

P-选择素缺失对小鼠生理特征的影响

李嘉琳, 李梦诗, 李斌, 亓翠玲, 王丽京*

(广东药科大学基础学院血管生物学研究所, 广州 510006)

【摘要】 目的 探讨 P-选择素基因(*P-selectin*)缺失对小鼠生理特征的影响。**方法** P-选择素敲除(PKO)小鼠和 C57 小鼠饲养于 SPF 级环境中,通过基因鉴定确定其为纯和 PKO 小鼠。观察 PKO 小鼠的活动状态、繁育状况,检测血常规,确定 P-选择素敲除后对小鼠一般情况的影响。分别于 6 周和 18 周处死小鼠,通过伊红 & 苏木素(HE)染色,观察 P-选择素敲除后对小鼠各个脏器组织结构的影响。**结果** PKO 小鼠与正常 C57 小鼠的繁育状况相似,血常规无异常,HE 染色发现 PKO 小鼠肝、脾、肺、肾组织结构均较正常。**结论** P-选择素的缺失不会对小鼠生殖繁育、血液造成影响,对重要的组织脏器也未见明显影响,为以后进一步研究 P-选择素在疾病中的作用提供了动物模型研究理论基础。

【关键词】 P-选择素;P-选择素敲除小鼠;动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2017) 01-0014-06

Doi:10. 3969/j. issn. 1005 - 4847. 2017. 01. 003

Effects of *P-selectin* gene knockout on the biological characteristics of mice

LI Jia-lin, LI Meng-shi, LI Bin, QI Cui-ling, WANG Li-jing*

(Vascular Biology Center, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of *P-selectin* gene knockout on the biological characteristics of mice. **Methods** *P-selectin* knockout (PKO) mice and C57BL/6 mice were housed in SPF environment. To make sure that the mice were pure PKO mice by gene identification. To determine the general condition, the activity status, reproduction of *P-selectin* knockout mice were observed and tested. HE staining was used to observed the histological morphology and structures of 6-week-old and 18-week-old *P-selectin* knockout mice. **Results** PKO mice and C57 mice have similar multiplication, there was no significant difference in reproduction and blood routine test. The structures of liver, spleen, lung and kidney were normal. **Conclusions** *P-selectin* knockout has no significant effects on reproduction, blood routine test and major organs. This research provides animal model theoretical basis for further study on the effects of P-selection in diseases.

【Key words】 *P-selectin*; *P-selectin* knockout mice; Animal model

Corresponding author: WANG Li-jing, E-mail: wanglijing62@163.com

P-选择素(CD62P)是选择素家族中的一员,还包括 L-选择素(CD62L)和 E-选择素(CD62E),这些选择素主要在白细胞和血管内皮细胞之间发挥作用,介导两者之间的粘附作用。当发生血栓或炎症反应时,储存于血小板 α -颗粒和血管内皮细胞 Weibel-Palade 小体中的 P-选择素^[1-3]迅速表达于血小板和内皮细胞表面,与 P-选择素配体(PSGL-1)结合

介导血小板、内皮细胞与单核、中性粒细胞之间的粘附作用,因此 P-选择素在血栓形成和炎症反应中发挥着重要作用^[4]。P-选择素还可以促进肿瘤的生长^[5-6]。基因工程小鼠(GEM)是对实验小鼠基因组进行有目的地改造,使其具有某种生物特性以便于对这种基因功能进行研究^[7]。本实验小鼠为 P-选择素基因敲除小鼠(PKO 小鼠),旨在通过对 PKO

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(31471290);广东省科技计划项目(51343072)。

【作者简介】 李嘉琳(1990-),女,硕士研究生,专业:病理学与病理生理学。E-mail: lijialin124@163.com

【通讯作者】 王丽京(1962-),女,教授,研究方向:肿瘤微环境、模式动物疾病模型。E-mail: wanglijing62@163.com

小鼠进行生物学特征及组织病理学观察,研究 P-选择素缺失后对小鼠一般生理特征的影响,为进一步研究 P-选择素在疾病中的作用提供提供了动物模型研究理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 P-选择素 (*P-selectin*) 基因敲除小鼠 (简称 PKO 小鼠) 纯合子雌雄各两只, 6 ~ 8 周龄, 体重 18 ~ 22 g, 购于美国 Jackson 实验室, 由密歇根大学耿建国教授惠赠, 背景为 C57BL/6J (简称 C57) 小鼠。清洁级 C57 小鼠 20 只, 雌雄各半, 5 ~ 6 周龄, 体重 18 ~ 22 g, 购自广东省医学实验动物中 [SCXK (粤) 2014 - 0035]。所有小鼠组织取材于广东药科大学实验动物中心动物实验设施内进行 [SYXK (粤) 2012 - 0125]。所有操作符合实验伦理委员会的要求。

