^{-/-}小鼠(图3)。

2.3 基因敲除小鼠基因型鉴定

F2代小鼠鼠尾DNA经PCR扩增后进行琼脂糖凝胶电泳,检测结果显示:仅扩增出单一的488 bp片段,为*Cc10*^{-/-}纯合子小鼠(homozygote, HO);扩增

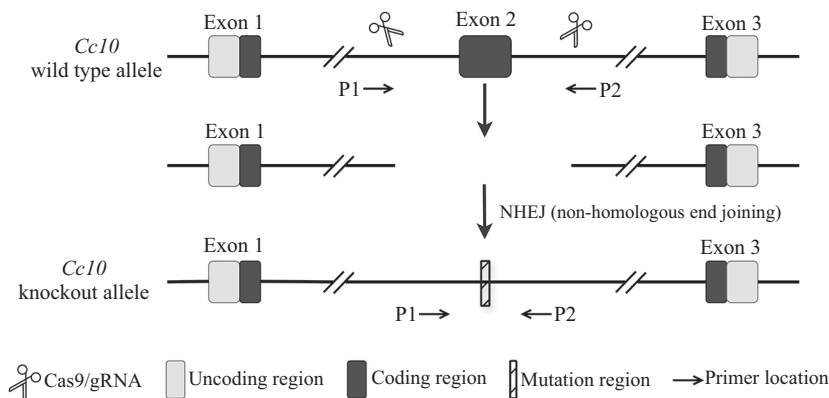


图1 *Cc10*基因敲除小鼠构建及基因型鉴定策略

Fig.1 *Cc10* knockout mice construction and genotyping strategy

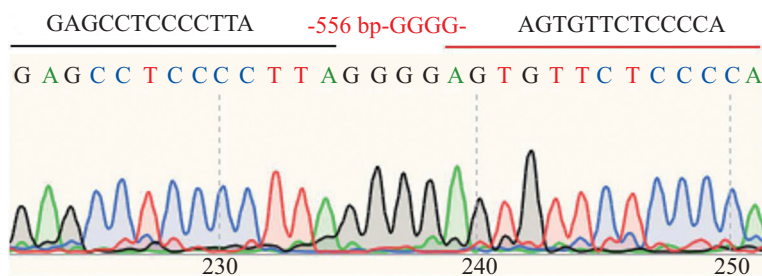


图2 F1代DNA测序结果

Fig.2 F1 generation DNA sequencing results

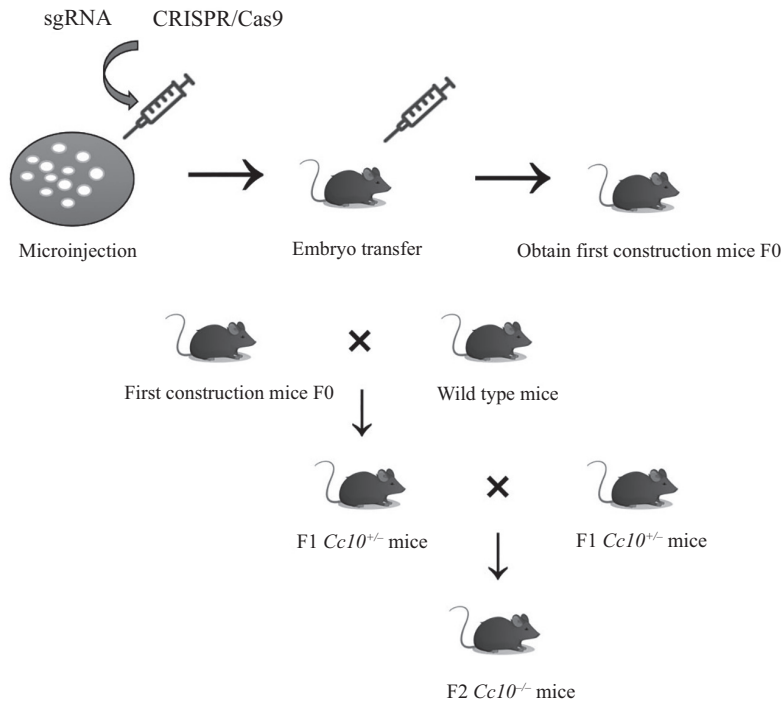
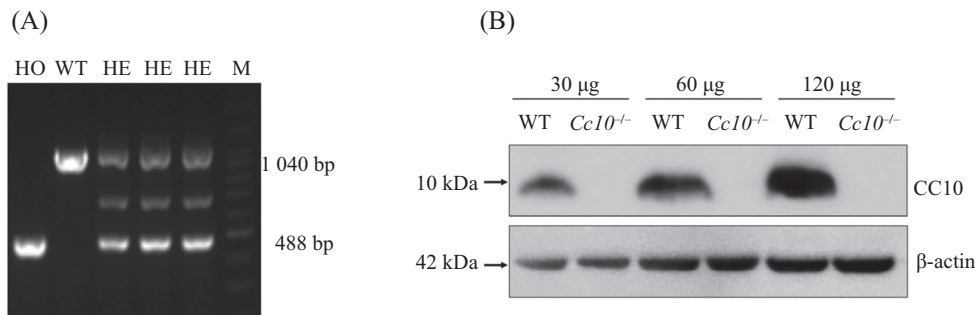


