

小鼠气道Club细胞发育特征分析

简鼎¹, 王艺颖¹, 朱琳¹, 李媛媛^{1,2}, 张光莉², 陈诗懿¹, 罗征秀^{2*}

¹重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所/儿童发育疾病研究教育部重点实验室/国家儿童健康与疾病临床医学研究中心/儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地/儿科学重庆市重点实验室, 重庆 400014; ²重庆医科大学附属儿童医院呼吸科, 重庆 400014

[中图分类号] RR725.6

[文献标志码] A

[DOI]

10.11855/j.issn.0577-7402.2022.04.0340

[声明]

本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文]

简鼎, 王艺颖, 朱琳, 等. 小鼠气道Club细胞发育特征分析[J]. 解放军医学杂志, 2022, 47(4): 0340-0345.

[收稿日期] 2021-08-26

[录用日期] 2021-10-09

[上线日期] 2022-03-08

[摘要] **目的** 探讨小鼠气道Club细胞的发育特征。**方法** 收集新生儿(1周龄)、幼年期(3周龄)、成年期(6周龄)BALB/c小鼠的肺组织及血清, 采用免疫荧光检测主支气管和细支气管Club细胞的分布及表达丰度; 流式细胞术检测气道上皮Club细胞百分比及增殖能力; ELISA法检测肺匀浆、血清中Club细胞分泌蛋白(CC16)水平。**结果** 各鼠龄期主支气管Club细胞表达位置参差不齐, 细支气管Club细胞分布形态平坦且均匀。随着鼠龄的增长, 主支气管Club细胞平均荧光强度(MFI)降低(分别为 0.73 ± 0.12 , 0.43 ± 0.05 , 0.26 ± 0.08), 细支气管Club细胞MFI增强(分别为 0.49 ± 0.07 , 0.73 ± 0.08 , 1.02 ± 0.19), 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。新生儿Club细胞占气道上皮细胞百分比($9.49\% \pm 2.38\%$)明显低于幼年期($15.45\% \pm 3.86\%$)和成年期($17.23\% \pm 4.82\%$), 差异有统计学意义($P < 0.05$); 同时新生儿增殖性Club细胞占比($6.12\% \pm 1.89\%$)明显高于幼年期($2.36\% \pm 0.98\%$)和成年期($1.94\% \pm 0.75\%$), 差异有统计学意义($P < 0.01$)。新生儿肺匀浆、血清CC16水平[(64.02 ± 12.70) ng/ml, (13.91 ± 3.36) ng/ml]均明显低于幼年期[(89.31 ± 5.41) ng/ml, (25.77 ± 4.68) ng/ml]和成年期[(95.74 ± 3.31) ng/ml, (28.02 ± 3.99) ng/ml], 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** 出生后Club细胞表达丰度不断增加的主要部位为小气道, 新生儿是气道Club细胞增殖及分泌CC16的关键时期。

[关键词] 气道上皮; Club细胞; Club细胞分泌蛋白; BALB/c小鼠

Study on the development characteristics of airway Club cells in mice

Jian Ding¹, Wang Yi-Ying¹, Zhu Lin¹, Li Yuan-Yuan^{1,2}, Zhang Guang-Li², Chen Shi-Yi¹, Luo Zheng-Xiu^{2*}

¹Institute of Pediatrics, Children's Hospital Affiliated to Chongqing Medical University/Key Laboratory of Child Development Disease Research, Ministry of Education/National Center for Clinical Medical Research on Child Health and Diseases/National International Scientific and Technological Cooperation Base for Major Diseases of Child Development/Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Chongqing 400014, China

²Department of Respiratory Medicine, Children's Hospital Affiliated to Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China

*Corresponding author, E-mail: luozhengxiu816@163.com

This work was supported by the Chongqing Natural Science Foundation (cstc2020jcyj-msxmX0677), the Project of Science and Technology Committee of Yuzhong District, Chongqing (20200156), and the General Basic Research Project from the Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders (GBRP-202112)

[Abstract] **Objective** To clear the developing characteristics of airway Club cells in mice model. **Methods** The lung tissues and serum were collected from neonatal (1-week-old), infant (3-week-old) and adult (6-week-old) BALB/c mice. The immunofluorescence method was performed to detect the distribution and expression abundance of Club cells in main bronchi

[基金项目] 重庆市自然科学基金面上项目(cstc2020jcyj-msxmX0677); 重庆市渝中区科委项目(20200156); 儿童发育疾病研究教育部重点实验室基础研究一般项目(GBRP-202112)

