

大鼠脊神经前根切断后脊髓内 Slit1 表达的变化

赵久红, 劳梅丽

(海南医学院人体解剖学教研室 571199 海口市)

【摘要】目的:探讨脊神经前根损伤后,大鼠脊髓组织中 Slit1 的表达变化,为进一步研究 Slit1 在神经再生中的作用提供依据。**方法:**应用 2 月龄 SD 大鼠共 100 只,体重 $250\pm 20\text{g}$,其中 80 只 SD 大鼠实施左侧 L5 及 L6 脊神经前根切断,分别在伤后 1d、3d、7d、14d 时处死(每个时间点 20 只),取 L5~L6 脊髓节段,标记左右;左侧半 L5~L6 脊髓节段为实验组;右侧半为自身对照组。假手术大鼠(20 只)实施麻醉及暴露 L5 及 L6 脊神经手术,未行 L5 及 L6 脊神经前根切断术,取其 L5~L6 脊髓节段为空白对照组。采用免疫组化、Western blotting 及 RT-PCR 法检测大鼠脊髓组织中 Slit1 的变化。**结果:**脊神经前根切断后 1d、3d、7d、14d,实验组中 Slit1 阳性细胞数分别为 5.78 ± 1.53 、 15.85 ± 2.65 、 23.93 ± 1.53 、 8.78 ± 1.78 ;自身对照组中分别为 2.31 ± 1.63 、 2.57 ± 1.89 、 3.20 ± 2.16 、 3.02 ± 2.15 。各时间点实验组中 Slit1 阳性细胞数显著高于空白对照组(2.89 ± 1.26)及自身对照组($P<0.05$)。Western blotting 示脊神经前根切断后 1d、3d、7d、14d,实验组 Slit1 相对表达量分别为 0.326 ± 0.09 、 0.448 ± 0.05 、 0.638 ± 0.07 、 0.304 ± 0.07 ;自身对照组分别为 0.038 ± 0.02 、 0.038 ± 0.01 、 0.035 ± 0.02 、 0.046 ± 0.03 。各时间点实验组 Slit1 相对表达量与空白对照组(0.038 ± 0.03)及自身对照组比较,差异有显著性($P<0.05$)。RT-PCR 示脊神经前根切断后 1d、3d、7d、14d,实验组 Slit1 mRNA 相对量分别为 0.380 ± 0.03 、 0.425 ± 0.04 、 0.768 ± 0.05 、 0.605 ± 0.04 ;自身对照组分别为 0.210 ± 0.04 、 0.265 ± 0.03 、 0.292 ± 0.02 、 0.261 ± 0.02 。各时间点实验组 Slit1 mRNA 相对量与空白对照组(0.231 ± 0.03)及自身对照组比较,差异有显著性($P<0.05$)。**结论:**脊神经前根切断后,同侧脊髓灰质前角内 Slit1 的表达显著增加。

【关键词】脊神经前根切断;脊髓;Slit1

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2016.05.10

中图分类号:R683.2,Q813 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2016)-05-0441-06

Changes of Slit1 expression in spinal cord after the section of dorsal root in rats/ZHAO JiuHong, LAO Meili//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2016, 26(5): 441-446

【Abstract】Objectives: To investigate the changes of Slit1 expression in spinal cord after the section of dorsal root in rats, and to provide evidence for the role of Slit1 in nerve regeneration. **Methods:** The left dorsal roots of L5 and L6 spinal nerve were transected from 80 2-month-old Sprague-Dawley rats, and the changes of Slit1 expression were detected with RT-PCR, Western blotting and immunohistochemical methods in the related spinal cord at 1d, 3d, 7d and 14d, respectively. The left halves of these L5/6 spinal cords were included in test group, the right halves of these L5/6 spinal cords were included in self-control group and the L5/6 spinal cords from sham operation rats (which were anaesthetized and the L5 and L6 spinal nerves were exposed, but without section operation, $n=20$) in blank control group. Then the number of Slit1 positive cells and the average integral optical density value (AIODV) were determined with image analysis. **Results:** The numbers of Slit1 positive cells in test group at 1d, 3d, 7d and 14d were 5.78 ± 1.53 , 15.85 ± 2.65 , 23.93 ± 1.53 and 8.78 ± 1.78 ; the numbers in self-control group were 2.31 ± 1.63 , 2.57 ± 1.89 , 3.20 ± 2.16 and 3.02 ± 2.15 , respectively. The number of Slit1 positive cells in test group was significantly higher than that in blank control groups(2.89 ± 1.26) or that in self-control group($P<0.05$). Western blotting showed the relative expressions of Slit1 in test group at 1d, 3d, 7d and 14d were 0.326 ± 0.09 , 0.448 ± 0.05 , 0.638 ± 0.07 and 0.304 ± 0.07 ; the

