DOI:10.16016/j.2097-0927.202107088

盘状结构域受体 1 对实验性结肠炎小鼠肠道炎症及纤维化的影响

熊 彬[1],李小丽[1],宋飞雪[1],李 屹[2],韩悌云[3],张德奎[1,3] 730030 兰州,兰州大学第二医院:肿瘤内科[1],消化疾病重点实验室[3];730070 兰州,兰州大学口腔医学院[2]

[**摘要**] **目的** 探究盘状结构域受体 1(discoidin domain receptors, DDR1)在慢性结肠炎小鼠肠道炎症及肠纤维化中的功能。**方法** 针对 DDR1 基因 exon4 设计并合成 gRNA 序列,与编码 Cas9 的 mRNA 混合显微注射入 C57BL/6 小鼠受精卵内,构建 DDR1 基因突变小鼠。选择 F4 代基因敲除纯合子小鼠($DDR1^{-/-}$)和野生型 C57BL/6 小鼠,通过葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导慢性结肠炎模型。比较两组小鼠疾病活动指数(DAI)、体质量、结肠长度及组织病理学变化。ELISA 法检测外周血细胞因子的含量,Western blot 法检测小鼠结肠纤维化相关蛋白表达。**结果** PCR 法检测结果显示利用 CRISPR/Cas9 技术成功构建 $DDR1^{-/-}$小鼠;循环饮用 DSS 后,与野生型小鼠相比,$DDR1^{-/-}$小鼠体质量下降减缓,DAI 评分及肠组织病理学评分降低,结肠短缩减轻(5.81±0.11 cm *vs* 5.19±0.05 cm,$P<0.05$);血清 IL-1β、TNF-α 及 TGF-β 水平下调($P<0.01$);Masson 染色胶原容积评分显示肠纤维化减轻(DSS-WT *vs* DSS-DDR1,41.43±0.08 cm *vs* 21.37±0.07 cm,$P<0.01$);肠组织 TGF-β、α-SMA 和 COL1A1 的蛋白表达下降。**结论** DDR1 参与慢性结肠炎的发生,敲除 DDR1 基因可减轻慢性结肠炎肠道炎症及纤维化的症状和疾病进程。

[**关键词**] 盘状结构域受体 1;CRISPR/Cas9 技术;基因敲除;结肠炎;肠纤维化
[**中图法分类号**] R341;R394.3;R574.62 [**文献标志码**] A

Effects of discoidin domain receptor 1 on intestinal inflammation and fibrosis in experimental colitis mice

XIONG Bin[1], LI Xiaoli[1], SONG Feixue[1], LI Yi[2], HAN Tiyun[3], ZHANG Dekui[1,3] [1]Department of Oncology, [3]Key Laboratory of Digestive Diseases, Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu Province, 730030; [2]School of Stomatology, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu Province, 730070, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the function of discoidin domain receptor 1 (DDR1) in intestinal inflammation and fibrosis in mice with chronic colitis. **Methods** A 20 bp gRNA sequence targeting exon4 of DDR1 gene was designed and synthesized, and subsequently microinjected into the fertilized eggs of C57BL/6 mice after being mixed with Cas9 mRNA in order to generate DDR1 mutant mice. The F4-generation homozygous mice ($DDR1^{-/-}$) as well as wild-type C57BL/6 mice (WT) were used to induce chronic colitis model by being given 2.5% dextran sodium sulfate (DSS) in drinking water. Disease activity index (DAI), body weight, colon length and histopathological changes were compared between the 2 groups. The contents of pro-inflammatory cytokines in peripheral blood were detected by ELISA. The severity of intestinal fibrosis and the expression of fibrosis related proteins were observed by Masson staining and Western blotting, respectively. **Results** PCR results identified that $DDR1^{-/-}$ mutant mice were successfully generated using CRISPR/Cas9 technology. As compared with the WT group, the $DDR1^{-/-}$ mice exhibited slower body weight loss, lower DAI

[**基金项目**] 甘肃省科技计划项目(18JR3RA321);兰州市城关区科技计划项目(2018SHFZ0043);兰州大学第二医院萃英科技创新计划项目(CY2017-QN10)

[**通信作者**] 张德奎,E-mail:sczdk1972@163.com

2097-0927/Copyright © 2022,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

scores and intestinal histopathology scores, and mild colon shortening (5.81±0.11 *vs* 5.19±0.05 cm, $P<0.05$) after DSS drinking. The serum levels of IL-1β, TNF-α and TGF-β were decreased ($P<0.01$), with down-regulated expression of TGF-β, α-SMA and COL1A1 proteins in the colon tissues of DDR1$^{-/-}$ mice. Masson staining displayed that collagen volume fraction was higher in the WT group than the DDR1$^{-/-}$ mice (41.43±0.08 *vs* 21.37±0.07 cm, $P<0.01$). **Conclusion** DDR1 is probably involved in the development of chronic colitis, and DDR1 deletion may mitigate the symptoms and disease progression of chronic intestinal inflammation and fibrosis.

[**Key words**] discoidin domain receptor 1; CRISPR/Cas 9 technology; gene knockout; colitis; intestinal fibrosis

Supported by the Project of Science and Technology Plan of Gansu Province (18JR3RA321), the Tackling Project of Science and Technology Plan of Chengguan District, Lanzhou City (2018SHFZ0043), and the Project of Cuiying Science and Technology Plan of Lanzhou University Second Hospital (CY2017-QN10).
Corresponding author: ZHANG Dekui, E-mail: sczdk1972@163.com

炎性肠病(inflammatory bowel disease,IBD)是一种病因尚不十分清楚的非特异性肠道炎症性疾病。回顾性研究显示[1],我国 IBD 在 10 年间经历了从罕见病到常见病的演变过程,其长期、慢性、反复出现的炎性组织损伤所致的腹痛、腹泻、乏力和消瘦等症状,严重危害着国人的健康。肠道的组织修复和再生过程可促使成纤维细胞、肌成纤维细胞等肠间质细胞增殖,肠壁间胞外基质沉积,肌层过度增生,最终因慢性肠炎引起肠腔狭窄和肠壁顺应性降低[2]。因此,深入研究肠炎及肠纤维化的发病机制将有助于了解炎性肠病的全貌,并探索新的治疗方法。