[作者简介] 简鼎, 硕士研究生, 主要从事新生儿肺炎链球菌肺炎对肺功能影响的研究

[通信作者] 罗征秀, E-mail: luozhengxiu816@163.com

and bronchioles. The flow cytometry was used to determine the quantity proportion and proliferation ability, and ELISA was used to detect the levels of Club cell secreted protein (CC16) in lung homogenate and serum. **Results** The Club cells unevenly distributed in main bronchus of all ages of mice, while was relatively flat and uniform in bronchioles in BALB/c mice model. With increasing of mice age, the mean fluorescence intensity (MFI) of Club cells decreased in main bronchus accompanied by an increase in bronchioles with significant difference (main bronchus: 0.73 ± 0.12 , 0.43 ± 0.05 , 0.26 ± 0.08 , respectively, $P < 0.05$; bronchioles: 0.49 ± 0.07 , 0.73 ± 0.08 , 1.02 ± 0.19 , respectively, $P < 0.05$). The proportion of Club cells in airway epithelium was significantly lower in neonatal ($9.49\% \pm 2.38\%$) than those in infant ($15.45\% \pm 3.86\%$) and adult ($17.23\% \pm 4.82\%$) ($P < 0.05$). Meanwhile, the proliferative ability of Ki67 in Club cells was significantly higher in neonatal ($6.12\% \pm 1.89\%$) than those in infant ($2.36\% \pm 0.98\%$) and adult ($1.94\% \pm 0.75\%$) ($P < 0.01$). The CC16 levels in lung homogenates and serum had a statistically significant increase in infant [(89.31 ± 5.41) ng/ml, (25.77 ± 4.68) ng/ml] and adult [(95.74 ± 3.31) ng/ml, (28.02 ± 3.99) ng/ml] than those in neonatal [(64.02 ± 12.70) ng/ml, (13.91 ± 3.36) ng/ml] ($P < 0.01$). **Conclusion** Small airway is the prominent area for Club cells developing after birth, and neonatal is the critical period for Club cells proliferating and secreting CC16.

[Key words] airway epithelium; Club cells; Club cell secreted protein; BALB/c mice

气道上皮是呼吸系统抵御外界致病物质入侵的第一道屏障^[1]。Club细胞是位于气道上皮黏膜处的细胞群，可特异性分泌Club细胞分泌蛋白(CC16)，并可充当干细胞/祖细胞参与气道上皮的损伤修复^[2-4]。Club细胞及CC16在维持气道上皮的完整性中起关键作用^[5-6]。研究证实，气道上皮损伤修复异常是哮喘、慢性阻塞性肺疾病(COPD)等疾病的重要发病机制^[7-8]，儿童早期CC16低表达与成年人哮喘、COPD发病密切相关^[9-10]，提示生命早期Club细胞结构或功能异常可能是哮喘、COPD发生的重要因素。小鼠是研究Club细胞结构和功能的常见动物模型。Karnati等^[11]曾对小鼠Club细胞的生物学特征进行研究，但未对出生后不同时期的Club细胞在各级气道中的分布、表达、增殖能力和分泌功能变化进行阐述。研究出生后不同时期Club细胞的发育特征对深入阐述气道上皮的损伤修复机制具有重要意义。本研究分析了BALB/c小鼠模型不同发育时期气道Club细胞的分布、表达、增殖和分泌等功能变化，以期研究发育期Club细胞结构和(或)功能异常相关疾病提供更多的参考依据。

1 材料与方 法

1.1 实验动物、主要试剂及仪器 清洁级BALB/c孕鼠12只(购自重庆医科大学实验动物中心)，单独饲养于独立通气的消毒饲养盒内，并提供恒定25℃室温、50%~65%湿度、12 h/d光照的环境条件。多聚甲醛购自北京索莱宝科技有限公司；牛血清白蛋白(BSA)、胶原蛋白酶 I 购自美国Sigma公司；抗CC16小鼠来源的单克隆抗体购自美国Santa Cruz公司；抗小鼠荧光二抗AF488、CD31-Biotin、CD34-Biotin、CD45-Biotin、Scal-1-APC、CD24-PE、streptavidin-APC-Cy7、Ki-67-PE-Cy7抗体和细胞固定剂、细胞通透液购自美国eBioscience公司；EpCAM-FITC抗体购自美国Biolegend公司；DAPI购