基金项目:海南省自然科学基金(814299);海南医学院科研培育资金(HY2010-008);海南省教育厅科研项目(Hjkj2013-32)

第一作者简介:女(1980-),硕士,讲师,研究方向:神经再生

电话:(0898)66987170 E-mail:zhjh2005627@163.com

通讯作者:劳梅丽 E-mail:645499025@qq.com

numbers in self-control group were 0.038 ± 0.02 , 0.038 ± 0.01 , 0.035 ± 0.02 and 0.046 ± 0.03 respectively. Compared with blank control group (0.038 ± 0.03) and self-control group, the relative expression of Slit1 in test group were significant ($P < 0.05$). RT-PCR showed the relative expressions of Slit1 mRNA in test group at 1d, 3d, 7d and 14d were 0.380 ± 0.03 , 0.425 ± 0.04 , 0.768 ± 0.05 and 0.605 ± 0.04 ; the numbers in self-control group were 0.210 ± 0.04 , 0.265 ± 0.03 , 0.292 ± 0.02 and 0.261 ± 0.02 respectively. Compared with blank control group (0.231 ± 0.03) and self-control group, the relative expression of Slit1 mRNA in test group was significantly higher ($P < 0.05$). **Conclusions:** After the section of dorsal root, Slit1 expression in spinal cord is significantly up-regulated.

[Key words] Dorsal root transection; Spinal cord; Slit1

[Author's address] 1Department of Anatomy, Hainan Medical College, Haikou, 571199, China

Slits是已知的参与神经系统发育的重要调节因子,其家族成员有 Slit1~3,在中枢神经系统发育过程中发挥重要作用^[1-3]。近年来发现周围神经系统如脊神经节(dorsal root ganglion, DRG)也表达 Slit1^[4]。有研究发现,坐骨神经损伤后 DRG 内 Slit1 表达上调,在时间上与生长锥的长出及早期定向较为吻合,在时间模式上与 GAP43 及其他神经生长因子受体类似^[5];另有研究发现,外源性 Slit1 能促进体外培养的 DRG 神经元突起生长^[6]。提示 Slit1 参与周围神经损伤修复过程。既然 Slit1 参与周围神经再生过程,那么 Slit1 是否参与中枢神经损伤修复?脊神经前根由脊髓灰质前角神经元周围突组成,切断脊神经前根可引起脊髓前角运动神经元变性,启动中枢神经损伤修复过程。坐骨神经由 L4 的一部分及 L5、L6 脊神经组成,是全身最粗大的神经,易于逆行追踪。故本实验拟采取 L5、L6 脊神经前根切断模型启动中枢神经再生,观察脊髓内 Slit1 的表达变化,为进一步研究 Slit1 在中枢神经再生中的作用提供依据。

1 材料与方法

1.1 动物

健康成年 SD 大鼠 100 只(湖南农业大学实验动物中心提供),雌雄不限, 250 ± 20 g,自由饮食和饮水,室温 $20^{\circ}\text{C} \sim 30^{\circ}\text{C}$,动物适应环境 1 周后开始实验。

