

军医进修学院
解放军总医院

硕士学位论文

中国知网 https://www.cnki.net

分类号：R686　　密级：公开

金葡素促进兔ACL重建后腱-骨愈合的组织学研究

Histological study of Highly Agglutinative Staphylococcin in enhancing tendon-bone healing after ACL reconstruction in rabbits

作者姓名：　李春宝

学科专业：　外科学(骨科)

导　　师：　刘玉杰 教授

答辩委员会主席：

论文答辩日期：　二O一一年五月九日

院校地址：　北京市复兴路28号

邮政编码：　100853

中国知网　https://www.cnki.net

军医进修学院
研究生学位论文原创性声明

秉承我院“敬业、勤奋、求实、创新”的学风，本人声明：所呈交的论文是我本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的研究成果，也不含为获得我院或其他教育机构的学位及证书而使用过的材料，对本文的研究作出贡献的个人或集体，均已在文中做了明确的说明并表示谢意。

申请学位论文与资料若有不实之处，本人承担一切相关责任。

论文作者签名：李春宝 日期：2011年5月9日

指导教师签名： 日期：

军医进修学院
研究生学位论文版权使用授权书

本人保证毕业离院后，发表论文或使用论文工作成果时署名单位为军医进修学院或解放军总医院。学院有权保留并向国家有关部门或机构送交论文原件、复印件和电子版本，可以采用影印、缩印、扫描或其它手段保存论文以供被查阅和借阅。学院可以公布学位论文的全部或部分内容(保密内容除外)。

论文作者签名：李春宝 日期：2011年5月9日

指导教师签名： 日期：

中国知网 https://www.cnki.net

目　录

缩略词表……(1)
中文摘要……(2)
英文摘要……(4)
前言……(6)
正文……(7)
材料和方法……(7)
结果……(13)
讨论……(22)
结论……(25)
参考文献……(26)
文献综述……(29)
攻读学位期间发表文章情况……(40)
致谢……(41)

中国知网 https://www.cnki.net

缩略词表

英文缩写	英文全名	中文译名
ACL	Anterior Cruciate Ligament	ACL
HAS	Highly Agglutinative Staphylococcin	金黄色葡萄球菌滤液制剂
SAI	Staphylococus Aureus Injection	骨折愈合刺激素
SAg	Super Antigen	超级抗原
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor	血管内皮生长因子
SEC	Staphylococcal Enterotoxin C	葡萄球菌肠毒素C
CPC	Calcium Phosphate Cement	磷酸钙骨水泥
TGF-β	Transforming Growth Factors-β	转化生长因子-β
G-CSF	Granulocyte Colony-stimulating Factor	粒细胞集落刺激因子
OPG	Osteoprotegerin	骨保护素
OCIF	Osteoclastgenesis Inhibitory Factor	破骨细胞生成抑制因子
LIPUS	Low-intensity Pulsed Ultrasound	低强度脉冲超声波
MMPs	Metalloproteinases	金属蛋白酶
BMSCs	Bone Mesenchymal stem Cells	骨髓间充质干细胞
PEGDA	Poly-ethyleneglycol Diacrylate	聚乙二醇二丙烯酸酯聚合物
PPCs	Periosteal Progenitor Ceils	骨膜祖细胞

中国知网 https://www.cnki.net

金葡素促进兔ACL重建后腱-骨愈合的组织学研究

中文摘要

目的 探讨金葡素(金黄色葡萄球菌滤液制剂)对兔 ACL 重建后腱-骨愈合的影响。

方法 采用自体趾长伸肌肌腱建立兔 ACL 重建动物模型，成年新西兰大白兔 24 只随机分为 2 组(实验组和空白对照组)，实验组于胫骨隧道建立后立即向隧道内均匀注射金黄色葡萄球菌滤液制剂(金葡素，Highly Agglutinative Staphylococcin, HAS，一种能够促进骨折愈合的生物制剂)0.2ml，分别于术毕及术后第 2 周于胫骨端腱-骨界面再次均匀注射金葡素 0.08ml。对照组以相同时间和方法注射等量 0.9%Nacl 注射液。分别于术后第 4、8 和 12 周各处死动物 8 只，自膝关节囊至胫骨结节下方横断取材，完整保留胫骨端骨隧道及移植肌腱，固定包埋后均行 HE、VEGF 免疫组化、苦味酸-天狼猩红和甲苯胺蓝染色，组织学评价腱-骨界面组织愈合情况。HE 染色定性观察腱-骨愈合程度，并以 Yamakado 分型方法进行评估；苦味酸-天狼猩红染色定性评价腱-骨界面 I、III 型胶原纤维增生、排列分布情况；VEGF 免疫组化染色定量评价腱-骨界面血管生成情况；甲苯胺蓝染色定量评价腱-骨界面新骨生成情况。

结果 实验组术后第 4 周腱-骨界面由纤维结缔组织填充，结合较为紧密，新生血管分布其间，成纤维细胞和成软骨细胞增生活跃，胶原纤维含量不多、排列尚不规则。术后第 8 周腱-骨结

中国知网 https://www.cnki.net

合较紧密，胶原纤维大量生成，部分区域可见 Sharpey’ s 纤维，形成间接止点，大量新生血管分布其间，肌腱周围成骨明显丰富，整个界面呈现新骨组织包围肌腱并向内侵入的趋势。第 12 周移植肌腱与骨隧道之间形成典型的间接连接,可见 Sharpey’ s 纤维排列有序，集结成束，血管生成较第 8 周有所减少，仍较丰富，新骨生成进一步增加，可见不成熟的纤维软骨。Yamakado 腱-骨界面形态学分型显示术后第 4、8 和 12 周实验组腱-骨界面愈合情况优于对照组。实验组在第 12 周有 1 个标本可观察到典型的直接连接结构。组织定量学分析表明术后第 4、8 和 12 周实验组新骨生成面积和新生血管所占比例均显著高于对照组($p \leqslant 0.05$)。通过本实验组织学研究及大量相关基础和临床研究可得，金葡素在多种成分(葡萄球菌肠毒素 C、血浆游离凝固酶、蛋白质、多肽和氨基酸等)的共同作用下，能够促进新生血管迅速长入腱-骨界面，丰富的血供一方面能够为新骨和胶原纤维的生成提供丰富的营养物质和细胞因子，启动骨代谢，激活骨细胞，加快骨坏死区的吸收与重建。同时也将大量的间充质细胞带入腱-骨界面，通过增殖，分化为成纤维细胞、成软骨细胞和成骨细胞。

结论 金葡素能够协同其多种成分的生物学作用，在增加腱-骨界面血液供应的基础上，共同促进新骨及胶原纤维的生成，由此达到促进兔 ACL 重建后腱-骨愈合的作用。

关键词：金黄色葡萄球菌；ACL；腱-骨愈合；重建

中国知网 https://www.cnki.net

Histological study of Highly Agglutinative Staphylococcin in enhancing tendon-bone healing after ACL reconstructionin rabbits

Abstract

[Objective] To explore the effects of Highly Agglutinative Staphylococcin on tendon-bone healing after ACL (anterior cruciate ligament) reconstruction in rabbits. **[Method]** Animal model of ACL reconstruction in 24 mature New Zealand White rabbits were established using autologous digital long extensor tendon and randomly classified into 2 groups. The HAS (Highly Agglutinative Staphylococcin) group was separately given Highly Agglutinative Staphylococcin immediately after operation and two weeks after operation, which was injected into the tendon-bone interface. The control group was only injected with the same doses of physiological saline. All animals were sacrificed at 4、8、and 12 weeks after operation for histological examinations. The specimens were stained with hematoxylin-eosin, Masson trichrome and toluidin blue to investigate pathology changes of the tendon-bone healing tissue. The VEGF immunohistochemisty stain was used to observe the neo-vascularization of tendon-bone healing tissue. **[Result]** The histological examination revealed that at 4 weeks after operation, the tendon-bone interface of HAS group was filled with proliferated fibroblasts and chondroblasts, the collagen fibers was obviously increased, however, their arrangement was not regular enough. At 8 weeks after operation, the healing tissue at the bone-tendon interface had developed into dense connective tissue, the collagen fibers was formed abundantly, some Sharpey's-like fibers spanning parts of the tendon-bone interface, which indicated the formation of indirect insertion. At 12 weeks after operation, The transition zones of collagen fibers, fibrocartilage and bone (the structure alike a direct ligamentous insertion) occurred in the local region of tendon-bone interface. These histological observations showed that the tissue healing at tendon-bone interface of the HAS group was quicker than those of the control group. The proportion of neo-vessels at the tendon-bone interface of the HAS group was

中国知网 https://www.cnki.net

significantly higher than those of the control group at 4, 8 and 12 weeks after operation (respectively p = 0.024， p=0.007). [**Conclusion]** Highly Agglutinative Staphylococcin can significantly improve the tendon-bone healing after ACL reconstruction in rabbits.

Key words: Staphylococcus aureus； ACL reconstruction; tendon-bone healing

中国知网 https://www.cnki.net

前　言

前交叉韧带(Anterior Cruciate Ligament，ACL)是膝关节重要的静力和动力性稳定结构，在保持胫股关节的正常运动中发挥着重要作用。

ACL 损伤在运动损伤中很常见，因其自身的组织学特点，一旦损伤难以自愈。ACL 损伤后常因膝关节生物力学性质的改变而严重影响关节功能，如治疗不当，易继发半月板和关节软骨损伤，导致关节退变和骨关节病[1-3] 。

为了恢复膝关节的正常结构与功能，关节镜下腘绳肌腱移植重建 ACL 已经成为治疗 ACL 损伤的标准手术。据统计，美国每年 ACL 重建手术病例超过 100,000 例[4]，但其手术失败率接近 10%，每年翻修手术多达 3000-10,000 例[5]。研究显示，肌腱移植物在骨隧道内不愈合或延迟愈合等是失败的主要原因之一[6]。多数动物实验研究发现，肌腱移植物在骨隧道内获得完全可靠的腱-骨愈合需要 12-24 个月甚至更长的时间[7-8] 。可见，ACL 重建术成功的关键在于移植肌腱与骨隧道的牢固愈合[9]。

文献报道体外冲击波、骨膜包裹、生物活性因子注射、磷酸钙、骨髓间充质干细胞等方法能在一定程度上起到促进腱-骨愈合的作用，但每种方法均存在一定的局限性。因此，如何更有效地促进腱-骨愈合，一直是研究的热点和难点。

金黄色葡萄球菌滤液制剂(金葡素，Highly Agglutinative Staphylococcin, HAS)是一种能够促进骨折愈合[10] 的新型生物制剂。它具有用药方便(局部或静脉注射)、使用剂量小、价格低廉、效果显著、无严重并发症等优点，目前已广泛应用于临床。因此该药能否促进 ACL 重建术后移植肌腱与骨隧道的愈合，成为一个值得探讨的问题。

本实验采用兔趾长伸肌腱建立 ACL 移植重建模型，将金葡素均匀注入腱-骨界面后，于术后第 4、8 和 12 周分别取材，进行大体和组织学定性及定量评估，通过与对照组比较，观察金葡素在腱-骨结合部位修复中的作用。

中国知网 https://www.cnki.net

金葡素促进兔 ACL 重建后腱-骨愈合的组织学研究

一、 材料和方法

(一) 仪器和设备

1. Olympus BX51 生物显微镜　　日本 Olympus 公司
2. Olympus DP70 数码照相设备　日本 Olympus 公司
3. 病理切片机　　德国莱卡公司
4. Nikon L-1 型数码相机　　JAPAN
5. BMJ-1 组织包埋机　　天津

