

基础研究

慢病毒介导的脑红蛋白体内基因转染
对兔损伤脊髓的作用陈宣维¹, 林文平², 林建华¹

(1 福建医科大学附属第一医院脊柱外科 350005 福州市; 2 福建医科大学附属第二医院骨科 362000 泉州市)

【摘要】目的:观察慢病毒介导脑红蛋白(Ngb)体内基因转染兔损伤的脊髓组织后对后肢运动功能的影响,探讨其作用机制。**方法:**用球囊压迫法制成兔脊髓损伤(SCI)模型 96 只,随机分为对照组(A 组)、生理盐水组(B 组)、空载体组(C 组)和 Ngb 慢病毒组(D 组),每组动物 24 只,A 组 SCI 后无治疗;B 组 SCI 后向脊髓内注射生理盐水;C 组 SCI 后向脊髓内注射空病毒;D 组 SCI 后向脊髓内注射 Ngb 重组慢病毒。各组分别在 1、3、7、14、21d 采用 BBB 运动功能评分系统检测兔后肢运动功能情况;观察损伤脊髓组织内标记荧光的表达;Real-time PCR 和 Western blot 检测 Ngb mRNA 及其相应蛋白的表达情况,生化方法检测丙二醛(MDA)和一氧化氮(NO)水平。**结果:**损伤后 14d 和 21d,D 组 BBB 评分明显高于其他 3 组($P<0.05$),但 A、B 及 C 组之间比较无差异($P>0.05$);C 组和 D 组兔损伤部位脊髓组织均有 GFP 表达的绿色荧光信号;损伤后 7d、14d 和 21d,D 组的 Ngb 表达与其他 3 组比较明显增强($P<0.05$);损伤后 7d、14d 和 21d,D 组损伤脊髓组织中 MDA、NO 含量明显低于其他 3 组($P<0.05$)。**结论:**慢病毒介导脑红蛋白(Ngb)体内基因转染可使 Ngb 高表达,可能是通过减轻继发性 SCI,从而促进 SCI 后后肢运动功能的恢复。

【关键词】脊髓损伤;脑红蛋白;转基因;丙二醛;一氧化氮

doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2012.03.15

中图分类号:R683.2,Q786 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2012)-03-0272-06

The protection of lentivirus-mediated neuroglobin gene transfer in vivo on injured spinal cord in rabbits, an experimental study/CHEN Xuanwei, LIN Wenping, LIN Jianhua//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2012, 22(3): 272~277

【Abstract】 Objectives: To investigate the possible protective mechanism of lentivirus-mediated neuroglobin gene transfer in vivo on injured spinal cord (SCI) in rabbits. **Methods:** Ninety-six New Zealand white rabbits were randomly divided into four groups($n=24$) according to intervention after SCI: no intervention(A); normal saline group(B); LV-GFP group (C); and LV-Ngb group(D).SCI was introduced by epidural balloon compression.24 hours after compression, T9 laminectomy was performed, then normal saline, LV-GFP or LV-Ngb was injected in situ respectively.Motor function of hind limbs after injection was evaluated by Basso-Beattie-Bresnahan(BBB) score, the expressions of green fluorescence in injured spinal cord were observed by fluorescence microscope, the expressions of Ngb mRNA and protein in injured spinal cord were detected by real-time PCR and Western blot, and the levels of malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) were also tested. **Results:** Significant functional improvement was observed in group D compared with group A, B and C at day 14 and 21.The expressions of green fluorescence in injured spinal cord were observed in group C and D.The Ngb expression in group D increased significantly compared with the other 3 groups at day 7, 14 and 21.The MDA and NO levels in group D were lower than the other 3 groups($P<0.05$) at day 7, 14 and 21. **Conclusions:** Lentivirus-mediated neuroglobin gene transfer in vivo may induce high expression of Ngb, which may be resulted from decreasing secondary spinal cord injury, thus promoting hind limbs motorfunction.

