

【药效学评价】

那如三味片对大鼠创伤性脊髓损伤后炎症作用的影响及相关机制研究

布 林¹, 何桂松¹, 何 冰²

1. 广州医科大学附属第二医院番禺院区 骨科, 广东 广州 511477

2. 广东药科大学 中药学院, 广东 广州 510006

摘 要: **目的** 观察那如三味片(Naru-3)对创伤性脊髓损伤大鼠炎症作用的影响,并探讨相关机制。**方法** SD大鼠随机分为假手术组、模型组、甲基泼尼松龙(MP, 30 mg/kg)组和Naru-3低、中、高剂量(10、20、30 mg/kg)组,每组12只。假手术组仅进行手术暴露,不进行打击;其他组别采用Allen's打击法建立大鼠脊髓损伤模型。术后30 min各组ig给药,假手术组和模型组ig等体积生理盐水,每天1次,连续21 d。采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)和western blotting法检测脊髓组织中白介素(IL)-1 β 、IL-6和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) mRNA和蛋白的相对表达量;ELISA法检测血清中IL-1 β 、IL-6和TNF- α 蛋白含量;免疫组织化学法确定脊髓组织单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)定位及表达;流式细胞术分析脊髓组织M1及M2表型巨噬细胞比例。**结果** 与模型组比较,Naru-3、MP显著减少血清中IL-1 β 、IL-6和TNF- α 蛋白含量,显著减少脊髓组织IL-1 β 、IL-6和TNF- α mRNA、蛋白水平($P < 0.05$ 、 0.001),Naru-3作用呈剂量、时间相关性;免疫组织化学结果显示,与模型组比较,Naru-3、MP可以明显减少脊髓中MCP-1表达;流式细胞术结果表明,与模型组比较,Naru-3、MP显著诱导M1表型巨噬细胞分化为M2表型($P < 0.001$)。**结论** Naru-3可以有效降低脊髓损伤引起的炎症反应,机制与诱导M1表型巨噬细胞分化为M2表型相关。

关键词: 那如三味片;脊髓损伤;炎症因子;巨噬细胞;甲基泼尼松龙;单核细胞趋化蛋白-1

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2019)07-1271-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.07.003

Anti-inflammatory effect of Mongolian medicine Naru-3 on traumatic spinal cord injury in rats and its mechanism

BU Lin¹, HE Guisong¹, HE Bing²

1. The Orthopaedic of Panyu, Second Affiliated Hospital of Guangzhou medical university, Guangzhou, 511477, China

2. Institute of Chinese medicine of Guangdong pharmaceutical university, Guangzhou, 510006, China

Abstract: Objective To observe the anti-inflammation effect of the Mongolian medicine naruru-3 (Naru-3) prescription in the treatment of spinal cord injury, and explore its related mechanism. **Methods** SD rats were randomly divided into sham group, model group, methylprednisolone (MP, 30 mg/kg) group and Naru-3 low, medium and high dose (10, 20, 30 mg/kg) group, with 12 rats in each group. The sham group was exposed to surgery only, but not attacked. The other groups were used Allen's attacking method to establish rat spinal cord injury model. Rats were ig administered in each group 30 min after operation, and rats in sham and model group was administered with normal saline once a day for 21 d. The relative expression levels of interleukin (IL)-1 β , IL-6 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in spinal cord tissues were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) and Western blotting. The levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in serum were detected by ELISA. The localization and expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in spinal cord tissues were determined by immunohistochemistry. The proportion of M1 and M2 phenotypic macrophages in spinal cord tissue was analyzed. **Results** Compared with model group, Naru-3 and MP significantly reduced the levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α protein in serum and the mRNA and protein levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in spinal cord tissue ($P < 0.05$, 0.001). The effect of Naru-3 was dose-dependent and time-dependent. Immunohistochemical results

收稿日期: 2018-10-11

基金项目: 广东省科技项目(2013A032500010)

第一作者: 布林(1959—),男,主任医师,外科学副教授,硕士研究生导师,研究方向为脊髓损伤后修复。E-mail: bulin@163.com

showed that Naru-3 and MP could significantly reduce the expression of MCP-1 in spinal cord compared with the model group. The results of flow cytometry showed that, compared with model group, Naru-3 and MP significantly induced M1 phenotype macrophages to differentiate into M2 phenotype ($P < 0.001$). **Conclusion** Naru-3 can effectively reduce the inflammatory response induced by spinal cord injury, and the mechanism is related to inducing M1 phenotype macrophages to differentiate into M2 phenotype.

