



费继锋, 广东省人民医院/广东省医学科学院, 研究员、博士生导师, 广东省珠江学者特聘教授, 中国细胞生物学学会青年工作委员会、发育分会委员、黄浦研修班组委会成员。长期从事模式生物疾病模型构建、组织器官的损伤再生机制以及基因编辑技术应用研究。近年来, 建立了世界领先的以墨西哥钝口螈为模型研究组织器官损伤再生的独特实验平台。利用墨西哥钝口螈和小鼠等模式生物, 通过比较基因组学、功能基因组学、单细胞测序、遗传模型构建、药物筛选以及成像学等方法, 研究组织器官损伤再生的修复过程, 并试图阐明其通用分子细胞生物学机制, 以期为重启动物组织器官的修复再生提供可能的机制与可行的策略。目前以第一作者(共同第一作者)及通讯作者身份在*Nature*、*Nat Protoc*、*PLoS Biol*、*PNAS*、*Cell Rep*、*Stem Cell Rep*、*Cereb Cortex*等杂志发表研究论文。主持国家重点研发计划国际合作项目、子课题以及基金委国家自然科学基金面上项目等多项研究课题。

神经环路再生研究进展

彭程^{1,2,3} 刘彦梅^{1*} 费继锋^{2,3*}

¹华南师范大学脑科学与康复医学研究院, 广州 510631; ²广东省人民医院, 广州 510080;

³广东省医学科学院, 广州 510080)

摘要 神经系统损伤会导致神经环路的缺损, 造成此神经环路所调节的功能丧失或紊乱, 并给病人的正常生活造成极大的障碍。所以, 重建受损神经环路并恢复其功能是治疗神经系统损伤的重要目标。近年来, 针对新生神经元替代缺失细胞并整合入损伤神经环路机制方面取得了一系列研究进展。高等哺乳动物利用内源性新生神经元或外源移植神经干细胞可以实现一定的神经环路重建和功能恢复, 同时低等脊椎动物可以通过自发的神经发生来实现神经系统损伤后较为完美的再生, 而对这些模式动物的研究也揭示了很多可以促进再生的因子和神经环路连接重建的机制。该文对这些方面的研究进展做了简要的综述。

关键词 神经环路再生; 新生神经元; 神经干细胞移植; 斑马鱼脊髓再生; 蝾螈脊髓再生

Research Progress of Neural Circuit Regeneration

PENG Cheng^{1,2,3}, LIU Yanmei^{1*}, FEI Jifeng^{2,3*}

¹Institute for Brain Research and Rehabilitation, South China Normal University, Guangzhou 510631, China; ²Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou 510080, China; ³Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China)

收稿日期: 2022-05-09

接受日期: 2022-08-23

国家重点研发计划(批准号: 2019YFE0106700、2021YFA0805000)、国家自然科学基金(批准号: 31970782、32070819)、高水平医院建设科研专项计划(批准号: KJ012021012、DFJHBF202103)、国家重点研发计划及国家自然科学基金配套经费(批准号: KY0120220184、KY012021464、KY0120211119)和广东省重点领域研发计划(批准号: 2018B030332001、2019B030335001)资助的课题

*通讯作者。Tel: 020-85212189, E-mail: jifengfei@gdph.org.cn; yanmeiliu@m.scnu.edu.cn

Received: May 9, 2022

Accepted: August 23, 2022

This work was supported by the National Key R & D Program of China (Grant No.2019YFE0106700, 2021YFA0805000), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31970782, 32070819), the High-Level Hospital Construction Project (Grant No.KJ012021012, DFJHBF202103), the GDPH Supporting Funds (Grant No.KY0120220184, KY012021464, KY0120211119), the Key-Area Research and Development Program of Guangdong Province (Grant No.2018B030332001, 2019B030335001)

*Corresponding authors. Tel: +86-020-85212189, E-mail: jifengfei@gdph.org.cn; yanmeiliu@m.scnu.edu.cn

Abstract Injuries of nervous system often result in damage or defect to the neural circuits, and induce dysfunction or loss of function that is originally modulated by those circuits, exerting massive obstacle to patient's daily life. Therefore, treatment to nervous system injury mainly aims to reestablishing the connectivity of neural circuits and recovering the function. In recent years, there have been a series of research progresses in investigating neural circuit reestablishment by new born neurons replacing lost cells and integrating into lesioned circuits. Mammals could achieve certain circuit repair and functional recovery by endogenous neurogenesis or implanting exogenous neural stem cells, meanwhile lower vertebrates are able to relatively perfectly regenerate lesioned neural tissue by intrinsic neurogenesis. Investigating these model animals also reveals many factors that could promote regeneration and the mechanisms that rebuild the connectivity of lesioned neural circuit. This review briefly summarized recent advances of these research aspects.

Keywords neural circuit regeneration; new born neurons; neural stem cell transplant; zebrafish spinal cord regeneration; salamander spinal cord regeneration

神经系统的损伤往往会带来严重的后果。损伤会导致损伤区域内包括神经元在内的各种细胞丢失、神经纤维切断,并且会造成继发性损伤,包括轴突变性(axon degeneration)、受累神经元凋亡等。因此,神经系统的损伤会破坏原有神经环路,妨碍神经环路的正常功能,导致动物相应的感觉、运动或认知功能遭到损害,甚至危及动物的生命^[1-2]。理想的神经系统再生和功能恢复需要新细胞生成并替代缺失的细胞,更重要的是,新的神经元需要生长出合适的神经突并与存活神经元再生的神经突建立合适的连接关系,即新神经元需要整合进受损的神经环路并使神经环路恢复原有的功能。除此之外,在没有新生神经元的条件下,如果受损的神经环路网络可以实现重塑,将被截断的神经通路进行部分重建,也可在一定程度上实现受损功能的恢复。然而,包括人类在内的成年高等哺乳动物在中枢神经系统的神经环路遭受破坏之后,基本丧失自发的再生修复能力,其新生神经元替换缺失神经元的能力非常有限,且成年神经系统的微环境对于神经元轴突及树突的再生普遍是不利的^[3]。尽管当前的多种治疗手段可以帮助病人实现一定程度的功能恢复,但是效果不甚理想。因此,对促进神经系统损伤后再生的细胞和分子生物学机制的研究,特别是对神经环路损伤后重建与功能恢复的机制研究,对新疗法开发和实现神经系统损伤病人的功能完全恢复具有重要的意义。

得益于细胞疗法、生物材料移植等技术的进展,通过移植外源细胞并使其转化成神经元,可以在高等哺乳动物的受损神经系统中实现一定程度的修复^[4-5]。

研究这些外源细胞如何修复神经系统损伤可以揭示影响再生的关键因子。此外,不同物种的神经系统再生能力不尽相同。不同于高等哺乳动物,低等脊椎动物(例如硬骨鱼类和有尾两栖类)拥有强大的神经系统再生能力^[6-7]。探究低等脊椎动物的神经系统再生,包括神经环路重建的细胞及分子生物学机制,有利于理解高等哺乳动物神经系统再生的限制因素。通过将促进低等脊椎动物神经环路再生的因子与目前所应用的细胞疗法、生物材料移植等手段相结合,有望改善高等哺乳动物神经环路的修复治疗策略。本文将对高等哺乳动物内源性新生神经元、外源性新生神经元以及低等脊椎动物(以斑马鱼和蝾螈为对象)新生神经元参与神经系统损伤后再生进行综述。本文聚焦于这些新生细胞如何整合并重建神经环路,并简单讨论影响神经发生和环路再生的多种因子的作用机制以及神经环路连接网络重建的机制。

1 哺乳动物内源性新生神经元

1.1 稳态下的神经发生

虽然大部分神经元丢失后不可补充,但在成年哺乳动物的神经系统中仍然存在一部分神经干细胞,其在稳态环境下可持续分裂分化出新神经元,并整合入不同的区域。这些神经干细胞基本上只存在于三个区域:中枢神经系统中的侧脑室室管膜下区(subependymal ventricular zone, SVZ)^[8]、齿状回颗粒下区(subgranular zone, SGV)^[9]以及鼻腔嗅上皮(olfactory epithelium, OE)^[10]的基底层。齿状回颗粒细胞的新生已被详细综述^[9],因此本文不再讨论。

在嗅觉神经系统的中枢神经系统部分,SVZ的

干细胞主要产生两种中间神经元的祖细胞。这些细胞经由喙侧迁移流(rostral migratory stream, RMS)迁移至嗅球, 然后放射状地迁移至最终位置并分别分化成熟为颗粒细胞(granular cell)和球周细胞(periglomerular cell)^[8]。这些新生的抑制性中间神经元与嗅球中的兴奋性神经元相互连接, 构成新的侧抑制(lateral inhibition)环路。他们在成熟后的一段时期内具有较高的可塑性, 并在经历修剪作用后与恰当的兴奋性神经元建立稳定的突触。增加这些新生细胞的数量最终可以提高动物分辨相似气味的能力^[11]。嗅球新生神经元的死亡主要发生在迁移的过程中, 而不是在迁移完成之后^[12], 颗粒细胞在由RMS迁移切换至放射状地迁移时其固有的胞内钙活动明显增强^[13], 另外, 球周细胞的内源性钙活动模式影响了其自身的存活、迁移和功能性整合^[14]。这些结果表明, 新生神经元内在的活动决定了他们如何整合入嗅球神经环路。