1.2 主要仪器及试剂

显微镜 (徕卡公司); PCR 仪 (美国应用生物系统公司); 石蜡切片机 (徕卡公司); 包埋机 (YAGUANG); 生物组织摊烤片机 (YAGUANG); 凝胶成像仪 (基因有限公司); 低温离心机 (美国热电公司); VMC64S7 独立送回风净化笼具 (苏杭实验动物设备厂); 制冰机 (励克生物公司); 蛋白酶 K、dNTP (Sigma 公司); PCR 引物合成 (上海英潍捷基公司); 二甲苯、乙醇 (广州康龙公司); 抗凝管 (广州康龙公司); 乙醚 (广州康龙公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠的饲养和繁育

C57 PKO 小鼠饲养于 SPF 环境中, 光照控制 (12 h 明/12 h 暗), 室温 22 ~ 26℃, 相对湿度 50% ~ 65%。将雄性和雌性 PKO 小鼠以 1:1 进行全同胞兄妹方式交配, 怀孕的母鼠单独放置一个笼位。每天观察小鼠的活动状态及饮食情况, 及时记录小鼠受孕时间及产仔数, 对配对的小鼠定期给予一定量的葵瓜子或煮熟的鸡蛋以补充营养。

1.3.2 *P-selectin* 基因的鉴定

(1) PKO 小鼠组织 DNA 的提取

75% 乙醇消毒剪刀后剪取约 2 mm 的鼠尾于 1.5 mL 离心管中, 加入 25 mmol/L NaOH 500 μ L, 使组织完全浸没, 金属浴 100℃ 1 h, 冷却后加入 40 mmol/L TrisHCl (pH 5.5) 500 μ L, 离心 3000 r/min

5 min。取 1 μ L 上清进行 PCR 反应。

(2) 扩增目的条带

引物 1: 5'-CTG AAT GAA CTG CAG GAC GA-3'; 引物 2: 5'-ATA CTT TCT CGG CAG GAG CA-3'; 引物 3: 5'-TTG TAA ATC AGA AGG AAG TGG-3'; 引物 4: 5'-AGA GTT ACT CTT GAT GTA GAT CTCC-3'。PCR 反应物配制: 2X Mix 25 μ L, 引物 1、2、3、4 各 1 μ L, 三蒸水 20 μ L, DNA 1 μ L, 总体积 50 μ L。PCR 反应条件: 94℃ 变性 3 min, 94℃ 20 s, 64℃ 30 s (每个循环依次减少 0.5℃), 72℃ 35 s, 共循环 12 次; 94℃ 20 s, 58℃ 30 s, 72℃ 35 s, 共循环 25 次; 72℃ 延伸 2 min, 10℃ 冷却扩增产物。

(3) 琼脂糖电泳及基因型鉴定

制备 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 取 7.5 μ L 的 PCR 产物及 DNA marker 分别加入孔中, 进行电泳分析。PKO^{-/-} 只有 1 条带为 172 bp, PKO^{+/-} 有两条带, 1 条带为 322 bp, 另 1 条带为 172 bp。

1.3.3 血常规

选择成熟的雄性小鼠 C57 和 PKO 各 6 只, 乙醚麻醉后, 从眼眶静脉丛取血 200 μ L, EDTAK2 抗凝, 冰上送检至广东省动物检测所, 检测以下血常规指标, 红细胞计数 (RBC)、白细胞计数 (WBC)、血小板计数 (PLT)、中性粒细胞数、淋巴细胞数、单核细胞数、嗜酸性细胞数、嗜碱性细胞数等。