【Key words】 Spinal cord injury; Neuroglobin; Gene transfer; Malondialdehyde; Nitric oxide

【Author's address】 Department of Spine Surgery, the First Affiliated Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou, 350005, China

第一作者简介:男(1968-),医学博士,副教授,副主任医师,研究方向:脊柱疾病

电话:(0591)87982572 E-mail:fjcxw@126.com

脑红蛋白(neuroglobin, Ngb)是 2000 年由德国学者 Burmester 等^[1]发现的一种脊椎动物单体球蛋白。研究发现^[2,3], Ngb 是神经系统特异性携氧球蛋白及信号转导的调控因子, 可作为内源性神经保护因子, 对脑缺血性损伤、脑创伤等中枢神经系统损伤有较好的保护作用, 而外源性 Ngb 也具有神经保护作用^[4-8], 但脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)后 Ngb 高表达作用机制尚不清楚。本研究通过对 Ngb 重组慢病毒在兔体内转染, 观察体内 Ngb 表达情况及与丙二醛(MDA)和一氧化氮(NO)表达之间的关系, 探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

慢病毒载体及包装系统(pGC-FU 载体、pHelper 1.0 载体和 pHelper 2.0 载体)购自上海吉凯基因技术公司; 球囊购自美国 Medtronic 公司(型号 2.0mm×20mm); Trizol 购自美国 Invitrogen Life Technologies 公司; 逆转录试剂盒购自美国 Fermentas 公司; SYBR Premix Ex Taq™(Perfect Real Time)试剂盒购自日本 TaKaRa 公司; 羊抗兔 Ngb 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司; PVDF 膜购自美国 Bio Rad 公司; 丙二醛(malondialdehyde, MDA)、一氧化氮(nitric oxide, NO)试剂盒购自南京建成生物化学有限公司。

1.2 Ngb 重组慢病毒的制备

通过限制性内切酶 Age I 酶切, 将 Ngb 基因片段和 pGC-FU 载体连接, 转化入感受态 DH5 α 细胞中, 通过筛选获得 Ngb 重组慢病毒载体, 并进行测序。抽提慢病毒载体, 转染 293T 细胞, 24h 后荧光显微镜观察转染情况。转染后分别于 48h、72h 收集含病毒上清液, 4500r/min 离心 20min 收集上清液, 保存于-70℃备用。

1.3 球囊压迫建立兔 SCI 模型

用氯胺酮(50mg/kg)及异丙嗪(5mg/kg)肌注麻醉后, 将兔俯卧位固定于手术台上。无菌条件下取背部正中切口, 钝性分离椎旁肌, 暴露 T8~T12 的椎板及横突, 切除部分 T10 椎板(图 1), 在硬膜外、椎板下置入球囊至 T9 下缘, 将球囊充气, 压力为 2 个标准大气压(atmosphere, atm), 压迫时间为 5min(图 2), 然后逐层缝合^[9]。麻醉清醒后, 见动物后肢轻微活动但不能负重, BBB 后肢运动功能评分在 2~4 分^[10]为模型建立成功。各组动物术

后连续 7d 肌肉注射青霉素 80 万 U/d, 预防感染。每天行人工挤压膀胱排尿 2 次, 直至兔恢复自主排尿。

1.4 实验动物与分组

健康新西兰大白兔 96 只, 雌雄不限, 体重 2.5~3.0kg, 由福建医科大学实验动物中心提供。取造模成功动物随机分为 4 组, 每组动物 24 只: ①对照组(A 组): SCI 后无治疗; ②生理盐水组(NS, B 组): SCI 后向脊髓内注射生理盐水; ③空载体组(LV-GFP, C 组): SCI 后向脊髓内注射空病毒; ④Ngb 慢病毒组(LV-Ngb, D 组): SCI 后向脊髓内注射 Ngb 重组慢病毒。

1.5 兔 SCI 后干预方法

兔脊髓压迫损伤后 1d 行 BBB 后肢运动功能评分, 然后切除 T9 椎板, 暴露损伤节段脊髓。选择 SCI 节段的中点及距中点头侧和尾侧 5mm 处为注射点, 每个注射点注射 5 μ l(共 15 μ l), 深度 2mm; 用微量注射器以 1 μ l/min 的速度匀速将 NS、LV-GFP(2×10^8 TU/ml)或 LV-Ngb(2×10^8 TU/ml)分别注入各组兔 SCI 处, 明胶海绵压迫止血, 逐层缝合, 分笼饲养。

1.6 后肢运动功能评分

每组随机取 6 只兔, 采用 BBB 后肢运动功能评分法, 于 SCI 后 1、3、7、14、21d 分别由熟悉该评分标准的非本组实验人员进行测定。

1.7 脊髓组织标本处理及观察指标

每组在损伤后 4 个观察点(3、7、14 及 21d), 各取 6 只兔麻醉, 严格无菌操作下取以损伤部位为中点头、尾各 8mm 的脊髓组织, 平均分为 4 段: 头端第一段用于观察荧光表达, 第二段用于 MDA、NO 检测, 第三段用于 Western blot 检测, 第四段用于 Real-time PCR 检测。