(二) 主要试剂

1. 10%甲醛溶液　　北京
2. 10% EDTA 磷酸缓冲液脱钙液　石家庄杰克化工有限公司
3. 苏木素-伊红染色剂　　北京
4. 苦味酸-天狼猩红染色剂　　北京
5. 甲苯胺蓝染色剂　　北京
6. 金黄色葡萄球菌滤液制剂　　沈阳协合集团，国药准字 S19990010
7. 0.9%Nacl 注射液　　双鹤药业，国药准字 H34023609
8. 亚甲蓝注射液　　江苏济川制药，国药准字 H32024827

(三) 实验对象及分组

3 月龄健康新西兰大白兔 24 只，体重平均 2.5 kg(2.1-2.8 kg)，雌雄不限，随机分为 2 组，即金黄色葡萄球菌滤液制剂组(实验组)和 0.9%Nacl 注射液组(对照组)，每组 12 只兔(24 个膝关节)。ACL 重建手术术中及术后分别在腱-骨界面给予等量 HAS 和 0.9%Nacl 注射液治疗。

(四) 动物模型的建立

1. 麻醉及体位

术前 24 小时禁食、水，双侧膝关节备皮。于兔肌内缓慢注射咪达唑仑注射液(图 1)0.15mg/kg(0.9%Nacl 注射液稀释)，待兔进入浅睡眠状态后缓慢肌注复合麻醉药物(速眠新 II 注射液与盐酸氯胺酮注射液以 1:1 体积分数配

中国知网 https://www.cnki.net

比)0．2ml／kg。麻醉成功后，动物仰卧于手术台上，碘酒、酒精消毒，铺无菌手术单(图 2)。初次麻醉 0.5h 后，注意观察兔情况，当出现呼吸变浅、脉搏加快、眼睫毛反射敏感或肢体有轻微活动时提示有效麻醉消失，此时追加药物。补充麻醉药量原则为首次麻醉药量的 1／2，根据手术时间可重复追加[6]



图 1 麻醉药物

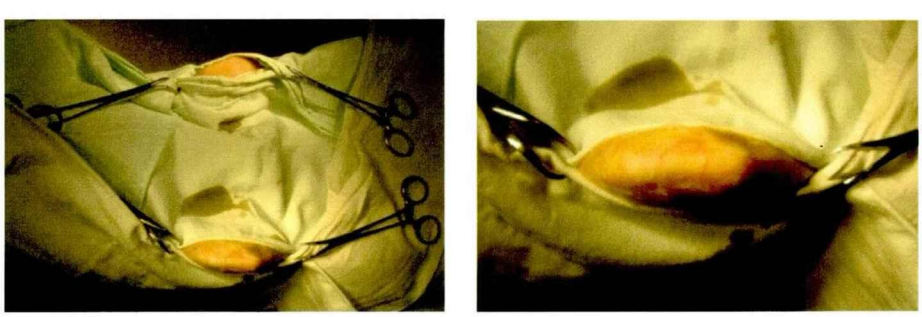


图 2 手术铺单

2. 手术显露

双侧膝关节分别取髌骨旁内侧缘做一纵行切口(图 3)，长约 20.0mm，依次切开皮肤、皮下组织和关节囊，将髌骨翻向内侧，暴露兔膝关节 ACL(图 4)，与周围组织分离后，切断 ACL(图 5)，查前抽屉及 Lachman 试验阳性。显露出 ACL 在股骨和胫骨侧的附着点，作为建立股骨和胫骨隧道的标记点。

中国知网 https://www.cnki.net



图 3 膝关节切口

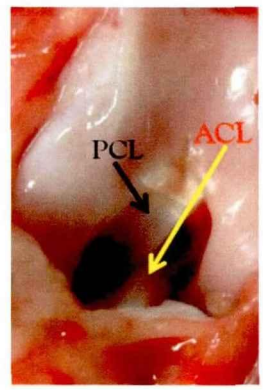


图 4 暴露 ACL

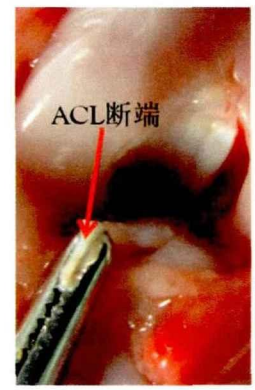


图 5 切断 ACL 并清理残端

3. 获取自体移植肌腱

沿趾长伸肌腱股骨附着端向远侧分离(图 6)显露肌肉肌腱联合处，并从腱腹联合处切断趾长伸肌腱，保留肌腱股骨端附着处(图 7)，统一长度为 40.0mm(图 8)，肌腱断端使用 4-0 Ethibond 缝合线编织缝合(图 9)，经测量，移植肌腱平均直径 2.0mm。

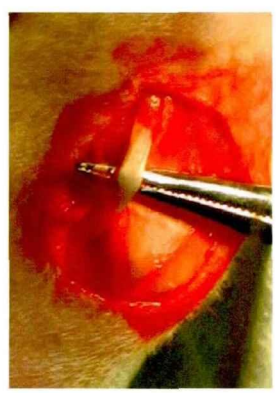


图 6 分离趾长伸肌腱



图 7 沿肌腹处切断肌腱



图 8 统一肌腱长度为 40.0mm

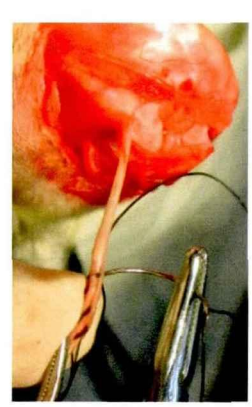




图 9 肌腱远端编织缝合

中国知网 https://www.cnki.net

4. 建立骨隧道

选取与移植肌腱直径匹配的克氏针(2.0mm)，以骨科手术专用钻分别经ACL在股骨和胫骨的附着点建立股骨、胫骨隧道(图 10)，将趾长伸肌腱远端拉入股骨隧道内，经关节腔穿过胫骨隧道拉出(图 11)，肌腱紧贴隧道出口处打结(图 12)，以肌腱结作为术后注药定位点。

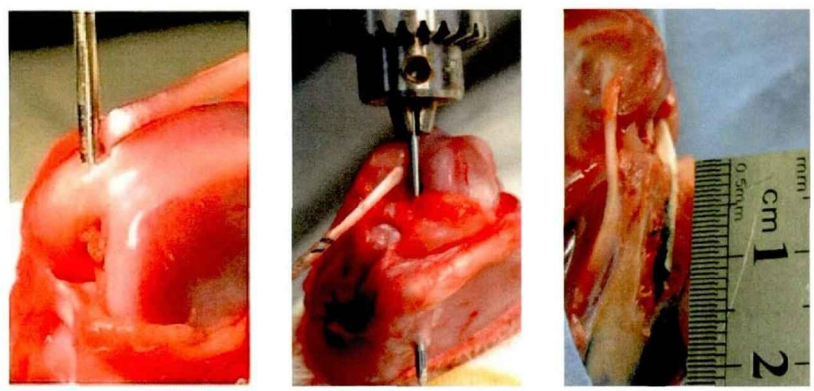


图 10 分别建立股骨和胫骨隧道



图 11 肌腱远端由股骨隧道经胫骨隧道拉出

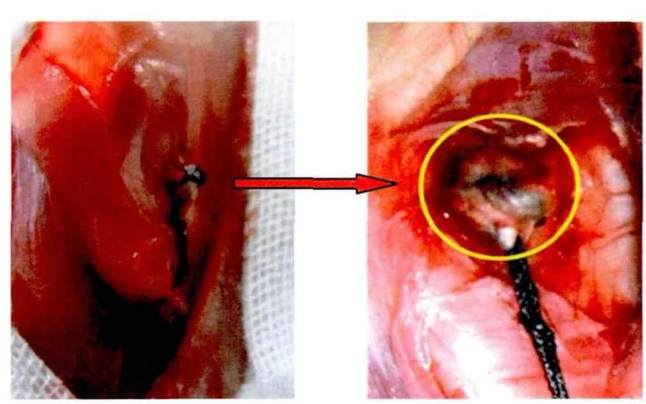


图 12 肌腱结

中国知网 https://www.cnki.net

5. 移植肌腱的固定

在胫骨骨隧道口下方的胫骨嵴冠状位钻孔，于膝关节屈曲 30°位，将肌腱牵引线穿出并在胫骨桥上打结固定(图 13)。ACL 重建完毕。经检查移植肌腱固定牢固，髁间窝无撞击(图 14)，术区以 0.9%Nacl 注射液冲洗，并逐层缝合关节囊及皮肤。伤口 75%酒精消毒后，无菌敷料包扎。



图 13 骨桥固定 ACL

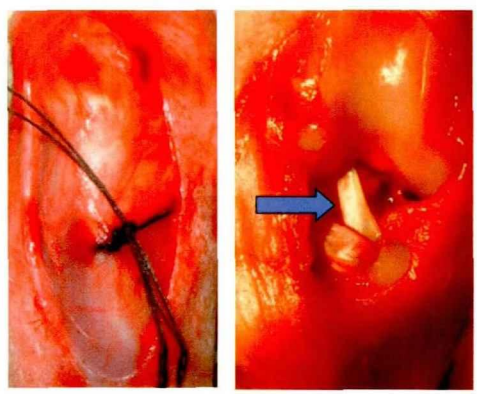


图 14 ACL 重建后

6. 术后处理

术后予以青霉素 80Wu/d 肌注，持续 3 天，每天检查实验动物伤口及一般情况。术后实验动物在解放军总医院动物实验中心饲养，局部不予制动，未见感染、意外死亡例。

7. 治疗方法

预实验中胫骨隧道建立后封闭两隧道口，其内可平均注入亚甲蓝注射液 0.2ml，移植肌腱固定后腱-骨界面平均注入剂量为 0.08ml(图 15)，以此作为实验术中药物注射剂量标准。

实验组 胫骨隧道建立后立即向隧道内均匀注如金黄色葡萄球菌滤液制剂(金葡素，沈阳协合集团，国药准字 S19990010)0.2ml(图 16)。分别于术毕(图 17)及术后第 2 周(图 18)于胫骨端腱-骨界面再次均匀注射金葡素 0.08ml。

对照组 以相同时间和方法注入等量 0.9%Nacl 注射液。

中国知网 https://www.cnki.net



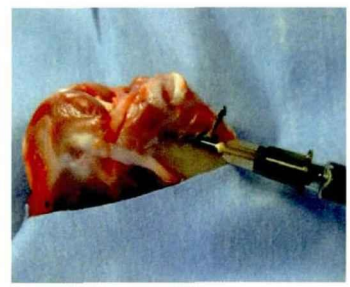
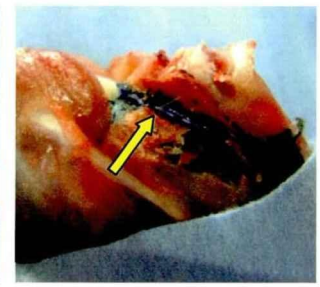



