

Slit2 基因过表达小鼠的生物学参数及 心脏生理功能分析

李想^{1,2}, 郑凌云¹, 郑双^{1,2}, 谭伟江², 王静², 黎冰林², 罗挺², 李舸², 王丽京¹,
杨丰华^{2*}, 黄韧^{1,2*}

(1. 广东药科大学基础学院血管生物学研究所, 广州 510006; 2. 广东省实验动物监测所, 广东省实验动物重点实验室, 广州 510633)

【摘要】 目的 测量评价人 Slit2 基因过表达小鼠 (Slit2-Tg 小鼠) 的基本生物学参数、心脏超声形态功能及转录组测序等, 为该小鼠在生物医学研究应用提供参考。方法 观察比较近交系繁育的 Slit2-Tg 和 C57BL/6 J 小鼠繁育情况、运用 PCR 技术确定基因型、采集血液进行血常规及血生化检测、收集脏器组织进行蛋白表达和病理分析, 以及对心脏进行超声评价和转录组测序分析。结果 Slit2-Tg 小鼠的每窝产仔数显著高于 C57BL/6 J 小鼠, 并可检测到 Slit2 基因和蛋白高表达。Slit2-Tg 小鼠脾的脏器系数有显著增加, 但未见组织结构异常。Slit2-Tg 小鼠的红细胞、血小板、嗜酸性粒细胞、葡萄糖、球蛋白、尿素氮、甘油三酯、高密度脂蛋白、动脉粥样硬化指数具有显著改变。Slit2-Tg 小鼠的心脏除舒张末期左心室前壁厚度较小外, 其他指标差异无显著性, 其心脏组织受检的 17 513 个基因中有 535 基因表达显著升高或降低, 主要涉及 15 个生物进程和信号转导通路。结论 完善了 Slit2-Tg 小鼠生物学参数, 并提示了此模式动物亦适用于心血管疾病相关研究。

【关键词】 Slit2 蛋白; 模式动物; 生物学参数; 转录组测序分析; 心血管疾病

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2018) 03-0302-09

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2018.03.006

Biological parameters and cardiac physiological function of the mice overexpressing human Slit2 gene

LI Xiang^{1,2}, ZHENG Lingyun¹, ZHENG Shuang^{1,2}, TAN Weijiang², WANG Jing², LI Binglin², LUO Ting²,
LI Ge², WANG Lijing¹, YANG Fenghua^{2*}, HUANG Ren^{1,2*}

(1. Guangdong Pharmaceutical University, School of Basic Courses, the Vascular Biology Institute, Guangzhou 510006, China. 2. Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangdong Key Laboratory for Laboratory Animals, Guangzhou 510633)

Corresponding author: HUANG Ren. E-mail: labking@sohu.com; YANG Fenghua. Email: fenghua.yang@gdlami.com

【Abstract】 **Objective** The basic biological, echocardiography and gene sequencing parameters of mice overexpressing Slit2 gene (Slit2-Tg mice) were collected and evaluated, and to provide a reference for the application of Slit2-Tg mice in biomedical research. **Methods** Slit2-Tg and C57BL/6 J mice were inbred. The genotypes of the mice were determined by a PCR assay. The blood samples were collected for blood routine and biochemical tests. The tissues of

【基金项目】 广东省科技专项 (No. 2017B020231001, No. 2017A070702001, No. 2016A020216019); 国家自然科学基金-面上项目 (No. 31672376, No. 31571178); 广东省实验动物重点实验室 (No. 2017B030314171)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (No. 2017B020231001, No. 2017A070702001, No. 2016A020216019), National Natural Science Foundation of China - Surface Projects (No. 31672376, No. 31571178), Guangdong Key Laboratory for Laboratory Animals (No. 2017B030314171)。

【作者简介】 李想 (1992—), 男, 研究方向: 转基因动物疾病模型与新药筛选研究。Email: 814736766@qq.com

【通信作者】 黄韧 (1959—), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 实验动物学。Email: labking@sohu.com;

杨丰华 (1970—), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 心血管生物学。Email: fenghua.yang@gdlami.com

main organs were collected for protein expression and pathological analysis. Echocardiography and transcriptome sequencing was carried out for analyzing the heart function and gene expression, respectively. **Results** The litter size was significantly higher in the Slit2-Tg mice than in C57BL/6 J mice. Human Slit2 gene and protein expressions were detected in the main organs of Slit2-Tg mice. Organ coefficient of spleen was significantly increased in Slit2-Tg mice, but the tissue structure appeared normal. There were significant changes in the counts of erythrocytes, platelets, eosinophils, and biochemistry of glucose, globulin, urea nitrogen, triglycerides, HDL, and atherosclerosis index. Echocardiography showed no significant differences in the morphology and function of the Slit2-Tg hearts except in the left ventricular anterior wall thickness at the end-diastolic state. Compared with the C57BL/6 J mice, 535 genes out of 17513 genes in the Slit2-Tg hearts were increased or decreased, mainly involving 15 biological process or signal transduction pathways. **Conclusions** This study has collected the biological parameters of Slit2-Tg mice and suggests that this model animal is suitable for the studies of cardiovascular diseases.

[Key words] Slit2 protein; model animal; biological parameters; transcriptome sequencing; cardiovascular disease

