

C-C趋化因子受体6基因敲除小鼠的构建及鉴定

吴瑶瑶, 张蕊, 魏伟

(安徽医科大学药学科学学院, 临床药理研究所, 合肥 230032)

摘要 **目的** 构建C-C趋化因子受体6(*CCR6*)基因纯合敲除小鼠模型,为后续开展体内功能研究奠定关键的动物模型基础。**方法** 采用规律成簇间隔短回文重复序列及其关联蛋白9系统(CRISPR/Cas9)技术构建*Ccr6*^{-/-}小鼠。提取鼠尾基因组DNA,通过PCR并结合琼脂糖凝胶电泳进行小鼠基因型鉴定;应用HE染色观察小鼠的心脏、肝脏、肺及肾脏等主要组织器官的病理学形态;利用Western blot检测小鼠血液、脾脏和骨髓中CCR6蛋白的表达水平;通过流式细胞术检测小鼠脾脏中T细胞和巨噬细胞的比例,以分析*CCR6*基因敲除对主要免疫细胞群体比例的影响。**结果** 琼脂糖凝胶电泳结果显示,经引物鉴定,仅在307 bp位置扩增出单一特异性条带的小鼠即为*Ccr6*^{-/-}小鼠;HE染色观察显示,*Ccr6*^{+/+}小鼠与*Ccr6*^{-/-}小鼠主要组织器官的细胞形态未见明显差异;Western blot分析表明,*Ccr6*^{-/-}小鼠主要组织中CCR6蛋白表达基本缺失,敲除效果良好;流式细胞术分析结果表明,*CCR6*基因缺失可显著增加CD8⁺T细胞的比例,而CD4⁺T细胞和巨噬细胞的比例保持不变。**结论** 成功利用CRISPR/Cas9技术构建了*CCR6*基因纯合敲除小鼠模型,为深入开展CCR6的体内功能机制研究提供了稳定可靠的动物模型基础。

关键词 C-C趋化因子受体6;基因敲除;CRISPR-Cas9;基因型鉴定;聚合酶链式反应;蛋白表达

中图分类号 R593.22

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2026)03-0409-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2026.03.004

C-C趋化因子受体6(C-C motif chemokine receptor type 6, *CCR6*)是一种G蛋白偶联受体,特异性表达于树突状细胞和T淋巴细胞等免疫细胞表面。*CCR6*的核心功能是通过识别配体C-C趋化因子配体20(C-C chemokine ligand 20, *CCL20*),介导表达*CCR6*的免疫细胞定向迁移,参与机体炎症应答和维持免疫稳态^[1-3]。由于*CCR6*在免疫细胞募集中关键作用,其在类风湿关节炎、银屑病等多种炎症性疾病及肿瘤发生发展中具有重要意义^[4-8]。因此,为在整体动物水平上深入研究*CCR6*的功能及其在疾病中的机制,构建*CCR6*基因敲除小鼠模型至关重要。建立标准化的基因型鉴定流程与高效的繁育策略,是获得可靠、稳定实验模型的基础。该研究旨在详细阐述*CCR6*基因敲除小鼠的基因型鉴定方法与繁育策略,为相关科研提供精准可靠的*CCR6*基因敲除小鼠模型,以深入探究*CCR6*相关疾

病的发生机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 该研究选用遗传背景为C57 BL/6J的*Ccr6*^{+/+}及其同窝*Ccr6*^{-/-}小鼠各4只(雌雄各半),均由江苏集萃药康生物科技股份有限公司提供。小鼠体质量范围为20~25 g,生产许可证号:SCXK(苏)2023-0009。所有动物实验方案均通过安徽医科大学临床药理研究所动物实验伦理委员会批准(编号:PZ-2025-015)。实验动物饲养于安徽医科大学临床药理研究所SPF级动物房内,环境温度维持在22~25℃,相对湿度维持在70%左右。

1.1.2 主要试剂 pH=7.4三甲氨基甲烷-盐酸(Tris aminomethane-Hydrochloric acid, Tris-HCl)缓冲液(货号:B548138-0500,上海生工生物工程股份有限公司)、pH=8.0乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)溶液(货号:B540625-0500,上海生工生物工程股份有限公司)、蛋白酶K溶液(货号:B600169-0002,上海生工生物工程股份有限公司)、2×SanTaq PCR Mix(货号:B532061-0040,上海生工生物工程股份有限公司)、DNA marker(货号:B500351-0500,上海生工生物工程股份有限公司)、核酸染料(货号:A616696-0100,上海生工生物

2025-12-06 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:82403663);安徽省高校自然科学研究重点项目(编号:2024AH050776);安徽医科大学校科研基金项目(编号:2023xkj013)

作者简介:吴瑶瑶,女,硕士研究生;

张蕊,女,副教授,硕士生导师,通信作者, E-mail: zhangrui@ahmu.edu.cn;