属于外周神经系统的嗅上皮的神经干细胞可以持续地生成几乎全部种类的嗅觉感觉神经元, 用于补充在鼻腔黏膜恶劣的环境中不断损失的感觉神经元, 这些新生神经元可以持续整合入嗅觉神经环路中^[10]。表达特定化学分子受体的新生神经元的轴突沿表达相同类型受体的神经元轴突生长, 以保证其支配正确的嗅觉小球, 这可能与他们轴突上表达相同的同嗜性细胞黏附分子相关^[15]。

综上, 成年哺乳动物在中枢和外周神经系统的特定区域都有产生成熟神经元的能力。不过这些区域的神经干细胞都只能生成一到两种神经元亚型, 分化能力非常有限。然而, 研究在成体环境下, 神经干细胞分化为神经元的机制, 在一定程度上可以为成体神经元再生提供一定的线索。

1.2 损伤后的神经发生

哺乳动物经历脑损伤后, SVZ和DG神经干细胞的增殖会增强, 而且在纹状体中也发现有新生神经元存在^[16]。这些新生的神经元具有部分整合入受损神经环路的能力。

对鼠中风后梗死纹状体的研究表明, 一些纹状体新生神经元可以整合入受损神经环路。SVZ来源的神经祖细胞会沿着由血管构成的支架迁移至中风后的纹状体, 这种迁移类似于祖细胞沿RMS向嗅球的迁移^[17]。新的纹状体神经元包含丰富的突触小泡并与邻近细胞建立突触, 而且部分神经元可向黑质投射出轴突^[18]。这些神经元表达多巴胺和谷氨酸受

体^[18], 可以被分为GABA能和胆碱能两种类型, 且会产生动作电位^[19]。这提示新生神经元可能整合入基底节神经环路并发挥一定的功能。

然而, 损伤后的内源性再生是极为有限的。因为损伤区域的不利微环境会导致新生的细胞存活率很低, 而且会导致SVZ的分化潜能较低, 使特定SVZ区域只能分化为特定的一种神经元^[3]。因此, 哺乳动物的神经系统在损伤后自身的修复能力低下, 通常情况下, 哺乳动物自发的神经系统再生是不成功的。

2 外源细胞参与修复哺乳动物神经组织

哺乳动物内源性新生神经元修复受损神经系统的有限, 但干细胞疗法研究的进展使得外源移植细胞有望修复损伤的神经组织。移植的细胞可以减轻受体损伤组织的炎症反应, 减少继发性神经损伤, 促进受损轴突再生; 而且, 移植细胞自身可以分化为神经元, 整合入受损的神经环路^[4]。本节将通过啮齿动物的脊髓损伤和脑损伤两种模型讨论移植的外源细胞如何整合入受损神经环路。

2.1 脊髓损伤后的干细胞移植

移植入损伤脊髓的干细胞可以存活并填充损伤部位, 并且能分化成多种细胞。用于移植的细胞主要包括胚胎干细胞(ESC)来源的或胚胎期的神经干/祖细胞(neural stem/progenitor cell, NSPC)^[20-23]、诱导多能干细胞(iPSC)来源的神经祖细胞^[24-26]、间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)^[27]。这些具有干性的细胞会在受体损伤处存活并分化为不同类型的神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞, 另外移植的MSC也会分化为具有神经元形态和特性的类神经元细胞^[27]。随着对神经细胞转录组的研究进展, 利用脊髓内多种神经元亚型特异的转录因子和特异标志物鉴定出了超过20种中间神经元类型。利用这些不同的标志物对移植体进行染色鉴定, 发现移植体中分化出多种神经元亚型, 包括感觉中间神经元、抑制性中间神经元、前运动中间神经元(pre-motor interneuron)和运动神经元^[22]。

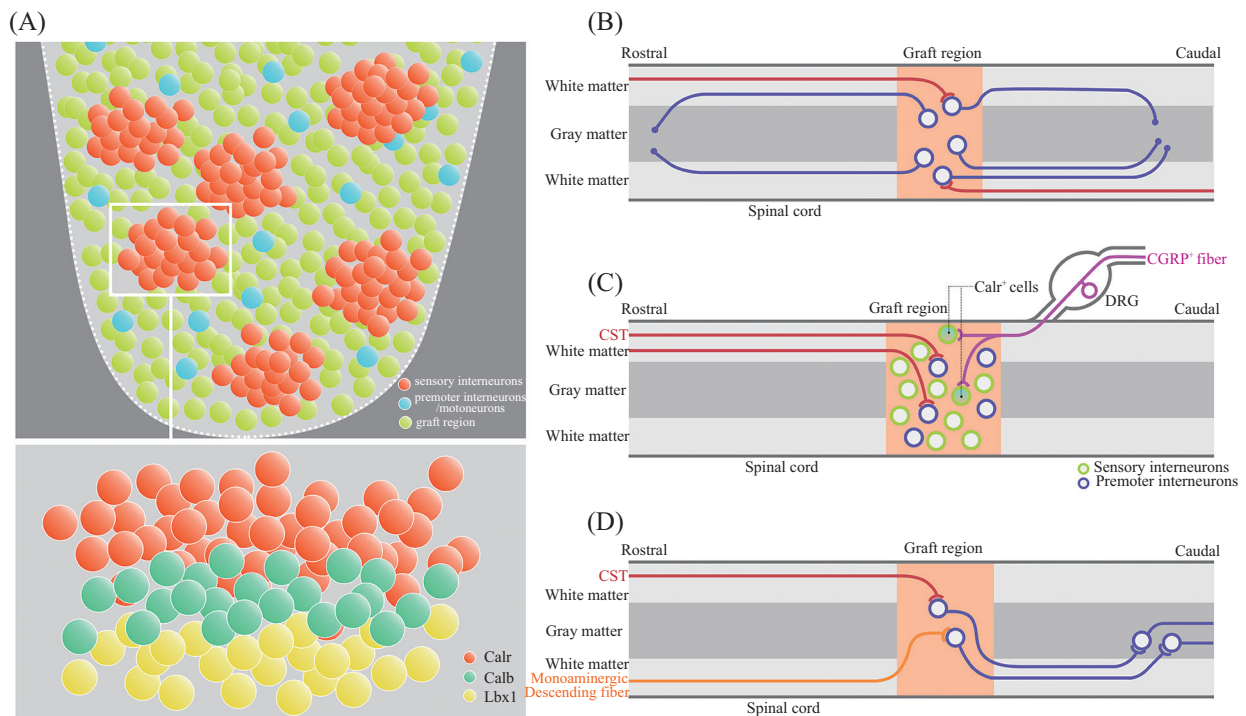
不同亚型的神经元在移植区域内不是随机分布的, 而是构成了一定的组织结构。相同亚型的感觉中间神经元倾向于聚团, 并且不同亚型之间在脊髓横切面的空间位置分布关系类似于正常脊髓灰质的分层关系, 但是移植体并不能完美地重构正常脊髓灰质的分层结构(图1A)^[22,28]。通过对移植体进行

活体钙成像观察,发现移植来源的神经元不仅存在单个细胞的自发活动也存在细胞群的同步活动,这提示移植后的新生细胞团不只是一团相互邻近的细胞,而且是很多组互相支配或接受相似突触前输入的细胞集合体^[23]。不过这些细胞构成的局部微环路的解剖结构目前尚不清楚。

另外,移植体成熟的神经元可以与受体神经元建立相互的连接。移植体可以向受体神经系统中生长出轴突并引导受体中受损轴突再生,而且移植神经元与受体神经元会建立合适的相互支配(图1B)。移植细胞分化的神经元的新生轴突会沿着脊髓的白质向前端、后端两个方向延伸较长的距离,并且穿透灰质与其中的未损伤神经元建立突触连接^[21,25]。同样,受体中未损伤部位的神经元也会再生轴突至移植体并建立突触。受体下行投射的运动神经元轴突(主要是皮质脊髓束)会避开移植体中的感觉中间神经元而特异性地支配与运动相关的中间神经元,

其支配的神经元亚型与正常组织的情况相似^[22];另外,背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)的痛觉传入神经(CGRP⁺纤维)基本上支配移植体中表达脊髓灰质板层I-II层标志物(Calr)的神经元,这与正常组织中痛觉传入神经支配的细胞类型类似(图1C)^[28]。除了当前的发现,当下的研究还不能明确辨别其他的移植体和受体间的支配连接。

更进一步地讲,移植体中的新生神经元能够实现功能性整合,修复受损神经环路。这主要是通过为切断的神经环路搭建中继连接(relay connection)实现的(图1D)。脊髓的损伤会造成投射纤维的切断,这其中的下行投射纤维(与运动功能相关)——主要是皮质脊髓束和单胺能纤维(包括五羟色胺能的缝核脊髓束)——虽然其再生的轴突无法跨越损伤位置并延伸到原来的目标,但是可以广泛地再生到移植体中并与其中的神经元建立突触^[24,27]。移植体中的神经元延伸出下行轴突,穿过灰质进入腹角(ven-



A: 移植区域内移植细胞自发形成的组织, 下图是上图中一个感觉中间神经元团块的放大展示, 提示不同类型神经元的排布模式。B: 受体的上下行纤维再生并支配移植神经元, 移植神经元也可向两方向伸出轴突支配受体神经元。C: CST选择支配运动中间神经元而CGRP⁺纤维选择支配Calr⁺细胞。D: 移植神经元参与形成中继环路。

A: spontaneous organization of graft cells in the graft region, below is a zoom on view of one assembly of sensory interneurons, indicating the location patterning of various neuron subtypes. B: ascending/descending fibers of host innervate graft cells, and graft cells send ascending/descending fibers to innervate host cells. C: CST selectively innervates premotor interneurons while CGRP⁺ fibers innervate Calr⁺ cells. D: graft cells participate in forming relay circuits.