1.3.4 HE 染色

分别选择 6 周和 18 周的 C57 和 PKO 小鼠, 脱颈椎法处死, 取心肝脾肺肾组织, 4% 中性甲醛溶液固定 12 ~ 24 h 后脱水处理, 脱水顺序为 70% 乙醇 30 min, 80% 乙醇 30 min, 95% 乙醇 30 min, 无水乙醇 I, 无水乙醇 II, 二甲苯 I, 二甲苯 II, 低熔点蜡, 高熔点蜡 (60℃) 均 1 h, 常规包埋切片, 切片厚度为 4 μ m。脱蜡: 按照常规脱蜡方法, 二甲苯 I, 二甲苯 II 各 20 min, 无水乙醇, 95% 乙醇各 15 min, 95% 乙醇 10 min, 90% 乙醇 5 min, 80% 乙醇 5 min 进行脱蜡。PBS 洗一次, 苏木素染色 2 min, 流水反蓝 30 min, 伊红染色 20 s, 常规脱水处理, 晾干后中性树胶封片。显微镜下观察, 取视野正中部分 100 倍、400 倍拍照。

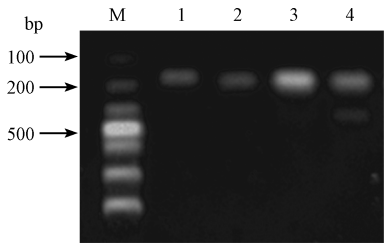
1.4 统计学方法

采用 GraphPad Prism 5.0 统计软件, 计量资料采用 *t* 检验或方差分析, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PKO 小鼠鉴定

为确定该小鼠确为 PKO 小鼠,我们对其基因进行鉴定。PKO^{-/-}: 只有 1 条带,为 172 bp,如图 1 中,1~3 号均为 PKO^{-/-};PKO^{+/-}有两条带,1 条带为 322 bp,另 1 条带为 172 bp,如图 1 中 4 号所示。



注:M. DNA marker 1000;1~3. PKO^{-/-}; 4. PKO^{+/-}。

图 1 P-选择素基因敲除小鼠的鉴定图

Note. M. DNA marker 1000;1~3. PKO^{-/-}; 4. PKO^{+/-}。

Fig.1 Identification of PKO mice

2.2 PKO 小鼠繁育情况

将 8~10 周的雄性和雌性 PKO 小鼠 1:1 进行配种,共 4 笼。通过观察发现 PKO 小鼠的繁育周期与正常 C57 小鼠一样均为 1 个月左右,且每胎产仔数与 C57 小鼠相似,说明 P-选择素基因的敲除,对小鼠生殖繁育没有影响。

2.3 PKO 小鼠主要脏器与正常小鼠 C57 组织病理学观察对比

2.3.1 P-选择素基因的缺失对小鼠肝组织结构无影响

分别于 6 周和 18 周时处死 PKO 小鼠和 C57 小鼠,石蜡包埋 HE 染色后分别在低倍镜(×100)及高倍镜(×400)进行组织病理学观察下,我们发现 PKO 小鼠和 C57 小鼠肝组织结构均较正常。P-选

择素基因的缺失不会对小鼠肝组织结构产生影响。(见图 3)

2.3.2 P-选择素基因的缺失对小鼠脾组织结构无影响

分别于 6 周和 18 周时处死 PKO 小鼠和 C57 小鼠,石蜡包埋 HE 染色后分别在低倍镜(×100)及高倍镜(×400)进行组织病理学观察下,我们发现 PKO 小鼠和 C57 小鼠脾组织结构均较为正常。P-选择素基因的缺失不会对小鼠脾组织结构产生影响。(见图 4)

2.3.3 P-选择素基因的缺失对小鼠肺组织结构无影响

分别于 6 周和 18 周时处死 PKO 小鼠和 C57 小鼠,石蜡包埋 HE 染色后分别在低倍镜(×100)及高倍镜(×400)进行组织病理学观察下,我们发现 PKO 小鼠和 C57 小鼠肺组织结构均较为正常。P-选择素基因的缺失不会对小鼠肺组织结构产生影响。(见图 5)

2.3.4 P-选择素基因的缺失对小鼠肾脏组织结构无影响

分别于 6 周和 18 周时处死 PKO 小鼠和 C57 小鼠,石蜡包埋 HE 染色后分别在低倍镜(×100)及高倍镜(×400)进行组织病理学观察下,我们发现 PKO 小鼠和 C57 小鼠肾组织结构均较正常。P-选择素基因的缺失不会对小鼠肾组织结构产生影响。(见图 6)

