

· 实验研究 ·

Sema3A 对小鼠原代视网膜神经节细胞轴突生长的抑制作用

张洁琼¹ 严军² 叶剑¹

¹陆军军医大学大坪医院眼科,重庆 400042; ²陆军军医大学大坪医院第一研究室 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042

通信作者:叶剑,Email:yejian1979@163.com

【摘要】目的 观察 Sema3A 对小鼠原代视网膜神经节细胞(RGCs)轴突生长的作用。**方法** 生后 24 h 内的 C57BL/6 小鼠,颈椎脱臼法处死后取出眼球,剥离出视网膜组织原代培养 RGCs,采用 Brn3a 免疫荧光染色法鉴定 RGCs。将培养 7 d 的 RGCs 分为对照组、0.05 μg/ml Sema3A 组、0.10 μg/ml Sema3A 组和 0.50 μg/ml Sema3A 组,分别加入相应质量浓度 Sema3A 处理 2 h,采用免疫荧光染色法检测各组细胞中神经元特异性标志物 β3-tubulin、树突标志物 MAP2 的表达,β3-tubulin⁺/MAP2⁻鉴定为轴突,采用 Image J 软件测量轴突长度;选取 0.1 μg/ml Sema3A 处理组和对照组细胞,分别于处理后 0.5、1 和 2 h 测量轴突长度。根据不同药物处理方式将细胞分为对照组、Sema3A 处理组、Y27632 处理组和联合处理组,观察并比较各组轴突长度变化。**结果** 原代培养的细胞 Brn3a 呈阳性表达,鉴定为 RGCs。培养后 7 d, RGCs 趋于成熟,有完整、细长的神经元突起,可见分支。0.05 μg/ml Sema3A、0.10 μg/ml Sema3A、0.50 μg/ml Sema3A 组轴突长度分别为 (69.35±1.49)、(60.45±1.42) 和 (93.65±1.86) μm,均明显短于对照组的 (109.80±2.29) μm,差异均有统计学意义(均 P<0.01)。0.1 μg/ml Sema3A 组 1 h 和 2 h 后细胞轴突长度分别为 (165.00±4.39) μm 和 (97.63±2.79) μm,明显短于相应时间对照组的 (210.40±4.44) μm 和 (199.00±4.36) μm,差异均有统计学意义(均 P<0.01);对照组、Sema3A 处理组、混合处理组和 Y27632 处理组轴突长度总体比较,差异有统计学意义(F=142.50, P<0.01),其中 Sema3A 处理组 RGCs 轴突长度明显短于对照组和混合处理组,差异均有统计学意义(均 P<0.01)。**结论** Sema3A 对小鼠原代 RGCs 轴突生长具有抑制作用,ROCK 信号通路抑制剂可减轻 Sema3A 对轴突生长的抑制作用。

【关键词】 视网膜神经节细胞; Sema3A; 轴突; 抑制

基金项目: 国家自然科学基金项目(81570840)

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.03.004

Inhibitory effect of Sema3A on axonal growth of primary retinal ganglion cells in mice

Zhang Jieqiong¹, Yan Jun², Ye Jian¹

¹Department of Ophthalmology, Daping Hospital, Army Medical University, Chongqing 400042, China; ²Department 1, State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Army Medical University, Chongqing 400042, China

Corresponding author: Ye Jian, Email: yejian1979@163.com

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of Semaphorin3A (Sema3A) on axon growth of primary retinal ganglion cells (RGCs) in mice. **Methods** C57/BL6 mice within 24 hours after birth were sacrificed and the eyeballs were removed, RGCs was isolated from retina and cultured *in vitro*. The primary cultured RGCs was identified by Brn3a immunofluorescence staining. Seven days after culture, the RGCs was divided into control group, 0.05 μg/ml Sema3A group, 0.10 μg/ml Sema3A group and 0.50 μg/ml Sema3A group, and the processing time was 2 hours. Immunofluorescence staining was used to detect the expression of neuron-specific marker β3-tubulin and dendritic marker MAP2, β3-tubulin⁺/MAP2⁻ was identified as axons. The length of axons was measured by Image J software. The axon lengths of 0.10 μg/ml Sema3A group and control group at 0.5, 1 and 2 hours after treatment were calculated. The primary cultured cells were divided into control group, Sema3A treatment group, Y27632 treatment group and combined treatment group according to different drugs. The average axon lengths were compared among the groups. The use and care of the animals complied with the Statement of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO). **Results** Brn3a was positively expressed in primary cultured RGCs as a specific cell

