

脊髓损伤后神经轴突导向分子 Semaphorin 3A 表达的研究

王国毓,程志坚,贺西京,杨宝辉,李浩鹏
(西安交通大学第二医院骨二科,陕西 西安 710004)

【摘要】 目的: 研究后脊髓损伤大鼠 Semaphorin 3A 表达的变化, 探索脊髓损伤后轴突再生受到抑制的可能机制。方法: 40 只雌性健康 SD 大鼠, 8 周龄, 体质量(210.00±9.88) g, 随机分为对照组(A 组, 20 只)和模型组(B 组, 20 只)。A 组仅切开 T₁₀ 全椎板及 T₉、T₁₁ 部分椎板, 对脊髓未作其他处理; B 组切开 T₁₀ 全椎板及 T₉、T₁₁ 部分椎板采用脊髓横切法制作脊髓损伤的动物模型。两组分别在术后 3、7、14、28、42 d(每组每个时间点 4 只)进行灌注、获取脊髓组织, 然后进行 HE 染色, 同时按照 SP 试剂盒的操作步骤进行 Semaphorin 3A 的表达。结果: 单纯脊髓横切损伤后, 损伤局部发生出血坏死, 局部水肿, 神经变性、坏死以及囊腔形成, 胶质细胞增生胶质瘢痕形成。对照组 Semaphorin 3A 只在灰质区有低水平表达。模型组术后 3 d 脊髓损伤损伤区 Semaphorin 3A 无表达, 14 d 时脊髓损伤损伤区 Semaphorin 3A 的表达显著增加, 处在较高的水平, 28 d 时 Semaphorin 3A 的表达呈中等水平, 42 d 时 Semaphorin 3A 阳性表达恢复到正常水平。结论: 脊髓损伤后 Semaphorin 3A 表达升高, 可能是抑制轴突再生的机制之一。

【关键词】 脊髓损伤; 组织病理; Semaphorin 3A

中图分类号: R681.5

DOI: 10.12200/j.issn.1003-0034.2021.04.015

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Expression of Semaphorin 3A after spinal cord injury WANG Guo-yu, CHENG Zhi-jian, HE Xi-jing, YANG Bao-hui, and LI Hao-peng. The Second Department of Orthopaedics, the Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi, China

ABSTRACT Objective: To investigate expression of Semaphorin 3A in rats after spinal cord injury and explore possible mechanism of inhibiting of axonal regeneration after SCI. **Methods:** Forty healthy female SD rats, 8 weeks old, weighing (210.00±9.88) g, were randomly divided into control group (20 rats in group A) and model group (20 rats in group B). In control group, removal of T₁₀ lamina and partial removal of T₉ and T₁₁ lamina were performed, and no further operation was performed on spinal cord (pseudo-operation). In model group, the total T₁₀ and partial T₉, T₁₁ partial lamina were incised and the spinal cord transection was performed to create animal models of spinal cord injury. The rats were perfused and spinal cord tissue obtained at 3, 7, 14, 28 and 42 days after surgery (4 rats in each group at each time point), respectively, and then HE staining was performed. Meanwhile, the expression of Semaphorin 3A was detected in accordance with the protocol of SP kit.

Results: After a simple spinal cord transection injury, hemorrhagic necrosis, localized edema, neurodegeneration, necrosis, and cyst formation occurred in the injured area, and glial scar formation occurred in glial cells. Semaphorin 3A expression levels in control group was low in the gray matter area. There was no expression of Semaphorin 3A in the injured area of spinal cord injury in model group 3 days after operation. On the 14th day, the expression of Semaphorin 3A in the injured area of spinal cord injury increased significantly and was at a high level. On the 28th day, the expression of Semaphorin 3A was moderate. On the 42th day, the positive expression of Semaphorin 3A returned to normal level. **Conclusion:** The increased expression of Semaphorin 3A after spinal cord injury may be one of the mechanisms that inhibit axonal regeneration.

