

应用鼠神经生长因子修复周围神经损伤对骨质疏松的影响

瞿英¹, 刘欣伟², 李哲³, 邓廉夫⁴(¹解放军第463医院急诊科, 辽宁省沈阳市 110042; ²解放军沈阳军区第210医院骨科, 辽宁省大连市 116011; ³沈空705医院, 辽宁省沈阳市 110000; ⁴上海市伤骨科研究所, 上海市中西医结合防治骨与关节病损重点实验室, 上海市 200025)

文章亮点:

1 课题通过活体动物实验探讨神经损伤后与骨质疏松的相关性, 并将其作为新的治疗靶点, 同时建立骨质疏松和异位骨化的相关性模型, 由于骨质疏松被证明在其他多种疾病中发挥重要作用, 因此该项研究结果不仅能帮助治疗神经损伤, 也可能将帮助治疗其他疾病。

2 实验结果说明神经性骨质疏松的发生并非源自钙磷流失, 而是由骨小梁的结构改变所致, 同时外源性鼠神经生长因子在神经性瘫痪后骨质疏松的恢复中具有积极意义。

关键词:

组织构建; 骨组织工程; 失神经支配; 骨小梁; 鼠神经生长因子; 骨质疏松

主题词:

去神经支配; 骨质疏松; 神经生长因子

摘要

背景: 神经损伤后骨质疏松症发生机制与其他原因造成的失用性骨质疏松症不完全相同, 在其发生发展过程中可能蕴含着更为复杂的因素, 除了失去应力刺激外, 细胞因子异常、神经功能的异常、激素水平的改变均参与了神经损伤后骨质疏松的发生。

目的: 通过活体动物实验探讨神经损伤后和骨质疏松的相互关系。

方法: 雄性 SD 大鼠随机分为正常对照组和失神经组, 失神经组大鼠切断股骨神经造成失神经支配模型, 然后分为模型对照组和失神经支配注射鼠神经生长因子组(神经生长因子组)。神经生长因子组在两侧下肢腓肠肌处部位注射鼠神经生长因子 0.2 mL, 频率 1 次/d, 失神经支配对照组注射同等量生理盐水, 正常对照组不做处置。30 d 后称质量、取血、处死动物, 取股骨进行骨组织计量学检查。

结果与结论: 失神经支配大鼠注射鼠神经生长因子后, 体质量、骨小梁量与模型对照组相比具有明显增加, 提示局部予以鼠神经生长因子治疗可明显减轻失神经支配后大鼠骨质疏松的程度, 并可减弱因失神经导致的体质量减轻, 而各组的血钙磷浓度无明显改变。说明神经性骨质疏松的发生并非源自钙磷流失, 而是由骨小梁的结构改变所致, 同时外源性鼠神经生长因子在神经性瘫痪后骨质疏松的恢复中具有积极意义。

瞿英, 刘欣伟, 李哲, 邓廉夫. 应用鼠神经生长因子修复周围神经损伤对骨质疏松的影响[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(51):8233-8237.

Effect of mouse nerve growth factor on osteoporosis after peripheral nerve injury

Zi Ying¹, Liu Xin-wei², Li Zhe³, Deng Lian-fu⁴ (¹Department of Emergency, No. 463 Hospital of Chinese PLA, Shenyang 110042, Liaoning Province, China; ²Department of Orthopedics, No. 210 Hospital of Shenyang Military Area Command of Chinese PLA, Dalian 116011, Liaoning Province, China; ³No. 705 Hospital of Shenyang Air Force, Shenyang 110000, Liaoning Province, China; ⁴Shanghai Key Laboratory for Bone and Joint Disease, Shanghai Institute of Traumatology and Orthopaedics, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

Abstract

BACKGROUND: Osteoporosis after nerve injury has different pathogenesis from osteoporosis of other causes. A more complex set of factors can be involved in the occurrence and development of osteoporosis after nerve injury. In addition to the loss of stress stimulation, cytokines abnormalities, abnormal nerve function and variation of hormone levels are all involved in osteoporosis after nerve injury.