marker. Seven days after culture, RGCs tended to mature, with complete elongated neuronal processes and branches. The axon lengths of 0.05, 0.10 and 0.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Sema3A groups were (69.35 ± 1.49) , (60.45 ± 1.42) and (93.65 ± 1.86) μm , which were significantly shorter than (109.80 ± 2.29) μm of the control group (all at $P < 0.01$). The axon length of 0.10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Sema3A group was (165.00 ± 4.39) μm and (97.63 ± 2.79) μm at 1 hour and 2 hours after treatment, respectively, which was significantly lower than (210.40 ± 4.44) μm and (199.00 ± 4.36) μm of control group at corresponding time points (both at $P < 0.01$). There was a significant difference in the axon length of control group, Sema3A treatment group, mixed treatment group and Y27632 treatment group ($F = 142.50$, $P < 0.01$). The RGC axon length of Sema3A treatment group was significantly lower than that of control group and combined treatment group (both at $P < 0.01$). **Conclusions** Sema3A can inhibit axon growth of primary retinal RGCs in mice, and ROCK signaling pathway inhibitors can alleviate such restrain effect.

[Key words] Retinal ganglion cells; Sema3A; Axon; Inhibitory effects

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81570840)

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.03.004

视神经是中枢神经系统的一部分,其损伤后再生能力十分有限。外伤、青光眼、糖尿病、肿瘤等占位性病变均可导致视神经损伤、萎缩,最终引起视力严重下降,甚至致盲,严重影响患者的工作和生活^[1]。视神经主要由大量的视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 轴突组成,因此, RGCs 的状态直接影响着视神经的功能^[2]。Sema3A (Semaphorin 3A) 是在脊椎动物中发现的神经导向因子之一,属于 Semaphorin 家族;在神经系统发育的定向投射过程中具有重要作用。此外,研究发现在中枢神经系统损伤后,Sema3A 不仅可以加速神经细胞的凋亡,还可减弱巨噬细胞对机体内髓磷脂的清除效应、抑制中枢神经髓鞘的再生^[3-5],从而阻碍中枢神经系统的再生,而 Sema3A 与 RGCs 轴突的关系还鲜有报道。因此,本研究中拟观察 Sema3A 对小鼠原代 RGCs 轴突生长的作用,为探讨视神经损伤修复提供新的思路和研究策略。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 出生后 24 h SPF 级健康新生 C57BL/6 小鼠来自陆军军医大学大坪医院实验动物中心,雌雄不限。本研究经陆军军医大学大坪医院伦理委员会批准,实验动物的使用和喂养遵循 ARVO 声明。

1.1.2 主要试剂 24 孔细胞培养板(美国 Corning 公司);DMEM/F12 培养基、胰蛋白酶、Hoechst33342(美国 Invitrogen 公司);胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)(以色列 BI 公司);多聚-D-赖氨酸氢溴酸盐 (poly-D-lysine hydrobromide, PDL)、Y27632(美国 Sigma 公司);B27、谷氨酰胺(美国 Gibco 公司);Sema3A 蛋白(5926-S3,美国 R&D Systems 公司);神经元培养基(美国 Cyclone 公司);大鼠抗小鼠神经元特

异性标志物 β 3-tubulin 一抗(ab78078)、兔抗鼠 MAP2 一抗(ab32454)(英国 Abcam 公司);兔抗鼠 Brn3a 一抗(AB5945, 美国 Millipore 公司);Alexa Fluor 594 标记的山羊抗鼠 IgG 二抗 (#8890)、Alexa Fluor 594 标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (#8889)、Alexa Fluor 488 山羊抗兔 IgG 二抗 (#4412)(美国 CST 公司)。