KEYWORDS Spinal cord injury; Histopathology; Semaphorin 3A

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是一种临床上常见的创伤,可致终生残疾并给个人、家庭及社会

都带来了巨大损失和负担^[1]。近年来脊髓损伤的发病率呈现逐年上升^[2]。成年哺乳动物脊髓损伤后的神经再生受限,轴突很少能长距离再生并重新和靶组织形成新的突触,造成永久性的功能丧失^[3]。然而成年动物的轴突能够在外周神经移植物中再生,说明中枢神经系统神经元并不缺乏再生的潜能,而微环境似乎是影响再生的重要因素^[4]。近年来研究发

基金项目:陕西省 2018 年重点研发计划(编号:2018SF-124)
Fund program: Shaanxi Key Research and Development Plan in 2018 (No. 2018SF-124)
通讯作者:贺西京 E-mail: xijing_h@vip.om.com
Corresponding author: HE Xi-jing E-mail: xijing_h@vip.tom.com

现,在中枢神经系统损伤后 Semaphorin 3A 的表达明显升高,参与构成抑制受损后轴突再生的微环境,对中枢系统神经元和胶质细胞均有明显的排斥作用,同时影响突触的形成^[5-6]。本研究采用脊髓横断法制作脊髓损伤的动物模型,观察脊髓损伤后 Semaphorin 3A 表达的变化,探索脊髓损伤后轴突再生受到抑制的可能机制,报告如下。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

SP 免疫组化染色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),Rabbit Ant-SEMA3A POLYCLONAL ANTIBODY (sc-28867) SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY,德国 Leica 显微镜及 Q550CW 图像信号采集与分析系统。

1.2 动物及分组

成年雌性健康 SD 大鼠 40 只,8 周龄,体质量(210.00±9.88)g,购自西安交通大学医学院实验动物中心,应用随机对照表将其随机分为对照组(A 组)20 只和模型组(B 组)20 只。本项目动物实验过程中将严格遵守西安交通大学医学部生物医学伦理委员会的相关要求,最大限度地降低实验动物痛苦,包括严格遵守实验动物处死步骤、合理脊髓损伤相关后护理等。

1.3 实验方法

1.3.1 脊髓横断模型的建立 按照脊髓横切法^[7-8]制作脊髓损伤的动物模型。两组动物均应用腹腔注射 3%水合氯醛(3 ml/kg 体重)麻醉动物。麻醉成功后将动物俯卧位固定于操作台上,手术野周围剪毛,常规碘伏消毒。取以 T₁₀ 为中心的后正中切口,长约 3 cm,依次切开皮肤、皮下组织,钝性剥离椎旁肌肉,显露棘突和椎板,切除 T₁₀ 棘突和椎板,切除棘突及 T₉、T₁₁ 部分椎板,B 组显露脊髓,剪开硬膜及软膜,并将 4 号丝线置于待切断脊髓的腹侧硬膜外。以剃须刀片于预置线头侧 0.5 mm(T₁₀ 水平)将脊髓横断,将预置线由腹侧向背侧提起,确保脊髓完全横断;A 组仅仅切开 T₁₀ 全椎板及 T₉、T₁₁ 部分椎板,对脊髓未作其他处理,明胶海绵轻柔压迫止血。随后缝合切口。术后动物,每日挤尿 2~3 次,给予抗感染、预防褥疮等处。

1.3.2 光镜标本的制作与观察 术后 3、7、14、28、42 d(每组每个时间点 4 只动物)进行灌注、获取脊髓组织。实验动物麻醉生效后,打开胸腔后显露心脏,经左心室、主动脉插管,先灌注生理盐水 200 ml,剪开右心耳放血,灌注至肠系膜血管变白为止。再先快后慢灌注含 4%多聚甲醛 0.1 m 磷酸盐缓冲液共