OBJECTIVE: To observe the interaction between nerve injury and osteoporosis by using living animal experiments.

METHODS: Male Sprague-Dawley rats were randomly divided into normal control and denervation groups. Denervated rat models were caused by cutting off the femoral nerve, and then subdivided into model group and nerve growth factor group. Rats in the nerve growth factor group were subjected to 0.2 mL nerve growth factor injection into the gastrocnemius of bilateral lower limbs, once a day; while rats in the model group were subjected to the same volume of saline. No treatment was done in the normal control group. After 30 days, the rats were weighted and blood samples were collected followed by killing, and then the femur bone was taken out for histomorphometry examination.

瞿英, 1970 年生, 辽宁省沈阳市人, 汉族, 博士, 副主任医师, 主要从事创伤骨科研究。

通讯作者: 邓廉夫, 博士, 研究员, 上海市伤骨科研究所, 上海市中西医结合防治骨与关节病损重点实验室, 上海市 200025

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.51.007
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:2095-4344
(2014)51-08233-05
稿件接受:2014-11-09

Zi Ying, M.D., Associate chief physician, Department of Emergency, No. 463 Hospital of Chinese PLA, Shenyang 110042, Liaoning Province, China

Corresponding author: Deng Lian-fu, M.D., Investigator, Shanghai Key Laboratory for Bone and Joint Disease, Shanghai Institute of Traumatology and Orthopaedics, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

Accepted: 2014-11-09

RESULTS AND CONCLUSION: After injection of nerve growth factor, the body mass and trabecular bone volume of rats in the nerve growth factor group was significantly higher than those in the model group, indicating local injection of nerve growth factor could obviously reduce the extent of osteoporosis in denervated rats, and meanwhile weaken the weight loss due to denervation. However, there was no change in blood calcium and phosphorus concentrations in each group. Experimental findings suggest that neurological osteoporosis does not originate from the loss of calcium and phosphorus, but by structural changes in the trabecular bone; meanwhile, exogenous mouse nerve growth factor is of positive significance for osteoporosis following after nerve paralysis.

Subject headings: denervation; osteoporosis; nerve growth factor

Zi Y, Liu XW, Li Z, Deng LF. Effect of mouse nerve growth factor on osteoporosis after peripheral nerve injury. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2014;18(51):8233-8237.

0 引言 Introduction

神经损伤后骨钙代谢发生一系列变化,随之变化的是血清钙调节激素的浓度。神经损伤后由于患者主动活动量减少引起的损伤平面以下骨组织疏松,骨组织中矿物质释放入血,引起血清中离子钙与无机磷浓度升高,但是血清中总钙浓度无明显变化^[1]。神经损伤后骨量丢失明显,骨微观结构明显退变^[2],增加了骨折的风险^[3-4],低于常规强度的力量导致的骨折,尤其是下肢的骨折比较常见^[5-6]。神经损伤后活动量减少是发生骨质疏松的重要原因。但因为一般的活动量减少引起的骨质疏松患者多见于长期卧床、患肢制动者等^[7],所以神经损伤后骨质疏松不一定是单一的失用性骨质疏松。一般失用性骨质疏松发病过程相对缓慢,而神经损伤后引起的骨质疏松发病过程早且较快。根据相关实验结果,脊髓损伤后的截瘫患者,6周左右拍常规X射线平片,可观察到清晰的骨质疏松改变^[8-9]。其次,适当的功能锻炼或许会减缓患者上肢骨量丢失,但是对于下肢骨量丢失作用不大^[10]。普通的活动量减少引起的骨质疏松与脊髓损伤后骨质疏松的骨矿物质丢失部位不同。相关激素水平的变化对骨质疏松的发生可能有影响^[11],其中创伤后的应激反应、使用糖皮质激素治疗等可能与早期骨矿物质总量丢失有关^[12]。