盘状结构域受体(discoidin domain receptors, DDR)是新型受体型蛋白酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinases, RTKs),因其胞外段含有一个由 155 个氨基酸的圆盘状结构而得名[3],该区与Ⅰ~Ⅲ型胶原结合后,可引起膜受体的活化并调节下游的信号通路[4]。DDRs 包括 DDR1 和 DDR2,其中 DDR1 基因分别位于人 6P21.3 及小鼠 17C 染色体上[5-6]。DDR1 作为细胞外基质的传感器,调节细胞的增殖、迁移、细胞因子分泌和细胞外基质重塑[7]。近年来,GROSS[8] 及 GUERROT[9] 团队分别报道了 DDR1 在肾小球基底膜蛋白的过度合成及小管间质损伤相关肾脏纤维化中的作用,MATSUYAMA 等[10] 证实 DDR1 缺失在慢性肺损伤致肺纤维化中的保护作用。炎性肠病肠纤维化的发生机制与肾脏及肺纤维化有诸多相似之处[2],但 DDR1 在炎性肠病及肠纤维化中的作用少见报道。

CRISPR/Cas9 技术是通过人工设计的 sgRNA 识别目的基因序列,并引导 Cas9 蛋白酶切割特异性基因片段从而达到精准敲除的目的[11]。VOGEL 等[12] 以同源重组的方式,通过 ES 细胞打靶及显微注射的方法成功构建 DDR1 敲除小鼠,该基因突变小鼠的出现推进了 DDR1 在器官纤维化[13-15]、癌症[16-21]、动脉粥样硬化[22] 等多种疾病中的研究。基于 CRISPR/Cas9 技术的便捷和高效性,本研究采用该方法成功构建了 DDR1 基因敲除小鼠,并通过 2.5% 葡聚糖硫酸钠(dextran sodium sulfate, DSS)诱导结肠炎模型,探讨 DDR1 基因在实验性结肠炎小鼠肠道炎症及纤维化中的作用,为研究炎性肠病肠纤维化的发病机制奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 C57BL/6 小鼠和 DDR1$^{-/-}$ 小鼠由上海南方模式生物科技股份有限公司构建[SCXK(沪)2017-0010]。小鼠饲养于兰州大学第二医院 SPF 实验动物中心。动物实验经兰州大学第二医院实验动物管理委员会及动物伦理委员会审批通过(D2019-167)。

1.1.2 主要试剂 Cas9 表达载体、pX-T7-sgRNA 质粒由上海南方模式生物科技股份有限公司构建。T7 体外转录试剂购自 Thermo Fisher 公司,PCR 试剂、感受态细胞、限制性内切酶、DNA 聚合酶和 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司,质粒提取试剂盒购自 Qiagen 公司,1 kb DNA marker(SM0311)购自 Thermo 公司,葡聚糖硫酸钠(MW: 36000-50000)购自 Yeasen 公司。Western blot 所需的 DDR1、TGF-β、α-SMA、COL1A1 及 β-actin 抗体(均为 Rabbit mAb)购自 Cell Signaling Technology 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 gRNA 设计及表达载体构建 针对 C57BL/6 小鼠 DDR1 基因的 exon4 (http://asia.ensembl.org/Mus_musculus/Gene/Summary? g = ENSMUSG00000003534; *r* = 17: 35 681 567-35 704 621)设计 20 bp 的 gRNA 核心序列,敲除转录本为 Ddr1-201(ENSMUST00000003628.12)。

根据 exon4 选择 2 个 sgRNA 靶点(序列见表 1)并合成相应的 oligo DNA 用于构建 sgRNA 表达载体。设计两对针对 DDR1 基因的 sgRNA(序列见表 2)。将 DDR1 sgRNA 寡核苷酸链退火,酶切 pX-T7-sgRNA 质粒使其线性化后制备感受态大肠杆菌,挑选抗性单克隆提取质粒 DNA,进行测序鉴定并保存正确的阳性克隆。

表 1　sgRNA 序列信息

sgRNA	序列(5′→3′端)
sgRNA1	ACTGTGTAACTTTGTAACTC　AGG
sgRNA2	CTGCCTCTCATCTTCCTGTG　GGG

表 2　寡核苷酸链序列信息

序列名称	序列(5′→3′端)
DDR1mut1 FOR	CAAGGTTACACAGTGAGGCAAGCC
DDR1mut1 REV	GAGTGGGAACTGAGGTTCTCTGG
DDR1mut2 FOR	CCTGAGTTACAAAGTTACACAGT
DDR1mut2 REV	CTGCCTCTCATCTTCCTGTGGGG

1.2.2　体外转录　　将带有 T7 启动子,特异性 gRNA 靶序列和 Chimeric gRNA scaffold 起始部分的载体经酶切线性化,按照 HiScribe™ T7 High Yield RNA Synthesis Kit 试剂盒说明书进行体外合成,Cas9 表达载体经酶切线性化,按照 T7 Ultra Transcription Kit 试剂盒说明书进行体外转录。

1.2.3　F0 代 DDR1$^{-/-}$小鼠获得及鉴定　　将 Cas9 mRNA 和 sgRNA 混合物显微注射入 C57BL/6 小鼠受精卵后移植到假孕雌鼠中获取 F0 代小鼠,F1 代杂合子小鼠由 F0 代 DDR1$^{-/-}$小鼠与 C57BL/6 野生型小鼠交配获得,F2 代 DDR1$^{-/-}$小鼠由 F1 代杂合子自交获得。抽提各代小鼠鼠尾 DNA,PCR 法鉴定其基因型,PCR 反应条件为:94 ℃ 4 min,94 ℃ 20 s,63 ℃ 20 s,72 ℃ 1 min 共 35 个循环。

1.2.4　结肠炎小鼠模型构建　　实验动物分为实验组(DSS-DDR1$^{-/-}$和 DSS-WT 组)及对照组(DDR1$^{-/-}$和 WT 组)。DDR$^{-/-}$雄鼠及同代次 C57BL/6 雄鼠各取 10 只,8~10 周龄,体质量 24~28 g,其中实验组给予 2.5% DSS 溶液自由饮用 7 d,换纯净水饮用 14 d,反复交替共 3 个循环(图 1),对照组小鼠饮用纯净水。

