

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.37.006

[http://www.crter.org]

孙正明, 凌鸣, 冯伟楼, 董向辉, 刘时璋, 易智. 间歇性负压干预前交叉韧带重建后的腱-骨愈合[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(37): 6573-6579.

间歇性负压干预前交叉韧带重建后的腱-骨愈合**☆

孙正明¹, 凌鸣¹, 冯伟楼², 董向辉¹, 刘时璋¹, 易智¹ (¹陕西省人民医院骨二科, 陕西省西安市 710061; ²西安市红十字会医院足踝外科, 陕西省西安市 710054)

文章亮点:

1 回顾前期文献, 负压已被证实在促进创伤及骨愈合方面有着独到的优势。但文章特点在于首次在兔膝关节前交叉韧带重建后施加间歇性负压干预, 观察间歇性负压对腱-骨愈合及肌腱移植生物力学的影响。

2 实验采用自体对照, 可以将实验偏差降至最低; 对照侧关节内也放置普通引流管, 这样可以真实反映负压干预下前交叉韧带重建后腱-骨界面愈合及肌腱移植爬行替代的变化。文章结果显示, 间歇性负压可能在前交叉韧带重建后腱-骨愈合、肌腱移植物的塑性过程中扮演着积极作用, 为交叉韧带重建后腱-骨愈合研究提供了新的思路。

3 间歇性负压促进兔膝前交叉韧带重建后腱-骨愈合的机制是多方面的, 尚需进一步从影像学及分子生物学水平探讨, 进而筛选更适宜的负压大小及频率。

关键词:

组织构建; 骨组织构建; 前交叉韧带; 负压; 腱-骨愈合; 肌腱移植; 成骨细胞; 拉力; 白细胞介素 1 β ; 省级基金

主题词:

前交叉韧带; 负压伤口疗法; 组织移植; 成骨细胞; 白细胞介素 1

基金资助:

陕西省自然科学基金基础研究计划项目(2011JM4050)*, 陕西省科技厅资助项目*

孙正明☆, 男, 1975年生, 宁夏回族自治区中卫市人, 汉族, 2009年西安交通大学毕业, 博士, 主治医师, 主要从事膝关节运动损伤的修复及重建研究。

szmxx3@aliyun.com

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2013)37-06573-07

收稿日期: 2013-03-18

修回日期: 2013-03-25

(201301041/G·C)

摘要

背景: 间歇性负压被证实可以促进软组织修复及骨愈合, 但其对交叉韧带重建后腱-骨愈合的影响尚未见报道。

目的: 观察间歇性负压对兔前交叉韧带重建后腱-骨愈合及肌腱移植生物力学的影响。

方法: 取 24 只新西兰大白兔制备自体半腱肌前交叉韧带重建模型, 随机取一侧后腿作为负压侧, 负压侧关节通过引流管接微型负压吸引器, 并维持低强度、间歇性负压; 对侧后腿作为对照, 接普通引流管。5 d 后两侧同时拔除吸尿管。造模后 6 周, 取关节液检测白细胞介素 1 β 的表达水平; 取股骨-韧带-胫骨复合体行肌腱移植拉力测定和腱-骨界面组织学观察。

结果与结论: 1 只兔关节感染, 最终 23 只兔进入结果分析。拉力测定结果显示, 负压组完全断裂所需拉力显著大于对照组 ($P < 0.05$)。组织学观察结果发现, 负压组成骨细胞数目显著多于对照组, 差异有显著性意义 ($P < 0.01$)。关节液检测结果提示负压组关节滑液中白细胞介素 1 β 含量低于对照组, 差异有显著性意义 ($P < 0.01$)。提示间歇性负压可能在前交叉韧带重建后腱-骨愈合、肌腱移植物的塑性过程中扮演着积极作用。

Intermittent negative pressure affects tendon-bone healing after anterior cruciate ligament reconstruction

Sun Zheng-ming¹, Ling Ming¹, Feng Wei-lou², Dong Xiang-hui¹, Liu Shi-zhang¹, Yi Zhi¹ (¹Second Department of Orthopedics, People's Hospital of Shaanxi Province, Xi'an 710068, Shaanxi Province, China; ²Department of Foot and Ankle Surgery, Xi'an Honghui Hospital, Xi'an 710054, Shaanxi Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Intermittent negative pressure has been proven to promote the repairing of soft tissue and bone healing, but the effect of negative pressure on the tendon-bone healing after anterior cruciate ligament reconstruction has not been reported.

OBJECTIVE: To research the effect of intermittent negative pressure on tendon-bone healing after anterior cruciate ligament reconstruction and on the biomechanics of tendon grafts.

