脊髓损伤重塑皮质脊髓运动神经元突触输入的作用

戴家峰¹, 王丽昭², 韩齐², 沈洪兴¹



文题释义:

皮质脊髓运动神经元: 是指大脑皮质运动区神经元及其发出的下行纤维, 其功能是发放和传递随意运动冲动至下运动神经元, 并控制和支 配其活动。

突触:两个神经元之间或神经元与效应器细胞之间相互接触并借以传递信息的结构,主要由突触前膜、突触后膜以及突触间隙构成。

摘要

背景:脊髓损伤后的功能恢复依赖于运动皮质的功能重塑,然而运动皮质功能重塑的解剖基础研究较少,了解脊髓损伤后运动皮质功能的 解剖变化可对脊髓损伤后功能恢复的调控以及康复治疗等提供新的思路以及研究方向。

目的:解析脊髓损伤后初级运动皮质功能重塑的神经回路结构基础。

方法: C57BL/6J小鼠随机分为假手术组、脊髓损伤组。向两组小鼠C₄脊髓注射表达Cre重组酶融合蛋白的腺相关病毒,同时在大脑初级运动 皮质注射Cre重组酶依赖的分别表达禽类肉瘤/白血病病毒包膜蛋白受体TVA和狂犬病毒糖蛋白的假性狂犬病毒辅助腺相关病毒。第14天时 脊髓损伤组小鼠建立C₆脊髓背侧半切模型,同时向两组小鼠初级运动皮质注射假性狂犬病毒,7 d后收集小鼠脑部样本,制作冰冻切片, 观察支配皮质脊髓运动神经元的输入神经元在脑内的分布情况并进行定量分析。

结果与结论:荧光显微镜观察及定量分析结果发现,两组小鼠支配初级运动皮质脊髓运动神经元的输入神经元在大脑皮质、间脑和中脑均 有分布。其中,假手术组小鼠大脑皮质的输入神经元占全脑输入神经元总数的(84.0±3.6)%,间脑占(10.6±2.3)%,中脑占(0.7±0.4)%;脊髓 损伤组直接突触的输入神经元在皮质、间脑和中脑中的占比分别为(81.7±1.0)%, (13.1±0.5)%和(1.6±0.8)%。脊髓损伤组初级运动皮质输入 神经元在3个区域的比例以及数量均与假手术组无明显差异。脊髓损伤后,各脑区内支配皮质脊髓运动神经元的输入神经元数量无明显变 化,提示皮质脊髓束受损后初级运动皮质的功能重塑可能不仅依赖于受损皮质脊髓运动神经元相关突触输入的改变,而更多地与受损神经 元自身的转录调控变化有关。

关键词:脊髓损伤;皮质脊髓束;初级运动皮质;全脑输入;假性狂犬病毒

Role of synaptic input remodeling of corticospinal motor neurons after spinal cord injury

Dai Jiafeng¹, Wang Lizhao², Han Qi², Shen Hongxing¹

¹Department of Spine Surgery, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200127, China; ²Department of Anatomy and Physiology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

Dai Jiafeng, Master candidate, Department of Spine Surgery, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200127, China Corresponding author: Shen Hongxing, MD, Chief physician, Department of Spine Surgery, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200127, China

Abstract

BACKGROUND: The recovery of function after spinal cord injury depends on the functional remodeling of the motor cortex. However, the anatomical evidence underlying the functional remodeling of the motor cortex is still illusive. Analyzing the anatomical changes in the motor cortex after spinal cord injury can provide new ideas and research directions for regulating functional recovery and rehabilitation after spinal cord injury. OBJECTIVE: To analyze the neural circuit structural basis of functional remodeling of the primary motor cortex after spinal cord injury.

1上海交通大学医学院附属仁济医院脊柱外科,上海市 200127;2上海交通大学医学院解剖学与生理学系,上海市 200025 第一作者:戴家峰,男,1996年生,广东省雷州市人,汉族,上海交通大学医学院在读硕士,主要从事脊髓损伤后轴突再生策略与机制的研究。 通讯作者:沈洪兴,博士,主任医师,上海交通大学医学院附属仁济医院脊柱外科,上海市 200127 https://orcid.org/0009-0001-5016-3639(戴家峰); https://orcid.org/0000-0003-2777-3102(沈洪兴) 基金资助:国家自然科学基金资助项目 (82072418),项目负责人:沈洪兴 引用本文:戴家峰,王丽昭,韩齐,沈洪兴.脊髓损伤重塑皮质脊髓运动神经元突触输入的作用[J].中国组织工程研究,2024, 28(25):4054-4059.



中国组织工程研究 《 Chinese Journal of Tissue Engineering Research www.CTER.com

METHODS: C57BL/6J mice were randomly divided into a sham operation group and a spinal cord injury group. The adeno-associated virus vectors expressing the fusion protein of Cre recombinase were injected into C_4 of mice of both groups. The adeno-associated virus vectors with Cre recombinase-inducible expression of avian sarcoma/leukosis envelope glycoprotein receptor TVA and rabies glycoprotein were injected into the primary motor cortex. Fourteen days later, a C_6 dorsal hemisection mice model was established in the spinal cord injury group. The pseudotyped rabies virus was injected into the primary motor cortex of mice of both groups. After 7 days, brain samples were collected and frozen sections were made. The distribution of input neurons innervating corticospinal motor neurons in the brain was observed and analyzed quantitatively.