魏伟,男,教授,博士生导师,通信作者, E-mail: wwei@ahmu.edu.cn

工程股份有限公司)、琼脂糖(货号:A620014-0100,北京索莱宝生物科技有限公司);氯化钠(货号:S8210,北京索莱宝生物科技有限公司)、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)(货号:S8010,北京索莱宝生物科技有限公司);放射免疫沉淀分析(radio immuno precipitation assay, RIPA)缓冲液(货号:C500005-0100,上海生工生物工程股份有限公司)、5×蛋白上样缓冲液(货号:P0286,上海碧云天生物技术公司)、苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)(货号:ST506,上海碧云天生物技术公司);50×三羟甲基氨基甲烷-乙酸盐-乙二胺四乙酸(Tris-acetate-EDTA, TAE)缓冲液(货号:G3001,北京塞维尔生物科技有限公司);CCR6抗体(货号:PAB12270,上海优宁维生物科技股份有限公司); β -actin抗体(货号:HC201-02,北京全式金生物技术有限公司);CD45、CD3、CD4、CD8和F4/80流式抗体(货号:103108、100206、100412、162310、123116,美国Biolegend试剂公司)。qPCR试剂(货号:Q111-02、R223-01,南京诺唯赞生物科技有限公司);基因鉴定引物均购自上海生工生物工程股份有限公司。

1.1.3 主要仪器 天能Tanon琼脂糖凝胶电泳仪、化学发光凝胶成像分析系统(上海天能科技有限公司,型号:EPS-300、Tanon 5200);通用型电泳仪(北京六一生物科技有限公司,型号:DYY-6C);组织原位细胞扫描分析系统(山东济南丹吉尔电子有限公司,型号:Pannoramic MIDI);Thermal Cycler PCR仪(美国Bio-Rad公司,型号:T100™);全自动凝胶图像分析系统(上海天能科技有限公司,型号:Tanon 1600);高端分析型流式细胞仪(美国BD公司,型号:FACSCanto)。

1.2 方法

1.2.1 先导RNA载体构建 *CCR6*基因位于小鼠17号染色体(Gene ID: 12458),包含9个转录本。该研究选定转录本*CCR6-201*(ENSMUST00000097418.7)的外显子5和6作为特异性敲除区域,该区域编码长度为367 bp的蛋白质功能域。该区域的精确敲除将导致CCR6蛋白结构完整性破坏及功能丧失。基于此敲除策略,通过规律成簇间隔短回文重复序列及其关联蛋白9系统(CRISPR-Cas9)工具设计了特异性靶向该区域的两条单链向导RNA(single-guide RNA, sgRNA):*CCR6-5S1*: GCGTGTGGTATAAGCTTACT和*CCR6-3S1*: ACACGAAACTC

TCGGTGACC,分别识别前间区序列邻近基序AGG。后续所有分子操作,包括sgRNA表达载体的构建与优化、载体的线性化处理、产物的纯化以及体外转录等关键实验步骤,均由合作的专业生物技术公司完成。

1.2.2 *Ccr6*^{-/-}小鼠的获得及繁殖 通过受精卵显微注射技术,将Cas9蛋白与体外转录获得的sgRNA混合物共同注入小鼠受精卵中,并将存活胚胎移植至代孕母鼠子宫内,该步骤由专业生物公司操作完成,最终成功获得阳性F0代杂合子(*Ccr6*^{+/-})小鼠。为建立稳定遗传的品系,将经基因型鉴定的F0代小鼠与C57 BL/6J野生型小鼠交配,产生F1代杂合子(*Ccr6*^{+/-})小鼠。随后通过F1代杂合子小鼠间的互交,获得F2代纯合子敲除(*Ccr6*^{-/-})小鼠。

1.2.3 小鼠基因型鉴定

1.2.3.1 鼠尾基因组DNA提取 取约4周龄小鼠尾尖组织(1~3 mm),置于含有490 μ L鼠尾裂解液及10 μ L蛋白酶K溶液的无酶EP管中,充分涡旋混匀,55 $^{\circ}$ C水浴消化过夜(12~16 h)。消化完成后,将EP管室温冷却片刻,于12 000 r/min离心15 min。小心吸取200 μ L上清液置于新的EP管中,加入400 μ L无水乙醇,轻柔颠倒混匀至出现絮状沉淀。12 000 r/min离心10 min,弃去上清液,加入400 μ L75%无水乙醇(无酶水:无水乙醇=1:3),轻柔颠倒混匀。12 000 r/min离心5 min,小心弃去上清液。再将离心管以12 000 r/min短暂离心30 s,用移液枪小心吸弃残留乙醇。离心管开盖室温晾置20~30 min。加入30 μ L焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)水,轻柔吹打溶解DNA沉淀,溶解后的DNA放入4 $^{\circ}$ C冰箱备用。

1.2.3.2 PCR扩增反应 该研究中使用两对引物,使用的基因鉴定引物序列见表1。PCR反应总体积13 μ L:2×San Taq PCR Mix 6.5 μ L; ddH₂O 4.5 μ L; 两对引物各0.5 μ L; 基因组DNA模板1 μ L。PCR扩增程序:95 $^{\circ}$ C预变性3 min; 35个循环(95 $^{\circ}$ C变性15 s; 65 $^{\circ}$ C退火30 s; 72 $^{\circ}$ C延伸1 min); 72 $^{\circ}$ C、5 min终止反应。