METHODS: A total of 24 New Zealand white rabbits were randomly selected to establish the models of anterior cruciate ligament reconstruction of autogenous semitendinosus. The hind leg of one side was selected randomly as the negative pressure group, and the joint of the negative pressure side was connected with the micro-negative pressure aspirator through drainage tube and maintained a low-intensity and intermittent negative pressure; the contralateral hind leg was as the control and connected with ordinary drainage tube. Drainage tubes

Sun Zheng-ming☆, M.D.,
Attending physician, Second
Department of Orthopedics,
People's Hospital of Shaanxi
Province, Xi'an 710061,
Shaanxi Province, China
szmxx3@aliyun.com

Received: 2013-03-18

Accepted: 2013-03-25

of both sides were removed at the same time after 5 days. At 6 weeks after modeling, the joint fluid was drawn to detect the expression levels of interleukin-1 β ; femur-ligament-tibia complex was used for tension measurement of tendon graft, and histological observation of tendon-bone interface.

RESULTS AND CONCLUSION: One rabbit had joint infection, and finally 23 rabbits were included in the study. Tension measurement results showed that maximum load for breakage in negative group pressure was significantly greater than that in the control group ($P < 0.05$). Histological observation found that the number of osteoblasts in the negative pressure group was significantly more than that in the control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). Detection of synovial fluid showed that interleukin-1 β content in synovial fluid of the negative pressure group was lower than that in the control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). Intermittent negative pressure may play an active role in tendon-bone healing and modeling of tendon graft after anterior cruciate ligament reconstruction.

Subject headings: anterior cruciate ligament; negative-pressure wound therapy; tissue transplantation; osteoblasts; interleukin-1

Funding: Basic Research Planning Project of Shaanxi Natural Science, No. 2011JM4050*; Shaanxi Provincial Science and Technology Department*

Sun ZM, Ling M, Feng WL, Dong XH, Liu SZ, Yi Z. Intermittent negative pressure affects tendon-bone healing after anterior cruciate ligament reconstruction. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2013;17(37):6573-6579.

0 引言 Introduction

随着大众运动的普及和交通事故的上升,前交叉韧带的损伤也日益增多。前交叉韧带撕裂是最严重的膝关节损伤之一,由于前交叉韧带自我修复的能力极差,一旦损伤难以自愈,前交叉韧带在膝关节的稳定中扮演着非常重要的作用,前交叉韧带功能的丧失将导致膝关节不稳、半月板撕裂和关节软骨的退变;严重影响了患者的日常生活和运动功能,给社会和家庭带来了沉重的经济负担。

为了恢复膝关节的正常结构和功能,自体韧带作为重建材料重建前交叉韧带成为了治疗标准,如何早日使腱移植与骨隧道牢固愈合,减少患者膝关节固定时间,使其早日进行功能锻炼并恢复关节功能是临床研究的热点之一。

目前,促进腱移植与骨隧道愈合的方法很多,但这些技术大多存在成本较高,临床疗效及安全性还是有待商讨等众多问题;因此寻找一种简便、经济、安全可靠的促进腱-骨界面早日愈合、加快肌腱移植塑性及爬行替代的方法,仍然是骨科研究者的重任。

近年来负压技术被证实促进创伤及骨愈合方面有着独到的优势^[1-4],目前,尚未见到负压对前交叉韧带重建后腱-骨愈合和肌腱移植爬行替代影响的研究报道。

文章将负压技术应用到前交叉韧带重建的动物模型中,探讨负压对腱-骨界面愈合及肌腱移植生物力学的影响。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 自体对照动物实验。

时间及地点: 于2012年5至9月在西安交通大学实验

动物中心和陕西省人民医院中心实验室完成。

材料: 健康成年骨骼发育成熟的新西兰大白兔24只,平均10-12月龄,体质量2.9-3.5 kg,均为雄性,由西安交通大学实验动物中心提供,生产许可证号:SCXK(陕)2007-001;使用许可证:SYXK(陕)2007-003。实验前动物运动良好,可奔跑,未见关节肿胀、畸形、跛行及其他异常,双膝关节均进行前抽屉实验、Lachman试验、及内外侧应力实验检查阴性,证实其前交叉韧带正常且膝关节稳定。

实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

负压对前交叉韧带重建后腱-骨愈合影响实验的主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
白细胞介素 1 β ELISA 试剂盒	Genzyme 公司
戊巴比妥钠	北京普博斯生物科技有限公司
硫化钠	上海易品实业有限公司
青霉素钠	哈药集团制药总厂
甲醛	西安健翔化工有限公司
WDW-100 微机控制电子万能生物力学试验机	上海百若试验仪器有限公司
SZ51/SZ61 显微镜	日本奥林巴斯
D21003 微型手电钻	东莞市达威五金设备有限公司