自上海碧云天生物技术有限公司；红细胞裂解液购自北京天根生化科技有限公司；胎牛血清、Hank's平衡盐溶液购自美国Gibco公司；小鼠CC16 ELISA试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司；Nikon C2 Plus激光共聚焦显微镜购自日本Nikon公司；流式细胞仪(FACSClibur)购自美国BD公司。

1.2 标本采集 孕鼠共生产54只新生小鼠，将小鼠分为出生后1周龄(新生儿)、3周龄(幼年期)、6周龄(成年期)^[12]，每个时期各18只。所有实验操作均在超净工作台内进行，实验过程符合国家及单位有关实验动物管理和使用的规定。将各组小鼠麻醉后心脏采血，用10 ml无菌PBS液进行心脏灌注至双肺发白。将右肺取出，每100 mg肺组织加入1 ml无菌PBS液，使用电动匀浆器匀浆。根据ELISA试剂盒要求，将外周血于4℃下1000×g离心20 min，肺匀浆于4℃下5000×g离心10 min后，均收集上清储存于-80℃。将左肺完整取出，用4%多聚甲醛溶液浸透固定，用于肺组织荧光染色。

1.3 免疫荧光检测各级气道Club细胞分布形态及表达丰度 气道Club细胞免疫荧光标记方法参考本课题组前期的研究基础^[13]。将各组小鼠左肺于4%多聚甲醛中固定48 h，梯度乙醇脱水后石蜡包埋，连续切片(厚4 μm)，每组随机选取12只小鼠，每个肺组织选取3张连续切片。5%BSA封闭60 min，分别用抗CC16小鼠来源的单克隆抗体(1:100) 4℃孵育12 h，抗小鼠荧光二抗AF488(1:500)室温避光孵育50 min，DAPI室温避光孵育10 min，封片后在Nikon C2 Plus激光共聚焦显微镜下拍摄图像。选取气管分出的一级支气管为主支气管，并在相同位置采集图像；细支气管图像选取标准参考Watson等^[14]对细支气管测量的研究数据。分别于200倍镜下采集5个主支气管横切面图像，400倍镜下采集6个细支气管横切面图像，600倍镜下采集主支气管及细支气管纵切面图像。使用NIS Element Viewer 5.20软件计算

CC16相对于DAPI的平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI)作为反映气道Club细胞表达丰度的指标并进行组间比较^[13]。

1.4 流式细胞术检测气道上皮中Club细胞百分比及增殖能力 参照本课题组前期的研究方法^[15], 麻醉处死小鼠后取出肺组织, 剪碎后于37℃条件下以0.1%胶原蛋白酶I孵育15 min, 然后置于不锈钢筛网(300目)上剪碎, 将培养皿中获取的肺组织单细胞悬液于4℃下700×g离心5 min, 去上清, 加入1 ml红细胞裂解液重悬并静置2 min, PBS洗2次, 4℃下700×g离心5 min, 去上清, 使用含2%胎牛血清的Hank's平衡盐溶液制成单细胞悬液。细胞表面染色: 参照Li等^[16]的方法, 加入一抗CD31-Biotin(1:40), CD34-Biotin(1:20), CD45-Biotin(1:67), EpCAM-FITC(1:100), Scal-1-APC(1:100)和CD24-PE(1:25)于冰上孵育40 min; Hank's平衡盐溶液终止反应, 加入二抗streptavidin-APC-Cy7(1:100)冰上孵育40 min。胞内染色: 将细胞用固定剂固定30 min, 4℃下700×g离心5 min, 去上清, 加入通透液常温通透5 min, 4℃下700×g离心5 min, 去上清后加入抗体Ki-67-PE-Cy7(1:200)冰上孵育30 min。Hank's平衡盐溶液终止反应, 流式细胞仪上机检测。CD31⁻CD34⁻CD45⁻EpCAM⁺Scal-1⁺CD24^{low}鉴定为Club细胞^[16]; Ki-67是一种与细胞增殖相关的核抗原^[17], 可将Ki-67⁺Club细胞/Club细胞的比值作为指标比较各组Club细胞

