·基础研究·

金葡素促进兔前交叉韧带重建后腱骨愈合的实验研究

李春宝[1]，薛超[1]，齐玮[1]，王宁[1]，薛静[2]，邬晓勇[1]，朱娟丽[1]，刘洋[1]，刘玉杰[1]
（1.中国人民解放军总医院骨科，北京　100853；2. 中国人民解放军空军总医院，北京　100036）

【摘要】 目的：探讨兔膝关节前交叉韧带（ACL）重建后，金黄色葡萄球菌滤液制剂（金葡素）对移植肌腱与骨隧道愈合的作用。方法：将 3 月龄新西兰大白兔 24 只（体重平均 2.56 kg，雌雄不限）随机分为实验组和空白对照组，每组 12 只。采用兔自体趾长伸肌腱建立膝前交叉韧带重建后的腱骨愈合模型。实验组分别于术中及术后第 2 天向胫骨端腱骨界面处缓慢均匀注射金葡素 0.1 ml，对照组以相同时间和方法注射等量 0.9% NaCl 注射液。术后双膝不予制动，以青霉素注射液 80 万 U/d 连续肌肉注射 3 d。分别于术后 4、8 和 12 周各处死动物 8 只，完整获取腱骨愈合标本并分别进行组织学分析，肉眼观察判断 ACL 重建大体情况，苏木精-伊红染色进行 Yamakado 腱骨界面组织形态分型评价，苦味酸-天狼猩红染色观察腱骨界面胶原纤维情况，血管内皮生长因子免疫组化染色定量评价腱骨界面再血管化情况，甲苯胺蓝染色定量评价腱骨界面新骨生成情况。结果：大体观察显示全部动物术后伤口Ⅰ期愈合，关节功能恢复良好，未见感染、死亡及金葡素注射不良反应。腱骨界面形态学分型结果显示术后各时间点实验组腱骨界面愈合质量均优于对照组（$P<0.05$））。苦味酸-天狼猩红染色显示实验组胶原纤维术后 4 周生成少，8 周大量生成，12 周 Sharpey 纤维有序排列，集结成束，各时间点胶原纤维生成情况均优于对照组。基于血管内皮生长因子免疫组化染色和甲苯胺蓝染色的定量分析显示实验组术后 4、8 和 12 周腱骨界面新生血管面积和新骨生成面积均高于对照组（$P<0.05$）。结论：金葡素能够在葡萄球菌肠毒素 C 等多种明确成分的协同作用下，通过局部启动无菌性炎症反应，加快腱骨界面血管生成和血液供应，激活骨细胞和纤维细胞大量增殖，有效促进兔 ACL 重建后腱骨愈合，有望成为促进 ACL 重建后腱骨愈合的新的临床方法。

【关键词】 金黄色葡萄球菌；　前交叉韧带重建；　腱；　骨再生；　兔
DOI：10.3969/j.issn.1003-0034.2017.06.011

Experimental study on staphylococcal enterotoxin promoting tendon-bone healing after reconstruction of anterior cruciate ligament in rabbits

LI Chun-bao, XUE Chao, QI Wei, WANG Ning, XUE Jing, WU Xiao-yong, ZHU Juan-li, LIU Yang, and LIU Yu-jie. *Department of Orthopaedics, General Hospital of PLA, Beijing* 100853, *China*

ABSTRACT **Objective**: To explore highly agglutinative staphylococcin (HAS) pomoting on tendon-bone healing after reconstruction of anterior cruciate ligament (ACL) in rabbits. **Methods**: Animal model of ACL reconstruction in 24 mature New Zealand white rabbits (3 months, 2.56 kg on average, either gender) were established using autologous digital long extensor tendon and randomly classified into 2 groups (HAS and control group), 12 rabbits for each group. HAS group was separately injected 0.1ml highly agglutinative staphylococcin immediately into tendon-bone interface during the operation and 2 days after operation. Control group was injected with the same dose of physiological saline for 3 days. All animals were sacrificed at 4, 8, and 12 weeks after operation for histological examinations. The specimens were stained with hematoxylin-eosin, picric acid-sirius red, VEGF immunohistochemistry stain, and toluidine blue to histologically analysis the total pathology changes of the tendon-bone healing tissue, the tendon bone interface morphology classification, hyperplasia and arrangement of collagen fiber, vascularization and new bone formation, respectively. **Results**: The Yamakado morphological interface results showed that the tissue healing at tendon-bone interface of the HAS group was better than that of the control group. The histological examination revealed that on the 4th week after operation, the tendon-bone interface of HAS group was filled with fibrous connective tissue. The proliferated fibroblasts, chondroblasts and the angiogenesis were rich. On the 8th week after operation, the healing tissue at the bone-tendon interface had developed into dense connective tissue, the neo-vessels were very rich, the collagen fibers were formed abundantly, some Sharpey's fibers spanning parts of the tendon-bone interface. On the 12th week after operation, the

基金项目：全军后勤科研项目（编号：CWS14J067）；全军医学科技青年培育孵化项目（编号：15QNP075）
Found program: Military Logistic Research Project (No. CWS14J067)
通讯作者：刘玉杰　E-mail：13701356381@163.com
Corresponding author: LIU Yu-jie　E-mail: 13701356381@163.com

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

transition zones were full of Sharpey's fibers; the neo-vessels were not as much as the 8th weeks, but new bone formation was further increased and immature fibrocartilage appeared. For quantitative histological analysis at 4, 8 and 12 weeks after operation, the proportion of neo-vessel area and the area of now bone formation of the HAS group were all significantly higher than those of the control group ($P<0.05$). **Conclusion**: Under the synergy of staphylococcal enterotoxin C and other active? ingredients, Highly Agglutinative Staphylococcin can significantly improve the tendon-bone healing after ACL reconstruction in rabbit knees, which is expected to be a new method to improve the clinical results of ACL reconstruction.