2.4 PKO 小鼠血常规检测

通过血常规检测红细胞计数(图 7A RBC)、白细胞计数(图 7B WBC)、血小板计数(图 7C PLT)、淋巴细胞数(图 7D)、单核细胞数(图 7E)、中性粒细胞数(图 7F)、嗜酸性粒细胞数(图 7G)发现 PKO 小鼠的血常规均在正常范围内(见图 7)。

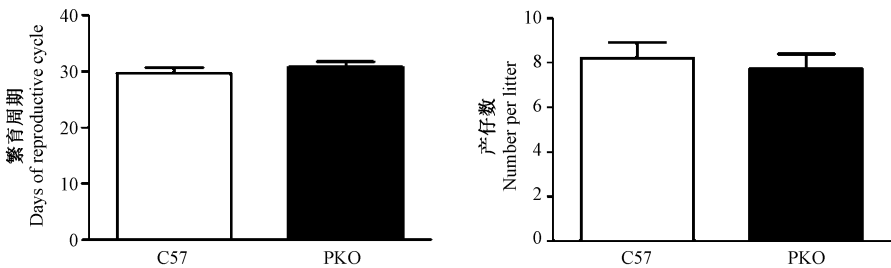
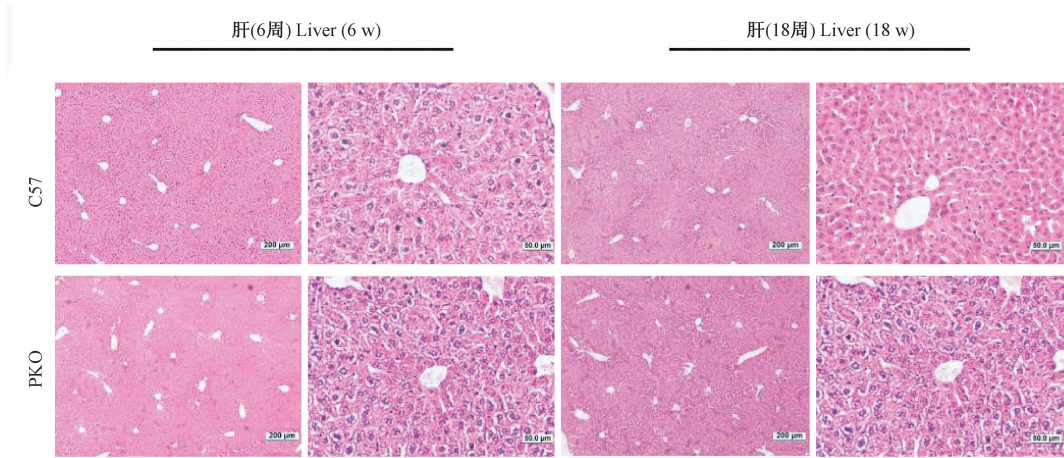


图 2 PKO 小鼠繁育周期和每窝产仔数与正常 C57 小鼠相似

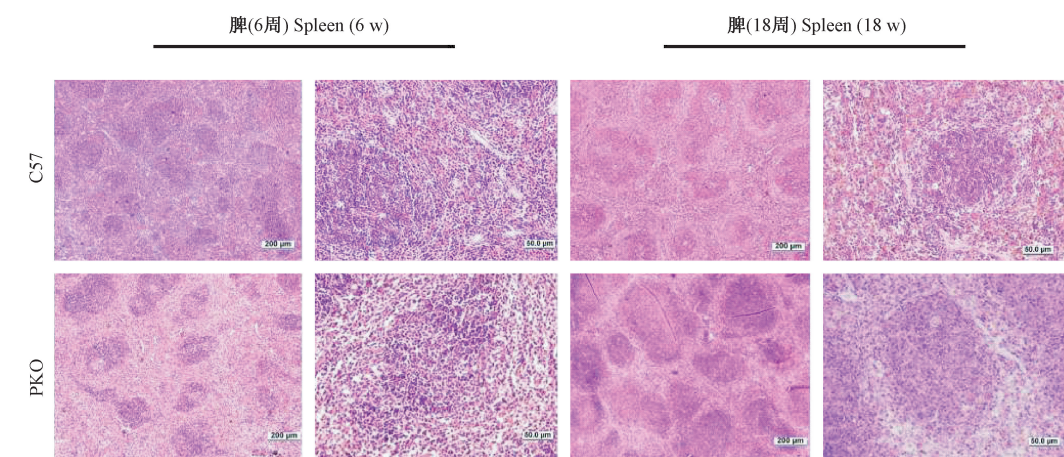
Fig.2 Days of reproductive cycle and number of puppies per litter of the mice