增殖能力的差异。

1.5 ELISA法检测小鼠CC16表达水平 取储存于-80℃的各组小鼠肺匀浆上清、血清, 采用ELISA法检测小鼠CC16的表达水平, 实验步骤按试剂盒说明书进行。

1.6 统计学处理 采用GraphPad Prim 8.0软件进行统计分析。计量资料符合正态分布, 以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用Games-Howell检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同时期BALB/c小鼠各级气道Club细胞分布及表达丰度比较 免疫荧光染色结果显示, 新生儿、幼年期和成年期小鼠主支气管Club细胞在气道上皮的表达位置参差不齐(图1A), 而细支气管Club细胞在气道上皮上的分布形态平坦且均匀(图1B)。进一步分析发现, 随鼠龄增长, 新生儿、幼年期和成年期主支气管Club细胞表达丰度逐渐下降, MFI分别为 0.73 ± 0.12 、 0.43 ± 0.05 、 0.26 ± 0.08 , 差异有统计学意义($P<0.05$)(图2A); 此外, 随鼠龄增长, 新生儿、幼年期和成年期细支气管Club细胞表达丰度逐渐增加, MFI分别为 0.49 ± 0.07 、 0.73 ± 0.08 、 1.02 ± 0.19 , 差异有统计学意义($P<0.05$)(图2B)。

2.2 不同时期BALB/c小鼠气道上皮中Club细胞百分比及增殖能力比较 流式细胞术检测结果

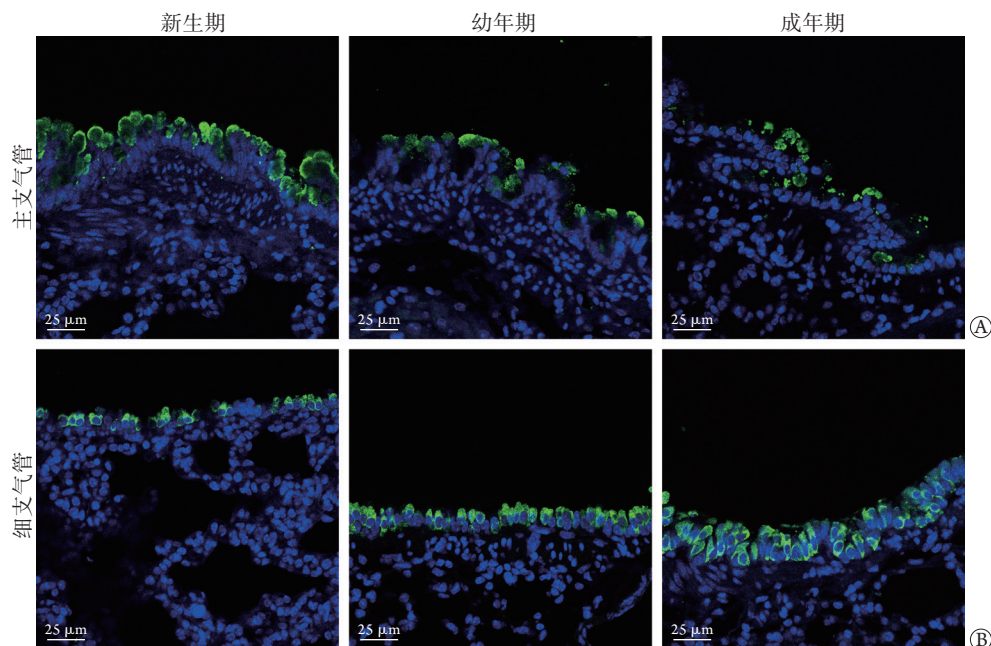


图1 不同鼠龄BALB/c小鼠主支气管(A)、细支气管(B)Club细胞的分布(免疫荧光染色)

Fig.1 Comparison of Club cells distribution in main bronchus (A), bronchioles (B) in different ages of BALB/c mice model (Immunofluorescence staining)