RESULTS AND CONCLUSION: Fluorescence microscopy observation and quantitative analysis found that input neurons innervating corticospinal motor neurons of the primary motor cortex in mice of both groups were distributed in the cerebral cortex, thalamus and midbrain. Among them, in the sham operation group, the number of input neurons in the mouse cerebral cortex accounted for $(84.0\pm3.6)\%$ of total brain input neurons; that in the thalamus accounted for $(0.7\pm0.4)\%$. Direct synaptic input neurons in the spinal cord injury group accounted for $(81.7\pm1.0)\%$, $(13.1\pm0.5)\%$, and $(1.6\pm0.8)\%$ in the cerebral cortex, thalamus and midbrain, respectively. The proportion and number of primary motor cortex input neurons in the three regions of the spinal cord injury group did not differ significantly from that of the sham operation group. After spinal cord injury, the number of input neurons in nervating corticospinal pyramidal motor neurons in various brain regions did not change significantly, suggesting that functional remudeling of the motor cortex after spinal cord injury may not only depend on changes in synaptic input related to injured corticospinal motor neurons, but also on transcriptional regulation changes within the injured neurons themselves.

Key words: spinal cord injury; corticospinal tract; primary motor cortex; whole brain inputs; pseudorabies rabies virus

Funding: National Natural Science Foundation of China, No. 82072418 (to SHX)

How to cite this article: DAI JF, WANG LZ, HAN Q, SHEN HX. Role of synaptic input remodeling of corticospinal motor neurons after spinal cord injury. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2024;28(25):4054-4059.

0 引言 Introduction

脊髓损伤是一种高致残率创伤性疾病,由于外部物理应 力破坏脊髓实质,出现相应损伤节段的运动、感觉以及自主 神经系统功能障碍^[1]。皮质脊髓束是大脑皮质执行运动指令 的主要下行性传导通路,其**60%-80%**是由初级运动皮质的 皮质脊髓运动神经元构成^[2]。脊髓损伤后,皮质脊髓束的完 整性被破坏,大脑皮质的运动指令无法传递至脊髓前角运动 神经元,导致机体运动功能障碍。脊髓损伤后运动功能恢复 依赖于运动皮质的功能重塑。皮质脊髓运动神经元树突棘与 突触输入的可塑性是运动皮质功能重塑的基础^[34]。故研究 重塑皮质脊髓运动神经元突的突触输入作用对脊髓损伤后运 动功能代偿、运动环路修复与再生提供重要启示,为康复训 练和干预提供科学依据。

脊髓损伤后初级运动皮质结构的重塑可能以神经元突触 输入的改变为基础。皮质脊髓运动神经元轴突损伤可能导致 树突棘数量的增多或者减少。突触后膜的变化影响神经元突 触输入的数量,改变皮质脊髓运动神经元的神经回路,实现 初级运动皮质结构的重塑。此外,初级运动皮质接受全脑多 个脑区的投射,大脑皮质内也具有丰富的神经投射。皮质脊 髓束的中断可能改变皮质脊髓运动神经元输入神经元的数量, 突触前膜输入的变化也影响神经元轴突输入的数量,导致神 经回路的改变,实现初级运动皮质结构的重塑。相较于传统 的示踪技术,如霍乱毒素亚基 B、生物素葡聚糖胺等,经过 基因编辑的 Cre- 依赖跨单突触伪狂犬病毒体系,可以特异 性标记受损皮质脊髓运动神经元的突触输入。利用基因重组 技术将具有强感染性的狂犬病毒糖蛋白 (rabies glycoprotein, RG) 基因替换成一种禽类肉瘤 / 白血病病毒的包膜蛋白 (envelope glycoprotein, EnvA) 基因后,由于哺乳动物神经元不 表达 EnvA 的受体禽肉瘤白血病病毒亚组 A 受体 (avian-specific retroviral receptor, TVA)蛋白,无法被其感染。使用 Cre 重组

酶依赖性的表达 TVA 和 RG 蛋白的腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV) 感染起始神经元后,可使伪狂犬病毒识别 TVA 受 体并进入该神经元。伪狂犬病毒结合 RG 蛋白后形成具有感染 性的病毒颗粒,并跨突触感染直接支配起始神经元的上级神经

元。由于被感染的上级神经元中没有 RG 蛋白,伪狂犬病毒则 失去再次跨突触的能力^[5]。因此,该研究采用逆向运输的腺相 关病毒使皮质脊髓运动神经元特异性表达 Cre 重组酶。在 Cre 重组酶依赖的 TVA 和 RG 蛋白的腺相关病毒辅助下,伪狂犬病 毒特异性标记初级运动皮质脊髓运动神经元的上级神经元,定 量分析皮质脊髓运动神经元相关突触输入的改变,为解析脊髓 损伤后运动皮质功能重塑的神经回路结构提供解剖学基础。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。组间差异采用独立样本t检验。
1.2 时间及地点 实验于 2022 年 8 月至 2023 年 1 月在上海 交通大学医学院完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 8-10周龄 SPF级 C57BL/6J 雄性小鼠 6 只, 体质量 20-25 g,购自上海灵畅生物科技有限公司,生产 许可证号为 SCXK(沪)2013-0018。实验小鼠饲养于上海交 通大学医学院实验动物中心,使用许可证号为 SYXK(沪) 2018-0027;环境温度 25 ℃,湿度 50%-60%,每 12 h 明暗交替, 小鼠自由饮水进食。实验动物相关操作均符合上海交通大学 医学院动物伦理相关规定,审批号为: A-2021-009。