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

Slit 蛋白有 Slit1、Slit2 和 Slit3^[1] 3 种亚型,由中线胶质细胞分泌^[2],通过结合 Robo 受体来引导轴突增长的方向^[3-4],是生长发育中关键的导向因子之一。近年研究表明 Slit 蛋白和其受体不仅调控神经发育,而且与心脏血管生成^[5-6]、免疫炎症^[7-8]、肿瘤发生转移^[9-10]等密切相关。Slit 蛋白不同亚型的特异性表达具有对应的功能^[11-12],我们前期研究集中在 Slit2 亚型。通过采用人 Slit2 蛋白过表达小鼠(Slit2-Tg 小鼠),我们和国内外同行揭示了 Slit2 蛋白在调控多种病理进程的新功能,包括多类肿瘤的发生发展^[11-12]、生殖器官的异位^[13-14]、老年痴呆症^[15]、肝组织变性^[16-17]等。另外,有研究报道 Slit2 及其受体 Robo 蛋白均表达于小鼠^[6]、斑马鱼和果蝇的心脏,且在斑马鱼和果蝇的心脏发育过程中起到重要作用^[5,18]。同时也有研究表明在血流不通畅情况下 Slit2 蛋白过表达可减小血栓的体积、抑制血栓形成^[6,19-20],提示了 Slit2 亦可能调控循环系统的功能。虽然 Slit2-Tg 小鼠被研究者们广泛应用于各类生理病理过程的研究,但尚缺乏较系统的生物学特性尤其是心脏生理功能的数据,为此本研究设计了繁殖率检测、脏器系数测量、基因和蛋白表达水平测定、组织病理学评价、血常规及血生化分析、心脏超声及心脏转录组测序等实验,收集 Slit2-Tg 小鼠的生物学特性数据并着重进行了心脏组织学、生理学和心脏差异基因表达分析,以期阐明此遗传工程小鼠在心血管疾病防治研究中的应用价值。

1 材料与方法

1.1 实验动物

Slit2-Tg 小鼠(背景为 C57BL/6 J 小鼠)来自于密歇根大学 Dr. Jianguo Geng 实验室^[10],并由广东

省实验动物监测所保种、繁育。8 周龄的实验对照小鼠 SPF 级 C57BL/6 J 小鼠,体重 20 ~ 25 g,购于广东省医学实验动物中心【SCXK(粤)2013 - 0002】。所有小鼠均饲养于广东省实验动物监测所 SPF 环境中【SYXK(粤)2012 - 0122】,近交系繁育,温度维持在 22 ~ 25℃,湿度维持在 50% ~ 70%,昼夜明暗交替时间为 12 h / 12 h,并于 8 周龄时用于实验。所有操作均符合广东省实验动物监测所的动物保护和和使用委员会(IACUC)的要求。

1.2 方法

1.2.1 基因型鉴定、繁育情况及脏器系数

剪取约 3 mm 小鼠尾尖组织,用 DNA 提取试剂盒(北京天根)提取 DNA,并运用 PCR 反应试剂(美国 Thermo Fisher Scientific)和 PCR 扩增仪(美国 Bio-Rad)扩增目的片段。在 1.2% 琼脂糖凝胶电泳后用凝胶成像系统(美国 Bio-Rad)观察电泳结果。记录近交系繁育 5 ~ 9 代每笼仔鼠总数和雌雄数量。取 Slit2-Tg 和 C57BL/6 J 小鼠各 12 只(雌雄比 1:1)称重后脱颈椎法处理,取心脏、肝、脾、肺、肾称重并计算各脏器的脏器系数。脏器系数 = 脏器重量(mg) / 体重(g)。

1.2.2 Slit2 蛋白在各脏器中的表达及组织学观察

Slit2-Tg 和 C57BL/6 J 小鼠各 4 只(雌雄比 1:1)脱颈椎法处理,取心脏、肝、脾、肺、肾。其中脏器的一部分提取 DNA 用于检测人 Slit2 基因的存在情况,一部分提取总蛋白用于检测 Slit2 蛋白的表达情况,其余组织用 4% 多聚甲醛溶液过夜固定,进行苏木素-伊红(HE)染色后在显微镜下观察脏器的组织结构。

1.2.3 血常规检测

Slit2-Tg 和 C57BL/6 J 小鼠各 14 只(雌雄比 1:

1), 乙醚麻醉后眼眶静脉丛采血。血常规检测使用全自动五分类血液分析仪(日本 XT-2000i, Sysmex), 检测指标包括红细胞计数(RBC)、白细胞计数(WBC)、血小板计数(PLT)、中性粒细胞百分比(NEUT%)、淋巴细胞百分比(LYMPH%)、单核细胞百分比(MONO%)、嗜酸性粒细胞百分比(E0%)。

1.2.4 血生化检测

Slit2-Tg 和 C57BL/6 J 小鼠各 16 只(雌雄比 1:1), 乙醚麻醉后采血, 血样经 3500 r/min、离心 10 min 后留取上清液, 采用全自动生化分析仪 7020(日本 Hitachi)检测, 检测指标分三大类:(1)代谢产物: 葡萄糖(GLU)、肌酐(CREA)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、球蛋白(GLOB)、尿素氮(BUN); (2)脂类: 甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白(LDL-C)、高密度脂蛋白(HDL-C), 并计算动脉粥样硬化指数(AI) = (TC - HDL) / HDL^[22]; (3)酶类: 谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)。

1.2.5 高分辨率小动物超声检测

取 Slit2-Tg 和 C57BL/6 J 小鼠各 15 只(其中雄性 8 只, 雌性 7 只), 用 Vevo2100 高分辨率小动物超声系统和 MS-550D 探头(加拿大 Visual Sonics)以左室长轴切面探测, 采集 B 型和 M 型超声图像, 随后应用 Vevo2100 配套图像分析软件分析 M 型超声图像, 获得心脏形态学指标(左心室的前后壁厚度、左心室内径)和生理功能指标(左心室容量、左心室心输出量、左心室射血分数、左心室短轴缩短率和心率)。

1.2.6 心脏转录组测序分析

Slit2-Tg 和 C57BL/6 J 小鼠各 3 只(雄性 2 只, 雌性 1 只), 采集心脏样品后各自混合成一个样品, 使用 TRIzol[®] Reagent 试剂盒(美国 Thermo Fisher Scientific)提取 RNA 后应用 Qubit[®] RNA Assay Kit(美国 Life Technologies)测定 RNA 的浓度。对 C57BL/6 J 和 Slit2-Tg 小鼠心脏的 RNA 进行 HiSeq

测序, 随后对测序结果进行差异基因表达水平和富集分析, 用以评估 Slit2 基因过表达对心脏的生物进程和信号转导通路的影响。转录组测序的技术服务由北京诺禾致源生物信息科技有限公司提供。