Key words: Naru-3; traumatic spinal cord injury; inflammatory cytokines; macrophages; methylprednisolone; MCP-1

创伤性脊髓损伤(TSCI)是一种严重的疾病,可导致截瘫或四肢瘫痪。从全球范围来看,在不同国家或地区之间存在显著差异,TSCI的发病率从每百万人口的10.4~83例不等^[1]。在中国,TSCI的发病率逐年上升,在2004—2008年期间,平均每年有23.7个病例^[2]。TSCI患病人群主要集中在18~32岁男性^[3]。迄今为止,尚无完全治愈TSCI的方法,因此TSCI对患者生存期、生活质量及家庭经济负担均有显著影响。脊髓的机械损伤引发了原发性病变的形成,继发性损伤可导致继发性脊髓损伤、脑损伤扩张^[4]。初次损伤过程不可逆,可从继发性损伤方面加以治疗,从而改善病症^[5-6]。TSCI在某种程度上可激活免疫系统,推测炎症反应可能是造成继发性损伤的主要原因^[7]。原始细胞及入侵的炎症细胞均可造成一系列的破坏性和修复性^[8]。Bethea指出^[9],白介素(IL)-10具有神经保护作用,可通过激活巨噬细胞降低肿瘤坏死因子- α (TNF- α)合成,促进脊髓损伤功能修复。

尽管目前脊髓损伤不能完全治愈,但是已有多项疗法在动物模型中得到验证。Can等^[10]发现,在右旋糖和甲基异丁苯甲胺联合作用下,葡萄糖和IL-6的水平显著降低;右旋糖和甲基泼尼松龙(MP)联合治疗可以达到抑制炎症反应的效果。Bradbury指出^[12],软骨化酶-ABC可以促进与再生相关的蛋白表达,恢复突出后活动,促进提升的感觉投射和下降的皮质脊髓束的再生,可以促进人类脊髓损伤后功能恢复^[11]。目前,糖皮质类固醇和MP联合治疗在临床中得到广泛应用。

蒙药那如-3方是中国传统药物,可以追溯到1 000年前,广泛应用于多种免疫性疾病。那如-3由草乌(制)、葶苈、诃子3味药材组成,具有祛黄水、消肿、止痛的功效。临床研究发现蒙药那如-3方具有抗炎、镇痛和抗菌作用^[13],其在治疗脊髓损伤中的作用机制尚不明确。本研究通过构建脊髓损伤模型,研究那如三味片(Naru-3)在脊髓损伤模型中的作用,并对其机制进行初步探索。

1 材料

1.1 药物及主要试剂

Naru-3(内蒙古蒙药股份有限公司,规格12片/盒);逆转录试剂盒(大连宝生);大鼠IL-1 ELISA试剂盒(R&D,RLB00,USA);大鼠IL-6 ELISA试剂盒(R&D,R6000B,USA);大鼠TNF- α ELISA试剂盒(R&D,RTA00,USA);CD86-FITC(Pharmingen, San Diego, CA, USA);CD163(GeneTex, CA, USA)。

Naru-3匀浆的制备:去糖衣层,称取100 g,蒸馏水调成不同浓度匀浆,4℃冰箱保存,备用。

1.2 主要仪器

FACSCalibur流式细胞仪分析(Accuri C6, Bio-rad, 美国);酶标仪(680, Bio-rad, 美国);荧光定量PCR仪(C1000 Touch™ with Dual 48, Bio-rad, 美国);电泳仪(PowerPac™ HC, Bio-rad, 美国);电泳槽(Mini-PROTEAN Tetra, Bio-rad, 美国)。

1.3 实验动物

80只健康成年雄性SD大鼠,体质量250~300 g,购自南方医科大学实验动物中心,实验动物生产许可证号SCXK(粤)2016-0041。饲养环境:室温控制在24~26℃,每12 h阴暗交替,自由进食,隔日更换垫料。

2 方法

2.1 脊髓损伤动物模型的制备及术后处理

用10%的水合氯醛按0.3 mL/100 g给SD大鼠行ip麻醉,待麻醉生效后俯卧位固定,以13肋为标准寻找T12胸椎棘突,以T9胸椎棘突定为中心剪除约4 cm×3 cm范围毛发,常规碘伏消毒,铺巾,沿背部T6-12椎棘突正中线切开皮肤,钝性分离浅筋膜,剪开T8-11椎棘突两侧的深筋膜和肌肉,暴露棘突和椎弓板,用持针钳咬除T9-10棘突和椎板暴露椎管,然后用小直止血钳夹除其他椎板,充分暴露脊髓。用自制改良Allen装置使20 g重砝码沿塑料套管自5 cm高度(致伤能量100 g/cm)对准T9-10落下撞击脊髓(表面覆盖3 mm×7 mm弧形金属片),撞击面积为3 mm×7 mm。撞击成功的标志为:大鼠痉挛