注:PKO 和 C57 小鼠分别在 6 周和 18 周时,通过低倍镜(×100)及高倍镜(×400)对肝组织进行病理学观察。

图 3 PKO 和 C57 小鼠肝脏组织 HE 染色

Fig. 3 Histology of the liver of 6-week-old and 18-week-old PKO mice and C57 mice. HE staining. ×100 and ×400



注:PKO 和 C57 小鼠分别在 6 周和 18 周时,通过低倍镜(×100)及高倍镜(×400)对脾组织进行病理学观察。

图 4 PKO 和 C57 小鼠脾脏组织 HE 染色

Fig. 4 Histology of the spleen of 6-week-old and 18-week-old PKO mice and C57 mice. HE staining. ×100 and ×400

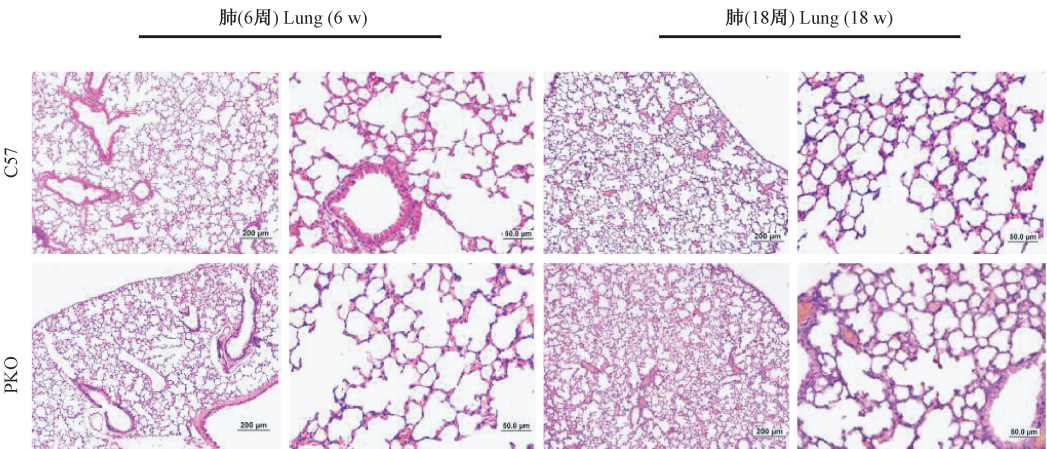
3 讨论

粘附分子(adhesion molecules, AM)是一类主要分布在细胞表面或是细胞外基质中的蛋白质,大多为糖蛋白主要介导细胞与细胞之间或细胞与细胞外基质之间的粘附作用^[10]。L 选择素(L-selectin)、E-选择素(E-selectin)和 P-选择素(P-selectin)是选择素家族成员,由最初发现这三种选择素的三种细胞 leukocyte、endothelium 和 platelet 命名,参与多种生理及病理过程,如介导淋巴细胞归巢、白细胞浸润炎症组织、血栓形成以及肿瘤转移等。P-选择素主要存储于血小板的 α 颗粒和内皮细胞的韦伯氏小体

中,当血小板或内皮细胞活化后,P-选择素迅速表达于血小板(仅需几秒)或内皮细胞(需数分钟)的表面,介导血小板或内皮细胞与白细胞之间的粘附作用,从而在血栓形成和炎症反应中具有重要作用^[11]。近年来发现 P-选择素在肿瘤的发生发展中也具有重要作用,例如,我们实验室亓翠玲等^[6]发现 P-选择素介导的血小板粘附促进肿瘤的生长,血小板可以促进肿瘤的发生,P-选择素的缺失可抑制血小板在肿瘤组织的聚集,减少血管内皮分泌生长因子及血管形成,从而抑制肿瘤生长。P-选择素的配体如 P-选择素糖蛋白配体-1 (PSGL-1),表达于多种肿瘤细胞上,如肺癌、肝癌、乳腺癌、结直肠癌、