图 15 注药平均剂量测定

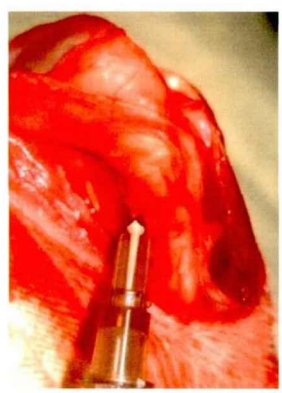




图 16 胫骨隧道注药　　图 17 术中腱-骨界面注药　图 18 术后 2 周腱-骨界面注药

(五) 标本处理及观察项目

1. 取材

分别于术后第 4、8 和 12 周各处死动物 8 只，自膝关节囊至胫骨结节下方横断取材，完整保留胫骨端骨隧道及移植肌腱，行大体观察。

3. 固定和脱钙

将标本以 10%甲醛溶液固定 72 小时，10% EDTA 磷酸缓冲液脱钙，每 3 天更换一次脱钙液，共 8 周。

4. 标本处理

切除膝关节周围软组织，锐利刀片沿胫骨隧道纵轴方向修整标本为约 10.0mm×5.0mm×5.0mm 大小的组织块。

5. 梯度脱水、透明、包埋及切片

100%酒精 2min×2 次，95%酒精 2min×2 次，80%酒精 2min，蒸馏水洗，二甲苯透明 5min×3 次，石蜡包埋后，切成 5μm 厚薄片，置于载波片上。操作时均在胫骨隧道中段靠近远端处切片。

中国知网 https://www.cnki.net

6. 组织学定性分析

切片行 HE、VEGF 免疫组化、苦味酸-天狼猩红和甲苯胺蓝染色后置于显微镜下，观察骨隧道和移植肌腱间界面组织愈合情况。界面形态采用 Yamakado[11]分型方法，分为腱-骨分离、疏松结缔组纵连接、Sharpey's 纤维连接和直接连接。每个标本均取胫骨侧，每组每个时段取 8 个标本。在同一标本上如发现上一种界面形态则归于上一类。苦味酸-天狼猩红染色定性评价腱-骨界面 I、III 型胶原纤维增生、排列分布情况。

7. 组织学定量分析

使用 Olympus DP70 microscope 观测，应用 Image-Pro Plus 5.0 Image-analysis Software(Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA)做图像分析。

7.1 甲苯胺蓝染色 定量评价腱-骨界面新骨生成情况。新骨生成的定量测定是将移植肌腱置于视野中央，以 100×放大视野下、同一曝光条件下照相，测量视野中 1 mm^2 区域内的新骨面积，每个标本随机选取 5 个区域测量。

7.2 VEGF 免疫组化染色 定量评价腱-骨界面血管生成情况。每一样本随机取 5 个部位进行观测，在 40×放大视野下、同一曝光条件下照相，计算出新生血管面积与视野面积的比值。

(六) 统计学分析

所有数据均以平均数±标准差表示，实验组与对照组新生软骨和血管含量的差别均采用定量数据成组 Student t 检验进行统计学比较，使用 SPSS11.0 统计软件进行统计学分析，检验水准 $\alpha = 0.05$。

二、结果

1. 大体观察结果

24 只实验动物术后恢复良好、无死亡。术后第 4、8 和 12 周处死动物前行双膝关节稳定性检查，前抽屉试验和 Lachman 试验均为阴性。部分实验组和对照组膝关节可见轻微滑膜增生和少量关节腔积液，考虑为手术创

中国知网 https://www.cnki.net

伤所致。各时间段动物膝关节半月板及关节软骨无磨损，移植肌腱连续性完整(图 19)。术后第 12 周移植肌腱与骨隧道结合紧密(图 20)。

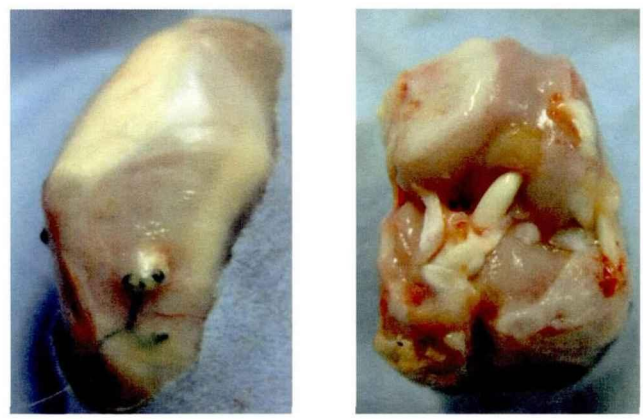


图 19 关节内移植肌腱连续性完整

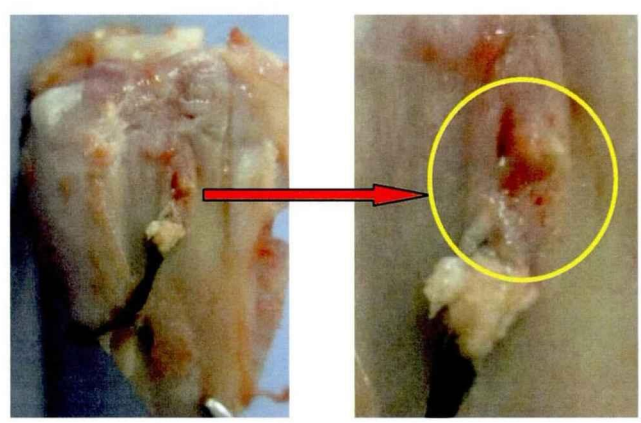


图 20 移植肌腱与骨隧道结合紧密

2. 光镜组织学观察结果(图示中“T”代表移植肌腱，“B”代表骨隧道)

2.1 术后第 4 周

实验组：移植肌腱与骨隧道之间由纤维结缔组织填充，结合较为紧密，主要成分为大量成纤维细胞和少量巨噬细胞、中性粒细胞等炎性细胞(图 21)，新生血管分布其间，增生活跃(图 23)。腱-骨结合区靠近骨隧道侧以细胞核呈类圆形的成软骨细胞为主，部分区域可见软骨移行带(图 25)；靠近肌腱侧主要为细胞核呈长梭形的成纤维细胞，胶原纤维含量不多、排列尚不规则，但生成活跃(图 27)。移植肌腱周围可见大量新骨生成，肌腱内可

中国知网 https://www.cnki.net

见大量成纤维细胞，胶原纤维含量少。在 8 个标本中有 1 个出现类 Sharpey's 纤维形态的胶原纤维穿透肌腱和新骨。

对照组：移植肌腱与骨隧道边界清晰，连接疏松，以新生纤维结缔组织相填充(图 22)，主要成分为成纤维细胞和炎性细胞，可见明显巨噬细胞浸润，胶原纤维生成少，血管生成不明显(图 24)。移植肌腱周围新骨生成活跃，靠近骨隧道侧可见成软骨细胞(图 26)，肌腱侧为少量成纤维细胞(图 28)。肌腱和骨隧道间尚有分离，部分标本表现为腱-骨分离形态。

2.2 术后第 8 周

实验组：移植肌腱与骨隧道间距减小，出致密的结缔组织连接(图 29)，炎性细胞逐渐消失，成纤维细胞数量有所减少，胶原纤维大量生成，且排列规则，与周边骨隧道紧密连接，部分显示为类 Sharpey's 样纤维与新生骨组织连接(图 35)，大量新生血管分布其间(图 31)。肌腱周围成骨明显丰富，新生骨与肌腱界限不清，不易分辨，整个界面呈现新骨组织包围肌腱并向内侵入的趋势(图 33)。肌腱内胶原含量丰富。

对照组：移植肌腱与骨隧道之间连接较为紧密，界面间成纤维细胞增生活跃，胶原纤维合成增多、排列尚不规则，部分标本可见少量疏松无序的类 Sharpey's 样纤维出现(图 36)，血管增生明显(图 32)。新生骨与肌腱界限清楚，成骨细胞活跃(图 34)。肌腱内成纤维细胞增生活跃，胶原含量较第 4 周明显增多，但排列尚不规则(图 26)。

2.3 术后第 12 周

实验组：移植肌腱与骨隧道之间形成典型的间接连接,距离小且均一，可见 Sharpey's 纤维有序排列，集结成束(图 37)，血管生成较第 8 周有所减少，仍较丰富(图 39)，新骨生成进一步增加，成骨细胞数量有所减少，可见不成熟的纤维软骨(图 41)。1 个标本出现典型的直接连接，包含纤维软骨和矿化软骨带，潮线明显可见。肌腱内成纤维细胞减少，胶原纤维含量丰富(图 43)。

对照组：移植肌腱与骨隧道之间连接紧密，界限变得模糊，胶原含量较 8 周增多，出现以 Sharpey's 纤维为代表的间接连接结构(图 38)，未见直接连接形态。血管生成明显减少(图 40)，成骨细胞活跃，新骨形成较第 8

