

羧甲酰促红细胞生成素促进脑缺血后神经再生的实验研究

王梓 邢宏义

【摘要】 目的 观察羧甲酰促红细胞生成素 (CEPO) 对实验大鼠脑缺血后 LINGO-1、生长相关蛋白 (GAP-43) 表达及脑梗死体积的影响,探讨 CEPO 对脑缺血后神经再生的促进作用。**方法** 将 48 只 SD 大鼠分为假手术组、缺血对照组及羧甲酰促红细胞生成素治疗组 (简称 CEPO 治疗组),采用线栓法将缺血对照组、CEPO 治疗组大鼠制成大脑中动脉闭塞 (MCAO) 模型。各组大鼠于脑缺血 90 min 后拔出线栓,CEPO 治疗组同时注射 0.5 ml CEPO,缺血对照组及假手术组均注射 0.5 ml 生理盐水。于缺血再灌注第 7 天时处死各组大鼠,采用免疫印迹技术检测 LINGO-1 和活化型 caspase-3 表达;采用免疫组化染色技术检测 GAP-43 表达;采用甲酚紫染色法检测各组大鼠脑梗死体积及脑水肿情况。**结果** 假手术组、缺血对照组及 CEPO 治疗组 LINGO-1 表达值分别为 (0.25 ± 0.02) 、 (1.22 ± 0.06) 和 (0.66 ± 0.05) , 各组间差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。假手术组大鼠脑皮质未见活化型 caspase-3 表达,缺血对照组缺血脑皮质活化型 caspase-3 表达值上升至 $(86.6 \pm 10.2)\%$,CEPO 治疗组则下降至 $(40.3 \pm 8.7)\%$, 各组间差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。假手术组、缺血对照组及 CEPO 治疗组 GAP-43 阳性表达值分别为 0、 (55.02 ± 1.62) 个/HP 和 (72.11 ± 3.23) 个/HP, 各组间差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。另外 CEPO 治疗组脑梗死体积及脑水肿程度均显著小于缺血对照组 ($P < 0.05$)。**结论** 脑缺血后给予 CEPO 干预能抑制实验大鼠脑梗死部位 LINGO-1 及活化型 caspase-3 表达、促进 GAP-43 蛋白表达、减小脑梗死体积及脑水肿程度,从而发挥促神经再生作用。

【关键词】 脑缺血; 羧甲酰促红细胞生成素; 生长相关蛋白-43; 半胱氨酸蛋白酶-3; 神经再生

基金项目:湖北省自然科学基金(2016CFB626)

Carbamylated erythropoietin can promote neural regeneration after cerebral ischemia Wang Zi, Xing Hongyi. Department of Neurology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

Corresponding author: Xing Hongyi, Email: xinghongyi215@163.com

【Abstract】 Objective To investigate any effects of carbamylated erythropoietin (CEPO) on the expression of LINGO-1, growth-associated protein-43 (GAP-43) and the infarcted volume after cerebral ischemia, so as to explore the effect of CEPO on neural regeneration after cerebral ischemia. **Methods** Forty-eight Sprague-Dawley rats were randomly divided into a sham operation group, an ischemia control group and a CEPO treatment group, each of 16. Middle cerebral artery occlusion (MCAO) was used to simulate focal cerebral ischemia in all except the rats in the sham operation group. Then the CEPO group was injected with 0.5 ml of CEPO, while the other two groups were given a 0.5 ml injection of normal saline daily for 7 days before they were sacrificed to prepare slices of brain tissue. Western blotting was used to detect the expression of LINGO-1 and activated caspase-3. Immunohistochemical staining was applied to observe the expression of GAP-43. The slices of brain tissue were stained with cresyl violet and the volume of infarction and edema were quantified with the Image J software. **Results** The average expression of LINGO-1 in the sham operation group, the ischemia control group and the CEPO treatment group were (0.25 ± 0.02) , (1.22 ± 0.06) and (0.66 ± 0.05) respectively, with significant differences among the 3 groups. There was no expression of activated caspase-3 in the sham operation group. However, the expression of activated caspase-3 increased significantly (to $86.6 \pm 10.2\%$) in the ischemia control group and increased significantly less (to $40.3 \pm 8.7\%$) in the CEPO treatment group. The average positive expression of GAP-43 in the sham operation group, the ischemia control group and the CEPO treatment group were 0, (55.02 ± 1.62) and (72.11 ± 3.23) /HP, respectively, with significant differences among them. Moreover, the average volumes of cerebral infarction and brain edema in the CEPO treatment group were

significantly lower than those in the ischemia control group. **Conclusions** CEPO can inhibit the expression of LINGO-1 and activated caspase-3, promote the expression of GAP-43, reduce infarct volume and limit cerebral edema so as to promote neural regeneration after cerebral ischemia, at least in rats.