性摆动,双下肢及躯干回缩样扑动,双下肢弛缓性瘫痪,造成脊髓挫伤模型,逐层缝合伤口。术后自由进食水,截瘫护理。假手术组仅打开椎管,不做撞击处理。

2.2 动物分组、给药及取材

适应性喂养1周后,随机选取12只作为假手术组,剩余68只进行脊髓损伤模型制备,成功制备60只,将其随机分模型组、MP(阳性药,30 mg/kg)组和Naru-3低、中、高剂量(10、20、30 mg/kg)组,每组12只。术前动物禁食12 h,自由饮水。术后30 min, Naru-3组立即ig给药,MP经尾iv注射治疗,假手术及模型组ig等体积的生理盐水,每天给药1次,连续给药21 d。

术后分笼喂养,每天人工挤尿3~4次,直到恢复排尿。给药7、14 d眼眶取血,血液离心,取上清,4℃保存备用。给药第21天,用10%的水合氯醛按0.3 mL/100 g给SD大鼠行ip麻醉后,仰卧位固定,暴露心脏,进行心脏取血。血液离心,取上清,4℃保存备用。取血完毕,处死,取包括头尾端在内的脊髓组织存放入4℃冰箱,备用。

2.3 检测炎症因子相对表达量

分别采用ELISA法、实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法、Western blotting法检测IL-1 β 、IL-6及TNF- α 相对表达量。

2.3.1 ELISA法检测血清中IL-1 β 、IL-6及TNF- α 相对表达量 取相应ELISA试剂盒检测收集到的血清中IL-1 β 、IL-6及TNF- α 表达量,操作步骤按说明书进行。

2.3.2 qRT-PCR法检测脊髓组织中IL-1 β 、IL-6及TNF- α mRNA相对表达量 每组各随机取3只大鼠脊髓,用Trizol提取脊髓总RNA,使用紫外分光光度计检测RNA浓度,各实验组取等量RNA逆转录为cDNA,进行PCR扩增。引物序列见表1,以 β -actin作为内参。

2.3.3 Western blotting法检测脊髓组织中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 相对表达量 每组随机取3只大鼠脊髓,

裂解脊髓组织,提取蛋白,测蛋白浓度。各组取50 μ g总蛋白进行SDS-PAGE电泳,采用12% PAGE胶。电泳结束后,取出凝胶,根据Marker切下目的条带,转至PVDF膜。用5%脱脂奶粉的PBST封闭,一抗4℃孵育过夜。PBST充分洗涤PVDF膜5~6次,每次5 min,二抗室温孵育2 h。PBST充分洗涤PVDF膜5~6次,每次5 min,加入适量ECL底物液,孵育数分钟。待荧光明显后,X光胶片压片后依次放入显影液显影、定影液定影。

2.4 免疫组织化学分析脊髓组织中单细胞化蛋白-1(MCP-1)的定位

每组取3只大鼠脊髓组织块经4%多聚甲醛固定,多级乙醇浸泡、二甲苯透明后石蜡包埋,切片为厚度3 μ m的组织切片,并附于经多聚赖氨酸附膜的载玻片上,65℃烘烤2 h。常规二甲苯脱蜡,梯度酒精脱水,PBS洗3遍,每次5 min。将切片浸泡于3% H_2O_2 中,37℃孵育10 min,PBS洗3遍,每次5 min。将切片置于0.01 mol/L枸橼酸缓冲液(pH 6.0)中用微波炉煮沸15 min,待冷却至室温后,PBS洗3遍,每次5 min。5%正常羊血清工作液封闭,37℃孵育30 min,甩干。孵育一抗,4℃冰箱孵育过夜,PBS洗3遍,每次5 min。孵育二抗:滴加辣根过氧化物酶标记的链霉素工作液,37℃孵育30 min,PBS冲洗3遍5 min。DAB/ H_2O_2 反应染色,自来水充分冲洗后,苏木精复染,常规脱水,透明,干燥,封片。

2.5 流式细胞术分析流式细胞术巨噬细胞表型变化

每组取3只大鼠脊髓新鲜组织制备细胞悬液,45 μ m过滤,梯度离心提取巨噬细胞。预冷PBS(pH 7.4)洗涤2次,重悬细胞,先后使用CD86-FITC抗体、CD163抗体进行孵育,PBS洗涤,FACSCalibur流式细胞仪分析。

2.6 统计分析

应用SPSS 17.0统计学软件进行数据统计分析,资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分

表1 引物序列
Table 1 Primer sequence

基因	引物5'-3'		产物/bp
	正向	反向	
β -actin	TCTTTTCCAGCCTTCTTCTCTTG	GGACTCATCGTACTCCTGCTTG	316
IL-1 β	ATCCCAAGCCAATACCCAAAGAA	AGAGGCAAGGAGGAAAACAGACC	388
IL-6	AGGATACCACTCCCAACAGACC	TCTTGGTCCTTAGCCACTCCTT	456
TNF- α	CTCTGTGAAGGGAATGGGTGTT	TTTGCAGAACTCAGGAATGGAC	296

