文章编号:1000-5404(2010)08-0763-04

论著

C5a受体拮抗剂对小鼠脊髓损伤后后肢功能的影响及作用机制

李 兰,赵天智,夏永智,储卫华,邹明明,朱海涛,薛兴森,冯 华,林江凯 (400038 重庆,第三军医大学西南医院神经外科,全军神经系统疾病微创诊治专科中心)

[摘要] **目的** 观察补体裂解因子C5a受体拮抗剂(C5a receptor antagonist, C5aRA)对小鼠脊髓损伤后炎症反应及功能变化的干预效果,探讨C5a在脊髓损伤后的作用机制。**方法** 利用成年雌性C57BL/6J小鼠建立脊髓夹伤模型,在术前45 min经腹腔注入C5aRA AcF-[OP(D-Cha)WR](PMX53),同时建立甲基强的松龙(methylprednisolone, MP)注射组、生理盐水注射组和假手术组对照。应用ELISA、RT-PCR观察炎症因子TNF-α及IL-1β表达的变化,通过流式细胞方法检测小胶质细胞百分比的变化,并进行小鼠后肢的行为学评分(mouse scale for locomotion,BMS)。**结果** 生理盐水组小鼠脊髓于伤后1 h即出现炎症因子的明显升高,TNF-α在1 h达峰值,IL-1β在12 h达峰值,后下降,到72 h两者均已接近基线值;小胶质细胞百分比在SCI后1 d即出现升高,3 d较明显,7 d达峰,14 d已下降,但仍高于正常水平。与生理盐水组相较,应用C5aRA特异性抑制C5a后,损伤早期的炎症因子表达水平及炎症细胞增殖均明显被抑制,BMS评分显著优于生理盐水组($P<0.05$),但其对炎症反应的抑制作用略弱于MP组($P<0.05$)。**结论** 应用C5aRA特异性拮抗C5a可以抑制脊髓损伤后早期炎症因子TNF-α、IL-1β表达及炎症细胞小胶质细胞活化增殖,改善后肢的行为学评分,提示C5a通过增强脊髓损伤后早期炎症反应参与了脊髓损伤后的继发性损伤。

[关键词] 脊髓损伤;C5a;C5a受体拮抗剂;肿瘤坏死因子α;白介素-1β;小胶质细胞;炎症
[中图法分类号] R392.11;R392.32;R651.2 **[文献标志码]** A

Effect and mechanism of Complement 5a receptor antagonist on hindlimb function after spinal cord injury in mice

Li Lan, Zhao Tianzhi, Xia Yongzhi, Chu Weihua, Zou Mingming, Zhu Haitao, Xue Xingsen, Feng Hua, Lin Jiangkai (Department of Neurosurgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] Objective To observe the effect of Complement 5a receptor antagonist (C5aRA) in the early inflammatory reaction and outcome of hindlimb function after spinal cord injury (SCI) in mice, and to investigate the role of complement C5a after spinal cord injury. Methods Totally 173 female C57BL/6J mice were randomly divided into sham operation, C5aRA group, methylprednisolone (MP) group, and normal saline group. Another 9 mice with no any treatment served as normal control. The mice of C5aRA group received an intraperitoneal injection of C5aRA peptides (1.0 mg/kg) in 45 min before, and 24 h after SCI establishment. MP (30 mg/kg) was given i.p. to the mice of this group followed by another 4 injections in every 6 h. Normal saline group received an injection of normal saline. Tumor necrosis factor alpha (TNF-α) and interleukin 1β (IL-1β) in injured spinal cord were measured by ELISA and RT-PCR. Microglia was examined by flow cytometry, and hindlimb locomotion was observed the by Mouse Scale for Locomotion (BMS). Results TNF-α and IL-1β were increased greatly at 1 h following SCI, with the peak at 1 h and 12 h respectively, and nearly returned to the normal level at 72 h. The percentage of activated microglial cells was raised at 1 d after SCI, with obvious increase at 3 d and the peak at 7. At 14 d it was decreased but still higher than the normal level. The level of TNF-α, IL-1β and microglia percentage of the C5aRA group was obviously lower than that of the NS group ($P<0.05$), although significantly higher than the MP group ($P<0.05$). Conclusion C5aRA suppresses early inflammatory reaction and improves BMS score after SCI in mice. C5a may participate in the secondary damage process through up-regulating the early inflammation reaction after SCI.