1.2 方法

1.2.1 原代 RGCs 的培养及鉴定 参照文献[6-8]的方法培养 RGCs。取出生 24 h 内的 C57BL/6 小鼠 8 只,以体积分数 75% 乙醇浸泡消毒后颈椎脱臼法处死,摘取眼球,显微镜下沿巩膜缘剪除角膜及眼前段组织,取出晶状体、玻璃体,钝性分离并取出视网膜,4 °C 条件下 $1000 \times g$ 离心 5 min, 弃上清后加入 3 ml 质量分数 0.25% 胰蛋白酶, 37 °C 水浴消化 15 min, 加入 1 ml 胎牛血清终止消化后补充添加 DMEM/F12 至 10 ml, 经直径 40 μm 的筛网过滤后 4 °C 条件下 $1000 \times g$ 离心 5 min, 弃上清, 加入神经元培养基(B27 1:50, 谷氨酰胺 1:100), 轻柔吹打制备细胞悬液, 以 $3 \times 10^5/\text{ml}$ 细胞密度接种于 0.1 mg/ml 多聚赖氨酸包被的 24 孔板中, 置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养, 于培养后第 7 天取出细胞进行实验。细胞以质量分数 4% 多聚甲醛溶液室温固定 30 min, PBS 清洗 3 次, 每次 5 min; 体积分数 0.3% Triton 溶剂破膜 15 min, PBS 清洗 3 次, 每次 5 min; 滴加 RGCs 特异性标志物 Brn3a 一抗 (1:100), 4 °C 孵育过夜, PBS 清洗 3 次, 每次 5 min; 滴加 Alexa Fluor 594 标记的山羊抗兔 IgG(1:500), 室温下孵育 1.5 h, PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 加 Hoechst33342 (1:2 000) 染核, 室温下孵育 5 min。PBS 清洗 3 次, 每次 5 min; 荧光显微镜下观察细胞荧光染色情况。

1.2.2 实验分组及处理 取出培养 7 d 的 RGCs, 将培养的细胞分为对照组、0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Sema3A 组、0.10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Sema3A 组、0.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Sema3A 组, 药物

分别作用2 h,根据各组轴突长度确定Sema3A蛋白干预的合适质量浓度。选取0.10 μg/ml Sema3A组和对照组细胞,分别于处理后0.5、1和2 h测量轴突长度,根据轴突长度确定Sema3A蛋白干预的合适处理时间。根据前期预实验结果,Y27632的合适作用浓度和时间为10 μmol/L和0.5 h。根据不同药物处理方式将来自同一批的培养7 d的细胞分为对照组、Sema3A处理组、Y27632处理组和联合处理组,其中Sema3A处理组细胞采用0.10 μg/ml Sema3A处理2 h,Y27632处理组细胞采用10 μmol/L Y27632处理0.5 h,联合处理组细胞先后接受Y27632处理组和Sema3A处理组的处理方式,确保各组细胞处理结束的时间点一致。

1.2.3 免疫荧光法测量轴突长度 各组细胞分别以4%多聚甲醛溶液室温下固定30 min,PBS清洗3次,每次5 min;0.3% Triton破膜15 min,PBS清洗3次,每次5 min;滴加鼠抗神经元突起特异性β3-tubulin一抗(1:500)和兔抗树突特异性MAP2一抗(1:500)4℃孵育过夜,PBS清洗3次,每次5 min;滴加荧光标记的山羊抗鼠IgG(1:500)、山羊抗兔IgG(1:500),室温下孵育1.5 h,PBS洗3次,每次5 min。加Hoechst33342(1:2 000)染核,室温下孵育5 min。PBS清洗3次,每次5 min;荧光显微镜下观察,每孔取上、下、中、左、右5个固定视野200倍镜下拍照,采用Image J软件测量视野内所有RGCs轴突长度,实验重复3次,取平均值。

1.3 统计学方法

采用SPSS 19.0统计学软件和Graphpad Prism7.0(美国Graphpad软件公司)进行统计分析和作图。本研究中测量的计量资料经W检验符合正态分布,以mean±SD表示。不同时间点对照组与Sema3A处理组轴突长度的差异比较采用两因素方差分析,多重比较采用LSD-t检验;不同质量浓度Sema3A组和不同处理方式组轴突长度比较采用单因素方差分析,多重比较采用LSD-t检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 原代培养RGCs的形态特征及鉴定