图1 基于干细胞移植的哺乳动物脊髓损伤后神经环路重建(根据参考文献[22,28]修改)

Fig.1 Stem cell transplantation based neural circuit reconstruction after spinal cord injury in mammals (modified from references [22,28])

tral horn)的区域并建立突触, 这些下行纤维中一半以上为表达胆碱乙酰转移酶(ChAT)的脊髓运动神经元纤维^[21,25]。一些电生理实验的证据表明, 脊髓损伤前段的神经冲动信号可以通过移植体被传入损伤后段, 与正常脊髓组织相比延迟了2~3 ms, 且在重新切断脊髓移植体后电信号无法传导到损伤后段, 这提示移植神经元建立了功能性的双突触中继连接^[21]。另外, 通过光遗传学和钙成像的方法发现, 受体皮质脊髓束可以激活移植神经元的广泛钙反应, 并且使移植体中细胞团簇产生相应活动, 而这种活动模式与正常动物中皮质脊髓束激活的脊髓内环路的活动相似^[23]。

总之, 向受损脊髓中移植的干细胞具有分化成不同神经元的能力, 且这些新生神经元可以整合入受损神经环路并发挥作用。受伤动物可以实现一些运动功能的改善, 特别是后肢移动功能的明显改善。然而, 一些更精细的运动功能, 如后肢的抓握^[20]、前肢的抓取动作^[29], 基本无法获得改善, 这说明基于移植疗法的脊髓神经环路更精确的重建还无法实现。

2.2 脑损伤后的干细胞移植

移植入脑的细胞同样可以存活并分化为合适的细胞类型。与脊髓不同的是, 除了一些神经干/祖细胞之外^[30,31], 很多研究使用胚胎期或从神经干细胞诱导来的新生皮层神经元作为移植细胞^[32-39]。移植入受损脑皮层的干细胞具有分化为大脑皮层不同层神经元的能力, 包括表达*Tbr1*(第5、6层神经元)的位于移植体深层的神经元以及少量表达*Cdp*(第1、2、3层神经元)的位于移植体浅层的神经元, 这表明移植体可以部分恢复大脑皮层的分层结构^[31,36]。

移植入脑损伤区域的新生神经元具有整合入受损神经环路的能力, 特别是其新生轴突具有寻路并生长到其他合适脑区的能力。在损伤不同脑区的模型中, 移植到损伤区域的相同命运的神经元往往可以接受原有区域的突触输入。例如, 移植到受损初级视皮层的神经元会对视觉刺激产生反应^[33]; 另外, 移植入躯体感觉皮层的神经元接受很多脑区的直接输入突触支配, 这些传入模式与正常脑的结构类似, 电生理的证据也表明移植细胞会对躯体感觉刺激产生相应的活动性改变^[35]。有意思的是, 当区域特异性的新生神经元移植入相应的损伤区域时, 这些神经元可以生长轴突到多数正确的皮层和皮层下目标区域^[30,32]; 然而, 当这种新生神经元异位移植

到其他损伤区域时(如胚胎期运动神经元移植到损伤初级视皮层, 胚胎期视皮层神经元移植到损伤初级运动皮层), 其轴突无法生长^[33,36]。这说明移植神经元修复损伤皮层具有区域特异性。

在一些更精细的损伤模型中, 初级视皮层的2/3层锥体细胞被特异性地消融。移植的胚胎期皮层神经元可以整合入受损的视皮层并转化为成熟锥体细胞, 这些成熟细胞具有与被消融细胞相似的树突结构和突触密度, 并具有与消融细胞相似的感受野(被特定方向的视觉刺激选择性激活); 这些细胞接受与消融细胞类似的传入支配, 而且特别地, 外侧膝状体向移植细胞的投射是符合视网膜定位映射的(retinotopically)^[34,38]。这些移植细胞也向正确的区域投射轴突, 但是并不清楚这些投射轴突是否也是区域定位映射的(topographically)。

向损伤脑移植细胞的结果表明, 移植的细胞可以整合入损伤脑区并表现出损伤区域神经元的特性。不过由于脑皮层的结构更为复杂, 目前还不清楚移植体是否能恢复大脑皮层内神经环路的精细结构或者能在何种程度上重建皮层神经环路的结构。对于这些问题的进一步探究或许能揭示更多损伤神经环路的重建机制。

综上所述, 向成年哺乳动物损伤神经系统移植干细胞可以使其获得一定程度的再生能力, 并且使损伤神经系统受累的功能得到一些恢复。令人惊讶的是, 这些外源的细胞可以自发地恢复一些正常神经组织的结构, 且再生的轴突可以生长至合适的目标, 这说明引导细胞有序组织和轴突生长的机制在成年哺乳动物中依然存在, 或者在再生的过程中被重新激活。对于这些机制的研究有助于加深对神经环路再生的认识和理解。

3 低等脊椎动物的新生神经元与损伤神经组织修复

不同于高等哺乳动物神经系统极为有限的再生能力, 低等脊椎动物的神经系统拥有较为强大的再生能力, 其在损伤后通常可以较为完善地恢复组织结构和生理功能。其中, 硬骨鱼类的斑马鱼是再生研究领域常用的模式动物^[7], 因其具有繁殖快、身体透明、基因编辑工具完善等优点; 另外, 蝾螈作为唯一能完整再生肢体和尾巴等复杂组织器官的四足动物^[6], 加之近来蝾螈实验技术的开发和进展, 所以

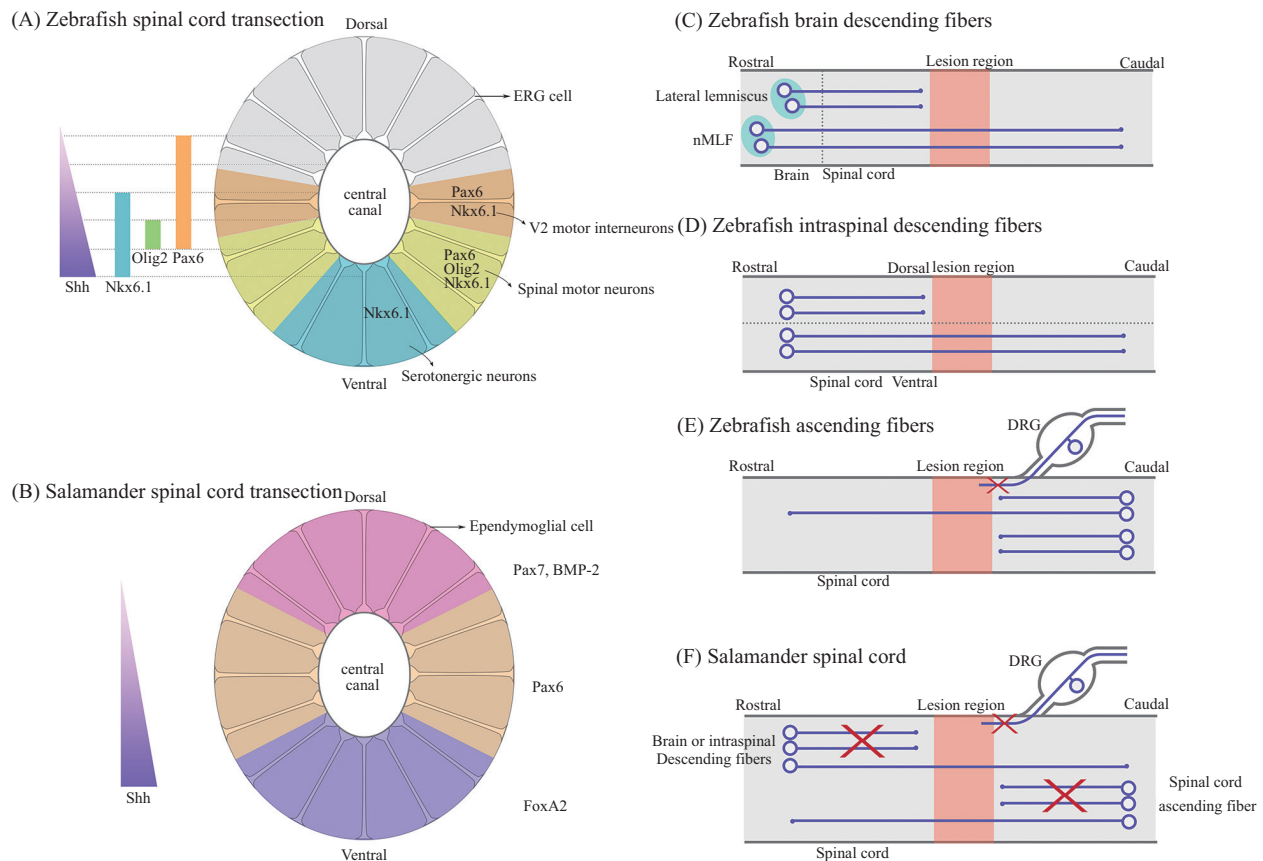
蝾螈也被更多地用于再生研究。

脊髓损伤模型是研究低等脊椎动物神经系统再生非常重要的模型。因为对动物生存至关重要的躯体运动(locomotion, 游泳、爬行动作等)功能主要由脊髓内的神经环路承担, 且这些神经环路结构在脊椎动物中具有较大程度的保守性^[40]。斑马鱼和蝾螈的运动功能在脊髓损伤时会受到损害, 但在脊髓神经系统再生后通常都能较为完善地恢复。因此研究这些动物脊髓再生的机制可能会为高等动物脊髓损伤后的功能恢复提供启示。近二十年来的研究揭示了低等脊椎动物自发性脊髓再生的一些机制, 本节着重讨论脊髓损伤后神经发生及其修复损伤组织的作用, 以及与运动功能恢复相关的一些研究结果。