KEYWORDS Staphylococcus aureus; Anterior cruciate ligament reconstructions; Tendon; Bone Regeneration; Rabbits

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2017, 30(6): 538-544 www.zggszz.com

前交叉韧带（Anterior cuciate ligament, ACL）损伤发病率逐年递增且难以自愈。关节镜下自体腘绳肌腱移植重建 ACL 已成为治疗该损伤的标准手术，手术成功的关键在于术后移植肌腱与骨隧道的良好愈合即腱骨愈合[1-3]，这也是运动医学研究的热点与难点。金黄色葡萄球菌滤液制剂（金葡素，highly agglutinative staphylococcin, HAS）是受骨髓炎病理机制启发，从金黄色葡萄球菌代谢产物中提取的一种无菌性淡黄或无色澄明液体，属国家一类新药［(94)卫药证字 S-08 号］。临床工作中发现该药能够有效促进骨折愈合和长入[4]。因此能否充分利用其生物学特性，提高 ACL 重建手术后的腱骨愈合效果，成为一个值得探讨的问题。本研究拟通过组织学研究探讨 HAS 对 ACL 重建术后腱骨愈合的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

选取 3 月龄健康新西兰大白兔 24 只（解放军总医院实验动物中心），体重平均 2.56 kg（2.34~2.87 kg），雌雄不限，术前膝关节前抽屉试验均阴性，随机分为 2 组，即实验组（HAS 组）和空白对照组（0.9% NaCl 注射液组），每组 12 只（24 个膝关节）。实验动物及实验方案均通过伦理委员会审核。

1.2 实验仪器和试剂

实验仪器：生物显微镜（日本 Olympus, BX51），数码照相设备（日本 Olympus, DP70），病理切片机（德国莱卡, RM2235），组织包埋机（天津爱华医疗, BMJ-1），图像分析软件（美国 Media Cybernetics, Silver Spring, Image-Pro Plus 5.0）。实验试剂：金黄色葡萄球菌滤液制剂（沈阳协合集团，国药准字 S19990010），0.9%NaCl 注射液（双鹤药业，国药准字 H34023609），亚甲蓝注射液（江苏济川制药，国药准字 H32024827），青霉素注射液（民生药业，国药准字 H33022217），兔血管内皮生长因子抗体（美国 Biovision 公司，批号 5363-100），苏木素-伊红染色剂（北京索莱宝科技有限公司，G1120），苦味酸-天狼猩红染色剂（河北保定市凌业商贸有限公司，4366548），甲苯胺蓝染色剂（河北保定市凌业商贸有限公司，89640）。

1.3 模型建立

24 只新西兰大白兔均术前双膝备皮，速眠新 II 注射液与盐酸氯胺酮注射液以 1/2 体积分数配比（0.2 ml/kg）肌肉注射麻醉[5]成功后常规消毒，取膝关节髌骨旁内侧缘做一纵行切口，髌骨外翻脱位，暴露 ACL 并切断，查前抽屉及 Lachman 试验阳性。分离趾长伸肌腱，完整保留其股骨端附着处，统一肌腱平均长度 4.0 cm，直径 0.2 cm，从远端切断，肌腱断端以 4-0 Ethibond 线编织缝合。以直径 0.2 cm 的钻分别经 ACL 解剖走行建立股骨、胫骨隧道，导针牵引移植肌腱依次通过股骨隧道、髁间窝、胫骨隧道，拉紧并于出口处紧贴隧道外口打结，以此作为术后注药的定位点。在胫骨嵴建立骨桥，于膝关节屈曲 30°位在骨桥上打结固定肌腱。经查移植肌腱固定牢固，髁间窝无撞击，ACL 重建模型完成。对侧膝关节以同样方法进行重建。

1.4 干预措施

实验组在术中肌腱固定前向骨隧道内缓慢滴注 HAS，同时将其均匀涂抹于移植肌腱，使药物充分侵润。分别于术中肌腱固定成功后及术后第 2 天在麻醉状态下向胫骨隧道内缓慢均匀注射金葡素 0.1 ml。对照组以相同方法用等量 0.9% NaCl 注射液进行干预。术后双膝关节无菌敷料包扎，不予制动，在动物实验中心饲养，以青霉素注射液 80 万 U/d 连续肌肉注射 3 d，每天检查伤口及一般情况。每组分别于术后 4、8、12 周以安乐死处死 4 只兔，获取 8 个膝关节标本。完整保留胫骨端骨隧道及移植肌腱，以 10%甲醛溶液固定 72 h，10% EDTA 磷酸缓冲液脱钙，石蜡包埋，于胫骨隧道中段靠近远端处切片，行苏木精-伊红（HE）、苦味酸-天狼猩红、甲苯胺蓝和血管内皮生长因子（VEGF）免疫组化染色。

1.5 检测项目与方法

分别对术后 4、8、12 周的动物标本进行组织学分析：（1）大体观察：包括术后膝关节整体情况及重建 ACL 的形态、颜色、张力、滑膜覆盖情况及隧道口封闭情况。（2）腱骨界面组织形态分型：在 HE 染色