500 ml 进行前固定,总时间约 2 h,完整取出脊髓全长。取距断段头尾侧各 0.5 cm 的脊髓,投入固定液中继续固定 24 h 后,修剪并石蜡包埋切片。

1.4 观察项目与方法

两组在术后 1、3、7、14、28、42 d 每个标本损伤区和头尾侧各取 4 张切片,进行 HE 染色,光镜下观察;按照 SP 试剂盒的操作步骤进行 Semaphorin 3A 免疫组化检测。显微镜下观察,并用图像分析议对阳性细胞进行计数 Leica-Q500IW 上进行图像分析。

1.5 统计学处理

对两组不同时间点脊髓切片中 Semaphorin 3A 的表达结果,在 Leica-Q500IW 上进行图像分析,实验数据采用 SPSS 13.0 软件进行统计处理。样本算术平均数、标准差、概率值分别以 \bar{x} 、 s 、 P 表示。两个均数比较采用独立样本 t 检验。以 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 代表相差显著和相差非常显著。

2 结果

2.1 大体观察结果

A 组未见异常;B 组动物行 T₁₀ 脊髓横断后,出现尿潴留,大便失禁,每日需人工挤尿 2~3 次;大鼠双后肢拖步爬行,不能站立,部分动物膝踝关节处出现溃疡和褥疮,呈典型失神经支配征象。

2.2 HE 染色结果

术后 1、3 d 标本可见脊髓损伤部位的脊髓断端碎裂,形成组织碎片;缺损区内散布着组织碎片、残渣以及数量不等的红细胞,炎性细胞浸润;可见散在的斑片状出血区域及神经元坏死。14 d 可见髓鞘组织坏死,多数神经元变性或消失,星性胶质细胞大量增生。28 d 时脊髓损伤区纤维走行结构紊乱,方向扭曲、不一致,有明显空洞存在,有轴突再生。42 d 时模型组损伤区有大量的胶质瘢痕增生,有囊性变,有许多大小不等的空洞形成,神经细胞数目较少,组织结构紊乱,神经纤维含量少且扭曲(图 1)。

2.3 Semaphorin 3A 的免疫组化染色

对照组只在灰质区有低水平表达。模型组术后 3 d 脊髓损伤区免疫组化染色显示 Semaphorin 3A 无表达。7 d 时脊髓损伤区可见 Semaphorin 3A 呈低水平表达。14 d 时脊髓损伤区 Semaphorin 3A 的表达显著增加,处在较高的水平。脊髓损伤 28 d 时 Semaphorin 3A 呈中等水平表达,比 14 d 时明显降低。到 42 d 时 Semaphorin 3A 阳性表达恢复到正常水平(图 2)。术后不同时间点两组脊髓 Semaphorin 3A 检测结果见表 1。