3.1 斑马鱼的神经元再生

成年斑马鱼的神经系统中广泛存在一种干性细胞, 即室管膜放射性胶质细胞(ependymal radial glial cell, ERG)^[41]。ERG细胞在形态和功能上类似于胚胎期哺乳动物神经系统的放射性胶质细胞(radial glia)。在脊髓损伤后, 位于损伤部位附近的ERG细胞增殖活动明显增加。

损伤处附近的ERG细胞中与发育相关的转录因子基因(*Nkx6.1*、*Pax6*、*Olig2*等)表达上调, 且表达特定转录因子的ERG细胞的空间分布模式与发育中的脊髓类似(图2A)。这些转录因子的表达由腹侧底板(floor plate)分泌的Shh(Sonic Hedgehog)信号分子诱导。这些结果提示了损伤激活的ERG细胞部分具有了发育时期的特征^[42]。此外, 沿脊髓中央管背



A: 斑马鱼ERG细胞的类群和分布。B: 蝾螈室管膜胶质细胞的类群和分布。C: 斑马鱼不同脑核团的下行纤维的再生能力不同。D: 斑马鱼脊髓内下行纤维在腹侧再生而背侧很少再生。E: 斑马鱼脊髓上行纤维再生能力很差, 从DRG来的感觉纤维几乎无法再生。F: 蝾螈脊髓中上下行纤维的再生能力有限, 且外周感觉传入上行纤维无法再生。

A: zebrafish ERG cell subpopulation and D/V patterning. B: salamander ependymoglia cell subpopulation and D/V patterning. C: zebrafish brain descending fibers differ in regenerative. D: ventral zebrafish intraspinal fibers do regenerate while dorsal ones do not. E: zebrafish intraspinal ascending fibers have very low regenerative ability, sensory ascending fibers from DRG can not regenerate. F: regeneration of salamander ascending/descending fibers is limited, and afferent sensory ascending fibers do not regenerate.

图2 斑马鱼和蝾螈脊髓再生模型(根据参考文献[44,59]修改)

Fig.2 Spinal cord regeneration of zebrafish and salamander (modified from reference [44,59])

腹轴特定空间位置的ERG细胞会分化为特定类型神经元, 同样, 这种空间分布模式与胚胎期神经管类似。详细地, 按照从腹侧往背侧的顺序: 只表达 *Nkx6.1* 的ERG分化为脊髓内五羟色胺能神经元^[43], 表达 *Olig2* 的ERG分化为ChAT阳性的脊髓运动神经元^[41], 表达 *Nkx6.1* 和 *Pax6* 但不表达 *Olig2* 的ERG分化为Vsx1阳性的V2运动中间神经元^[44](图2A)。

虽然目前还基本不清楚这些再生的神经元是否能适当地整合入神经环路, 但一些实验证据证明某些新生神经元具有整合入受损神经环路的能力。新生的脊髓运动神经元在损伤后6~8周趋于成熟, 并表达胆碱乙酰转移酶(ChAT)。从形态学的角度, 其脊髓内突触密度与未损伤脊髓的运动神经元相似, 并且其轴突生长延伸入躯体的肌肉中^[41]。另外, V2中间神经元可继续细分为V2a和V2b两种亚型^[45]。其中表达 *Vsx2* 的V2a神经元在损伤9天后产生^[46], 其轴突形态与未损伤组织的V2a神经元不同, 不会向脊髓后部节段延伸。但是根据电生理实验的结果, 这些神经元的激活与下行运动纤维的输入信号同步发生, 表明这些神经元接受下行运动纤维的支配, 并且动物的躯体运动功能得到部分恢复。这说明再生的V2a神经元可能部分的整合入了运动神经环路中。不过由于没有进行更长时间的追踪, 因此还不清楚再生的V2a神经元能否向脊髓后段延伸轴突并最终使运动神经环路恢复到未损伤时的状态。

除了ERG细胞来源的新生神经元参与修复损伤外, 脑和脊髓内存在一些处于休眠状态的神经前体细胞^[47-48], 其中脊髓内的前体细胞先于ERG细胞参与脊髓损伤修复。在斑马鱼幼鱼的脊髓横断模型中, 这些休眠细胞在损伤时激活并快速迁移至损伤部位, 在损伤大约4天后, 这些细胞生长出的神经突与损伤两侧的脊髓神经元相连, 且动物的游泳功能也得以恢复, 而此时新生神经元还未迁移至损伤部位^[48]。然而, 运动功能的快速恢复只在幼鱼中发现, 成年斑马鱼的功能恢复则需要两周以上的时间^[49], 而此时从ERG细胞再生的神经元已经开始整合, 因此需要进一步研究以确定这些不同来源的细胞对于神经环路重建和功能恢复的具体贡献。

不同亚型的神经元再生能力存在差异, 其再生能力因其处在不同的背腹轴位置而不同。脊髓损伤激活ERG细胞增殖时, 表达 *Pax6* 和 *Pax2* (包括V1运动中间神经元) 的腹侧命运细胞大量增多, 但是背侧

的小清蛋白(parvalbumin)阳性神经元却几乎没有再生。另外, 相较于Shh, 胚胎期背侧形态发生素信号(BMP2、BMP4等)也没有在损伤时上调^[44]。同样, 在休眠的神经前体细胞中, 腹侧命运的细胞发生迁移而背侧命运的细胞很少迁移^[48]。

综上, ERG细胞增殖产生的子代细胞可以分化为多种神经元, 并补充替换因损伤丢失的神经元。不过, 这种再生能力是不完全的, 有很大一部分神经元类型在损伤后是一直缺失的。

3.2 蝾螈的神经元再生

在蝾螈的神经系统中存在类似于斑马鱼ERG细胞的干性细胞, 其通常被称为室管膜胶质细胞(ependymogial cell)。值得注意的是, 在探索蝾螈室管膜胶质细胞参与再生的研究中, 通常使用切断尾部的再生模型^[50]。与斑马鱼ERG细胞相比, 室管膜胶质细胞具有更多的分化潜能, 可以在尾部再生时增殖并分化为多种谱系的细胞, 这些谱系不限于神经系统的细胞类型^[51-53]。

在尾部再生时, 邻近断面的一段脊髓中的室管膜胶质细胞会被激活并显著的加快细胞周期^[54]。这些细胞分裂产生的子代细胞是脊髓再生并向后延伸的主要细胞来源, 而未损伤脊髓中的细胞向后迁移、重排等只占其中少部分。利用FUCCI技术(一种使处于不同细胞周期的细胞表达不同荧光蛋白的技术), COSTA等^[55]对蝾螈尾部再生模型中的增殖细胞的细胞周期加速的时间和空间特性进行了更为精细的描述。根据他们的实验数据和模型, 在尾部离断大约85 h后, 邻近断面约830 μm的脊髓室管膜胶质细胞开始加速分裂并表现出细胞周期的同步化。利用Crispr/Cas9技术敲除*Sox2*的蝾螈受精卵能正常发育并孵化出拥有完整脊髓的幼体, 然而, 敲除*Sox2*的室管膜细胞不能在尾部损伤后加速分裂, 并导致脊髓再生缺陷^[56-57]。敲除*Sox2*不影响发育可能是因为*Sox3*在发育时期的补偿作用。这些结果提示, *Sox2*可能是脊髓再生的关键调节因子。

与斑马鱼的情况类似, 蝾螈的脊髓在损伤时也具有发育中脊髓的特征。蝾螈再生的脊髓底板表达并分泌Shh蛋白, 且Shh信号可以调控再生脊髓的背腹轴特化(dorsal/ventral axis patterning)^[58]。在一项把体外培养的蝾螈神经球(neurosphere)来源的神经干细胞移植入脊髓的研究显示, 这些神经干细胞默认保持分化为顶板(roof plate)细胞的命运, 即表达

*Pax7*和*BMP-2*, 而这些细胞可被*Shh*诱导而拥有了分化为其他类型细胞的命运^[59]。最终, 根据*Shh*从腹侧到背侧逐渐减少的浓度梯度, 再生的脊髓从背侧顶板到腹侧底板分别表达*Pax7*(背侧)、*Pax6*(两侧)和*FoxA2*(腹侧)(图2B)。另外, *Wnt/PCP(planar cell polarity)*通路在尾部再生的脊髓中被重新激活, 在向后延伸的脊髓里调控前后轴特化(*anterior/posterior axis patterning*)^[60]。*Wnt*信号引导脊髓持续延伸, 并使室管膜胶质细胞沿前后轴方向分裂。

在再生的脊髓中, 由室管膜胶质细胞增殖而来的细胞可被*NeuN*染色标记, 说明室管膜胶质细胞的子代细胞可以分化为成熟的神经元^[53,61]。脊髓再生时, 子代细胞在背腹轴的位置上倾向于贴近其亲代细胞, 且*Pax7*、*Pax6*染色的结果显示, 转录因子的背腹轴特化在整段再生脊髓上都是稳定的^[53]。另外, 脊髓中的神经干细胞可以参与产生新生背根神经节中的神经元^[61]。这些证据提示, 脊髓受损后蝾螈有能力再生包括外周神经系统神经元在内的多种神经元。与斑马鱼相比, 蝾螈的室管膜细胞似乎可更全面地再生脊髓中的各种神经元亚型。不过, 需要对再生的神经元进行更详细的鉴定才能明确了解蝾螈不同类型脊髓神经元再生的能力。

这些研究揭示了脊髓损伤后再生细胞的来源和机制, 但是尾部再生模型中脊髓的新生神经元包含何种类型、这些神经元如何参与神经环路重建等问题还基本无法解答。

3.3 不完美的再生, 还是成功的再生?