RGCs接种后大多贴壁生长,细胞体成圆形,培养后3 d,RGCs可见轴突和突触,多数聚集生长,成岛状(图1A);培养后7 d,RGCs趋于

成熟,可见完整的神经元突起和分支,且突起较长(图1B)。免疫荧光染色结果显示,培养的细胞Brn3a呈红色荧光(图2),鉴定体外培养的细胞为RGCs。

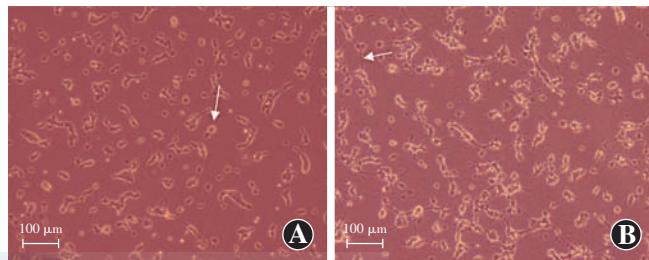


图1 光学显微镜观察原代培养RGCs的形态特征($\times 100$,标尺=100 μm) A:培养后3 d,RGCs细胞体成类圆形,可见突起(箭头) B:培养后7 d,RGCs趋于成熟,可见细长突起(箭头)

2.2 不同质量浓度Sema3A处理组RGCs轴突长度变化

对照组、0.05 μg/ml Sema3A组、0.10 μg/ml Sema3A组和0.50 μg/ml Sema3A组轴突长度分别为 (109.80 ± 2.29) 、 (69.35 ± 1.49) 、 (60.45 ± 1.42) 和 (93.65 ± 1.86) μm,不同质量浓度Sema3A组RGCs轴突长度总体比较,差异有统计学意义($F = 163.9, P < 0.01$),其中0.05 μg/ml、0.10 μg/ml、0.50 μg/ml Sema3A组轴突长度均明显短于对照组,0.10 μg/ml Sema3A组轴突长度明显短于0.50 μg/ml Sema3A组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)(图3)。因此,Sema3A的合适的作用质量浓度为0.10 μg/ml。

2.3 0.10 μg/ml Sema3A组和对照组不同作用时间点RGCs轴突长度变化

0.10 μg/ml Sema3A组和对照组不同时间点RGCs轴突长度总体比较,差异均有统计学意义($F_{\text{分组}} = 65.14, P < 0.05; F_{\text{时间}} = 63.14, P < 0.05$),其中0.10 μg/ml Sema3A组作用1 h和作用2 h RGCs轴突长度均比相应时间对照组短,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$);且0.10 μg/ml Sema3A组作用2 h后细胞轴

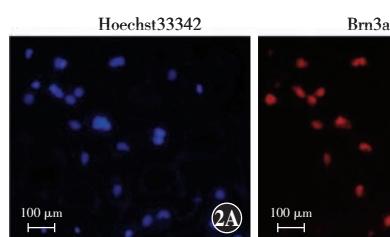
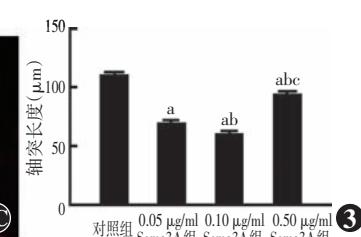


图2 荧光显微镜下观察培养细胞中Brn3a的表达($\times 400$,标尺=100 μm) 培养的细胞核呈蓝色荧光(Hoechst33342),Brn3a为阳性表达,呈红色荧光(Alexa Fluor 594) 图3 不同质量浓度Sema3A组RGCs轴突长度比较 $F = 163.90, P < 0.01$ 。与对照组比较,^a $P < 0.01$;与0.05 μg/ml Sema3A组比较,^b $P < 0.01$;与0.10 μg/ml Sema3A组比较,^c $P < 0.01$ (单因素方差分析,LSD-t检验,n=1147)



突长度短于作用1 h后值,差异有统计学意义($P<0.01$) (表1)。选取 $0.10\text{ }\mu\text{g/ml}$ Sema3A的合适作用时间为2 h。

表1 $0.10\text{ }\mu\text{g/ml}$ Sema3A组和对照组处理不同时间点 RGCs 轴突长度比较 (mean \pm SD, μm)

组别	样本量	不同作用时间点 RGCs 轴突长度		
		0.5 h	1 h	2 h
$0.10\text{ }\mu\text{g/ml}$ Sema3A 组	485	246.20 ± 5.94	$165.00\pm4.39^{\text{ab}}$	$97.63\pm2.79^{\text{abc}}$
对照组	486	217.00 ± 6.04	210.40 ± 4.44	199.00 ± 4.36