绿色荧光. CC16; 蓝色荧光. DAPI

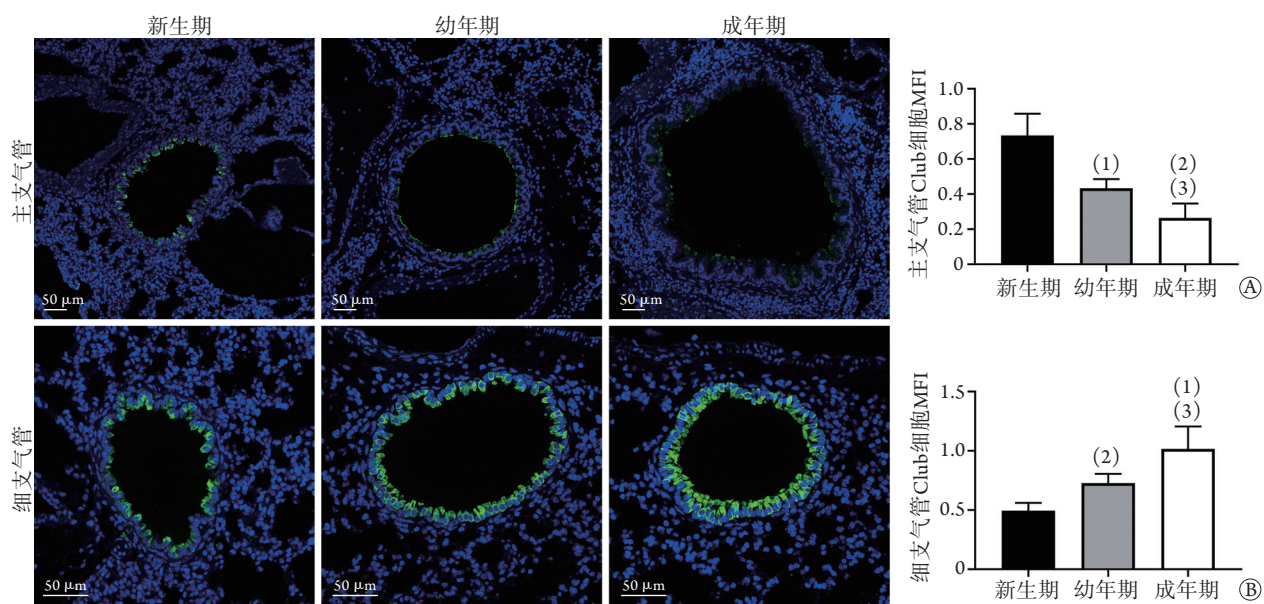


图2 不同鼠龄BALB/c小鼠主支气管(A, n=5)、细支气管(B, n=6)Club细胞的表达丰度比较(免疫荧光染色)

Fig.2 Expression abundance of Club cells in main bronchus (A, n=5), bronchioles (B, n=6) in different ages of BALB/c mice model (Immunofluorescence staining)

MFI. 平均荧光强度; 绿色荧光. CC16; 蓝色荧光. DAPI; 与新生儿比较, (1) $P < 0.01$, (2) $P < 0.001$; 与幼年期比较, (3) $P < 0.05$

显示, 新生儿、幼年期和成年期Club细胞占气道上皮细胞的百分比分别为(9.49% ± 2.38%)、(15.45% ± 3.86%)、(17.23% ± 4.82%), 与新生儿比较, 幼年期和成年期气道上皮Club细胞百分比明显增加($P = 0.028$, $P = 0.022$), 而幼年期与成年期比较差异无统计学意义($P = 0.765$)(图3A); 新生儿、幼年期和成年期增殖性Club细胞的占比分别为(6.12% ± 1.89%)、(2.36% ± 0.98%)、

(1.94% ± 0.75%), 幼年期和成年期Club细胞的增殖能力明显低于新生儿($P = 0.007$, $P = 0.005$), 而幼年期与成年期比较差异无统计学意义($P = 0.690$)(图3B)。

2.3 不同时期BALB/c小鼠肺组织匀浆、血清CC16表达水平比较 ELISA检测结果显示, 随鼠龄增长, 新生儿、幼年期和成年期肺组织匀浆血清CC16表达水平分别为(64.02 ± 12.70) ng/ml、