1.2 动物模型制备

80 只大鼠制作脊神经前根切断模型:10%水合氯醛($0.3\text{ml}/100\text{g}$)腹腔注射麻醉,俯卧位固定,常规备皮和消毒,作 L2~S1 后正中切口,切开皮肤、皮下组织,小心分离脊柱背侧肌肉,双侧清楚显示从每个椎间孔穿出的脊神经背支,沿背支向椎间孔方向追踪,即可以确定脊神经及其前、后

根。首先确定大鼠骶骨,其上即为 L6 椎板,两者之间有 L6 脊神经穿出,继续向上可明确定位 L5 脊神经。根据解剖定位,小心切除 L5~L6 双侧椎板,切开硬膜囊暴露马尾及 L5~L6 DRG。DRG 位于椎间孔前内侧,呈梭形膨大,肉眼观白色近透明。横断左侧 DRG 前根,两断端任其回缩。期间有死亡的用相同体重大鼠补造模。其余 20 只大鼠实施假手术,即麻醉、寻找 L5~L6 脊神经方法同上,仅行椎板切除术而不切断脊神经前根。

1.3 动物分组

80 只脊神经前根切断大鼠于术后 1d、3d、7d 和 14d(随机, $n=20$)取 L5~L6 脊髓节段,标记左右。左侧半 L5~L6 脊髓节段为实验组;右侧半为自身对照组;假手术大鼠($n=20$)L5~L6 脊髓节段为空白对照组^[5]。

1.4 组织样品准备

实施脊神经前根切断术大鼠及假手术组大鼠于相应时间点行腹腔麻醉术(同前)。其中 10 只大鼠灌注后取材(用于免疫组化法检测脊髓内 Slit1 的表达情况);开胸暴露心脏,生理盐水 100ml 冲洗,4%多聚甲醛缓冲液 300ml 灌注,持续 30min。取出对应脊神经前根切断的 L5 及 L6 脊髓节段(再次确认为 L5~L6 前根切断),标记脊髓左右侧,于上述相同固定液内后固定 2h 后,依次浸入含 10%、20%、30%蔗糖的 PBS 液中,至标本沉底。恒冷冰冻连续切片,片厚 $15\mu\text{m}$,贴片备用。另 10 只大鼠行新鲜标本取材(用于 Western blotting 及 RT-PCR 法检测脊髓内 Slit1 的表达情况):腹腔麻醉生效后,取出 L5~L6 脊髓节段,左右分开,左侧半为实验组;右侧半为自身对照组;来源于假手术大鼠 L5~L6 脊髓节段为空白对照组(CON)。空白对照组、自身对照组和实验组脊髓均入 -80°C 冰箱备用。

1.5 组织样品中 Slit1 表达水平检测

1.5.1 Western blotting 脊髓组织蛋白的抽取: 将-80℃冰箱中各组不同时间点来源的大鼠组织取出放入匀浆器中置于冰上, 加入组织蛋白抽取试剂(含有 1mmol/L PMSF), 钻头研碎, 将匀浆器内液体吸入 EP 管, 置于冰上, 摇匀 30min。接着 12000r/min, 4℃离心 20min, 吸取上清转移到另一离心管中置于-20℃冰箱。用 BCA 法, 酶标仪测定待测样品的吸光值, 计算样品中的蛋白浓度。脊髓组织蛋白的电泳: 计算每个样本的上样量, 按 35μg 蛋白量上样, 总上样体积 30μl, 其中含有 5μl 的 5×加样缓冲液, 不足的部分以生理盐水补齐, 100℃水浴 5min。用 Tris-甘氨酸聚丙烯酰胺凝胶分离样品, 5%浓缩胶 80V, 6%分离胶 120V 和 PVDF 膜 120V 湿转 1.5h, 用含 5%脱脂奶粉 TBST 液摇床室温封闭 0.5h 后 4℃过夜。加小鼠抗 Slit1 (1:1000)和小鼠抗 β-actin(1:1000)室温 4h, TBST 冲洗 15min×3 次, 加入 HRP 标记山羊抗小鼠免疫球蛋白 IgG(1:1000), 摇床室温孵育 1h, TBST 冲洗 15min×3 次, DAB 液显影。实验重复 3 次, β-actin 作为内参照。条带图片用 TIPAS98 仪的图片分析系统进行灰度扫描, Slit1 条带的相对光密度值=Slit1 条带的密度值/内参条带光密度值。