[Key words] Cerebral ischemia; Carbamylated erythropoietin; Growth-associated protein 43; Caspase-3; Neural regeneration

Fund program: Hubei Province Natural Science Foundation (grant 2016CFB626)

长期临床实践表明,神经再生障碍是导致脑卒中后遗症和脊髓损伤后遗症的重要原因之一^[1]。近年来相关研究发现 Nogo 受体复合物中的一种跨膜蛋白——含亮氨酸重复序列和免疫球蛋白结构域的 Nogo 受体作用蛋白(LRR and Ig domain-containing Nogo receptor interacting protein, LINGO-1)在中枢神经系统损伤后轴突再生中发挥关键作用^[2]。羧基化促红细胞生成素(carbamylated erythropoietin, CEPO)是促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)的衍生物,具有增加脑缺血再灌注后脑血流量及抗细胞凋亡等作用^[3],但 CEPO 是否具有促进神经再生的作用目前报道甚少。基于上述背景,本研究拟初步探讨 CEPO 调控 LINGO-1 表达对脑缺血后神经再生的影响。

材料与方法

一、主要实验材料

选取健康雄性成年 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 48 只,体重 180~200 g,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供,所有实验动物均在自然昼夜节律光照环境下饲养,其摄食、饮水不受任何限制。主要实验试剂羧基化促红细胞生成素(CEPO)来源于美国 Warren Pharmaceuticals 公司;兔抗活化型半胱氨酸蛋白酶(cysteine aspartase, caspase)抗体来源于美国 BD Biosciences 公司;兔抗 LINGO-1 多克隆抗体来源于美国 Upstate 公司;兔抗 β -actin 抗体来源于美国 Santa Cruz 公司;兔抗生长相关蛋白(growth associated protein 43, GAP-43)单克隆抗体来源于香港 Abcam 有限公司;超敏增强化学发光试剂盒(enhanced chemoluminescence, ECL)来源于上海碧云天生物技术有限公司。

二、制模及分组处理

采用随机数字表法将上述实验大鼠分为 3 组,分别是假手术组(共有大鼠 12 只)、缺血对照组(共有大鼠 18 只)及羧基化促红细胞生成素治疗组(简称 CEPO 治疗组,共有大鼠 18 只)。将缺血对照组及 CEPO 治疗组大鼠制成大脑中动脉栓塞/再灌注(middle cerebral artery occlusion/reperfusion, MCAO/R)动物模型,具体制模操作如下:制模前实验大鼠均禁食 8 h,禁水 4 h;采用 10%水合氯醛(按每千克体重 3 ml 标准)进行腹腔注射麻醉;待麻醉剂生效后将大鼠仰卧位固定,经 75%酒精消毒皮肤,颈部正中切开皮肤,钝

性分离皮下层组织及颈总动脉鞘,游离出颈总动脉、颈内动脉和颈外动脉后用缝线结扎颈总动脉近心端,在颈总动脉分叉处的近心端置线备用。在颈总动脉分叉下方 4 mm 处做血管切口,插入直径为 0.20 mm 或 0.24 mm 且顶端涂有多聚-L-赖氨酸的线栓(均购自北京沙东生物技术有限公司),用备用缝线稍微固定。向颈内动脉入颅方向继续插入线栓,当线栓通过颈内动脉到达大脑前动脉并有轻微阻力感时停止插入(此时线栓插入深度为 20~21 mm)并结扎固定线,依次缝合各层组织及皮肤,经碘酒消毒后剪去滞留在外面栓线。假手术组大鼠制模操作同上,但线栓插入深度为 10 mm,未阻塞大脑中动脉入口。