表1 *Ccr6*^{-/-}小鼠基因鉴定引物序列

Tab. 1 Primer sequences for *Ccr6*^{-/-} mice gene identification

Primer name	Sequence (5'-3')
F1	TGCCTCACCACACTTTGCTTCT
R1	ACACCTTAGTGGGTCCCTCTCTCTA
F2	TGCCTCACCACACTTTGCTTCT
R2	TGATTCAAAGACTGGAGAGATGGC

1.2.3.3 琼脂糖凝胶电泳 称取 1.4 g 琼脂糖粉末置于锥形瓶中,加入 70 mL 1×TAE 电泳缓冲液,手动混匀。使用微波炉加热至溶液第 1 次沸腾,取出后小心摇匀。再次放入微波炉加热至第 2 次煮沸,取出后充分摇匀。待溶液稍冷却后,补充 ddH₂O 定容至初始体积(缓慢加,边加边摇匀,避免局部冷却过快),稍微冲凉冷却到 55 ℃ 左右加入核酸染料,摇匀缓慢倒入已放置好梳子的制胶槽中,直到整个板表面形成均匀胶层,室温下静置 20~30 min 直至凝胶完全凝固,垂直向上轻拔梳子,即得 2% 琼脂糖凝胶。取上述 PCR 扩增产物 10 μL 电泳,上样时,将 DNA Marker 点样于中间泳道, F1R1 与 F2R2 的 PCR 扩增产物分别点样于 Marker 两侧的泳道,电压 140 V,电泳 30 min,使用天能 Tanon 琼脂糖凝胶电泳仪观察条带。

1.2.4 外周血单个核细胞悬液的制备 使用无菌剪刀小心剪去小鼠面颊部两侧胡须,用无菌镊子迅速摘除眼球,将血液收集到抗凝管中,加入 5 mL 红细胞裂解液,用移液枪轻柔且充分吹打混匀,室温裂解 15 min,确保红细胞充分裂解。加入适量预冷含 0.2% FBS 的 PBS 终止裂解,1 500 r/min 离心 10 min 后,小心弃去上清液,即获得外周血单个核细胞悬液。

1.2.5 脾脏细胞悬液的制备 颈椎脱臼处死小鼠后,无菌摘取小鼠的脾脏组织置于 70 μm 细胞滤网上,采用机械研磨法配合 5 mL 注射器的推杆进行组织解离,用预冷的含 0.2% FBS 的 PBS 将研磨后的组织冲洗过滤至 50 mL 离心管中,1 500 r/min 离心 5 min 后,弃去上清液,加入 2 mL 红细胞裂解液,用移液枪轻柔且充分吹打混匀,冰上孵育 5 min。加入适量预冷的含 0.2% FBS 的 PBS 终止裂解,1 500 r/min 离心 5 min 后,弃去上清液,即获得脾脏细胞悬液。

1.2.6 骨髓细胞悬液的制备 在小鼠后肢腕关节和踝关节处剪断,取下完整的下肢,用镊子配合湿润纱布仔细摩擦剔除附着在骨骼上的肌肉、肌腱和结缔组织。将剥离干净的骨骼在 75% 乙醇中浸泡 30 s 进行表面灭菌,随后立即转移至无菌 PBS 中漂洗 2 次。将骨骼转移至无菌的 6 cm 培养皿中,加入少量预冷的含 0.2% FBS 的 PBS 使其保持湿润。用无菌剪刀在股骨两端以及胫骨两端各剪开一个小口,充分暴露骨髓腔。用 1 mL 注射器吸取少量预冷的含 0.2% FBS 的 PBS,将针对准一端骨腔开口,轻柔且持续地推注 PBS,将骨髓从骨腔中冲出至培

养皿中,调换骨骼方向,从另一端开口重复冲洗,直至骨骼变白。用移液枪将培养皿中的骨髓细胞悬液转移到 15 mL 离心管中,用少量预冷的含 0.2% FBS 的 PBS 冲洗培养皿并将其合并到离心管中,1 500 r/min 离心 5 min 后,小心弃去上清液,加入 2 mL 红细胞裂解液,用移液枪轻柔且充分吹打混匀,冰上孵育 5 min。加入适量预冷的含 0.2% FBS 的 PBS 终止裂解,1 500 r/min 离心 5 min 后,弃去上清液,即获得骨髓细胞悬液。

1.2.7 小鼠体质量和重要器官的 HE 染色 分别称量 *Ccr6*^{+/+} 小鼠和 *Ccr6*^{-/-} 小鼠体质量后,取心脏、肝脏、肺和肾脏组织经固定、石蜡包埋后切片。切片依次经二甲苯 I、二甲苯 II (各 10 min) 脱蜡,梯度乙醇(100%、95%、75%,各 5 min) 及双蒸水水化。苏木精染色 5 min,流水冲洗返蓝;0.1% 盐酸乙醇分化数秒后流水冲洗,伊红染色 2~5 s,再用流水进行冲洗。脱水透明步骤:75%、95%、100% 乙醇(各 5 min),二甲苯 10 min。中性树脂封片后,采用组织原位细胞扫描分析系统观察病理形态。