1.3.2 实验试剂与仪器 表达 Cre 重组酶的腺相关病毒 (AAV-hSyn-SV40-NLS-Cre)、重组酶依赖的表达 TVA 的腺相关病毒 (AAV-EF1α-DIO-TVA-mCherry)、Cre 重组酶依赖的表达 RG 蛋白的腺相关病毒 (AAV-hSyn-DIO-N₂CG)、携带增强绿色荧光 蛋白的假性狂犬病毒 (PCVS-EGFP) 均购自武汉枢密脑科学技 术有限公司;包埋剂购自美国 SAKURA 公司;封片剂购自美国 SouthernBiotech 公司;微量注射器 (Nanoject II,美国 Dmmmond Scientmc);冰冻切片机 (HM525NX,美国 Thermo);高通量普通 荧光显微镜 (VSI20,日本 Olympus)。Louisville 脊髓损伤系统由 上海交通大学医学院解剖学与生理学系韩齐课题组提供。

1.4 实验方法

1.4.1 实验分组 将 6 只 C57BL/6J 小鼠随机分为脊髓损伤组 和假手术组,每组 3 只。脊髓损伤组小鼠在右侧初级运动皮 质注射假性狂犬病毒 (PCVS-EGFP) 之前进行 C₆ 脊髓背侧半切

● 中国组织工程研究 www.CITER.com Chinese Journal of Tissue Engineering Research

手术,而假手术组小鼠在右侧初级运动皮质注射假性狂犬病毒 (PCVS-EGFP) 之前进行 C₆ 椎板切开术,保持脊髓完整。

1.4.2 病毒注射 为了逆向跨单突触标记初级运动皮质脊髓 运动神经元的全脑输入,该研究设计了病毒联合使用策略, 见图1。第0天,小鼠经异氟烷(5%诱导和1.5%维持)麻醉后, 进行颈部剃毛,碘伏消毒后,切开颈部皮肤,逐层钝性分离 肌肉,暴露颈部脊柱,使用U型小鼠脊柱稳定器稳定C₄椎体, 使用加热垫使小鼠在手术过程中体温保持在37℃。行椎板切 除术以暴露 C。脊髓节段,将 500 nL 表达 Cre 重组酶的腺相关 病毒 (AAV-hSyn-SV40-NLS-Cre) 注射到 C。脊髓(脊髓背侧中缝 右侧 0.5 mm, 深度 0.5 mm), 注射完毕后逐层缝合肌肉、皮肤, 并用碘伏消毒伤口。将小鼠从脊髓固定器中取出,观察小鼠 状态。在小鼠呼吸、体温良好的情况下,将小鼠放置于立体 定位仪上固定。小鼠头部剃毛,碘伏消毒后,切开头部皮 肤暴露颅骨。先使用颅骨钻在注射位点上开直径约 0.5 mm 的小窗,再使用微量注射器在注射位点以 60 nL/min 的速度 注射病毒。将 2×10¹² µg/mL 重组酶依赖的表达 TVA 的腺相关 病毒 (AAV-EF1α-DIO-TVA-mCherry) 和 2×10¹² µg/mL Cre 重组酶 依赖的表达 RG 蛋白的腺相关病毒 (AAV-hSyn-DIO-N₂CG) 按照 1:2比例混合后向右侧运动皮质(前囟-1.5,-0.5,0,0.5, 1.0 mm, 旁开 1.5 mm, 深度 0.5 mm) 注射 100 nL。第 14 天, 脊髓损伤组小鼠建立脊髓损伤模型、假手术组小鼠行椎板切 开术之后,在同一天按照上述方式在右侧初级运动皮质注射 100 nL 携带增强绿色荧光蛋白的假性狂犬病毒 (PCVS-EGFP)。



图注:图 A 为研究所使用病毒序列;B 为 C₆ 脊髓背侧半切示意图;C 为 各病毒注射位点示意图;D 为特异性标记初级运动皮质输入神经元病毒 注射实验流程示意图。第0天,在脊髓C₄节段注射 AAV-hSyn-SV40-NLS-Cre, 并将 AAV-Efla-DIO-TVA-mCherry和 AAV-hSyn-DIO-N₂CG 按照1:2比例注 射进右侧初级运动皮质。第14天,在右侧初级运动皮质内注射 PCVS-EGFP,并进行C₆ 脊髓背侧半切损伤。第21天时进行灌流取材。

图 1 |标记脊髓损伤 7 d 后初级运动皮质脊髓运动神经元输入神经元全 脑分布的病毒联合使用策略

Figure 1 | Strategy for joint viral labelling of the whole-brain inputs to M1 pyramidal neurons 7 days after spinal cord injury

1.4.3 脊髓损伤 (C₆ 背侧半切) 模型 根据 1.4.2 所述,在第 14 天使用 10% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉小鼠。小鼠后颈部 剃毛,碘伏消毒后,切开后颈部皮肤,逐层钝性分离颈部 肌肉,暴露颈部脊柱。使用 U 型小鼠脊柱稳定器稳定 C₇ 椎 体,行椎板切除术以暴露 C₆ 脊髓节段。使用 32 号注射针于 C₆ 脊髓背侧行横向硬膜切开术。将 2.4 mm 的平刀片连接到 Louisville 脊髓损伤系统,向腹侧移动,建立约 0.5 mm 深的 背侧脊髓半切模型。脊髓半切后,将小鼠从脊柱稳定器中转 移至洁净的手术隔离垫上,逐层缝合肌肉与皮肤。将麻醉动 物放置在加热垫上,术后保持体温 (37±0.5) ℃。