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

基础上，采用 Yamakado 等[6]分型方法进行腱骨界面组织形态分型评价（腱骨分离、疏松结缔组织连接、Sharpey's 纤维连接和直接连接 4 类，同一标本上如发现上一种界面形态则归于上一类）。(3)腱骨界面胶原纤维情况：通过苦味酸-天狼猩红染色，观察腱骨界面Ⅰ、Ⅲ型胶原纤维增生和排列分布情况。(4)腱骨界面再血管化情况：基于 VEGF 免疫组化染色，每一标本随机取 5 个部位进行观测，在 20 倍放大视野、同一曝光条件下照相，计算新生血管面积与视野面积的比值，以此评价腱骨界面再血管化情况。(5)腱骨界面新骨生成情况：基于甲苯胺蓝染色，将标本中移植肌腱置于视野中央，以 20 倍放大视野下、同一曝光条件下照相，测量视野中 1 mm^2 区域内的新骨量，每一标本随机选取 5 个区域测量，以此评价腱骨界面新骨生成情况。以上使用生物显微镜（BX51，Olympus，Japanese）观测，应用 Image-Pro Plus 5.0 图形分析软件进行图像分析。

1.6　统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析，计量数据均以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）形式表示，Yamakado 腱骨界面形态学分型采用等级资料秩和检验进行统计，新生血管面积所占比例和新骨生成面积等计量数据采用 *Student t* 检验进行统计学分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　大体观察

全部动物术后伤口Ⅰ期愈合，关节功能恢复良好，无感染及死亡。取材前行双膝关节稳定性检查，前抽屉试验和 Lachman 试验均为阴性。部分膝关节可见轻微滑膜炎症和少量关节积液，考虑为手术本身所致。各时间点动物膝关节半月板及关节软骨未见明显磨损，移植肌腱连续性完整，组织弹性好，未见金葡素注射导致的不良反应。

2.2　腱骨界面组织形态分型

对照组术后 4 周移植肌腱与骨隧道边界清晰，以疏松结缔组织填充，部分标本为腱骨分离形态（图 1a）；8 周移植肌腱与骨隧道连接较为紧密（图 1b）；12 周腱骨界面连接紧密，可见 Sharpey 纤维连接（图 1c）。实验组术后 4 周腱骨界面间由大量疏松结缔组织填充，主要成分为成纤维细胞和炎性细胞（图 1d）；8 周腱骨界面已形成致密的结缔组织连接，炎性细胞逐渐消失（图 1e）；12 周已形成以 Sharpey 纤维为标志的间接连接，1 个标本出现典型的直接连接（图 1f）。

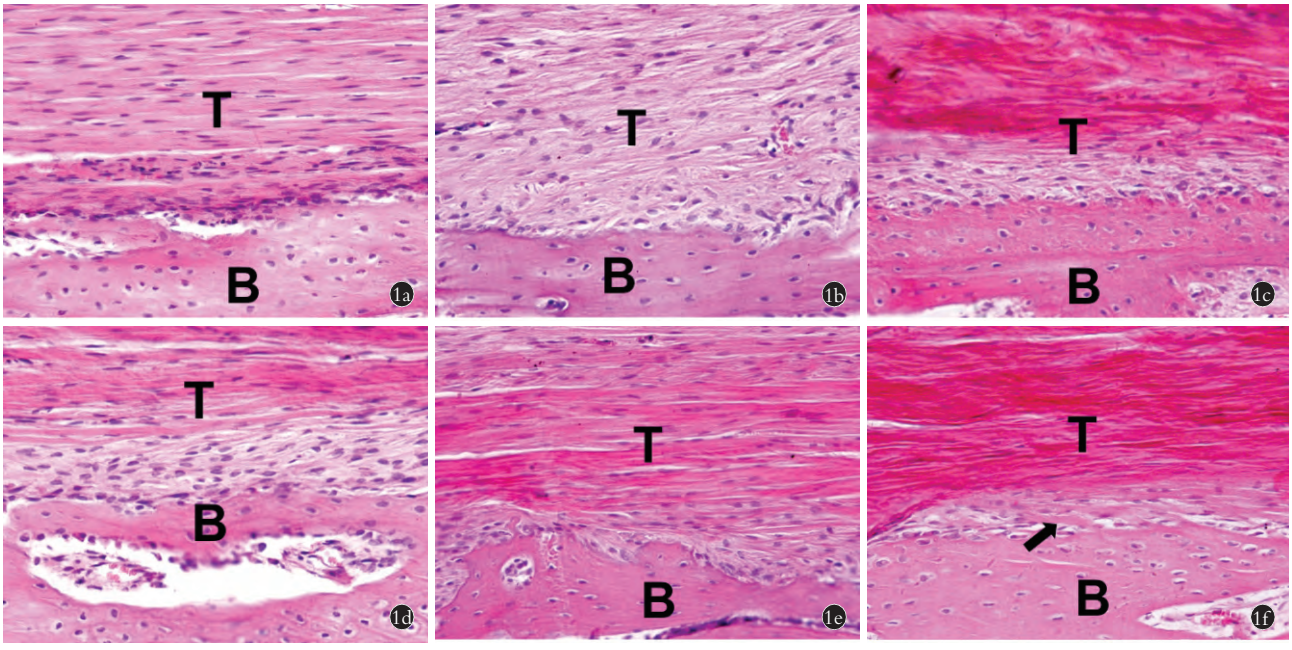


图 1　腱骨界面的光镜下组织形态表现（HE×40）　1a. 术后 4 周对照组移植肌腱与骨隧道边界清晰　1b. 术后 8 周对照组移植肌腱与骨隧道间的纤维结缔组织连接较为紧密　1c. 术后 12 周对照组界面间可见 Sharpey 纤维连接　1d. 术后 4 周实验组移植肌腱与骨隧道纤维结缔组织连接较为紧密　1e. 术后 8 周实验组界面间可见致密的结缔组织相连接　1f. 术后 12 周实验组界面间已形成典型的 Sharpey 纤维间接连接（箭头所示）