神经损伤后肢体发生瘫痪,由此引起骨质疏松的发生率较高,目前为止,还没有预防的良好方法。本实验研究了大鼠神经支配丧失后发生瘫痪的动物模型,有助于对骨质疏松的理解和认识,以便在临床工作中降低骨折的发生。在实验动物中,大鼠的神经、肌肉分布与人类有相近之处,所以建立大鼠神经损伤的动物模型可以较好地反映出人类在神经损伤后引起瘫痪的病理过程。近年来国内外有关对骨组织学改变的影响研究,主要集中在探讨因活动量减少后肌肉萎缩引起骨代谢变化的机制^[13]。本实验通过研究大鼠神经损伤后的动物模型,早期外源性给予鼠神经生长因子,观察神经损伤后大鼠的体质量、骨小梁、血钙的变化,探讨鼠神经生长因子对神经损伤后骨质疏松发生的影响。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2014年8月10日在解放军沈阳军

区总医院动物实验室完成。

材料: SPF级10周龄雄性SD大鼠60只,体质量220-250 g,由沈阳化工学院新药安全评价中心动物部提供,许可证号:SYXK(辽)2006-0002。标准啮齿类动物饲料喂养,给予清洁饮水。室温保持在(22±2)℃,模拟太阳光照,控制好室内照明,保持每天12 h光照和黑暗的交替。鼠神经生长因子(舒泰神)生产企业:舒泰神(北京)生物制药股份有限公司,批准文号:国药准字S20060023,剂量:30 μg/瓶。

实验方法:

动物去神经支配模型制备: 实验动物应用戊巴比妥钠麻醉,按照25 mg/kg的剂量。首先把实验动物四肢固定好、备皮、消毒。在无菌条件下于腹卧位在两侧后肢选取股外侧切口,于双侧股骨转子平面切断下肢坐骨神经。游离切口远心端6 mm切除,无菌丝线缝合切口。仰卧位固定好实验动物,选取正中纵切口,切口的上缘过腹股沟韧带,于腹股沟韧带平面切断大鼠两侧股神经,游离远心端6 mm,缝合伤口。切口缝合前后滴入头孢米诺,防止术后感染的发生。

动物肢体固定: 实验动物手术后立即给予下肢石膏固定。管型石膏固定,用脱脂棉做内衬,固定完成后,待石膏干燥,并用一次性废旧输液器,做成弹性套管后,套于大鼠石膏固定肢外面,粗丝线固定,以防大鼠噬咬。

动物分组: 大鼠随机分为正常对照组和失神经组,失神经组大鼠切断股骨神经造成失神经支配模型,然后分为模型对照组(失神经支配)和失神经支配注射鼠神经生长因子组(神经生长因子组)。神经生长因子组大鼠在两侧腓肠肌处分别注射鼠神经生长因子0.2 mL,1次/d,模型对照组注射同等量生理盐水,正常对照组不做处置,30 d后取材。

实验标本的制作: 取实验动物左侧胫腓骨,截断胫腓骨连接处,将胫骨平台游离清楚,去除附着的肌肉、韧带,切取胫骨近端1/3,用生理盐水冲洗后,做好标记,依次放到体积分数50%→70%→95%→100%乙醇各24 h内脱水,然后用二甲苯透明2-4 h,放入包埋液中。根据情况,用甲基丙烯酸甲脂+邻苯二甲酸二丁酯(3:1)浸泡3-5 d,甲基丙烯酸甲脂+邻苯二甲酸二丁酯+过氧化苯甲酰浸泡5-7 d,然后浸入甲基丙烯酸甲脂+邻苯二甲酸二丁酯+过氧化苯

表 1 大鼠失神经支配及给予神经生长因子后体质量、血钙磷的变化
Table 1 Changes in body mass and blood calcium and phosphorus concentrations in denervated rats after local injection of nerve growth factor

组别	实验后		血钙(mg/L)	血磷(mg/L)
	实验前 体质量(g)	实验后 体质量(g)		
正常对照组	245±20	350±20	110.6±10.0	56.1±3.0
模型对照组	240±20	265±20	106.7±8.0	60.2±5.0
神经生长因子组	257±21	307±21 ^a	109.7±6.0	53.8±5.5