各组大鼠于脑缺血 90 min 后拔出线栓进行再灌注,同时立即进行颈动脉插管并采用微泵(model 310, Zakmedicine Tech, USA)进行颈动脉药物注射。治疗组大鼠按每千克体重 50 μ g 标准注射 CEPO(注射用 CEPO 采用 0.5 ml 生理盐水溶解配制),缺血对照组及假手术组大鼠均注射 0.5 ml 生理盐水。手术完毕后解除麻醉,各组大鼠被放回饲养笼内自由摄食、饮水。

三、LINGO-1 蛋白及活化型 caspase-3 蛋白检测

于 CEPO 注射 7 d 后,假手术组、缺血对照组及 CEPO 治疗组各随机取 6 只大鼠断头处死,提取缺血区大脑皮质组织,在 0.01 M、pH 值为 7.2 的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)中匀浆、离心,按比例加入 1 \times 裂解液,置于冰上 20 min 并不断搅拌,于 4 $^{\circ}$ C 环境下离心 8 min(12000 g),取上清液用 5 倍缓冲液稀释,煮沸 10 min 后用于 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。电泳开始阶段电压为 80 V,当溴酚蓝跑过浓缩胶后将电压加大至 180 V,继续电泳至溴酚蓝跑到凝胶底部。将凝胶上蛋白转移到聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上,并用 5%脱脂奶粉(实验室用)封闭膜,加入用 5%脱脂牛奶按 1000:1 稀释的第一抗体(兔抗 LINGO-1 多克隆抗体或多克隆兔抗活化型 caspase-3 抗体),4 $^{\circ}$ C 环境下孵育过夜。洗膜后加入 5%脱脂牛奶稀释,再加入由过氧化物酶标记的第二抗体(4000:1),37 $^{\circ}$ C 摇床上孵育 2 h,漂洗后置于 ECL 溶液中显色,采用 ChemiDoc XPS 系统扫描,选用 Image Lab 3.0 版图像分析软件检测样本中 LINGO-1 蛋白、活化型 caspase-3 蛋白和 β -actin 蛋白各显色条带的平均光密度值,前二者与 β -actin 蛋白的比

值即为 LINGO-1 蛋白或活化型 caspase-3 蛋白的相对表达值。

四、GAP-43 检测

于 CEPO 注射 7 d 后,假手术组、缺血对照组及 CEPO 治疗组各随机取 6 只大鼠采用 10% 水合氯醛(按每千克体重 3 ml 标准)腹腔注射麻醉,采用 4% 多聚甲醛经心脏灌注,然后断头取脑,提取缺血区大脑皮质组织于 4℃、4% 多聚甲醛中固定 24 h,常规石蜡包埋后行连续冠状切片,片厚约 5 μm。采用链霉素抗生物蛋白-过氧化酶检测脑梗死周边区 GAP-43 表达,具体操作要点如下:65℃ 烘箱中烘片 2 h,二甲苯 I、II 脱蜡,逐级乙醇脱水,0.01 M PBS 液漂洗,EDTA 缓冲液修复,置于 3% 过氧化氢溶液中孵育 10 min,阻断内源性过氧化物酶,经 5% BSA 封闭非特异性染色反应,加入一抗(兔抗大鼠 GAP-43 单克隆抗体)孵育过夜(4℃),经 0.01 M PBS 液漂洗后,再加入二抗(生物素化羊抗兔)孵育(4℃)50 min,漂洗后滴加新鲜配置的 DAB 显色液,然后采用苏木精复染细胞核、氨水返蓝、逐级乙醇脱水、二甲苯透明、中性树脂封片,置于光镜下观察并拍照,每张切片在脑梗死周边区随机取 5 个高倍镜视野(×400),采用 Image-Pro plus 图像分析软件检测 GAP-43 阳性细胞数量。

五、脑梗死体积及脑水肿程度检测

于 CEPO 注射 7 d 后,缺血对照组及 CEPO 治疗组各随机取 6 只大鼠断头处死,取出全脑后迅速从大脑额极处向后每间隔 3 mm 切片,共切取 4 块冠状位脑组织块,置于干冰上速冻,再置入 AO 恒冷箱切片机内进行切片(片厚 18 μm),贴片后置于 4% 多聚甲醛中浸泡 7 min,经 ddH₂O 漂洗 1 次后置于甲酚紫染液中静置 2 min,摇荡 13 min,再经逐级乙醇脱水、二甲苯固定、透明、中性树脂封片等处理,采用 ImageJ 软件计算各组大鼠脑梗死体积及脑水肿数据^[4]。