1.7.1 荧光显微镜观察各组脊髓组织荧光表达第一段脊髓组织, 连续冰冻切片, 片厚 8 μ m, 置于荧光显微镜下观察荧光信号表达情况。

1.7.2 化学比色法测定脊髓组织中 MDA 含量第二段脊髓组织按照南京建成生物化学有限公司试剂盒操作方法进行操作。操作步骤如下, 配制好标准管及标准空白管后, 取脊髓组织匀浆上清各 0.1ml 加入测定管中。加入试剂, 漩涡混匀器混匀, 100℃水浴 40min, 流水冷却, 然后 4000r/min, 离心 10min, 取上清, 紫外分光光度计比色, 波长为 532nm, 测各管吸光度值, 再根据公式换算为脊髓

组织中 MDA 含量(nmol/mg pro)。硝酸还原酶法测定脊髓组织中 NO 含量,按照南京建成生物化学有限公司试剂盒操作方法进行操作,所得样本用分光光度计比色,波长为 550nm,测各管吸光度值,再根据公式换算脊髓组织中 NO 含量(mol/g pro)。

1.7.3 Western blot 检测各组脊髓组织 Ngb 蛋白的表达 第三段脊髓组织应用 Bio-Rad 方法提取各组兔脊髓组织总蛋白,用考马斯亮蓝法(Bradford 法)测蛋白浓度,调节蛋白浓度一致,取等量蛋白样品,SDS-PAGE 电泳分离蛋白,转 PVDF 膜,用 5%脱脂奶粉封闭后,先后加入一抗(山羊抗兔 Ngb 多克隆抗体,1:200,Santa Cruz 公司)和二抗(鼠抗羊 IgG,1:2000,北京中杉金桥生物技术有限公司)。以 β -actin 作为内对照(山羊抗兔 β -actin 单克隆抗体,Santa Cruz 公司,稀释浓度 1:500),步骤同上。用 Quantity One 软件对反应条带进行半定量分析,记录所测的灰度值。以 Ngb 与同组 β -actin 的灰度值比值表示 Ngb 蛋白的相对表达量。

1.7.4 Real-time PCR 检测各组脊髓组织 Ngb mRNA 的表达 第四段脊髓组织按 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA,紫外分光光度计测定总 RNA 纯度(A260/A280)均>1.8;采用美国 Fermentas 公司的逆转录试剂盒,按说明书操作,合成 cDNA。

Real-time PCR 检测采用 SYBR Premix Ex TaqTM(Perfect Real Time)试剂盒,设定 GAPDH 为管家基因,Ngb 和 GAPDH 引物参考 Gene Bank,使用 Prime 5.0 软件设计,由大连宝生物工程有限公司合成。Ngb 上游引物为:5'-CTGGACCACATCAGGAAGGT-3',下游引物为:5'-CCCAGACACTTCTCCAGCAT-3',扩增长度为 182bp,基因编号为 NM_001082133;GAPDH 上游引物为:5'-CCACTTTGTGAAGCTCATTTTCCT-3',下游引物为:5'-TCGTCCTCCTCTGGTGCTCT-3',扩增长度为 140bp,基因编号为 NM_001082253。在 RT PCR 仪(TAKARA Thermal Cycler Dice TP800)上进行 PCR 反应。RT PCR 反应的数据分别采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[11]进行分析, $\Delta\Delta Ct$ =各组 ΔCt (目的基因 Ct-管家基因 Ct)-对照组 ΔCt (目的基因 Ct-管家基因 Ct)。每份样本均重复测量两次,取其平均值。

1.8 统计学方法

用 SPSS 16.0 统计分析软件进行统计处理。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,各组间行单因素方差分析,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Ngb 重组慢病毒载体测序结果与目标序列完全一致(图 3)。转染 24h 后用荧光显微镜观察到细胞内有绿色荧光,慢病毒质粒成功转染 293T 细胞,完成了慢病毒的包装,见图 4。

2.2 各组兔损伤脊髓组织荧光表达情况

细胞移植或体内注射病毒浓缩液后,荧光显微镜下观察到 C 组和 D 组兔损伤部位脊髓组织有 GFP 表达的绿色荧光信号,7d 时荧光较弱,14d 时荧光较强,21d 时仍可见明显的荧光(图 5);A 组及 B 组始终未能检测到绿色荧光信号。