中国知网 https://www.cnki.net

周增加(图 42)。肌腱内成纤维细胞数量明显较第 8 周少，胶原纤维含量进一步增多，排列趋于规则(图 44)。

术后第 4 周，HE 染色

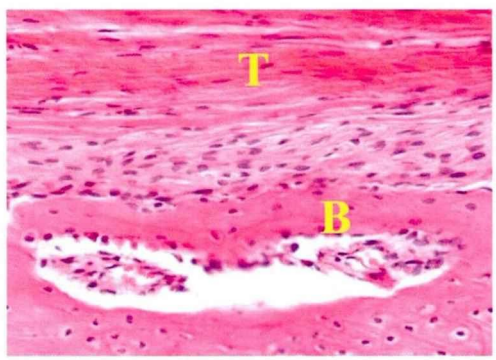


图 21 4W 实验组×40

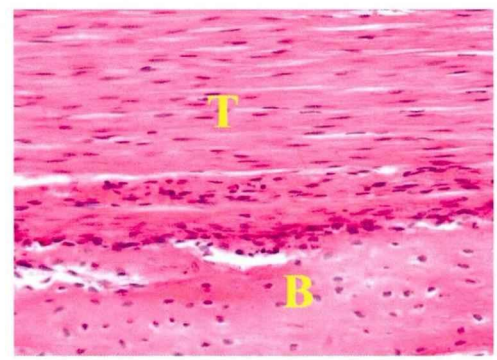


图 22 4W 对照组×40

图 21：实验组腱-骨界面由纤维结缔组织填充，结合较为紧密。

图 22：对照组腱-骨界面以新生纤维结缔组织填充，连接疏松，杂乱无序,尚有分离。

术后第 4 周，VEGF 染色

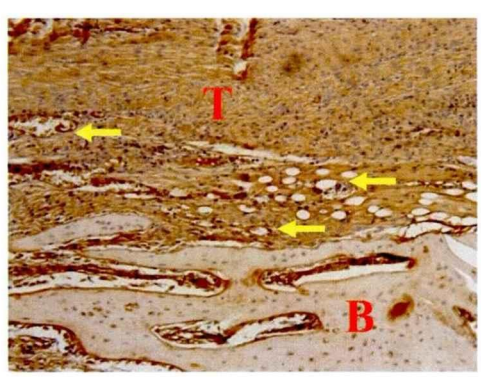


图 23 4W 实验组×20

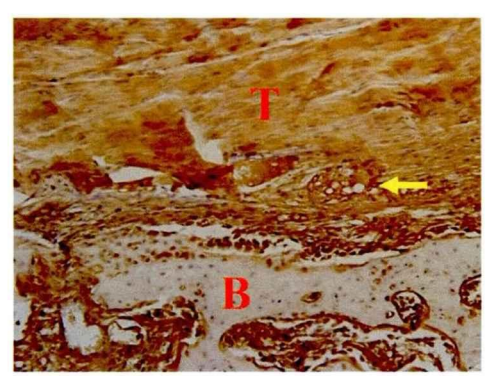


图 24 4W 对照组×20

图 23：实验组腱-骨界面血管生成活跃。

图 24：对照组腱-骨界面可见少量新生血管出现。

中国知网 https://www.cnki.net

术后第 4 周，甲苯胺蓝染色

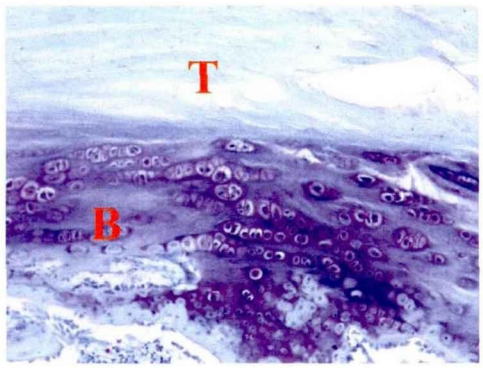


图 25 4W 实验组×20

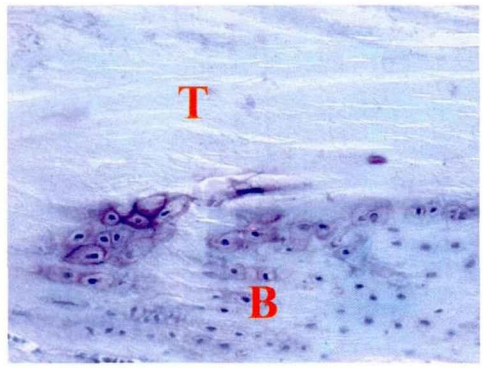


图 26 4W 对照组×20

图 25：实验组移植肌腱周围大量新骨生成，靠近骨隧道侧可见大量成串排列的成软骨细胞。

图 26：对照组移植肌腱周围可见新骨生成，靠近骨隧道侧可见成软骨细胞。

术后第 4 周，天狼猩红染色

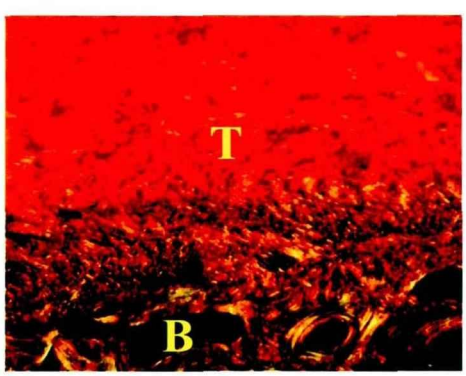


图 27 4W 实验组×20

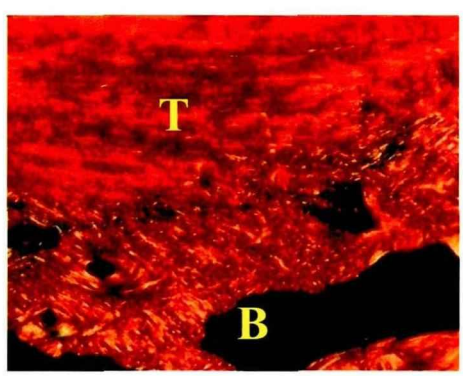


图 28 4W 对照组×20

图 27：实验组腱-骨界面胶原纤维生成活跃，肌腱侧成纤维细胞丰富，胶原纤维含量不多，排列不规则。

图 28：对照组腱-骨界面胶原纤维生成少，肌腱侧成纤维细胞较少。

术后第 8 周，HE 染色

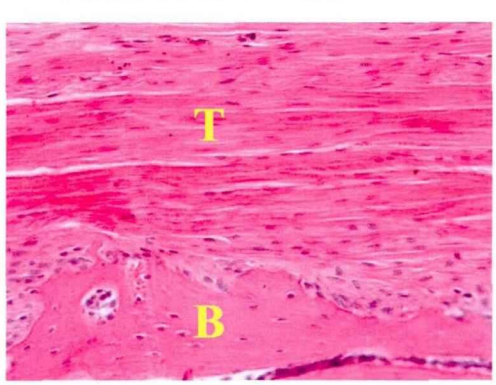


图 29 8W 实验组×40

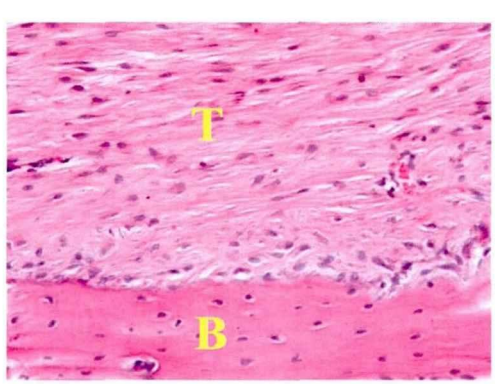


图 30 8W 对照组×40

中国知网 https://www.cnki.net

图 29：实验组腱-骨界面连接紧密，部分标本出现类 Sharpey's 样纤维。

图 30：对照组腱-骨界面连接较为紧密，部分标本可见少量无序疏松的类 Sharpey's 样纤维出现。

术后第 8 周，VEGF 染色

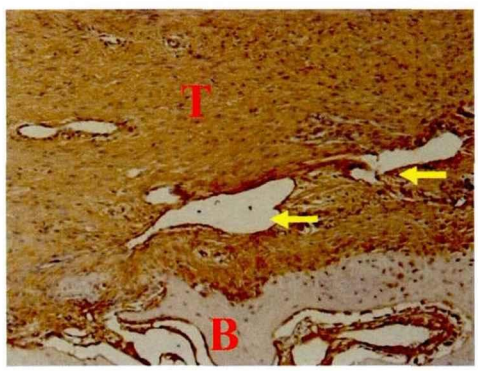


图 31 8W 实验组×20

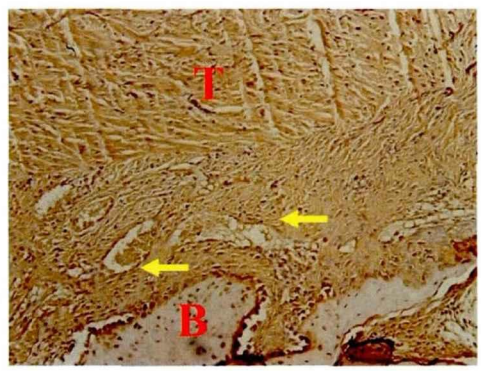


图 32 8W 对照组×20

图 31：实验组腱-骨界面血管生成活跃，大量新生血管分布其间。

图 32：对照组腱-骨界面血管生成较第 4 周明显增多。

术后第 8 周，甲苯胺蓝染色

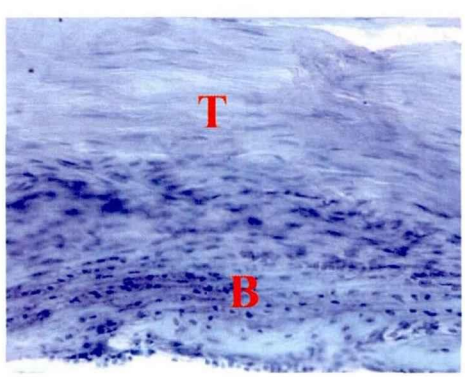


图 33 8W 实验组×20

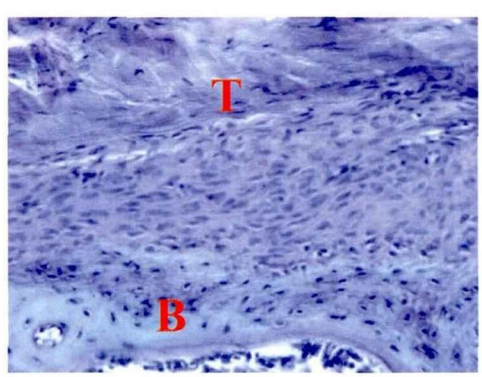


图 34 8W 对照组×20

图 33：实验组肌腱周围成骨明显丰富，新生骨与肌腱界限不清，不易分辨，整个界面呈现新骨组织包围肌腱并向内侵入的趋势。

图 34：对照组新生骨与肌腱界限清楚，成骨细胞活跃。

中国知网 https://www.cnki.net

术后第 8 周，天狼猩红染色

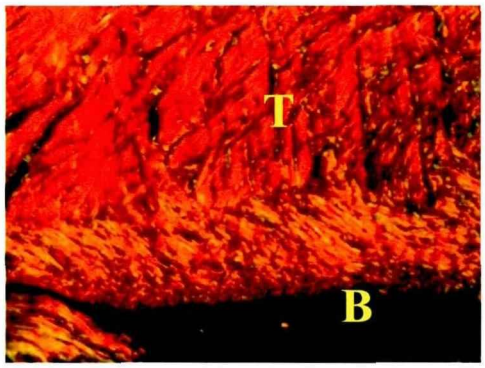


图 35 8W 实验组×20

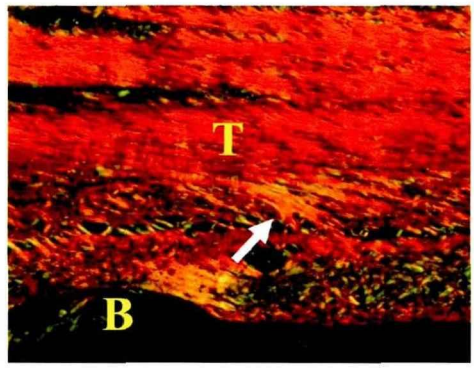


图 36 8W 对照组×20

图 35：实验组腱-骨界面胶原纤维大量生成，排列规则，部分可见类 Sharpey's 样纤维与新生骨组织紧密连接。

图 36：对照组腱-骨界面胶原纤维合成增多，排列尚不规则，部分标本可见少量无序疏松的类 Sharpey's 样纤维出现。

术后第 12 周，HE 染色

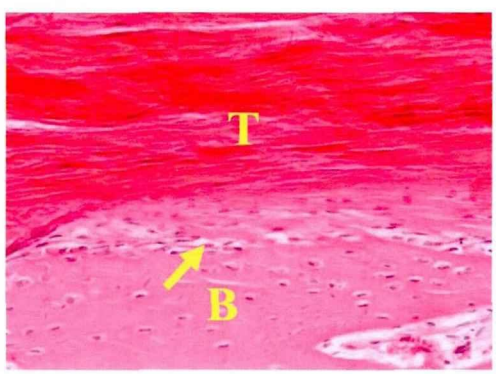


图 37 12W 实验组×40

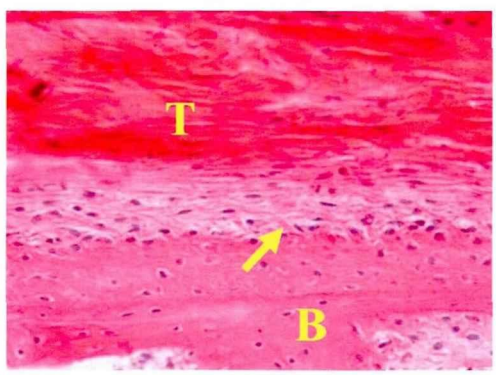


图 38 12W 对照组×40

图 37：实验组腱-骨界面形成典型的间接连接，Sharpey's 纤维排列有序，集结成束。

图 38：对照组腱-骨界面连接紧密，界限模糊，出现以 Sharpey's 纤维为代表的间接连接结构。

中国知网 https://www.cnki.net

术后第 12 周，VEGF 染色

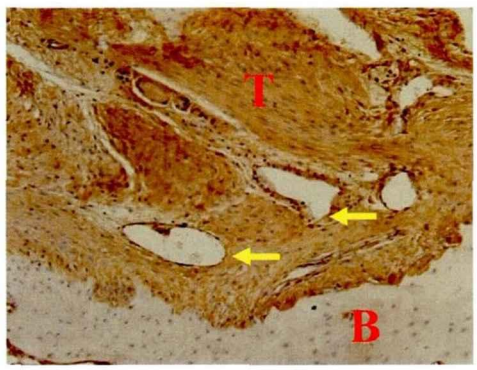


图 39 12W 实验组×20

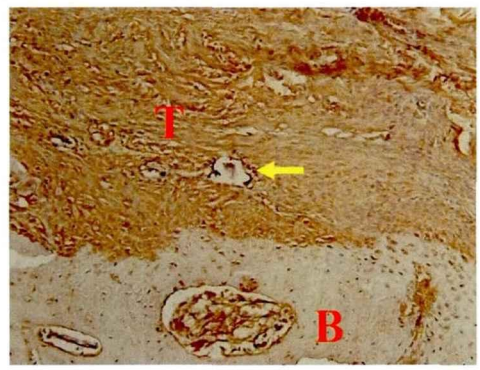


图 40 12W 对照组×20

图 39：实验组腱-骨界面血管生成较第 8 周有所减少，仍较丰富。
图 40：对照组腱-骨界面血管生成明显减少。

术后第 12 周，甲苯胺蓝染色

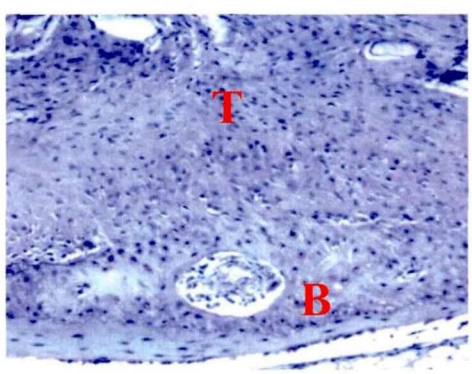


图 41 12W 实验组×20

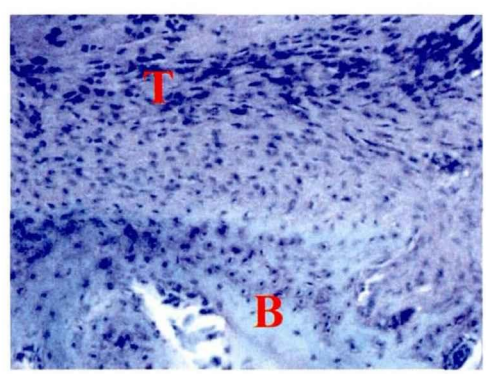


图 42 12W 对照组×20

图 41：实验组骨隧道新骨生成增加，成骨细胞数量减少，可见不成熟的纤维软骨。
图 42：对照组腱-骨界面界限变得模糊，成骨细胞活跃，新骨形成进一步增多。

术后第 12 周，天狼猩红染色

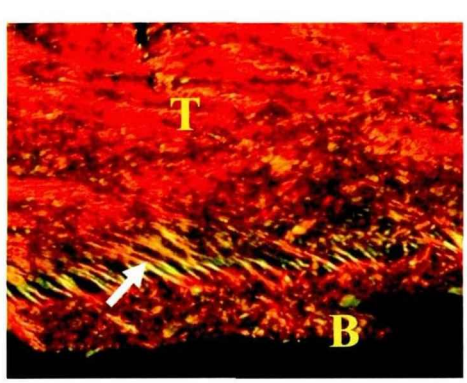


图 43 12W 实验组×20

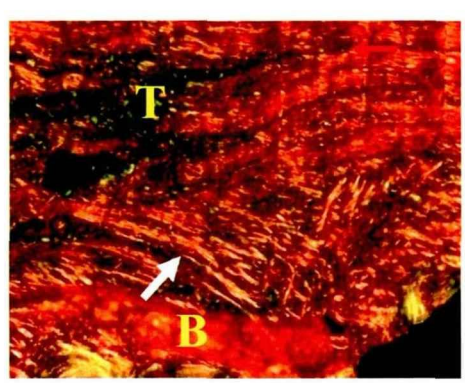


图 44 12W 对照组×20

中国知网 https://www.cnki.net

图 43：实验组腱-骨界面 Sharpey's 纤维排列有序，集结成束，肌腱内成纤维细胞减少，胶原纤维丰富。

图 44：对照组腱-骨界面胶原含量较 8 周增多，出现以 Sharpey's 纤维为代表的间接连接结构；肌腱内胶原纤维含量进一步增多，排列趋于规则。

3 统计学结果

3.1. 两组兔 Yamakado 腱-骨界面形态学分型 (如表 1 所示)。

术后第 4、8 和 12 周实验组腱-骨界面愈合情况优于对照组。实验组在第 12 周有 1 个标本在腱-骨界面可观察到典型的直接连接结构。

表 1　两组兔术后不同时相 Yamakado 腱-骨界面形态学分型结果