图3 *Cc10*^{-/-}小鼠的获得(根据参考文献[10]修改)
Fig.3 Obtain of *Cc10*^{-/-} mice (modified from reference [10])



A: F2代小鼠基因型的PCR鉴定结果(HO: 纯合子; HE: 杂合子; WT: 野生型; M: 分子量标准); B: 基因敲除小鼠肺组织内CC10蛋白表达情况。
A: PCR identification results of genotype in F2 mice (HO: homozygote; HE: heterozygous; WT: wild type; M: DNA marker); B: expression of CC10 protein in lung tissue of gene knockout mice.

图4 基因敲除小鼠基因型鉴定和蛋白表达验证结果

Fig.4 Results of genotype identification and protein expression validation in gene knockout mice

出1 040 bp片段和488 bp片段, 为*Cc10*^{+/-}杂合子小鼠 (heterozygote, HE), 仅扩增出单一的1040 bp片段, 为*Cc10*^{+/+} WT小鼠, 见图4A。

2.4 *Cc10*基因敲除小鼠蛋白水平验证

利用 Western blot方法在 WT小鼠肺组织中能够检测到CC10蛋白表达, 但是在*Cc10*^{-/-}小鼠肺组织中检测不到CC10蛋白表达(图4B)。这说明敲除*Cc10*基因的exon 2后, CC10蛋白读码框发生移码, 提前终止翻译, CC10蛋白无法表达。证明*Cc10*基因敲除小鼠模型构建成功。