[Key words] spinal cord injury;C5a; C5a receptor antagonist; TNF-α; IL-1β; microglial cell; inflammation

Supported by the National Natural Science Foudation of China(30471781,30572167,30330220). Corressponding author: Lin Jiangkai, Tel: 86-23-68765251, E-mail: jklin2002@yahoo.com.cn

[基金项目] 国家自然科学基金(30471781, 30572167, 30330220)
[通信作者] 林江凯,电话:(023)68765251,E-mail: jklin2002@yahoo.com.cn

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是一种致残率高,常遗留瘫痪等后遗症的严重损伤。SCI神经学损害由原发性和继发性2种损伤机制引起,其中继发性损伤SCI主要的病理损伤过程[1,2]。炎症反应在SCI后继发性损伤中起着重要作用,适度的炎症反应有利于损伤修复,而过度的炎症反应会加重损伤,影响SCI后的功能恢复[3]。研究发现,补体与炎症反应关系密切,补体片段C5a被认为是致炎作用最强的补体成分[4];而中枢神经系统损伤后,补体可通过受损的血脑屏障进入中枢神经系统,或在中枢神经系统内由侵入或固有免疫细胞合成而大量增高激活[5,6],因此C5a极有可能参与介导了脊髓损伤早期的炎症反应。C5a与受体C5a受体(complement 5a receptors, C5aR)及C5L2受体相结合,其中又以C5aR发挥主要生物学作用[7]。C5aR主要分布于多形核白细胞(polymorphonuclear leukocytes, PMNs)、单核细胞、巨噬细胞、星形胶质细胞和小胶质细胞等炎症反应细胞[5]。新近研究[8]发现,使用人工合成的环肽片段C5a受体拮抗剂(C5a receptor antagonist, C5aRA) AcF-[OP(D-Cha)WR](PMX53),可减轻脑冻伤、内毒素性休克、败血症、炎性肠病等多种动物模型中炎症性损伤,取得了比较肯定的效果,并已用于人风湿性关节炎、银屑病的临床研究。本研究采用C57BL/6J小鼠SCI模型,通过腹腔注入C5aRA以达到拮抗C5a,进而阻断C5a的生物学效应作用,与甲基强的松龙(methylprednisolone, MP)治疗组、生理盐水注射组以及假手术组比较,观察损伤处脊髓早期炎症因子TNF-α、IL-1β以及炎症细胞小胶质细胞的变化,并结合行为学评分,以期明确C5a在脊髓损伤后的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组与材料

成年雌性C57BL/6J小鼠173只,6~8周龄,体质量18~20 g,由第三军医大学实验动物中心提供。采用完全随机化分成4个实验组:假手术组、补体C5a受体拮抗剂(C5aRA)注射组、MP注射组及生理盐水注射组,每组41只;另取9只小鼠检测正常的相应指标。