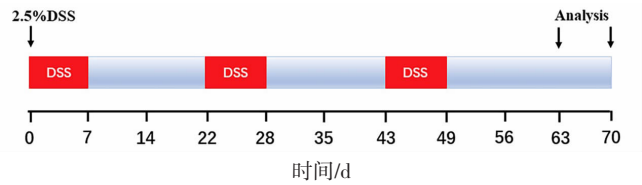


图 1　DSS 诱导实验性结肠炎小鼠模型示意图

按照图 2 构建策略,本项目共获得 6 只 F0 代 DDR1$^{-/-}$小鼠,F1 代杂合子有 5 种基因型,分别为:1 型,缺失 459 bp;2 型,缺失 461 bp;3 型,缺失 479 bp;4 型,缺失 475 bp;5 型,缺失 434 bp。本研究最终选择 2 型用于后续繁育。各代次小鼠鼠尾 DNA 鉴定显示总突变阳性率达到 50%以上。PCR 鉴定分析如图 3 所示,F3 代两窝同代次雄鼠(父 1 和父 2)均为纯合子,因缺失 461 bp,PCR 结果在 159 bp 处呈现一条条带,雌鼠(母 1 和母 2)均为野生型,在 620 bp 处呈现一条条带,两窝子代(F4 代)中的杂合子在 620 bp 和 159 bp 处各呈现一条条带。

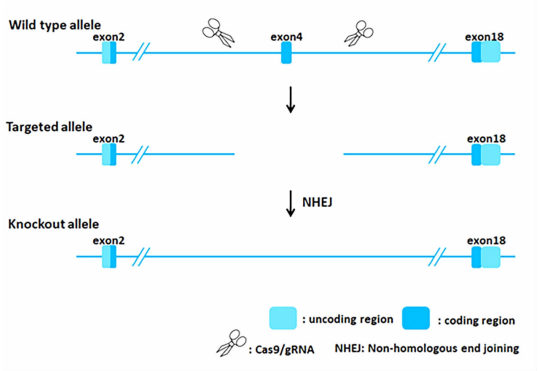
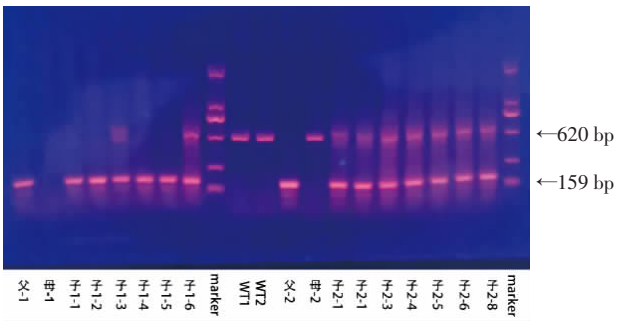


图 2　DDR1 基因敲除策略



父-1,2 为 F_3 代 DDR1$^{-/-}$;母-1,2 为 F_3 代 WT

图 3　DDR1 基因敲除小鼠基因型鉴定

1.2.5　症状观察及组织病理学检测　　造模过程中,各组小鼠每天称量,观察小鼠大便性状、便血情况,进行疾病活动指数(disease activity index, DAI)评分(评分标准见表 3)。第 63 天异氟烷麻醉眼球取血后处死,观察结肠的大体形态并测量回盲部远端至肛门肠段的长度,取 1 cm 近端结肠组织制备石蜡切片,分别行免疫组织化学、HE 及 Masson 染色检查,盲法观察并参照 Cooper 标准[23]进行组织病理学评分(表 4)。

1.2.6　免疫组织化学染色　　切片常规脱腊及抗原修复后,载玻片与 DDR1 抗体(1∶400)4 ℃冰箱孵育过夜,次日孵育二抗,辣根酶标记,DAB 显色及苏木精复

染。每个标本随机选取 3 张切片,每张切片选取 5 个视野,Image J 软件分析 DDR1 的表达强度。

表 3 DAI 评分标准

评分	体质量丢失(%)[a]	大便性状	粪潜血试验
0	<1	量少,正常	阴性
1	1~5	量少,湿粘	阴性
2	6~10	量多,湿粘	潜血阳性
3	11~15	大量,黑便	潜血阳性
4	>15	稀便,鲜血便	潜血强阳性

a: 体质量丢失=(检测时间点体质量-造模前体质量)/造模前体质量×100%

表 4 结肠组织病理学 Cooper 评分标准

组织学表现	得分
炎症程度(I)	
无中性粒细胞浸润	0
中性粒细胞轻度浸润	1
中性粒细胞中度浸润	2
中性粒细胞重度浸润	3
受损深度(E)	
无损伤	0
黏膜层损伤	1
黏膜及黏膜下层损伤	2
透壁性损伤	3
增生(R)	
增生完全	0
增生较完全	1
增生伴隐窝消失	2
表皮不完整	3
不规则修复	4
隐窝损伤(C)	
无损伤	0
基底部 1/3 损伤	1
基底部 2/3 损伤	2
仅有上皮完整	3
隐窝及上皮缺失	4
病灶范围(P)	
1%~25%	1
26%~50%	2
51%~75%	3
76%~100%	4

病理组织学评分=I+E+R+C+P

1.2.7 Masson 染色 肠组织切片(4 μm)先后经二甲苯及梯度乙醇脱蜡后自来水冲洗 1 min,然后苏木精染色 4 min,充分水洗后酸性丽春红品红染色 10 min,充分水洗后予 1%磷钼酸浸染 3 min,2%苯胺蓝 1 min,0.2%冰醋酸处理片刻,再次乙醇脱水,最后二甲苯透明,中性树胶封片。在光镜下逐一观察各组肠纤维化程度,采用 Image J 软件分析并计算胶原容积分数。