Fig.1　Histomorphology of tendon-bone interface under microscopic (HE×40)　**1a.** Loss connective tissue formed at 4 weeks after operation　**1b.** Comparatively dense connective tissue on the interface at 8 weeks after operation　**1c.** Comparatively dense and mature connective tissue formed at 12 weeks after operation　**1d.** Comparatively dense connective tissue formed at 4 weeks after operation　**1e.** Dense and mature connective tissue formed at 8 weeks after operation　**1f.** Typical Sharpey like indirect connection formed at 12 weeks after operation (arrow)

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

术后 4、8、12 周实验组腱骨界面的结缔组织连接、纤维连接和直接连接的膝关节标本数量均多于对照组(P<0.05)。提示实验组腱骨界面愈合质量优于对照组。见表 1。

2.3　腱骨界面胶原纤维情况

对照组术后 4 周胶原纤维生成少(图 2a);8 周胶原纤维生成增多,排列尚不规则,部分标本可见少量疏松无序的 Sharpey 样纤维(图 2b);12 周可见 Sharpey 纤维连接(图 2c)。实验组术后 4 周胶原纤维生成少,可见大量成纤维细胞分布其间(图 2d);8 周胶原纤维大量生成,排列规则,可见部分 Sharpey 样纤维长入新生骨组织(图 2e);12 周 Sharpey 纤维集结成束,在腱骨界面间密集有序排列(图 2f)。

2.4　腱骨界面再血管化情况

对照组术后 4 周血管生成尚不明显,零星可见血管样结构(图 3a);8 周新生血管的数量和面积明显增加(图 3b);至 12 周新生血管面积和数量有所减少(图 3c)。实验组术后 4 周可见新生血管密集分布(图 3d);8 周新生血管清晰可见,数量和面积显著增加(图 3e);至 12 周新生血管仍较丰富,但较 8 周有所减少(图 3f)。

实验组腱骨界面新生血管所占比例在术后 4、8 和 12 周均高于对照组(P<0.05)。实验组在 8 周血管面积所占比例最大,到 12 周有所减少。见表 2。

2.5　腱骨界面新骨生成情况

对照组术后 4 周移植肌腱靠近骨隧道侧可见成

表 1　两组兔术后不同时间点 Yamakado 腱骨界面形态学分型膝关节标本数量结果对比(个)

Tab.1　Yamakado morphligical interface results of each group at different intervals (individual)

组别	兔数	术后时间	直接连接	纤维连接	结缔组织连接	腱骨分离	U 值	P 值
对照组	8	4 周	0	0	5	3		
		8 周	0	1	5	2		
		12 周	0	5	3	0		
实验组	8	4 周	0	1	6	1	1.988	<0.05*
		8 周	0	5	3	0	2.297	<0.05#
		12 周	1	6	1	0	2.017	<0.05&