1.5.2 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR) 取出保存于-80℃冰箱内的组织, 用逆转录试剂 RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas) 获得 cDNA, 按说明书操作。Slit1 特异性上游引物为: 5'-TGTGAAGCAGACTGTGTCA-3', 下游引物为: 5'-TAGCCCTCAGCACAGAGACA-3'。扩增产物长度为 311bp。以 GAPDH 作为内参对照, 其上游引物为 5'TGCTGGTCTGAGTATGTCTG-3', 下游引物为: 5'GCATGTCAGATCCACAACGG-3'。扩增产物长度为 361bp。RT-PCR 产物行 2%琼脂糖凝胶电泳。电泳照片用 TIPAS98 仪的图片分析系统进行灰度扫描, Slit1 条带的相对光密度值=Slit1 条带的密度值/内参条带光密度值。

1.5.3 免疫组化法 采用 ABC 法, 主要步骤如下: 滴加含 3% H_2O_2 的甲醇溶液阻断内源性过氧化物酶 30min; 山羊血清室温封闭 1h; 加入小鼠抗 Slit1 (1:120), 4℃孵育过夜; 加入生物素标记山羊抗小鼠免疫球蛋白 IgG (1:100), 湿盒孵育 2h; SABC 50μl/片, 室温孵育 0.5h。新鲜双蒸水配制

的各含 5%A 液和 B 液的 DAB 显色液 (博士德) 显色 3min, 双蒸馏水冲洗干净。依次过 70%, 80%, 90%, 100%酒精, 各 3min。少量二甲苯滴入中性树胶中混匀后封片, 显微镜观察。免疫荧光法: 主要步骤如下: 切片加入山羊血清室温封闭 1h; 加入小鼠抗 Slit1 (1:100), 4℃孵育过夜; PBS 漂洗 5min×3 次; Cy3 标记的抗小鼠 IgG(1:100)室温孵育 2h, 反应均在避光条件下进行; PBS 漂洗 10min×3 次, 50%甘油封片。避光下荧光显微镜观察。每只大鼠脊髓连续切片中随机取 12 张相同序数切片, 每张切片于 200×镜下随机选取 3 个视野, 计数 Slit1 阳性细胞数。

1.6 数据收集及统计分析

实验过程中获取的 Slit1 阳性细胞数、Western blotting 条带相对光密度值及 RT-PCR 条带的相对光密度值等数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示^[9]。所有数据均采用 SPSS 13.0 软件分析。脊髓内 Slit1 阳性细胞数组间比较及 Slit1 条带相对光密度两两组间比较均采用 student *t* 检验, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 正常脊髓中 Slit1 的表达情况

免疫组化、Western blotting 及 RT-PCR 法检测结果表明, 在 Slit1 在正常成年脊髓内呈低表达状态(表 1~3)。损伤对侧半脊髓(方框内, 自身对照)及空白对照正常脊髓中 Slit1 阳性细胞数少; Western blotting 法及 RT-PCR 法检测到空白对照组脊髓(CON)中有 Slit1 的表达, 只是表达的量较少(图 1)。

2.2 脊神经前根切断后脊髓内 Slit1 表达的变化

脊神经前根切断 1d 后, 同侧脊髓灰质前角内 Slit1 阳性细胞数量开始增多, 并于损伤后 7d 达到高峰, 随后下降, 但仍高于空白对照组。神经前根切断 1d 后实验组脊髓内 Slit1 蛋白表达即上调, 于损伤后 7d 达到高峰, 与空白对照组比较, 差异有统计学意义($t=10.416, P=0.00, 001$); 神经前根切断 1d 后实验组脊髓内 Slit1 mRNA 即上调, 于损伤后 7d 达到高峰, 与空白对照组比较, 差异有统计学意义($t=6.637, P=0.00016$); 空白对照组与自身对照组比较, Slit1 表达的变化无显著统计学意义($P > 0.05$, 表 1~3)。