1.3 统计学方法

实验数据以 mean ± SEM 表示, 采用 GraphPad Prism 5.0 统计软件, 计量资料采用 *t* 检验, 以 *P* < 0.05 为有统计学差异。

2 结果

2.1 Slit2-Tg 小鼠基因型鉴定、繁育情况及脏器系数

Slit2-Tg 小鼠 DNA 的扩增产物片段经电泳后, 在 600 bp 处有条带, 而 C57BL/6 J 经扩增后电泳无条带。1~4 号均在 600 bp 左右可见明亮扩增条带, 则为 Slit2-Tg 小鼠; 5~7 号在 600 bp 处无条带, 则为 C57BL/6 J 小鼠(图 1)。



图 1 Slit2-Tg 小鼠的 PCR 鉴定图

Fig. 1 Identification of the Slit2-Tg mice by a PCR assay

经统计发现, Slit2-Tg 小鼠的每窝产仔数量显著多于 C57BL/6 J 小鼠(*P* < 0.05), 每窝仔鼠的雌雄比例差异无显著性(表 1)。心脏、肝、脾、肺、肾组织的脏器系数表明, Slit2-Tg 小鼠脾的脏器系数比 C57BL/6 J 显著增大, 其他脏器系数未见统计学差异(表 2)。

2.2 Slit2 基因在各脏器中的表达情况和病理学观察对比

PCR 和 Western blot 检测结果显示, Slit2-Tg 小鼠的心脏、肝、脾、肺及肾中均存在人 Slit2 基因片段(图 2 A), 并发现 Slit2 蛋白在各脏器中的表达均高于 C57BL/6 J 小鼠(图 2B)。

表 1 交配方式及产仔情况($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 1 Mating method and litter size($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 品系 Strains | 交配方式 Mating method (♀/♂) | 每窝产仔数 Litter size | 每窝雄鼠数 Number of males per litter | 每窝雌鼠数 Number of females per litter |
|---------------|--------------------------------|----------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| C57BL/6 J | 1:1 | 8.5 ± 0.3 | 4.7 ± 0.4 | 3.8 ± 0.6 |
| Slit2-Tg | 1:1 | 10.9 ± 0.8* | 5.7 ± 0.3 | 5.2 ± 0.8 |

注: * *P* < 0.05, 表明 Slit2-Tg 小鼠与 C57BL/6 J 小鼠的每窝产仔数差异有显著性。

Note. * *P* < 0.05, significant differences in numbers per litter were seen between the Slit2-Tg mice and C57BL/6 J mice.

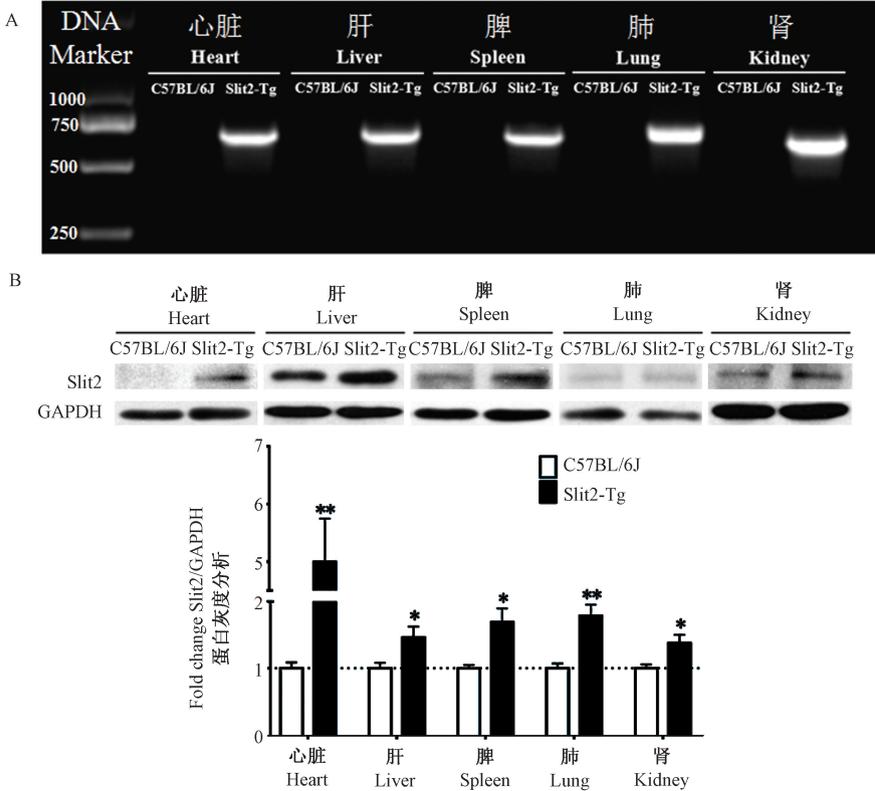
表 2 Slit2-Tg 和 C57BL/6 J 小鼠脏器组织的脏器系数($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Tab.2 Organ coefficients of the Slit2-Tg and C57BL/6 J mice($\bar{x} \pm s, n = 12$)

| 脏器系数 Organ coefficients (mg / g) | 心脏 Heart | 肝 Liver | 脾 Spleen | 肺 Lung | 肾 Kidney |
|--|-------------|--------------|----------------|-------------|-------------|
| C57BL/6 J | 5.17 ± 0.15 | 50.46 ± 1.29 | 2.94 ± 0.09 | 6.01 ± 0.22 | 6.21 ± 0.22 |
| Slit2-Tg | 5.40 ± 0.18 | 51.95 ± 1.94 | 3.41 ± 0.09*** | 6.01 ± 0.08 | 6.40 ± 0.12 |

注: *** $P < 0.001$, 表明 Slit2-Tg 小鼠与 C57BL/6 J 小鼠脾的脏器系数差异有显著性。

Note. *** $P < 0.001$, significant differences in the organ coefficients of spleen was seen between the Slit2-Tg and C57BL/6 J mice.