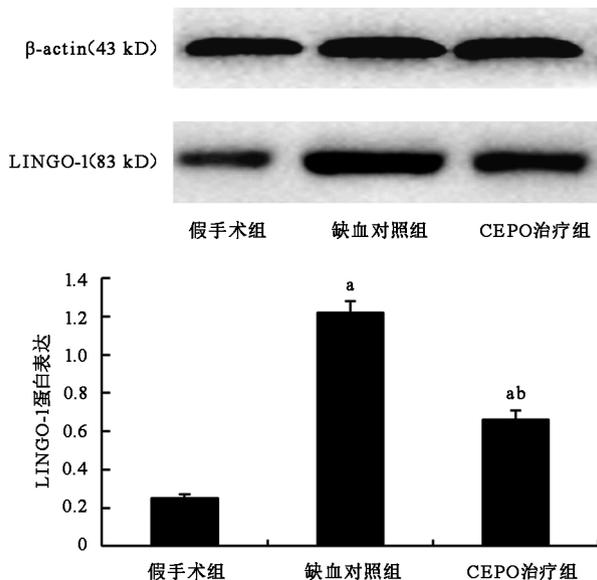
六、统计学分析

本研究所得计量数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 19.0 版统计学软件包进行数据分析,各组计量数据间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、各组大鼠 LINGO-1 表达比较

假手术组大鼠皮质 LINGO-1 蛋白表达仅为(0.25±0.02),缺血对照组 LINGO-1 蛋白表达上升至(1.22±0.06),CEPO 治疗组则下降为(0.66±0.05),各组间差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。上述结果表明 CEPO 能抑制脑缺血后 LINGO-1 蛋白表达。具体情况见图 1。

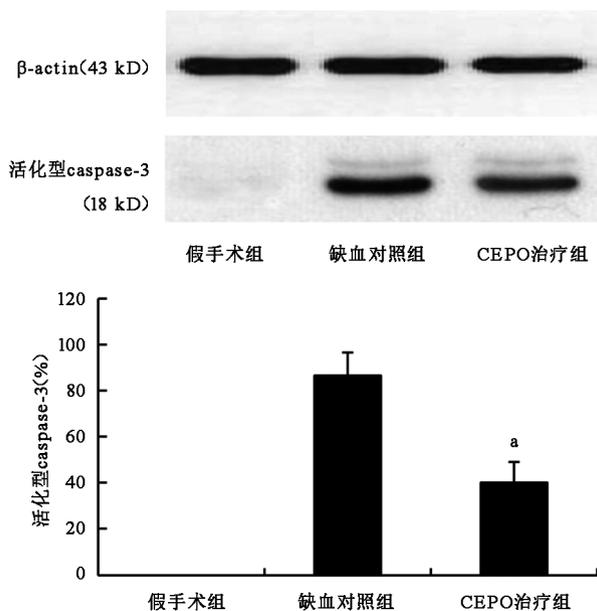


注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与缺血对照组比较,^b $P < 0.05$

图 1 各组大鼠 LINGO-1 蛋白表达比较

二、各组大鼠活化型 caspase-3 表达比较

假手术组大鼠脑皮质未发现活化型 caspase-3 表达,缺血对照组脑皮质中活化型 caspase-3 表达上升至(86.6±10.2)%,CEPO 治疗组则下降至(40.3±8.7)%,各组大鼠活化型 caspase-3 表达组间差异均具有统计学意义($P < 0.05$),具体情况见图 2。



注:与缺血对照组比较,^a $P < 0.05$

图 2 各组大鼠活化型 caspase-3 表达比较

三、各组大鼠脑梗死周边区 GAP-43 阳性表达比较

GAP-43 阳性表达主要集中在脑缺血半暗带区神经细胞膜上,呈褐色或棕黄色。本研究于 400 倍普通光镜下进行 GAP-43 阳性细胞计数,发现假手术组

脑梗死周边区无 GAP-43 表达,缺血对照组 GAP-43 阳性细胞计数为 (55.02 ± 1.62) 个/HP, CEPO 治疗组 GAP-43 阳性细胞计数则显著上升至 (72.11 ± 3.23) 个/HP, 各组间差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$), 具体情况见图 3。