1.2.8 CCR6 蛋白水平检测 将裂解液(RIPA 裂解液 196 μL+蛋白酶抑制剂 2 μL+磷酸酶抑制剂 2 μL) 加入细胞中裂解细胞,冰上裂解 30 min 后,12 000 r/min 离心 15 min 收集上清液。应用二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA) 检测法测定蛋白浓度,取等量蛋白与 5× 上样缓冲液混匀,100 ℃ 恒温煮沸 10 min 使蛋白变性。制备 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶,上样后先以 80 V 恒压电泳至浓缩胶,随后调整为 120 V 继续电泳至溴酚蓝到达胶底端。采用湿转法(220 mA, 90 min) 将蛋白转移至 PVDF 膜。将膜放入 5% 脱脂牛奶(1 g 脱脂奶粉溶于 20 mL TPBS) 中,室温摇床低速封闭 2 h。双蒸水漂洗 3 次(每次 10 min) 后,在条带对应位置敷上 β-actin (1:5 000) 和 CCR6 (1:1 000) 一抗,4 ℃ 孵育过夜(16~18 h)。次日,复温至室温后,TPBS 清洗 3 次(每次 10 min) 后,随后加入相应二抗(山羊抗兔 IgG 或山羊抗小鼠 IgG, 1:10 000 稀释于 5% 脱脂牛奶),室温摇床低速封闭 2 h。TPBS 清洗 3 次、PBS 清洗 1 次(每次 10 min) 后,采用化学发光凝胶成像分析系统进行显影。使用 ImageJ 软件定量分析内参和目的条带的灰度值,并对各组结果进行比较。

1.2.9 流式细胞术分析 CCR6 对主要免疫细胞比例的影响 将“1.2.5 项”下提取的脾脏细胞悬液移至流式管中,标记好 *Ccr6*^{+/+} 组和 *Ccr6*^{-/-} 组,1 500 r/

min 离心 5 min 后,小心弃去上清液,两组细胞经固定破膜后,加入相应体积的 CD45、CD3、CD4、CD8 和 F4/80 流式抗体,4 °C 避光孵育 30 min 后,1 500 r/min 离心 5 min 后,小心弃去上清液,用 300 μL PBS 重悬后,经滤网过滤后,上机进行分析。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 8 软件对所有数据进行统计分析,实验结果以均值±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *Ccr6*^{-/-}小鼠的获得 从合作公司获得 F1 代小鼠后,首先通过 PCR 及电泳技术对其进行基因型鉴定。结果显示(图 1A),所有 F1 代小鼠(编号 1-4)均在 307 bp 和 298 bp 位置同时出现特异性条带,证实为 *Ccr6*^{+/-} 小鼠。为获得 *Ccr6*^{-/-} 小鼠,选取经鉴定的 F1 代杂合子小鼠进行互交扩繁,获得 F2 代群体,并对 F2 代个体进行基因型鉴定。结果如图 1B 所示,9 号小鼠仅显示 298 bp 条带,为 *Ccr6*^{+/+} 小鼠;8 号小鼠同时显示 307 bp 和 298 bp 条带,为 *Ccr6*^{+/-} 小鼠;5、6、7、10、11 及 12 号小鼠仅显示 307 bp 条带,鉴定为 *Ccr6*^{-/-} 小鼠。上述结果表明,利用 F1 代杂合子小鼠成功扩繁并获得 *CCR6* 基因敲除纯合小鼠,且该基因型能够稳定遗传。

2.2 *CCR6* 敲除对小鼠生长发育的影响 初步观察显示,*CCR6* 基因缺失对小鼠的一般生长发育未见显著影响,但发现 *Ccr6*^{-/-} 雌鼠的繁殖能力出现明显下降:其平均每窝产仔数为 5~7 只,而 *Ccr6*^{+/+} 雌鼠则为 8~10 只。结果显示,在日常的繁殖管理中需对该品系雌鼠予以特别关注。同窝饲养条件下,*Ccr6*^{-/-} 小鼠体质量与 *Ccr6*^{+/+} 小鼠相比差异无统计学

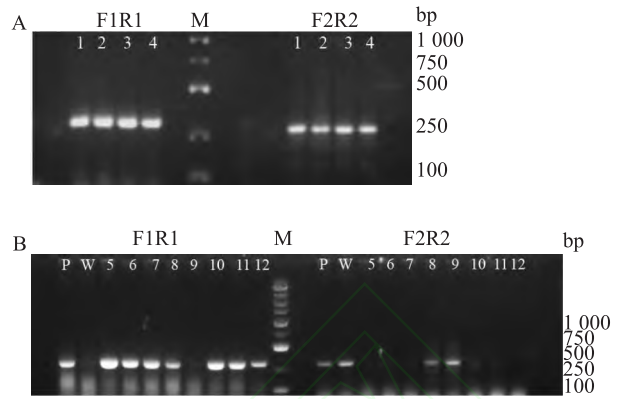


图 1 *Ccr6*^{-/-}小鼠基因鉴定结果

Fig. 1 Results of gene identification of *Ccr6*^{-/-} mice

A: Genotyping results of F1 generation mice; B: Genotyping results of F2 generation mice; 1-12: Represent different mouse numbers; P: Positive control; W: Wild Type; M: DNA marker.