Table1　Yamakado morphligical interface results of each group at different intervals

分组		直接连接	纤维连接	结缔组织连接	腱-骨分离
对照组	4 周	0	0	5	5
	8 周	0	2	6	2
	12 周	0	5	4	1
实验组	4 周	0	1	7	1
	8 周	0	7	3	0
	12 周	1	8	1	0

3.2. 两组兔移植肌腱周围新骨生成面积评估结果

术后第 4、8 和 12 周实验组腱-骨界面新骨生成面积均显著大于对照组($P \leq 0.05$) (如表 2 所示) 。

表 2　两组兔移植肌腱周围新骨形成面积比较

Table2　Comparasion of circum-graft new bone areas in two groups at different intervals ($\bar{x} \pm S$, n=8, mm^2)

分组	4 周	8 周	12 周
对照组	0.15±0.12	0.24±0.05	0.33±0.10
实验组	0.27±0.05	0.41±0.11	0.48±0.12
t	2.611	3.979	2.716
p	0.0205	0.0014	0.0167

中国知网 https://www.cnki.net

3.3. 两组兔移植肌腱周围新生血管所占比例评估结果

术后第 4、8 和 12 周实验组腱-骨界面新生血管在组织切片中所占的比例均显著高于对照组(P <0.05) (如表 3 所示) 。该比例在术后第 8 周最大，在第 12 周有所减少。

表 3　两组兔移植肌腱周围新生血管所占比例比较

Table3　Comparasion of circum-graft new vessles proportion in two groups at different intervals　($\bar{x}$ ±S, n=8)

分组	4 周	8 周	12 周
对照组	0.08±0.04	0.26±0.05	0.20±0.10
实验组	0.27±0.12	0.48±0.11	0.41±0.12
t	4.249	5.150	3.803
P	0.0008	0.0001	0.0019

三、讨论

移植肌腱在骨隧道内的愈合是一个复杂的过程，有学者[12]报道，ACL 重建术后有 10%的患者因腱-骨愈合不良导致关节不稳。腱-骨之间愈合的速度与质量很大程度上影响手术疗效及术后膝关节康复。因此，移植肌腱与骨隧道牢固的愈合是 ACL 重建手术成功的关键，也是该领域研究的重点。

(一) ACL 重建术后腱-骨愈合的组织学转归

移植肌腱与骨隧道的连接方式有两种即直接连接和间接连接。其中正常 ACL 止点是典型的直接连接，包含四层结构：韧带纤维组织、非钙化纤维软骨、钙化软骨和骨组织，在非钙化纤维软骨与钙化软骨之间有嗜碱性染色的潮线[13]。间接连接指肌腱与骨之间通过垂直胶原纤维即 Sharpey's 纤维进行连接。ACL 重建后，移植肌腱在骨隧道内理想的愈合方式应与正常 ACL 止点类似。

实验研究表明，移植肌腱在骨隧道内多为间接愈合，即肌腱与骨之间无纤维软骨带，而直接通过 Sharpey's 纤维建立连接。多数动物试验显示，

中国知网　https://www.cnki.net

在术后第 12 周腱-骨界面间开始出现 Sharpey's 纤维。敖英芳等[14]认为腱-骨间愈合是先形成间接连接，再逐渐向直接连接转化的过程。

(二) 金葡素对腱-骨愈合的促进作用

金葡素又名骨折愈合刺激素(Staphylococus Aureus Injection, SAI)，是受骨髓炎病理机制启发，利用现代生物技术从金黄色葡萄球菌代谢产物中提取的富含多种生物活性成分的新型生物制剂。该制剂为无菌淡黄色或无色澄明液体，主要成分为葡萄球菌肠毒素 C(Staphylococcal Enterotoxin C, SEC)、血浆游离凝固酶(Coagulase)、蛋白质、多肽和氨基酸等。

金葡液在临床中的应用最早可追溯到 1967 年。前苏联学者 MOBIII OBИH 等报导了应用金黄色葡萄球菌类毒素联合抗菌素防治四肢开放性骨折感染。1982 年，谢旭明等[15] 通过动物实验研究发现金黄色葡萄球菌代谢产物提取液能够加速骨折愈合。随后的临床病例回顾研究显示[10]金葡素具有加速骨折端血肿吸收、机化和促进骨痂形成的作用。徐寿香等[16]采用同位素技术通过动物实验，证实其具有促进骨折端血管形成，增加血流量的作用。此后，多年的实验研究与临床应用发现金葡素在骨折(包括新鲜骨折、骨延迟愈合及骨不愈合)、股骨头坏死、骨囊肿、椎间盘突出、骨质疏松等疾病的治疗中具有显著疗效[17-22]。

本实验通过组织学研究，观察金葡素对腱-骨愈合的影响。经比较实验组和对照组 Yamakado 腱-骨界面形态学分型结果，发现术后第 4、8 和 12 周实验组愈合情况均优于对照组。实验组腱-骨界面在术后第 12 周形成广泛的间接连接，可见典型的密集排列的 Sharpey's 纤维。其血管生成面积在第 8 周达到高峰，至第 12 周仍处于活跃状态；新骨生成和胶原纤维生成量随时间递增。经组织学定量分析，3 个时段实验组腱-骨界面新生血管和新骨生成面积均显著优于对照组($P\leq0.05$)。因此，组织学研究显示，金葡素具有促进兔移植肌腱与骨隧道间血管、新骨和胶原纤维生成，利于腱-骨愈合的作用。

(三) 金葡素促进腱-骨愈合的机理

中国知网 https://www.cnki.net

金葡素是一种由多种成份组成的生物制剂。其中，SEC[23-25]是一种具有高度生物活性的外源性蛋白质，在免疫学中被确定为超级抗原(Super Antigen, SAg)，仅需微量(纳克剂量，ng)即可高效刺激 T 细胞增殖，促使机体释放多种细胞因子，通过局部无菌性炎症，加快血管再生，改善微循环，促新陈代谢和组织再生。血浆游离凝固酶[26] 的作用与凝血酶原物质相似，它能够与血浆中的激活因子组合成复合物，使纤维蛋白原转变为纤维蛋白，加快血浆凝固，促进纤维细胞的形成与演变，使新生毛细血管网不断重建与扩大，起到加速血肿吸收，促进组织修复的作用。

当腱-骨界面注入金葡素后，在 SEC、血浆游离凝固酶等多种成分的共同作用下，新生血管迅速长入。由此带来的丰富血供一方面能够为新骨和胶原纤维的生成提供丰富的营养物质和细胞因子，进而启动骨代谢，激活骨细胞，加快骨坏死区的吸收与重建。同时也将大量的间充质细胞带入腱-骨界面, 通过增殖，分化为成纤维细胞、成软骨细胞和成骨细胞；间充质细胞还能分泌内源性骨形成蛋白, 对于诱导成骨也具有重要作用。此外，有研究显示[27]，在体外培养环境下，金葡素对成骨细胞的增殖和分化作用甚微，但能够显著促进成骨细胞的矿化，这从细胞水平阐述了该制剂相关的作用机理。可见，金葡素能够协同多种成分的生物学作用，在有效增加腱-骨界面血流量的基础上，共同促进新骨及胶原纤维的生成，由此达到促进腱-骨愈合的作用。