3 讨论

3.1 Semaphorin 3A 在脊髓损伤后的表达

Semaphorin 是一类由分泌信号分子和细胞结合

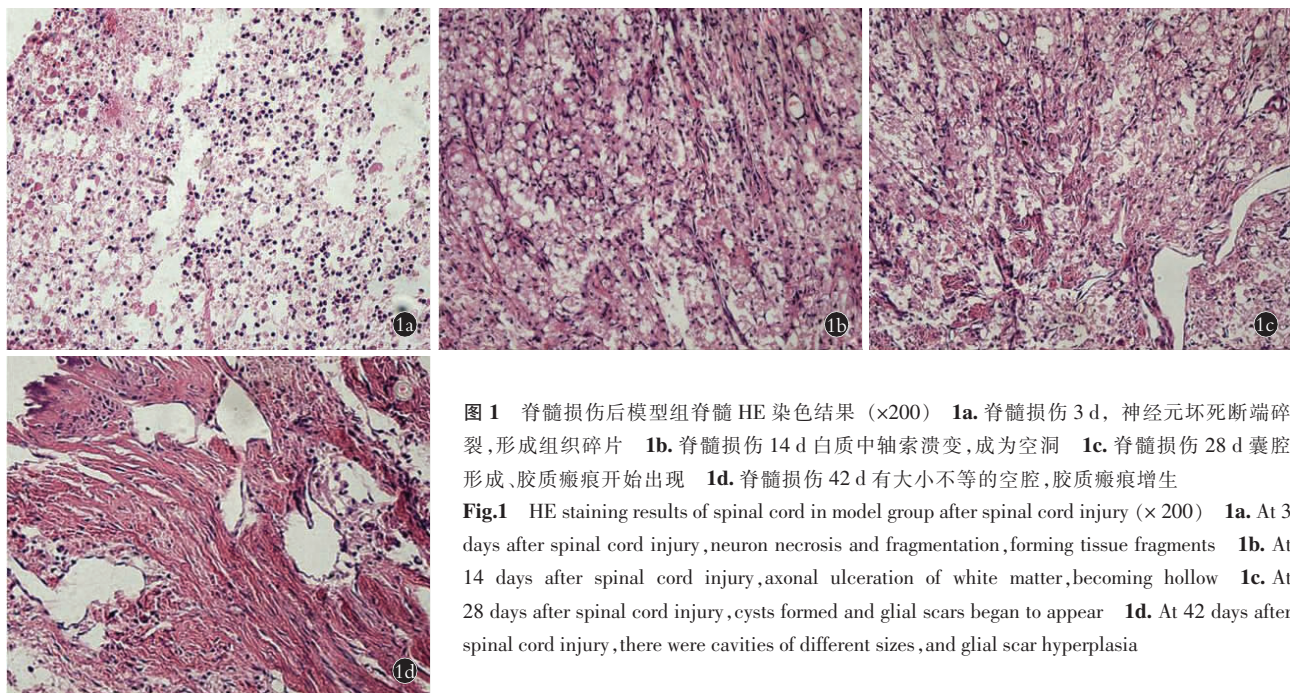


图 1 脊髓损伤后模型组脊髓 HE 染色结果 (×200) 1a. 脊髓损伤 3 d, 神经元坏死断端碎裂, 形成组织碎片 1b. 脊髓损伤 14 d 白质中轴索溃变, 成为空洞 1c. 脊髓损伤 28 d 囊腔形成、胶质瘢痕开始出现 1d. 脊髓损伤 42 d 有大小不等的空腔, 胶质瘢痕增生

Fig.1 HE staining results of spinal cord in model group after spinal cord injury (× 200) 1a. At 3 days after spinal cord injury, neuron necrosis and fragmentation, forming tissue fragments 1b. At 14 days after spinal cord injury, axonal ulceration of white matter, becoming hollow 1c. At 28 days after spinal cord injury, cysts formed and glial scars began to appear 1d. At 42 days after spinal cord injury, there were cavities of different sizes, and glial scar hyperplasia

表 1 两组术后不同时间点 Semaphorin 3A 检测结果 (x̄±s, ng/ml)

Tab.1 Comparison of Semaphorin 3A at different time points after surgery between two groups(x̄±s, ng/ml)

组别	鼠数	术后 7 d	术后 14 d	术后 28 d	术后 42 d
对照组	4	4136±437	6433±724	4682±511	2117±285
模型组	4	1892±201 ^①	1992±193 ^②	1868±189 ^③	1937±210 ^④

注: 与对照组比较, ①t=7.44, P<0.05; ②t=10.32, P<0.01; ③t=8.46, P<0.01; ④t=0.59, P>0.05

Note: Compared with control group, ①t=7.44, P<0.05; ②t=10.32, P<0.01; ③t=8.46, P<0.01; ④t=0.59, P>0.05

