

## Slit2 蛋白对深静脉血栓作用的实验研究\*

勾红菊<sup>1</sup>,王丽京<sup>2</sup>,兰天<sup>2</sup>,吴腾<sup>2</sup>,吴平香<sup>1</sup>,顾取良<sup>3</sup>,郑凌云<sup>3</sup>,温定文<sup>2</sup>,丁彦青<sup>1△</sup>

(1. 南方医科大学基础医学院,广州 510515; 2. 广东药学院血管生物研究所,广州 510006;

3. 广东药学院基础学院,广州 510006)

**摘要:**目的 探讨 Slit2 过表达对深静脉血栓形成的影响。方法 利用 Slit2 过表达转基因小鼠进行下腔静脉结扎造模,观察血栓形成的情况,测量出血时间、血栓重量长度比,HE 染色观察血栓形成的病理形态,并同时设立 C57 小鼠对照组。结果 成功建立了小鼠下腔静脉血栓模型;在造模 48 h 后 Slit2 过表达转基因小鼠与 C57 小鼠相比,裸血栓重量长度比明显减小;出血时间延长;Slit2 过表达小鼠形成的血栓中白色血栓所占比例较小,而 C57 小鼠则白色血栓所占比例较大。结论 Slit2 过表达能通过抑制白色血栓形成,从而有效抑制深静脉血栓的形成。

**关键词:**深静脉血栓形式;Slit2;基因工程小鼠

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.16.016

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)16-2016-03

## Experimental study on effect of Slit2 protein on deep vein thrombosis in mice\*

Gou Hongju<sup>1</sup>, Wang Lijing<sup>2</sup>, Lan Tian<sup>2</sup>, Wu Teng<sup>2</sup>, Wu Pingxiang<sup>1</sup>, Gu Quliang<sup>3</sup>,Zheng Lingyun<sup>3</sup>, Wen Dingwen<sup>2</sup>, Ding Yanqing<sup>1△</sup>

(1. Department of Pathology, School of Basic Medical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;

2. Vascular Biology Institute, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;

3. School of Basic Sciences, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China )

**Abstract: Objective** To investigate the effect of Slit2 overexpression on deep vein thrombosis in mice. **Methods** Slit2 overexpression transgenic mice were adopted to establish the model of deep vein thrombosis by ligating venae cava inferior. The thrombosis situation was observed. The bleeding time and the ratio of thrombus weight to length were measured. The histopathological features of thrombogenesis were observed by the HE staining. At the same time the C57 mice control group was set up. **Results** The thrombus model of mouse venae cava inferior was successfully established; compared with the C57 mice, the ratio of naked thrombus weight to length after 24 h of the constructing model in the Slit2 overexpression transgenic mice was significantly decreased; the bleeding time was prolonged; the proportion of the white thrombi to the formative thrombi in the Slit2 overexpression mice was very small, while which in the C57 mice was larger. **Conclusion** Slit2 overexpression can effectively inhibit the deep vein thrombosis through inhibiting the white thrombosis.

**Key words:** deep vein thrombosis venous thrombosis; Slit2; genetically engineered mice

深静脉血栓(deep vein thrombosis, DVT)又称血栓性深静脉炎,与肺栓塞一起被称为静脉血栓栓塞性疾病(VTE),二者是同一疾病的两个不同阶段<sup>[1]</sup>。本病主要发生在骨科手术、肿瘤治疗后,是临床上常见的血管外科疾病<sup>[2]</sup>。患病后易造成肢体病残,严重者可危及患者生命。据报道,全世界每年 DVT 发病率约为 0.1%,美国等西方国家 VTE 发病率在心血管疾病中居第 3 位,欧洲每年有 50 万人死于 VTE。其中患下肢深静脉功能不全者占人口的 0.5%,且大部分是下肢 DVT 形成的后遗症。在普通外科手术中约 29% 的恶性肿瘤患者并发 DVT。近年来 DVT 形成的发病情况有逐年上升的趋势<sup>[3-5]</sup>。