表注: 经鼠神经生长因子处理后大鼠体质量减轻不明显, 失神经支配并未造成骨钙的流失。与模型对照组相比, $P < 0.05$ 。

甲酰溶液33-35 °C恒温浸透15-20 d。切取3 μm切片, 供组织形态学测量。将制好的切片依次经体积分数100%→95%→70%→40%各级乙醇脱水, 双蒸水冲洗, 每个步骤3 min。随机从每组大鼠蜡块中取6只, 每块蜡块切片6张作甲苯胺蓝染色。染色10 min后, 枸橼酸缓冲液(pH=2.9)冲洗2次, 空气中晾干10 min后, 经正丁醇2次→1/2正丁醇+1/2甲苯2次→甲苯2次透明。然后用明胶树脂封固, 温箱烘干备用。切片在显微镜下用计算机图像分析系统计算骨小梁密度、骨小梁平均连接点数、游离末端数等。

主要观察指标: ①大鼠神经损伤前及损伤后给予鼠神经生长因子后体质量、血钙磷的变化。②大鼠神经损伤给予鼠神经生长因子后骨小梁组织形态计量的变化。

统计学分析: 采用SPSS 19.0软件处理, 组间比较进行方差分析和LSD检验。

2 结果 Results

2.1 实验动物的数量分析 实验选用大鼠60只, 分为3组, 实验过程无脱失, 全部进入后续数据分析。

2.2 实验动物失神经支配后的一般情况 大鼠术后约30 min意识清醒, 双侧后肢无主动屈伸活动, 后爪呈屈曲形, 活动量明显减少。被动活动3 d后, 大鼠足部肿胀减退, 活动量逐渐加大。

2.3 大鼠失神经支配及给予鼠神经生长因子后体质量、血钙、血磷的变化 实验动物神经损伤后的临床表现主要为肌肉萎缩, 可以引起骨质疏松。从实验结果看, 实验动物丧失神经支配后肢体肌肉萎缩明显, 体质量明显减轻; 而在注射鼠神经生长因子后大鼠的肌肉萎缩有改善, 体质量减轻不明显。血钙浓度是骨骼钙质损失的重要指标, 结果显示, 神经损伤没有导致骨钙的减少, 见表1。

2.4 大鼠神经损伤后及局部给予鼠神经生长因子后骨小梁组织形态计量的变化 骨小梁组织形态计量结果见表2。大鼠神经损伤后局部注射鼠神经生长因子对骨小梁平均宽度影响显著, 与对照组比较, 差异有显著性意义($P < 0.05$), 对骨小梁的体积密度、骨小梁的连接点数、骨小梁的游离末端数影响也非常显著, 与对照组比较, 差异有显著性意义($P < 0.01$)。

表 2 神经生长因子大鼠失神经支配后对骨小梁的影响
Table 2 Effect of nerve growth factor on the trabecular bone in denervated rats

组别	骨小梁			
	骨小梁连接点 数(个/mm ²)	游离末端数 (个/mm ²)	骨小梁体积 密度(%)	骨小梁平均宽 度(mm)
正常对照组	18.12±2.5	13.12±2.00	55.06±6.35	55.61±2.30
模型对照组	3.23±0.90	20.12±2.23	20.67±7.81	20.02±2.50
神经生长因子组	7.81±1.10 ^b	17.24±10.25 ^b	30.97±12.61 ^b	25.38±1.55 ^a

表注: 大鼠失神经支配局部注射鼠神经生长因子后骨小梁平均宽度、骨小梁体积密度、骨小梁连接点数均显著增加, 游离末端数显著减少。与模型对照组比较, ^a $P < 0.05$; ^b $P < 0.01$ 。