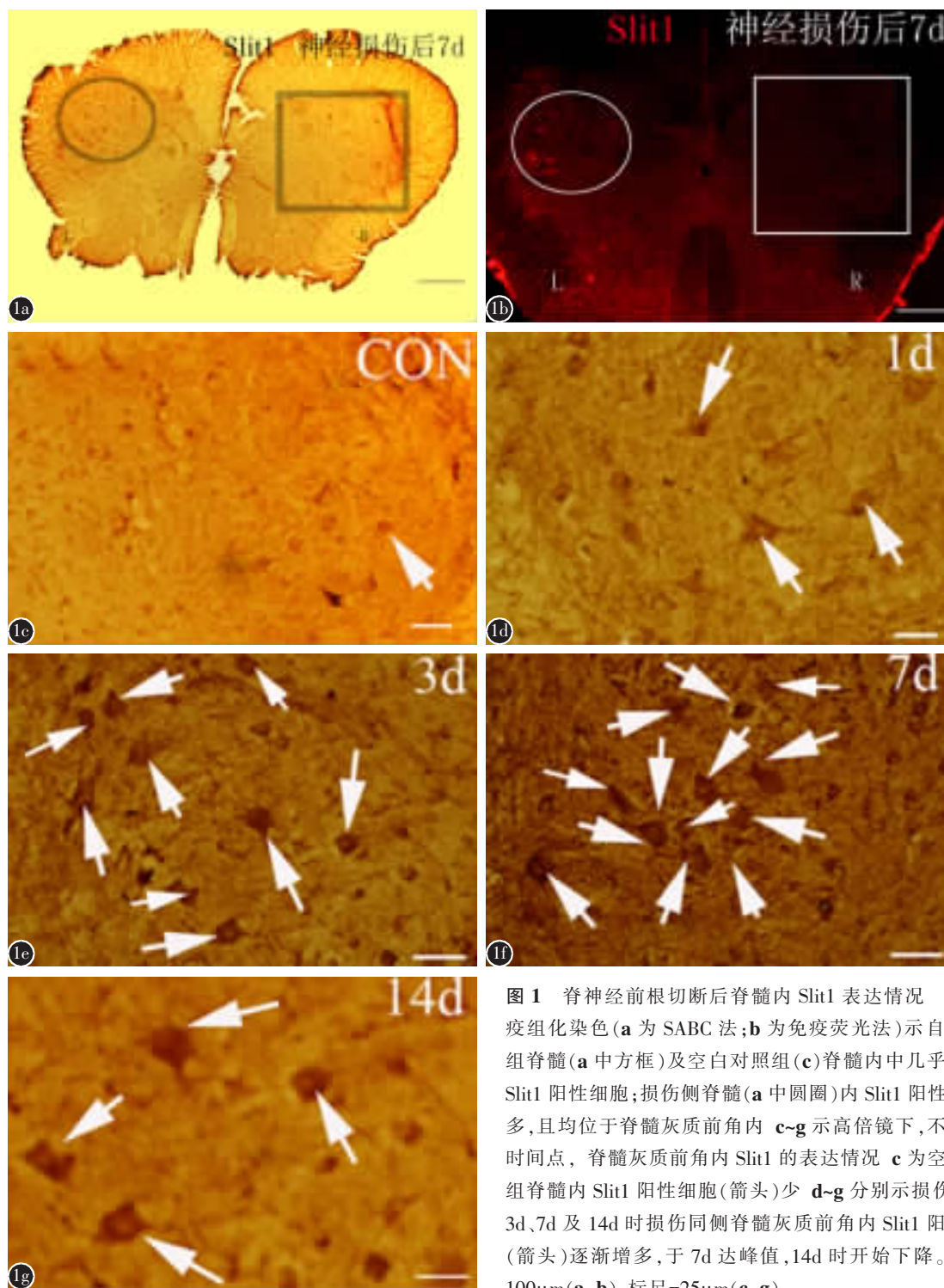


图 1 脊神经前根切断后脊髓内 Slit1 表达情况 Slit1 免疫组化染色 (a 为 SABC 法; b 为免疫荧光法) 示自身对照组脊髓 (a 中方框) 及空白对照组 (c) 脊髓内几乎看不到 Slit1 阳性细胞; 损伤侧脊髓 (a 中圆圈) 内 Slit1 阳性细胞增多, 且均位于脊髓灰质前角内 c~g 示高倍镜下, 不同损伤时间点, 脊髓灰质前角内 Slit1 的表达情况 c 为空白对照组脊髓内 Slit1 阳性细胞 (箭头) 少 d~g 分别示损伤后 1d、3d、7d 及 14d 时损伤同侧脊髓灰质前角内 Slit1 阳性细胞 (箭头) 逐渐增多, 于 7d 达峰值, 14d 时开始下降。标尺=100 μ m (a-b); 标尺=25 μ m (c-g)

Figure 1 The expression of Slit1 in spinal cord increased after the left dorsal roots transection, spinal cord was obtained and stained with anti-Slit1 (a with SABC method; b with immunofluorescence staining). There were few Slit1 positive cells in self-control group (a-b, box) and blank control group (c). The number of Slit1 positive cells increased in spinal cord in test group (a-b, circle), and all Slit1 positive cells were located in the anterior horn of spinal cord. c-g The anterior horn of spinal cord under a high magnification at different point times: c The number of Slit1 positive cells (arrow) was few in blank control group; d-g The number of Slit1 positive cells increased in the anterior horn of spinal cord (arrow) at 1d, 3d, 7d and 14d, respectively, which peaked at 7d and began to decline at 14d. Scale=100 μ m (a-b) and 25 μ m (c-g)

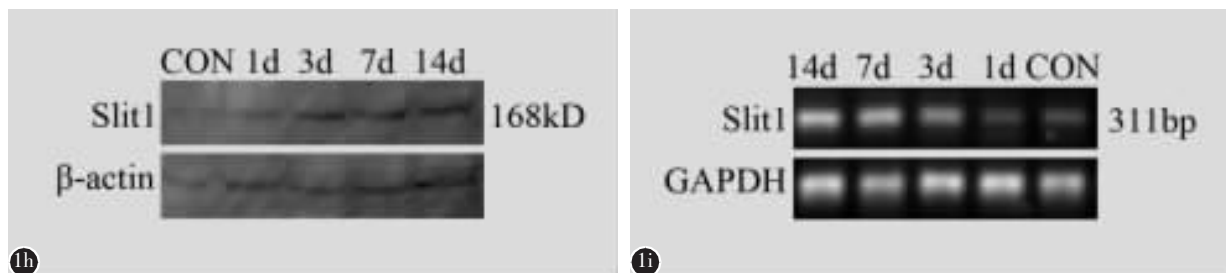


图 1 h 采用 Western blotting 法检测脊髓内 Slit1 的表达变化,示脊神经前根切断后,实验组脊髓内 Slit1 表达上调,于 7d 达高峰,14d 开始下降,但仍高于空白对照组 i 采用 RT-PCR 检测脊髓内 Slit1mRNA 水平的变化,示脊神经前根切断后,实验组脊髓内 Slit1mRNA 上调,于 7d 达高峰,14d 开始下降,但仍高于空白对照组

Figure 1 (h) the expression of Slit1 was detected with Western blotting method and the results showed Slit1 expression increased after spinal nerve roots section, peaked at 7d, and began to decline at 14 d, but still higher than the blank control group; (i) Slit1mRNA in spinal cord was detected via RT-PCR and the results showed that Slit1mRNA in test group increased after operation, peaked at 7d, and began to decline at 14d, but still higher than the blank control group

表 1 各组脊髓内 Slit1 阳性细胞数量 (个)