肾癌、鳞状上皮癌等,通过与 P-选择素结合介导肿瘤细胞与血小板或内皮细胞的黏附,从而促进肿瘤细胞生长及转移^[12]。另有报道发现在肿瘤组织中

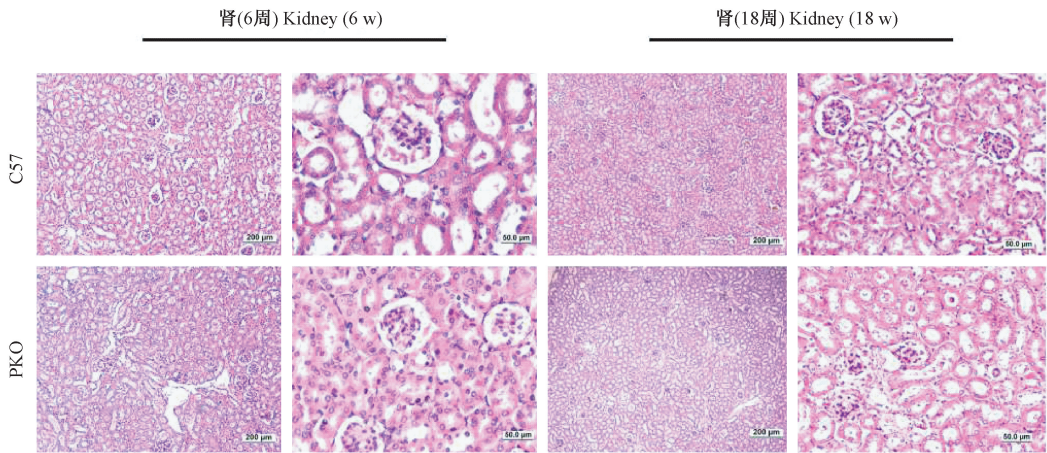
P-选择素表达增加促进新生血管的形成,并且细胞表面黏附分子和内皮细胞间的相互作用对于肿瘤的转移和新生血管形成有着重要作用^[13]。



注:PKO 和 C57 小鼠分别在 6 周和 18 周时,通过低倍镜($\times 100$)及高倍镜($\times 400$)对肺组织进行病理学观察。

图 5 PKO 和 C57 小鼠肺组织 HE 染色
and high power lens($\times 400$).

Fig. 5 Histology of the lungs of 6-week-old and 18-week-old PKO mice and C57 mice. HE staining. $\times 100$ and $\times 400$



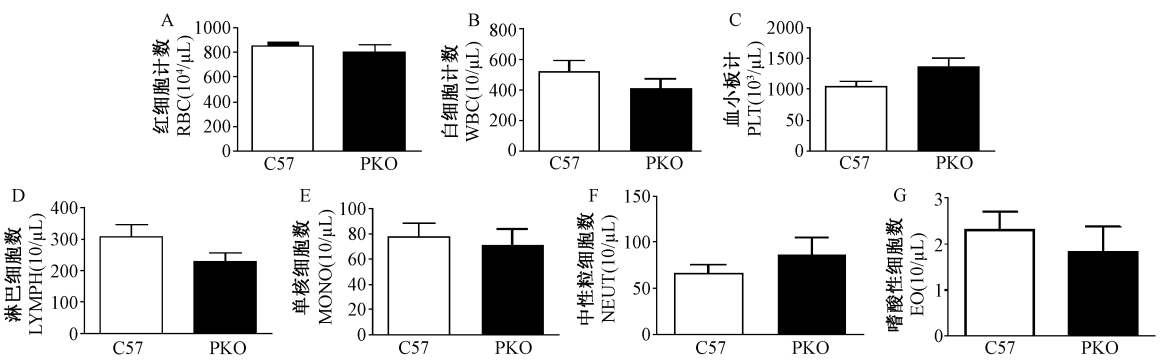
注:PKO 和 C57 小鼠分别在 6 周和 18 周时,通过低倍镜($\times 100$)及高倍镜($\times 400$)对肾组织进行病理学观察。