析,组间多重比较采用LSD-*t*检验。

3 结果

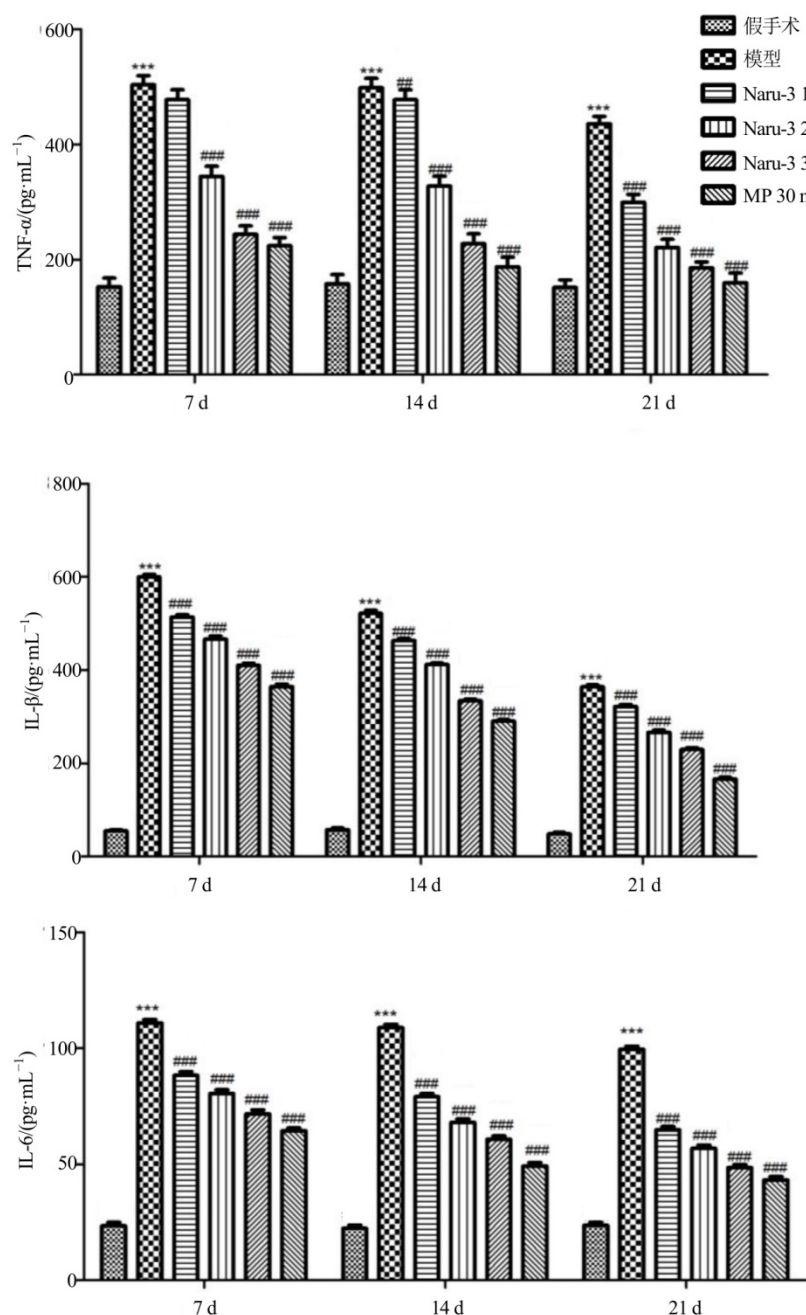
3.1 ELISA 法检测血清中 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 含量

如图1所示,与假手术组比较,模型组血清IL-1 β 、IL-6及TNF- α 含量显著升高($P < 0.001$);与模型组比较,除给药7 d Naru-3 低剂量组TNF- α 水平外, Naru-3 各剂量组、MP组血清IL-1 β 、IL-6及TNF- α 含量均显著下降($P < 0.001$),且Naru-3作用呈剂量相

关性。同时,伴随处理时间延长,IL-1 β 、IL-6及TNF- α 含量整体呈现下降趋势,推测伴随治疗时间延长,治疗效果逐渐增强。结果表明,Naru-3可有效降低IL-1 β 、IL-6及TNF- α 含量,伴随药物用量的增大以及治疗时间的延长,治疗效果逐渐增强。

3.2 qRT-PCR 法检测脊髓组织中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 相对表达量

如图2所示,与假手术组比较,模型组脊髓组织中IL-1 β 、IL-6、TNF- α mRNA水平显著升高($P <$



与假手术组比较:*** $P < 0.001$;与模型组比较:## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$

*** $P < 0.001$ vs sham group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group

图1 各组血清中IL-1 β 、IL-6及TNF- α 含量($\bar{x} \pm s$, $n = ?$)