方法:

动物模型的建立: 3.3%戊巴比妥钠(1 mL/kg)耳缘静脉注射行全身麻醉,待麻醉满意后,用硫化钠脱毛剂脱去双膝关节周围的兔毛。

投币方式决定实验手术侧后腿、对侧后腿为对照,消毒、铺巾,取膝前内侧弧形切口,逐层切开皮肤、皮下组织、深筋膜;沿髌骨内侧打开关节腔(若关节腔内有明显积液、滑膜炎表现则不能作为实验动物),显露膝关节内前方结构,切断前交叉韧带股骨胫骨起止点,术中

做前抽屉试验发现胫骨前向明显失稳。

于大腿内侧分离出半腱肌腱并取出, 剔除肌肉部分, 肌腱两端均用10号丝线缝合, 两端均留8 cm长的缝线作为牵引线备用, 预张10 min并浸泡在生理盐水中。

屈膝45°, 用1 mm克氏针在自制点对点定位器引导下沿着胫骨结节内上0.8 cm处向原前交叉韧带起点处钻取骨道, 屈膝90°, 再从股骨外侧髁的内侧面即原前交叉韧带止点处向后上方钻取骨道, 出口在股骨髁干交界处, 测量半腱肌直径后用2 mm克氏针扩大骨隧道, 用带孔克氏针引导牵引线, 将肌腱依次穿过胫骨股骨隧道, 屈膝60°位收紧, 牢固缝合于周围骨膜及软组织上^[5]。

术后查前抽屉试验及Lachman试验阴性后, 生理盐水彻底冲洗关节腔, 放置引流管, 关闭伤口, 敷料包扎, 引流管接微型负压吸引器, 兔麻醉苏醒后即开始实施负压, 50 kPa, 30 min/次, 2次/d, 5 d后拔除负压吸引管。取对侧下肢按上述方法进行前交叉韧带重建, 同样放置引流管, 关闭伤口; 与负压侧同时拔除引流管。术后每只兔每天予青霉素钠注射液80万单位肌肉注射, 连续6 d, 预防感染。

取材: 造模后6周, 将兔空气栓塞法处死, 将膝关节内滑液取出放置于-80 °C冰箱备用。取下股骨-韧带-胫骨复合体, 剔除周围肌肉及其他软组织, 用湿生理盐水纱布包裹, 立即送实验台进行拉力测定。

力学拉力测定: 采用WDW-100微机控制电子万能生物力学试验机, 把股骨-韧带-胫骨复合体置于测试夹具中进行拉伸试验, 加载速度为5 mm/min, 记录前交叉韧带完全断裂时的加载负荷。

苏木精-伊红染色及结果判定: 取2组膝关节标本, 随机于股骨髁上1 cm或胫骨结节下方0.5 cm处切断(若隧道内韧带拉出、则取非拉出端)。体积分数10%甲醛溶液固定, 10%EDTA磷酸缓冲液脱钙, 脱钙后标本以蒸馏水冲洗, 清除关节周围软组织, 将股骨隧道和胫骨隧道纵向剖开, 取下标本并修整成1 cm×0.5 cm×0.5 cm大小。依次梯度脱水、二甲苯透明、石蜡包埋, 切成5 μm厚的薄片。

行苏木精-伊红染色, 在显微照相系统下随机选取10个高倍镜视野下行腱骨交界面组织成骨细胞计数, 然后取平均数。

滑液中白细胞介素1β的检测: 采用双抗夹心ELISA法, 检测滑液白细胞介素1β的水平, 步骤如下: 除空白孔, 将不同浓度标准品(100 μL/孔) 分别加入相应孔内, 封住反应孔, 18-25 °C共同孵育120 min。洗板。在空白孔外其他孔内, 加入生物素化抗体工作液(100 μL/孔)。封住板孔, 18-25 °C孵育60 min。洗板。除空白孔外, 加入酶结合物工作液(100 μL/孔)。封住板孔, 18-25 °C孵

育30 min。洗板。加入底物A、B(各50 μL/孔), 避光室温5-30 min。加入终止液(50 μL/孔), 混匀后5 min内测量吸光度值($A_{450\text{ nm}}$)。

用所测 $A_{450\text{ nm}}$ 值减去零孔的A值, 制作标准曲线, 查出浓度值。

主要观察指标: 造模后6周取兔子股骨-韧带-胫骨复合体进行生物力学测试; 取腱-骨界面进行进行苏木精-伊红染色, 光镜观察组织病理改变; 取关节液行白细胞介素1β的检测。