(四) 腱-骨愈合与腱-骨界面再血管化的关系

ACL 重建术后[28]，移植肌腱与骨隧道之间首先行成富含血管的纤维结缔组织带，在此基础上，来源于骨隧道的新生骨逐渐向肌腱内长入。Ntoulia A 等[31]指出，再血管化是移植肌腱与骨隧道愈合的重要环节，其周围的微环境在愈合过程中发挥着非常重要的作用。Walsh 等[29] 通过动物研究发现，当腱-骨界面血管化程度提高后，界面间组织愈合程度和生物力学性能得到显著提升。可见，ACL 移植重建后，良好的血管再生对腱-骨界面细胞增殖和组织愈合至关重要。

Yoshikawa T 等[30]在实验中发现，ACL 重建术后移植肌腱过度的血管化将降低肌腱生物力学性能，增加膝关节松弛度，不利于腱-骨愈合。

中国知网 https://www.cnki.net

本实验中组织学观察可见，实验组腱-骨界面血管生成活跃。统计学分析显示，各个时间点实验组新生血管的面积显著大于对照组，但血管并非持续过度扩增，其面积在术后第 8 周最大，在第 12 周，已有所减少。同时，实验组新骨生成面积和骨长入情况，以及胶原纤维生成情况均优于对照组。实验组在第 4 周即可观察到类 Sharpey's 纤维穿透肌腱和新骨，至第 12 周，Sharpey's 纤维广泛生成，集结成束有序排列，1 个标本出现典型的直接连接结构。研究表明[31]，移植肌腱与骨隧道间骨长入程度与生物力学性能的提高呈正相关，同时 Sharpey's 纤维生成的数量和大小也直接影响移植物的最大失效负荷。可见，金葡素对腱-骨愈合的促进作用并非单纯体现在促进血管再生方面，其对新骨和胶原纤维生成的促进作用保证了移植肌腱与骨隧道愈合的质量。

(五) 本实验的不足：

金葡素是一种较为复杂的生物复合制剂，其所含成分及每种成分的精确含量尚不清楚，这是一项不容回避的事实，因此，该药发挥促进腱-骨愈合作用的具体机制还有待于深入探讨。此外，其对腱骨愈合的促进作用还需通过生物力学研究做进一步验证。

四 结论

组织学研究表明，金葡素能够促进兔 ACL 重建术后，移植肌腱与骨隧道间血管、新骨和胶原纤维的生成，具有促进腱-骨愈合的生物学作用；金葡素促进腱-骨愈合的研究为今后的临床应用打下了良好的实验依据。

中国知网 https://www.cnki.net

参考文献

1. Yamakado K, Kitaoka K, Yamada H, et al. The influence of mechanical stress on graft healing in a bone tunnel [J]. Arthroscopy, 2002: 18(9): 82-90.
2. Wetzler M, Bartolozzi A, Gillespie M, et al. Revision anterior cruciate ligament reconstruction [J]. Oper Techn Orthop, 1996, 6: 181.
3. Spindler KP, Kuhn JE, Freedman KB, et al. Anterior cruciate ligament reconstruction autograft choice: bone-tendon-bone versus hamstring: does it really matter? A systematic review [J]. Am J Sports Med, 2004, 32(8): 1986.
4. Gorden M, stein M, et al. Anterior cruciate ligament injuries. In: Garrick J (ed) Orthopaedic Knowledge Update: Sports Medicine. American Academy of Orthopaedic Surgeons, Rosemont, 2004: 169-181.
5. Ferretti A, Conteduca F, Monaco E, et al. Revision anterior cruciate ligament reconstruction with doubled semitendinosus and gracilis tendons and lateral extra-articular reconstruction [J]. J Bone Joint Surg Am, 2006, 88(11): 2373-2379.
6. Denti M, Lo Vetere D, Bait C, et al. Revision Anterior Cruciate Ligament Reconstruction: Causes of Failure, Surgical Technique, and Clinical Results [J]. Am J Sports Med, 2008, 36 (10): 1896-1902.
7. Goradia VK. Tendon healing in a bone tunnel. Parts I and II [J]. Arthroscopy, 2003, 19 (1): 111.
8. Shelbourne KD, Carr DR, et al. Meniscal repair compared with meniscectomy for bucket-handle medial meniseal tears in anterior cruciate ligament-reconstructed knees [J]. Am J Sports Med, 2003, 31(5): 718-723.
9. Wickiewicz TL. Revision ACL reconstruction. Instructional course 350. Proceedings of the American Academy of Orthopaedic Surgeons 64th Annual Meeting, San Fran cisco, 1997.
10. 谢旭明. 骨折愈合刺激素的临床疗效观察 [J]. 中华外科杂志 , 1983: (10) : 584-586.

中国知网 https://www.cnki.net

11. Yamakado K, Kitaoka K, Yamada H, et al. The influence of mechanical stress on graft healing in a bone tunnel [J]. Arthroscopy 2002: 18(9): 82-90.
12. Wolf RS, Lemak LA, et al. Revision anterior cruciate ligament reconstruction surgery [J] J South Orthop Assoc, 2002, 1 1(1): 25-32.
13. Benjamin M, Kumai T, Milz S, et al. The skeletal attachment of tendons-tendon "entheses" [J] . Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 2002, 133(4): 931-945.
14. 王永健, 敖英芳, 等. 自体半腱肌腱重建兔 ACL 腱-骨愈合和止点形成实验研究 [J]. 中国运动医学杂志, 2007, l: 5-9.
15. 谢旭明. 骨折愈合刺激素的临床疗效观察 [J]. 中华外科杂志, 1983, (10) : 584-586.
16. 徐寿香, 张昭坤, 沈怕祥, 等. 生葡液注射液生物测定的实验研究 [J]. 中国新药杂志. 1996, 5(2): 134-135.
17. 储春龙. 经皮注射金葡液治疗骨折延期愈合 30 例报告 [J]. 巾医正骨, 2000, 12(4): 36.
18. 孙德舜, 辛跃, 赵志锋. 旋人式带锁髓内针固定金葡液经皮注射治疗肱骨干骨折不愈合 [J]. 中医正骨, 2006, 18(6): 55-56.
19. 王洪厦, 金蔚芳, 高建军. 骨质疏松症防治药物的体外细胞药效评价 [J]. 中国骨质疏松杂志, 1999, 5(2): 58-62.
20. 王连俊, 杨光, 廖威, 等. 高聚生治疗脱骨头无菌坏死的初步观察 [J]. 武警医学院学报 Vol. 12 No.4.
21. 董玲生, 寇丙祯. 金葡液治疗骨囊肿 36 例报告 [J]. 骨与关节损伤杂志, 1999, 14(3): 151.
22. 门洪学, 于波, 门艳艳, 等. 金葡液间盘旁注射治疗腰椎间盘突出症(65 例报告) [J]. 中国矫形外科杂志, 2000, 7(11): 1074-1076.
23. Dohlsten M, Sundstedt A, Bjurklound M, et al. Superantigen-induced cytokines suppress growth of human colon-carcinoma cells [J]. Int J Cancer, 1993, 54(3): 482-488.
24. John A, D'Orazion, George W, et al. Staphylococcal enterotoxin B

中国知网 https://www.cnki.net

activated purified NK cells to secrete IFN-γ but requires T lymphocytes to augment NK cytotoxicity [J]. J Immunol, 1995, 154: 10-14.

25. ChiangYC, Liaow w , Fan CM, et al. PCR detection of Staphylococcal enterotoxins (SEs) N, O, P, Q R, U, and survey of SE types in Staphylococcus aureus isolates from food-poisoning cases in Taiwan [J]. Int J Food Microbiol, 2008, 121(1): 66-73.
26. 刘真真, 林涛, 李光伟, 等. 金黄色葡萄球菌不同培养与反应条件对其血浆凝固酶的影响 [J]. 检验检疫科学. 2005, 15(5): 34-35.
27. 吴从俊等. 骨折愈合刺激素(金葡素)对体外培养成骨细胞的影响 [J] 骨质疏松症康复. 2004, 86(7): 1072-1076.
28. Rodeo SA, Arnoczky SP, Tprzlli PA, et a1. Tendon healing in a bone tunnel-a biomechanical and histological study in the dog [J]. J Bone Joint Surg Am, 1993, 75A(12): 1795-1803.
29. Ntoulia A, Papadopoulou F, et al. Revascularization Process of the Bone-Patellar Tendon-Bone Autograft Evaluated by Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging 6 and 12 Months After Anterior Cruciate Ligament Reconstruction [J]. Am J Sports Med. 2011 Mar 10. [Epub ahead of print].
30. Yoshikawa T, Tohyama H, Katsura T, et al. Effects of local administration of vascular endothelial growth factor on mechanical characteristics of the semitendinosus tendon graft after anterior cruciate ligament reconstruction in sheep [J]. Am J Sports Med, 2006, 34(12): 1918-1925.
31. Max Ekdahl, James H. -C. Wang, Mario Ronga. et al. Graft healing in anterior cruciate ligament reconstruction [J]. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc (2008) 16: 935–947.

中国知网 https://www.cnki.net

文献综述：

前交叉韧带重建术后促进腱-骨愈合的研究进展

李春宝 综述 刘玉杰 审校

摘 要 膝关节前交叉韧带损伤后难以自愈，需手术治疗。前交叉韧带重建后移植肌腱与骨隧道界面的愈合是修复重建的关键，如何促进腱-骨愈合是当前研究的重点和热点。本文通过分析影响腱-骨愈合的因素，对促进移植肌腱与骨髓道组织愈合的方法，如：钙磷生物材料、骨膜包裹移植肌腱、生长因子、骨保护素、物理治疗、炎症反应的生物调控技术、基因治疗、干细胞移植等进展进行了综述。

关键词：腱-骨愈合；前交叉韧带；重建

采用自体腘绳肌腱或自体骨-髌腱-骨移植重建前交叉韧带(Anterior Cruciate Ligament, ACL)均能取得良好的治疗效果。但ACL重建手术后仍有0.7%–10%的患者因移植失败再次发生关节不稳[1-2],其中移植肌腱与骨隧道的愈合即腱-骨愈合是决定重建成败的重要因素之一。

1. 前交叉韧带腱-骨愈合的类型

韧带止点的类型可分为直接止点即纤维软骨止点(Fibro Cartilaginous Entheses)和间接止点即纤维止点(Fibrous Entheses)两种。正常 ACL 属于典型的直接止点，以韧带与骨软骨结合为特点，具有四层特征性结构，即：韧带、非钙化纤维软骨、钙化的纤维软骨和骨组织。在非钙化纤维软骨和钙化纤维软骨区域可见规律的潮线。这种高度分化的止点结构具有缓冲应力，有效降低韧带牵张负荷的作用。间接愈合即在腱-骨界面间形成一层纤维瘢痕组织，胶原机化后形成 Sharpey's 样胶原纤维直接长入骨组织[3]。Sharpey's 纤维与界面强度有关，其数量和大小直接影响移植肌腱的最大失效负荷。ACL 重建后，腱-骨愈合转归将影响移植肌腱强度及膝关节稳定性的维持，其理想止点应与正常 ACL 止点相似。

中国知网 https://www.cnki.net

2. 腱-骨愈合的基本过程

腱-骨愈合过程复杂，可分为三个阶段，即腱-骨界面形成纤维组织连接、新骨形成并向肌腱内长入和局部塑型改造。在此过程中，肌腱在骨髓道内经历坏死、再血管化、胶原纤维爬行替代、塑型并最终韧带化[4]。腱-骨愈合的实质是腱-骨止点的形成，目前认为，此过程难以再现正常止点，以间接愈合为主。有学者认为腱-骨愈合是由间接止点向直接止点逐渐转化的过程。ACL重建后，任何生物环境和生物力学因素的改变都将影响愈合过程。