四、各组大鼠脑梗死体积及脑水肿程度比较

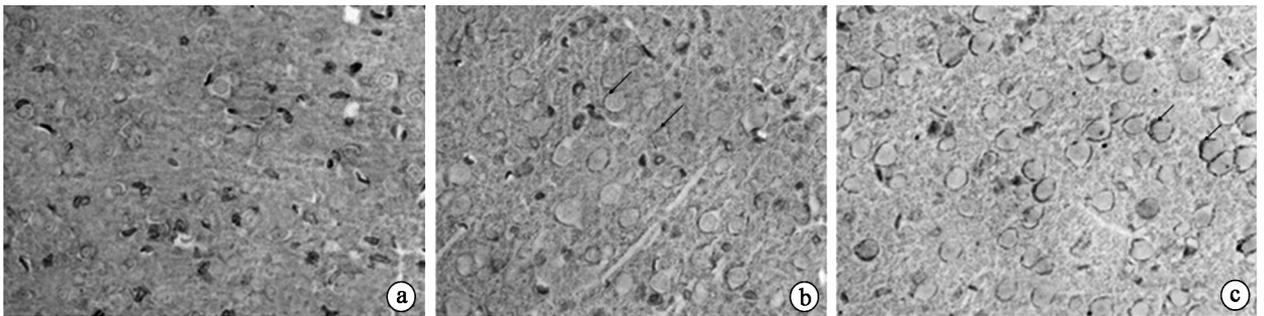
各组大鼠脑片经甲酚紫染色后,采用 ImageJ 软件计算脑梗死体积及相对脑水肿数据,发现缺血对照组脑梗死体积为 $(322.1 \pm 36.2) \text{ mm}^3$, CEPO 治疗组脑梗死体积则下降至 $(156.5 \pm 22.6) \text{ mm}^3$ 。缺血对照组相对脑水肿数据为 $(46.8 \pm 8.2)\%$, CEPO 治疗组则下降至 $(23.2 \pm 6.4)\%$ 。经统计学比较,发现 CEPO 治疗组脑梗死体积及脑水肿程度均明显优于缺血对照组水平,组间差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。各组大鼠脑梗死情况详见图 4。

讨 论

CEPO 是 EPO 衍生物,即 EPO 中的所有赖氨酸通

过氨甲酰化作用转换成高瓜氨酸而形成 CEPO,与 EPO 不同,CEPO 并不与经典的 EPO 受体结合,没有促红细胞生成的活性,对机体造血系统无明显影响,因此也就没有诱发血栓形成等副作用^[3,5]。相关研究表明,EPO 除了有神经保护作用外,还可促进损伤脊髓组织原位移植的神经干细胞存活及迁移,加速神经功能修复^[6]。抗神经节苷脂抗体能抑制吉兰-巴雷综合征患者的神经轴突再生,而 EPO 能够完全消除抗神经节苷脂抗体对神经再生的抑制作用,并提高自身免疫性神经病变动物模型的神经再生修复功能^[7]。Choi 等^[8]研究发现,EPO 及 CEPO 均能有效促进神经突生长,其作用机制与上调 E1A 结合蛋白(p300)和 p300 介导的 p53 乙酰化作用,进而增加 p53 对 GAP-43 蛋白的激活作用有关。但 CEPO 是否具有促进脑组织神经再生的作用目前报道甚少。

2004 年有学者应用基因组学和蛋白质组学方法在成年动物和人脑内发现了 Nogo 受体复合物中一种十分重要的跨膜蛋白,即含亮氨酸重复序列和免疫球



注:a 为假手术组,b 为缺血对照组,c 为 CEPO 治疗组;箭头处为 GAP-43 阳性表达
图 3 各组大鼠脑梗死周边区 GAP-43 阳性表达比较(免疫组化染色,×400)



注:脑片自左向右依次为距额极 3 mm、6 mm、9 mm、12 mm 冠状位切面;脑片左侧白色区为梗死区,右侧紫色区为正常脑组织。a 为缺血对照组,b 为 CEPO 治疗组,可见 CEPO 治疗组白色梗死区明显小于缺血对照组