1.4.4 组织取样及处理 假性狂犬病毒注射 7 d 后,10% 戊巴 比妥钠深度麻醉小鼠,1×PBS 灌流 3 min 后,用 40 g/L 多聚 甲醛固定。取出小鼠大脑,放置于 40 g/L 多聚甲醛中后固定 过夜,30% 蔗糖溶液脱水 2 d。充分脱水后,使用包埋剂包埋, 冷冻,小鼠大脑组织在冰冻切片机中切成厚度 50 μm 的冠状 切片,最后使用含 DAPI 的封片剂进行封固。

1.4.5 荧光显微镜成像 使用可完成自动聚焦和快速荧光扫描拍摄的 VSI20 高通量普通荧光显微镜对小鼠脑切片进行荧光成像。每个鼠脑取全脑切片 55-60 片进行成像。

1.4.6 解剖数据分析方法 使用高通量解剖数据分析软件对荧光脑片图像进行分析^[6]。此套软件包括3个模块:胞体信号检测、脑片图谱配对和全脑定量分析。胞体信号检测模块能够标记胞体位置。脑片图谱配对模块能够将脑片与艾伦脑科学研究所 (Allen Institute)发布的数字化图谱进行精准配对。全脑定量分析模块能够综合前2个模块的数据计算出全脑范围内每个脑区内标记的细胞数量和占全脑标记细胞的比例。
1.5 主要观察指标 小鼠脑切片中绿色荧光细胞的数量。
1.6 统计学分析 用 SPSS 16.0 和 Excel 2020 统计软件进行分析。数据均采用 x±s 表示,组间比较采用学生 t 检验 (Student's t-test)。采用 Origin 2019 软件制作数据图表。文章统计学方法已经通过上海交通大学医学院附属仁济医院生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 初级运动皮质中的起始皮质脊髓运动神经元的标记与鉴定 在初级运动皮质,经脊髓注射感染AAV-hSyn-SV40-NLS-Cre的皮质脊髓运动神经元合成Cre重组酶。在胞体内,对Cre重组酶依赖的包含TVA蛋白和RG蛋白序列的腺相关病毒DNA被Cre重组酶剪切和重组,从而诱导TVA和RG蛋白的表达。表达TVA蛋白的神经元会发出红色荧光,见图2A。腺相关病毒注射14d后,TVA和RG蛋白在初级运动皮质脊髓运动神经元内已经充分表达。此时在初级运动皮质注射表达绿色荧光蛋白的假性狂犬病毒,假性狂犬病毒与皮质脊髓运动神经元内TVA结合,从而进入皮质脊髓运动神经元。当假性狂犬病毒进入初级运动皮质脊髓运动神经元胞体后,病毒基因组进行复制,并加入RG蛋白组装成为有跨突触能力的狂犬病毒颗粒。这些狂犬病毒颗粒逆向跨单突触感染直

研究原著

接支配初级运动皮质脊髓运动神经元的输入神经元,可大量 表达绿色荧光蛋白, 使得这些输入神经元在荧光显微镜成像 中清晰可见,见图 2B。由假性狂犬病毒介导的逆向跨单突 触感染实验中的起始神经元,是既被表达假性狂犬病毒辅助 蛋白的腺相关病毒(红色荧光)感染,又被假性狂犬病毒(绿 色荧光)感染的神经元。在小鼠初级运动皮质中,观察到黄 色(红色和绿色荧光叠加的结果)起始神经元,见图 2C。



图注: 图 A 为 AAV-Efla-DIO-TVA-mCherry 和 AAV-hSyn-DIO-N₂CG 注射位 点,表达红色荧光蛋白的细胞主要位于初级运动皮质; B 为由携带绿色 荧光蛋白的伪狂犬病毒所标记的初级运动皮质输入神经元; C 为同时感 染 AAV-Efla-DIO-TVA-mCherry、AAV-hSyn-DIO-N₂CG 以及 PCVS-EGFP 的起 始神经元。

图 2 | 病毒注射位点及荧光蛋白在各级神经元的表达情况 Figure 2 | Viral vector injection sites and the expression of fluorescence proteins in the neurons

2.2 初级运动皮质中皮质脊髓运动神经元突触输入神经元数 量的全脑定量分析 在脊髓损伤组和假手术组小鼠多个脑区 观察到有假性狂犬病毒携带的绿色荧光标记的输入神经元, 包括皮质 (cortical areas)、间脑 (interbrain) 和中脑 (midbrain)。 假手术组小鼠皮质的输入神经元占全脑输入神经元总数的 (84.0±3.6)%, 间脑占(10.6±2.3)%, 中脑占(0.7±0.4)%。脊髓 损伤组小鼠初级运动皮质的直接输入神经元在皮质、间脑和 中脑中的占比分别是 (81.7±1.0)%, (13.1±0.5)% 和 (1.6±0.8)%。 脊髓损伤组神经元在3个区域细胞数量的比例与假手术组 无明显差异,见图3。在皮质区域,两组输入神经元最多的 区域均是躯体运动区 (somatomotor area, MO), 见图 4A, 图 5A。此外,初级运动皮质还与听觉区 (auditory areas, AUD)、压后皮质 (retrosplenial area, RSP) 等皮质结构有解剖 学连接,见图4A,5A。