1.2.8 ELISA 法检测小鼠血清 IL-1β、TNF-α、TGF-β 的含量 小鼠眼球血分离血清后进行 IL-1β、TNF-α、TGF-β 含量检测。根据 ELISA 试剂盒说明(NEOBIOSCIENCE 公司),用分析 Buffer 按梯度稀释标准品及检测样品,按说明依次加入待检抗体及酶标抗体并按说明洗板,加入底物直至加样孔变为蓝色后用终止液终止反应,读取光密度值 $D(450)$,重复实验 3 次,记录数据并分析。

1.2.9 Western blot 检测 分别取 30 mg 各组小鼠近端结肠,按比例加入裂解缓冲液,离心匀浆取上清液定量至蛋白浓度为 5 μg/μL,各样本上样量为 10 μL,经 SDS-PAGE 电泳后转膜至 PVDF 膜,室温下含 5%脱脂牛奶的 Tris 缓冲液中封闭 1 h,TGF-β、α-SMA、COL1A1 及 β-actin 抗体(1∶1 000)4 ℃孵育过夜,次日晨 TBST 洗膜后,加入二抗(1∶3 000, Proteintech, Inc. China), ECL 试剂 (Amersham Pharmacia Biotech, Japan)检测并使用 Quantity One 软件分析蛋白表达强度。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 26.0(IBM, Armonk, NY, USA)进行统计分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用 Spearman 检验进行 IL-1β、TNF-α、TGF-β 血清水平的统计分析,DAI 疾病活动指数及组织病理评分使用 Wilcoxon 检验进行统计分析。检验水准 $\alpha=0.05$。

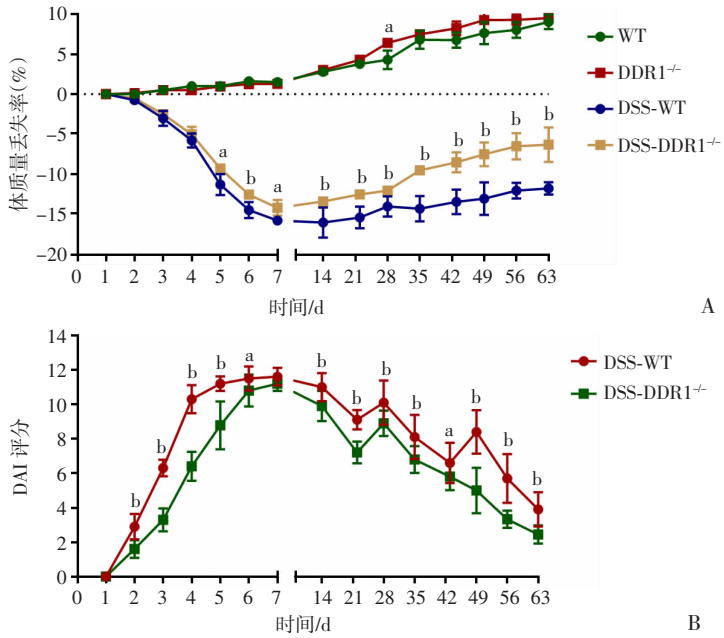
2 结果

2.1 敲除 DDR1 基因减缓结肠炎小鼠体质量及 DAI 变化

经 DSS 诱导后 3 d,实验组及对照组小鼠均出现体质量下降,第 4~5 天体质量急剧下降(图 4A),小鼠活动明显减少,出现不同程度的腹泻、便血,停用 DSS 并换用纯净水后小鼠精神状态渐恢复,第 2~3 循环 DSS 给药后,小鼠腹泻、便血较第 1 循环减轻,体质量下降趋于缓和。对比 WT 组,$DDR1^{-/-}$ 小鼠腹泻、便血症状相对较轻,体质量下降缓和,DAI 评分也低于前者(第 2~9 周,$P<0.01$,图 4B),$DDR1^{-/-}$ 小鼠对同等剂量 DSS 药物诱导的耐受力好于 WT 组。

2.2 敲除 DDR1 基因改善了结肠炎小鼠肠道组织损伤

HE 染色显示(图 5),WT 组肠组织病变区呈现明显的透壁性淋巴细胞浸润及淋巴组织增生,腺体萎缩变形,局部有隐窝脓肿及裂隙性溃疡形成,而 $DDR1^{-/-}$ 小鼠肠道腺体排列相对规整,病变以淋巴组织轻度增生为主,其组织病理评分低于前者(表 5)。结合免疫组织化学染色检测,组织病理评分高者 DDR1 呈现高表达($P<0.01$,图 6),DDR1 表达水平与肠道病变严重程度呈正相关。