意义($P=0.6072, t=0.5349$)(图 2A)。HE 染色结果显示(图 2B),两组小鼠的心肌纤维结构清晰,排列整齐;肝脏中肝细胞形态完整,无炎性浸润,肝窦结构清晰;肺泡间隔均匀,无渗出性病变;肾小管及肾小球结构正常,未见病理改变。

2.3 *Ccr6*^{-/-}小鼠外周血、脾脏和骨髓中 CCR6 表达情况 为验证 *Ccr6*^{-/-} 小鼠的敲除情况,通过 Western blot 检测了 *Ccr6*^{+/+} 和 *Ccr6*^{-/-} 小鼠中多个组织的 CCR6 蛋白表达(图 3),结果显示,与 *Ccr6*^{+/+} 小鼠相比, *Ccr6*^{-/-} 小鼠的外周血、脾脏和骨髓中 CCR6 蛋白表达水平显著降低($P=0.0039, t=6.000; P=0.0035, t=6.149; P=0.0006, t=9.724$)。

2.4 *Ccr6*^{-/-}小鼠中主要免疫细胞的比例 为了探究 *CCR6* 基因敲除是否会影响小鼠脾脏中主要免疫细胞的比例,该研究采用流式细胞术检测了 *Ccr6*^{+/+} 和 *Ccr6*^{-/-} 小鼠脾脏中 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞及巨噬

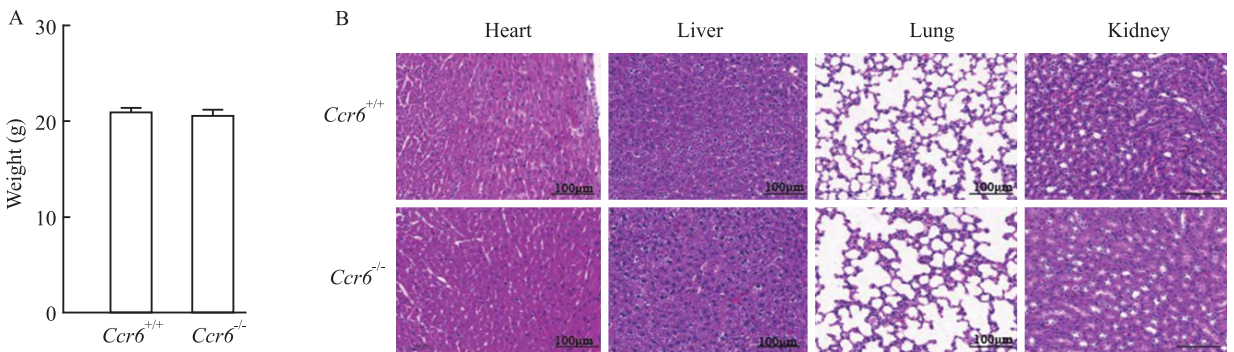


图 2 *Ccr6*^{+/+}小鼠和 *Ccr6*^{-/-}小鼠的体质量对比及心脏、肝脏、肺和肾脏组织变化比较

Fig. 2 Comparison of body weight and changes in heart, liver, lung and kidney tissues between *Ccr6*^{+/+} mice and *Ccr6*^{-/-} mice

A: Comparison of body weight between *Ccr6*^{+/+} mice and *Ccr6*^{-/-} mice; B: HE staining images of heart, liver, lung and kidney tissues from *Ccr6*^{+/+} mice and *Ccr6*^{-/-} mice ×40.

细胞的比例。流式细胞术实验检测结果显示,与 $Ccr6^{+/+}$ 小鼠相比, $Ccr6^{-/-}$ 小鼠脾脏中 CD8⁺T 细胞的比例增加 ($P=0.0232, t=2.800$), CD4⁺T 细胞和巨噬细胞的比例保持不变 ($P=0.1555, t=1.568; P=0.9377,$