图注: 由携带绿色荧光蛋白的假性狂犬病毒逆向示踪标记的输入神经元 在皮质、间脑以及中脑的比例,两组间比例无明显差异。皮质(蓝), 间脑(黄),中脑(绿)。

图 3 | 皮质、间脑以及中脑内假性狂犬病毒逆向示踪标记的输入神经元比例 Figure 3 | Proportion of pseudorabies virus-labelled input neurons in cerebral cortex, interbrain and midbrain

在间脑,输入神经元主要分布于背侧丘脑,背侧丘脑为 大脑重要的感觉传导接替站。来自全身的上行感觉传导通路 (除听觉以外)均在背侧丘脑内进行换元,背侧丘脑发出大

中国组织工程研究 Chinese Journal of Tissue Engineering Research www.CITER.com

TTeR

量神经元投射到大脑皮质。在背侧丘脑内,两组输入神经元 最多的区域为背侧丘脑腹侧组,见图 4B,5B。背侧丘脑其 余区域也与初级运动皮质有解剖学连接,如背侧丘脑板内核 (intralaminar nuclei of the dorsal thalamus, ILM)、背侧丘脑背 内侧核 (medial group of the dorsal thalamus)。此外,初级运 动皮质也接受下丘脑干未定带 (zona incerta, ZI) 的神经元输 入, 见图 4B, 图 5B。

在中脑,两组输入神经元主要分布于纹状体与中脑运动 核团,如顶盖前区前核 (anterior pretectal nucleus, APN)、无 名质 (substantia innominata, SI)、苍白球 (globus pallidus, GP) 和外侧视前区 (lateral preoptic area,LPO),见图 4C,5C。

脊髓损伤后,全脑范围各脑区内有假性狂犬病毒携带的 绿色荧光标记的输入神经元数量无明显差异,见图 5。



图 注: 图 A 为大脑皮质输 入神经元(绿) 的分布; B 为 间脑输入神 经元(绿)的 分布: C 为中 脑输入神经 元(绿)的分 布。假手术组 与脊髓损伤组 小鼠初级运动 皮质的输入神 经元在全脑范 围内均有输入 神经元投射。 脑区注释: (1) 大脑皮质: MO 为躯体运 动区,SS为 躯体感觉区, RSP 为压后皮 质 区,AUD 为听觉区。(2) 间 脑: VENT 为背侧丘脑腹 侧群,ILM 为 背侧丘脑板内 核,MED 为 背侧丘脑背内 侧核,ZI 为未 定带。(3)中 脑: APN 为顶 盖前区前核, GP 为苍白球, LPO 为外侧视 前区, SI 为无 名质。



Figure 4 | Whole-brain distribution of pseudorabies virus-labelled input neurons of sham operation group and spinal cord injury group

中国组织工程研究



图 5 | 假手术组与脊髓损伤组小鼠全脑范围内各脑区假性狂犬病毒逆向 示踪标记的输入神经元百分比

Figure 5 | Percentages of pseudorabies virus-labelled input neurons in the whole brain of sham operation group and spinal cord injury group

3 讨论 Discussion

OTTOR

初级运动皮质是大脑执行自主运动指令的区域,其传出 神经纤维主要构成下行性运动传导束——皮质脊髓束,当其 完整性被破坏时将导致机体运动功能障碍。有相关研究证实, 脊髓损伤后,大脑皮质发生功能重塑,促进机体运动功能恢 复。为解析脊髓损伤后运动皮质功能重塑的神经回路结构基 础,该研究采用伪狂犬病毒标记初级运动皮质中皮质脊髓运 动神经元的输入神经元,定量分析皮质脊髓运动神经元相关 突触连接的改变。研究结果表明,来自躯体运动区和躯体感 觉区的输入神经元占比最高。初级运动皮质还接收对侧皮质、 基底节、丘脑、听觉皮质、前扣带回等区域的输入,与既往 研究相符合^[7-8]。脊髓损伤后,皮质脊髓运动神经元输入神 经元的比例以及数量在各个脑区中均无明显的变化。

脊髓损伤后,大脑皮质发生功能重塑主要体现在以下 2 个方面:一是神经可塑性,脊髓损伤可能导致下肢运动、感 觉和其他功能的受损。在这种情况下,大脑皮质会发生神经 可塑来尝试恢复或重新组织功能。这种可塑性可以表现为其 他部位的皮质区域重新分配功能,以弥补受损部位的功能缺 失。例如,大脑可能会增加对残存感觉通路的利用,以增强 受损区域周围的感觉功能^[9]。二是神经环路可塑性,脊髓损 伤后,大脑皮质还可以通过神经环路重组来尝试恢复功能。 这种环路重组可以包括形成新的神经连接路径或增强既有连 接,以绕过受损的脊髓区域并重新建立与肢体的通信。例如, 大脑可能会建立新的神经连接来通过非受损的通路激活运动 神经元,以尝试恢复受损肢体的运动功能^[3, 10-11]。功能磁共 振^[12]、电生理图谱构建^[13]、光遗传学图谱构建均发现脊髓 损伤后运动皮质的神经元及其环路可发生功能性代偿^[14-15], 但精确的解剖学神经环路机制目前尚不清楚。