3 讨论 Discussion

骨质是通过骨重建来维持的^[14], 即不断重复的骨破坏及骨修复。骨质的形成机制由破骨细胞和成骨细胞进行调节, 由成骨细胞形成新的骨质, 破骨细胞吸收旧的骨质, 而骨质疏松是因为这一过程紊乱^[15-16]。外部机械力的大小和频率决定了力学-能量密度率的变化(SED), 而力学-能量密度的变化又反过来影响骨细胞刺激的强度, 这些刺激又是促进骨质重建的因素。骨细胞凋亡的结果是破骨细胞在局部的聚集^[17], 导致骨的破坏。破骨细胞与成骨细胞之间的关联因素与力学有着不解之缘, 破骨细胞吸收旧骨后形成腔隙, 之后周围的应力集中, 这或许是引起成骨细胞聚集后形成骨细胞的原因^[18]。在病理情况下, 成骨细胞与破骨细胞之间的杠杆平衡机制破坏, 则可导致骨质疏松的发生。

肌肉和神经与骨的形成和成长有着密切关系^[19-21], 骨强度除了与骨量有关外, 还与骨内部结构有关。骨力学强度虽然由骨量决定, 但是值得注意的是, 在骨量降低时并不一定发生骨折, 相反, 有些骨量正常或骨密度极高的疾病, 如石骨症, 却经常会有骨折发生^[22]。因此作者认为骨量不能完全反映出骨强度。对松质骨而言, 骨小梁构筑方式更能说明骨强度。其他相关研究得出结论, 认为松质骨的稳定性取决于3个方面, 即骨量的高低、三维构筑以及骨小梁间的连接性^[23]。尤其是对骨小梁连接点和游离末端数测量更能说明骨小梁结构稳定性的变化。本实验结果亦表明, 大鼠下肢神经损伤后, 血液中的钙磷浓度无明显改变, 而骨小梁形态却有明显的改变。

神经损伤后早期骨吸收增强, 骨代谢处于高转换状态。有学者研究, 神经损伤后1周能反映骨吸收的标志物开始增加^[24-25], 至第10-16周达到高峰, 最高时可以达到正常范围上限的10倍。相反, 反映骨形成的标志物只在正常值范围内轻度增加, 这表明神经损伤后早期骨吸收比骨形成旺盛。有证据表明神经损伤后3个月男性患者, 血清与尿I型胶原C端肽CTX-1浓度及血清骨钙蛋白浓度均显著高于对照组^[26]。有学者则观察到血清骨钙蛋白浓度在神经损伤后1个月内处于正常值范围内, 随后持续增高, 而尿羟脯氨酸/肌酸的比值在早期有增高, 提示神经损伤后先发生破骨细胞引起的骨吸收, 随后成骨细胞的活性开始增加。一般损

伤一两年后, 这种紊乱状态可消除, 形成新的平衡。

神经损伤后患者骨矿物质含量减少, 四肢瘫痪的患者上下肢的骨矿物质均有丢失, 而截瘫后骨盆与下肢骨矿物质均丢失明显, 上肢无明显丢失。脊髓不完全性损伤患者, 瘫痪肢体侧膝关节部位骨矿物质丢失比对侧明显。然而神经损伤后经过功能锻炼并不能改变损伤平面以下的骨矿物质丢失^[27]。神经完全损伤的患者, 骨矿物质丢失比不完全性神经损伤患者明显^[28-29]。可能与持续负重有关, 多数文献报道神经损伤患者的腰椎骨矿物质无明显丢失^[30-31]。国外研究表明脊髓损伤后1年的患者, 损伤平面以下骨矿物质显著丢失^[32], 损伤平面上骨矿物质无明显丢失, 腰椎骨矿物质丢失11%, 截瘫患者上肢骨矿物质与正常对照组相比无明显丢失, 四肢瘫患者上肢骨矿物质显著丢失, 其中又以前臂远端最明显。

骨折后神经纤维也有损伤, 鼠神经生长因子能够引导神经纤维长入骨折中, 间接的调节骨折愈合, 同时通过自分泌和旁分泌的方式参与骨代谢和骨修复的过程^[33-34]。交感神经、感觉神经在靶区分布的密度和mRNA含量决定了鼠神经生长因子在靶组织中的含量多少^[35-36]。骨折断端引起神经部分或者全部死亡, 靶细胞在骨折刚发生时失去神经的调控, 靠分泌大量神经营养因子来诱导神经纤维长入到骨折断端, 分泌的大量神经营养因子与骨细胞上的受体结合, 通过磷酸化增强了骨细胞的活性及功能活动^[37]。