注: $F_{\text{分组}}=65.14, P<0.05$; $F_{\text{时间}}=63.14, P<0.05$ 。与相应时间点对照组值比较,^a $P<0.01$;与组内作用0.5 h值比较,^b $P<0.01$;与组内作用1 h值比较,^c $P<0.01$ (两因素方差分析,LSD-*t*检验) RGCs:视网膜神经节细胞

2.4 不同处理组 RGCs 轴突长度变化

对照组、Sema3A 处理组、Y27632 处理组和混合处理组 RGCs 轴突长度分别为 (78.04 ± 1.38) 、 (44.41 ± 0.79) 、 (78.58 ± 1.52) 和 $(72.24\pm1.55)\text{ }\mu\text{m}$,各组总体比较差异有统计学意义($F=142.50, P<0.01$),其中

Sema3A 处理组轴突长度较对照组缩短,差异有统计学意义($P<0.01$);混合处理组轴突长度较 Sema3A 处理组长,差异有统计学意义($P<0.01$) (图4)。免疫荧光染色结果显示 Sema3A 处理组 RGCs 轴突($\text{MAP2}^-/\beta 3\text{-tubulin}^+$)较对照组短(图5)。

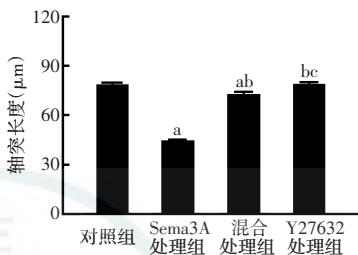


图4 不同处理组 RGCs 轴突长度比较 $F=142.50, P<0.01$ 。与对照组比较,^a $P<0.05$;与 Sema3A 处理组比较,^b $P<0.01$;与混合处理组比较,^c $P<0.01$ (单因素方差分析,LSD-*t*检验,n=723)

3 讨论

视神经损伤是临幊上常见的难治性眼病,目前临幊仍缺乏及时有效的救治措施,约有一半患者因此丧失视力,给患者的工作和生活造成了极大不便^[9]。Sema3A 是经典的轴突导向因子,对发育的神经元轴突

具有极强的排斥作用。研究表明,中枢神经系统受损后,受损神经元周围 Sema3A 及其受体表达上调,参与构成抑制受损后轴突再生的微环境,且对中枢神经细胞和胶质细胞均有明显的排斥作用^[10-11]。在金鱼视神经损伤后,玻璃体腔内注入 Sema3A 可以间接干扰视神经再生过程^[12]。此外,多项研究显示,大鼠视神经损伤模型中视网膜中 Sema3A 表达水平上升,且主要局限在 RGCs 层^[13-15]。然而,Sema3A 对原代培养 RGCs 轴突生长