当皮质完整性被破坏时,如在脑卒中、皮质灶状损伤模型中,皮质神经元突触连接发生改变。损伤初级运动皮质手 代表区,运动前区皮质向躯体感觉皮质的投射增多^[16];建立 小鼠脑卒中模型后8周,初级运动皮质与躯体感觉皮质外侧 区域神经元突触连接减少,与同侧纹状体、压后皮质中后部 连接增多^[8];当慢性外周神经损伤时,感觉皮质中皮质间的 研究原著

连接增多,丘脑皮质投射无明显改变^[17]。但上述研究所使用 神经元示踪方式均为于皮质内注射双向示踪剂(如霍乱毒素 亚基 B、生物素葡聚糖胺),经过基因编辑的病毒进行神经环 路绘制可提供更特异和精确的证据。其次,上述研究使用的 动物模型与此研究不相同,此研究所采用的是脊髓损伤模型, 其大脑皮质结构保持完整。脊髓损伤后初级运动皮质结构的 重塑取决于突触后膜以及突触前膜输入的改变。皮质脊髓运 动神经元是否会死亡,即突触后膜是否变化,一直存在争议。 HAINS 等^[18]提出大约 20% 的皮质脊髓运动神经元在脊髓损伤 后坏死; LEE 等^[19]发现脊髓损伤后运动皮质 TUNEL 染色细胞 增多;但有相关报道根据 HAINS 等^[18]提供的实验步骤与方 法并未发现脊髓损伤后皮质脊髓运动神经元的明显减少^[20]。

一些研究报道皮质脊髓运动神经元在脊髓损伤后并不会死 亡^[21-24]。除了皮质脊髓运动神经元的数量以外,神经元的形 态变化也可能引起突触后膜的改变。脊髓损伤后皮质脊髓运 动神经元会经历一系列形态学变化[18-19, 21, 25],如神经元细胞 缩小、皮质脊髓运动神经元树突棘密度减少^[26]、棘的长度和 直径减小等^[27]。此外,脊髓损伤后树突棘的变化具有异质性。 位于 Layer II / III 层的树突棘减少的数量比位于 Layer V 要少, 树突棘开始减少的时间要更长 [28],仍需更高分辨率的研究分 析脊髓损伤后突触后膜的变化。另一方面,突触前膜的输入 变化对初级运动皮质神经环路也有明显的影响。一项体外研 究证明,轴突损伤后神经元抑制性输入突触减少,同时促进 兴奋性突触前膜释放谷氨酸增多^[29]。但暂无文献报道脊髓损 伤后神经元树突棘变化以及突触重塑的时间窗,且突触的重 塑可能是一个动态的过程。因此,作者推测,脊髓损伤后皮 质脊髓运动神经元与输入神经元仍保有解剖学连接,运动皮 质的功能重塑部分依赖于运动神经元相关突触连接的改变, 但仍需要更多损伤后不同时间节点的研究、更高分辨率或实 时的突触结构观测进行验证。

神经元胞体通过感知逆向损伤信号,例如钙离子浓度的 变化^[30],而调控转录组表达情况。目前,关于脊髓损伤后皮 质脊髓运动神经元转录组的调控研究表明,最先改变的转录 组基因主要与细胞坏死、损伤反应、细胞骨架重组等生物过 程相关^[31];在损伤 10-21 d内,皮质脊髓运动神经元重编程, 其转录组与 E18 d 的皮质脊髓运动神经元具有相关性^[32]。一 些与细胞骨架重组相关的基因,如 Rab13^[33]、Coronin 1b^[34]、 FGF22^[35]、STAT3等^[36],与神经元轴突的再生、重塑相关,调 控相关的基因可促进脊髓损伤后皮质脊髓束的重塑与功能恢 复。在脑卒中模型中,梗死区域皮质神经元的输入神经元的 转录组发生明显改变,差异基因主要与神经突出芽、细胞骨 架重组、树突棘生长等生物过程相关^[37],促进皮质结构的重 组。作者推测,运动皮质的功能重塑仅部分依赖于运动神经 元相关突触连接的改变, 而更多地与受损神经元自身的转录 调控变化有关。仍需进一步研究受损神经元或受损神经元的 输入神经元在功能重塑中的基因组表达调控。

据国内外研究报道,针对神经环路重塑两级节点有不同 的治疗策略,如康复治疗^[38-39]、经颅脑刺激促进皮质重塑从 而实现脊髓损伤功能恢复^[40-41],以及应用组织工程于脊髓损 伤处填补空洞^[42]、促进神经干细胞迁移、分化^[43]、调节脊 髓损伤微环境等^[44]。基于此研究脊髓损伤后运动皮质上游神 经元的输入无明显变化的结果显示,皮质功能重塑更多地依 赖皮质神经元转录组调控而促进功能恢复。应加大对脊髓损 伤处组织修复或者结合二级治疗策略促进功能修复的研究。

综上所述,该研究采用跨单突触病毒标记策略,解析了 受损的运动皮质神经元与上游输入神经元之间的突触输入模 式。研究结果揭示了皮质脊髓神经元自身可塑性,而非环路 可塑性在功能代偿中的重要作用。这为理解神经损伤后运动 皮质的重塑和功能代偿提供了新的理论框架,也为制定有效 的康复治疗策略提供了新的依据。

结论:脊髓损伤后,各脑区内支配皮质脊髓运动神经元 的输入神经元数量无明显变化,提示皮质脊髓束受损后初级 运动皮质的功能重塑可能不仅依赖于受损皮质脊髓运动神经 元相关突触输入的改变,而更多地与受损神经元自身的转录 调控变化有关。