统计学分析: 由第一作者使用SPSS 17.0统计软件包进行数据数据, 所有指标数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 取24只新西兰大白兔制备自体半腱肌前交叉韧带重建模型, 造模后1只兔因负压侧膝关节发生感染被剔除, 最终共23只兔进入实验结果分析。

2.2 拉力测试结果 拉力测定结果显示负压组21例肌腱从韧带体部断裂, 2例从隧道内拉出。

对照组18例标本从韧带体部断裂, 5例从隧道内拉出。

拉力测定结果显示, 负压组完全断裂所需拉力显著大于对照组($P < 0.05$), 见表1。

表1 负压组及对照组兔肌腱移植体完全断裂所需的拉力比较
Table 1 Required tension resulting in full rupture of the tendon graft in the negative pressure group and the control group ($\bar{x} \pm s, n=23, N$)

组别	最大拉力
负压组	21.71±2.59
对照组	20.27±2.39
<i>P</i>	0.047

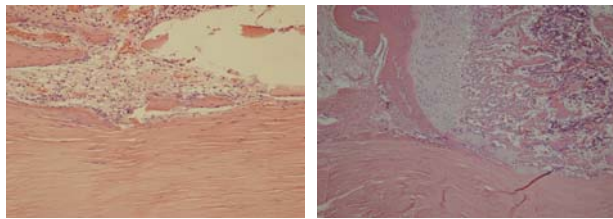
注: 兔前交叉韧带重建后, 负压侧关节通过引流管接微型负压吸引器, 并维持低强度、间歇性负压; 对照侧接普通引流管。负压组肌腱移植体完全断裂时所需的拉力显著大于对照组($P < 0.05$), 提示负压可增加交叉韧带重建后肌腱移植体的强度。

2.3 组织学观察结果 见图1及表2。

造模后6周负压组显示移植体周围有明显的骨细胞形成, 但肌腱周围部分无成纤维细胞出现, 移植肌腱中央部分发生坏死, 被胶原纤维组织代替, 见图1。

在对照组移植体和隧道壁之间也无成纤维细胞, 不定型的连接纤维; 骨细胞形成量明显少于负压组, 部分标本表现为腱-骨分离状态。

进一步研究发现, 与对照组相比, 负压组的成骨细胞数目增多, 且差异有显著性意义($P < 0.01$), 见表2。



A: 负压组

B: 对照组

注: 前交叉韧带重建后, 负压侧关节通过引流管接微型负压吸引器, 并维持低强度、间歇性负压; 对照侧接普通引流管。负压组腱骨界面有大量的成骨细胞; 对照组骨界面成骨细胞稀疏, 部分标本表现为腱-骨分离状态。

图1 负压组及对照组兔腱-骨界面组织学形态(苏木精-伊红染色, $\times 100$)

Figure 1 Morphology of tendon-bone interface of rabbits in the negative pressure group and the control group (Hematoxylin-eosin staining, $\times 100$)

表2 负压组及对照组兔腱-骨界面成骨细胞数目比较

Table 2 Number of osteoblasts on tendon-bone interface in the negative pressure group and the control group ($\bar{x} \pm s$, $n=23$)

组别	成骨细胞数目
负压组	29.17 \pm 1.86
对照组	20.38 \pm 2.64
<i>P</i>	0.000

注: 兔前交叉韧带重建后, 负压侧关节通过引流管接微型负压吸引器, 并维持低强度、间歇性负压; 对照侧接普通引流管。负压组腱-骨界面成骨细胞数量显著多于对照组($P < 0.01$), 提示负压促进了腱-骨界面愈合。

2.4 关节滑液中白细胞介素 1β 的检测 关节滑液中白细胞介素 1β 水平见表3。

表3 负压组及对照组兔关节液中白细胞介素 1β 水平比较

Table 3 Interleukin- 1β level in the synovial fluid of the negative pressure group and the control group ($\bar{x} \pm s$, $n=23$, ng/L)

组别	白细胞介素 1β
负压组	10.94 \pm 1.64
对照组	12.96 \pm 1.86
<i>P</i>	0.002

注: 兔前交叉韧带重建后, 负压侧关节通过引流管接微型负压吸引器, 并维持低强度、间歇性负压; 对照侧接普通引流管。负压组关节液中白细胞介素 1β 水平显著低于对照组($P < 0.01$), 提示负压促进了腱-骨界面愈合。

由表3结果可见, 与对照组相比, 负压组滑液中白细胞介素 1β 的质量浓度明显降低, 且差异有显著性意义($P < 0.01$)。

3 讨论 Discussion

前交叉韧带重建是治疗前交叉韧带损伤是的主要手段, 采用肌腱移植物做为前交叉韧带重建的材料是目前的主流选择; 其中移植物与骨隧道牢固的愈合是前交叉韧带重建手术成功的关键之一。但是, 许多动物实验研究发现, 肌腱移植物与骨隧道达到完全可靠的腱-骨愈合需要12-24个月甚至更长时间^[6-9]。