$t=0.081$)(图4)。

3 讨论

CRISPR/Cas9 基因编辑系统由 CRISPR 序列和

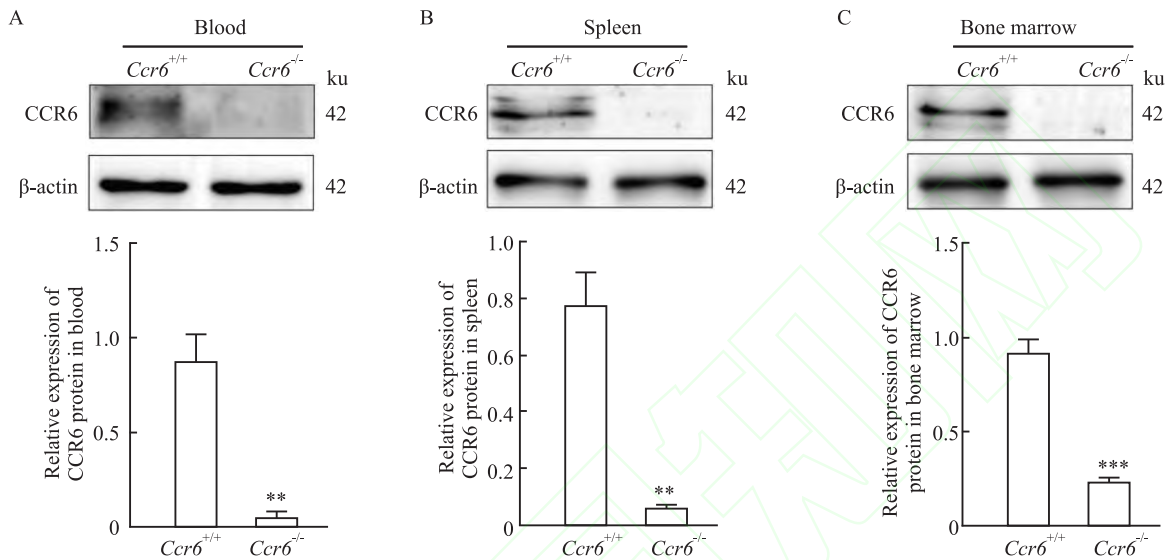


图3 $Ccr6^{+/+}$ 小鼠和 $Ccr6^{-/-}$ 小鼠血液、脾脏和骨髓中 CCR6 的表达情况

Fig. 3 The expression of CCR6 in the blood, spleen and bone marrow of the $Ccr6^{+/+}$ mice and $Ccr6^{-/-}$ mice

A: Blood; B: Spleen; C: Bone marrow; ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs $Ccr6^{+/+}$ group.

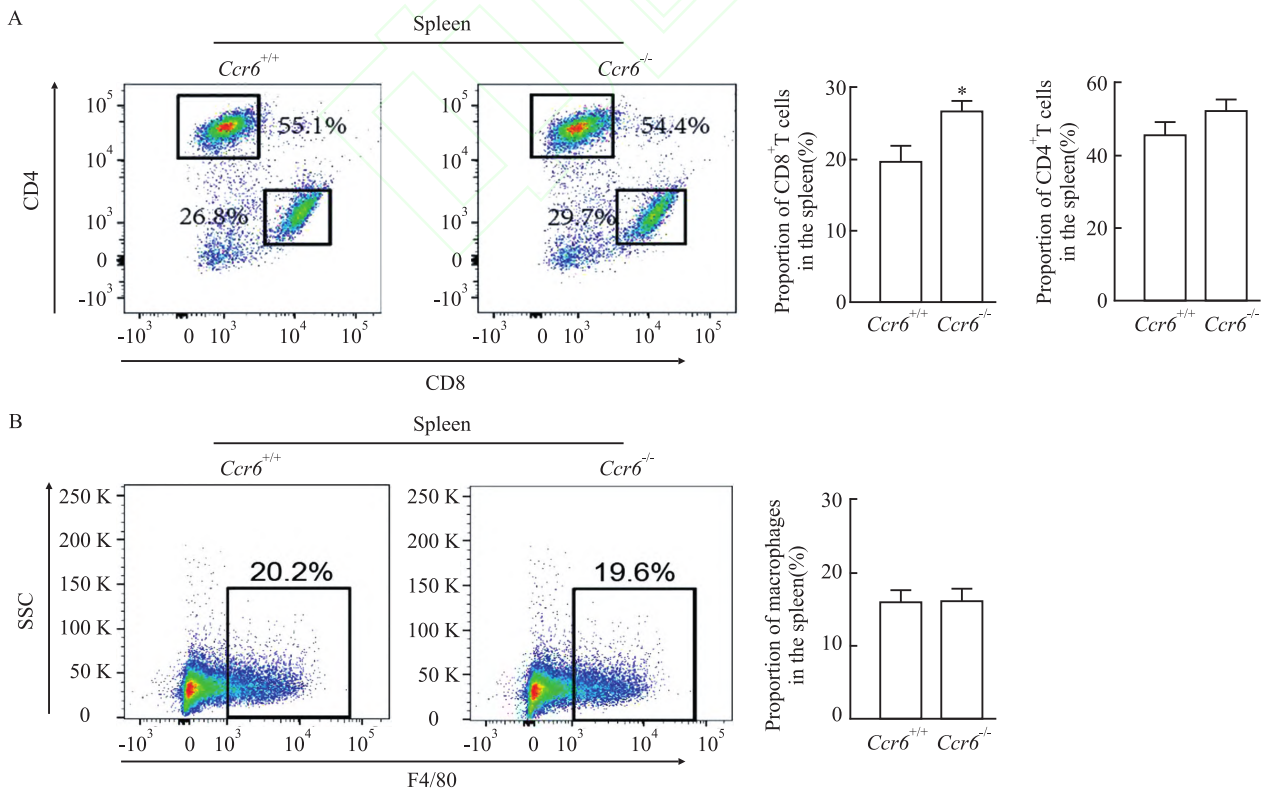


图4 CCR6 基因的敲除对 T 细胞和巨噬细胞比例的影响

Fig. 4 The impact of CCR6 gene knockout on the ratio of T cells and macrophages

A: The proportion of CD4⁺T cells in the spleen of mice remained unchanged, while the proportion of CD8⁺T cells increased; B: The proportion of macrophages in the mouse spleen remains unchanged; * $P<0.05$ vs $Ccr6^{+/+}$ group.