Table 1 The number of Slit1 positive cells in spinal cord in all groups

	实验组 Test group	自身对照组 Self-control group	空白对照组 Blank control group
1d	5.78±1.53 ^{①②}	2.31±1.63	
3d	15.85±2.65 ^{①②}	2.57±1.89	
7d	23.93±1.53 ^{①②}	3.20±2.16	2.89±1.26
14d	8.75±1.78 ^{①②}	3.02±2.15	

注:①与空白对照组比较 $P<0.05$;②与自身对照组比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with blank control group, $P<0.05$; ②Compared with self-control group, $P<0.05$

表 2 各组脊髓内 Slit1 蛋白的表达 ($n=10$)

Table 2 the expression of Slit1 protein in spinal cord in all groups

	实验组 Test group	自身对照组 Self-control group	空白对照组 Blank control group
1d	0.326±0.09 ^{①②}	0.038±0.02	
3d	0.448±0.05 ^{①②}	0.038±0.01	
7d	0.638±0.07 ^{①②}	0.035±0.02	0.038±0.028
14d	0.304±0.07 ^{①②}	0.046±0.03	

注:①与空白对照组比较 $P<0.05$;②与自身对照组比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with blank control group, $P<0.05$; ②Compared with self-control group, $P<0.05$

3 讨论

Slit1 是 Slits 家族的一员,是已知的参与神经系统发育的重要调节因子,同时在周围神经损伤修复过程中发挥重要作用^[5]。本研究中发现正常成年大鼠脊髓低表达 Slit1,脊神经前根切断后脊

表 3 各组脊髓内 Slit1 mRNA 的表达 ($n=10$)

Table 3 the expression of Slit1 mRNA in spinal cord in all groups

	实验组 Test group	自身对照组 Self-control group	空白对照组 Blank control group
1d	0.380±0.03 ^{①②}	0.210±0.04	
3d	0.425±0.04 ^{①②}	0.265±0.03	
7d	0.768±0.05 ^{①②}	0.292±0.02	0.231±0.03
14d	0.605±0.04 ^{①②}	0.261±0.02	

注:①与空白对照组比较 $P<0.05$;②与自身对照组比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with blank control group, $P<0.05$; ②Compared with self-control group, $P<0.05$

髓内 Slit1 的表达明显上调,说明 Slit1 不仅参与周围神经损伤修复过程,也很可能存在于中枢神经损伤修复过程。

以往的研究证实 Slit1 由发育期中枢神经系统中线胶质细胞分泌,在神经元迁移和轴突生长导向方面起重要作用^[8]。在 Slit 缺失情况下中枢神经系统的发育会出现异常^[3,8]。本研究发现在成年大鼠脊髓内 Slit1 并未消失而是呈现一种低表达状态,说明 Slit1 不仅参与神经系统发育的调控,很可能在成年体内处于静息状态,一旦机体需要就可发挥一定的作用。本研究发现脊神经前根切断后同侧半脊髓前角内 Slit1 的表达明显上调也说明这一点。

2006 年 Yi 等研究发现切断脊神经后根,DRG 内 Slit1 表达明显上调,而脊髓内 Slit1 的表达未发生变化^[5]。我们的研究结果与之不同,其原

因为脊神经后根是由 DRG 神经元发出的中枢突起组成,通过脊髓后外侧沟进入脊髓,与脊髓内细胞发生突触联系。后根损伤会直接引起 DRG 神经元发生病理生理变化,而不会直接(或仅轻微间接)影响脊髓内神经元的状态,故而 Yi 等在切断后根后,仅在 DRG 内发现 Slit1 的表达改变,而未在脊髓内检测到 Slit1 的变化。而本研究与 Yi 等不同,采用切断脊神经前根制作神经损伤模型,脊神经前根由脊髓前角运动神经元发出的周围突组成,故而前根损伤会引起其所属神经元(脊髓内神经元)发生病理生理变化(如 Slit1 的表达变化)。