神经迁移蛋白 Slit 及其受体 Robo(roundabout)是一类对神经轴突导向和神经元迁移具有重要调节作用的“神经导向因子”<sup>[6]</sup>。Slit 是一种外分泌蛋白,哺乳动物有 Slit1、Slit2 及 Slit3 3 个家族成员,均表达于神经系统,而其中 Slit2、Slit3 也发现表达于神经系统外的其他细胞中;其受体 Robo 是一种跨膜蛋白,哺乳动物 Robo 家族包括 4 个成员,Robo 均表达于神经

系统,而其中 3 个 Robo 蛋白在非神经系统中也有表达,如在血管内皮细胞上发现有 Robo1 及 Robo4 蛋白的表达<sup>[7]</sup>。近年来研究发现,除神经系统外,Slit2 及其受体 Robo1 在哺乳动物的肝脏及血管受损时的中性粒细胞、白细胞及血小板上均有表达<sup>[8-9]</sup>。Slit2-Robo1 信号通路在白细胞趋化和募集、肿瘤新生血管形成以及血小板黏附、扩散及其活化等多个生理过程发挥重要作用<sup>[10-13]</sup>。由于血栓形成的首要过程与血小板黏附、活化等功能密切相关,本文选用 Slit2 过表达转基因小鼠(即 Slit2-Tg 小鼠)为研究对象,与对照组 C57 小鼠比较,观察 Slit2/Robo1 信号通路在 DVT 形成中的作用,为临床预防和治疗下肢 DVT 提供有关线索。

**1 材料与方**

**1.1 实验动物** SPF 级 C57BL/6 小鼠(简称 C57 小鼠)购于广东省动物中心,生产许可证号:SCXK(粤)2008-0002; Slit2-Tg 小鼠由上海生命科学院构建赠送,SPF 环境中饲养扩群。

**1.2 仪器与试剂** 组织包埋机(莱卡)、石蜡切片机(莱卡)、体

视显微镜(重庆奥特)、显微眼科剪、显微手术镊子、显微持针器、持针器、眼科剪、眼科镊子、带线缝合针 7-0 圆 3/8 1.5×6、医用缝合针圆 3/8 5×14、医用缝合线 5-0、纱布、乙醇棉球、棉球、0.9%生理盐水、1%戊巴比妥钠、1%氨苄溶液等。

1.3 方法

1.3.1 Slit2-Tg 小鼠鉴定 用消毒后的剪刀剪下小鼠尾尖部约 1 cm,置于 1.5 mL EP 管中,加入 180 μL 50 mmol NaOH, 100 °C 水浴裂解 30 min 后加入 20 μL 1 mmol Tri-HCl 充分混匀,离心得上清液即为提取的 DNA。上游引物:5'-ATG-GACTACAAGGACGACGATGAAAGAAGC-3', 下游引物:5'-CCATACACTGAG TGTACAGACCAACCCGA-3'。以上述提取的 DNA 为模板进行 PCR 反应扩增目的片段。琼脂糖凝胶电泳观测扩增产物条带大小。

1.3.2 建立动物模型 C57 小鼠、Slit2-Tg 小鼠各 8 只,均为雄性,6~8 周龄,体质量 20~25 g。适应性喂养 1 周后,C57 小鼠为对照组,Slit2-Tg 小鼠为实验组进行造模。造模处理如下:小鼠腹腔注射 1%戊巴比妥钠(0.1 mL/20 g)麻醉后,四肢固定并腹部消毒后沿其腹白线逐层打开腹腔进行下腔静脉结扎手术,术后置于 25~28 °C,直至小鼠复苏,即可正常饲养。

1.3.3 出血时间的测定 小鼠进行下腔静脉血栓造模 48 h 后,腹腔注射 1%戊巴比妥,待小鼠麻醉进入静息状态后,用刻度尺量取并标记尾部 5 cm 处,剪去小鼠尾尖约 1 cm,将尾部 5 cm 标记处以下置于 37 °C 预热生理盐水中。观察小鼠尾尖出血状况,记录出血时间<sup>[14]</sup>。