a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与对照组细胞比较

图 4 DSS 诱导前后小鼠体质量丢失率及 DAI 比较

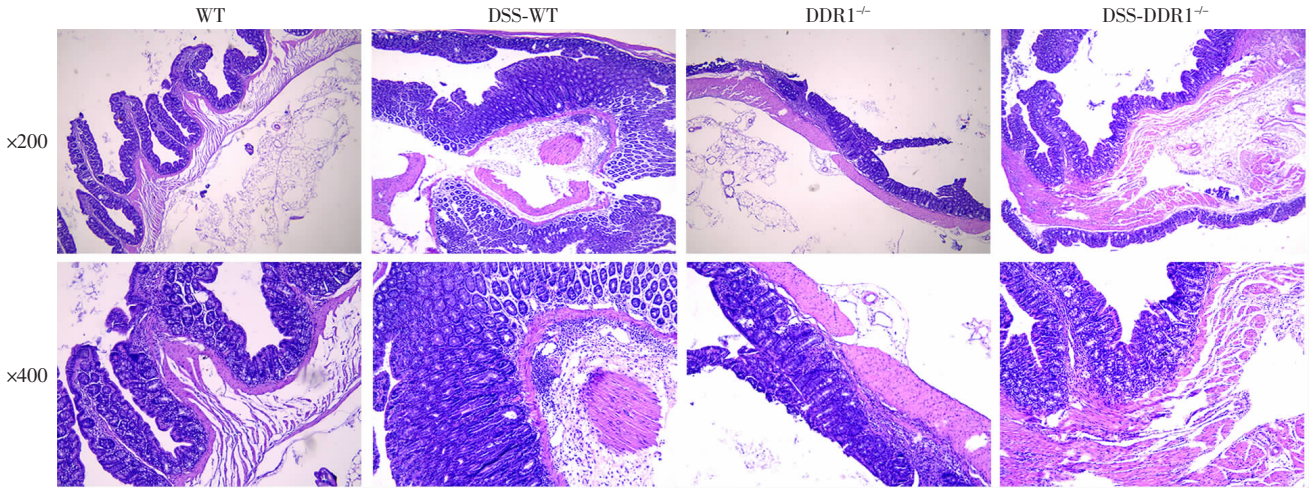
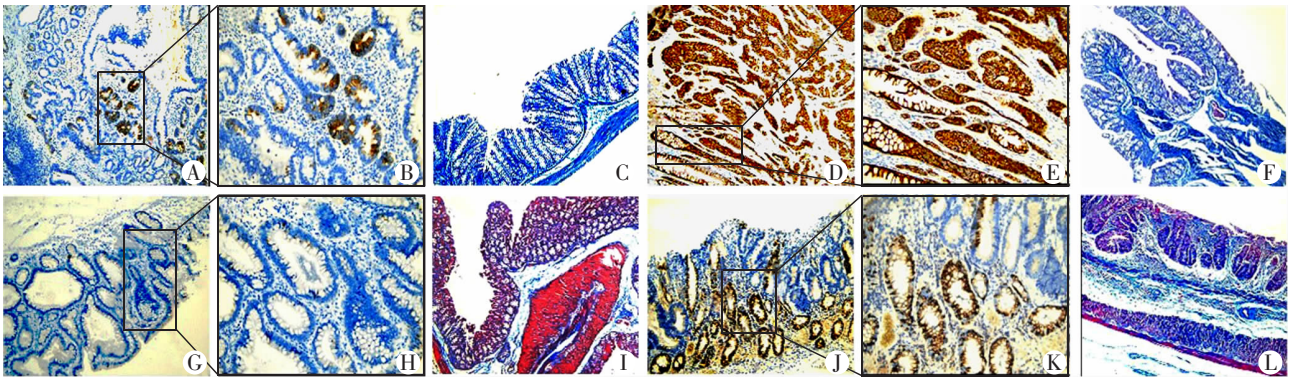


图 5 DSS 诱导前后小鼠结肠组织 HE 染色观察



A,B:DDR1 在 WT 小鼠肠组织中的免疫组织化学染色;C:WT 小鼠 Masson 染色;D,E:DDR1 在 DSS 诱导后 WT 小鼠肠组织中的免疫组织化学染色;F:DSS-WT 小鼠 Masson 染色;G,H:DDR1 在 $DDR1^{-/-}$ 小鼠肠组织中的免疫组织化学染色;I:$DDR1^{-/-}$ 小鼠 Masson 染色;J,K:DDR1 在 DSS 诱导后 $DDR1^{-/-}$ 小鼠肠组织中的免疫组织化学染色;L:DSS-$DDR1^{-/-}$ 小鼠 Masson 染色

图 6 DSS 诱导前后各组小鼠结肠 DDR1 表达及 Masson 染色比较

表 5　结肠组织病理学 Cooper 评分　($\bar{x}\pm s$)

组别	n	评分
WT	10	1.40±0.52
DSS-WT	9	16.80±0.42[a]
DDR1$^{-/-}$	10	1.20±0.44
DSS-DDR1$^{-/-}$	9	11.80±0.63

a: P<0.01,与 DSS-DDR1$^{-/-}$比较

2.3　敲除 DDR1 基因下调了结肠炎小鼠外周血促炎因子的释放

本研究进一步通过 ELISA 法分析实验组及对照组小鼠外周血促炎因子的含量变化,发现造模前 WT 组小鼠血清 IL-1β 及 TNF-α 含量 DDR1$^{-/-}$小鼠无明显差异,循环 DSS 给药后,各组结肠炎模型小鼠的血清 IL-1β、TNF-α 及 TGF-β 含量均明显上升,但对比 WT 组,DDR1$^{-/-}$小鼠的 IL-1β、TNF-α 提升水平较低(P<0.01,图 7)。

2.4　敲除 DDR1 基因减轻了结肠炎小鼠结肠短缩及肠纤维化

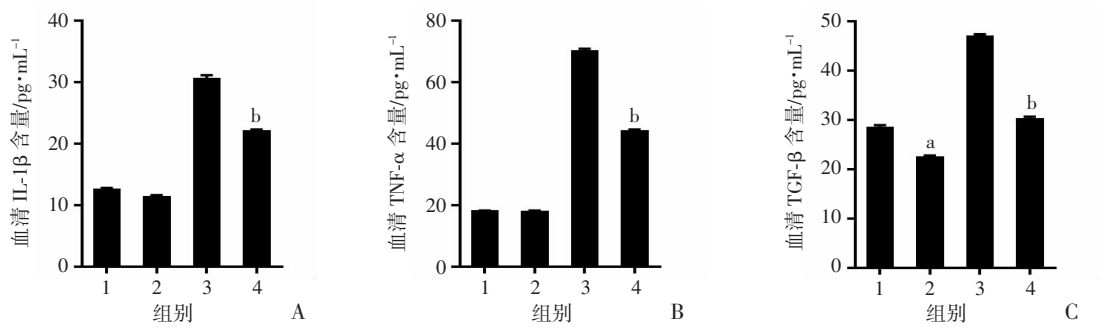
不同于野生型小鼠,DDR1$^{-/-}$小鼠肠壁增厚且缩短,但 DSS 诱导后 WT 组小鼠肠段短缩更加明显(图 8),且伴肠腔狭窄及肠壁僵硬,其造模前后结肠长度差异有统计学意义(P<0.01)。Masson 染色显示(图 6),WT 模型组黏膜及黏膜下层中代表纤维组织增生的蓝染区明显增多,并且在肌层黏膜和固有肌层中,也检测到条索状蓝染区域,其胶原容积评分是 DDR1$^{-/-}$组的近 1 倍(P<0.01)。WT 组模型小鼠结肠组织的 TGF-β、α-SMA、COL1A1 表达量增加,其中 α-SMA、COL1A1 明显高于 DDR1$^{-/-}$组小鼠(P<0.01,图 9)。