图 4 各组大鼠脑梗死体积比较(甲酚紫染色)

蛋白结构域的 Nogo 受体作用蛋白 (LINGO-1), 该蛋白在中枢神经系统损伤后轴突再生中发挥关键作用^[9-10]。诸多研究表明 LINGO-1 是 Nogo 受体复合物的组成部分, 在轴突延伸、少突胶质细胞分化、髓鞘形成及神经元存活中具有重要作用^[11-13]。当中枢神经系统损伤后, 髓鞘断裂并释放出髓鞘源性轴突生长抑制分子, 其与 Nogo 受体复合物结合使 Rho 蛋白由非活化 RhoA-GDP 形式转化为活化 RhoA-GTP 形式, 进而激活下游 RhoA 激酶 (Rho-kinase, ROCK), 活化的 ROCK 使细胞骨架动力学发生改变并引发神经元内生长锥溃变, 从而抑制轴突再生^[14-15]。

脑梗死是发病率、致残率及致死率均很高的疾病, 临床在促进脑梗死后神经元再生、改善缺损神经功能、提高患者生活质量方面还未找到特别有效的治疗手段。刘建锋等^[16]采用线栓法制作大鼠大脑中动脉栓塞 (MCAO) 模型, 发现再灌注 7 d 后脑组织 Nogo-A 及 Rho 激酶表达上升, 通过意向运动训练能抑制缺血区周围 Nogo-A 和 Rho 激酶表达, 从而改善 MCAO 大鼠神经功能缺损症状, 提示 Nogo 能抑制脑缺血大鼠神经生长。LINGO-1 作为 Nogo 受体复合物的关键成分, 为脑缺血后神经再生干预提供了可能线索及解决途径。目前国内、外针对 LINGO-1 在脑缺血后神经细胞再生中的作用均报道甚少。黄浩然等^[17]分别采用 RT-PCR 法、免疫组化法检测 LINGO-1 mRNA 及蛋白表达, 发现局灶性脑梗死大鼠脑内 LINGO-1 水平明显上调, 辅以运动训练可降低 LINGO-1 表达并改善神经功能。

鉴于 CEPO 在机体脑缺血后有抗细胞凋亡及促周围神经再生作用, 因此本研究推测 CEPO 可能也具有促脑缺血后神经再生的功效。本研究利用线栓法制作大鼠中动脉闭塞 (MCAO) 动物模型, 采用 Western blot 技术检测 LINGO-1 表达, 结果发现脑缺血后 LINGO-1 表达明显增强, CEPO 可抑制 LINGO-1 表达。由于 LINGO-1 是 Nogo 受体复合物中的组成部分, 其下游能激活 RhoA-ROCK, 导致细胞骨架崩解、神经突生长受到抑制。因此本研究推测 CEPO 能影响 Nogo 受体复合物, 进而有助于减小 LINGO-1 对神经再生的阻抑作用。

生长相关蛋白-43 (GAP-43) 是一种主要存在于神经生长锥和突触前膜的神经组织特异性磷酸化蛋白, 在促进神经发芽及诱导轴突生长方面具有重要作用^[18]。机体正常神经系统不表达 GAP-43, 只有当神经系统损伤时才有 GAP-43 表达, 即只要有损伤导致突触重建, 即使无轴突延伸, GAP-43 也会呈现高水平表达, 一旦突触恢复正常, GAP-43 表达水平也会急剧下降, 呈微量或阴性表达。因此国际上也将 GAP-43

作为神经生长发育和损伤修复等神经可塑性研究的首选分子探针, 是神经元轴突再生的分子标志。有研究发现反复脑缺血致血管性痴呆 (vascular dementia, VD) 大鼠其海马 CA1 区 GAP-43 表达在第 7 天时达到高峰, 运动训练可增强 GAP-43 表达, 从而改善 VD 大鼠学习记忆能力^[19]。本研究也发现脑缺血再灌注第 7 天时大鼠脑梗死周边区 GAP-43 表达明显增强, 表明脑缺血后由于神经元损伤, 机体启动神经自我修复机制, CEPO 干预能进一步增强 GAP-43 表达, 提示 CEPO 具有促神经生长作用。