在用脊髓横断模型研究脊髓再生时, 研究者发现低等脊椎动物损伤的脊髓在解剖结构上并不能完全恢复至正常的水平。如前文所述, 斑马鱼不能完全再生全部的神经元类型。另外, 因损伤截断的各种类型轴突的再生能力也不尽相同, 因此可以说脊髓的再生是不完美的。虽然不是本文论述的重点, 探讨轴突的再生可以帮助我们理解低等脊椎动物如何实现躯体运动功能的成功恢复。

相比于哺乳动物, 低等脊椎动物的轴突被截断后具有显著的再生能力, 不过不同投射通路不同类型神经元的轴突再生能力差异较大。斑马鱼的脊髓横断后, 从脑部和脊髓内发出的下行轴突和损伤部位后端的上行轴突都被切断^[62]。首先, 斑马鱼不同脑部核团投射纤维的再生能力存在差异, 例如, 内侧纵束(*nMLF*)再生能力强而外侧丘系的能力差(图2C)^[63]。

另外, 斑马鱼的一些脊髓内神经元发出的下行纤维可以再生并跨越损伤位点^[49]。不过, 根据轴突所在位置的不同, 斑马鱼中位于脊髓腹侧的下行轴突可穿过损伤位点继续生长而背侧的下行轴突几乎无法跨越损伤部位^[64](图2D)。其次, 脊髓上行纤维的再生能力较弱, 而且, 从背根神经节发出进入脊髓的上行感觉纤维几乎无法再生(图2E)^[63]。同样, 蝾螈轴突再生的能力各有差别(图2F)。虽然从脑和脊髓内发出的下行纤维和上行纤维都有能力再生并穿过损伤位置, 但成功再生的轴突数量大约只占正常动物的1/3^[65-66]。而且, 坐骨神经的传入上行感觉纤维似乎没有再生能力^[67-68]。

虽然脊髓的神经元和轴突无法完整地恢复至正常水平, 但是斑马鱼的游泳运动功能^[49]和蝾螈的游泳爬行运动功能^[66]都能在脊髓横断损伤后恢复。关于功能恢复的机制, 存在如下可能的解释。一方面, 对于功能恢复来说, 可能不是所有的神经连接的恢复都是必要的^[65]。有再生能力的轴突生长过损伤位点后可以继续向损伤后端延伸并支配合适的目标^[69-70]。而且, 对蝾螈脊髓损伤部位后端躯体肌肉的肌电信号进行记录发现肌肉的活动恢复至正常动物的节律和幅度, 并与损伤部位前端躯体肌肉的活动同步^[66]。蝾螈躯体运动的初步计算模型提示蝾螈的运动神经环路可能存在一定的冗余性, 这表明一部分神经环路的正确重建就可使运动功能恢复。另一方面, 神经系统高度的可塑性可以使神经系统通过重塑一些神经环路以恢复其原有运动功能。在斑马鱼中, 与运动功能相关的多巴胺(*DA*)能和五羟色胺(*5-HT*)能下行纤维只能向损伤部位后端再生很短的距离, 但是它们的轴突在损伤部位前端发出大量的侧枝, 这些侧枝可能通过连接脊髓内在神经元从而可以继续传导下行信息^[43]。而且脊髓的内在*5-HT*能神经元在损伤后先过量增殖, 而后恢复至正常水平^[43]; 这些增殖的神经元释放*5-HT*, 能激活脊髓中长距离投射的谷氨酸能中间神经元的*5HT_{1B}*受体, 这些神经元可在收到*5-HT*的信号后促进自己轴突的再生^[71]。这些结果表明在斑马鱼中*DA*能和*5-HT*能纤维可能通过建立新的神经环路来恢复动物运动的功能。

脊髓神经系统结构上不完美的再生为何能使神经系统的功能成功再生? 虽然目前还无法明确回答, 但对这个问题的进一步探索有助于我们更好地

理解神经环路的功能,也可能对改善高等哺乳动物神经环路的修复提供启示。

4 促进损伤神经系统的神经发生和环路再生的因子

神经系统损伤后的修复受到包括转录因子、生长因子、信号通路、免疫系统、神经递质等多种机制的调控,操纵这些调控因子可以在一定程度上帮助神经系统的修复和再生。本节将整合哺乳动物和低等脊椎动物的研究,着重讨论促进神经发生和神经环路再生的相关因子及其作用机制。

损伤后神经组织中一些转录因子的表达上调并启动再生相关基因的转录,而且操控表达特定转录因子也能促进神经系统再生。首先在斑马鱼再生的神经元和受损的哺乳动物DRG神经元中ATF3的表达上调^[72-73],且在DRG神经元中增加ATF3的表达可以诱导再生相关基因*SPRR1A*的转录,以增强其外周分支的再生。其次,斑马鱼脊髓横断后ERG细胞的*Sox11b*开始表达,并通过上调转录因子*ascl1a*和神经干细胞相关基因*Nestin*的表达来促进神经发生^[74];同样在小鼠受损脊髓中诱导表达*Sox11*可以上调*Nestin/Dcx*的表达^[75],促进脑源性神经营养因子(BDNF)表达^[76],以提高运动功能的恢复。另外,斑马鱼和蝾螈的神经干细胞表达的*Sox2*是神经发生所需要的^[56-57,77];并且在哺乳动物受损脊髓中的星形胶质细胞中异位表达*Sox2*可使其重编程为DCX⁺神经母细胞^[78],其通过p53-p21信号通路转化为成熟神经元并与运动神经元建立连接^[79]。

除了转录因子,操纵一些关键的信号通路也可以促进神经系统的再生。其中PTEN/mTOR和SOCS3及其相关通路JAK/STAT3受到诸多关注。哺乳动物脊髓损伤后受损神经元通过JAK2激酶的信号转导激活STAT3,以上调*GAP43*的表达来促进生长锥形成和轴突再生^[80];而过表达STAT3则可促进皮质脊髓束轴突重塑和运动功能恢复^[81]。相反地,作为mTOR信号的负调节物,PTEN被敲除后可以增强视网膜神经节细胞轴突的再生^[82]。同时敲除PTEN和SOCS3(STAT3的负调节物)则可更好地促进皮质脊髓束和视网膜神经节细胞轴突的再生^[83-85]。另外,cAMP的激活可以通过下游分子CREB激活再生相关基因的表达来促进脊髓轴突再生^[86]。在斑马鱼中,脊髓损伤激活Fgf3,其通过MAPK通路发挥作用以

调控神经发生和运动神经元的成熟^[87]。

此外,神经系统的再生还受到多种其他因素的调节,例如免疫系统、神经递质和神经营养因子等。免疫系统广泛参与到损伤神经组织的再生过程中:哺乳动物中小胶质细胞和巨噬细胞可以支持神经元的存活和生长^[88],特定CD4⁺T细胞可以识别特定神经自体抗原并在特定条件下发挥保护、修复神经组织的作用^[89];在斑马鱼中存在一种被命名为调节性T细胞(regulatory T cells, Tregs)的细胞可以诱导Sox2⁺神经祖细胞的增殖,并产生神经营养因子^[90]。同时,斑马鱼脊髓中下行投射纤维释放的神经递质也可以促进脊髓损伤后再生,其中多巴胺可能通过影响Shh信号来促进神经发生^[91],血清素可以诱导ERG细胞再生运动神经元^[92]。另外,外源施加多种神经营养因子可以有效促进再生,例如FGF2、neurotrophin-3和BDNF的协同效应可以促进视网膜神经节细胞的轴突再生^[93]。

综上,目前已发现很多可以促进神经系统损伤后再生的调控因子,其中一些方法已经应用于临床治疗。某些促进因子在高等和低等动物中相对保守,从低等脊椎动物中发现的某些因子具有提高哺乳动物再生能力的应用前景。而且,近年来各种组学技术的发展和运用,使得我们有可能发现更多影响再生的因子,并对神经系统再生的细胞和分子机制获得更全面的认识。