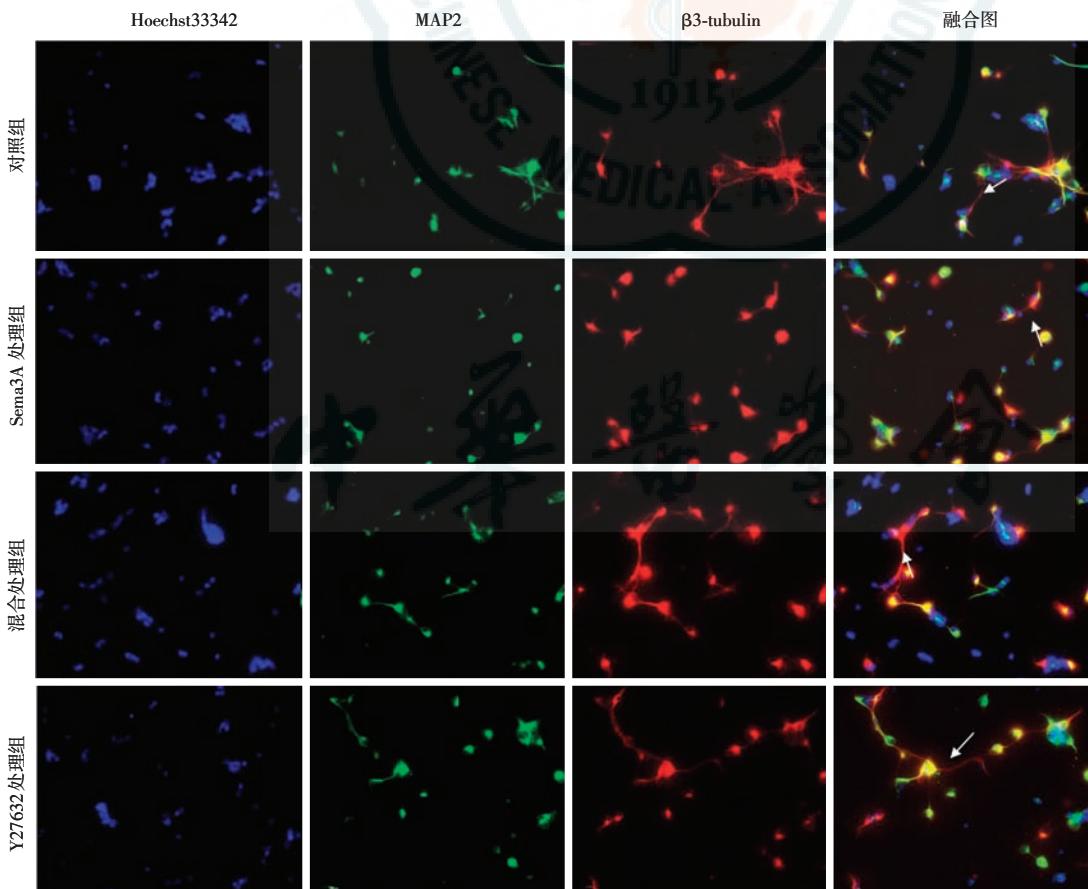


图5 免疫荧光染色观察不同处理组 RGCs 中 MAP2 和 $\beta 3\text{-tubulin}$ 的表达 ($\times 200$) 细胞核呈蓝色荧光(Hoechst33342),树突 MAP2 染色阳性,呈绿色荧光(Alexa Fluor 488),所有突起 $\beta 3\text{-tubulin}$ 染色阳性,呈红色荧光(Alexa Fluor 594),MAP2 染色阴性和 $\beta 3\text{-tubulin}$ 染色阳性为轴突(箭头)

的作用还鲜有报道。本研究中从新生小鼠视网膜中分离 RGCs 并进行原代培养, 经 Brn3a 特异性免疫荧光染色鉴定证实所培养的细胞为 RGCs, 通过加入外源性 Sema3A 蛋白观察其对轴突生长的影响。

本研究结果发现, 0.05 μg/ml ~ 0.50 μg/ml Sema3A 作用2 h后的 RGCs 轴突长度明显短于对照组; 且0.10 μg/ml Sema3A 作用0.5 h时轴突长度与相应时间对照组无明显差别, 当作用时间达到1 h以上时, 轴突长度开始明显短于相应时间点对照组, 说明 Sema3A 对 RGCs 轴突的生长存在抑制作用, 并且该抑制作用具有时间依赖性。推测其原因可能是 Sema3A 作用0.5 h时, 调控轴突生长的下游通路和效应分子的质量浓度不足以产生效应。Y27632 为 ROCK 信号通路抑制剂, 可以促进脊髓神经元的生长, 在视神经损伤后也可诱导神经轴突生长与再生^[16~18], 故本研究中将其作为神经生长的促进剂, 用于干预 Sema3A 对 RGCs 轴突生长的抑制作用。本研究结果显示, Y27632 可以减轻 Sema3A 对轴突生长的抑制作用, 推测 Sema3A 可能与 ROCK 信号通路相关, 这为研究视神经损伤后修复再生的研究提供了新的思路。本研究主要是基于细胞的离体实验, 还缺少在体动物层面的研究, 其作用机制还有待完善。

综上所述, Sema3A 对小鼠原代 RGCs 轴突生长具有抑制作用, 该作用可能通过 ROCK 信号通路来实现。此外, 该研究可为视神经损伤后选择恰当的时间点中和 Sema3A, 从而有效缓解其对轴突再生的抑制作用提供细胞学基础。由于视神经损伤后再生的过程极其复杂, 受多种因素调控, 未来的研究将对 Sema3A 在视神经损伤后对再生抑制作用的量效关系以及其与 ROCK 信号通路的相互作用进行进一步探索。