1.2 脊髓损伤实验动物模型制备

将小鼠用10%水合氯醛(5 ml/kg)腹腔麻醉后置于俯卧位,以T_{10}棘突为中心,备皮,碘伏消毒后取背部正中切口,长约2 cm,依次剪开皮肤、皮下组织,显露棘突。锐性切开椎旁肌并向两侧分离,暴露T_8~T_{13}椎体棘突及椎板,纹式钳小心咬除T_9~T_{11}棘突及椎板。手术显微镜下用宽0.5 mm的动脉夹左右方向夹伤T_{11}节段脊髓致0.2 mm,持续15 s[9]。夹伤后整个脊膜完整,BMS评分0分判断为建模成功。术后分笼饲养,每天挤压膀胱协助排尿2次。C5aRA组:在脊髓夹伤前45 min经腹腔注入C5a受体拮抗剂AcF-[OP(D-Cha)WR](PMX53)(1.0 mg/kg,上海吉尔生化有限公司合成),24 h后再注射1次,共2次[10];MP组:脊髓夹伤后立即经腹腔注入MP(30 mg/kg,辉瑞公司生产),然后再注射4次[30 mg/(kg·6 h)],共5次[11];生理盐水组:脊髓夹伤后经腹腔注入生理盐水(10 ml/kg);假手术组:只打开椎板,不损伤硬脊膜及脊髓。

1.3 ELISA检测TNF-α、IL-1β的表达

检测正常小鼠及各实验组小鼠损伤后2、12 h、1、3 d脊髓的TNF-α、IL-1β表达量。小鼠处死后取损伤处及周围0.5 mm的脊髓组织,称量后加入1 ml的PBS,用玻璃匀浆器匀浆,转入EP管离心1 500 r/min,离心5 min,取上清,用考马斯亮蓝溶液于紫外分光光度计上测蛋白浓度,将总蛋白浓度调至1 μg/μl后按ELASA试剂盒说明书操作流程检测蛋白含量。IL-1β、TNF-α ELISA试剂盒购于上海西唐生物科技有限公司。

1.4 RT-PCR检测TNF-α、IL-1β的表达

检测正常小鼠及各实验组小鼠损伤后2、12、24、72 h的TNF-α、IL-1β mRNA水平表达。小鼠处死后取损伤处及周围0.5 mm脊髓组织,按Trizol说明书提取标本总RNA,测定RNA浓度及纯度。采用Primer Premier 5.0软件设计引物,引物序列:TNF-α上游5′-GGAGTCCGGGCAGGTCTACTT-3′,下游5′-AGGTCACTGTCCCAGCATCTTGT-3′,235 bp;IL-1β上游5′-TCCAGGATGAGGACATGAGCAC-3′,下游5′-GAACGTCACACCACCAGGTTA-3′,105 bp;GAPDH上游5′-TGGGGTGATGCTGGTGCTGAGT-3′,下游5′-AGGTTTCTCCAGGCGGCATGTC-3′,500 bp,由Invitrogen公司合成。RT-PCR反应条件及扩增程序:按试剂盒说明书加入试剂、引物及样本总RNA,反应总体积40 μl。取10 μl扩增产物于含溴化乙锭的1.5%琼脂糖凝胶中电泳(80 V),凝胶扫描成像。四星图像分析软件分别计算目的基因和GAPDH所对应电泳条带光密度值,以GAPDH作为内参,以目的基因光密度值与GAPDH光密度值的比值表示目的基因的表达丰度。RT-PCR试剂盒为TaKaRa试剂盒。

1.5 流式细胞检测小胶质细胞百分比

以流式细胞术检测正常小鼠及各实验组小鼠损伤后1、3、7、14 d小胶质细胞百分比。取小鼠损伤处及周围0.5 cm脊髓组织进行小胶质细胞百分比含量检测,一抗(大鼠抗小鼠CD11b,eBioscience,1∶100),对照组加等量PBS,4 ℃孵育30 min,二抗(FITC标记山羊抗大鼠IgG,中杉金桥公司进口分装,1∶100),4 ℃避光孵育30 min,2%多聚甲醛4 ℃保存,于3~4 d内上机检测。

1.6 后肢功能恢复的行为学观测

于脊髓夹伤前,夹伤后12 h、1、3、7、14、28 d行小鼠后肢运评分(BMS)[12],BMS量表主要是依据观察小鼠脊髓损伤后后肢踝关节活动度,脚掌脚背着地情况,躯干稳定性及尾巴的位置进行评分。小鼠脊髓夹伤前均为满分9分,夹伤成功后为0分。