2.3 各组兔损伤脊髓组织中 MDA 和 NO 表达

各组兔损伤脊髓组织 MDA 和 NO 的变化见表 1、2。损伤后 3d,各组之间的 MDA 及 NO 水平无明显差异($P>0.05$);损伤后 7、14 和 21d,D 组的 MDA 及 NO 水平与 A、B 及 C 组比较有统计学差异($P<0.05$),而 A、B 和 C 组之间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.4 各组兔损伤脊髓组织 Ngb mRNA 表达情况

应用 Real-time PCR 法检测兔损伤脊髓组织中 Ngb mRNA 表达变化,结果见表 3。损伤后 3d,各组之间的 Ngb mRNA 表达量无明显差异($P>0.05$);损伤后 7、14 和 21d,D 组的 Ngb mRNA 表达量与 A 组、B 组和 C 组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),而 A 组、B 组和 C 组之间比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

兔损伤脊髓组织中 Ngb 蛋白表达变化结果见图 6、表 4。损伤后 3d,各组之间的 Ngb 蛋白表达量无明显差异($P>0.05$);损伤后 7、14 和 21d,D 组的 Ngb 蛋白表达量与 A 组、B 组和 C 组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),而 A 组、B 组和 C 组之间比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.5 BBB 运动功能评分

SCI 后各组兔后肢 BBB 评分结果见表 5。损伤后 1d、3d 和 7d,各组之间的运动功能评分差异无统计学意义($P>0.05$);随损伤时间延长,各组动物后肢功能评分逐渐升高,而损伤后 14d 和 21d D 组的分值均高于其他 3 组($P<0.05$)。

本实验结果显示,SCI 后注射 LV-Ngb 病毒颗粒能降低损伤脊髓组织中的 MDA、NO 水平,示 SCI 后 Ngb 高表达可能参与抗氧化和抗 NO 损伤的机制中。在体外实验发现^[15],体外培养的神经细胞中 Ngb 能够减少活性氧的产生;Jin 等^[17]发现 Ngb 过表达的 HN33 细胞与野生型细胞相比更不

容易被 NO 损伤,说明 Ngb 可能通过中合 NO 神经毒性作用而发挥神经保护的功能。Wang 等^[16]发现 Ngb 高表达具有明显抗氧化和抗 NO 损伤的能力,在过表达 Ngb 的转基因小鼠模型与野生型小鼠相比中,前者能够更明显地降低脑梗死的面积,且前者的脑梗死组织 MDA 水平较后者明显下