5 受损神经环路的连接重建

神经系统的感觉、运动等功能的正常恢复,不仅需要补充缺失的细胞以及再生受损的轴突,还需要再生的神经元实现功能整合并参与重建合适的神经环路。神经环路的重建是多方面的,包括新生神经元在损伤部位建立局部环路,神经元再生长距离投射轴突,以及延伸到合适区域的轴突与恰当的目标细胞建立突触连接。本节将从这几个方面,总结哺乳动物和低等脊椎动物中的研究结果,讨论神经环路的连接重建。

首先,多种亚型的新生神经元可以替代缺失的细胞^[22,28,42,59],并形成局部环路。虽然重建的局部环路的详细结构还基本不清楚,但是电生理记录和活体钙成像的结果表明新生的神经组织存在与正常组织类似的自发活动并对未损伤高级神经中枢的下行信号输入产生适当的反应^[23,46],这从侧面提示这些

新生组织可能建立了合适的局部环路。在低等脊椎动物中, 损伤可以激活发育时期的形态发生素(例如 Shh)和转录因子的表达, 并且在合适的位置增殖分化出相应类型的神经元^[42,59]。损伤组织表现出的发育时期特性可能是新生神经元重建损伤区域局部环路的关键。

其次, 多数研究都报道再生的轴突——不论是新生神经元的还是存活的受损神经元的轴突——可以延伸较长距离至原来的目标区域。有意思的是, 哺乳动物脑损伤时, 胚胎期视皮层神经元移植到初级视皮层时可以生长轴突并连接合适的脑区, 但移植到初级运动皮层则无法再生轴突, 反之亦然^[33,36]。而且, 脊髓下行运动相关轴突可以正确生长到移植体中新生的运动中间神经元而避开感觉中间神经元^[22]。这些结果暗示了神经元自身的特性和正确的微环境可以帮助轴突再生并延伸到正确的目标区域。虽然引导轴突正确再生的机制还不清楚, 斑马鱼的一些研究表明泛素连接酶PHR、Semaphroin4D等是引导轴突再生的候选因子^[94-95]。

最后, 同样重要地, 再生的轴突需要与正确的目标神经元建立轴突才能保证功能正常恢复。然而, 这种更精确的连接重建可能存在问题。哺乳动物颈椎损伤后, 控制手部精细动作的皮质脊髓束无法与脊髓目标重建精确的连接, 导致手部精细动作无法恢复^[29]。另外, 嗅上皮的严重损伤会导致大部分嗅觉感觉神经元的缺失, 虽然这些神经元基本上会再生到原来的数量, 但是轴突会连接到错误的嗅球小球中, 导致嗅觉功能紊乱的发生^[15]。不过, 在低等脊椎动物的金鱼中, 视神经损伤会短暂上调EphA3和EphA5的表达, 引导视网膜神经节细胞的轴突在视顶盖(optic tectum)重建正确的视网膜定位映射图(retinotopic map)^[96]。因此, 重新激活发育时期梯度表达的形态发生素分子, 可能有助于重建精细的突触连接。

虽然对于神经环路重建各方面的全面图景和细节还知之甚少, 但对于不同水平环路重建机制的继续研究, 将为更好地恢复神经系统功能提供思路和启示。

6 总结与展望

近多年的技术进展及研究改变了我们原来对高等哺乳动物神经系统不能再生的认知。而且, 细

胞疗法在小鼠等动物上取得了长足的进展, 外源神经元可以帮助受损的神经系统重建部分神经环路, 并部分恢复其功能^[97]。不过相较于低等脊椎动物强大的自发性再生能力, 这些进展仍显不足。然而, 低等脊椎动物的再生研究大多集中在神经干细胞增殖分化的过程与机制, 对于再生的成熟神经元修复神经环路并实现功能性整合的机制鲜有报道。

蝾螈是唯一能完整再生多种组织的四足动物也是进化上较早出现的四足动物, 其本身也多被用于游泳和爬行运动的神经环路功能的研究^[98], 而且基于对运动神经环路编码的研究还开发出“蝾螈机器人”模型来模拟蝾螈的神经环路^[99], 对此的进一步研究有助于我们加深对蝾螈运动神经环路结构和生理功能的理解。此外, 蝾螈基因组的研究表明很多神经元标志物(*Chx10*、*Dbx1*、*ChAT*、*Vglut2*等)的基因序列与高等哺乳动物的同源性都比较高^[100], 可以利用这些基因来标记蝾螈神经系统中不同的神经元类型。因此, 借助蝾螈运动神经环路功能研究的成果以及蝾螈的实验技术的进展, 我们可以利用蝾螈研究与运动相关的神经环路再生机制。

对于低等脊椎动物神经系统再生的系统性研究, 特别是对神经系统再生的调控因子和神经环路重建机制的研究, 有助于探寻限制高等哺乳动物神经系统再生能力的关键因素。阐明促进低等脊椎动物再生因子的作用机制, 有望将其应用于高等哺乳动物以改善其再生能力。对此的研究成果将为实现高等动物神经系统损伤后的功能恢复提供新的治疗手段和思路。

参考文献 (References)

- [1] SOFRONIEW M V. Dissecting spinal cord regeneration [J]. *Nature*, 2018, 557(7705): 343-50.
- [2] VARADARAJAN S G, HUNYARA J L, HAMILTON N R, et al. Central nervous system regeneration [J]. *Cell*, 2022, 185(1): 77-94.
- [3] NEMIROVICH-DANCHENKO N M, KHODANOVICH M Y. New neurons in the post-ischemic and injured brain: Migrating or resident [J]? *Front Neurosci*, 2019, doi: 10.3389/fnins.2019.00588.
- [4] HUANG L, FU C, XIONG F, et al. Stem cell therapy for spinal cord injury [J]. *Cell Transplant*, 2021, doi: 10.1177/0963689721989266.
- [5] HUTSON T H, DI GIOVANNI S. The translational landscape in spinal cord injury: focus on neuroplasticity and regeneration [J]. *Nat Rev Neurol*, 2019, 15(12): 732-45.
- [6] JOVEN A, ELEWA A, SIMON A. Model systems for regeneration: salamanders [J]. *Development*, 2019, doi: 10.1242/