注:A, Slit2 基因在各脏器中的检测情况;B, Slit2 蛋白在各脏器中的表达情况。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. C57BL/6 J. $n = 4$ 。

图 2 Slit2 在 Slit2-Tg 小鼠各脏器中的表达

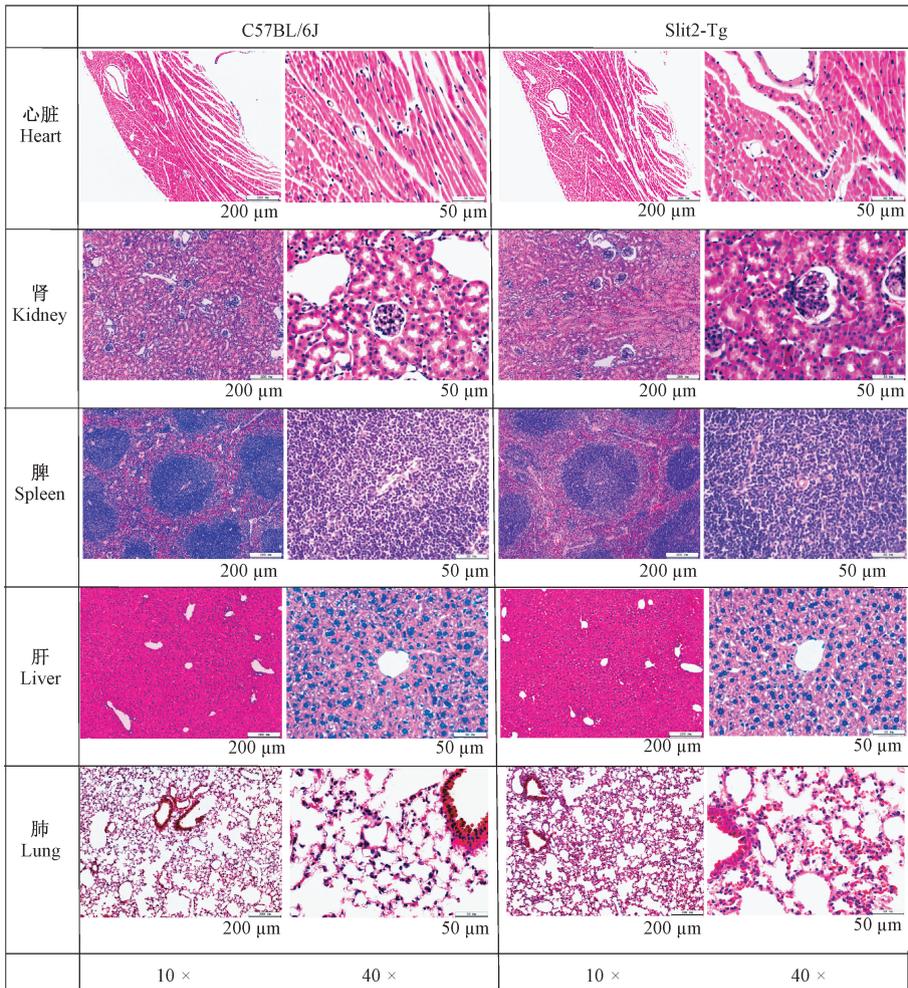
Note. A: Detection of Slit2 gene in various tissues. B: Expression of Slit2 protein in various tissues.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. C57BL/6 J mice. $n = 4$.

Fig.2 Expression of Slit2 in different organs of the Slit2-Tg mice

通过 HE 染色后各脏器的观察结果如图 3 所示, Slit2-Tg 与 C57BL/6 J 两组小鼠的脏器组织结构完整、细胞清晰可见。心脏组织低倍镜下均观察到心内膜、心肌膜和心外膜结构完整,高倍镜下心肌膜有各种切面的心肌细胞,间隙富有小血管及微量的结缔组织;肾组织低倍下皆可见散落的圆形肾小球及红染的肾小管,高倍下近曲和远曲小管排列整齐、结构清晰,肾小球囊壁完整,囊内血管球含有大量的毛细血管;脾组织低清晰可见红染的红髓和紫

蓝色的骨髓,高倍下可见骨髓内中央动脉及动脉周围弥散的淋巴组织;肝组织低倍下均观察到中央静脉、肝血窦和门管区,高倍下肝细胞在中央静脉周围呈放射状排列;肺组织均有大量肺泡和散布的小支气管,高倍下肺泡隔中有少量结缔组织和大量的毛细血管。与 C57BL/6 J 小鼠的各脏器相比,Slit2-Tg 小鼠的心脏、肝、脾、肺及肾组织未见明显的形态结构异常。



注: Slit2-Tg 和 C57BL/6 J 小鼠在 8 周时, 通过光学显微镜对小鼠主要脏器进行病理学观察。

图 3 Slit2-Tg 和 C57BL/6 J 小鼠脏器组织的 HE 染色

Note: Slit2-Tg and C57BL/6 J mice were pathologically observed by light microscopy on the major organs of mice at 8 weeks.

Fig. 3 Histology of the organ tissues of slit2-Tg and C57BL/6 J mice at 8 weeks (HE staining)

2.3 Slit2-Tg 小鼠的血常规

与同龄的 C57BL/6 J 小鼠相比, Slit2-Tg 小鼠的 RBC 明显增加 ($P < 0.05$), PLT 显著减少 ($P < 0.01$), WBC 未见统计学差异。在白细胞分类中, Slit2-Tg 小鼠与 C57BL/6 J 小鼠相比, EO% 显著减小 ($P < 0.001$), NEUT%、LYMPH% 及 MONO% 差异均无显著性(图 4)。