细胞凋亡 (apoptosis) 是机体生长发育、细胞分化及病理状态中细胞自主性死亡过程, 其发生机制十分复杂, 其中 caspase 在神经元凋亡中发挥重要作用。人类 caspase 家族成员至少有 11 种, 均以无活性酶前体 (pro-caspase) 形式存在。细胞凋亡过程涉及多种 caspase 参与, 而 caspase 的激活是级联反应模式, 最后激活 caspase-3, 它是所有细胞凋亡途经的最后执行者, 能激活脱氧核糖核酸酶, 将 DNA 裂解成碎片, 导致细胞凋亡^[20]。本研究发现假手术组脑皮质无活化型 caspase-3 表达, 缺血对照组活化型 caspase-3 表达明显增强, CEPO 治疗组活化型 caspase-3 表达较缺血对照组显著降低。上述结果提示 CEPO 能抑制活化型 caspase-3 表达而发挥神经保护作用。同时本研究采用 cresyl-violet 染色法观察各组大鼠脑梗死体积及脑水肿情况, 发现 CEPO 干预能明显减小实验大鼠脑梗死体积、减轻脑水肿程度。

综上所述, 本研究结果显示 CEPO 干预能抑制脑缺血大鼠 LINGO-1 及活化型 caspase-3 表达, 促进 GAP-43 蛋白表达及减小脑梗死体积、减轻脑水肿程度, 从而发挥促神经再生作用, 但关于 CEPO 促神经再生的确切分子机制还有待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] 诸葛栋, 梁战华, 宋琳, 等. 不同来源干细胞神经分化能力的研究现状 [J]. 中国组织工程研究, 2010, 14 (32): 6031-6035. DOI: 10.3969/j.issn.1673-8225.2010.32.031.
- [2] Schwab ME, Strittmatter SM. Nogo limits neural plasticity and recovery from injury [J]. Curr Opin Neurobiol, 2014, 27 (27C): 53-60. DOI: 10.1016/j.conb.2014.02.011.
- [3] Chen J, Yang Z, Zhang X. Carbamylated erythropoietin: A prospective drug candidate for neuroprotection [J]. Bioch Ins, 2016, 8 (S1): 25-29. DOI: 10.4137/BCI.S30753.
- [4] 邢宏义, 梅元武, 孙圣刚, 等. 可重复性小鼠局灶性脑缺血/再灌注模型的探讨 [J]. 中华神经医学杂志, 2006, 5 (12): 1209-1212. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-8925.2006.12.007.
- [5] Montero M, Poulsen FR, Norberg J, et al. Comparison of neuroprotective effects of erythropoietin (EPO) and carbamylerythropoietin (CEPO) against ischemia-like oxygen-glucose deprivation (OGD) and