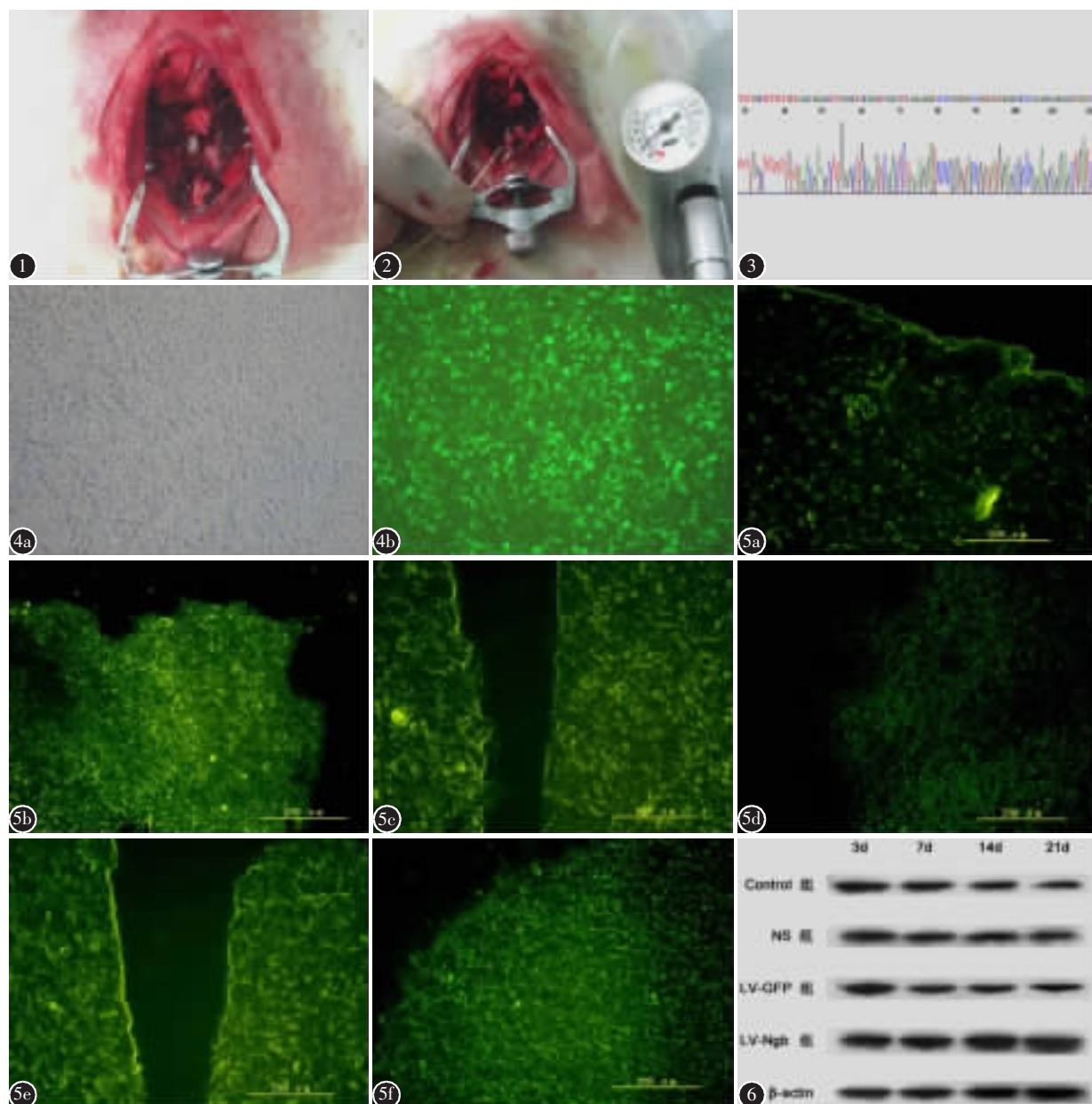


图1 暴露脊髓 图2 球囊压迫脊髓 图3 Ngb(脑红蛋白)重组慢病毒载体测序的部分结果序列 图4 293T 细胞转染 24 h 相差显微镜(a)和荧光显微镜(b)观察情况($\times 100$) 图5 兔损伤脊髓组织荧光表达情况($\times 200$) a~c 为 C 组; d~f 为 D 组 图6 各组兔损伤脊髓组织不同时间点 Ngb 蛋白表达情况 Figure 1 Exposed spinal cord Figure 2 Balloon compression of spinal cord Figure 3 Part of the nucleotide sequencing map of Ngb recombinant lentiviral vector Figure 4 Effect of transfected 293T cells on the 24th hour by contrast phase microscope and fluorescence microscope ($\times 100$) Figure 5 Expressions of fluorescence in injured spinal cord tissue of rabbits($\times 200$) Figure 6 Expression of Ngb protein in injured spinal cord tissue of rabbits in all the groups at different time point

表 1 各组兔损伤脊髓组织 MDA 的变化 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 Motor functional assessment with the BBB scale in all the groups after SCI in rabbits

组别 (Groups)	MDA (nmol/mg prot)			
	3d	7d	14d	21d
A组 Group A	30.97±1.40	34.00±1.69 ^①	29.32±1.40 ^①	27.80±1.37 ^①
B组 Group B	31.42±1.48	33.66±1.62 ^①	29.45±1.46 ^①	27.17±1.25 ^①
C组 Group C	30.70±1.57	33.39±1.61 ^①	29.87±1.58 ^①	28.10±1.20 ^①
D组 Group D	29.90±1.13	30.97±1.09	26.98±1.30	23.78±1.55

注:①与 D 组比较 $P<0.05$
Note: ① Compared with group D $P<0.05$

表 3 各时间点各组兔损伤脊髓组织中 Ngf mRNA 的表达变化 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Expression changes of Ngf protein in injured spinal cord tissue of rabbits in all the groups