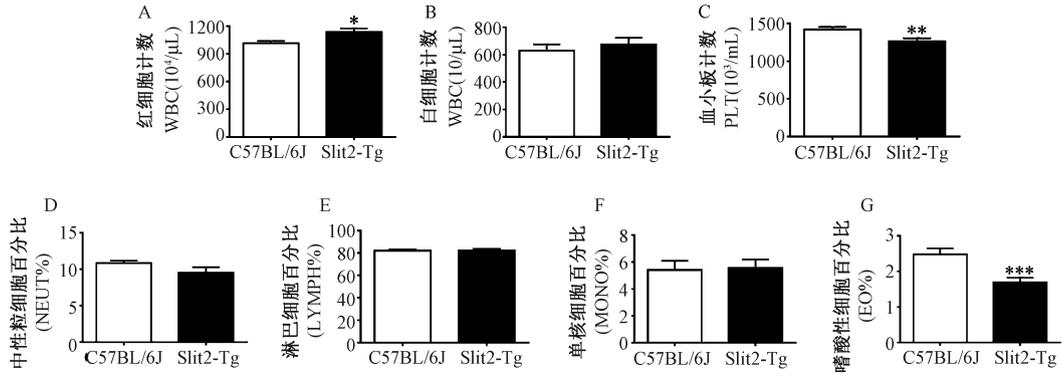
2.4 Slit2-Tg 小鼠的血生化

与 C57BL/6 J 小鼠相比, Slit2-Tg 小鼠血清中代谢产物 GLU 和 BUN 的含量显著降低 ($P < 0.01$), 而

GLOB 的含量显著升高 ($P < 0.05$), 血清中脂类 TG 及 HDL-C 的含量显著升高 ($P < 0.05$), 而计算得到的 AI 显著降低, 其他指标差异无显著性(表 3)。

2.5 Slit2-Tg 小鼠的心脏形态和功能

超声结果显示, Slit2-Tg 小鼠的舒张末期左心室前壁厚度(LVAWd)小于 C57BL/6 J 小鼠(图 5, 表 4), 其他形态学指标(左心室的前后壁厚度、左心室内径)和生理功能指标(左心室容量、左心室心输出量、左心室射血分数、左心室短轴缩短率和心率)差异均无显著性(表 4)。



注: A, 红细胞计数(RBC); B, 白细胞计数(WBC); C, 血小板计数(PLT); D, 中性粒细胞百分比(NEUT%); E, 淋巴细胞百分比(LYMPH%); F, 单核细胞百分比(MONO%); G, 嗜酸性细胞百分比(EO%)。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. C57BL/6 J. $n = 14$ 。

图 4 Slit2-Tg 小鼠与 C57BL/6 J 小鼠的血常规比较

Note. A: Red blood cell count. B: White blood cell count. C: Blood platelet count. D: Neutrophil percentage. E: Lymphocyte percentage. F: Monocyte percentage. G, Eosinophil percentage. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, vs. the C57BL/6 J mice. $n = 14$.

Fig. 4 Comparison of the routine hematologic analysis of the Slit2-Tg and C57BL/6 J mice

表 3 Slit2-Tg 小鼠与 C57BL/6 J 小鼠的
血生化比较($\bar{x} \pm s, n = 16$)

Tab. 3 Comparison of the blood biochemical analysis of
Slit2-Tg and C57BL/6 J mice($\bar{x} \pm s, n = 16$)

| 血生化指标 Serum biochemical indexes | C57BL/6 J mice | Slit2-Tg mice |
|------------------------------------|----------------|----------------|
| 葡萄糖 Glucose (mmol/L) | 7.95 ± 0.21 | 6.87 ± 0.30** |
| 肌酐 Creatinine (μmol/L) | 22.29 ± 1.13 | 21.56 ± 1.25 |
| 总蛋白 Total protein (g/L) | 59.74 ± 0.82 | 60.59 ± 0.78 |
| 白蛋白 Albumin (g/L) | 38.98 ± 0.57 | 38.23 ± 0.46 |
| 球蛋白 Globulin (g/L) | 20.27 ± 0.35 | 22.11 ± 0.37** |
| 尿素氮 BUN (mmol/L) | 10.88 ± 0.39 | 8.68 ± 0.20*** |
| 甘油三酯 Triglyceride (mmol/L) | 1.83 ± 0.08 | 2.17 ± 0.08** |
| 总胆固醇 Total cholesterol (mmol/L) | 3.43 ± 0.09 | 3.43 ± 0.11 |
| 低密度脂蛋白 LDL-C (mmol/L) | 0.22 ± 0.01 | 0.22 ± 0.01 |
| 高密度脂蛋白 HDL-C (mmol/L) | 2.55 ± 0.08 | 2.91 ± 0.08** |
| 动脉粥样硬化指数 AI | 0.36 ± 0.02 | 0.25 ± 0.01*** |
| 肌酸激酶 CK (U/L) | 2052 ± 282.1 | 2194 ± 259.8 |
| 乳酸脱氢酶 LDH (U/L) | 601.2 ± 34.03 | 650.2 ± 40.45 |
| 谷丙转氨酶 ALT (U/L) | 49.89 ± 2.37 | 53.39 ± 2.43 |
| 谷草转氨酶 AST (U/L) | 157.7 ± 11.00 | 154.6 ± 9.23 |
| 碱性磷酸酶 ALP (U/L) | 113.6 ± 5.08 | 112.8 ± 7.65 |

注: 采用 t 检验来进行统计学评价, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, vs. C57BL/6 J mice。

Note. Statistical evaluation was performed by t test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, vs. the C57BL/6 J mice.

2.6 Slit2-Tg 小鼠心脏的转录组测序分析

对 Slit2-Tg 和 C57BL/6 J 小鼠的心脏进行 17 513 个基因的测序, 与 C57BL/6 J 小鼠对比, 结果显示 Slit2-Tg 小鼠心脏组织中有 535 个基因有显著性差异表达, 其中有 239 个基因表达显著降低, 296 个基因表达显著升高(图 6 A)。这些基因主要位于

1、2、7 和 11 号染色体上(图 6B), 涉及改变的生物进程有: 趋化因子调控、趋化因子生成调控、白细胞趋化调控、淋巴细胞迁移、细胞迁移反向调控; 左心室形态学、胶原纤维、血管大小调控、骨生成相关调控; 横纹肌收缩、钠离子跨膜转运、钠离子转运调控; 不饱和脂肪酸合成、激素合成调控、胰岛素应答(表 5)。