- dev.167700.
- [7] MARQUES I J, LUPI E, MERCADER N. Model systems for regeneration: zebrafish [J]. *Development*, 2019, doi: 10.1242/dev.167692.
- [8] GHEUSI G, LEPOUSEZ G, LLEDO P M. Adult-born neurons in the olfactory bulb: integration and functional consequences [J]. *Curr Top Behav Neurosci*, 2013, doi: 10.1007/7854_2012_228.
- [9] RODRÍGUEZ-IGLESIAS N, SIERRA A, VALERO J. Rewiring of memory circuits: connecting adult newborn neurons with the help of microglia [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2019, doi: 10.3389/fcell.2019.00024.
- [10] CHOI R, GOLDSTEIN B J. Olfactory epithelium: cells, clinical disorders, and insights from an adult stem cell niche [J]. *Laryngoscope Invest*, 2018, 3(1): 35-42.
- [11] BRAGADO ALONSO S, REINERT J K, MARICHAL N, et al. An increase in neural stem cells and olfactory bulb adult neurogenesis improves discrimination of highly similar odorants [J]. *EMBO J*, 2019, doi: 10.15252/emj.201798791.
- [12] PLATEL J C, ANGELOVA A, BUGEON S, et al. Neuronal integration in the adult mouse olfactory bulb is a non-selective addition process [J]. *eLife*, 2019, doi: 10.7554/eLife.44830.
- [13] BUGEON S, HAUBOLD C, RYZYNSKI A, et al. Intrinsic neuronal activity during migration controls the recruitment of specific interneuron subtypes in the postnatal mouse olfactory bulb [J]. *J Neurosci*, 2021, 41(12): 2630-44.
- [14] LI K, FIGARELLA K, SU X, et al. Endogenous but not sensory-driven activity controls migration, morphogenesis and survival of adult-born neurons in the mouse olfactory bulb [J]. *bioRxiv*, 2021, doi: 10.1101/2021.04.21.440775.
- [15] YU C R, WU Y. Regeneration and rewiring of rodent olfactory sensory neurons [J]. *Exp Neurol*, 2017, 287(3): 395-408.
- [16] LINDVALL O, KOKAIA Z. Neurogenesis following stroke affecting the adult brain [J]. *Csh Perspect Biol*, 2015, doi: 10.1101/cshperspect.a019034.
- [17] KOJIMA T, HIROTA Y, EMA M, et al. Subventricular zone-derived neural progenitor cells migrate along a blood vessel scaffold toward the post-stroke striatum [J]. *Stem Cells*, 2010, 28(3): 545-54.
- [18] SUN X, ZHANG Q-W, XU M, et al. New striatal neurons form projections to substantia nigra in adult rat brain after stroke [J]. *Neurobiol Dis*, 2012, 45(1): 601-9.
- [19] HOU S W, WANG Y Q, XU M, et al. Functional integration of newly generated neurons into striatum after cerebral ischemia in the adult rat brain [J]. *Stroke*, 2008, 39(10): 2837-44.
- [20] MITSUI T, SHUMSKY J S, LEPORÉ A C, et al. Transplantation of neuronal and glial restricted precursors into contused spinal cord improves bladder and motor functions, decreases thermal hypersensitivity, and modifies intraspinal circuitry [J]. *J Neurosci*, 2005, 25(42): 9624-36.
- [21] LU P, WANG Y, GRAHAM L, et al. Long-distance growth and connectivity of neural stem cells after severe spinal cord injury [J]. *Cell*, 2012, 150(6): 1264-73.
- [22] KUMAMARU H, LU P, ROSENZWEIG E S, et al. Regenerating corticospinal axons innervate phenotypically appropriate neurons within neural stem cell grafts [J]. *Cell Rep*, 2019, 26(9): 2329-39, e4.
- [23] CETO S, SEKIGUCHI K J, TAKASHIMA Y, et al. Neural stem cell grafts form extensive synaptic networks that integrate with host circuits after spinal cord injury [J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 27(3): 430-40, e5.
- [24] NORI S, OKADA Y, YASUDA A, et al. Grafted human-induced pluripotent stem-cell-derived neurospheres promote motor functional recovery after spinal cord injury in mice [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(40): 16825-30.
- [25] LU P, WOODRUFF G, WANG Y, et al. Long-distance axonal growth from human induced pluripotent stem cells after spinal cord injury [J]. *Neuron*, 2014, 83(4): 789-96.
- [26] LAVOIE N S, TRUONG V, MALONE D, et al. Human induced pluripotent stem cells integrate, create synapses and extend long axons after spinal cord injury [J]. *J Cell Mol Med*, 2022, 26(7): 1932-42.
- [27] ZENG X, QIU X C, MA Y H, et al. Integration of donor mesenchymal stem cell-derived neuron-like cells into host neural network after rat spinal cord transection [J]. *Biomaterials*, 2015, doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.02.073.
- [28] DULIN J N, ADLER A F, KUMAMARU H, et al. Injured adult motor and sensory axons regenerate into appropriate organotypic domains of neural progenitor grafts [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1-13.
- [29] NUTT S E, CHANG E A, SUHR S T, et al. Caudalized human iPSC-derived neural progenitor cells produce neurons and glia but fail to restore function in an early chronic spinal cord injury model [J]. *Exp Neurol*, 2013, doi: 10.1016/j.expneurol.2013.07.010.
- [30] OKI K, TATARISHVILI J, WOOD J, et al. Human-induced pluripotent stem cells form functional neurons and improve recovery after grafting in stroke-damaged brain [J]. *Stem Cells*, 2012, 30(6): 1120-33.
- [31] TORNERO D, WATTANANIT S, GRØNNING MADSEN M, et al. Human induced pluripotent stem cell-derived cortical neurons integrate in stroke-injured cortex and improve functional recovery [J]. *Brain*, 2013, 136(12): 3561-77.
- [32] GAILLARD A, PRESTOZ L, DUMARTIN B, et al. Reestablishment of damaged adult motor pathways by grafted embryonic cortical neurons [J]. *Nat Neurosci*, 2007, 10(10): 1294-9.
- [33] MICHELSEN KIMMO A, ACOSTA-VERDUGO S, BENOIT-MARAND M, et al. Area-specific reestablishment of damaged circuits in the adult cerebral cortex by cortical neurons derived from mouse embryonic stem cells [J]. *Neuron*, 2015, 85(5): 982-97.
- [34] FALKNER S, GRADE S, DIMOU L, et al. Transplanted embryonic neurons integrate into adult neocortical circuits [J]. *Nature*, 2016, 539(7628): 248-53.
- [35] TORNERO D, TSUPYKOV O, GRANMO M, et al. Synaptic inputs from stroke-injured brain to grafted human stem cell-derived neurons activated by sensory stimuli [J]. *Brain*, 2017, 140(3): 692-706.
- [36] ESPUNY-CAMACHO I, MICHELSEN K A, LINARO D, et al. Human pluripotent stem-cell-derived cortical neurons integrate functionally into the lesioned adult murine visual cortex in an area-specific way [J]. *Cell Rep*, 2018, 23(9): 2732-43.
- [37] YU S P, TUNG J K, WEI Z Z, et al. Optochemogenetic stimulation of transplanted iPS-NPCs enhances neuronal repair and functional recovery after ischemic stroke [J]. *J Neurosci*, 2019,

- 39(33): 6571-94.
- [38] ANDREOLI E, PETRENKO V, CONSTANTHIN P E, et al. Transplanted embryonic neurons improve functional recovery by increasing activity in injured cortical circuits [J]. *Cereb Cortex*, 2020, 30(8): 4708-25.
- [39] XIONG M, TAO Y, GAO Q, et al. Human stem cell-derived neurons repair circuits and restore neural function [J]. *Cell Stem Cell*, 2021, 28(1): 112-26.e6.
- [40] RYCZKO D, DUBUC R, CABELGUEN J M. Rhythmogenesis in axial locomotor networks: an interspecies comparison [J]. *Prog Brain Res*, 2010, doi: 10.1016/B978-0-444-53613-6.00013-7.
- [41] REIMER M M, SÖRENSEN I, KUSCHA V, et al. Motor neuron regeneration in adult zebrafish [J]. *J Neurosci*, 2008, 28(34): 8510-6.
- [42] REIMER M M, KUSCHA V, WYATT C, et al. Sonic hedgehog is a polarized signal for motor neuron regeneration in adult zebrafish [J]. *J Neurosci*, 2009, 29(48): 15073-82.
- [43] KUSCHA V, BARREIRO-IGLESIAS A, BECKER C G, et al. Plasticity of tyrosine hydroxylase and serotonergic systems in the regenerating spinal cord of adult zebrafish [J]. *J Comp Neurol*, 2012, 520(5): 933-51.
- [44] KUSCHA V, FRAZER S L, DIAS T B, et al. Lesion-induced generation of interneuron cell types in specific dorsoventral domains in the spinal cord of adult zebrafish [J]. *J Comp Neurol*, 2012, 520(16): 3604-16.
- [45] KIMURA Y, SATOU C, HIGASHIJIMA S I. V2a and V2b neurons are generated by the final divisions of pair-producing progenitors in the zebrafish spinal cord [J]. *Development*, 2008, 135(18): 3001-5.
- [46] VASUDEVAN D, LIU Y C, BARRIOS J P, et al. Regenerated interneurons integrate into locomotor circuitry following spinal cord injury [J]. *Exp Neurol*, 2021, doi: 10.1016/j.expneurol.2021.113737.
- [47] BARBOSA J S, SANCHEZ-GONZALEZ R, DI GIAIMO R, et al. Live imaging of adult neural stem cell behavior in the intact and injured zebrafish brain [J]. *Science*, 2015, 348(6236): 789-93.
- [48] VANDESTADT C, VANWALLEGHEM G C, KHABOOSHAN M A, et al. RNA-induced inflammation and migration of precursor neurons initiates neuronal circuit regeneration in zebrafish [J]. *Dev Cell*, 2021, 56(16): 2364-80.e8.
- [49] GOLDSHMIT Y, SZTAL T E, JUSUF P R, et al. Fgf-dependent glial cell bridges facilitate spinal cord regeneration in zebrafish [J]. *J Neurosci*, 2012, 32(22): 7477-92.
- [50] TAZAKI A, TANAKA E M, FEI J F. Salamander spinal cord regeneration: the ultimate positive control in vertebrate spinal cord regeneration [J]. *Dev Biol*, 2017, 432(1): 63-71.
- [51] BENRAISS A, ARSANTO J, COULON J, et al. Neurogenesis during caudal spinal cord regeneration in adult newts [J]. *Dev Genes Evol*, 1999, 209(6): 363-9.
- [52] ECHEVERRI K, TANAKA E M. Ectoderm to mesoderm lineage switching during axolotl tail regeneration [J]. *Science*, 2002, 298(5600): 1993-6.
- [53] MCHEDLISHVILI L, EPPERLEIN H H, TELZEROW A, et al. A clonal analysis of neural progenitors during axolotl spinal cord regeneration reveals evidence for both spatially restricted and multipotent progenitors [J]. *Development*, 2007, 134(11): 2083-93.
- [54] ROST F, ALBORS A R, MAZUROV V, et al. Accelerated cell divisions drive the outgrowth of the regenerating spinal cord in axolotls [J]. *eLife*, 2016, doi: 10.7554/eLife.20357.
- [55] COSTA E C, OTSUKI L, ALBORS A R, et al. Spatiotemporal control of cell cycle acceleration during axolotl spinal cord regeneration [J]. *eLife*, 2021, doi: 10.7554/eLife.55665.
- [56] FEI J F, SCHUEZ M, TAZAKI A, et al. CRISPR-mediated genomic deletion of Sox2 in the axolotl shows a requirement in spinal cord neural stem cell amplification during tail regeneration [J]. *Stem Cell Rep*, 2014, 3(3): 444-59.
- [57] FEI J F, KNAPP D, SCHUEZ M, et al. Tissue- and time-directed electroporation of CAS9 protein-gRNA complexes *in vivo* yields efficient multigene knockout for studying gene function in regeneration [J]. *NPJ Regen Med*, 2016, 1(1): 1-9.
- [58] SCHNAPP E, KRAGL M, RUBIN L, et al. Hedgehog signaling controls dorsoventral patterning, blastema cell proliferation and cartilage induction during axolotl tail regeneration [J]. *Development*, 2005, 132(14): 3243-53.
- [59] SUN A X, LONDONO R, HUDNALL M L, et al. Differences in neural stem cell identity and differentiation capacity drive divergent regenerative outcomes in lizards and salamanders [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(35): E8256-E65.
- [60] ALBORS A R, TAZAKI A, ROST F, et al. Planar cell polarity-mediated induction of neural stem cell expansion during axolotl spinal cord regeneration [J]. *eLife*, 2015, doi: 10.7554/eLife.10230.
- [61] MCHEDLISHVILI L, MAZUROV V, GRASSME K S, et al. Reconstitution of the central and peripheral nervous system during salamander tail regeneration [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(34): E2258-E66.
- [62] BECKER T, WULLIMANN M F, BECKER C G, et al. Axonal regrowth after spinal cord transection in adult zebrafish [J]. *J Comp Neurol*, 1997, 377(4): 577-95.
- [63] BECKER T, LIEBEROTH B C, BECKER C G, et al. Differences in the regenerative response of neuronal cell populations and indications for plasticity in intraspinal neurons after spinal cord transection in adult zebrafish [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2005, 30(2): 265-78.
- [64] ANGUITA-SALINAS C, SÁNCHEZ M, MORALES R A, et al. Cellular dynamics during spinal cord regeneration in larval zebrafish [J]. *Dev Neurosci*, 2019, 41(1/2): 112-22.
- [65] DAVIS B M, DUFFY M T, SIMPSON JR S B. Bulbosplinal and intraspinal connections in normal and regenerated salamander spinal cord [J]. *Exp Neurol*, 1989, 103(1): 41-51.
- [66] CHEVALLIER S, LANDRY M, NAGY F, et al. Recovery of bimodal locomotion in the spinal-transected salamander, *Pleurodeles waltlii* [J]. *Eur J Neurosci*, 2004, 20(8): 1995-2007.
- [67] KAO C C, BUNGE R P, REIER P J. Spinal cord reconstruction [M]. New York: Raven Press, 1983, 121-49.
- [68] ZUKOR K A, KENT D T, ODELBERG S J. Meningeal cells and glia establish a permissive environment for axon regeneration after spinal cord injury in newts [J]. *Neural Dev*, 2011, 6(1): 1-23.
- [69] BECKER C G, LIEBEROTH B C, MORELLINI F, et al. L1.1 is involved in spinal cord regeneration in adult zebrafish [J]. *J Neurosci*, 2004, 24(36): 7837-42.
- [70] OHNMACHT J, YANG Y, MAURER G W, et al. Spinal motor