在美国每年前交叉韧带重建的手术约10万例以上, 但每年翻修手术高达3 000-10 000例, 其中肌腱移植物在骨隧道内延迟愈合就是主要原因之一^[10-11]。此外, 术后为了使移植物经历坏死、重新血管化、胶原纤维爬行替代、塑型等过程, 最后成为类似于交叉韧带生物特性的替代韧带以及腱移植物与骨隧道的牢固愈合, 膝关节需要较长时间的限制活动, 从而引起后期关节功能康复锻炼的困难、甚至关节功能恢复的不理想。

如何早日使腱移植物与骨隧道牢固愈合以及移植物尽快完成爬行替代、塑型过程, 减少患者膝关节固定时间, 使其早日进行功能锻炼并恢复关节功能是临床骨科研究的热点之一。

目前, 促进腱移植物与骨隧道愈合的方法主要包括: 骨膜包裹肌腱移植物、生物活性因子、磷酸钙、骨髓间充质干细胞、低强度脉冲超声波、体外冲击波及基因工程治疗等^[12-26]。以上各种促进腱骨愈合的方法均对移植物在骨隧道内的愈合起一定作用, 但作用机制还需更深入的研究。

如骨膜内多能干细胞的质量和数量直接影响骨膜对腱骨愈合的促进作用, 如何最大程度发挥骨膜内多能干细胞的活性对腱骨愈合起重要作用; 关节腔内注射生物活性因子受关节活动和关节内滑液稀释影响, 如何保证生物活性因子的有效浓度是其发挥促进腱骨愈合作用的关键; 而如何保证骨髓间充质干细胞在腱骨界面更长时间存留, 尚需寻找更合适的载体, 防止间充质干细胞从腱骨界面流失及减少载体对移植物愈合的影响; 低强度脉冲超声波和体外冲击波均存在作用强度、作用频率及作用部位和时间的选择; 基因技术及组织工程的应用可能是肌腱移植重建交叉韧带后促进腱骨愈合的一个研究方向, 但离临床应用还很遥远。以上各种促进腱-骨界面愈合的方法均对移植物在骨隧道内的愈合起积极作用, 但作用机制仍需更深入的研究。所以, 目前尚无经济、安全、可靠并大规模应用于临床促进腱-骨愈合的方法。

这次实验在兔前交叉韧带重建的关节内施加间歇

性的低强度负压, 通过观察腱-骨界面组织学改变、移植物的强度及关节内滑液中白细胞介素 1β 的水平, 初步研究负压对腱-骨界面愈合肌腱移植强度的影响。

本实验结果提示, 术后6周, 负压组腱-骨界面成骨细胞显著多于对照组; 拉力测定中, 负压组肌腱移植自骨隧道拉出数目少于对照组, 同时移植物的强度显著高于对照组。这些结果证实, 间歇性负压可能会促进交叉韧带重建后腱-骨愈合及移植物的塑性替代过程。这主要可能与负压所形成的机械性刺激和缺氧有关, 机械性刺激是细胞生长过程中受到的基本刺激之一, 它可以对细胞分化和增殖产生重要的影响, 许多体外实验已经证实机械刺激可以促进细胞成骨分化^[27-29], 应力刺激也能通过促进成骨细胞增殖、分化等多种途径促进骨的形成^[30]。另外, 关节内维持负压环境势必造成组织细胞缺氧, 研究发现低氧能提高大鼠骨髓间充质细胞成骨能力^[31]。

在以往的研究中证实低强度间歇性负压可以成功的诱导骨髓间充质干细胞向成骨细胞定向分化, 诱导的细胞具有典型的成骨细胞特性^[1]; 同时间歇性负压具有抑制骨吸收、促进成骨的作用^[2]。

作者推测, 与正常对照相比, 当关节腔内维持间歇性负压, 更多的骨髓间充质干细胞间歇进入关节腔侧的腱-骨界面并向成骨细胞转化; 同时负压抑制腱-骨界面的骨吸收, 促进其成骨, 从而促进了腱-骨界面愈合。