Fig. 1 Concentrations of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in serum in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = ?$)

0.001);与模型组比较,Naru-3组、MP组 IL-1 β 、IL-6及 TNF- α 含量显著降低($P<0.001$)。结果表明,Naru-3可显著降低脊髓组织 IL-1 β 、IL-6及 TNF- α 含量,其作用效果与药物浓度相关。

3.3 Western blotting法检测脊髓组织中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 蛋白表达量

如图3所示,与假手术组比较,模型组脊髓组织 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 蛋白表达量显著升高($P<$

0.001);与模型组比较,Naru-3组、MP组 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 蛋白表达量显著下降($P<0.05$ 、0.001),且呈剂量相关性。

3.4 免疫组织化学分析脊髓组织中 MCP-1 定位

免疫组化结果显示(图4),MCP-1在细胞质中表达,脊髓损伤导致 MCP-1 表达量明显增高。与模型组比较,经不同浓度Naru-3处理后,MCP-1 表达量明显降低,且呈剂量相关性,MP处理组 MCP-1 表

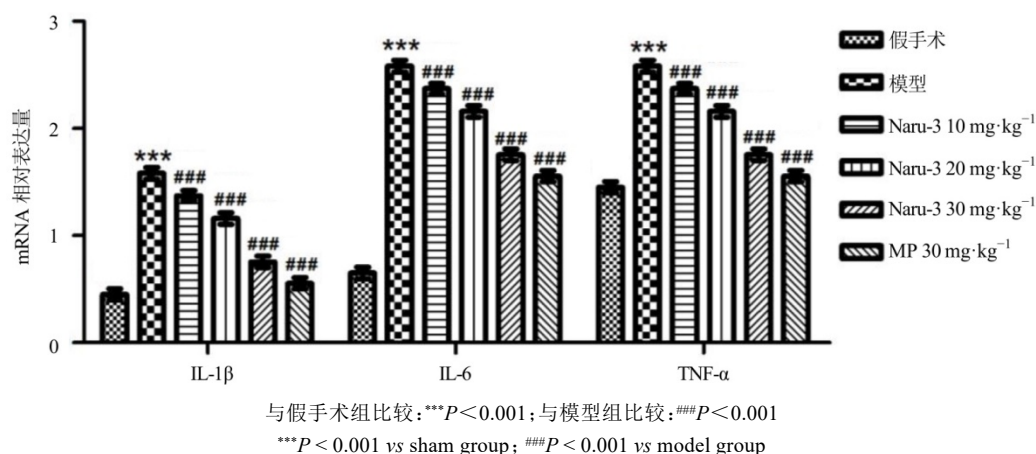


图2 各组脊髓组织中 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α mRNA 相对表达量($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 2 Relative mRNA expression levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in different dose groups of spinal cord tissue ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

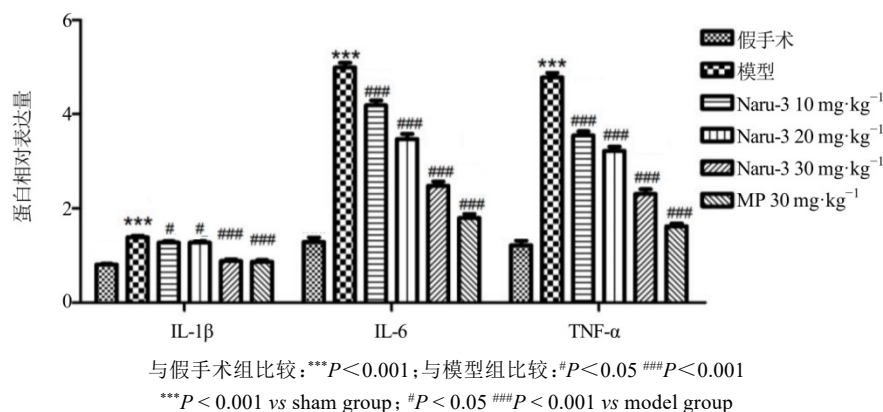
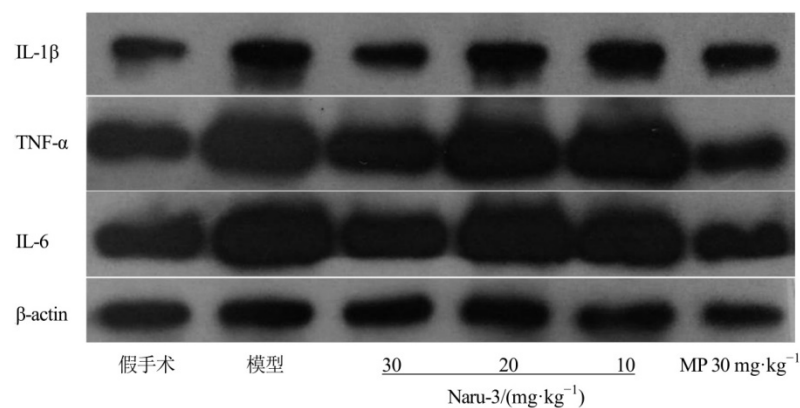