表 6　DSS 诱导前后小鼠 Masson 染色胶原容积评分　(%, $\bar{x}\pm s$)

组别	n	胶原容积分数
WT	10	18.27±0.07
DSS-WT	9	41.43±0.08[a]
DDR1$^{-/-}$	10	13.31±0.06
DSS-DDR1$^{-/-}$	9	21.37±0.07

胶原容积分数=胶原阳性面积/视野组织总面积×100%;

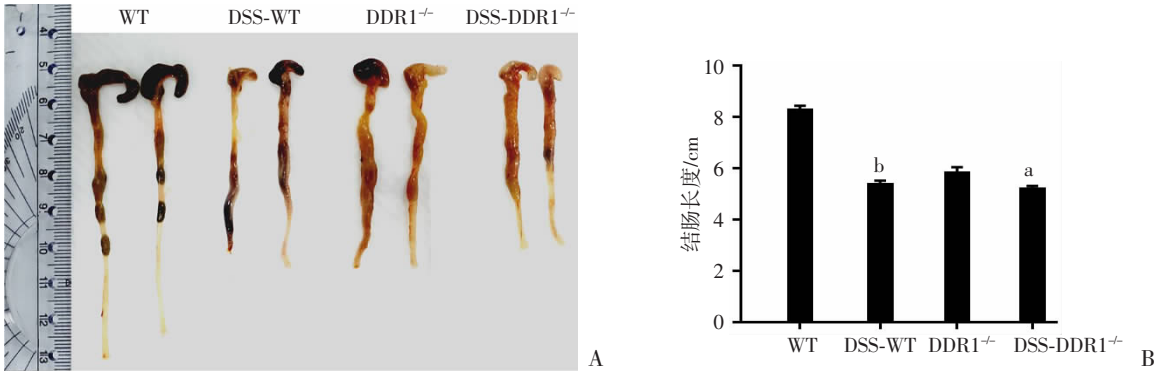
a: P<0.01, 与 DSS-DDR1$^{-/-}$比较



1: WT; 2: DSS-WT; 3: DDR1$^{-/-}$; 4: DSS-DDR1$^{-/-}$

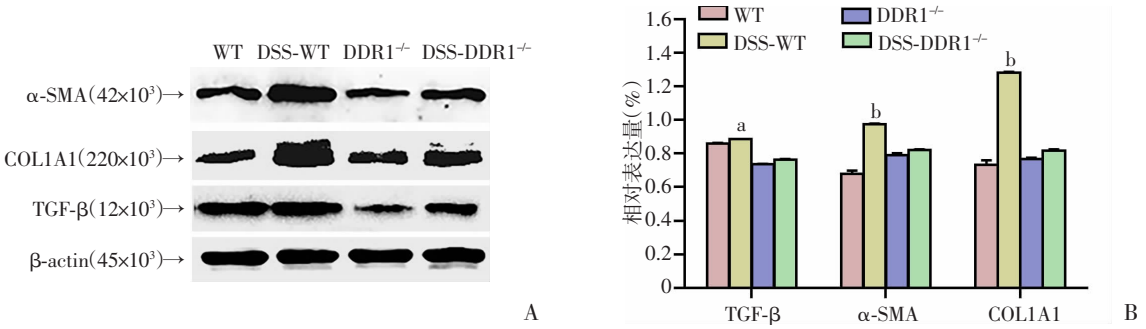
A:血清 IL-1β 含量;B:血清 TNF-α 含量;C:血清 TGF-β 含量;a: P<0.05, 与 WT 组比较; b: P<0.01,与 DDR1$^{-/-}$组比较

图 7　DSS 诱导前后 IL-1β、TNF-α 及 TGF-β 血清水平变化



A:DSS 诱导前后小鼠结肠图;B:DSS 诱导前后小鼠结肠长度比较;a: P<0.05, b: P<0.01, 与对照组比较

图 8　DSS 诱导前后各组小鼠结肠长度比较



A:Western blot 检测结果;B:TGF-β、α-SMA 及 COL1A1 蛋白相对表达量;a:$P<0.05$, b:$P<0.01$,与对照组比较

图 9 DSS 诱导前后 TGF-β、α-SMA 及 COL1A1 蛋白水平变化

3 讨论

早在 1997 年有学者发现 DDR 作为唯一可使多种胶原活化的 RTK,其与在数分钟内就促使肽类生长因子激活的 RTKs 家族其他成员不同,它与胶原结合后的磷酸化过程异常缓慢。从 DDR1 对冠状动脉粥样硬化[22-24]、肺纤维化[25-26]、肾纤维化[8-9,14]等疾病的影响及分子机制研究中,推测 DDR1 的这种缓慢激活动力可能在基质蛋白过度沉积和重塑不良所致的脏器纤维化中起着关键作用。但 DDR1 在慢性肠炎及肠纤维化这一炎症-纤维化序列演进中的作用仍不清楚。

本研究利用 CRISPR/Cas9 技术成功构建了 DDR1 基因敲除小鼠,总突变阳性率达到 50%以上。对比 VOGEL 等[12]构建 DDR1 敲除小鼠时的方法,该技术不仅省略了胚胎干细胞打靶的步骤,而且降低了成本,效率也更高。VOGEL 团队发现 $DDR1^{-/-}$ 母鼠存在哺乳障碍,并进一步证实大量胞外基质沉积于乳腺导管从而影响了该突变小鼠的泌乳功能。此外,DDR1 基因在多篇文献中因促使胞外基质重塑引起脏器纤维化的报道使得我们更感兴趣其在炎性肠病肠纤维化中的作用。本研究发现 DSS 诱导的 $DDR1^{-/-}$ 慢性肠炎小鼠不仅体质量下降较 WT 组缓和,包括体质量丢失率、腹泻及便血程度在内的疾病活动指数也更低,这一现象表明 DDR1 可能参与了炎性肠病的发生、发展过程。而进一步的实验结果显示,WT 模型小鼠肠组织 DDR1 表达增加,组织病理评分高于 $DDR1^{-/-}$ 组小鼠,同时血清 IL-1β、TNF-α 及 TGF-β 含量也明显上升。由此,我们认为 DDR1 表达水平与肠道组织炎症损伤密切相关,抑制 DDR1 可明显改善慢性结肠炎的相关症状。