图 6 PKO 和 C57 小鼠肾组织 HE 染色

Fig. 6 Histology of the kidneys of 6-week-old and 18-week-old PKO mice and C57 mice. HE staining. $\times 100$ and $\times 400$

综上所述,通过对 P-选择素基因敲除小鼠一般状态的观察及重要组织脏器的 HE 染色,发现 P-选择素基因的缺失不会对 PKO 小鼠的生殖和繁育造成影响,对血液、各主要脏器无明显影响,说明 P-选择素的缺失对小鼠一般生理功能没有影响。通过对

P-选择素基因敲除小鼠生理特征的研究,为 P-选择素与肿瘤、炎症等疾病的研究提供了动物模型研究理论基础。总之,通过对转基因动物生物学特征和病理学的观察,对探究基因与疾病关系和新药研发具有重要意义。



注：(A)红细胞计数(RBC)；(B)白细胞计数(WBC)；(C)血小板计数(PLT)；(D)淋巴细胞数；
(E)单核细胞数；(F)中性粒细胞数；(G)嗜酸性细胞数。

图 7 PKO 小鼠与 C57 小鼠血常规比较

Note. (A) Red blood cell count; (B) White blood cell count; (C) Blood platelet count;
(D) Lymphocyte count; (E) Monocyte count; (F) Neutrophil count; (G) Eosinophil count.

Fig. 7 Comparison of the routine blood test of ther PKO and C57 mice

参 考 文 献

[1] Furie B, Furie BC. The molecular basis of platelet and endothelial cell interaction with neutrophils and monocytes: role of P-selectin and the P-selectin ligand, PSGL-1[J]. Thromb Haemost, 1995, 74: 224 – 7.

[2] Hartwell DW, Wagner DD. New discoveries with mice mutant in endothelial and platelet selectins[J]. Thromb Haemost, 1999, 82: 850 – 7.

[3] Chen M, Geng JG. P-selectin mediates adhesion of leukocytes, platelets, and cancer cells in inflammation, thrombosis, and cancer growth and metastasis [J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2006, 54: 75 – 84.

[4] Romo GM, Dong JF, Schade AJ, et al. The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin[J]. J Exp Med, 1999, 190: 803 – 14.

[5] Qi CL, Li B, Guo SM, et al. P-selectin-mediated adhesion between platelets and tumor cells promotes intestinal tumorigenesis in ApcMin/ + mice. [J]. Int J Biol Sci, 2015, 11 (6) : 679 – 87.

[6] Qi CL, Wei B, Ye J, et al. P-selectin-mediated platelets adhesion promote tumor growth [J]. Oncotarget, 2015, 6 (9) : 6584 – 6569.

[7] Waton AL, Anderson LK, Greeley AD, et al. Co-targeting the MAPK and PI3K/AKT/mTOR pathway in two genetically engineered mouse models of Schwann cell tumors reduces tumor grade and multiplicity[J]. Oncotarget, 2014, 5 (6) : 1502 – 1514.

[8] 宁磊,王保宁. 基因工程小鼠研究现状[J]. 青海科技, 2000, 7: 46 – 47.

[9] Nomura T. Practical development of genetically engineered animals as human disease models[J]. Lab Anim Sci, 1997, 47 (2) : 113 – 117.

[10] Libby P. Inflammation in atherosclerosis[J]. Nature. 2002; 420: 868 – 874.

[11] 冯利锋. c-Cbl 介导的对 P – 选凝素诱导 β2 整合素活化的负反馈调控机制的研究和 SHKBP1 抑制表皮生长因子受体 (EGFR) 信号负调控机理的研究[D]. 浙江大学, 2008.

[12] Monzavi – KB, Stanley JS, Hennings L, et al. Chondroitin sulfate glycosaminoglycans as major P-selectin ligands on metastatic breast cancer cell lines [J]. Int J Cancer, 2007, 120: 1179 – 1191.

[13] Iwamura T, Caffrey TC, Kitamura N, et al. P-seletin expression in a metastatic pancreatic tumor cell line(SUTT – 2) [J]. Cancer Res, 1997, 57: 1206 – 1212.

[收稿日期] 2016 – 06 – 27