图3 各组 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 相对表达量($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 3 Expression of IL-1 β , IL-6, TNF- α in each group detected by Western blotting ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

达量显著降低,其降低效果与Naru-3高剂量处理组效果类似。

3.5 流式细胞术分析巨噬细胞表型变化

CD86作为M1表型巨噬细胞特异性marker,CD163作为M2表型巨噬细胞特异性marker,可用于鉴定脊髓损伤中巨噬细胞的鉴定。结果如图5所示,与假手术组比较,模型组脊髓细胞中M1巨噬细胞阳性率(CD86-FITC阳性)显著升高($P<0.001$),M2巨噬细胞阳性率(CD163-PE阳性)显著降低($P<0.001$),推测M1、M2表型差异与脊髓损伤有关;经

MP治疗后,与模型组比较,M1表型阳性率显著降低,M2表型阳性率显著升高($P<0.001$);与模型组比较,Naru-3各剂量组M1巨噬细胞阳性率显著降低,M2巨噬细胞阳性率显著升高($P<0.001$),且呈剂量相关性,Naru-3高剂量组M1、M2巨噬细胞表型阳性率与MP处理组相近。结果表明,Naru-3可能会影响巨噬细胞分型,从而影响脊髓损伤病程。

4 讨论

脊髓损伤引发了一种强烈的免疫反应,其主要特征是细胞因子和趋化因子合成,以及由周围的白

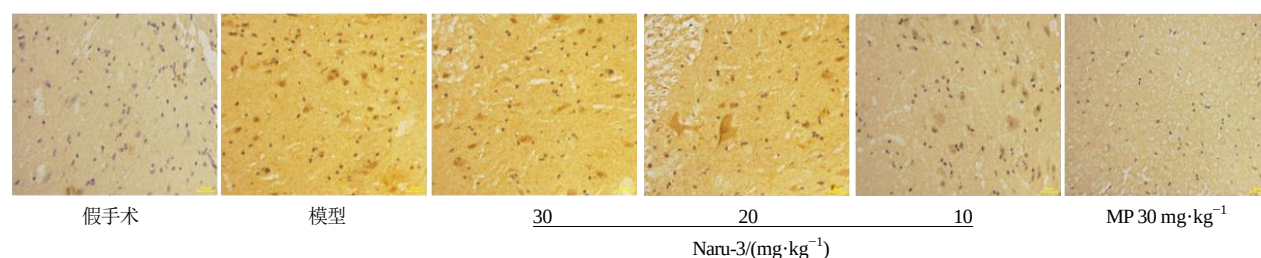
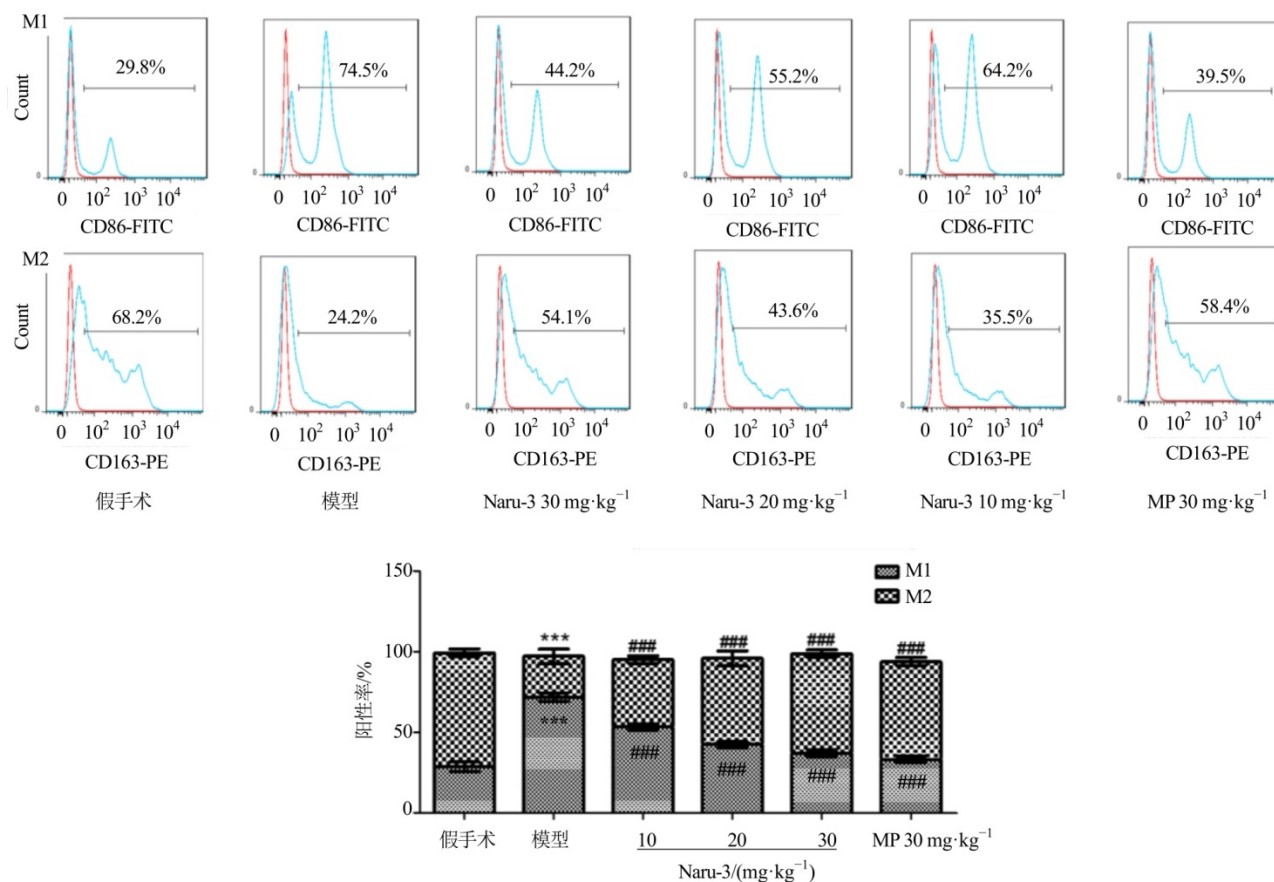