鼠神经生长因子是靶源性神经营养因子, 交感与感觉神经元的存活与发育是靠神经生长因子来维持的, 也可以促进神经递质的合成^[38-40]。大鼠的成骨细胞存在鼠神经生长因子的低亲和力受体, 内源性和外源性鼠神经生长因子均可与鼠神经生长因子的低亲和力受体结合, 对细胞间信息传递起到重要作用, 进一步促使成骨细胞发生磷酸化, 加强成骨能力。另有报道, 鼠神经生长因子在骨组织中对 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 摄取起调节作用^[41-42]。国外相关实验表明, 实验大鼠注射鼠神经生长因子后可能引起神经功能的改变^[43-44], 无论局部还是全身用药, 只要能够到达损伤部位, 就有一定的治疗作用, 上述结论与本实验结果一致。

本实验结果提示, 大鼠发生神经损伤后体质量增长慢, 丧失神经支配的肢体肌肉严重萎缩, 游离末端数显著增加, 骨小梁连接点数减少。这说明骨质的营养与所属的神经和肌肉是分不开的。另外从实验结果可以看出, 骨小梁结构稳定性差, 骨小梁排列不符合力学要求, 也是导致骨结构强度下降的原因^[45]。大鼠下肢注射微量鼠神经生长因子后, 肌肉萎缩程度明显减轻, 骨小梁平均宽度、连接点数、体积密度与对照组比较, 均有增加, 游离末端数也明显下降, 说明应用鼠神经生长因子治疗后能明显改善失去神经支配的肢体所致的骨结构的改变, 减少骨量的丢失。这可能与鼠神经生长因子的神经营养作用和神经调节作用有关^[46-48], 说明鼠神经生长因子对神经性瘫痪患者发生的骨质疏松有预防和治疗的作用。

作者贡献: 实验设计为瞿英、邓廉夫, 实施为刘欣伟, 评估为李哲。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 没有与相关伦理道德冲突的内容。

学术术语: 神经生长因子-是神经营养因子中最早被发现, 目前研究最为透彻的, 具有神经元营养和促使突起生长双重生物学功能的一种神经细胞生长调节因子, 它对中枢及周围神经元的发育、分化、生长、再生和功能特性的表达均具有重要的调控作用。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Morley J, Marsh S, Drakoulakis E. Does traumatic brain injury result in accelerated fracture healing. *Injury*. 2005; 36(3): 363-368.
- [2] 王小健, 苏云星, 余建平, 等. 感觉/运动神经切断影响大鼠骨折愈合的实验研究[J]. *中国矫形外科杂志*, 2008, 16(6): 450-454.
- [3] Otfinowski J. Heterotopic induction of osteogenesis in the cause of neural injury. *Patol Pol*. 1993; 44(1): 133-168.
- [4] Offley SC, Guo TZ, Wei T. Capsaicin-sensitive sensory neurons contribute to the maintenance of trabecular bone integrity. *J Bone Miner Res*. 2005; 20(2): 257-267.
- [5] Efleferiou F. Regulation of bone remodeling by the central and peripheral nervous system. *Arch Biochem Biophys*. 2008; 473(2): 231-236.
- [6] Osen CJ. Bone remodeling, energy metabolism, and the molecular clock. *Cell Metab*. 2008; 7(1): 7-10.
- [7] Saadoun S, Bell BA, Verkman AS, et al. Greatly improved neurological outcome after spinal cord compression injury in AQP4-deficient mice. *Brain*. 2008; 131(4): 1087-1098.
- [8] Yamaguchi M, Fukagawa M. Role of zinc in regulation of protein tyrosine phosphatase activity in osteoblastic MC3T3-E1 cells: zinc modulation of insulin-like growth factor-I's effect. *Calcif Tissue Int*. 2005; 76(1): 32-38.
- [9] Liang D, Yang M, Guo B, et al. Zinc Upregulates the Expression of Osteoprotegerin in Mouse Osteoblasts MC3T3-E1 Through PKC/MAPK Pathways. *Biol Trace Elem Res*. 2012; 146: 340-348.
- [10] Guo B, Yang M, Liang D, et al. Cell apoptosis induced by zinc deficiency in osteoblastic MC3T3-E1 cells via a mitochondrial-mediated pathway. *Mol Cell Biochem*. 2012; 361(1-2): 209-216.
- [11] Alexandrino AP, Rodrigues MA, Matsuo T, et al. Evaluation of seminal zinc levels by atomic absorption in men with spinal cord injury. *Spinal Cord*. 2011; 49(3): 435-438.
- [12] Wang Y, Me X, Zhang L, et al. Supplement moderate zinc as an effective treatment for spinal cord injury. *Med Hypotheses*. 2011; 77(4): 589-590.
- [13] 陈毅军, 赵小纲. 神经损伤影响骨折愈合速度机制研究的进展[J]. *创伤外科杂志*, 2008, 10(1): 79-81.
- [14] 朱建平, 张伯勋, 刘郑生, 等. 选择性神经根损伤对大鼠骨代谢影响的实验研究[J]. *中国矫形外科杂志*, 2002, 9(4): 354-356.
- [15] Gautschi OP, Toffoli AM, Joesbury KA, et al. Osteoinductive effect of cerebrospinal fluid from brain-injured patients. *Neurotrauma*. 2007; 24(1): 154-162.
- [16] 王玉国, 张丹丹. 鼠神经生长因子治疗视神经挫伤的研究[J]. *航空航天医药*, 2010, 21(4): 435-436.