1.7 统计学方法

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件,均数的比较行方差分析,行为学评分行重复测量方差分析。

2 结果

2.1 ELISA检测各组损伤处脊髓TNF-α、IL-1β的含量变化

正常C57BL/6J小鼠脊髓的炎症细胞因子含量较低,总蛋

白为1 μg/μl时,TNF-α含量(250±10)pg/ml,IL-1β含量(8±5)pg/ml。脊髓损伤后1 h各损伤组炎症因子TNF-α、IL-1β均出现明显升高,TNF-α在1 h即达峰值,IL-1β在12 h达峰值,假手术组较正常小鼠也出现轻微升高;各时间点生理盐水注射组两者水平均显著高于假手术组。与生理盐水组相比,各时间点MP组小鼠的TNF-α、IL-1β水平明显被抑制($P<0.05$);C5aRA组小鼠TNF-α表达也较生理盐水组明显被抑制($P<0.05$),但抑制程度较MP组为弱($P<0.05$),IL-1β仅在高峰期12 h被显著抑制($P<0.05$),其余时间点抑制不明显。见表1、2。

表1 各组损伤处脊髓组织中TNF-α含量的变化(pg/ml,$n=3$,$\bar{x}\pm s$)

组别	伤后1 h	伤后12 h	伤后24 h	伤后72 h
假手术组	420.93±33.1	299.1±13.9	260.1±15.9	249.0±17.9
生理盐水组	1 312.9±190.8[a]	758.1±18.6[a]	430.5±26.4[a]	291.1±18.3[a]
MP组	638.8±41.9[ab]	430.5±26.4[ab]	295.6±19.8[ab]	250.7±20.7[b]
C5aRA组	1 056.2±75.7[abc]	504.0±26.2[abc]	323.3±11.5[abc]	254.3±18.7[b]

a:$P<0.05$,与假手术组比较;b:$P<0.05$,与生理盐水组比较;c:$P<0.05$,与MP组比较

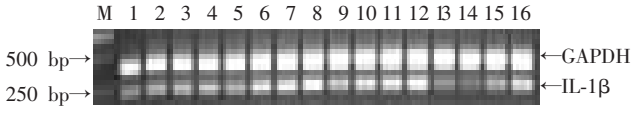
表2 各组损伤处脊髓组织中IL-1β的含量变化(pg/ml,$n=3$,$\bar{x}\pm s$)

组别	伤后1 h	伤后12 h	伤后24 h	伤后72 h
假手术组	11.8±1.1	16.6±1.1	10.3±0.8	8.7±0.9
生理盐水组	38.8±7.7[a]	70.3±4.7[a]	16.7±2.5[a]	12.0±1.2[a]
MP组	23.1±6.4[ab]	26.3±6.0[ab]	12.9±1.6[b]	9.5±1.2[b]
C5aRA组	34.4±5.6[ac]	58.4±4.6[abc]	14.7±1.0	10.7±1.1

a:$P<0.05$,与假手术组比较;b:$P<0.05$,与生理盐水组比较;c:$P<0.05$,与MP组比较

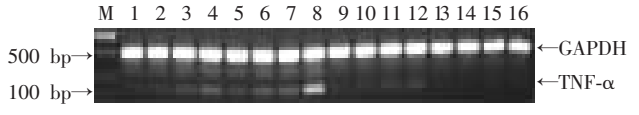
2.2 各组小鼠损伤处脊髓TNF-α、IL-1β mRNA的表达变化

正常C57BL/6J小鼠脊髓IL-1β mRNA表达水平极低,TNF-α mRNA有一定程度的表达,生理盐水组小鼠脊髓损伤后TNF-α、IL-1β mRNA表达明显升高,增高趋势和蛋白水平相似,即TNF-α 1 h较高,IL-1β 12 h较高,72 h降至基线水平,与生理盐水组相比,MP组小鼠的TNF-α、IL-1β mRNA表达水平明显被抑制($P<0.05$),C5aRA组小鼠TNF-α被抑制($P<0.05$),但抑制程度较MP组为弱($P<0.05$),IL-1β仅在12 h被显著抑制($P<0.05$),其余时间点抑制不明显。见图1、2。