此外, 本文发现, 负压组关节液中白细胞介素 1β 水平显著低于对照组。关节液由滑膜细胞产生分泌, 含胶原蛋白、透明质酸、蛋白多糖、滑液内正常细胞和一些脱落的滑膜表皮细胞、酶等物质, 不含凝血因子和纤维蛋白, 正常关节液的主要功能是润滑和向软骨细胞提供营养物质, 同时降解和清除关节内的软骨碎屑。前交叉韧带重建术后, 由于手术创伤的刺激引起关节内严重的炎症反应, 关节液异常增多, 而重建肌腱移植体内无血液供应, 也没有腱膜和结缔组织包裹覆盖, 关节液中异常增多的大量炎性细胞和炎症因子等直接与之接触, 不利于韧带的愈合, 抑制了肌腱移植物的爬行替代, 所以韧带强度急剧下降。同时, 理化性质异常的关节液进入肌腱与骨隧道之间的缝隙, 其中的炎症因子, 白细胞介素1、肿瘤坏死因子 α 及基质金属蛋白酶等可降解骨组织, 抑制了腱-骨愈合^[32]。

Cameron等^[33]研究也认为关节液是引起骨隧道内骨质溶解, 隧道扩大的重要因素之一。也有学者认为关节滑液对腱-骨愈合无显著影响^[34]。但最新的研究发现股骨隧道内腱-骨愈合优于胫骨端骨隧道, 提示关节滑液不利于了腱-骨界面愈合^[35], 本实验结果支持此结论。

白细胞介素1由单核细胞、巨噬细胞和滑膜细胞等

细胞产生^[36], 是关节组织损伤的重要介质。此外, 白细胞介素1可以刺激肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素6、白细胞介素8及基质金属蛋白酶的分泌^[37-38], 加重关节内结构的损伤。Henderson等^[39]研究认为白细胞介素1抑制剂能够抑制滑膜炎和软骨破坏, 提示关节液内的白细胞介素1会破坏关节内结构, 对腱-骨愈合产生不利影响。

作者认为, 间歇性的负压吸引不仅可以减少关节液量, 特别是使重要的炎症白细胞介素 1β 水平的明显降低, 间接减少了其他炎症递质的释放, 抑制了骨和肌腱移植物的破坏及降解, 从而促进了腱-骨界面愈合及肌腱移植物的爬行替代。

在负压大小和模式的选择方面, 根据前期的文献提示60-80 kPa的负压有利于缩小创面, 促进肉芽组织迅速生长, 有利于创面愈合^[40], 负压通过刺激血管生成、改善组织血供, 促进细胞及肉芽组织生长, 从而加速软组织创面愈合^[41]。50 kPa体外间断性负压可以抑制骨保护素配体的表达, 同时促进骨髓基质细胞骨保护素mRNA的表达^[1]。在一项研究中发现, 在没有负压的情况下血管内皮细胞迁移受限, 而负压条件下血管内皮细胞的增殖和迁移明显增加, 间歇性负压效果优于连续性负压^[42]。

此外, 作者认为, 兔前交叉韧带重建关节内创伤较大, 术后持续性负压必然会导致大量的血液及体液的丧失, 不利于兔前交叉韧带重建术后创伤的愈合, 故本实验选择50 kPa体外间断性负压施加干预。

关于负压维持时间, 作者这次实验选择5 d, 因为引流管放置时间过长容易引起关节感染, 实验中就发生了1只兔关节感染导致前交叉韧带重建失败, 故选择引流管放置5 d。

到目前为止, 未见将间歇性负压技术应用到前交叉韧带重建动物模型的研究报道。本实验发现, 负压组腱-骨界面成骨细胞显著多于对照组, 同时移植物的强度显著高于对照组; 并且负压组关节液中白细胞介素 1β 水平显著低于对照组。

总之文章结果提示, 间歇性负压可能在前交叉韧带重建术后腱-骨界面愈合、肌腱移植物的塑性及爬行替代中扮演着积极作用, 其作用机制是多方面的, 这需要进一步深入研究其具体机制及筛选更适宜的负压大小及频率。

致谢: 感谢西安交通大学机械结构强度与振动国家实验室和陕西省人民医院实验中心的同仁在本实验实施过程中提供的帮助。

作者贡献: 第一作者负责总体设计及论文书写, 第二作者指导动物模型的建立, 第三作者负责饲养动物、组织学及生物力学的测试, 第四作者负责免疫组化部分, 第五、第六作者负