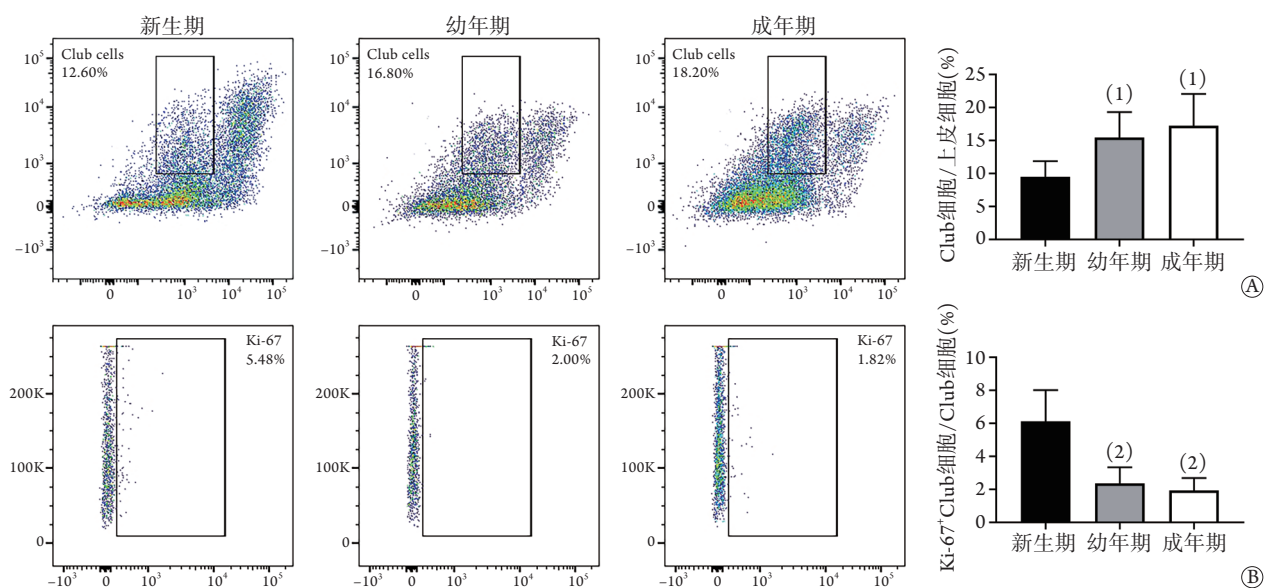


图3 流式细胞仪检测不同时期BALB/c小鼠气道上皮中Club细胞的占比(A)和增殖能力(B)(n=6)

Fig.3 Proportion (A) and proliferation (B) of Club cells in airway epithelium in different ages of BALB/c mice model (Flow cytometry, n=6)

与新生儿比较, (1) $P < 0.05$, (2) $P < 0.01$

(89.31 ± 5.41) ng/ml、(95.74 ± 3.31) ng/ml, 与新生期比较, 幼年期和成年期肺匀浆上清CC16表达水平明显升高($P=0.008$, $P=0.003$), 而幼年期与成年期比较差异无统计学意义($P=0.085$)(图4A); 此外, 随鼠龄增长, 新生期、幼年期和成年期

血清CC16表达水平分别为(13.91 ± 3.36) ng/ml、(25.77 ± 4.68) ng/ml、(28.02 ± 3.99) ng/ml, 与新生期比较, 幼年期和成年期血清CC16表达水平明显升高($P=0.002$, $P<0.001$), 而幼年期与成年期比较差异无统计学意义($P=0.657$)(图4B)。

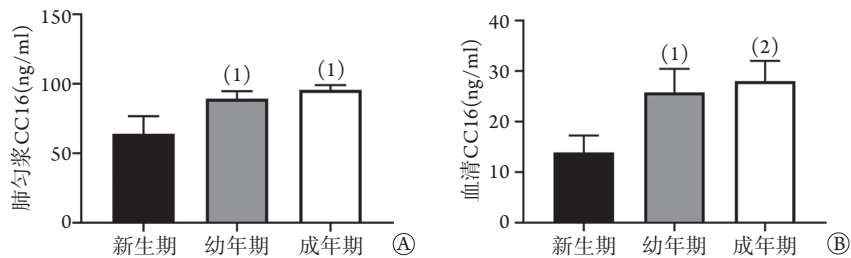


图4 不同时期BALB/c小鼠肺组织匀浆(A)和血清(B)CC16表达水平比较(ELISA)($n=6$)

Fig. 4 Expressive levels of CC16 in lung homogenates (A) and serum (B) in different ages of BALB/c mice model (ELISA) ($n=6$) 与新生期比较, (1) $P<0.01$, (2) $P<0.001$

3 讨 论

气道上皮损伤是多种肺部疾病发病的重要机制^[18-20]。Club细胞是一种异质性、多功能的气道上皮细胞, 可作为干细胞/祖细胞及时有效地参与气道上皮的损伤修复^[6]。有研究发现, 早期CC16低表达与后期肺功能下降明显相关^[10], 提示生命早期Club细胞的正常表达对维持后期气道功能稳定具有重要作用。目前对出生后不同时期Club细胞的生物学特征变化知之甚少, 因此, 本研究对生后不同鼠龄段的小鼠气道Club细胞进行分析, 结果发现出生后Club细胞表达丰度不断增加的主要部位是小气道, 而新生期则是气道Club细胞增殖及CC16表达增加的关键时期。