1、5、9、13:分别为假手术组1、12、24、72 h;2、6、10、14:分别为MP组1、12、24、72 h;3、7、11、15:分别为C5aR组1、12、24、72 h;4、8、12、16:分别为生理盐水组1、12、24、72 h;M:标准

图1 RT-PCR检测SCI小鼠脊髓损伤处炎症因子TNF-α mRNA的表达



1、5、9、13:分别为假手术组1、12、24、72 h;2、6、10、14:分别为MP组1、12、24、72 h;3、7、11、15:分别为C5aR组1、12、24、72 h;4、8、12、16:分别为生理盐水组1、12、24、72 h;M:标准

图2 RT-PCR检测SCI小鼠脊髓损伤处炎症因子IL-1β mRNA的表达

2.3 各组小鼠损伤处脊髓小胶质细胞百分比变化

正常C57BL/6J小鼠脊髓小胶质细胞百分比为(2.5±0.5)%。各SCI小鼠伤后第1天即出现小胶质细胞百分比升高,提示活化增殖,3 d时较明显,7 d达峰值,14 d已下降,但仍高于正常。伤后各时间点假手术组仅出现轻微增高,MP组小胶质细胞增殖较生理盐水对照组明显被抑制($P<0.05$),C5aRA注射组小胶质细胞增殖也被抑制($P<0.05$),但抑制作用在3、7 d时间点时略弱于MP组($P<0.05$)。见表3。

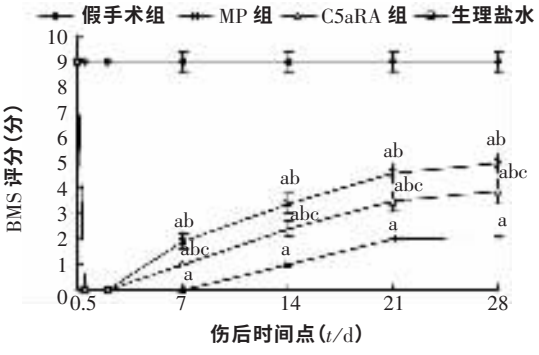
表3 各组SCI小鼠损伤处脊髓小胶质细胞百分比[$n=3$,($\bar{x}\pm s$)%]

组别	伤后1 d	伤后3 d	伤后7 d	伤后14 d
假手术组	2.67±0.2	3.12±0.3	3.21±0.2	2.77±0.2
生理盐水组	3.46±1.3[a]	6.45±0.3[a]	9.19±0.6[a]	3.80±0.3[a]
MP组	3.07±0.1[ab]	4.02±0.3[ab]	6.06±0.2[ab]	3.22±0.3[ab]
C5aRA组	3.33±0.2[ab]	5.83±0.3[abc]	7.86±0.3[abc]	3.26±0.1[ab]

a:$P<0.05$,与假手术组比较;b:$P<0.05$,与生理盐水组比较;c:$P<0.05$,与MP组比较

2.4 后肢功能恢复的行为学观测结果

术后12 h,各组小鼠全部清醒,脊髓损伤各组BMS评分均为0分,假手术组未见后肢功能障碍。术后7 d时,MP组小鼠后肢已出现广泛踝关节活动,而C5aRA组仅有轻微踝关节活动,生理盐水组无恢复。随时间延长,各组均出现一定程度恢复,至28 d,MP组小鼠后肢已可频繁脚掌站立,但不协调,出现脚爪触地和抬起时旋转。而C5aRA组可偶尔脚掌站立,生理盐水组仅出现广泛的踝关节活动。重复测量方差分析显示C5aRA组小鼠后肢功能恢复强于生理盐水组,但略弱于MP组,各组间存在统计学差异($P<0.05$)。见图3。