作者贡献:戴家峰负责实验与数据统计、图表制作、文献收集以及撰写文章, 王丽昭、戴家峰负责设计课题,韩齐负责文章审阅以及文章校对,沈洪兴负责文件审 阅以及课题资助。

利益冲突:文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。 开放获取声明:这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》"署名-非商业性使用-相同方式共享4.0"条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业 性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、 打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合 法用途。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和 医学期刊编辑与发表的推荐规范》; 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进 行3次文字和图表查重; 文章经小同行外审专家双盲审稿,同行评议认为文章符合 期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- BENEDETTI B, WEIDENHAMMER A, REISINGER M, et al. Spinal Cord Injury and Loss of Cortical Inhibition. Int J Mol Sci. 2022;23(10):5622.
- [2] WELNIARZ Q, DUSART I, ROZE E. The corticospinal tract: Evolution, development, and human disorders. Dev Neurobiol. 2017;77(7):810-829.
- [3] NISHIMURA Y, ISA T. Cortical and subcortical compensatory mechanisms after spinal cord iniury in monkeys. Exp Neurol. 2012;235(1):152-161.
- [4] COURTINE G, GERASIMENKO Y, VAN DEN BRAND R, et al. Transformation of nonfunctional spinal circuits into functional states after the loss of brain input. Nat Neurosci. 2009;12(10):1333-1342.
- [5] WICKERSHAM IR, LYON DC, BARNARD RJ, et al. Monosynaptic restriction of transsynaptic tracing from single, genetically targeted neurons. Neuron. 2007; 53(5):639-647.
- [6] ZHANG S, XU M, CHANG WC, et al. Organization of long-range inputs and outputs of frontal cortex for top-down control. Nat Neurosci. 2016;19(12):1733-1742.
- [7] DONOGHUE JP, PARHAM C. Afferent connections of the lateral agranular field of the rat motor cortex. J Comp Neurol. 1983;217(4):390-404.
- [8] BROWN CE, AMINOLTEJARI K, ERB H, et al. In vivo voltage-sensitive dye imaging in adult mice reveals that somatosensory maps lost to stroke are replaced over weeks by new structural and functional circuits with prolonged modes of activation within both the peri-infarct zone and distant sites. J Neurosci. 2009;29(6):1719-1734.
- [9] FOUAD K, PEDERSEN V, SCHWAB ME, et al. Cervical sprouting of corticospinal fibers after thoracic spinal cord injury accompanies shifts in evoked motor responses. Curr Biol. 2001;11(22):1766-1770.
- [10] NISHIMURA Y, ISA T. Compensatory changes at the cerebral cortical level after spinal cord injury. Neuroscientist. 2009;15(5):436-444.
- [11] NISHIMURA Y, ONOE H, MORICHIKA Y, et al. Time-dependent central compensatory mechanisms of finger dexterity after spinal cord injury. Science. 2007;318(5853):1150-1155.
- [12] HAWASLI AH, RUTLIN J, ROLAND JL, et al. Spinal Cord Injury Disrupts Resting-State Networks in the Human Brain. J Neurotrauma. 2018;35(6):864-873.
- [13] MARTINEZ M, DELCOUR M, RUSSIER M, et al. Differential tactile and motor recovery and cortical map alteration after C4-C5 spinal hemisection. Exp Neurol. 2010;221(1):186-197.

[14] QIAN J, WU W, XIONG W, et al. Longitudinal Optogenetic Motor Mapping Revealed Structural and Functional Impairments and Enhanced Corticorubral Projection after Contusive Spinal Cord Injury in Mice. J Neurotrauma. 2019;36(3):485-499.