既往研究表明,DDR1 在人类白细胞中普遍表达,其过表达可增加单核细胞系 THP1[27]及 T 细胞在 3D 胶原中的迁移[28]。在炎性肠病中,炎症细胞这种跨内皮的迁移不仅对肠壁黏膜屏障形成持续性刺激,而且会增加腔内抗原的暴露,为腔内微生物的侵入提供门户[29]。此外,在动脉粥样硬化[30]、肺炎[10,31]及慢性肾炎[32]等疾病中,DDR1 可通过胶原和层粘连蛋白为主的胞外基质网络调节再平衡炎症细胞在组织内的迁移和持久性,从而加速了靶器官的慢性纤维化进程。正如几种常见的脏器纤维化,炎性肠病肠纤维化也正是因上述的炎性损伤加剧了胞外基质的过度沉积,黏膜肌层增厚这一共性病变所致[33-34]。Masson 染色显示,WT 模型鼠胶原容积评分为 $DDR1^{-/-}$ 小鼠的近 1 倍,DSS 循环给药后,该组的促纤维化因子 TGF-β、α-SMA、COL1A1 表达量也较后者增加。这与 MELGAR 等[35]报道的 DSS 诱导的结肠炎模型的组织病理表现极为相似,模型小鼠不仅表现出高水平的前炎症因子,还表现出纤维化指标的异常。作为细胞外基质最重要的传感器,DDR1 可能通过上调促炎、促纤维化因子的分泌加速了胞外基质的重塑,进而引起结肠的短缩和肠壁顺应性的改变。结合文献,同敲除 DDR1 可减轻肺纤维化、肾脏纤维化及瘢痕组织形成一样,本研究显示抑制 DDR1 也可以减轻慢性结肠炎肠道炎症及纤维化进程。

此外,本研究发现 $DDR1^{-/-}$ 小鼠肠壁平滑肌层异常增厚,但该组织增生可能并非为促纤维间充质细胞来源的肌细胞增生,而仅仅为肌肉细胞的肥大性变化,这种结构改变可能在一定程度上减轻了 DSS 诱导后胶原蛋白沉积调节不良导致的进行性器官功能障碍。但纤维化修复反应异常复杂,涉及广泛的细胞、信号网络调节,我们将在后续的研究中深入探究 DDR1 在胶原重塑调节中的作用及可能的分子机制。综上,敲除 DDR1 可以减轻结肠炎小鼠肠道炎症及纤维化,为 IBD 发病机制研究及肠道纤维化防治提供理论依据。

参考文献:

[1] 钱家鸣, 杨红. 中国炎症性肠病研究现状和展望[J]. 中华炎性肠病杂志, 2017, 1(1): 2-4. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2096-367X.2017.01.002.
QIAN J M, YANG H. Current status and prospects of research on inflammatory bowel disease in China[J]. Chin J Inflamm Bowel Dis, 2017, 1(1): 2-4. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2096-367X.2017.01.002.

[2] RIEDER F, FIOCCHI C. Intestinal fibrosis in IBD: a dynamic, multifactorial process[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2009, 6(4): 228-235. DOI: 10.1038/nrgastro.2009.31.

[3] JOHNSON J D, EDMAN J C, RUTTER W J. A receptor tyrosine kinase found in breast carcinoma cells has an extracellular discoidin I-like domain[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(22): 10891. DOI: 10.1073/pnas.90.22.10891.

[4] KADLER K E, BALDOCK C, BELLA J, *et al*. Collagens at a glance[J]. J Cell Sci, 2007, 120(pt 12): 1955-1958. DOI: 10.1242/jcs.03453.

[5] DI MARCO E, CUTULI N, GUERRA L, *et al*. Molecular cloning of trkE, a novel trk-related putative tyrosine kinase receptor isolated from normal human keratinocytes and widely expressed by normal human tissues[J]. J Biol Chem, 1993, 268(32): 24290-24295.

[6] PLAYFORD M P, BUTLER R J, WANG X C, *et al*. The genomic structure of discoidin receptor tyrosine kinase[J]. Genome Res, 1996, 6(7): 620-627. DOI: 10.1101/gr.6.7.620.

[7] POZZI A, YURCHENCO P D, IOZZO R V. The nature and biology of basement membranes[J]. Matrix Biol, 2017, 57/58: 1-11. DOI: 10.1016/j.matbio.2016.12.009.

[8] GROSS O, BEIROWSKI B, HARVEY S J, *et al*. DDR1-deficient mice show localized subepithelial GBM thickening with focal loss of slit diaphragms and proteinuria[J]. Kidney Int, 2004, 66(1): 102-111. DOI: 10.1111/j.1523-1755.2004.00712.x.

[9] GUERROT D, GUERROT D, KERROCH M, *et al*. Discoidin domain receptor 1 is a major mediator of inflammation and fibrosis in obstructive nephropathy[J]. Am J Pathol, 2011, 179(1): 83-91. DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.03.023.

[10] MATSUYAMA W, WATANABE M, SHIRAHAMA Y, *et al*. Activation of discoidin domain receptor 1 on CD14-positive bronchoalveolar lavage fluid cells induces chemokine production in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. J Immunol, 2005, 174(10): 6490-6498. DOI: 10.4049/jimmunol.174.10.6490.

[11] WANG H, YANG H, SHIVALILA C S, *et al*. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering[J]. Cell, 2013, 153(4): 910-918. DOI: 10.1016/j.cell.2013.04.025.

[12] VOGEL W F, ASZÓDI A, ALVES F, *et al*. Discoidin domain receptor 1 tyrosine kinase has an essential role in mammary gland development[J]. Mol Cell Biol, 2001, 21(8): 2906-2917. DOI: 10.1128/mcb.21.8.2906-2917.2001.

[13] IMAMURA R, MATSUMOTO K. Hepatocyte growth factor in physiology and infectious diseases[J]. Cytokine, 2017, 98: 97-106. DOI: 10.1016/j.cyto.2016.12.025.

[14] LIU F, ZHUANG S. Role of receptor tyrosine kinase signaling in renal fibrosis[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(6): 972. DOI: 10.3390/ijms17060972.