信号分子组成的家族, 共分为 8 类, 由一个常见的 500 个氨基酸信号域的特定结构来定义。Semaphorin 3A 属于第 3 类 Semaphorin 家族, 是第一个在脊椎动物中发现的 Semaphorin 家族成员^[9]。Semaphorin 3A 在神经发育期抑制或排斥轴突生长锥, 影响生长锥伸展方向, 引导和新突触连接的形成, 确保其向靶组织定向生长^[6]。研究发现, 中枢神经系统损伤后 Semaphorin 3A 的表达明显升高^[10]。本实验结果显示: 术后 1、3 d 脊髓损伤损伤区免疫组化染色显示 Semaphorin 3A 无表达。7 d 时脊髓损伤区可见 Semaphorin 3A 呈低水平表达。14 d 时脊髓损伤区 Semaphorin 3A 的表达显著增加, 处在较高的水平。脊髓损伤 28 d 时 Semaphorin 3A 的表达呈中等水平表达, 比 14 d 时明显降低; 到 42 d 时 Semaphorin 3A 阳性表达恢复到正常水平, 与其结论一致。

3.2 Semaphorin 3A 与胶质瘢痕

近年来许多实验表明, 胶质瘢痕对 Semaphorin 的表达分泌关系密切^[11], Pasterkamp 等^[12]发现成年大鼠嗅球以及脊髓损伤后瘢痕组织中 Semaphorin 3A 及其受体的 mRNA 水平升高, 对这些细胞特性的进一步双标记发现, 大部分 Semaphorin 3A mRNA 阳性细胞位于瘢痕的核心部位, 表达成纤维细胞特有的蛋白, 如 ED14、ED15, 却不表达雪旺细胞标志物 S100。推测这些阳性细胞可能来源于脑脊膜成纤维细胞, Semaphorin 3A 的表达增加一方面直接抑制或排斥轴突生长, 构成胶质瘢痕分子性屏障; De Winter 等^[10]研究认为, 在脊髓横断和脊髓挫伤的大鼠应用原位杂交及蛋白印迹技术, 发现在脊髓横断和脊髓挫伤损伤部位 Semaphorin 3A 表达明显升高, 脊髓横断比脊髓挫伤的表达高, 认为 Semaphorin 3A 阳性成纤维细胞位于瘢痕的核心部位及损伤的周围, 认为阳性细胞可能来源于脑脊膜成纤维细胞。另一方面 Semaphorin 3A 与星形胶质细胞表面的受体结合, 调节星形胶质细胞的迁移、增殖和分化, 促进胶质瘢痕形成, 构成胶质瘢痕物理性屏障^[13], 与中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 不同, 外周神经组织损伤时 Semaphorin 3A 的表达下降, 允许新生轴突向远端神经残体延伸, 为周围神经系统 (peripheral nervous system, PNS) 再生提供条件^[14]。国内外有学者发现^[15]: 体外培养的脊神经后角的神经节细胞 (dorsal root ganglion, DRG) 细胞生长冠末端膨大成帆幕状, 有突起向四周伸展, 加入神经生长抑制因子后生长冠末端萎缩。再加入抗 Collapsin 1 的抗血清后, 原来