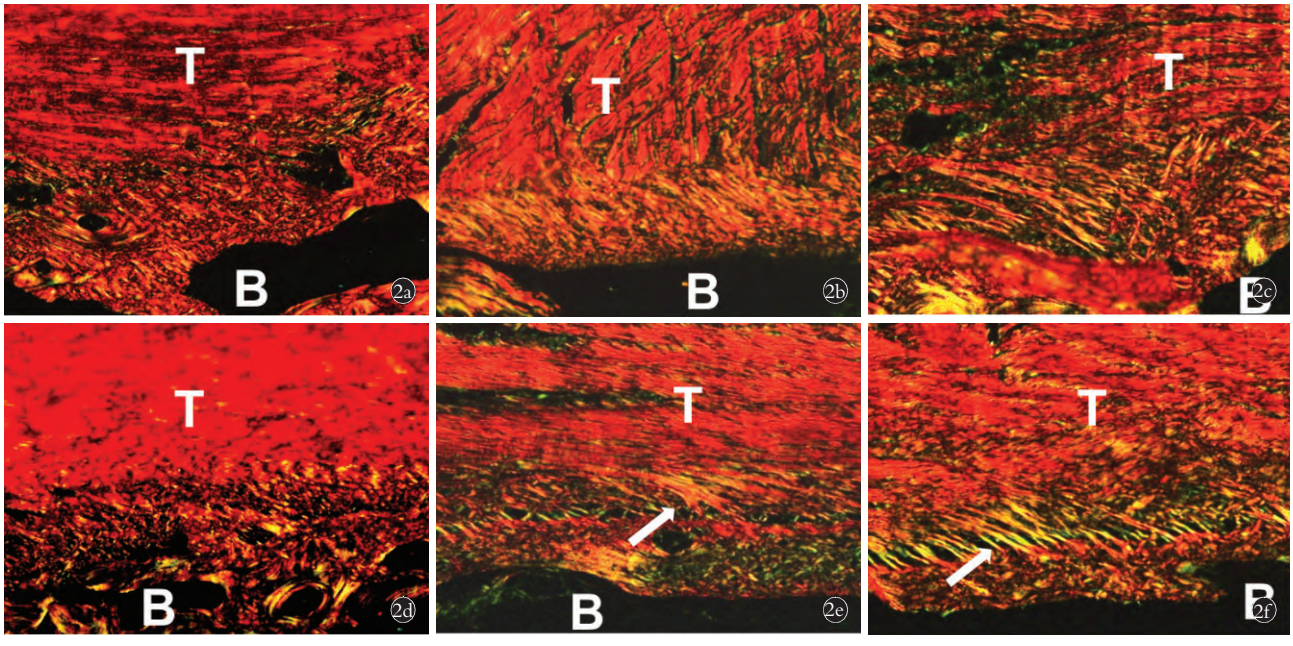


图 2　腱骨界面的光镜下组织形态表现(苦味酸-天狼猩红染色×20)　2a. 对照组术后 4 周腱骨界面间胶原纤维含量较少　2b. 对照组术后 8 周界面间胶原纤维合成增多、排列尚不规则　2c. 对照组术后 12 周腱骨界面可见 Sharpey 纤维连接　2d. 实验组术后 4 周腱骨界面间可见大量成纤维细胞　2e. 实验组术后 8 周腱骨界面间胶原纤维大量生成　2f. 实验组术后 12 周腱骨界面间 Sharpey 纤维密集有序排列

Fig.2　Histomorphology of tendon-bone interface under microscopic (Picric acid-sirius red×20)　**2a.** Few collagen fibers appeared at 4 weeks after operation　**2b.** Proliferated fibroblasts was rich at 8 weeks after operation　**2c.** Sharpey fibers appears 12 weeks after operation　**2d.** Many proliferated fibroblasts can be observed at 4 weeks after operation　**2e.** Collagen fibers formed abundantly at 8 weeks after operation　**2f.** Sharpey fibers formed abundantly and ordered arrangement at 12 weeks after operation

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 2　两组术后不同时间兔移植肌腱周围新生血管所占比例对比($\bar{x}\pm s$, %)

Tab.2　Comparison of circum-graft new vessles proportion between two groups at different intervals at different times after operation($\bar{x}\pm s$, %)

组别	兔数	4 周	8 周	12 周
对照组	8	8.00±0.04	26.00±0.05	20.00±0.10
实验组	8	27.00±0.12	48.00±0.11	41.00±0.12
t 值	–	4.249	5.150	3.803
P 值	–	0.000 8	0.000 1	0.001 9

表 3　两组术后不同时间兔移植肌腱周围新骨形成面积对比($\bar{x}\pm s$, mm^2)

Tab.3　Comparison of circum-graft new bone areas between two groups at different intervals at different times after operation($\bar{x}\pm s$, mm^2)

组别	兔数	4 周	8 周	12 周
对照组	8	0.15±0.12	0.24±0.05	0.33±0.10
实验组	8	0.27±0.05	0.41±0.11	0.48±0.12
t 值	–	2.611	3.979	2.716
P 值	–	0.020 5	0.001 4	0.016 7

软骨细胞(图 4a);8 周可见大量成骨细胞,新骨生成活跃 (图 4b);12 周新骨大量生成并包绕移植肌腱(图 4c)。实验组术后 4 周移植肌腱周围可见大量成软骨细胞,部分区域可见软骨移行带(图 4d);8 周成骨明显丰富, 新骨组织有包围肌腱并向内侵入的趋势(图 4e);12 周新骨生成进一步增加,包绕移植肌腱,成骨细胞数量有所减少,可见不成熟的纤维软骨(图 4f)。

两组腱骨界面新骨生成面积比较结果见表 3。实验组移植肌腱周围新骨生成面积在术后 4、8、12 周均大于对照组(P<0.05)。

3　讨论

ACL 重建术后移植肌腱与骨隧道的愈合即腱骨愈合是影响手术效果的最重要因素之一, 但研究显示腱骨愈合失败的概率高达 8%[1]。为此,学者们尝试了多种中西医方法,如三七总皂苷、补肾中药、干细胞、生长因子、骨保护素、基因治疗等来促进腱骨愈合[7-10],但效果均不够理想。本实验首次将金葡液(HAS)直接局部注射到 ACL 重建腱骨界面,从组织学角度探讨其对腱骨愈合的作用。结果表明相较于对照组,实验组移植肌腱和骨隧道组织连接紧密,血管、新骨和胶原纤维生成丰富,且胶原纤维成熟度较