然而, 本研究发现, 大气道Club细胞的发育特征与小气道截然不同。Hogan等^[21]发现, 小鼠大气道为假复层纤毛柱状上皮, 而小气道上皮由简单细胞排列构成, 提示大、小气道Club细胞分布形态不同与相应气道细胞组成的差异有关。主支气管是气管分出的一级支气管, 本研究发现主支气管Club细胞表达丰度随鼠龄增长逐渐下降, 与Rawlins等^[22]发现气管Club细胞在上皮细胞中的占比随鼠龄增长而下降一致, 提示Club细胞占比或表达丰度随鼠龄增长而下降可能是大气道的共同特点。本研究还发现, 随鼠龄增长, 细支气管Club细胞表达丰度增加, 与Karnati等^[11]报道小气道Club细胞表达丰度的发育变化结果一致。此外, 本研究发现, 新生期Club细胞增殖能力最强, Club细胞在气道上皮中的占比从新生期至幼年期明显升高。Karnati等^[11]发现, 小鼠Club细胞平均体积在生后保持不变, 但Club细胞总体积和总数量在出生后早期明显增加,

提示Club细胞在新生期处于快速发育阶段。CC16作为气道含量最丰富的分泌蛋白, 主要由Club细胞分泌产生, 对维持气道上皮完整性具有重要作用^[5]。本研究发现, 小鼠肺部、血清CC16水平在生后早期明显升高, 可能与小鼠Club细胞的胞内分泌颗粒数量及体积仅在新生期明显增多有关^[11], 提示新生期是CC16水平增长的关键时期。

人类肺的发育过程与小鼠相似, 均需经历气道的分支和延伸生长^[23], 其中包括各类气道上皮细胞的发育与成熟。小气道Club细胞结构或功能损伤与哮喘、COPD等多种肺部疾病的发生密切相关^[19,24-25]。了解小鼠大、小气道Club细胞的不同发育特征, 不仅可为人体Club细胞的气道分布规律提供解释, 也可为Club细胞功能失调相关疾病的机制研究提供实验平台。有研究发现, 儿童早期呼吸道感染或环境暴露可能导致成年后的慢性肺部疾病^[26]。流行病学及动物实验研究发现, 新生期感染肺炎链球菌、呼吸道合胞病毒或过敏原暴露可促进后期气道高反应性和(或)哮喘的发生^[27-28], 其机制与气道上皮损伤密不可分^[29-30], 但这些不利因素是否导致Club细胞结构或功能损伤, 从而参与疾病的发生发展尚需进一步研究明确。

综上所述, 本研究对不同鼠龄段小鼠气道Club细胞的表达、增殖及分泌功能进行分析, 补充了肺发育过程中Club细胞的生物学特征变化。但本研究仍存在一些局限性: 仅分析了小鼠主、细支气管两个典型支气管解剖部位的Club细胞, 未分析支气管树其他部位的Club细胞分布及表达特征, 也未研究Club细胞的其他生物学特性如干细胞/祖细胞功能等。因此, 后续应进一步加深对气道Club细胞多种生物学特征的研究, 有望为发育期Club细胞结构