1.3.4 标本的获取及处理 术后 48 h 脱臼处死小鼠并剖开腹部,移开小肠等内脏器官,暴露下腔静脉。在体视显微镜下取出下腔静脉主脉管的结扎处下方约 1.0 cm 处的下腔静脉段血管,生理盐水漂洗、滤纸吸干后进行称重和长度测量,然后在 4%中性甲醛中 4 °C 固定过夜。经脱水后石蜡包埋、切片,进行 HE 染色,普通显微镜下观察并拍摄。

1.4 统计学处理 采用 SPSS10.0 统计软件进行分析,所有数据均用  $\bar{x} \pm s$  表示,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Slit2-Tg 小鼠鉴定 Slit2-Tg 转基因小鼠 DNA 的 PCR 扩增产物的条带位置大约在 600 bp,而野生型小鼠(即 C57 小鼠)经扩增后凝胶电泳无条带。1~4 号泳道在 600 bp 位置可见明亮扩增条带的为 Slit2-Tg 转基因小鼠,5~8 号泳道 600 bp 位置没有相应条带的为 C57 小鼠,见图 1。

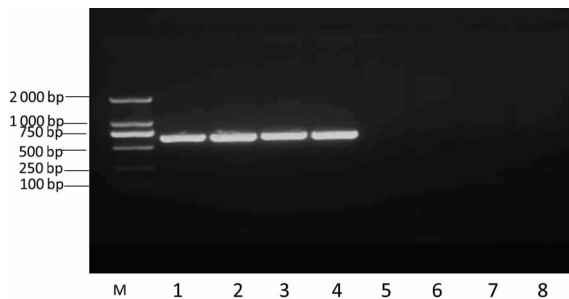
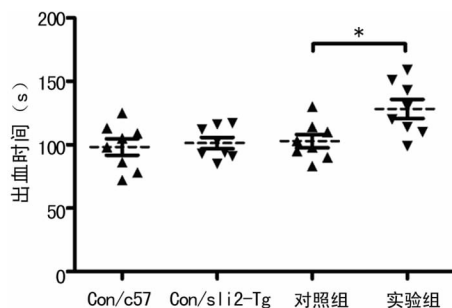


图 1 琼脂糖凝胶电泳观测扩增产物

2.2 两组小鼠出血时间比较 经过观察记录、统计分析,实验组小鼠出血时间为(128.30±7.49)s,对照组小鼠出血时间为(102.90±5.27)s。实验组小鼠自然出血时间比对照组的出血时间延长,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 2。

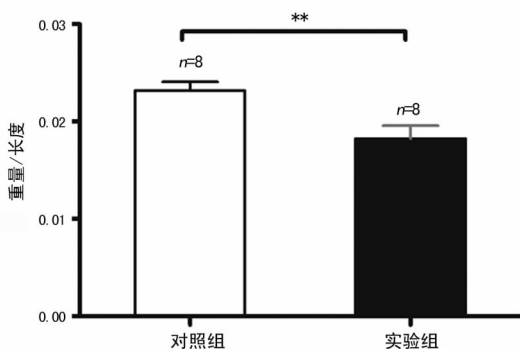
2.3 两组小鼠血栓重量/长度比值比较 对两组小鼠进行下腔静脉血栓造模 48 h 后,取出血栓测量其重量和长度,计算重量长度比,结果表明实验组小鼠形成的血栓重量/长度比值小于对照组小鼠,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 3。

2.4 组织病理学观察 造模 48 h 后取出形成的血栓进行脱水石蜡包埋后切片,且均以血栓头部经 HE 染色,镜下发现 C57 小鼠形成的白色血栓区域比例大,HE 切片中呈现为浅粉染色结构区域;实验组小鼠形成的白色血栓区域较少,HE 切片中主要呈现为红染的凝血块样结构区域,见图 4。