- neurons are regenerated after mechanical lesion and genetic ablation in larval zebrafish [J]. *Development*, 2016, 143(9): 1464-74.
- [71] HUANG C X, ZHAO Y, MAO J, et al. An injury-induced serotonergic neuron subpopulation contributes to axon regrowth and function restoration after spinal cord injury in zebrafish [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 7093.
- [72] SEIJFFERS R, MILLS C D, WOOLF C J. ATF3 increases the intrinsic growth state of DRG neurons to enhance peripheral nerve regeneration [J]. *J Neurosci*, 2007, 27(30): 7911-20.
- [73] WANG L F, HUANG S B, ZHAO H D, et al. Activating transcription factor 3 promotes spinal cord regeneration of adult zebrafish [J]. *Biochem Bioph Res Co*, 2017, 488(3): 522-7.
- [74] GUO Y, MA L, CRISTOFANILLI M, et al. Transcription factor Sox11b is involved in spinal cord regeneration in adult zebrafish [J]. *Neuroscience*, 2011, doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.10.026.
- [75] GUO Y, LIU S, ZHANG X, et al. Sox11 promotes endogenous neurogenesis and locomotor recovery in mice spinal cord injury [J]. *Biochem Bioph Res Co*, 2014, 446(4): 830-5.
- [76] HASLINGER A, SCHWARZ T J, COVIC M, et al. Expression of Sox11 in adult neurogenic niches suggests a stage-specific role in adult neurogenesis [J]. *Eur J Neurosci*, 2009, 29(11): 2103-14.
- [77] OGAI K, NAKATANI K, HISANO S, et al. Function of Sox2 in ependymal cells of lesioned spinal cords in adult zebrafish [J]. *Neurosci Res*, 2014, doi: 10.1016/j.neures.2014.07.010.
- [78] SU Z, NIU W, LIU M L, et al. In vivo conversion of astrocytes to neurons in the injured adult spinal cord [J]. *Nat Commun*, 2014, 5(1): 1-15.
- [79] WANG L L, SU Z, TAI W, et al. The p53 pathway controls SOX2-mediated reprogramming in the adult mouse spinal cord [J]. *Cell Rep*, 2016, 17(3): 891-903.
- [80] QIU J, CAFFERTY W B, MCMAHON S B, et al. Conditioning injury-induced spinal axon regeneration requires signal transducer and activator of transcription 3 activation [J]. *J Neurosci*, 2005, 25(7): 1645-53.
- [81] LANG C, BRADLEY P M, JACOBI A, et al. STAT3 promotes corticospinal remodelling and functional recovery after spinal cord injury [J]. *Embo Rep*, 2013, 14(10): 931-7.
- [82] PARK K K, LIU K, HU Y, et al. Promoting axon regeneration in the adult CNS by modulation of the PTEN/mTOR pathway [J]. *Science*, 2008, 322(5903): 963-6.
- [83] SUN F, PARK K K, BELIN S, et al. Sustained axon regeneration induced by co-deletion of PTEN and SOCS3 [J]. *Nature*, 2011, 480(7377): 372-5.
- [84] JIN D, LIU Y, SUN F, et al. Restoration of skilled locomotion by sprouting corticospinal axons induced by co-deletion of PTEN and SOCS3 [J]. *Nat Commun*, 2015, 6(1): 1-12.
- [85] MAK H K, NG S H, REN T, et al. Impact of PTEN/SOCS3 deletion on amelioration of dendritic shrinkage of retinal ganglion cells after optic nerve injury [J]. *Exp Eye Res*, 2020, doi: 10.1016/j.exer.2020.107938.
- [86] MA T C, BARCO A, RATAN R R, et al. cAMP-responsive element-binding protein (CREB) and cAMP co-regulate activator protein 1 (AP1)-dependent regeneration-associated gene expression and neurite growth [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(47): 32914-25.
- [87] GOLDSHMIT Y, TANG J K K, SIEGEL A L, et al. Different Fgfs have distinct roles in regulating neurogenesis after spinal cord injury in zebrafish [J]. *Neural Dev*, 2018, 13(1): 1-14.
- [88] CHERRY J D, OLSCHOWKA J A, O'BANION M K. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed [J]. *J Neuroinflamm*, 2014, 11(1): 1-15.
- [89] SHECHTER R, MILLER O, YOVEL G, et al. Recruitment of beneficial M2 macrophages to injured spinal cord is orchestrated by remote brain choroid plexus [J]. *Immunity*, 2013, 38(3): 555-69.
- [90] HUI S P, SHENG D Z, SUGIMOTO K, et al. Zebrafish regulatory T cells mediate organ-specific regenerative programs [J]. *Dev Cell*, 2017, 43(6): 659-72.e5.
- [91] REIMER M M, NORRIS A, OHNMACHT J, et al. Dopamine from the brain promotes spinal motor neuron generation during development and adult regeneration [J]. *Dev Cell*, 2013, 25(5): 478-91.
- [92] BARREIRO-IGLESIAS A, MYSLAK K S, SCOTT A L, et al. Serotonin promotes development and regeneration of spinal motor neurons in zebrafish [J]. *Cell Rep*, 2015, 13(5): 924-32.
- [93] LOGAN A, AHMED Z, BAIRD A, et al. Neurotrophic factor synergy is required for neuronal survival and disinhibited axon regeneration after CNS injury [J]. *Brain*, 2006, 129(2): 490-502.
- [94] BREMER J, MARSDEN K C, MILLER A, et al. The ubiquitin ligase PHR promotes directional regrowth of spinal zebrafish axons [J]. *Commun Biol*, 2019, 2(1): 1-15.
- [95] PENG S X, YAO L, CUI C, et al. Semaphorin4D promotes axon regrowth and swimming ability during recovery following zebrafish spinal cord injury [J]. *Neuroscience*, 2017, doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.03.030.
- [96] KING C E, WALLACE A, RODGER J, et al. Transient up-regulation of retinal EphA3 and EphA5, but not ephrin-A2, coincides with re-establishment of a topographic map during optic nerve regeneration in goldfish [J]. *Exp Neurol*, 2003, 183(2): 593-9.
- [97] HOU Y, LIU X, GUO Y, et al. Strategies for effective neural circuit reconstruction after spinal cord injury: use of stem cells and biomaterials [J]. *World Neurosurgery*, 2022, doi: 10.1016/j.wneu.2022.02.012.
- [98] FLAIVE A, RYCZKO D. From retina to motoneurons: a substrate for visuomotor transformation in salamanders [J]. *J Comp Neurol*, 2022, 530(14): 2518-36.
- [99] KARAKASILIOTIS K, SCHILLING N, CABELGUEN J M, et al. Where are we in understanding salamander locomotion: biological and robotic perspectives on kinematics [J]. *Biol Cybern*, 2013, 107(5): 529-44.
- [100] ELEWA A, WANG H, TALAVERA-LÓPEZ C, et al. Reading and editing the *Pleurodeles waltl* genome reveals novel features of tetrapod regeneration [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1-9.