Chinese Journal of Tissue Engineering Research

中国组织工程研究

- [15] HILTON BJ, ANENBERG E, HARRISON TC, et al. Re-Establishment of Cortical Motor Output Maps and Spontaneous Functional Recovery via Spared Dorsolaterally Projecting Corticospinal Neurons after Dorsal Column Spinal Cord Injury in Adult Mice. J Neurosci. 2016;36(14):4080-4092.
- [16] DANCAUSE N, BARBAY S, FROST SB, et al. Extensive cortical rewiring after brain injury. J Neurosci. 2005;25(44):10167-10179.
- FLORENCE SL, TAUB HB, KAAS JH. Large-scale sprouting of cortical connections after peripheral injury in adult macaque monkeys. Science. 1998;282(5391):1117-1121.
 HAINS BC, BLACK JA, WAXMAN SG. Primary cortical motor neurons undergo
- HAINS BC, BLACK JA, WAXIMAN SG, Primary Contral motor neurons intergo apoptosis after axotomizing spinal cord injury. J Comp Neurol. 2003;462(3):328-341.
 LEE BH, LEE KH, KIM UJ, et al. Injury in the spinal cord may produce cell death in
- the brain. Brain Res. 2004;1020(1-2):37-44.
 NIELSON JL. STRONG MK. STEWARD O. A reassessment of whether cortical motor
- neurons die following spiral cord injury. J Comp Neurol. 2011;519(14):2852-2869.
 WANNER T. SCHMIDLIN E. BLOCH J. et al. A unilateral section of the corticospinal
- [21] WANNIER T, SCHMIDLIN E, BLOCH J, et al. A unilateral section of the corticospinal tract at cervical level in primate does not lead to measurable cell loss in motor cortex. J Neurotrauma. 2005;22(6):703-717.
- [22] NIELSON JL, SEARS-KRAXBERGER I, STRONG MK, et al. Unexpected survival of neurons of origin of the pyramidal tract after spinal cord injury. J Neurosci. 2010; 30(34):11516-11528.
- [23] MCBRIDE RL, FERINGA ER, GARVER MK, et al. Retrograde transport of fluoro-gold in corticospinal and rubrospinal neurons 10 and 20 weeks after T-9 spinal cord transection. Exp Neurol. 1990;108(1):83-85.
- [24] BARRON KD, DENTINGER MP, POPP AJ, et al. Neurons of layer Vb of rat sensorimotor cortex atrophy but do not die after thoracic cord transection. J Neuropathol Exp Neurol. 1988;47(1):62-74.
- [25] TAKATA Y, YAMANAKA H, NAKAGAWA H, et al. Morphological changes of large layer V pyramidal neurons in cortical motor-related areas after spinal cord injury in macaque monkeys. Sci Rep. 2023;13(1):82.
- [26] NAGENDRAN T, TAYLOR AM. Unique Axon-to-Soma Signaling Pathways Mediate Dendritic Spine Loss and Hyper-Excitability Post-axotomy. Front Cell Neurosci. 2019;13:431.
- [27] KIM BG, DAI HN, MCATEE M, et al. Remodeling of synaptic structures in the motor cortex following spinal cord injury. Exp Neurol. 2006;198(2):401-415.
- [28] GHOSH A, PEDUZZI S, SNYDER M, et al. Heterogeneous spine loss in layer 5 cortical neurons after spinal cord injury. Cereb Cortex. 2012;22(6):1309-1317.
- [29] NAGENDRAN T, LARSEN RS, BIGLER RL, et al. Distal axotomy enhances retrograde presynaptic excitability onto injured pyramidal neurons via trans-synaptic signaling. Nat Commun. 2017;8(1):625.
- [30] CHO Y, SLOUTSKY R, NAEGLE KM, et al. Injury-induced HDAC5 nuclear export is essential for axon regeneration. Cell. 2013;155(4):894-908.
- [31] KRUSE F, BOSSE F, VOGELAAR CF, et al. Cortical gene expression in spinal cord injury and repair: insight into the functional complexity of the neural regeneration program. Front Mol Neurosci. 2011;4:26.
- [32] POPLAWSKI GHD, KAWAGUCHI R, VAN NIEKERK E, et al. Injured adult neurons regress to an embryonic transcriptional growth state. Nature. 2020;581(7806):77-82.
- [33] BRADKE F, FAWCETT JW, SPIRA ME. Assembly of a new growth cone after axotomy: the precursor to axon regeneration. Nat Rev Neurosci. 2012;13(3):183-193.
- [34] DI GIOVANNI S, DE BIASE A, YAKOVLEV A, et al. In vivo and in vitro characterization of novel neuronal plasticity factors identified following spinal cord injury. J Biol Chem. 2005;280(3):2084-2091.
- [35] ALJOVIĆ A, JACOBI A, MARCANTONI M, et al. Synaptogenic gene therapy with FGF22 improves circuit plasticity and functional recovery following spinal cord injury. EMBO Mol Med. 2023;15(2):e16111.
- [36] WANG Z, MEHRA V, SIMPSON MT, et al. KLF6 and STAT3 co-occupy regulatory DNA and functionally synergize to promote axon growth in CNS neurons. Sci Rep. 2018;8(1):12565.
- [37] URBAN ET 3RD, BURY SD, BARBAY HS, et al. Gene expression changes of interconnected spared cortical neurons 7 days after ischemic infarct of the primary motor cortex in the rat. Mol Cell Biochem. 2012;369(1-2):267-286.
- [38] SANDROW-FEINBERG HR, HOULÉ JD. Exercise after spinal cord injury as an agent for neuroprotection, regeneration and rehabilitation. Brain Res. 2015;1619:12-21.
- [39] CHENG X, MAO GP, HU WJ, et al. Exercise combined with administration of adipose-derived stem cells ameliorates neuropathic pain after spinal cord injury. Neural Regen Res. 2023;18(8):1841-1846.
- [40] KUMRU H, FLORES A, RODRÍGUEZ-CAÑÓN M, et al. Non-invasive brain and spinal cord stimulation for motor and functional recovery after a spinal cord injury. Rev Neurol. 2020;70(12):461-477.
- [41] SONG QF, CUI Q, WANG YS, et al. Mesenchymal stem cells, extracellular vesicles, and transcranial magnetic stimulation for ferroptosis after spinal cord injury. Neural Regen Res. 2023;18(9):1861-1868.
- [42] LUO Y, FAN L, LIU C, et al. An injectable, self-healing, electroconductive extracellular matrix-based hydrogel for enhancing tissue repair after traumatic spinal cord injury. Bioact Mater. 2021;7:98-111.
- [43] LI G, ZHANG B, SUN JH, et al. An NT-3-releasing bioscaffold supports the formation of TrkC-modified neural stem cell-derived neural network tissue with efficacy in repairing spinal cord injury. Bioact Mater. 2021;6(11):3766-3781.
- [44] LIU H, XU X, TU Y, et al. Engineering Microenvironment for Endogenous Neural Regeneration after Spinal Cord Injury by Reassembling Extracellular Matrix. ACS Appl Mater Interfaces. 2020;12(15):17207-17219.

(责任编辑: ZM, MZH, ZN, QY)