\* :  $P < 0.05$ , 与对照组比较。

图 2 两组小鼠出血时间比较



\*\* :  $P < 0.01$ , 与对照组比较。

图 3 两组小鼠血栓的重量/长度比值比较

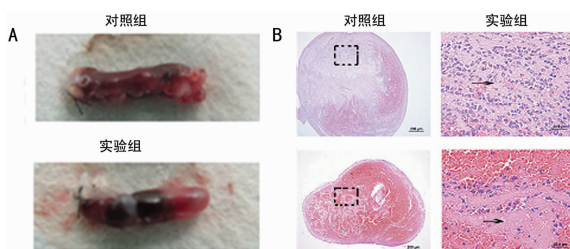


图 4 两组小鼠血栓的病理形态

3 讨 论

血栓形成的基本条件是血液高凝状态、内皮细胞受损及血流动力学改变。而无论是心脏或动脉、静脉内的血栓,其形成过程都是从血小板黏附于内膜裸露的胶原开始。血小板在 vW 因子的参与下黏附于内皮下细胞外基质释放出血小板源生长因子和致密颗粒等物质,进一步激活内源性和外源性凝血途径,从而激活凝血酶,活化的凝血酶将纤维蛋白原水解转变为纤维蛋白。纤维蛋白和内皮下的纤维连接蛋白结合,形成纤维蛋白网,使聚集的血小板堆牢固地黏附于受损内膜表面,形成镜下淡红色结构,其间可见少量纤维蛋白的不可逆的血小板血栓,即白色血栓,白色血栓形成作为血栓形成的起始点,进一步促进混合血栓及红色血栓形成<sup>[14]</sup>。因此,抑制白色血栓形成能有效减少血

栓形成,降低血栓导致的栓塞及梗死等血液循环障碍。

本文利用 Slit2 蛋白过表达转基因小鼠及 C57 小鼠为实验对象,采用下腔静脉结扎的方法建立 DVT 模型<sup>[15]</sup>,引起局部血流淤滞、低氧、血管内皮损伤,活化血小板并激活其黏附功能等,启动凝血系统、导致静脉血栓的形成。观察 Slit2 蛋白对血栓形成的重量/长度比值、出血时间及病理改变的影响。

Slit2 及其受体 Robo1 的早期研究主要集中在神经系统发育方面,它们在线虫、果蝇和脊椎动物神经轴突导向生长和细胞迁移的过程中发挥重要调节作用<sup>[6-7]</sup>。后来随着研究发现,Slit2 及 Robo1 在非神经系统中也有表达,Slit2-Robo1 信号与肿瘤以及血管性疾病的关系开始受到关注。如 Robo1 被发现表达于血管平滑肌细胞、中性粒细胞、单核巨噬细胞,Slit2 与其相互作用、能够抑制这些细胞对相关趋化因素诱导的定向迁移<sup>[8-9]</sup>。本结果发现,与 C57 小鼠相比,Slit2 蛋白过表达的小鼠进行下腔静脉结扎后出血时间延长,所形成的血栓重量/长度比值明显减小,白色血栓形成的区域面积少;研究初步表明 Slit2 过表达能够减缓 DVT 形成,这与 Patel 等<sup>[8]</sup>2012 年报道的研究结果基本吻合,该研究发现,Robo1 表达于巨核细胞和血小板表面,体外实验 Slit2-N 蛋白能够抑制多种刺激因素下血小板的黏附、延伸及活化,体内尾静脉注射 Slit2-N 蛋白能够损伤血小板功能、使出血时间延长、闭塞性动脉血栓形成减少。Slit2 抑制血小板黏附的这种功能不是通过与血小板表面糖蛋白 1b $\alpha$  受体直接作用而实现,而与血小板黏附及延伸所依赖的激酶途径有关,可能通过抑制整合素的作用而下调 Akt 信号通路的活化从而减弱血小板延伸、聚集以及颗粒分泌<sup>[16-20]</sup>。

总之,本实验体内研究表明,Slit2 能抑制白色血栓的形成及减小血栓的体积,可能通过抑制血小板的聚集、黏附等功能有关,其具体机制有待于进一步明确。综上所述,本研究结果为临床预防下肢 DVT 的形成提供了新的线索,也为研究开发抑制血小板功能药物以及抗栓药物提供了新的靶点。