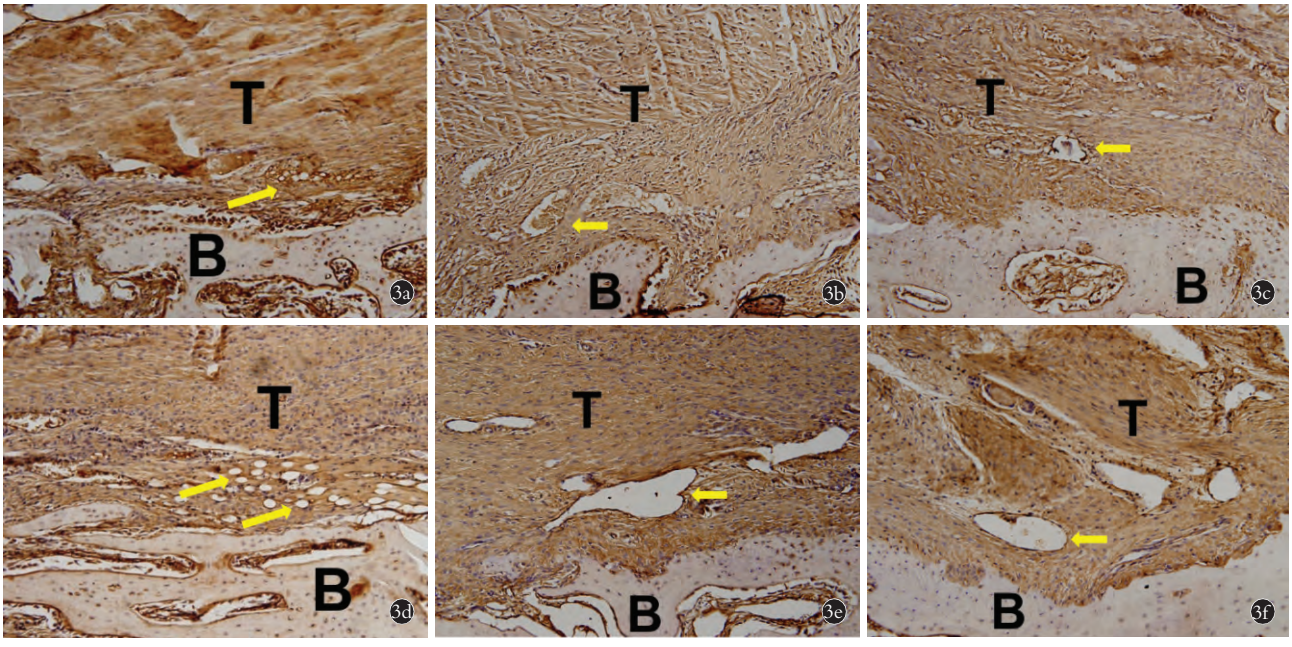


图 3　腱骨界面的光镜下组织形态表现(VEGF 免疫组化染色×20)　3a. 术后 4 周对照组腱骨界面间新生血管不明显(箭头所示)　3b. 术后 8 周对照组界面间血管增生明显(箭头所示)　3c. 术后 12 周对照组界面间血管生成减少(箭头所示)　3d. 术后 4 周实验组腱骨界面间新生血管增生活跃(箭头所示)　3e. 术后 8 周实验组界面间大量新生血管分布其中(箭头所示)　3f. 术后 12 周实验组界面间血管生成较 8 周有所减少(箭头所示)

Fig.3　Histomorphology of tendon-bone interface under microscopic (VEGF immunohistochemisty×20)　**3a.** Angiogenesis appeared but not rich at 4 weeks after operation (arrow)　**3b.** Angiogenesis was rich at 8 weeks after operation (arrow)　**3c.** Many neo-vessels could be observed at 12 weeks after operation (arrow)　**3d.** Angiogenesis was rich at 4 weeks after operation (arrow)　**3e.** Neo-vessels was very rich at 8 weeks after operation (arrow)　**3f.** Neo-cvessels was rich at 12 weeks after operation, but not as much as at 8 weeks (arrow)