Dubey 等研究发现神经损伤可唤起系列与发育过程相似的事件,包括参与神经突出和生长锥导向在内的许多发育阶段调控基因再表达^[9]。Slit1 是重要的神经系统发育调节因子,已被证实参与周围神经再生修复过程(坐骨神经损伤后,脊神经节内神经元表 Slit1 上调)^[5]。本研究发现脊神经前根切断后脊髓内 Slit1 表达上调,据此我们判定 Slit1 参与成年中枢神经损伤修复过程。

以前的研究^[3,8]认为 Slits 通过其受体 Robo 的介导,对中枢神经系统发育过程中神经元(尤其是运动神经元)的轴突生长及轴突导向起抑制作用。然而 2011 年 Liu 等^[10]的研究表明,Slit2-Robo1 信号通路在脊髓损伤修复过程不起抑制作用。然而 Liu 等^[10]的研究未提及 Slit1 在脊髓损伤修复过程的作用。2015 年 Ceber 等^[11]研究发现 Slit1-Robo 信号通路在下牙槽神经损伤修复中起到了积极的作用,促进了下牙槽神经中运动神经纤维的再生,患鼠张口反射恢复良好。我们的前期研究同时也证明 Slit1 可促进体外培养的神经元突起生长^[6]。据此我们推测 Slit1 在中枢神经损伤修复过程起到积极作用。当然为明确 Slit1 在中枢神经损伤修复过程中是否具有积极的作用,还需进一步研究。

总之,本研究结果显示,脊神经前根切断后,同侧脊髓灰质前角 Slit1 表达上调,提示 Slit1 可能参与中枢神经损伤修复过程,但仍需进一步研究明确 Slit1 在中枢神经再生中的具体作用及其

内在机制。

4 参考文献

1. Piper M, Little M. Movement through Slits: cellular migration via the Slit family[J]. *Bioessays*, 2003, 25(1): 32-38.
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, 4(12A): 2169-2187.
3. Furrer MP, Vasenkova I, Kamiyama D, et al. Slit and Robo control the development of dendrites in Drosophila CNS [J]. *Development*, 2007, 134(21): 3795-3804.
4. Wang SZ, Ibrahim LA, Kim YJ, et al. Slit/Robo signaling mediates spatial positioning of spiral ganglion neurons during development of cochlear innervation[J]. *Neurosci*, 2013, 33(30): 12242-12254.
5. Yi XN, Zheng LF, Zhang JW, et al. Dynamic changes in Robo2 and Slit1 expression in adult rat dorsal root ganglion and sciatic nerve after peripheral and central axonal injury[J]. *Neurosci Res*, 2006, 56(3): 314-321.
6. Zhang HY, Zheng LF, Yi XN, et al. Slit1 promotes regenerative neurite outgrowth of adult dorsal root ganglion neurons in vitro via binding to the Robo receptor [J]. *Chem Neuroanat*, 2010, 39(4): 256-261.
7. Dickinson RE, Hryhorskij L, Tremewan H, et al. Involvement of the SLIT/ROBO pathway in follicle development in the fetal ovary[J]. *Reproduction*, 2010, 139(2): 395-407.
8. Andrews WD, Barber M, Parnavelas JG. Slit-Robo interactions during cortical development[J]. *Anat*, 2007, 211(2): 188-198.
9. Dubey N, Letourneau PC, Tranquillo RT. Guided neurite elongation and schwann cell invasion into magnetically aligned collagen in simulated peripheral nerve regeneration [J]. *Exp Neurol*, 1999, 158(2): 338-350.
10. Liu JB, Jiang YQ, Gong AH, et al. Expression of Slit2 and Robo1 after traumatic lesions of the rat spinal cord[J]. *Acta Histochem*, 2011, 113(1): 43-48.
11. Ceber M, Mihmanli A, Kilic U, et al. Changes in expression of Slit1 and its receptor Robo2 in trigeminal ganglion and inferior alveolar nerve following inferior alveolar nerve axotomy in adult rats: a pilot study[J]. *Int Oral Maxillofac Surg*, 2015, 44(4): 518-527.

(收稿日期:2015-12-02 末次修回日期:2016-03-11)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 彭向峰)