a:$P<0.05$,与假手术组比较;b:$P<0.05$,与生理盐水组比较;c:$P<0.05$,与MP组比较

图3 各组小鼠损伤后后肢功能BMS评分结果

3 讨论

SCI后,过度的炎症反应在继发性损伤中发挥重要作用,因此如何有效减轻或抑制SCI后急性期的炎症反应有助于减轻SCI后的损伤过程。由于补体活性成分C5a对炎症反应有较强的激活作用,而脊髓损伤后损伤处的补体激活已得到证实[13],因此明确C5a是否参与了脊髓损伤后早期炎症反应,了解C5a在SCI后作用机制有重要的意义。

TNF-α、IL-1β是重要的炎症因子,在SCI伤后早期明

显升高,大量上调的 TNF-α、IL-1β 可通过诱导炎症细胞释放 NO、花生四烯酸等神经毒性介质或直接损伤神经细胞等途径发挥 SCI 后的炎症损伤过程;而阻断 TNF-α、IL-1β 可使 SCI 后的神经功能恢复提高[14]。小胶质细胞是中枢神经系统重要的免疫细胞,脊髓损伤后,小胶质细胞增殖活化,释放大量炎症因子,介导炎症损伤反应[15]。因此我们重点观察运用 C5aRA 对上述指标的影响作用。

皮质激素具有很强的抗炎作用,MP 是目前公认的 SCI 后早期治疗有效的药物之一。我们在实验中观察到,MP 确实抑制了小鼠 SCI 后早期的炎症反应,与生理盐水组比较,MP 组小鼠损伤处脊髓组织炎症因子 TNF-α、IL-1β 的表达和小胶质细胞受到明显抑制,BMS 评分增高,与美国国家急性脊髓损伤研究(national acute spinal cord injury study, NASCIS)Ⅱ等的研究结果一致[16]。然而,MP 有增加继发性感染、消化道出血等副作用。

C5aRA 是一种人工合成的环肽 C5aR 抑制剂,可阻断 C5a 的主要生物学效应,在许多损伤模型中被证实可阻止急性期炎症反应,抑制炎症细胞因子表达和炎症细胞增殖,提高康复预后水平。如 Clark 等[17]证实在 C57BL/6J 小鼠后肢切伤模型中,C5aRA 可使损伤处组织炎症细胞因子 TNF-α、IL-1β 等较对照组明显降低。Pan 等[18]研究发现,在顺铂诱导肾损伤模型中,$C5^{-/-}$ 和 $C5aR^{-/-}$ 小鼠的炎症细胞因子 TNF-α、IL-1β 的升高受到明显抑制。Conroy 等[19]研究也发现 C5aRA 抑制体外培养的 PMNs 产生 TNF-α、IL-1β 等炎症细胞因子。Sewell 等[20]在脑冻伤模型中证实 C5aRA 可使中性粒细胞外渗下降 68%。然而,在脊髓损伤研究中尚少见采用 C5aRA 抑制炎症反应的相关报道。本实验我们于 SCI 前 45 min 经腹腔将 C5aRA 注入 C57BL/6J 小鼠,在损伤后观察到炎症因子 TNF-α、IL-1β 的表达和炎症细胞小胶质细胞的增殖均被抑制,而后肢功能的恢复也较生理盐水对照组更好。提示 C5a 介导了 SCI 后早期的炎症反应,可通过增强炎症反应而加重 SCI 后的损伤过程。

综上所述,本研究应用小鼠脊髓夹伤模型,观察到 C5aRA 可抑制脊髓损伤后 TNF-α、IL-1β 的表达和小胶质细胞的活化增殖,提示 C5a 参与了损伤后的炎症反应,而拮抗 C5a 则可以显著抑制脊髓损伤组织的免疫炎症反应,减轻继发性脊髓损伤,促进行为学功能恢复。

参考文献:

[1] Amar A P, Levy M L. Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord injury[J]. Neurosurgery, 1999, 44(5): 1027-1040.