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

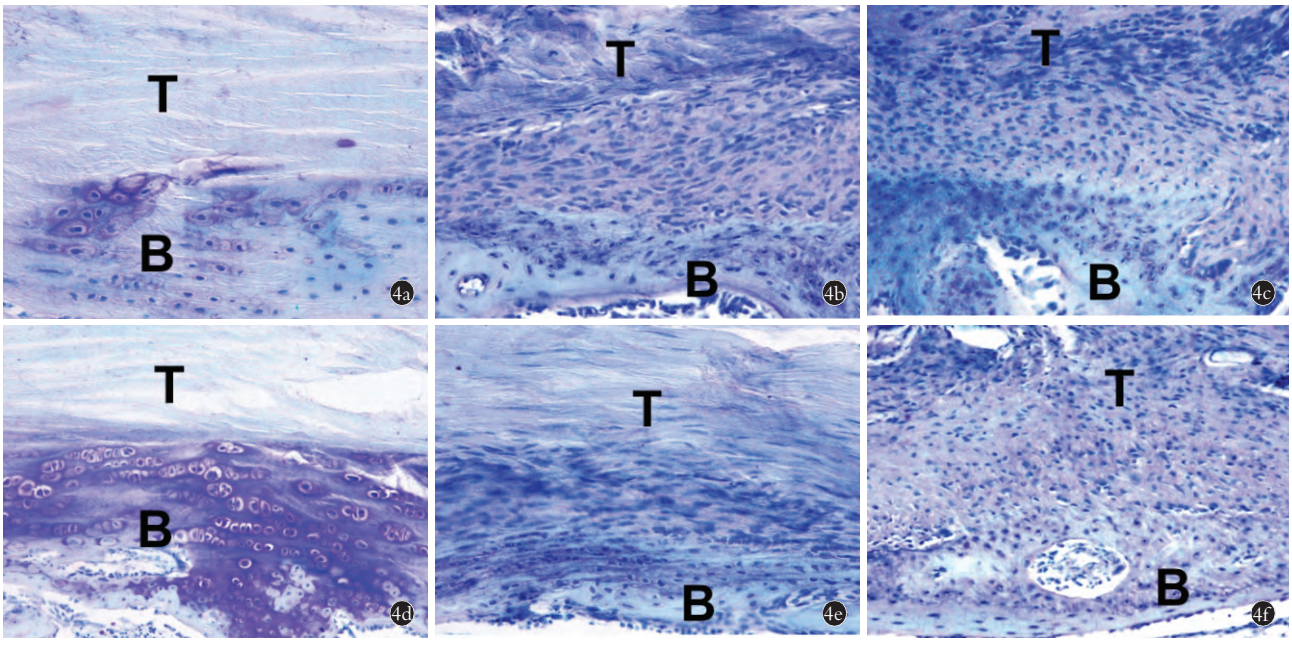


图 4　腱骨界面的光镜下组织形态表现(甲苯胺蓝染色×20)　4a. 术后 4 周对照组腱骨界面间可见串状排列的成软骨细胞　4b. 术后 8 周对照组界面间可见大量成骨细胞　4c. 术后 12 周对照组界面间可见大量新骨生成　4d. 术后 4 周实验组腱骨界面间可见串状排列的成软骨细胞和软骨移行带　4e. 术后 8 周实验组界面间成骨明显丰富　4f. 术后 12 周实验组腱骨界面新骨包绕移植肌腱,其间可见纤维软骨

Fig.4　Histomorphology of tendon-bone interface under microscopic (Toluidine blue×20)　**4a.** Proliferated chondroblasts can be observed at 4 weeks after operation　**4b.** Many osteoblasts appeared at 8 weeks after operation　**4c.** More new bone formed at 12 weeks after operation　**4d.** New bone formed actively and many proliferated chondroblasts formed at 4 weeks after operation　**4e.** New bone formed actively and rich at 8 weeks after operation　**4f.** New bone rich and fibrocartilage occurred at 12 weeks after operation

高(P<0.05)。实验组术后腱骨愈合质量显著优于对照组。

3.1　HAS 的作用机制

金葡素富含葡萄球菌肠毒素 C(staphylococcal enterotoxin C,SEC),血浆游离凝固酶(coagulase),多种蛋白质,多肽和氨基酸等活性物质[11-13]。早在前苏联学者 МОВШОВИН 等最先报道了应用金黄 1967 年色葡萄球菌类毒素联合抗菌素防治四肢开放性骨折感染。目前此药在临床广泛用于骨折骨延迟愈合及骨不连、骨缺损、股骨头坏死、骨囊肿、腰椎间盘突出等疾病的治疗[4,14],同时作为成熟的肿瘤治疗辅助药物在临床使用已达 20 余年[15]。

Ding 等[11]利用生物素-链霉亲和素-ELISA 技术证实 HAS 有效成分是 SEC,其含量在药物总蛋白含量中接近 0.1%。SEC 属于超级抗原 (Super Antigen, SAg), 可特异性地与 T 细胞受体 TCR-Vβ 片段结合,仅需微量(pg-ng/ml)即可高效刺激其增殖并增强其活性[16]。本研究结果显示实验组在术后 4 周腱骨界面由疏松结缔组织填充, 其间可见大量炎性细胞和成纤维细胞。Wan 等[17]研究显示 HAS 注射后首先引起局部无菌性炎症反应, 诱发炎症细胞趋化和炎症因子的释放,这与本研究结果相一致。提示 HAS 可能在 SEC 作用下,使腱骨界面间 T 细胞大量激活并提前启动无菌性炎症反应, 并通过诱导机体释放大量转化生长因子 (transforming growth factor-b, TGF-b)、成纤细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)、VEGF 等细胞因子扩大其炎症效应,利于腱骨界面的早期愈合。

再血管化是腱骨愈合的关键环节。本实验中实验组血管生成面积均大于对照组 (P<0.05)。此外, Wan 等[17]将 SEC 与维生素 C 相结合(SEC-AA)用于骨折愈合研究, 发现 SEC-AA 能够激活骨髓间充质干细胞,促进其分化为破骨细胞,加速骨细胞的生成和钙化。这些与笔者的研究结果具有一致性。可见在 HAS 作用下, 腱骨界面发生的早期局部无菌性炎症反应和 VEGF 等因子的释放均能促进毛细血管的大量生成和长入。充分的血供一方面能将血液中的大量间充质干细胞带入腱骨界面, 促进内源性骨形成蛋白的分泌和成骨诱导; 另一方面也为新骨和胶原纤维生成提供所需的细胞因子和营养物质, 最终促进了新骨和胶原纤维的大量生成与成熟。

3.2　再血管化与腱骨愈合的关系

Ntoulia 等[18]证实血管化程度的提高能够显著提升腱骨界面间组织愈合程度和生物力学性能。值得关注的是本实验结果中实验组血管生成面积在术后 8 周达到峰值,到 12 周时有所减少。但可以看到,实

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

验组新骨生成面积和胶原纤维特别是 Sharpey 纤维生成均随时间递增且优于对照组($P<0.05$),到 12 周 Sharpey 纤维广泛生成并有序排列,1 个标本形成了典型的直接连接。已证实,移植肌腱与骨隧道间骨长入情况与生物力学性能呈正相关,而 Sharpey 纤维生成的数量和大小与移植肌腱的最大失效负荷呈正相关。可见,HAS 对腱骨界面间再血管化的促进作用保证了胶原纤维和新骨的生成,利于腱骨愈合质量的提高。