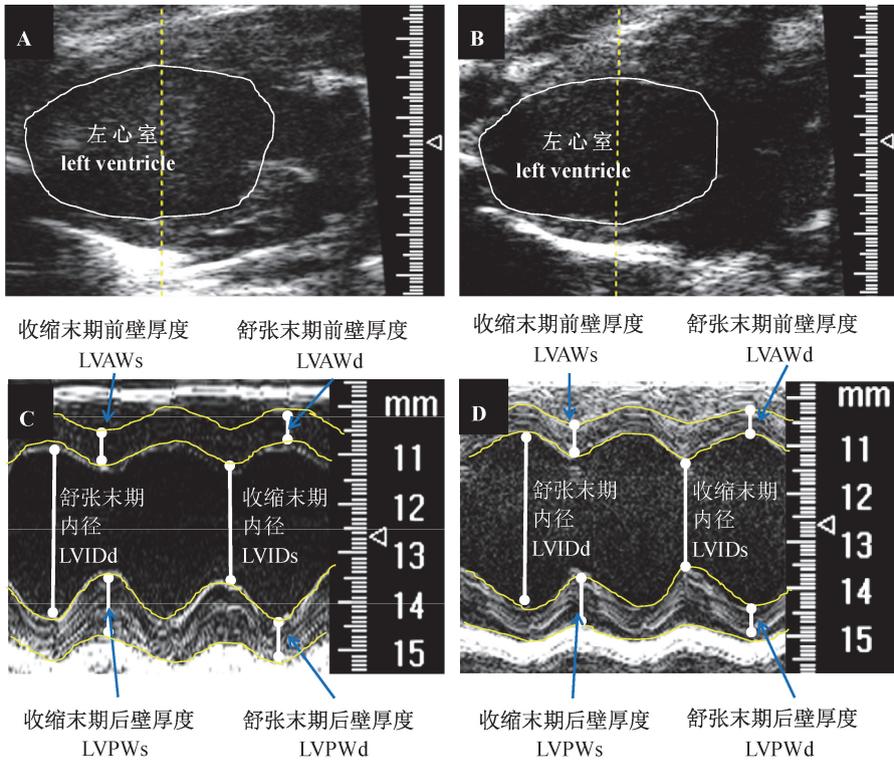
表 4 心脏超声功能评价结果($\bar{x} \pm s, n = 15$)

Tab. 4 Results of evaluation of the mouse
echocardiography($\bar{x} \pm s, n = 15$)

| 心功能检测指标 Heart function indexes | C57BL/6 J mice | Slit2-Tg mice |
|-----------------------------------|----------------|---------------|
| 心率 HR (次/min) | 474.3 ± 10.8 | 457.1 ± 14.5 |
| 舒张末期左室前壁厚度 LVAWd (mm) | 1.04 ± 0.03 | 0.93 ± 0.03* |
| 收缩末期左室前壁厚度 LVAWs (mm) | 1.54 ± 0.04 | 1.42 ± 0.06 |
| 舒张末期左室后壁厚度 LVPWd (mm) | 0.80 ± 0.02 | 0.75 ± 0.02 |
| 收缩末期左室后壁厚度 LVPWs (mm) | 1.33 ± 0.05 | 1.17 ± 0.05 |
| 舒张末期左室内径 LVIDd (mm) | 3.70 ± 0.14 | 3.52 ± 0.08 |
| 收缩末期左室内径 LVIDs (mm) | 2.23 ± 0.17 | 2.19 ± 0.09 |
| 舒张末期左室容量 LVVd (μL) | 60.97 ± 5.00 | 52.37 ± 3.03 |
| 收缩末期左室容量 LVVs (μL) | 19.58 ± 3.15 | 16.71 ± 1.67 |
| 心输出量 CO (L/min) | 19.38 ± 1.26 | 17.35 ± 1.19 |
| 射血分数 EF% | 70.64 ± 2.88 | 68.57 ± 1.93 |
| 短轴缩短率 FS% | 40.48 ± 2.64 | 37.92 ± 1.60 |

注: * $P < 0.05$, 表明 Slit2-Tg 小鼠与 C57BL/6 J 小鼠的数值差异有显著性。

Note. * $P < 0.05$, indicating significant differences between the Slit2-Tg and C57BL/6 J mice.

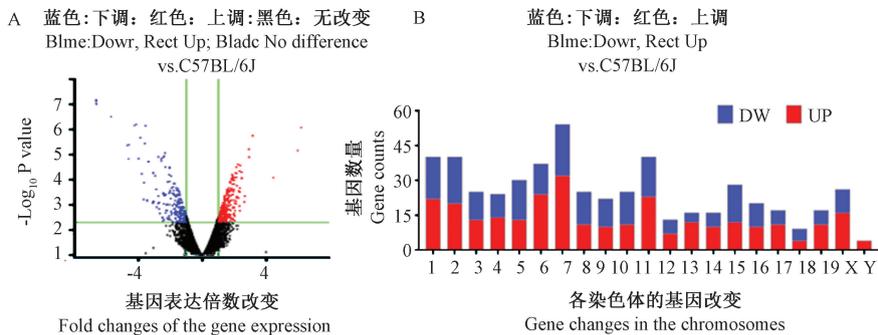


注: A 和 C, 超声显示 C57BL/6 J 小鼠正常心脏的 B 型和 M 型图; B 和 D, 超声显示 Slit2-Tg 小鼠正常心脏的 B 型和 M 型图。

图 5 Slit2-Tg 小鼠与 C57BL/6 J 小鼠的心脏功能检测

Note. A and C: Typical B- and M-mode images of the normal heart in C57BL/6 J (long axis). B and D: Typical B- and M-mode images of the normal heart in Slit2-Tg (long axis).