2.5 *Cc10*基因敲除哮喘模型小鼠BALF白细胞总数及分类计数

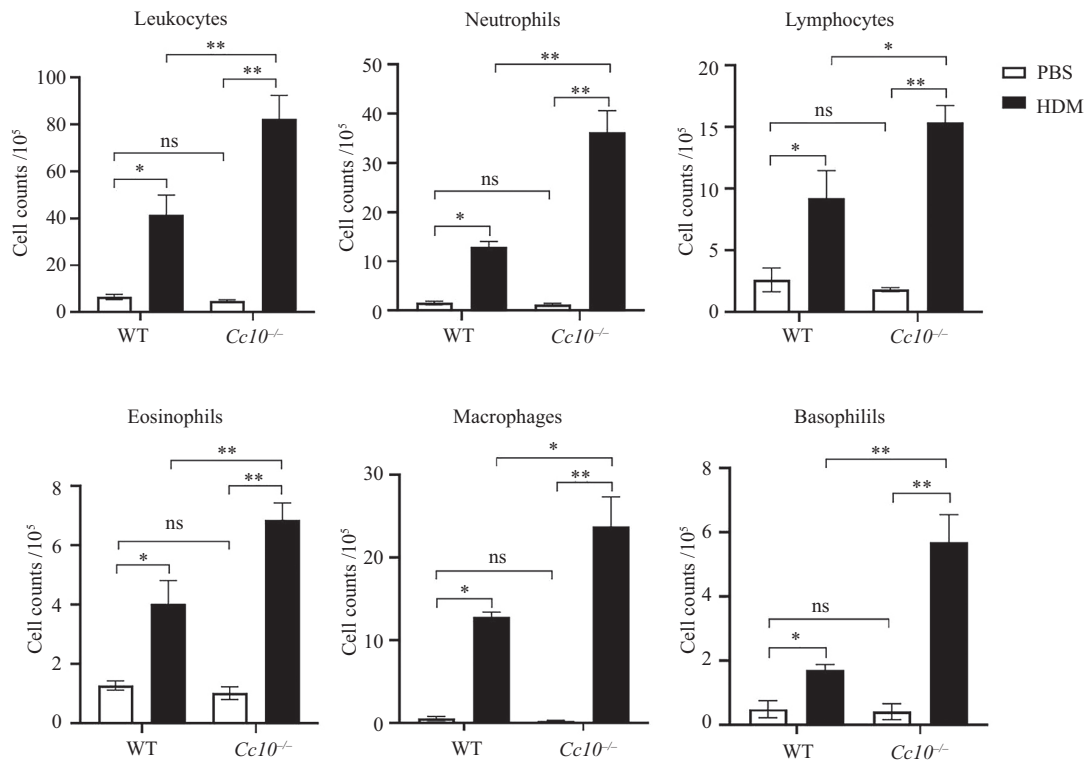
采用动物血细胞分析仪检测BALF白细胞总数及分类计数, 如图5所示, 与WT正常对照组比较, WT哮喘模型组小鼠BALF中白细胞总数增加 ($P<0.05$), 而*Cc10*^{-/-}哮喘模型组小鼠BALF中白细胞总数与WT哮喘模型组比较显著上升 ($P<0.01$)。白细胞分类计数结果显示, 与WT正常对照组比较, WT哮喘模型组小鼠BALF中中性粒细胞(Neu)、淋巴细胞(Lym)、嗜酸性粒细胞(Eos)、巨噬细胞(Mac)和嗜碱性粒细

胞(Bas)的数量均增加($P<0.05$), $Cc10^{-/-}$ 哮喘模型组小鼠BALF中Neu、Lym、Eos、Mac及Bas与WT哮喘模型组相比数量均显著上升($P<0.05$, $P<0.01$), 同时结果显示, WT正常对照组与 $Cc10^{-/-}$ 正常对照组相比, BALF中白细胞总数以及分类计数均无统计学差异($P>0.05$), 说明正常小鼠与 $Cc10^{-/-}$ 小鼠滴鼻PBS不

会影响肺内正常的生理状态。

2.6 $Cc10$ 基因敲除哮喘模型小鼠BALF中Th2型细胞因子IL-4、IL-5和IL-13表达水平

ELISA结果(图6)显示, WT哮喘模型组BALF中IL-4、IL-5、IL-13的表达水平上升($P<0.01$), 而 $Cc10^{-/-}$ 哮喘模型组小鼠BALF中IL-4、IL-5、IL-13与