责建立动物模型。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。**学术术语:** 间歇性负压技术-近年来负压被证实在促进创伤及骨愈合方面有着独到的优势。在负压大小和模式的选择方面, 前期的文献提示60-80 kPa的负压有利于缩小创面, 促进肉芽组织迅速生长, 有利于创面愈合, 负压通过刺激血管生成、改善组织血供, 促进细胞及肉芽组织生长, 从而加速软组织创面愈合。有研究中发现, 在没有负压的情况下血管内皮细胞迁移受限, 而负压条件下血管内皮细胞的增殖和迁移明显增加, 间歇性负压效果优于连续性负压。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Yang Z, Liu M, Zhang YG, et al. Effects of intermittent negative pressure on osteogenesis in human bone marrow-derived stroma cells. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2009; 10(3): 188-192.
- [2] 杨治, 刘淼, 张银刚, 等. 间歇性负压培养对人BMSCs 骨保护素和骨保护素配体mRNA 表达水平的影响[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2008, 22(11):1354-1357.
- [3] Rubin J, Murphy T, Nanes MS, et al. Mechanical strain inhibits expression of osteoclast differentiation factor by murine stromal cells. *Am J Physiol: Cell Physiol*. 2000;278(6): 1126-1132.
- [4] Kim CH, You L, Yellowley CE, et al. Oscillatory fluid flow-induced shear stress decreases osteoclastogenesis through RANKL and OPG signaling. *Bone*. 2006; 39(5): 1043-1047.
- [5] 董向辉, 凌鸣, 冯伟楼, 等. 关节滑液对兔前交叉韧带重建后腱骨愈合生物力学和组织学的影响[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(13):1937-1940.
- [6] Rodeo SA, Arnoczky SP, Torzilli PA, et al. Tendon-healing in a bone tunnel. A biomechanical and histological study in the dog. *J Bone Joint Surg Am*. 1993;75(12):17951-803.
- [7] Tomita F, Yasuda K, Mikami S, et al. Comparisons of intraosseous graft healing between the doubled flexor tendon graft and the bone-patellar tendon-bone graft in anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy*. 2001;17(5):461-476.
- [8] Goradia VK. Tendon healing in a bone tunnel. Parts I and II. *Arthroscopy*. 2003;19(1):111.
- [9] Shelbourne KD, Carr DR. Meniscal repair compared with meniscectomy for bucket-handle medial meniscal tears in anterior cruciate ligament-reconstructed knees. *Am J Sports Med*. 2003;31(5):718-723.
- [10] Denti M, Lo Vetere D, Bait C, et al. Revision anterior cruciate ligament reconstruction: causes of failure, surgical technique, and clinical results. *Am J Sports Med*. 2008; 36(10):1896-1902.
- [11] 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 Bone Joint Surg Am*. 2006;88(11):2373-2379.
- [12] Youn I, Jones DG, Andrews PJ, et al. Periosteal augmentation of a tendon graft improves tendon healing in the bone tunnel. *Clin Orthop*. 2004;419: 223-231.
- [13] Burak D, Bartu S, Ozgur O, et al. Enhancement of tendon-bone healing of anterior cruciate ligament grafts by blockage of matrix metalloproteinases. *J Bone Joint Surg Am*. 2005;87(11): 2401-2410.
- [14] Dinybil C, Kawamura S, Kim HJ, et al. The effect of osteoprotegerin on tendon-bone healing after reconstruction of the anterior cruciate ligament: a histomorphological and radiographical study in the rabbit. *Z Orthop Ihre Grenzgeb*. 2006;144 (2): 179-186.
- [15] Yamazaki S, Yasuda K, Tomita F. The effect of transforming growth factor-beta1 on intraosseous healing of flexor tendon auto-graft replacement of anterior cruciate ligament in dogs. *Arthroscopy*. 2005;21(9): 1034-1041.
- [16] Mutsuzaki H, Sakane M. Calcium phosphate-hybridized tendon graft to enhance tendon-bone healing two years after ACL reconstruction in goats. *Sports Med Arthrosc Rehabil Ther Technol*. 2011;3(1):31.
- [17] Mutsuzaki H, Sakane M, Nakajima H, et al. Calcium phosphate-hybridized tendon graft to reduce bone-tunnel enlargement after ACL reconstruction in goats. *Knee*, 2012; 19(4):455-460.
- [18] Mutsuzaki H, Sakane M, Fujie H, et al. Effect of calcium phosphate-hybridized tendon graft on biomechanical behavior in anterior cruciate ligament reconstruction in a goat model: novel technique for improving tendon-bone healing. *Am J Sports Med*. 2011;39(5):1059-1066.
- [19] Mutsuzaki H, Ito A, Sakane M, et al. Calcium phosphate coating formed in infusion fluid mixture to enhance fixation strength of titanium screws. *J Mater Sci Mater Med*. 2007; 18(9):1799-1808.
- [20] Mutsuzaki H, Sakane M, Nakajima H, et al. Calcium-phosphate-hybridized tendon directly promotes regeneration of tendon-bone insertion. *J Biomed Mater Res A*. 2004;70(2):319-327.
- [21] Lim JK, Hui J, Li L, et al. Enhancement of tendon graft osteointegration using mesenchymal stem cells in a rabbit model of anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy*. 2004;20(9): 899-910.
- [22] Walsh WR, Stephens P, Vizesi F, et al. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on tendon-bone healing in an intra-articular sheep knee model. *Arthroscopy*. 2007;23(2): 197-204.
- [23] Wang CJ, Wang FS, Yang KD, et al. The effect of shock wave treatment at the tendon-bone interface-an histomorphological and biomechanical study in rabbits. *J Orthop Res*. 2005;23(2): 274-280.
- [24] Hashimoto Y, Naka Y, Fukunaga K, et al. ACL reconstruction using bone-tendon-bone graft engineered from the semitendinosus tendon by injection of recombinant BMP-2 in a rabbit model. *J Orthop Res*. 2011;29(12): 1923-1930.
- [25] Chen CH. Strategies to enhance tendon graft-bone healing in anterior cruciate ligament reconstruction. *Chang Gung Med J*. 2009;2(5):483-443.