图4 免疫组化检测脊髓组织中MCP-1表达

Fig. 4 Immunohistochemical analysis for MCP-1 in spinal cord



与假手术组比较:*** $P<0.001$;与模型组比较:### $P<0.001$

*** $P<0.001$ vs sham group; ### $P<0.001$ vs model group

图5 巨噬细胞M1/M2表型变化($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 5 Flow cytometric analysis of M1-phenotype and M2-phenotype ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

细胞形成的受损部位的协同浸润^[14]。虽然最初的损伤是由病变引起的,但最终的病理组织学损伤远比在受伤后的最初确定的要严重得多^[15]。因此,对于二次损伤的治疗显得尤为重要。

研究表明,对于脊髓损伤可以通过干预急性中枢神经炎症反应加以治疗^[16-18]。促炎细胞因子的释放可刺激黏附分子和趋化因子的合成^[19-20]。研究表明,MCP-1可以激活噬细胞并参与脊髓损伤的炎症反应损伤^[21]。巨噬细胞有损伤和修复的功能,其功能的不同可能是由不同的表型噬细胞群引起的(M1或M2)^[22]。细胞损伤过程中可能会促进巨噬细胞表现为M1表型,损伤后的细胞产生高水平氧化代谢物(如超氧化物和一氧化氮)和促炎细胞因子^[23]。某些细胞因子可激活巨噬细胞分化为的M2显型,M2细胞在抑制破坏性免疫的同时可促进血管再生和基质重塑^[24]。

作为一种古老的蒙药,Naru-3可以减少患者体内促炎细胞因子表达,通过抑制炎症反应和继发性伤害级联反应缓解患者病情。在本实验中,脊髓损伤模型组的炎症细胞因子(IL-1、IL-6和TNF- α)水平和M1-表型的比例高于假手术组,这证明脊髓损伤可以诱导促炎症反应,而M1巨噬细胞则起到损伤作用。经Naru-3治疗后,模型组的炎症细胞因子水平和M1表型细胞的比例下降,M2表型巨噬细胞比例上升,推测M2表型巨噬细胞可促进损伤后修复。与假手术组比较,模型组大鼠MCP-1表达下调,这可能是由促炎细胞因子引起的。此外,随着炎症细胞因子减少和M2表型巨噬细胞增加,Naru-3组的MCP-1表达减弱。

MP是临床常见脊髓损伤治疗药物,但有研究表明MP疗效较低且有明显的副作用^[25-26],因此,研究脊髓损伤的新疗法是非常必要的。本研究发现,Naru-3对脊髓损伤具有抗炎作用,且其抗炎效果和MP组相近,机制与诱导M1表型巨噬细胞分化为M2表型相关。