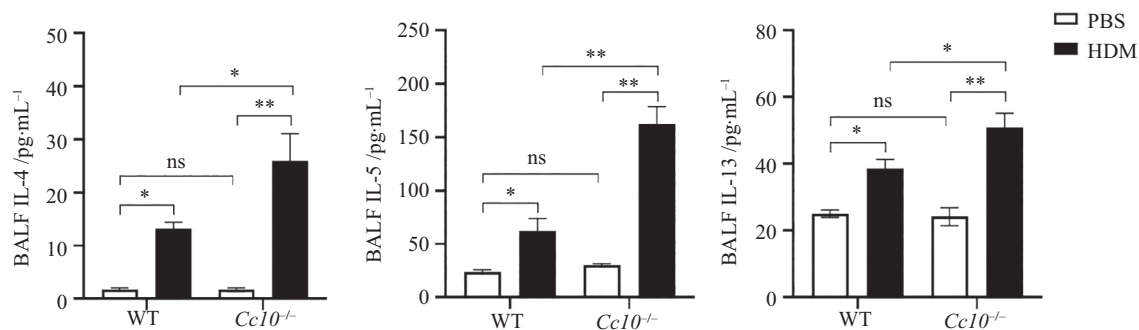


各组小鼠BALF中白细胞总数(Leu)、中性粒细胞(Neu)、淋巴细胞(Lym)、嗜酸性粒细胞(Eos)、巨噬细胞(Mac)和嗜碱性粒细胞(Bas)表达情况。 $*P<0.05$, $**P<0.01$, ns表示无统计学意义。n=4-6。

The expression of total white blood cells (Leu), neutrophils (Neu), lymphocytes (Lym), eosinophils (Eos), macrophages (Mac), and basophils (Bas) in the BALF of each group of mice. $*P<0.05$, $**P<0.01$, ns indicates no statistical significance. n=4-6.

图5 小鼠BALF中白细胞总数及分类计数

Fig.5 Total and differential counts of leukocytes in the BALF of mice

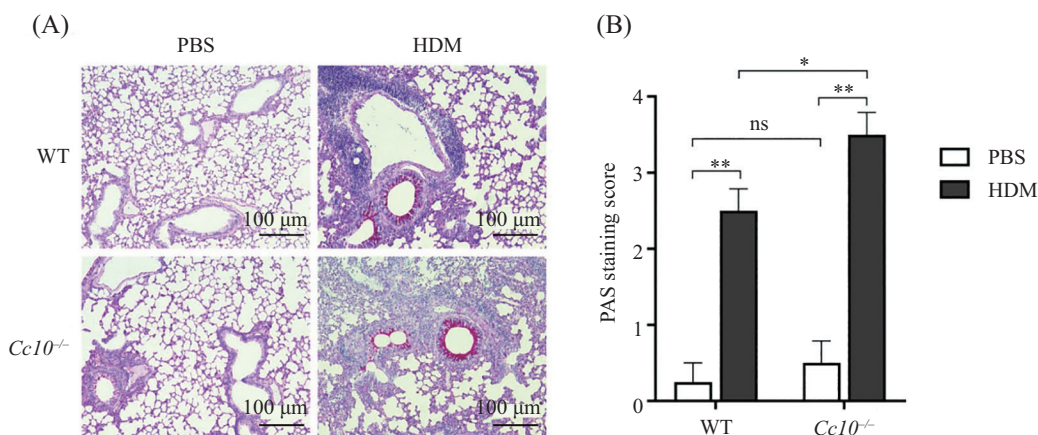


各组小鼠BALF上清中IL-4、IL-5、IL-13表达水平。 $*P<0.05$, $**P<0.01$, ns表示无统计学意义。n=4-6。

The expression levels of IL-4, IL-5, and IL-13 in the BALF supernatant of each group of mice. $*P<0.05$, $**P<0.01$, ns indicates no statistical significance. n=4-6.

图6 小鼠BALF中Th2型细胞因子表达水平

Fig.6 Expression levels of Th2 cytokines in BALF of asthma model mice

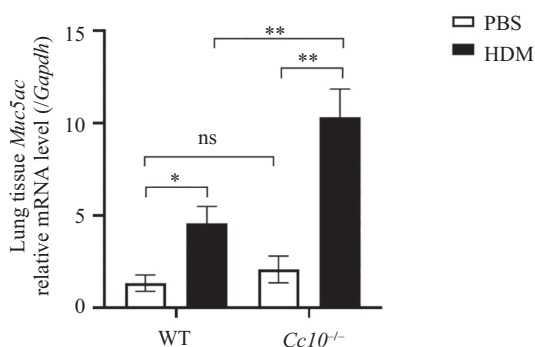


A: 代表性的肺组织PAS染色结果; B: PAS染色的评分定量分析结果。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ns表示无统计学意义。n=4~6。

A: representative lung tissue PAS staining results; B: quantitative analysis of PAS staining scores. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ns indicates no statistical significance. n=4-6.