- [26] Lee AJ, Chung WH, Kim DH, et al. Anterior cruciate ligament reconstruction in a rabbit model using canine small intestinal submucosa and autologous platelet-rich plasma. *J Surg Res*. 2012;178(1):206-215.
- [27] 黎润光, 邵景范, 魏明发, 等. 维拉帕米在应力对体外骨髓间充质干细胞早期反应基因蛋白表达中作用的研究[J]. *中国矫形外科杂志*, 2009, 17(8):621-624.
- [28] Jagodzinski M, Breitbart A, Wehmeier M, et al. Influence of perfusion and cyclic compression on proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells in 3-dimensional culture. *J Biomech*. 2008;41(9): 1885-1891.
- [29] Friedl G, Schmidt H, Rehak I, et al. Undifferentiated human mesenchymal stem cells (hMSCs) are highly sensitive to mechanical strain: transcriptionally controlled early osteo-chondrogenic response in vitro. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007;5(11): 1293-1300.
- [30] Jaasma MJ, Jackson WM, Tang RY, et al. Adaptation of cellular mechanical behavior to mechanical loading for osteoblastic cells. *J Biomech*. 2007;40(9):1938-1945.
- [31] Lennon DP, Edmison JM, Caplan AI. Cultivation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells in reduced oxygen tension: effects on in vitro and in vivo osteochondrogenesis. *J Cell Physiol*. 2001;187(3): 345-355.
- [32] Weiler A, Förster C, Hunt P, et al. The influence of locally applied platelet-derived growth factor-BB on free tendon graft remodeling after anterior cruciate ligament reconstruction. *Am J Sports Med*. 2004;32(4):881-891.
- [33] Cameron ML, Fu FH, Paessler HH, et al. Synovial fluid cytokine concentrations as possible prognostic indicators in the ACL-deficient knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 1994;2(1):38-44.
- [34] Kurland ES, Rosen CJ, Cosman F, et al. Insulin-like growth factor-I in men with idiopathic osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(9):2799-2805.
- [35] Wen CY, Qin L, Lee KM, et al. Grafted tendon healing in tibial tunnel is inferior to healing in femoral tunnel after anterior cruciate ligament reconstruction: a histomorphometric study in rabbits. *Arthroscopy*. 2010;26(1):58-66.
- [36] Choy EH, Panayi GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2001; 344(12):907-916.
- [37] Zwcrina J, Redlich K, Polzer IL, et al. TNF-induced structural joint damage is mediated by IL-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(28):11742-1147.
- [38] Suzuki M, Tetsuka T, Yoshida S, et al. The role of p38 mitogen-activated protein kinase in IL-6 and IL-8 production from the TNF-alpha- or IL-1beta-stimulated rheumatoid synovial fibroblasts. *FEBS Lett*. 2000;465(1):23-27.
- [39] Henderson B, Thompson RC, Hardingham T, et al. Inhibition of interleukin-1-induced synovitis and articular cartilage proteoglycan loss in the rabbit knee by recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. *Cytokine*. 1991;3(3): 246-249.
- [40] Argenta LC, Morykwas MJ. Vacuum assisted closure: a new method for wound control and treatment: clinical experience. *Ann Plast Surg*. 1997;38(6): 563-576.
- [41] Potter MJ, Banwell P, Baldwin C, et al. In vitro optimisation of topical negative pressure regimens for angiogenesis into synthetic dermal replacements. *Burns*. 2008;34(2):164-174.
- [42] Kanakaris NK, Thanasis C, Keramaris N, et al. The efficacy of negative pressure wound therapy in the management of lower extremity trauma: review of clinical evidence. *Injury*. 2007;38(5): S9-18.