3. 影响腱-骨愈合的因素

3.1 生物力学因素

3.1.1 腱-骨界面移植肌腱的微动 移植肌腱在骨隧道内的微动包括两种，一是肌腱沿隧道纵轴方向的运动，即“蹦极”效应；二是肌腱垂直于隧道纵轴方向的运动，即“雨刷”效应。研究发现[5]微动不利于移植肌腱与骨隧道的愈合。肌腱固定失效、骨隧道过大、肌腱预张不足、肌腱滑液浸泡、骨质疏松以及术后康复训练过于激进等都可因肌腱微动，影响腱-骨愈合，严重者可导致骨隧道扩大，韧带重建失败。

3.1.2 移植肌腱的固定方式 移植肌腱牢固的固定有利于腱-骨愈合。其固定方法可分为直接固定和间接固定。直接固定是将移植肌腱直接固定于骨，如界面螺钉固定和门形钉固定等。间接固定是将移植肌腱末端固定于骨隧道出口端，如钮扣钢板固定和缝线栓桩固定等。与间接固定相比，直接固定可减少移植肌腱在骨隧道内的“蹦极”效应和“雨刷”效应。Weiler等[6]的研究提示挤压固定可在腱-骨间形成直接愈合，而Li等[7]发现肌腱悬吊固定使腱-骨间倾向于间接愈合。可见，直接固定更利于腱-骨愈合。

3.1.3 肌腱应力分布 隧道内不同部位的愈合情况与移植肌腱的应力分布有关。Yamakado 等[7]将兔趾长伸肌的股骨端切断后植入垂直于胫骨干的骨隧道内，其压应力分布于隧道下部，张应力分布于隧道入口，切应力主要分布于隧道内部。组织学和生物力学实验显示，张应力能够加强腱-骨愈合过程，但过大的张力不利于移植肌腱再血管化；压应力促进软骨形成；切应力

中国知网 https://www.cnki.net

对愈合几乎无影响。

3.1.4 移植肌腱与骨髓道的适配度 Tien等[8]用兔的半腱肌腱重建ACL，骨隧道直径分别取1.5 mm、1.8 mm和2.0mm，移植肌腱平均直径取(1.48±0.12) mm。组织学表明，骨隧道直径越小，腱-骨间胶原纤维越致密成熟；生物力学试验表明，骨隧道直径越小，抗拉强度越大。也有学者研究了不同直径的肌腱在同直径骨髓道中的愈合情况，Nebelung[9]发现在相同直径骨隧道内重建ACL，四股半腱肌腱重建ACL腱-骨愈合程度优于双股半腱肌重建。有报道称，骨隧道与移植肌腱的直径差异不足2.0mm时，对腱-骨愈合无明显影响。

3.2 生物学因素

移植肌腱在骨隧道不同部位的愈合过程有所区别。Berg 等[10]不损伤正常ACL，在股骨和胫骨上做与其平行的隧道，并将骨隧道分为远离关节腔、中间区域和靠近关节腔3个部分。在术后第4周，可见股骨及胫骨隧道远离关节腔部分充满新生骨,靠近关节腔部分仅生成少量新骨；到术后第12周，隧道中间区域也充满了新骨。由此认为肌腱在隧道内的愈合是由隧道远端向关节腔内不断生长的过程，越靠近关节腔腱-骨愈合时间越长，其可能原因是关节内滑液所含的蛋白水解酶、细胞因子、生长因子等对愈合的抑制性作用。

ACL损伤后关节腔内滑液的细胞因子水平随之改变，白介素-1、6、8，肿瘤坏死因子α及前列腺素E_2水平均有增高，而与之相拮抗的白介素-1受体对抗蛋白及转移生长因子β水平却降低，这将提高破骨细胞活性，导致骨溶解，不利于腱-骨愈合。

4. 促进腱-骨交界愈合的方法

自体肌腱移植重建ACL手术成功的关键在于移植肌腱与骨隧道的良好愈合，这也是该领域研究的重点和热点。目前，已知能够促进腱-骨愈合的方法有：钙磷生物材料、骨膜包裹移植肌腱、生长因子、骨保护素、物理治疗、炎症反应的生物调控技术、基因治疗、干细胞移植等。

4.1 钙磷生物材料

磷酸钙作为一种在临床广泛应用的活性生物材料。Mutsuzaki H等[11]通过化学方法使肌腱表面吸附磷酸钙微晶后植入骨隧道，术后第2周移植肌腱部分

中国知网 https://www.cnki.net

区域可见肌腱与新生骨形成直接愈合。Wen等[12]在实验侧腱-骨界面填充磷酸钙骨水泥(Calcium Phosphate Cement，CPC)，术后实验组新生骨组织长入情况及生物力学抗拔出负荷均优于对照组，由此认为CPC能够促进腱-骨愈合。

4.2 骨膜包裹移植肌腱

骨膜内含丰富的间充质干细胞，具有诱导骨化，促进骨组织长入胶原组织的能力。Chen等[13]用骨膜包裹的移植肌腱重建ACL，术后第12周发现实验组肌腱与骨隧道间有纤维软骨形成，其生物力学特性显著优于对照组，可见骨膜对腱-骨愈合有明显促进作用。Youn等[14]通过兔ACL重建模型研究发现，骨膜包裹移植肌腱能增强腱-骨界面组织学结构的完整性。当新鲜骨膜的内面朝向骨隧道时，骨隧道周围新骨形成更活跃，且排列更加规则。Robert等[15]的前瞻性随机研究发现，人ACL重建术中应用自体骨膜可明显降低关节出口处骨隧道的扩大，有助于防止滑液流入骨隧道。

4.3 生长因子

Ma等[16]通过兔ACL重建模型研究了不同剂量基因工程人骨形成蛋白(rhBMP-2)对腱-骨愈合的影响，发现实验组腱-骨愈合程度及生物力学刚度均优于对照组，且腱-骨界面新骨形成及愈合程度具有rhBMP-2剂量依赖性。同时，应用BMPs缓释载体能明显降低骨隧道内的骨吸收。Anderson等[17]在兔腱-骨界面引入骨诱导生长因子，发现术后实验组腱-骨愈合程度优于对照组，且实验组移植肌腱的最大拔出负荷高于对照组，由此证实骨诱导生长因子具有促进腱-骨愈合的作用。Yamazaki等[18]在犬ACL重建骨隧道内局部应用转化生长因子-β (Transforming Growth Factors-β，TGF-β)，术后腱-骨愈合良好，且Sharpey's纤维和新骨生成量显著增加。此外，粒细胞集落刺激因子(Granulocyte Colony-stimulating Factor，G-CSF)可有效增加腱-骨界面血管生成和新骨生成，有助于腱-骨愈合[19]。

4.4 骨保护素

骨保护素(Osteoprotegerin，OPG)又称破骨细胞生成抑制因子(Osteoclastgenesis Inhibitory Factor，OCIF)，可生理性抑制破骨细胞性骨吸收和破骨细胞分化，诱导成熟破骨细胞凋亡。Dynybil等[20]在兔腱-骨间注入一定剂量骨保护素，组织学观察发现术后第3周实验组移植肌腱周围新生骨量较

中国知网 https://www.cnki.net

对照组显著增加，骨隧道周围破骨细胞数较对照组显著减少，骨保护素具有促进腱-骨愈合的作用。

4.5 物理治疗

冲击波(Shock Wave)、低强度脉冲超声波(Low-intensity Pulsed Ultrasound， LIPUS)等物理治疗，可作为无创伤性方法促进腱-骨愈合。Wang等[21]实验发现，冲击波物理治疗能明显提高兔ACL重建术后骨隧道内腱-骨界面的愈合速度，且效果呈时间依赖性。Walsh等[22]研究发现，LIPUS可促进腱-骨界面新骨和纤维软骨的生成及软骨化生，可对腱-骨界面愈合起到明显的促进作用。

4.6 炎症反应的生物调控技术

ACL重建术后，腱-骨界面早期的炎症反应被认为是导致腱-骨界面形成纤维愈合而非骨性愈合的原因之一。Hays等[23]应用氯膦酸盐诱导腱-骨界面巨噬细胞调亡，结果显示术后第2周实验组腱-骨界面炎症反应较对照组明显减轻。术后第4周实验组腱-骨界面间隙明显减少，可见新生骨组织长入移植肌腱内，胶原纤维的连续性和完整性以及生物力学性能均优于对照组。金属蛋白酶(Metalloproteinases，MMPs)在伤口愈合过程中对细胞外基质的重新塑形起重要作用。Demirag等[24]在实验侧膝关节内注入α_2-巨球蛋白。术后发现膝关节滑液中金属蛋白酶含量显著下降，腱-骨界面组织学形态更为成熟，Sharpey's纤维更多，并且拔出负荷明显提高。由此证明α_2-巨球蛋白能够阻断关节滑液内基质金属蛋白酶，发挥促进腱-骨交界愈合的作用。

4.7 基因治疗

利用基因工程促进腱-骨愈合具有很大的发展前景，是当前研究的热点之一。Martinek等[25]实验组体外用携带荧光素酶和BMP-2基因的腺病毒载体(AdBMP-2)或腺病毒-牛乳糖酶(AdLacZ)转染兔的半腱肌腱。ACL重建术后腱-骨界面成骨细胞活跃，可见直接愈合结构，而对照组则为间接愈合。基因转染技术能够赋予靶细胞某些特定活性，使特定的生长因子能在一定时期持续而稳定地释放。Lattermann等[26]利用此技术可使生长因子在腱-骨界面局部释放长达4周。这为腱-骨愈合提供了更好的微环境。

4.8 干细胞移植

中国知网 https://www.cnki.net

随着组织工程学的发展，骨髓间充质干细胞(Bone Mesenchymal stem Cells，BMSCs)也被引入到腱-骨愈合研究中。Lim等[27]在移植肌腱表面涂一层富含BMSC的纤维蛋白胶。术后第8周可见一条成熟的软骨带逐渐长入移植肌腱，其组织学特征类似于兔正常ACL末端结构，且生物力学强度显著高于对照组。Soon MY等 [28]研究了BMSC对异体肌腱腱-骨愈合的作用，发现实验组组织愈合情况和生物力学特性均优于对照组。上述研究提示BMSC具有促进腱-骨界面组织愈合，提高界面生物力学的特性。

4.9 组织工程

Chen等[29]以聚乙二醇二丙烯酸酯聚合物(Poly-ethyleneglycol Diacrylate，PEGDA)为支架材料，骨膜祖细胞(Periosteal Progenitor Ceils，PPCs)为种子细胞，BMP-2为生长因子构建生物工程组织。通过光固化技术将上述3种成分制成一种可注射性水凝胶。在兔胫骨近端建立骨隧道并将自体肌腱置入后，将水凝胶注入骨隧道内。组织学结果发现，术后第3周和第6周实验组腱-骨界面组织学愈合程度均优于对照组，可见更多的Sharpey's纤维、新骨组织和纤维软骨连接形成。同时，实验组移植肌腱的抗拔出力较对照组显著增高。Spalazzi等[30]用一种新型三相构建支架材料模拟正常腱-骨界面，第一相种植成纤维细胞，中间相种植软骨细胞，第3相种植成骨细胞。裸鼠实验表明，以上3种细胞在支架内相互反应良好，并形成明显的矿化纤维软骨样组织。宿主组织成功长入工程材料内，并在软组织与骨之间形成一种具有再生功能的界面组织。实验证明将此人工界面组织填充于腱-骨界面，可促进骨向移植肌腱内长入，利于腱-骨愈合。