Fig. 5 Detection results of cardiac function of the Slit2-Tg and C57BL/6 J mice



注: A, Slit2-Tg 小鼠心脏的差表达基因的整体分布情况, 蓝色(降低), 红色(升高), 黑色(没差异), 设定改变的基线为 $-\log_{10}(0.05) \geq 1.3$ 及 $|\log_2(\text{fold change})| \geq 2$; B, Slit2-Tg 小鼠心脏有显著性差异表达的基因在各染色体上的分布, 蓝色表达升高的基因, 红色表达降低的基因。

图 6 Slit2-Tg 小鼠心脏的基因差异表达分析

Note. A: Overall distribution of differentially expressed genes in the heart of Slit2-Tg mice. Blue (decreased expression), red (increased expression), black (no difference), baseline for setting change is $-\log_{10}(0.05) \geq 1.3$ and $|\log_2(\text{fold change})| \geq 2$. B: Distribution of genes with significantly different expression on each chromosome in the Slit2-Tg mouse hearts. Blue, elevated genes; red, decreased genes.

Fig. 6 Analysis of differential gene expression in the heart of Slit2-Tg mice

表 5 Slit2 过表达导致的主要生物进程和信号调控基因的改变

Tab. 5 Main enriched genes of the biological process and signal transduction in the Slit2-Tg mouse heart

| 生物进程和信号转导 Biological process and signal transduction | 基因归类 Classified genes |
|---|---|
| 细胞迁移反向调控 Negative regulation of cell migration | <i>Igfbp3, Timp1, Ptn, Olfm1, Igfbp5, Ccl12, Fam65b, Nov, Grem1, Nr2f2, Cxcl13, Rgcc, Serpinf1, Tbx5, Sfrp2, Podn, Adipoq</i> |
| 白细胞趋化调控 Regulation of leukocyte chemotaxis | <i>Ccl2, Ccr2, Ccl12, Fam65b, Cd74, Ppbp, Nov, Grem1, Mpp1, Cxcl13, Rarres2</i> |
| 趋化因子生成调控 Regulation of chemokine production | <i>Postn, Darc, Ticam2, P2ry2, Egr1, Cd74, Il4ra, Adipoq, Arg2</i> |
| 淋巴细胞迁移 Lymphocyte migration | <i>Ccl2, Ccr2, Ccl11, Ccl12, S1pr1, Cxcl13, Ccl7</i> |
| 趋化因子调控信号 Chemokine-mediated signaling pathway | <i>Ccl2, Darc, Ccl11, Ccl12, Foxc1, Ppbp, Cxcl13, Ccl7</i> |
| 血管大小调控 Regulation of blood vessel size | <i>Rgs2, Adm, Mrvl1, Acta2, Kcna5, P2ry2, Atp1a2, Foxc, Htr2b, Hrh2, Nppa, Ptas1, Alox12</i> |
| 左心室形态学 Left cardiac ventricle morphogenesis | <i>Fgf9, Tgfb2, Tbx5, Sfrp2, Hand1</i> |
| 胶原纤维组织 Collagen-fibrotic tissue | <i>Foxc1, Col14a1, Grem1, Dpt, Lum, Tgfb2, Sfrp2</i> |
| 骨生成相关调控 Regulation of ossification | <i>Igfbp5, Fzd9, Tmem119, P2ry2, Id2, Prkd1, Tob2, Gnas, S1pr1, Smoc1, Tph1, Grem1, Cited1, Ahsg, Mgp, Sfrp2</i> |
| 钠离子转运调控 Regulation of sodium ion transport | <i>Slc9a3, Atp2b4, Fgf12, Atp1a2, Fxyd3, Gnas, Nkain4, Scnn1b, Fxyd2, Fxyd5</i> |
| 钠离子跨膜转运 Transmembrane sodium ion transport | <i>Slc9a3, Atp1a2, Slc8a2, Scnn1b, Slc9a4, Slc17a7, Slc12a3</i> |
| 横纹肌收缩 Striated muscle contraction | <i>Kcna5, Myl1, Uty, Mybphl, Chrne, Chrng, Kcne2, Homer1, Arg2, Myl4</i> |
| 胰岛素应答 Response to insulin | <i>Irs2, Egr1, Sort1, Gck, Soga1, Vgf, Irs4, Cited1, Slc25a33, Hadha, Adipoq, Pak1</i> |
| 激素合成调控 Regulation of hormone biosynthesis | <i>Vdr, Egr1, Cyp17a1, Dkk3, Akr1c18, Nfkb1</i> |
| 不饱和脂肪酸合成 Unsaturated fatty acid biosynthesis | <i>Ptgis, Cd74, Scd1, Alox12b, Ptas1, Alox12</i> |

3 讨论

本研究系统的研究了 Slit2-Tg 小鼠的生物学参数和心脏生理功能,并与 C57BL/6 J 小鼠的相应指标进行了比较。在生物学参数方面,Slit2-Tg 小鼠的每窝产仔数显著高于 C57BL/6 J 小鼠,脾脏系数显著增加,血常规中的红细胞数量、血小板数量及嗜酸性粒细胞有显著改变,血生化中代谢物、脂类和酶类均有部分指标发生了显著改变;在心脏形态学、功能学和基因差异富集分析中,Slit2-Tg 小鼠心脏舒张末期的左室前壁厚度较小,有 535 个基因表达显著升高或降低,并集中体现在 15 条生物进程和信号通路。研究结果完善了 Slit2-Tg 小鼠的生物学特性指标,并表明了此遗传工程小鼠在心血管疾病防治研究中具有重要价值。

虽然早期研究表明 Slit2-Tg 小鼠可出现生殖器官异位^[13-14],但本研究中我们对 Slit2-Tg 小鼠的繁

育情况进行了观察记录,发现与 C57BL/6 J 小鼠相比 Slit2-Tg 小鼠的产仔率显著提高,表明即使出现部分生殖器官异常也不会直接影响繁育,能够保证获取足够的后代开展实验。本研究发现 Slit2-Tg 小鼠脾脏系数显著增加,但显微组织观察未见其形态学异常,未知此结构改变是良性还是损害性代偿。我们亦发现动脉粥样硬化指数较低,结合其他实验室发现 Slit2 蛋白过表达可减少血管损伤使和血栓形成^[6, 19-20],推测 Slit2 可能减缓动脉粥样硬化症的发生发展进程。