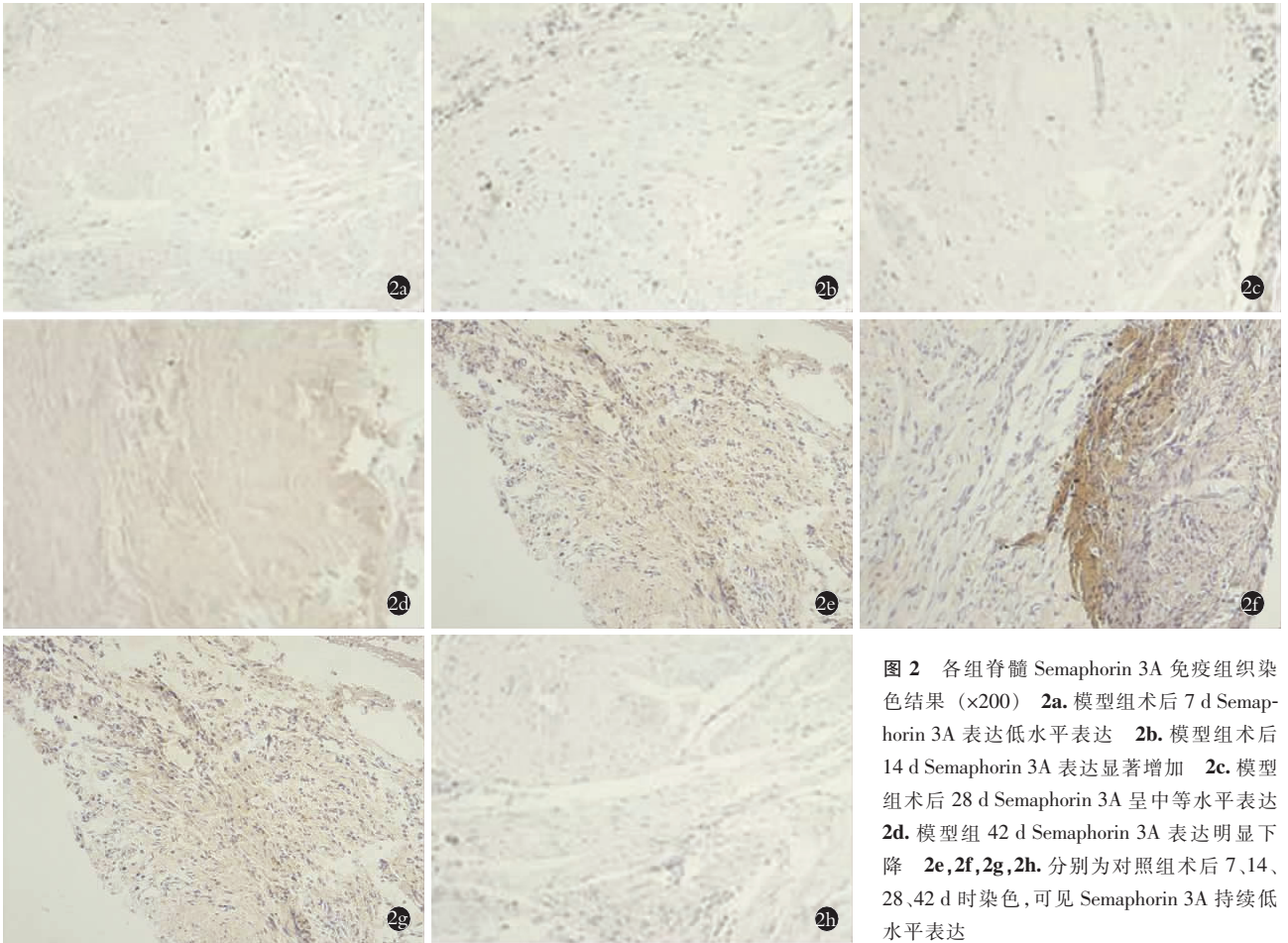


图 2 各组脊髓 Semaphorin 3A 免疫组织染色结果 (×200) 2a. 模型组术后 7 d Semaphorin 3A 表达低水平表达 2b. 模型组术后 14 d Semaphorin 3A 表达显著增加 2c. 模型组术后 28 d Semaphorin 3A 呈中等水平表达 2d. 模型组 42 d Semaphorin 3A 表达明显下降 2e, 2f, 2g, 2h. 分别为对照组术后 7、14、28、42 d 时染色, 可见 Semaphorin 3A 持续低水平表达

Fig.2 Semaphorin 3A immunostaining results

of spinal cord in each group (×200) 2a. The expression of Semaphorin 3A in model group at 7 d after surgery 2b. The expression of Semaphorin 3A increased significantly in model group at 14 days after surgery 2c. The expression of Semaphorin 3A was moderate at 28 days after surgery 2d. The expression of Semaphorin 3A decreased significantly in model group at 42 d after surgery 2e, 2f, 2g, 2h. Stained at 7, 14, 28, and 42 days after surgery in control group respectively, expression of Semaphorin 3A remained low