图7 小鼠肺组织PAS染色

Fig.7 Lung histology stained with PAS



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ns表示无统计学意义。n=4~6。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ns indicates no statistical significance. n=4-6.

图8 小鼠肺组织*Muc5ac* mRNA的表达水平

Fig.8 The mRNA expression levels of *Muc5ac* in mouse lung tissue

WT哮喘模型组比较显著上升($P < 0.01$), 说明CC10缺失能升高哮喘小鼠中Th2相关炎症细胞因子表达水平。

2.7 *Cc10*基因敲除哮喘模型小鼠肺组织PAS染色结果

PAS染色结果显示, 在 *Cc10*^{-/-}哮喘模型小鼠中, 支气管壁增厚、细支气管周围炎症细胞浸润和气道上皮杯状细胞增生等病理变化与WT哮喘模型小鼠比较更加明显, 其PAS染色评分显著高于WT哮喘模型组($P < 0.05$)(图7)。

2.8 *Cc10*基因敲除哮喘模型小鼠肺组织*Muc5ac* mRNA表达结果

呼吸道表面通过富含黏蛋白糖蛋白的分泌黏液层保护机体免受吸入病原体的侵害, 异常黏液蓄积是呼吸系统疾病的主要特征, MUC5AC可能在驱

动气道炎症和恶化严重程度方面起着核心作用^[11]。荧光定量PCR结果显示, WT哮喘模型组和 *Cc10*^{-/-}哮喘模型组小鼠肺组织 *Muc5ac* mRNA表达与各自的正常对照组比较均显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。同时, *Cc10*^{-/-}哮喘模型组与WT哮喘模型组比较 *Muc5ac* mRNA表达水平显著上升($P < 0.01$), 说明 *Cc10*^{-/-}基因缺失能够使哮喘小鼠 *Muc5ac* mRNA表达水平更高。

3 讨论与结论

CC10蛋白是主要由气道Clara细胞表达的分泌型蛋白, 在维持呼吸道上皮屏障完整性、抗炎和免疫调节等方面发挥着重要作用^[3,12]。异常的CC10水平在多种呼吸系统疾病包括哮喘^[13]、COPD^[14]和囊性纤维化肺病^[15]中被观察到。临床研究表明, 与健康个体相比, 哮喘患者血清中CC10表达水平较低^[16]。

相反,在进行特异性过敏原免疫疗法后,气道中的CC10表达水平显著增加,同时伴随着局部Th2细胞因子的减少,这突显了其作为气道炎症关键内源性调节因子的作用^[17]。然而,CC10蛋白在哮喘等气道炎症性疾病中的具体作用机制仍有待进一步探究。

基因敲除技术是一种强大的研究工具,通过选择性地敲除特定基因,观察该基因缺失对生物体的影响,从而解析该基因及其编码的蛋白质在生物过程中的作用与机制。CRISPR/Cas9技术以其高效、精确、灵活的特点,成为目前最广泛使用的基因敲除和基因编辑工具^[18]。本研究利用CRISPR/Cas9技术成功构建了*Cc10*基因敲除小鼠模型,并验证了该模型的基因型和蛋白表达水平。该技术通过sgRNA和Cas9核酸酶的共同作用,实现了对*Cc10*基因exon 2的精准敲除,导致CC10蛋白的读码框移码,从而使CC10蛋白无法正确表达,进而造成基因功能缺失。PCR扩增结果显示*Cc10*^{-/-}小鼠的基因型为单一的488 bp片段,表明该基因被成功敲除。Western blot分析显示,*Cc10*^{-/-}小鼠肺组织中CC10蛋白表达缺失,进一步验证了基因敲除的有效性。该*Cc10*基因敲除小鼠模型的成功构建为研究CC10在呼吸道疾病中的作用提供了有力的工具。