参考文献

- [1] You S, Wu M, Kuang F, et al. Restoration of optic neuropathy [J]. J Neurorestoratology, 2017, 5: 59~72. DOI: 10.2147/JN.S120640.
- [2] Wilhelm H, Schabet M. The diagnosis and treatment of optic neuritis [J]. Dtsch Arztebl Int, 2015, 112 (37) : 616~626. DOI: 10.3238/arztebl.2015.0616.
- [3] Mecollari V, Nieuwenhuis B, Verhaagen J. A perspective on the role of class III semaphorin signaling in central nervous system trauma [J]. Front Cell Neurosci, 2014, 8: 328. DOI: 10.3389/fncel.2014.00328.
- [4] Piaton G, Aigrot M S, Williams A, et al. Class 3 semaphorins influence oligodendrocyte precursor recruitment and remyelination in adult central nervous system [J]. Brain, 2011, 134 (4) : 1156~1167. DOI: 10.1093/brain/awr022.
- [5] 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. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4930-10.2011.
- [6] 胡丽丽, 艾明, 杨红霞, 等. 高糖对原代培养的视网膜神经节细胞中 Toll 样受体 4 表达的上调作用及其意义 [J]. 中华实验眼科杂志, 2017, 35 (7) : 597~602. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.07.005.
- [7] Hu LL, Ai M, Yang HX, et al. Regulation of high glucose to the expression of Toll-like receptor 4 in retinal ganglion cells and its significance [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2017, 35 (7) : 597~602. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.07.005.
- [8] Huang CJ, Huo Y, Chen C, et al. Protective effect of miR-30b on retinal ganglion cells against oxygen-glucose deprivation *in vitro* [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2016, 34 (5) : 396~401. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.05.004.
- [9] Pereiro X, Ruzafa N, Acera A, et al. Dexamethasone protects retinal ganglion cells but not Müller glia against hyperglycemia *in vitro* [J]. PLoS One, 2018, 13 (11) : e0207913 [2018-11-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6258116/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0207913. eCollection 2018.
- [10] Chun BY, Cestari DM. Advances in experimental optic nerve regeneration [J]. Curr Opin Ophthalmol, 2017, 28 (6) : 558~563. DOI: 10.1097/ICU.0000000000000417.
- [11] Andrews WD, Barber M, Nemitz M, et al. Semaphorin3A-neuropilin1 signalling is involved in the generation of cortical interneurons [J]. Brain Struct Funct, 2017, 222 (5) : 2217~2233. DOI: 10.1007/s00429-016-1337-3.
- [12] Rosenzweig S, Razprag D, Nitzan A, et al. Sema-3A indirectly disrupts the regeneration process of goldfish optic nerve after controlled injury [J]. Graefes Arch Clin Exp, 2010, 248 (10) : 1423~1435. DOI: 10.1007/s00417-010-1377-y.
- [13] Nitzan A, Kerner P, Shirvan A, et al. Examination of cellular and molecular events associated with optic nerve axotomy [J]. Glia, 2010, 54 (6) : 545~556. DOI: 10.1002/glia.20398.
- [14] Han F, Huo Y, Huang CJ, et al. MicroRNA-30b promotes axon outgrowth of retinal ganglion cells by inhibiting Semaphorin3A expression [J]. Brain Res, 2015, (1611) : 65~73. DOI: 10.1016/j.brainres.2015.03.014.
- [15] Sharma A, Pollett MA, Plant GW, et al. Changes in mRNA expression of class 3 semaphorins and their receptors in the adult rat retino-collicular system after unilateral optic nerve injury [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012, 53 (13) : 8367~8377. DOI: 10.1167/iovs.12-10799.
- [16] Duffy P, Schmandke A, Schmandke A, et al. Rho-associated kinase II (ROCK II) limits axonal growth after trauma within the adult mouse spinal cord [J]. J Neurosci, 2009, 29 (48) : 15266~15276. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4650-09.2009.
- [17] Fujita Y, Yamashita T. Axon growth inhibition by RhoA/ROCK in the central nervous system [J/OL]. Front Neurosci-Switz, 2014, 8 : 338 [2018-10-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/25374504/>. DOI: 10.3389/fnins.2014.00338.
- [18] Shaw PX, Sang A, Wang Y, et al. Topical administration of a Rock/Net inhibitor promotes retinal ganglion cell survival and axon regeneration after optic nerve injury [J]. Exp Eye Res, 2016, 158 : 33~42. DOI: 10.1016/j.exer.2016.07.006.

(收稿日期:2018-11-29 修回日期:2019-01-29)

(本文编辑:张宇)