萎缩的生长冠又重新伸展, 而加入它的免疫前血清和去除抗体的抗血清对萎缩反应没有影响。所以, 认为天然的和重组的 Collapsin 1 都能导致生长冠的萎缩。这种致萎缩活性可被抗 Collapsin 1 的抗体所阻断。也证明了 Semaphorin 3A 对 DRG 细胞生长冠抑制作用。脊髓损伤后损伤部位 Semaphorin 3A 表达明显升高, Semaphorin 3A 的抑制剂 SM-216289 已被证明可以促进轴突再生, 增强雪旺细胞向病变部位的迁移, 抑制细胞凋亡, 并显著改善成年大鼠脊髓横断后肢的功能恢复。

3.3 Semaphorin 3A 对轴突再生的抑制作用

Semaphorin 3A 具有干扰神经细胞的保护, 诱导神经元凋亡, 排斥轴突生长, 抑制损伤部位血管再生, 降低巨噬细胞对脊髓损伤部位髓磷脂的清除、抑制髓鞘的再生等作用^[16-17]。因此, 通过抑制 Semaphorin 3A 表达, 解除 Semaphorin 3A 对中枢神经再生的抑制作用, 改善胶质瘢痕化学分子性屏障

作用及胶质瘢痕物理性屏障, 从而允许新生轴突向远端延伸, 促进脊髓损伤后轴突恢复, 从而促进损伤后中枢神经的再生, 可能是治疗脊髓损伤的一种方法。

参考文献

- [1] Ropper AE, Ropper AH. Acute spinal cord compression [J]. N Engl J Med, 2017, 376(14): 1358-1369.
- [2] Selvarajah S, Hammond ER, Haider AH, et al. The burden of acute traumatic spinal cord injury among adults in the United States: an update [J]. Neurotrauma, 2014, 31(3): 228-238.
- [3] Hayta E, Elden H. Acute spinal cord injury: A review of pathophysiology and potential of non-steroidal anti-inflammatory drugs for pharmacological intervention [J]. J Chem Neuroanat, 2018, 87(1): 25-31.
- [4] David S, Aguayo AJ. Axonal elongation into peripheral nervous system "bridges" after central nervous system injury in adult rats [J]. Science, 1981, 214: 931-933.
- [5] Quraisha S, Forbes LH, Andrews MR. The extracellular environment of the CNS: influence of plasticity, sprouting and axonal regeneration after spinal cord injury [J]. Neural Plast, 2018, (11): 1-18.
- [6] Andrews WD, Barber M, Nemitz M, et al. Semaphorin 3A-neu-

- ropilin1 signalling is involved in the generation of cortical inter neurons[J]. Brain Struct Funct, 2017, 222(5): 2217-2233.
- [7] 王春婷, 游思维, 刘惠玲, 等. 成年大鼠 4 种脊髓全横断方法的比较[J]. 第四军医大学学报, 2002, 23(1): 965-968.
WANG CT, YOU SW, LIU HL, et al. Comparison of four spinal cord transecting methods in adult rats[J]. Di Si Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 23(11): 965-968. Chinese.
- [8] Steward O, Willenberg R. Rodent spinal cord injury models for studies of axon regeneration[J]. Exp Neurol, 2017, 287(Pt 3): 374-383.
- [9] Pasterkamp RJ, Giger RJ. Semaphorin function in neural plasticity and disease[J]. Curr Opin Neurobiol, 2009, 19(3): 263-274.
- [10] De Winter F, Oudega M, Lankhorst AJ, et al. Injury induced class 3 Semaphorin expression in the rat spinal cord[J]. Exp Neurol, 2002, 175(1): 61-75.
- [11] Sandvig A, Berry M, Barrett LB, et al. Myelin reactive glia and scar derived CNS axon growth inhibitors: expression, receptor signaling, and correlation with axon regeneration[J]. Glia, 2004, 46(3): 225-251.
- [12] Pasterkamp RJ, Giger RJ, Ruitenberg MJ, et al. Expression of the gene encoding the chemorepellent Semaphorin III is induced in the fibroblast component of neural scar tissue formed following injuries of adult but not neonatal CNS. Mol Cell [J]. Neurosci, 1999, 13(2): 143-166.
- [13] Raper JA. Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates[J]. Curr Opin Neurobiol, 2000, 10(1): 88-94.
- [14] Holtmaat AJ, Gorter JA, De Wit J, et al. Transient downregulation of Semaphorin 3A mRNA in a rat model for temporal lobe epilepsy. A novel molecular event potentially contributing to mossy fiber sprouting[J]. Exp Neurol, 2003, 182(1): 142-150.
- [15] Nakanishi T, Fujita Y, Yamashita T. Neuropilin-1-mediated pruning of corticospinal tract fibers is required for motor recovery after spinal cord injury[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(2): 67-78.
- [16] Mecollari V, Nieuwenhuis B, Verhaagen J. A perspective on the role of class III semaphorin in signaling in central nervous system trauma[J]. Front Cell Neurosci, 2014, 8: 328.
- [17] Syed YA, Hand E, Mobius W, et al. Inhibition of CNS remyelination by the presence of Semaphorin 3A[J]. J Neurosci, 2011, 31(10): 3719-3728.