通过对*Cc10*^{-/-}小鼠模型进行HDM诱发的过敏性哮喘实验,本研究发现*Cc10*^{-/-}小鼠在HDM刺激后表现出比WT小鼠更为严重的气道炎症反应。具体表现为BALF中白细胞总数及分类计数(包括Neu、Lym、Eos、Mac、及Bas)、2型炎症细胞因子IL4、IL-5、IL-13表达水平显著增加。此外,肺脏组织切片的PAS染色结果显示,*Cc10*^{-/-}哮喘模型小鼠气道上皮杯状细胞增生的病理变化比WT哮喘模型小鼠更为显著。我们此前的研究还表明,*Cc10*^{-/-}哮喘模型小鼠的支气管壁增厚以及细支气管周围的炎性细胞浸润程度增高、上皮细胞增生作用显著增强^[19]。这些结果共同表明,*Cc10*基因敲除小鼠模型在HDM刺激下表现出更为严重的气道炎症,这与CC10蛋白在气道炎症中的免疫抑制作用相一致^[20],说明CC10蛋白可能通过其抗炎特性减轻气道炎症。

荧光定量PCR结果显示,*Cc10*^{-/-}哮喘模型小鼠的肺组织中*Muc5ac* mRNA表达水平显著升高,提示*Cc10*基因缺失可能使哮喘小鼠MUC5AC黏蛋白表达量更高。这与TOKITA等^[21]的研究一致,他们发现CC10蛋白能够抑制由细菌脂多糖(lipopolysaccharide,

LPS)和IL-13刺激的人类气道上皮细胞中MUC5AC黏蛋白的分泌。MUC5AC是气道黏液的主要成分之一,其过度表达与气道阻塞和哮喘症状加重密切相关^[22-23]。本研究结果支持CC10在调节气道黏液分泌中的重要作用,提示CC10可能通过抑制MUCAC的表达来减少黏液分泌,从而减轻哮喘症状。

综上所述,本研究成功构建了*Cc10*基因敲除小鼠模型,并验证了其在哮喘模型中的气道炎症表型变化,揭示了CC10在调节气道炎症和黏液分泌中的重要作用。前期研究初步展示了该模型在探索哮喘气道炎症调控机制中的应用潜力^[19]。未来的研究可以进一步深入解析CC10调控气道炎症和黏液分泌的具体细胞或分子机制,例如通过评估CC10蛋白表达变化对气道免疫细胞功能活性的影响,或采用转录组学、蛋白质组学等手段,全面揭示CC10的下游信号通路和作用机制,开发基于CC10的新型治疗策略。此外,还可以利用该基因敲除小鼠模型,评估不同治疗手段对CC10缺失引起的气道炎症和肺组织损伤的改善效果,为临床转化应用提供坚实的实验基础。

参考文献 (References)

- [1] LI R, LI J, ZHOU X. Lung microbiome: new insights into the pathogenesis of respiratory diseases [J]. Signal Transduct Target Ther, 2024, 9(1): 19.
- [2] ÇELEBI SÖZENER Z, TREFFEISEN E R, ÖZDEL ÖZTÜRK B, et al. Global warming and implications for epithelial barrier disruption and respiratory and dermatologic allergic diseases [J]. J Allergy Clin Immunol, 2023, 152(5): 1033-46.
- [3] MARTINU T, TODD J L, GELMAN A E, et al. Club cell secretory protein in lung disease: emerging concepts and potential therapeutics [J]. Annu Rev Med, 2023, 74:427-41.
- [4] KIMURA S, YOKOYAMA S, PILON A L, et al. Emerging role of an immunomodulatory protein secretoglobulin 3A2 in human diseases [J]. Pharmacol Ther, 2022, 236: 108112.
- [5] PLOPPER C G, MANGO G W, HATCH G E, et al. Elevation of susceptibility to ozone-induced acute tracheobronchial injury in transgenic mice deficient in Clara cell secretory protein [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2006, 213(1): 74-85.
- [6] JUNG C G, CAO T B T, QUOC Q L, et al. Role of club cell 16-kDa secretory protein in asthmatic airways [J]. Clin Exp Allergy, 2023, 53(6): 648-58.
- [7] LONG X, WANG N, ZHANG X. Roles of Clara cell 10-kD protein and type 2 innate lymphoid cells in allergic rhinitis [J]. Cell Cycle, 2021, 20(18): 1923-34.
- [8] DU Y, LIU Y, HU J, et al. CRISPR/Cas9 systems: delivery technologies and biomedical applications [J]. Asian J Pharm Sci, 2023, 18(6): 100854.
- [9] LIU G, LIN Q, JIN S, et al. The CRISPR-Cas toolbox and gene