组别 (Groups)	Ngf mRNA ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值)			
	3d	7d	14d	21d
A组 Group A	1.00±0.08	0.54±0.06 ^①	0.39±0.05 ^①	0.27±0.04 ^①
B组 Group B	1.01±0.06	0.52±0.05 ^①	0.41±0.06 ^①	0.32±0.06 ^①
C组 Group C	1.01±0.05	0.54±0.06 ^①	0.37±0.05 ^①	0.31±0.06 ^①
D组 Group D	1.08±0.06	1.14±0.08	1.42±0.06	1.90±0.07

注:①与 D 组比较 $P<0.05$
Note: ① Compared with group D $P<0.05$

表 2 各组兔损伤脊髓组织 NO 的变化 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Expression changes of Ngf mRNA in injured spinal cord tissue of rabbits in all the groups at different time point

组别 (Groups)	NO ($\mu\text{mol/g prot}$)			
	3d	7d	14d	21d
A组 Group A	0.80±0.06	0.90±0.05 ^①	0.79±0.03 ^①	0.57±0.04 ^①
B组 Group B	0.82±0.05	0.91±0.05 ^①	0.78±0.05 ^①	0.56±0.04 ^①
C组 Group C	0.81±0.05	0.92±0.06 ^①	0.80±0.05 ^①	0.57±0.06 ^①
D组 Group D	0.80±0.05	0.78±0.04	0.67±0.06	0.41±0.06

注:①与 D 组比较 $P<0.05$
Note: ① Compared with group D $P<0.05$

表 4 各组兔损伤脊髓组织 Ngf 蛋白的表达变化

Table 4 Changes of MDA levels in injured spinal cord tissue of rabbits in all the groups ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别 (Groups)	Ngf/ β -actin 灰度值比值			
	3d	7d	14d	21d
A组 Group A	1.15±0.07	1.03±0.06 ^①	0.88±0.05 ^①	0.78±0.07 ^①
B组 Group B	1.18±0.05	0.98±0.07 ^①	0.87±0.06 ^①	0.81±0.06 ^①
C组 Group C	1.20±0.06	0.99±0.05 ^①	0.91±0.05 ^①	0.77±0.04 ^①
D组 Group D	1.22±0.06	1.54±0.06	2.02±0.08	2.22±0.07

注:①与 D 组比较 $P<0.05$
Note: ① Compared with group D $P<0.05$

表 5 各组兔 SCI BBB 运动功能评分 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 5 Changes of NO levels in injured spinal cord tissue of rabbits in all the groups

组别 (Groups)	BBB 评分 (BBB score)				
	1d	3d	7d	14d	21d
A组 Group A	3.21±0.66	4.17±0.72	5.92±0.79	6.83±0.84 ^①	8.33±1.21 ^①
B组 Group B	3.17±0.57	4.25±0.87	6.00±0.74	7.08±0.90 ^①	8.67±1.03 ^①
C组 Group C	3.13±0.61	4.33±0.78	6.08±0.67	7.17±1.03 ^①	9.00±1.10 ^①
D组 Group D	3.17±0.76	4.75±0.87	6.75±0.97	9.58±1.08	13.17±1.17

注:①与 D 组比较 $P<0.05$
Note: ① Compared with group D $P<0.05$

3 讨论

目前 SCI 后的干预治疗主要在两个方面^[12,13]: 一是在损伤急性期通过减轻或消除继发性病理反应,保护残存的轴突和神经元不再遭受继发损伤;二是在损伤慢性期促进神经组织的再生和修复。如何保护急性期损伤的脊髓,减轻或消除继发性损伤在 SCI 的治疗中尤为重要。

Ngf 是人体内第三种携氧球蛋白,分子量为 17kDa,Ngf 同血红蛋白一样,属于辅基血红素蛋白,含有一个铁卟啉环结构,有 6 个配位键,Fe²⁺的第 6 个配位键能可逆地与氧结合,这使得 Fe²⁺与氧具有较高的亲和性。Ngf 在神经细胞的氧运输与能量代谢方面起重要作用^[14],且外源性 Ngf 有神经保护作用^[4-8]。实验结果与 Ngf 在脑缺血性损伤、脑创伤中的神经保护作用相一致^[2,3]。