- [17] 杨惠婷,姚鹏,李静秋.视神经钝挫伤的诊治及疗效观察[J].牡丹江医学院学报,2012,33(5):50-52.
- [18] 张丹丹.鼠神经生长因子结合葛根素对视神经挫伤治疗效果的研究[D].哈尔滨:黑龙江中医药大学,2010.
- [19] Lazo MG, Shirazi P, Sam M, et al. Osteoporosis and risk of fracture in men with spinal cord injury. *Spinal Cord*. 2001;39(4):208-214.
- [20] Zhao L, Lv GM, Jiang SY, et al, Donglin Jiang. Morphological differences in skeletal muscle atrophy of rats with motor nerve and/or sensory nerve injury. *Neural Regen Res*. 2012; 7(32): 2507-2515.
- [21] Modlesky CM, Majumdar S, Narasimhan A et al. Trabecular bone microarchitecture is deteriorated in men with spinal cord injury. *J Bone Miner Res*.2004;19 (1):48-55.
- [22] Vestergaard P, Krogh K, Rejnmark L, et al. Fracture rates and risk factors for fractures in patients with spinal cord injury. *Spinal Cord*.1998; 36(11): 790-796.
- [23] 沈凌飞,胡美君.复方樟柳碱联合鼠神经生长因子治疗视神经挫伤疗效分析[J].求医问药:下半月,2011,9(2): 73-74.
- [24] 陈迎月,郑帆,陈勤.复方樟柳碱联合鼠神经生长因子治疗视神经挫伤的临床观察[J].海峡药学,2011,23(9):102-103.
- [25] 龚善初,邱久军,李东,等.注射用鼠神经生长因子治疗儿童孤独症的疗效观察[J].中国药业,2012,21 (22): 40-42.
- [26] 张旭,杨丽娟,陆金梅.鼠神经生长因子治疗神经萎缩的临床观察[J].中国临床研究,2010,23(6):463-464.
- [27] 魏智慧,高海雷.腰麻硬膜外联合麻醉致脊髓损伤一例反思[J].临床误诊误治,2010,23(1):79.
- [28] 高建平,王健,张来虎.胸腰椎骨折合并脊髓损伤的早期手术治疗[J].中国当代医药,2012,19(33):190-192.
- [29] 王印国,韦国强,陈娟.鼠神经生长因子治疗急性一氧化碳中毒迟发性脑病临床观察[J].华北国防医药,2010,22(3):227.
- [30] Garland DE, Adkins RH, Stewart CA, et al. Regional osteoporosis in women who have a complete spinal cord injury. *J Bone Joint Surg Am*.2001;83(8):1195-1200.
- [31] Warden SJ, Bennell KL, Matthews B, et al.Quantitative ultrasound assessment of acute bone loss following spinal cord injury: a longitudinal pilot study. *Osteoporos Int*.2002; 13(7):586-592.
- [32] Savignat M, De-Doncker L, Vodouhe C, et al. Rat nerve regeneration with the use of a polymeric membrane loaded with NGF.*J Dent Res*.2007;86(11):1051-1056.
- [33] Amino S, Itakura M, Ohnsi H, et al. Nerve growth factor enhances neurotransmitter release from PC 12 cells by increasing Ca²⁺-responsible secretory vesicles through the activation of mitogen-activated protein kinase and hosphatidylinositol 3-kinase.*J Biochem*.2002;131(6):887-894.
- [34] Kim HC, Cho YJ, Ahn CW, et al . Nerve growth factor and expression of its receptors in patients with diabetic neuropathy.*Diabet Med*.2009;26(12):1228-1234.