差异基因富集分析显示伴随着 Slit2 过表达出现了趋化因子相关的基因表达改变,此与其他报道 Slit2 蛋白能够调控中性粒细胞、淋巴细胞及巨噬细胞的迁移^[7-8, 22]相一致;另外,分析结果指出 Slit2-Tg 小鼠心脏组织的激素、肌肉收缩调控、组织结构相关基因改变了表达,结合超声显示的 Slit2-Tg 小鼠心脏舒张期前壁的改变,提示了 Slit2 可能通过介

导炎症信号调控心脏功能, 而人 Slit2 过表达遗传工程小鼠可能成为解释此机制的重要工具。

参 考 文 献(References)

- [1] Itoh A, Miyabayashi T, Ohno M, et al. Cloning and expressions of three mammalian homologues of *Drosophila slit* suggest possible roles for Slit in the formation and maintenance of the nervous system [J]. *Mol Brain Res*, 1998, 62: 175–86.
- [2] Rothberg JM, Jacobs JR, Goodman CS, et al. *slit*: an extracellular protein necessary for development of midline glia and commissural axon pathways contains both EGF and LRR domains [J]. *Genes Dev*, 1990, 04: 2169–2187.
- [3] Kidd T, Russell C, Goodman CS, et al. Dosage-sensitive and complementary functions of roundabout and commissureless control axon crossing of the CNS midline [J]. *Neuron*, 1998, 20: 25–33.
- [4] Yuan W, Zhou L, Chen JH, et al. The mouse SLIT family: secreted ligands for ROBO expressed in patterns that suggest a role in morphogenesis and axon guidance [J]. *Dev Biol*, 1999, 212: 290–306.
- [5] Mommersteeg MT, Andrews WD, Ypsilanti AR, et al. Slit-roundabout signaling regulates the development of the cardiac systemic venous return and pericardium [J]. *Circ Res*, 2013, 112: 465–75.
- [6] 陈桂秀, 王浩宇, 刘涛, 等. Slit2/Robo4 信号通路对小鼠心肌微血管内皮细胞增殖和迁移的影响 [J]. *中华心血管病杂志*, 2013, 41(12): 1034–1039.
Chen GX, Wang HY, Liu T, et al. Myocardial Slit2/Robo4 expression and impact of exogenous Slit2 on proliferation and migration of cardiac microvascular endothelial cells [J]. *Chin J Cardiol*, 2013, 41(12): 1034–1039.
- [7] Guan H, Zu G, Xie Y, et al. Neuronal repellent Slit2 inhibits dendritic cell migration and the development of immune responses [J]. *J Immunol*, 2003, 171: 6519–6526.
- [8] Wu JY, Feng L, Park HT, et al. The neuronal repellent Slit inhibits formation in zebrafish [J]. *Development*, 2011, 138: 1409–1419.
- [9] Wang B, Xiao Y, Ding BB, et al. Induction of tumor angiogenesis by Slit-Robo signaling and inhibition of cancer growth by blocking Robo activity [J]. *Cancer Cell*, 2003, 4: 19–29.
- [10] Yang XM, Han HX, Sui F, et al. Slit-Robo signaling mediates lymphangiogenesis and promotes tumor lymphatic metastasis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 396: 571–577.
- [11] Strickland P, Shin GC, Plump A, et al. Slit2 and netrin 1 act synergistically as adhesive cues to generate tubular bi-layers during ductal morphogenesis [J]. *Development*, 2006, 133: 823–832.
- [12] Yuan FW, Rao Y, Babiuk RP, et al. A genetic model for a central (septum transversum) congenital diaphragmatic hernia in mice lacking Slit3 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100: 5217–5222.
- [13] Guo SW, Zheng Y, Lu Y, et al. Slit2 overexpression results in increased microvessel density and lesion size in mice with induced endometriosis [J]. *Reprod Sci*, 2013, 20: 285–298.
- [14] Li P, Peng H, Lu WH, et al. Role of Slit2/Robo1 in trophoblast invasion and vascular remodeling during ectopic tubal pregnancy [J]. *Placenta*, 2015, 36: 1087–1094.
- [15] Li JC, Han L, Wen YX, et al. Increased permeability of the blood-brain barrier and Alzheimer's disease-like alterations in slit-2 transgenic mice [J]. *J Alzheimers Dis*, 2013, 29: 195–198.
- [16] 曾翠玲, 郑凌云, 邢丽英, 等. Slit2 在非酒精性脂肪肝中的作用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2016, 26(5): 19–24.
Zeng CL, Zheng LY, Xing LY, et al. Effect of Slit2 on nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Chin J Comp Med*, 2016, 26: 19–24.
- [17] Chang JL, Lan T, Li CZ, et al. Activation of Slit2-Robo1 signaling promotes liver fibrosis [J]. *J Hepatol*, 2015, 63: 1413–1420.
- [18] Fish JE, Wythe JD, Xiao T, et al. A Slit/miR-218/Robo regulatory loop is required during heart tube formation in zebrafish [J]. *Development*, 2011, 138: 1409–1419.
- [19] 勾红菊, 王丽京, 兰天, 等. Slit2 蛋白对深静脉血栓作用的实验研究 [J]. *重庆医学*, 2014, 43: 2016–2018.
Gou HJ, Wang LJ, Lan T, et al. Experimental study on effect of Slit2 protein on deep vein thrombosis in mice [J]. *Chongqing Med*, 2014, 43: 2016–2018.
- [20] Patel S, Huang YW, Rehemani A, et al. The cell motility modulator Slit2 is a potent inhibitor of platelet function [J]. *Circulation*, 2012, 126: 1385–95.
- [21] Haglund O, Luostarinen R, Wallin R, et al. The effects of fish oil on triglycerides, cholesterol, fibrinogen and malondialdehyde in humans supplemented with vitamin E [J]. *J Nutr*, 1991, 121: 165–169.
- [22] Tole S, Mukovozov IM, Huang YW, et al. The axonal repellent, Slit2, inhibits directional migration of circulating neutrophils [J]. *J Leukoc Biol*, 2009, 86: 1403–1415.

[收稿日期] 2018-01-11