- NMDA excitotoxicity in mouse hippocampal slice cultures [J]. *Exp Neurol*, 2007, 204 (1): 106-117. DOI: 10.1016/j.expneurol.2006.09.026.
- [6] 王仲伟, 关庆凯, 周文科, 等. 促红细胞生成素促进脊髓损伤大鼠移植神经干细胞存活和迁移 [J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16 (36): 6736-6740. DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2012.36.015.
- [7] Zhang G, Lehmann HC, Bogdanova N, et al. Erythropoietin enhances nerve repair in anti-ganglioside antibody-mediated models of immune neuropathy [J]. *PLoS One*, 2011, 6 (10): e27067. DOI: 10.1371/journal.pone.0027067.
- [8] Choi M, Ko SY, Lee IY, et al. Carbamylated erythropoietin promotes neurite outgrowth and neuronal spine formation in association with CBP/p300 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 446 (1): 79-84. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.02.066.
- [9] Mi S, Lee X, Shao Z, et al. LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex [J]. *Nat Neurosci*, 2004, 7 (3): 221-228. DOI: 10.1038/nn1188.
- [10] Mi S, Sandrock A, Miller RH. LINGO-1 and its role in CNS repair [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40: 1971-1978. DOI: 10.1016/j.biocel.2008.03.018.
- [11] Mi S, Pepinsky RB, Cadavid D. Blocking LINGO-1 as a therapy to promote CNS repair: from concept to the clinic [J]. *CNS Drugs*, 2013, 27 (7): 493-503. DOI: 10.1007/s40263-013-0068-8.
- [12] Bhatt A, Fan LW, Pang Y. Strategies for myelin regeneration: lessons learned from development [J]. *Neural Regen Res*, 2014, 9 (14): 1347-1350. DOI: 10.4103/1673-5374.137586.
- [13] Andrews JL, Fernandez-Enright F. A decade from discovery to therapy: Lingo-1, the dark horse in neurological and psychiatric disorders [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2015, 56: 97-114. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2015.06.009.
- [14] Jepson S, Vought B, Gross CH, et al. LINGO-1, a transmembrane signaling protein, inhibits oligodendrocyte differentiation and myelination through intercellular self-interactions [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287 (26): 22184-22195. DOI: 10.1074/jbc.M112.366179.
- [15] 吴洪福, 侯景义, 邓宇斌. Lingo-1 及其在脊髓损伤神经再生中作用的研究进展 [J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2011, 21 (1): 67-70. DOI: 10.3969/j.issn.1004-406X.2011.01.17.
- [16] 刘建锋, 侯德仁, 张杰文. 意向运动疗法对大鼠脑缺血后 Nogo-A 和 Rho 激酶表达的影响 [J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2015, 37 (6): 401-405. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2015.06.001.
- [17] 黄浩然, 李光勤, 付敏, 等. 运动训练对大鼠局灶脑梗死后脑内 LINGO-1 的表达及其对神经功能的影响 [J]. *重庆医科大学学报*, 2013, 38 (2): 134-137. DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2013.02.0036.
- [18] Laxu T, Fukami K, Thelen M, et al. GAP43, MARCKS, and CAP23 modulate PI(4,5)P(2) at plasmalemmal rafts, and regulate cell cortex actin dynamics through a common mechanism [J]. *J Cell Biol*, 2000, 149 (7): 1455-1472.
- [19] 樊振勇, 陈丽娜, 徐琳峰, 等. 运动训练对血管性痴呆大鼠学习记忆能力及海马 GAP-43 表达的影响 [J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2009, 31 (7): 433-436. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2009.07.001.
- [20] McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2015, 7 (4): a026716. DOI: 10.1101/cshperspect.a026716.

(修回日期: 2016-12-13)

(本文编辑: 易浩)

· 外刊撷英 ·

Anti-inflammatory treatment after ACL injury

BACKGROUND AND OBJECTIVE More than 50% of patients with anterior cruciate ligament (ACL) rupture develop radiographic abnormalities and post-traumatic osteoarthritis within five to 15 years post-injury. This study was designed to determine whether steroid injections affect the inflammatory biomarkers evident in the joint after such injuries.

METHODS Patients with ACL tears received intra-articular injections at four days and two weeks post-injury. Group one received a corticosteroid injection (triamcinolone, 40 mg) at four days and a placebo at two weeks. Group two received a placebo saline injection at four days and a corticosteroid injection at two weeks. Group 3 received corticosteroid injections at both time intervals. Group four received placebo injections at both intervals.

RESULTS Arthrocentesis was performed on the day of initial presentation, between six and 10 days after the initial visit and on the day of surgery. Patient-reported outcomes were collected at the initial visit and at the time of surgery, with outcome scores obtained from the 5 KOOS subscales, the International Knee Documentation Committee Measure, visual analog scale pain scale and the Pain Catastrophizing Scale. Both chondrodegenerative and inflammatory markers worsened over the first five weeks, while all patient-reported outcomes improved during this time. Patient-reported outcomes did not differ between those of patients in the corticosteroid group and those in the placebo group. Increases in CTX-II, associated with greater type II collagen breakdown, were significantly greater in the placebo group than either of the two groups receiving steroids within the first several days post-injury.

CONCLUSION This study of patients with ACL ruptures found that biochemical indicators of early osteoarthritis were evident before surgery, with intra-articular steroids able to suppress some of these.

【摘自: Lattermann C, Jacobs CA, Proffitt Bunnell M, et al. A multicentered study of early anti-inflammatory treatment in patients with acute anterior cruciate ligament tear. *Am J Sports Med*, 2017, 45 (2): 325-333.】