Cas9 核酸内切酶两部分组成,其中 CRISPR 来源于原核生物基因组内的一段重复序列,而 Cas9 蛋白能够在 sgRNA 引导下对特定基因组位点进行精准切割。凭借其操作简便、靶向性强和编辑效率高等优势,该技术已成为构建基因修饰动物模型的首选工具^[9-10]。在该研究中,针对 *CCR6* 基因设计特异性 sgRNA,通过引导 Cas9 蛋白靶向切割基因组特定位点,诱导 DNA 双链断裂,成功构建了 *CCR6* 基因敲除小鼠模型。

CCR6 的特异性配体为 CCL20,在自身免疫性疾病中,免疫细胞和基质细胞高表达 CCL20,通过募集 CCR6 阳性免疫细胞至炎症部位,促进炎症放大和组织损伤^[7]。具体而言,在类风湿关节炎和银屑病中,炎症部位 CCL20 高表达,可招募 CCR6⁺辅助性 T 细胞 17(T helper cell 17, Th17),Th17 细胞释放白细胞介素-17 等炎症因子加剧炎症^[7];在多发硬化症中,脑血管内皮细胞与蛛网膜细胞分泌 CCL20,招募致病性 T 细胞穿越血脑屏障,导致中枢神经系统髓鞘结构受损,加速多发硬化症进程^[11]。研究^[12]表明,CCL20/CCR6 在肿瘤微环境调控中同样发挥关键作用:在前列腺癌中通过肿瘤相关巨噬细胞募集诱导 T 细胞耗竭并加速骨转移;在食管癌和膀胱癌中,CCL20 介导的 CCR6 活化则分别促进肿瘤细胞增殖^[13]和迁移侵袭^[14-15]。这些研究结果充分表明,CCL20/CCR6 的互作在多种疾病的发生发展中具有重要作用。

该研究通过 CRISPR/Cas9 技术构建 *CCR6* 基因敲除小鼠模型,并在 SPF 级环境中进行系统繁育。经基因型鉴定和 Western blot 验证,成功获得可稳定遗传的 *Ccr6*^{-/-} 小鼠品系。该 *CCR6* 基因敲除小鼠模型为深入研究该受体在免疫调节及相关疾病机制中的作用提供了重要工具。通过比较 *Ccr6*^{+/-} 与 *Ccr6*^{-/-} 小鼠在疾病模型中的表型差异,能够直接揭示 *CCR6* 在炎症、自身免疫性疾病及肿瘤发展中的因果关系。此外,该模型是评估靶向 CCR6 治疗策略的重要标准:利用敲除鼠建立疾病模型,若小鼠疾病发展得到显著抑制,则强有力地证明阻断 CCR6 通路具有治疗潜力,从而为开发 CCR6 小分子拮抗剂或中和抗体提供理论依据。同时,通过长期监测 *CCR6* 基因敲除鼠的生理指标(如体质量变化与繁殖性能),也可为未来临床前安全性评价提供参考。