[2] Hausmann O N. Post-traumatic inflammation following spinal cord injury [J]. Spinal Cord, 2003, 41(7): 369-378.

[3] Kwon B K, Tetzlaff W, Grauer J N, *et al*. Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury[J]. Spine J, 2004, 4(4): 451-464.

[4] Guo R F, Ward P A. Role of C5a in inflammatory responses[J]. Annu Rev Immunol, 2005, 23: 821-852.

[5] Klos A, Tenner A J, Johswich K O, *et al*. The role of the anaphylatoxins in health and disease[J]. Mol Immunol, 2009, 46(14): 2753-2766.

[6] 李兰, 林江凯. 脊髓损伤后胶质瘢痕形成中补体的作用[J]. 创伤外科杂志, 2008, 10(6): 562-564.

[7] Lee H, Whitfeld P L, Mackay C R. Receptors for complement C5a. The importance of C5aR and the enigmatic role of C5L2[J]. Immunol Cell Biol, 2008, 86(2): 153-160.

[8] Ricklin D, Lambris J D. Complement-targeted therapeutics[J]. Nat Biotechnol, 2007, 25(11): 1265-1275.

[9] Plemel J R, Duncan G, Chen K W, *et al*. A graded forceps crush spinal cord injury model in mice[J]. J Neurotrauma, 2008, 25(4): 350-370.

[10] Finch A M, Wong A K, Paczkowski N J, *et al*. Low-molecular-weight peptidic and cyclic antagonists of the receptor for the complement factor C5a[J]. J Med Chem, 1999, 42(11): 1965-1974.

[11] Bracken M B, Shepard M J, Collins W F, *et al*. A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury. Results of the second national acute spinal cord injury study [J]. N Engl J Med, 1990, 322(20): 1405-1411.

[12] Basso D M, Fisher L C, Anderson A J, *et al*. Basso Mouse Scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains[J]. J Neurotrauma, 2006, 23(5): 635-659.

[13] Qiao F, Atkinson C, Song H, *et al*. Complement plays an important role in spinal cord injury and represents a therapeutic target for improving recovery following trauma[J]. Am J Pathol, 2006, 169(3): 1039-1047.

[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] Hanisch U K. Microglia as a source and target of cytokines[J]. Glia, 2002, 40(2): 140-155.

[16] Hall E D. Drug development in spinal cord injury: what is the FDA looking for? [J]. J Rehabil Res Dev, 2003, 40(4 Suppl 1): 81-91.

[17] Clark J D, Qiao Y, Li X, *et al*. Blockade of the complement C5a receptor reduces incisional allodynia, edema, and cytokine expression[J]. Anesthesiology, 2006, 104(6): 1274-1282.

[18] Pan H, Shen Z, Mukhopadhyay P, *et al*. Anaphylatoxin C5a contributes to the pathogenesis of cisplatin-induced nephrotoxicity[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2009, 296(3): F496-F504.

[19] Conroy A , Serghides L, Finney C, *et al*. C5a enhances dysregulated inflammatory and angiogenic responses to malaria *in vitro*: potential implications for placental malaria [J]. PLoS One, 2009, 4(3): e4953.

[20] Sewell D L , Nacewicz B, Liu F, *et al* . Complement C3 and C5 play critical roles in traumatic brain cryoinjury: blocking effects on neutrophil extravasation by C5a receptor antagonist[J]. J Neuroimmunol, 2004, 155 (1/2): 55-63.

(**收稿**:2009-10-27;**修回**:2009-11-23)

(编辑 张 维)