(收稿日期: 2020-04-12 本文编辑: 王宏)

颈椎前路融合手术中钢板摆放角度对颈椎稳定性影响的有限元分析

武建超, 师政伟, 潘亦欣, 李绍平, 周建伟, 汪玉良
(兰州大学第二医院骨科, 甘肃 兰州 730030)

【摘要】 目的: 利用有限元分析的方法, 比较颈椎前路融合手术中钢板偏离颈椎长轴与钢板标准摆放的生物力学性能。方法: 选取一名健康女性志愿者并进行 CT 扫描(C₁-T₁), 应用 Mimics 19.0, Geomagic Studio 2015, Solidworks 2018, Ansys Workbench 17.2 等软件建立下颈椎(C₃-C₇)模型进而验证模型的可靠性, 随后置入不同角度、不同长度的颈前路钢板, 从而建立颈椎前路椎间盘切除减压融合术(anterior cervical discectomy fusion, ACDF)模型, 在 C₃ 上施加 73.6 N 轴向压力及 1 NM 的纯力矩, 使模型产生屈曲、后仰、侧弯及旋转活动, 观察模型应力云图, 记录器械最大应力值及椎间活动度并进行分析比较。结果: 建立下颈椎(C₃-C₇)有限元模型, 与已发表的关于颈椎活动度的文献相对比, 验证了模型的有效性。钢板摆放偏移轴线对内固定器械的应力分布、最大应力值及椎间活动度影响较小; 单节段钢板相比于双节段钢板对钢板偏移的力学影响更小。结论: 在颈椎前路钢板与颈椎长轴存在角度时对颈椎的力学稳定性影响不大。在临床手术钢板倾斜小于 20° 时, 无须重新调整钢板位置。

【关键词】 有限元分析; 下颈椎; 脊柱融合术; 内固定器
中图分类号: R681.5

DOI: 10.12200/j.issn.1003-0034.2021.04.016

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Finite element analysis of the effect of plate placement angle on cervical spine stability in anterior cervical fusion surgery WU Jian-chao, SHI Zheng-wei, PAN Yi-xin, LI Shao-ping, ZHOU Jian-wei, and WANG Yu-liang. Department of Orthopaedics, the Second Affiliated Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu, China

ABSTRACT Objective: Using the method of finite element analysis, to compare the biomechanical properties between the plate deviating from the long axis of the cervical spine and the standard placement of the plate in the anterior cervical fusion

基金项目: 甘肃省科技计划-科技支撑计划(编号: 17JR5RA249)

Fund program: Gansu Province Science and Technology Plan-Science and Technology Support Plan (No.17JR5RA249)

通讯作者: 汪玉良 E-mail: wy160918@sina.com

Corresponding author: WANG Yu-liang E-mail: wy160918@sina.com