参考文献

- [1] Kadomoto S, Izumi K, Mizokami A. The CCL20-CCR6 axis in cancer progression[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(15): 5186. doi: 10.3390/ijms21155186.
- [2] Kwantwi L B, Wang S, Sheng Y, et al. Multifaceted roles of CCL20 (C-C motif chemokine ligand 20): mechanisms and communication networks in breast cancer progression [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 6923-34. doi: 10.1080/21655979.2021.1974765.
- [3] Wasilko D J, Gerstenberger B S, Farley K A, et al. Structural basis for CCR6 modulation by allosteric antagonists [J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 7574. doi: 10.1038/s41467-024-52045-7.
- [4] Xie T, Fu D J, Li Z M, et al. CircSMARCC1 facilitates tumor progression by disrupting the crosstalk between prostate cancer cells and tumor-associated macrophages *via* miR-1322/CCL20/CCR6 signaling [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 173. doi: 10.1186/s12943-022-01630-9.
- [5] Wang Y, Chen W, Qiao S, et al. Lipid droplet accumulation mediates macrophage survival and Treg recruitment *via* the CCL20/CCR6 axis in human hepatocellular carcinoma [J]. *Cell Mol Immunol*, 2024, 21(10): 1120-30. doi: 10.1038/s41423-024-01199-x.
- [6] Zhang R, Dong M, Tu J, et al. PMN-MDSCs modulated by CCL20 from cancer cells promoted breast cancer cell stemness through CXCL2-CXCR2 pathway [J]. *Sig Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 97. doi: 10.1038/s41392-023-01337-3.
- [7] Meitei H T, Jadhav N, Lal G. CCR6-CCL20 axis as a therapeutic target for autoimmune diseases [J]. *Autoimmun Rev*, 2021, 20(7): 102846. doi: 10.1016/j.autrev.2021.102846.
- [8] Liu Y, Wei D, Deguchi Y, et al. PPAR δ dysregulation of CCL20/CCR6 axis promotes gastric adenocarcinoma carcinogenesis by remodeling gastric tumor microenvironment [J]. *Gastric Cancer*, 2023, 26(6): 904-17. doi: 10.1007/s10120-023-01418-w.
- [9] 黄蓉, 赵鑫鑫, 薛慧, 等. TREM2 基因敲除小鼠的构建、繁育和基因鉴定 [J]. *安徽医科大学学报*, 2025, 60(6): 977-83. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.06.001.
- [9] Huang R, Zhao X X, Xue H, et al. Construction, breeding, and gene identification of TREM2 knockout mice [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2025, 60(6): 977-83. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.06.001.
- [10] 张艺薇, 龙维虎, 唐东红, 等. 基于 CRISPR/Cas9 系统构建 Uox 基因敲除的高尿酸血症小鼠模型 [J]. *中国实验动物学报*, 2025, 33(3): 411-9. doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2025.03.009
- [10] Zhang Y W, Long W H, Tang D H, et al. Construction of hyperuricemic mouse model with Uox gene knockout based on CRISPR/Cas9 system [J]. *Acta Lab Animalis Sci Sin*, 2025, 33(3): 411-9. doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2025.03.009
- [11] Asashima H, Axisa P P, Pham T H G, et al. Impaired TIGIT expression on B cells drives circulating follicular helper T cell expansion in multiple sclerosis [J]. *J Clin Invest*, 2022, 132(20): e156254. doi: 10.1172/JCI156254.
- [12] Kfoury Y, Baryawno N, Severe N, et al. Human prostate cancer

bone metastases have an actionable immunosuppressive microenvironment [J]. *Cancer Cell*, 2021, 39(11): 1464-78, e8. doi:10.1016/j.ccell.2021.09.005.

- [13] Lian J, Liu S, Yue Y, et al. Eomes promotes esophageal carcinoma progression by recruiting Treg cells through the CCL20-CCR6 pathway [J]. *Cancer Sci*, 2021, 112(1): 144-54. doi: 10.1111/cas.14712.
- [14] Nakagawa R, Izumi K, Hiratsuka K, et al. Tumor-associated

macrophages promote bladder cancer metastasis through the CCL20-CCR6 axis [J]. *Neoplasia*, 2025, 60: 101103. doi: 10.1016/j.neo.2024.101103.

- [15] Ouyang J, Hu S, Zhu Q, et al. RANKL/RANK signaling recruits Tregs via the CCL20-CCR6 pathway and promotes stemness and metastasis in colorectal cancer [J]. *Cell Death Dis*, 2024, 15(6): 437. doi:10.1038/s41419-024-06806-3.

Construction and identification of C-C motif chemokine receptor type 6 gene knockout mice

Wu Yaoyao, Zhang Rui, Wei Wei

(*Institute of Clinical Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032*)

Abstract Objective To establish a C-C motif chemokine receptor 6 (*CCR6*) homozygous knockout mouse model in order to provide a crucial animal model foundation for subsequent *in vivo* functional studies. **Methods** *Ccr6*^{-/-} mice were generated using CRISPR-Cas9 technology. Genomic DNA was extracted from mouse tails, with genotyping performed by PCR and agarose gel electrophoresis. Pathological morphology of major organs (heart, liver, lung, kidney) was assessed through HE staining. Western blot was used to analyze *CCR6* protein expression in blood, spleen, and bone marrow. To analyze the impact of *CCR6* gene knockout on the proportion of major immune cell populations, the ratio of T cells and macrophages in the mouse spleen was detected using flow cytometry. **Results** The results of agarose gel electrophoresis demonstrated that mice exhibiting a single specific band at the 307 bp position upon primer-based identification were confirmed as *Ccr6*^{-/-} mice. HE staining revealed no significant histopathological differences between *Ccr6*^{+/+} and *Ccr6*^{-/-} mice. Western blot demonstrated near-complete absence of *CCR6* protein in target tissues. Flow cytometry results demonstrated that *CCR6* gene deletion significantly increased the proportion of CD8⁺T cells, while the ratios of both CD4⁺T cells and macrophages remained unaltered. **Conclusion** A *Ccr6*^{-/-} mouse model is established using CRISPR-Cas9 technology, serving as an essential tool for elucidating *CCR6*'s regulatory role in tumor proliferation.

Key words C-C motif chemokine receptor 6; gene knockout; CRISPR-Cas9; genotyping; polymerase chain reaction; protein expression

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 82403663); Natural Science Research Project of Anhui Educational Committee (No. 2024AH050776); Scientific Research Project of Anhui Medical University (No. 2023xkj013)

Corresponding authors Zhang Rui, E-mail: zhangrui@ahmu.edu.cn; Wei Wei, E-mail: wwei@ahmu.edu.cn