参考文献

- [1] Wyndaele M, Wyndaele J J. Incidence, prevalence and epidemiology of spinal cord injury: What learns a worldwide literature survey? [J]. Spinal Cord, 2006, 44(9): 523-529.
- [2] Ning G Z, Yu T Q, Feng S Q, et al. Epidemiology of traumatic spinal cord injury in Tianjin, China [J]. Spinal Cord, 2011, 49(3): 386-390.
- [3] Lee B B, Cripps R A, Fitzharris M, et al. The global map for traumatic spinal cord injury epidemiology: update 2011, global incidence rate [J]. Spinal Cord, 2014, 52(2): 110-116.
- [4] Nashmi R, Fehlings M G. Changes in axonal physiology and morphology after chronic compressive injury of the rat thoracic spinal cord [J]. Neuroscience, 2001, 104(1): 235-251.
- [5] Bethea J R, Dietrich W D. Targeting the host inflammatory response in traumatic spinal cord injury [J]. Curr Opin Neurol, 2002, 15(3): 355-360.
- [6] Schwartz M, Kipnis J. Protective autoimmunity: Regulation and prospects for vaccination after brain and spinal cord injuries [J]. Trends Mol Med, 2001, 7(6): 252-258.
- [7] Carlson S L, Parrish M E, Springer J E, et al. Acute inflammatory response in spinal cord following impact injury [J]. Exp Neurol, 1998, 151(1): 77-88.
- [8] Jones T B, McDaniel E E, Popovich P G. Inflammatory-mediated injury and repair in the traumatically injured spinal cord [J]. Curr Pharm Des, 2005, 11(10): 1223-1236.
- [9] Bethea J R, Nagashima H, Acosta M C, et al. Systemically administered interleukin-10 reduces tumor necrosis factor- α production and significantly improves functional recovery following traumatic spinal cord injury in rats [J]. J Neurotrauma, 1999, 16(10): 851-863.
- [10] Can M, Gul S, Bektas S, et al. Effects of dexmedetomidine or methylprednisolone on inflammatory responses in spinal cord injury [J]. Acta Anaesthesiol Scand, 2009, 53(8): 1068-1072.
- [11] Bradbury E J, Moon L D, Popat R J, et al. Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury [J]. Nature, 2002, 416(6881): 636-640.
- [12] Jones T B, McDaniel E E, Popovich P G. Inflammatory-mediated injury and repair in the traumatically injured spinal cord [J]. Curr Pharm Des, 2005, 11(10): 1223-1236.
- [13] 李淑艳, 巴根那, 布日额, 等. 蒙药那如-3的研究进展 [J]. 内蒙古民族大学学报: 自然科学版, 2008, 23(1): 92-94.
- [14] Donnelly D J, Popovich P G. Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury [J]. Exp Neurol, 2008, 209(2): 378-388.
- [15] Hausmann N. Post-traumatic inflammation following spinal cord injury [J]. Spinal Cord, 2003, 41(7): 369-378.
- [16] Beattie M S. Inflammation and apoptosis: linked therapeutic targets in spinal cord injury [J]. Trends Mol Med, 2004, 10(12): 580-583.

- [17] Stirling D P, Khodarahmi K, Liu J, et al. Minocycline treatment reduces delayed oligodendrocyte death, attenuates axonal dieback, and improves functional outcome after spinal cord injury [J]. *J Neurosci*, 2004, 24 (9): 2182-2190.
- [18] Brambilla R, Bracchi-Ricard V, Hu W H, et al. Inhibition of astroglial nuclear factor kappaB reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury [J]. *J Exp Med*, 2005, 202(1): 145-156.
- [19] Ma M H, Wei T, Boring L, et al. Monocyte recruitment and myelin removal are delayed following spinal cord injury in mice with CCR2 chemokine receptor deletion [J]. *J Neurosci Res*, 2002, 68(6): 691-702.
- [20] Zhang J, De Koninck Y. Spatial and temporal relationship between monocyte chemoattractant protein-1 expression and spinal glial activation following peripheral nerve injury [J]. *J Neurochem*, 2006, 97(3): 772-783.
- [21] Lee Y L, Shih K, Bao P, et al. Cytokine chemokine expression in contused rat spinal cord [J]. *Neurochem Int*, 2000, 36(4/5): 417-425.
- [22] Kigerl K A, Gensel J C, Ankeny D P, et al. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord [J]. *J Neurosci*, 2009, 29(43): 13435-13444.
- [23] Popovich P G, Longbrake E E. Can the immune system be harnessed to repair the CNS? [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2008, 9(6): 481-493.
- [24] Sica A, Schioppa T, Mantovani A, et al. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: Potential targets of anti-cancer therapy [J]. *Eur J Cancer*, 2006, 42 (6): 717-727.
- [25] Hurlbert R J. Methylprednisolone for acute spinal cord injury: an inappropriate standard of care [J]. *J Neurosurg*, 2000, 93(1 Suppl): 1-7.
- [26] Bakalash S, Kessler A, Mizrahi T, et al. Antigenic specificity of immunoprotective therapeutic vaccination for glaucoma [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44(8): 3374-3381.