3.3　本研究不足

首先,HAS 是一种富含多种成分的生物复合制剂,虽然 Ding 等[11]证实了 SEC 的存在和含量,McAdow 等[12]认为该药含有的血浆游离凝固酶等多种蛋白质都能促进腱骨愈合,但其有效成分及具体含量尚未明了,还有待于进一步深入研究。其次,HAS 作为一种液体制剂,在腱骨界面不易长期存留,药物有效作用时间较短。本实验在移植肌腱固定前向,肌腱固定成功后及术后第 2 天分别向腱骨界面进行 HAS 干预,保证了药物作用的持续性,达到了预期效果。此外,本实验未涉及生物力学研究,HAS 对腱骨愈合的促进作用还需通过生物力学测试做进一步验证。

总之,HAS 能够在 SEC 等多种成分的协同作用下,通过启动局部无菌性炎症反应,加快腱骨界面血管生成,激活骨细胞和纤维细胞大量增殖,有效促进兔 ACL 重建后移植肌腱与骨隧道的愈合,有望成为促进 ACL 重建后腱骨愈合的新的临床治疗措施。本研究"老药新用",也为深度挖掘传统药物的临床潜在应用价值提供了思路与借鉴。

参考文献

[1] Shea KG, Carey JL, Richmond J, et al. The American Academy of Orthopaedic Surgeons evidence-based guideline on management of anterior cruciate ligament injuries[J]. J Bone Joint Surg Am, 2015, 97(8): 672–674.

[2] 刘玉杰. 关注前交叉韧带重建术后影响疗效的因素与对策[J]. 中国骨伤, 2012, 25(11): 883–885.
LIU YJ. Influencing factors on therapeutic effects and its management of reconstruction of anterior cruciate ligament[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2012, 25(11): 883–885. Chinese.

[3] 魏民, 毕胜, 刘玉杰, 等. 胫骨残端长度对前交叉韧带重建术后本体觉恢复的影响[J]. 中国骨伤, 2015, 28(7): 609–614.
WEI M, BI S, LIU YJ, et al. Effect of length of tibial stump on proprioceptive recovery after the reconstruction of anterior cruciate ligament[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2015, 28(7): 609–614. Chinese with abstract in English.

[4] 彭国常. 金葡素在骨科领域的应用及进展[J]. 临床合理用药杂志, 2014, 7(5): 180–181.
PENG GC. The application and progression of staphylococus aureus injection in orthopeadics[J]. Lin Chuang He Li Yong Yao Za Zhi, 2014, 7(5): 180–181. Chinese.

[5] 李春宝, 刘玉杰, 齐玮, 等. 兔咪唑安定基础麻醉下手术全麻效果的实验观察[J]. 武警医学院学报, 2011, 20(4): 266–268.
LI CB, LIU YJ, QI W, et al. Experimental observation of anesthetic effects of general anesthesia under the basal anesthesia of midazolam on rabbit operations[J]. Wu Jing Yi Xue Yuan Xue Bao, 2011, 20(4): 266–268. Chinese.

[6] 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.

[7] Hao ZC, Wang SZ, Zhang XJ, et al. Stem cell therapy: a promising biological strategy for tendon-bone healing after anterior cruciate ligament reconstruction[J]. Cell Prolif, 2016, 49(2): 154–162.

[8] 张磊, 李智尧, 孙晋, 等. 三七总皂苷促进腱骨愈合的实验研究[J]. 中国骨伤, 2011, 24(2): 132–136.
ZHANG L, LI ZR, SUN J, et al. Effects of Panax Notoginseng Saponins on autograft tendon healing in bone tunnel: interface histological characteristics[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2011, 24(2): 132–136. Chinese with abstract in English.

[9] Atesok K, Fu FH, Wolf MR, et al. Augmentation of tendon–to–bone healing[J]. J Bone Joint Surg Am, 2014, 96(6): 513–521.

[10] Yoon JP, Chung SW, Kim JY, et al. Outcomes of combined bone marrow stimulation and patch augmentation for massive rotator cuff tears[J]. Am J Sports Med, 2016, 44(4): 963–971.

[11] Ding D, Huang P, Sun H, et al. Identification of protein components and quantitative immunoassay for SEC2 in staphylococcin injection[J]. J Pharm Biomed Anal, 2009, 50(1): 79–85.

[12] McAdow M, Missiakas DM, Schneewind O. Staphylococcus aureus secretes coagulase and von Willebrand factor binding protein to modify the coagulation cascade and establish host infections[J]. J Innate Immun, 2012, 4(2): 141–148.

[13] Hui J, Yu XJ, Cui XJ, et al. Construction of novel chimeric proteins through the truncation of SEC2 and Sak from Staphylococcus aureus[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2014, 78(9): 1514–1521.

[14] Liang J, Jiang X, Zhang X, et al. Interventional catheterization combined with staphylococcin aureus injection in 112 cases of ischemic necrosis of femoral heads[J]. Cell Biochem Biophys, 2015, 73(2): 271–273.

[15] Wang F, Huang Q, Zhou LY. Analysis of the treatment of gliomas with SEC therapy combined with radiochemotherapy[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2015, 19(13): 2400–2405.

[16] Salgado-Pabón W, Case-Cook LC, Schlievert PM. Molecular analysis of staphylococcal superantigens[J]. Methods Mol Biol, 2014, 1085: 169–185.

[17] Wan XC, Liu CP, Li M, et al. Staphylococcal enterotoxin C injection in combination with ascorbic acid promotes the differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into osteoblasts in vitro[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 373(4): 488–492.

[18] Ntoulia A, Papadopoulou F, Ristanis S, 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, 39(7): 1478–1486.

(收稿日期: 2016–06–17　本文编辑: 李宜)

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net