5. 展望

近年来，腱-骨愈合研究取得了许多可惜的进展。这些方法均具有各自的特性及局限性，且多数尚处于动物实验阶段。例如，如何最大限度发挥骨膜内多能干细胞的活性；如何明确生长因子局部应用的有效剂量，并保证其持续发挥作用；如何保证骨髓间充质干细胞在腱-骨界面存留，并进一步明确其发挥作用的具体机制； CPC材料降解过慢及其低孔隙率是否会对腱-骨愈合产生不利影响；不同炎症细胞和细胞因子在腱-骨愈合过程中的具体作用以及

中国知网 https://www.cnki.net

生物调控中最佳的靶细胞或靶因子是什么等。他们的作用机理及相关方法仍需进一步研究。基因技术及组织工程的应用可能是今后腱-骨愈合领域研究的热点。

中国知网 https://www.cnki.net

参考文献

1. Wetzler M, Bartolozzi A, Gillespie M, et al. Revision anterior cruciate ligament reconstruction [J]. Oper Techn Orthop, 1996, 6: 181.
2. Spindler KP, Kuhn JE, Freedman KB, et al. Anterior cruciate ligament reconstruction autograft choice: bone-tendon-bone versus hamstring: does it really matter? A systematic review [J]. Am J Sports Med, 2004, 32(8): 1986.
3. Yoshiya S, Nagano M, Kurosaka M, et al. Graft healing in the bone tunnel in anterior cruciate ligament reconstruction [J]. Clin Orthop Relat Res 2000, (376): 278 –286.
4. D J Deehan: T E Cawston, et al. The biology of integration of the anterior cruciate ligament [J]. Journal of Bone and Joint Surgery: Jul 2005, 87(7): 889.
5. Howell S M, Roos P, Hull M L, et al. Compaction of a bone dowel in the tibial tunnel improves the fixation stifhess of a soft tissue anterior cruciate ligament graft: an in vitro study in calf tibia [J]. Am J Sports Med, 2005, 33(5): 719-725.
6. Weiler A, Hoffmann R F, Bail H J, et al. Tendon healing in a bone tunnel. Part II: Histologic analysis after biodegradable interference fit fixation in a model of anterior cruciate ligament reconstruction in sheep [J]. Arthroscopy, 2002, 18(2): 124-135.
7. Yamakado K, Kitaoka K, Yamada H, et al. The influence of mechanical stress on graft healing in a bone tunnel [J]. Arthroscopy, 2002, 18(1): 82-90.
8. Tien YC, Chih HW, Cheng YM, el a1. The influence of the gap size on the interfacial union between the bone and the tendon [J]. Kaohsiung Med Sci, 1999, 15(10): 581-588.
9. Nebelung W, Becker R, Merkel M, et al. Bone tunnel enlargement after anterior cruciate ligament reconstruction with semitendinosus tendon using Endobutton fixation on the femoral side [J]. Arthmscopy, 1998, 14(8):

中国知网 https://www.cnki.net

810-815.

10. Berge E E, Pollard M E, Kang Q, et al. Interarticular bone tunnel healing [J]. Arthroscopy, 2001, 17(2): 189-195.
11. Mutsuzaki H, Sakane M, Hattor S, et al. Firm anchoring between a calcium phosphate-hybridized tendon and bone for anterior cruciate ligament reconstruction in a goat model [J]. Bio med Mater, 2009, 4: 45.
12. Wen C Y, Qin L, Lee K M, et al. The use of brushite calcium phosphate cement for enhancement of bone-tendon integration in an anterior cruciate ligam ent reconstruction rabbit model [J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2009, 89B(2): 466-474.
13. Chen C H, Chen W J, Shih C H, et al. Enveloping the tendon graft with pefiosteum to enhance tendon-bone healing in a bone tunnel: A biomechanical and histologic study in rabbits [J]. Arthroscopy, 2003, 19 (3): 290-296.
14. Youn I, Jones D G, Andrews P J, et al. Periosteal augmentation of a tendon graft improves tendon healing in the bone tunnel [J]. Clin Orthop Relat Res, 2004, (419): 223-231.
15. Robert H, Es-Sayeh J, et al. The role of periosteal flap in the prevention of femoral widening in anterior crueiate ligament reconstruction using hamstring tendons [J]. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2004, 12 (1): 30-35.
16. Ma C B, Kawamura S, Deng X H, et al. Bone morphogenetic proteins-'signaling plays a role in tendon--to--bone healing: a study of rhBMP-2 and noggin [J]. Am J Sports Med, 2007, 35 (4): 597-604.
17. Andemon K, Seneviratne A M. lzawa K, et al. Augmentation of tendon healing in an intra-articular bone tunnel with use of a bone growth factor [J]. Am J Sports Med, 2001, 29(6): 689-698.
18. Yamazaki S, Yasuda K, Tomita F, et al. The effect of transforming growth factor-betal on intraosseous healing of flexor tendon autograft replacement

中国知网 https://www.cnki.net

of anterior eru eiate ligament in dogs [J]. Artbruscopy, 2005, 21(9): 1034-1041.

19. Sasaki K, Kuroda R. Ishida K, et al. Enhancement of tendon-bone osteointegration of anterior cruciate ligament graft using granulocyte colony-stimulating factor. Am J Sports Med, 2008, 36(8): 1519-1527.
20. Dynybil C. Kawarnura S. Kim H J, et al. The effect of osteoprotegerinon tendon-bone healing after reconstruction of the anterior cruciate ligament: a histomorphological and radiographical study in the rabbit [J]. Z Orthop Ihre Grenzgeb, 2006, 144(2): 179-186.
21. Wang C J, Wang F S, Yang K D, et al. The effect of shock wave treatment at the tendon-bone interface-all histomorphological an dbiomechanical study in rabbits [J]. J Orthop Res, 2005, 23 (2): 274-280.
22. Walsh W R, Stephens P, Vizesi F, et al. Efects oflow-intensity pulsed ultrasound on tendon --bone healing in all intra-articular sheep knee mode1 [J]. Arthroscopy, 2007, 23(2): 197-204.
23. Hays P L, Kawarnura S, Deng X H, et al. The role of macrophages in early healing of a tendon graft in a bone tunne1 [J]. J Bone Joint Surg Am, 2008, 90 (3): 565-579.
24. Demirag B, Sarisozen B, Ozer O, et a1. Enhancement oftendon-bone healing of anterior cruciate ligament grafts by blockage of matrix metallopmteinases [J]. J Bone Joint Surg Am, 2005, 87 (11): 2401-2410.
25. Martinek V, Latterman C, Usas A, et a1. Enhancement of tendon-bone integration of anterior cruciate ligament grafts with bone morphogenetic protein-2 gene transfer: a histological and biomechanic study [J]. J Bone Joint Surg Am, 2002, 84(7): 1123-1131.
26. Lattermann C, Zelle B A, Whalen J D, et a1. Gene transfer to the tendon-bone insertion site [J]. Knee Surg Sports Traumatol Arthrose, 2004, 12(5): 510-515.
27. Lim J K, Hui J, Li L, et a1. Enhancement oftendon graft osteoin- tegration

中国知网 https://www.cnki.net

using mesenchymal stem cells in a rabbit model of anterior crueiate ligament reconstruction [J]. Arthroscopy, 2004, 20 (9): 899-910.

28. Soon M Y, Hassan A, Hui J H, et a1. An analysis of soft tissue allograft anterior cruciate ligament reconstruction in a rabbit m0del: a short-term study of the use of mesenchymal stem cells to enhance tendon osteointegration [J]. Am J Sports Med, 2007, 35 (6): 962-971.
29. Chen C H, Liu H W, Tsai C L, et al. Photoencapsulation of bone morphogenetic protein-·2 and periosteal progenitor cells improve tendon-bone healing in a bone tunne1 [J]. Am J Sports Med, 2008, 36(3): 461-473.
30. Spalazzi J P, Dagher E, Doty S B, et a1. In vivo evaluation of a multiphased scafold designed for orthopaedic interface tissue engineering and soft tissue-to-bone integration [J]. J Biomed Mater Res A, 2008, 86 (1): 1-12.

中国知网 https://www.cnki.net

攻读学位期间发表文章

1. 关节镜下 Fast-Fix 缝合装置在半月板损伤修复中的应用[J]. 军医进修学院学报 2010, 10: 961-963.
2. ACL 重建术后影响腱-骨愈合的因素[J].军医进修学院学报 2009, 5: 622-623.
3. 咪达唑仑诱导下兔手术全麻效果的实验观察与研究[J]. 武警医学杂志 2011, 5.

参 编 论 著

1.《实用关节镜手术学》第二版 刘玉杰主编.人民军医出版社，2011.1

2.《关节疾病微创治疗与康复》 刘玉杰主编.人民军医出版社，2010.9

3.《关节镜新技术与研究》 刘玉杰主编

参 加 会 议

2011、2009 国际骨科运动医学与关节镜外科高峰论坛

2010 年第二届亚洲关节镜学术大会(AAC) (英文大会发言) 2010. 09.10

2010 年首届武警部队关节镜技术学习班 (大会发言) 2010.10.23

2010 年北京地区关节镜年会 (大会发言) 2010.12.10

2010 第三届创伤骨科研讨大会

2009 亚洲人工关节协会年会(APAS)

2009 中国国际脊柱外科论坛

2009 第八届国际关节软骨韧带修复与重建大会(ICRS)

2009 年北京地区关节镜年会暨华北地区关节镜与运动医学学组成立大会

2008、2009 中华医学会骨科学会大会(COA)

2008 脊柱脊髓损伤大会(SCI)

中国知网 https://www.cnki.net

致　谢

硕士研究生学习时光转瞬即逝，在导的师辛勤培养与严格要求下，我顺利完成研究生课题，值此论文完成之际，首先向导师刘玉杰教授致以最崇高的敬意和最衷心的感谢！

三年前，我有幸成为刘玉杰教授的学生，这是我人生最重要的转折与机遇；三年来，导师对我的成长倾注了大量的心血与汗水。他始终言传身教，以宽仁的胸怀，踏实的作风和谦逊的态度，教我如何做人做事；以高尚的医德，丰富的经验和精湛的技术，教我如何做一名合格的外科医生；更以一丝不苟、精益求精和勇于创新的态度激励我勤奋学习，踏实工作，迎难而上，勇于争先。这些都将使我受益终身！不仅如此，每当在学习、工作和生活中遇到困难，导师总会给予我最大的鼓励与帮助。在读期间，师母丁俊芝女士对我的学业和生活给予了无微不至的关心和照料，在此深深感谢！

李众利主任、王志刚主任、蔡胥主任、魏民主任在课题研究和临床实习中给予了悉心指导与热情帮助，在此表示衷心感谢！骨研所张莉主任，赵斌和睢翔等老师在试验中提供了巨大帮助，在此表示深深的感谢！张明学总护士长、董晓燕护士长，以及科室全体护理教员也对学业给予了很大的关心与帮助，在此表示衷心感谢！

周密、王宁、齐玮、薛静、王明新、李志超、周预、邬晓勇、王俊良、李海峰、石斌、王晓、陈旭、何蔚、李光辉、袁伟、李海鹏、杨玉明、宋立坤、王琪、傅仰木等师兄弟以及朱娟丽教员和刘洋技师在学习、工作和实验中给予了大量帮助，在此表示感谢！

感谢我的父亲、母亲、叔叔、婶婶、兄弟姐妹和所有亲人，无论身在何方，他们总是给予我最大的支持与最无私的关爱，这使我能够心无旁骛地将全部精力投入到学业之中，您们的恩情我终生无以为报。

感谢所有关心、支持和帮助过我的人，祝愿您们心想事成，幸福安康！

中国知网 https://www.cnki.net