#### 参考文献:

- [1] Meadows TA, Bhatt DL. Clinical aspects of platelet inhibitors and thrombus formation[J]. *Circ Res*, 2007, 100(9): 1261-1275.
- [2] 鲁宁, 杨阳, Della-Valle AG, 等. 术前自体血采集预防髋关节置换术后血栓性疾病的作用[J]. *中国骨伤*, 2013, 26(1): 38-40.
- [3] Goldhaber SZ, Tapson VF. DVT FREE Steering Committee. A prospective registry of 5 451 patients with ultrasound-confirmed deep vein thrombosis[J]. *Am J Cardiol*, 2004, 93(2): 259-262.
- [4] Bell EJ, Selvin E, Lutsey PL, et al. Glycemia (hemoglobin A1c) and incident venous thromboembolism in the Atherosclerosis Risk in Communities cohort study[J]. *Vasc Med*, 2013, 18(5): 245-250.
- [5] Angchaisuksiri P. Venous thromboembolism in Asia—an unrecognised and under-treated problem? [J]. *Thromb Haemost*, 2011, 106(4): 585-590.
- [6] Brose K, Bland KS, Wang KH, et al. Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive

axon guidance[J]. *Cell*, 1999, 96(6): 795-806.

- [7] Morlot C, Thielens NM, Ravelli RB, et al. Structural insights into the Slit-Robo complex[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(38): 14923-14928.
- [8] Patel S, Reheman A. The cell motility modulator slit2 is a potent inhibitor of platelet function[J]. *Circulation*, 2012, 126(11): 1385-1395.
- [9] Tole S, Mukovozov IM, Huang YW, et al. The axonal repellent, Slit2, inhibits directional migration of circulating neutrophils[J]. *J Leukoc Biol*, 2009, 86(6): 1403-1415.
- [10] Licht C, Pluthero FG, Li L, et al. Platelet-associated complement factor H in healthy persons and patients with atypical HUS[J]. *Blood*, 2009, 114(20): 4538-4545.
- [11] Abou-Saleh H, Yacoub D, Theoret JF, et al. Endothelial progenitor cells bind and inhibit platelet function and thrombus formation[J]. *Circulation*, 2009, 120(22): 2230-2239.
- [12] Reheman A, Gross P, Yang H, et al. Vitronectin stabilizes thrombi and vessel occlusion but plays a dual role in platelet aggregation[J]. *J Thromb Haemost*, 2005, 3(5): 875-883.
- [13] Wu JY, Feng L, Park HT, et al. The neuronal repellent Slit inhibits leukocyte chemotaxis induced by chemotactic factors[J]. *Nature*, 2001, 410(6831): 948-952.
- [14] Kubota T, Fukuya Y, Hashimoto R, et al. Possible involvement of chemokine-induced platelet activation in thrombophilic diathesis of antiphospholipid syndrome [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2009, 1173: 137-145.
- [15] Li YD, Ye BQ, Zheng SX. NF- $\kappa$ B transcription factor p50 critically regulates tissue factor in deep vein thrombosis [J]. *J Bio Chem*, 2009, 284(7): 4473-4483.
- [16] Von Hundelshausen P, Weber C. Platelets as immune cells; bridging inflammation and cardiovascular disease [J]. *Circ Res*, 2007, 100(1): 27-40.
- [17] Mazharian A, Roger S, Berrou E, et al. Protease-activating receptor-4 induces full platelet spreading on a fibrinogen matrix: involvement of ERK2 and p38 and Ca<sup>2+</sup> mobilization[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(8): 5478-5487.
- [18] Chen J, De S, Damron DS, et al. Impaired platelet responses to thrombin and collagen in AKT-1-deficient mice[J]. *Blood*, 2004, 104(6): 1703-1710.
- [19] Woulfe D, Jiang H, Morgans A, et al. Defects in secretion, aggregation, and thrombus formation in platelets from mice lacking Akt2[J]. *J Clin Invest*, 2004, 113(3): 441-450.
- [20] Yin H, Stojanovic A, Hay N, et al. The role of Akt in the signaling pathway of the glycoprotein Ib-IX induced platelet activation[J]. *Blood*, 2008, 111(2): 658-665.