- [35] Li XL,Zhang W,Zhou X,et al.Temporal changes in the expression of some neurotrophins in spinal cord transected adult rats.*Neuropeptides*.2007; 41(3):135-143.
- [36] Kasahara K,Nakagawa T,Kubota T.Neuronal loss and expression of neurotrophic factors in a model of rat chronic compressive spinal cord injury.*Spine*.2006;31(18): 2059-2066.
- [37] Sharma HS.A select combination of neurotrophins enhances neuroprotection and functional recovery following spinal cord injury.*Ann N Y Acad Sci*. 2007;11(22):95-11.
- [38] Swoboda KJ,Kissel JT,Crawford TO,et al.Perspectives on clinical trials in spinal muscular atrophy.*J Child Neurol*.2007; 22(8):957-966.
- [39] Wang Y, Zhang H, Wang Z, et al. Therapeutic effect of nerve growth factor on cerebral infarction in dogs using the hemisphere anomalous volume ratio of diffusion-weighted magnetic resonance imaging. *Neural Regen Res*. 2012; 7(24): 1873-1880.
- [40] Sunderland S,Beadly KC.Stress-strain phenomena in human peripheral nerve trunks.*Brain*.1961;84(2):102.
- [41] Yu Y,M atsuyama Y,Nakashima S,et al.Effects of M PSS and a potent iNOS inhibitor on traumatic spinal cord injury.*Neuroreport*.2004;15(13):2103-2107.
- [42] Gerndt SJ,Rodriguez L,Pawlik JW,et al. Consequences of high-dose steroid therapy for acute spinal cord injury.*J Trauma*.1997;42(2):279-284.
- [43] Haghghi SS,Agrawal SK,Surdell D Ir,et al.Effects of methylprednisolone and MK-801 on functional recovery after experimental chronic spinal cord injury.*Spinal Cord*.2000; 38(12):733-740.
- [44] Chen ZY,Chai YF,Cao L,et al.G1ial cell line-derived neurotrophic factor enhances axonal regeneration following sciatic nerve transection in adult rats.*Brain Res*.2001;902(2): 272-276.
- [45] Kasai Y, Iida R, Uchida A. Metal concentrations in the serum and hair of patients with titanium alloy spinal implants. *Spine*. 2003;28:1320-1326.
- [46] Ma SZ, Peng CL, Wu SQ, et al. Sciatic nerve regeneration using a nerve growth factor-containing fibrin glue membrane. *Neural Regen Res*. 2013; 8(36): 3416-3422.
- [47] Closkey RW, Parsons JR,Blacksin MF,et al. Mechanics of interbody spinal fusion:analysis of critical bone graft area. *Spine*.1993,18:1011.
- [48] Adam C,Pearcy M,McCombe P. Stress analysis of interbody fusion--finite element modelling of intervertebral implant and vertebral body. *Clin Biomech (Bristol, Avon)*. 2003;18(4): 265-272.