降, Ngb 过表达具有抗脑脂质过氧化的作用。Liu 等^[5]发现 Ngb 过表达能够清除细胞内多余的活性氧, 抑制氧化应激反应, 对神经细胞有明显的保护作用。本实验结果示 Ngb 过表达, 可能通过抗氧化、抗 NO 损伤的作用, 减轻继发性 SCI, 而起到神经保护作用。其可能与以下机制有关^[16, 17]: 氧化型 Ngb(Fe^{3+})能够与 NO_2 、 H_2O_2 等作用, 起到清除活性氧的作用; 通过其组氨酸 64 位点的 His 与活性氧发生作用; Ngb 内源性的二硫键($-\text{S}-\text{S}-$)骨架可被硫氧化蛋白还原酶降解; Ngb 的衍生物--Ngb- O_2 , 能够与 NO 快速反应形成 NO^3 和 Ngb 突变体, 通过此反应通路 Ngb 能够清除 NO。

综上, Ngb 高表达能明显提高 SCI 后后肢运动功能的恢复, Ngb 过表达, 可能通过抗氧化, 抗 NO 损伤的作用, 从而减轻继发性 SCI, 起到神经保护作用, 为 SCI 急性期的药物治疗提供思路。

4 参考文献

- Burmester T, Weich B, Reinhardt S, et al. A vertebrate globin expressed in the brain[J]. *Nature*, 2000, 407(6803): 520-523.
- Li RC, Guo SZ, Lee SK, et al. Neuroglobin protects neurons against oxidative stress in global ischemia [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2010, 30(11): 1874-1882.
- Greenberg DA, Jin K, Khan AA. Neuroglobin: an endogenous neuroprotectant[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2008, 8(1): 20-24.
- Khan AA, Wang Y, Sun Y, et al. Neuroglobin-overexpressing transgenic mice are resistant to cerebral and myocardial ischemia[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(47): 17944-17948.
- Liu J, Yu Z, Guo S, et al. Effects of neuroglobin overexpression on mitochondrial function and oxidative stress following hypoxia/reoxygenation in cultured neurons[J]. *J Neurosci Res*, 2009, 87(1): 164-170.
- Wang X, Liu J, Zhu H, et al. Effects of neuroglobin overexpression on acute brain injury and long-term outcomes after focal cerebral ischemia[J]. *Stroke*, 2008, 39(6): 1869-1874.
- Jin K, Mao XO, Xie L, et al. Neuroglobin protects against nitric oxide toxicity[J]. *Neurosci Lett*, 2008, 430(2): 135-137.
- Duong TT, Witting PK, Antao ST, et al. Multiple protective activities of neuroglobin in cultured neuronal cells exposed to hypoxia re-oxygenation injury[J]. *J Neurochem*, 2009, 108(5): 1143-1154.
- Aslan A, Cemek M, Buyukokuroglu ME, et al. Dantrolene can reduce secondary damage after spinal cord injury [J]. *Eur Spine J*, 2009, 18(10): 1442-1451.
- Yoshii S, Ito S, Shima M, et al. Functional restoration of rabbit spinal cord using collagen-filament scaffold[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2009, 3(1): 19-25.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2(-\Delta\Delta C(T))$ Method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- Kurt G, Ergun E, Cemil B, et al. Neuroprotective effects of infliximab in experimental spinal cord injury[J]. *Surg Neurol*, 2009, 71(3): 332-336.
- Kwon BK, Liu J, Lam C, et al. Brain-derived neurotrophic factor gene transfer with adeno-associated viral and lentiviral vectors prevents rubrospinal neuronal atrophy and stimulates regeneration-associated gene expression after acute cervical spinal cord injury[J]. *Spine*, 2007, 32(11): 1164-1173.
- Khan AA, Mao XO, Banwait S, et al. Regulation of hypoxic neuronal death signaling by neuroglobin [J]. *FASEB J*, 2008, 22(6): 1737-1747.
- Nayak G, Prentice HM, Milton SL. Role of neuroglobin in regulating reactive oxygen species in the brain of the anoxia-tolerant turtle *Trachemys scripta* [J]. *J Neurochem*, 2009, 110(2): 603-612.
- Nicolis S, Monzani E, Ciaccio C, et al. Reactivity and endogenous modification by nitrite and hydrogen peroxide: does human neuroglobin act only as a scavenger [J]? *Biochem J*, 2007(407): 89-99.
- Lardinois OM, Tomer KB, Mason RP, et al. Identification of protein radicals formed in the human neuroglobin- H_2O_2 reaction using immuno-spin trapping and mass spectrometry [J]. *Biochemistry*, 2008(47): 10440-10448.

(收稿日期: 2011-07-31 修回日期: 2011-10-31)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 刘彦)