[15] WANG L, ZHUANG S. The role of tyrosine kinase receptors in peritoneal fibrosis[J]. Perit Dial Int, 2015, 35(5): 497-505. DOI: 10.3747/pdi.2014.00171.

[16] TAKAI K, DRAIN A P, LAWSON D A, *et al*. Discoidin domain receptor 1 (DDR1) ablation promotes tissue fibrosis and hypoxia to induce aggressive basal-like breast cancers[J]. Genes Dev, 2018, 32(3/4): 244-257. DOI: 10.1101/gad.301366.117.

[17] SONG J, CHEN X, BAI J, *et al*. Discoidin domain receptor 1 (DDR1), a promising biomarker, induces epithelial to mesenchymal transition in renal cancer cells[J]. Tumour Biol, 2016, 37(8): 11509-11521. DOI: 10.1007/s13277-016-5021-2.

[18] HU Y B, LIU J S, JIANG B N, *et al*. MiR-199a-5p loss up-regulated DDR1 aggravated colorectal cancer by activating epithelial-to-mesenchymal transition related signaling[J]. Dig Dis Sci, 2014, 59(9): 2163-2172. DOI: 10.1007/s10620-014-3136-0.

[19] LAI S L, TAN M L, HOLLOWS R J, *et al*. Collagen induces a more proliferative, migratory and chemoresistant phenotype in head and neck cancer *via* DDR1[J]. Cancers, 2019, 11(11): 1766. DOI: 10.3390/cancers11111766.

[20] XIE R, WANG X, QI G, *et al*. DDR1 enhances invasion and metastasis of gastric cancer *via* epithelial-mesenchymal transition[J]. Tumour Biol, 2016, 37(9): 12049-12059. DOI: 10.1007/s13277-016-5070-6.

[21] AVINO S, DE MARCO P, CIRILLO F, *et al*. Stimulatory actions of IGF-I are mediated by IGF-IR cross-talk with GPER and DDR1 in mesothelioma and lung cancer cells[J]. Oncotarget, 2016, 7(33): 52710-52728. DOI: 10.18632/oncotarget.10348.

[22] JU G X, HU Y B, DU M R, *et al*. Discoidin domain recep-

tors (DDRs): potential implications in atherosclerosis[J]. Eur J Pharmacol, 2015, 751: 28-33. DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.01.033.

[23] COOPER H S, MURTHY S N, SHAH R S, *et al*. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis[J]. Lab Invest, 1993, 69(2): 238-249.

[24] KROHN J B, HUTCHESON J D, MARTÍNEZ-MARTÍNEZ E, *et al*. Discoidin domain receptor-1 regulates calcific extracellular vesicle release in vascular smooth muscle cell fibrocalcific response via transforming growth factor-β signaling[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2016, 36(3): 525-533. DOI: 10.1161/atvbaha.115.307009.

[25] MATSUYAMA W, WATANABE M, SHIRAHAMA Y, *et al*. Activation of discoidin domain receptor 1 on CD14-positive bronchoalveolar lavage fluid cells induces chemokine production in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. J Immunol, 2005, 174(10): 6490-6498. DOI: 10.4049/jimmunol.174.10.6490.

[26] AVIVI-GREEN C, SINGAL M, VOGEL W F. Discoidin domain receptor 1-deficient mice are resistant to bleomycin-induced lung fibrosis[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2006, 174(4): 420-427. DOI: 10.1164/rccm.200603-333oc.

[27] KAMOHARA H, YAMASHIRO S, GALLIGAN C, *et al*. Discoidin domain receptor 1 isoform-a (DDR1alpha) promotes migration of leukocytes in three-dimensional collagen lattices[J]. FASEB J, 2001, 15(14): 2724-2726. DOI: 10.1096/fj.01-0359fje.

[28] HACHEHOUCHE L N, CHETOUI N, AOUDJIT F. Implication of discoidin domain receptor 1 in T cell migration in three-dimensional collagen[J]. Mol Immunol, 2010, 47(9): 1866-1869. DOI: 10.1016/j.molimm.2010.02.023.

[29] NA Y R, JUNG D, STAKENBORG M, *et al*. Prostaglandin E 2 receptor PTGER4-expressing macrophages promote intestinal epithelial barrier regeneration upon inflammation[J]. Gut, 2021, 70(12): 2249-2260. DOI: 10.1136/gutjnl-2020-322146.

[30] FRANCO C, HOU G, AHMAD P J, *et al*. Discoidin domain receptor 1 (ddr1) deletion decreases atherosclerosis by accelerating matrix accumulation and reducing inflammation in low-density lipoprotein receptor-deficient mice[J]. Circ Res, 2008,102(10): 1202-1211. DOI: 10.1161/circresaha.107.170662.

[31] MATSUYAMA W, WATANABE M, SHIRAHAMA Y, *et al*. Suppression of discoidin domain receptor 1 by RNA interference attenuates lung inflammation[J]. J Immunol, 2006, 176(3): 1928-1936. DOI: 10.4049/jimmunol.176.3.1928.

[32] DORISON A, DUSSAULE J C, CHATZIANTONIOU C. The role of discoidin domain receptor 1 in inflammation, fibrosis and renal disease[J]. Nephron, 2017, 137(3): 212-220. DOI: 10.1159/000479119.

[33] LATELLA G, ROGLER G, BAMIAS G, *et al*. Results of the 4th scientific workshop of the ECCO (I): pathophysiology of intestinal fibrosis in IBD[J]. J Crohns Colitis, 2014, 8(10): 1147-1165. DOI: 10.1016/j.crohns.2014.03.008.

[34] DE BRUYN J R, MEIJER S L, WILDENBERG M E, *et al*. Development of fibrosis in acute and longstanding ulcerative colitis[J]. J Crohns Colitis, 2015, 9(11): 966-972. DOI: 10.1093/ecco-jcc/jjv133.

[35] MELGAR S, KARLSSON A, MICHAËLSSON E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005, 288(6): G1328-G1338. DOI: 10.1152/ajpgi.00467.2004.

(收稿:2021-07-13;修回:2021-10-03)

(编辑 邓强庭)