和(或)功能异常相关疾病提供新的病因机制和治疗方向。

【参考文献】

- [1] Leiva-Juárez MM, Kolls JK, Evans SE. Lung epithelial cells: therapeutically inducible effectors of antimicrobial defense[J]. *Mucosal Immunol*, 2018, 11(1): 21-34.
- [2] Boers JE, Ambergen AW, Thunnissen FB. Number and proliferation of Clara cells in normal human airway epithelium[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999, 159(5 Pt 1): 1585-1591.
- [3] Zaragosi LE, Deprez M, Barbry P. Using single-cell RNA sequencing to unravel cell lineage relationships in the respiratory tract[J]. *Biochem Soc Trans*, 2020, 48(1): 327-336.
- [4] Basil MC, Katzen J, Engler AE, 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.
- [5] Almutashiri S, Zhu Y, Han Y, et al. Club cell secreted protein CC16: potential applications in prognosis and therapy for pulmonary diseases[J]. *J Clin Med*, 2020, 9(12): 4039.
- [6] Davis JD, Wypych TP. Cellular and functional heterogeneity of the airway epithelium[J]. *Mucosal Immunol*, 2021, 14(5): 978-990.
- [7] Hough KP, Curtiss ML, Blain TJ, et al. Airway remodeling in asthma[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2020, 7: 191.
- [8] de Rose V, Molloy K, Gohy S, et al. Airway epithelium dysfunction in cystic fibrosis and COPD[J]. *Mediators Inflamm*, 2018, 2018: 1309746.
- [9] Zhai J, Insel M, Addison KJ, et al. Club cell secretory protein deficiency leads to altered lung function[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2019, 199(3): 302-312.
- [10] Guerra S, Halonen M, Vasquez MM, et al. Relation between circulating CC16 concentrations, lung function, and development of chronic obstructive pulmonary disease across the lifespan: a prospective study[J]. *Lancet Respir Med*, 2015, 3(8): 613-620.
- [11] Karnati S, Graulich T, Oruqaj G, et al. Postnatal development of the bronchiolar club cells of distal airways in the mouse lung: stereological and molecular biological studies[J]. *Cell Tissue Res*, 2016, 364(3): 543-557.
- [12] Chen YX. Effect and mechanism of streptococcus pneumonia on susceptibility to asthma in mice of different ages[D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2018. [陈云秀. 不同时期肺炎链球菌感染对过敏性哮喘的影响及机制探讨[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2018.]
- [13] Chen S, Yu G, Xie J, et al. High-mobility group box-1 protein from CC10+ club cells promotes type 2 response in the later stage of respiratory syncytial virus infection[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2019, 316(1): L280-L290.
- [14] Watson JK, Sanders P, Dunmore R, et al. Distal lung epithelial progenitor cell function declines with age[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 10490.
- [15] Chen YX, Tian YL, Tian XY, et al. The effects of infantile pneumonia on risk of asthma in mice[J]. *Immunol J*, 2017, 33(10): 872-878. [陈云秀, 田永露, 田小银, 等. 幼年时期肺炎链球菌肺炎对哮喘形成的影响[J]. 免疫学杂志, 2017, 33(10): 872-878.]
- [16] Li K, Li M, Li W, et al. Airway epithelial regeneration requires autophagy and glucose metabolism[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(12): 875.
- [17] Sun X, Kaufman PD. Ki-67: more than a proliferation marker[J]. *Chromosoma*, 2018, 127(2): 175-186.
- [18] Reynaud P, Ahmed E, Serre I, et al. Club cell loss as a feature of bronchiolization in ILD[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 630096.
- [19] Zhu L, An L, Ran D, et al. The club cell marker SCGB1A1 downstream of FOXA2 is reduced in asthma[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2019, 60(6): 695-704.
- [20] Prince OA, Krunkosky TM, Sheppard ES, et al. Modelling persistent *Mycoplasma pneumoniae* infection of human airway epithelium[J]. *Cell Microbiol*, 2018, 20(3): 10.1111/cmi.12810.
- [21] Hogan BL, Barkauskas CE, Chapman HA, 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): 123-138.
- [22] Rawlins EL, Okubo T, Xue Y, et al. The role of Scgb1a1⁺ Clara cells in the long-term maintenance and repair of lung airway, but not alveolar, epithelium[J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(6): 525-534.
- [23] Metzger RJ, Klein OD, Martin GR, et al. The branching programme of mouse lung development[J]. *Nature*, 2008, 453(7196): 745-750.
- [24] Bommart S, Marin G, Molinari N, et al. Club cell secretory protein serum concentration is a surrogate marker of small-airway involvement in asthmatic patients[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2017, 140(2): 581-584.
- [25] Milne S, Li X, Hernandez Cordero AI, et al. Protective effect of club cell secretory protein (CC-16) on COPD risk and progression: a Mendelian randomisation study[J]. *Thorax*, 2020, 75(11): 934-943.
- [26] Zar HJ, Ferkol TW. The global burden of respiratory disease-impact on child health[J]. *Pediatr Pulmonol*, 2014, 49(5): 430-434.
- [27] Vissing NH, Chawes BL, Bisgaard H. Increased risk of pneumonia and bronchiolitis after bacterial colonization of the airways as neonates[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2013, 188(10): 1246-1252.
- [28] Siegle JS, Hansbro N, Herbert C, et al. Early-life viral infection and allergen exposure interact to induce an asthmatic phenotype in mice[J]. *Respir Res*, 2010, 11(1): 14.
- [29] Wu Y, Kong X, Li QY, et al. Effects of neonatal *Streptococcus pneumoniae* pneumonia on airway epithelial injury of mice[J]. *Med J Chin PLA*, 2019, 44(11): 919-924. [吴毅, 孔潇, 李沁原, 等. 新生儿小鼠肺炎链球菌肺炎对气道上皮损伤的影响[J]. 解放军医学杂志, 2019, 44(11): 919-924.]
- [30] Jartti T, Gern JE. Role of viral infections in the development and exacerbation of asthma in children[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2017, 140(4): 895-906.

(责任编辑: 张小利)