- editing technologies [J]. *Mol Cell*, 2022, 82(2): 333-47.
- [10] 柯璐, 曹愿, 谷文达, 等. 通过CRISPR/Cas9技术构建Apoe基因敲除小鼠模型及其表型研究[J]. *中国实验动物学报*(KE L, CAO Y, GU W D, et al. Use of CRISPR/Cas9 system for establishment and characterization of Apoe gene knockout mice model [J]. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*), 2024, 32 (11): 1390-8.
- [11] SINGANAYAGAM A, FOOTITT J, MARCZYNSKI M, et al. Airway mucins promote immunopathology in virus-exacerbated chronic obstructive pulmonary disease [J]. *J Clin Invest*, 2022, 132(8): e120901.
- [12] PACK R J, AL-UGAILY L H, MORRIS G. The cells of the tracheobronchial epithelium of the mouse: a quantitative light and electron microscope study [J]. *J Anat*, 1981, 132(Pt 1): 71-84.
- [13] GOUDARZI H, KIMURA H, KIMURA H, et al. Association of serum CC16 levels with eosinophilic inflammation and respiratory dysfunction in severe asthma [J]. *Respir Med*, 2023, 206:107089.
- [14] VEERAPANENI V V, UPADHYAY S, THIMRAJ T A, et al. Circulating secretoglobulin family 1a member 1 (SCGB1A1) levels as a marker of biomass smoke induced chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Toxics*, 2021, 9(9): 208.
- [15] STAROSTA V, RATJEN F, RIETSCHEL E, et al. Anti-inflammatory cytokines in cystic fibrosis lung disease [J]. *Eur Respir J*, 2006, 28(3): 581-87.
- [16] GUERRA S, VASQUEZ M M, SPANGENBERG A, et al. Club cell secretory protein in serum and bronchoalveolar lavage of patients with asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2016, 138(3): 932-34, e931.
- [17] ZISSLER U M, JAKWERTH C A, GUERTH F, et al. Allergen-specific immunotherapy induces the suppressive secretoglobulin 1A1 in cells of the lower airways [J]. *Allergy*, 2021, 76(8): 2461-74.
- [18] CHAVEZ M, CHEN X, FINN P B, et al. Advances in CRISPR therapeutics [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2023, 19(1): 9-22.
- [19] 张雪. 针刺对*Cc10*基因敲除小鼠哮喘模型的治疗作用研究[D]. 上海: 上海中医药大学, 2020.
- [20] LIU M, LU J, ZHANG Q, et al. Clara cell 16 kDa protein mitigates house dust mite-induced airway inflammation and damage via regulating airway epithelial cell apoptosis in a manner dependent on HMGB1-mediated signaling inhibition [J]. *Mol Med*, 2021, 27(1): 11.
- [21] TOKITA E, TANABE T, ASANO K, et al. Club cell 10-kDa protein attenuates airway mucus hypersecretion and inflammation [J]. *Eur Respir J*, 2014, 44(4): 1002-10.
- [22] LACHOWICZ-SCROGGINS M E, YUAN S, KERR S C, et al. Abnormalities in MUC5AC and MUC5B protein in airway mucus in Asthma [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2016, 194(10): 1296-99.
- [23] SINGANAYAGAM A, FOOTITT J, MARCZYNSKI M, et al. Airway mucins promote immunopathology in virus-exacerbated chronic obstructive pulmonary disease [J]. *J Clin Invest*, 2022, 132(8): e120901.