

同种异体移植物处置方法影响犬前交叉韧带重建术后腱骨愈合界面的骨重塑

尚小可¹, 马占军², 温鹏¹, 王浩³, 马少伟³, 胡建中⁴, 李箭⁵, 郑君¹, 李棋⁵

https://doi.org/10.12307/2023.882

投稿日期: 2022-11-24

采用日期: 2022-12-26

修回日期: 2023-02-25

在线日期: 2023-03-09

中图分类号:

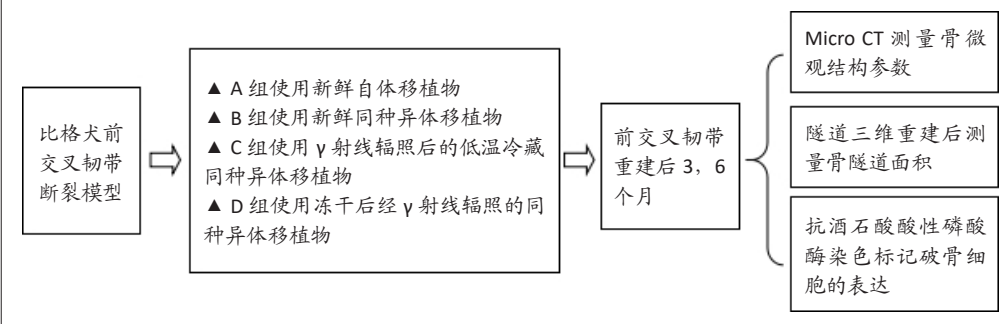
R459.9; R318.17; R873.5

文章编号:

2095-4344(2023)34-05516-07

文献标识码: A

文章快速阅读: 不同方法处理同种异体移植物对腱骨愈合过程中骨重塑的影响



文题释义:

同种异体移植物: 是指前交叉韧带重建手术中所使用的在同种异体上获取且经过处理的肌腱移植物。

腱骨愈合: 是指前交叉韧带重建手术中的移植肌腱与骨道壁之间的生长愈合及转化过程, 其特征性结构为形成纤维软骨移行带。

摘要

背景: 使用同种异体移植物进行前交叉韧带重建手术后的腱骨愈合过程复杂, 愈合不良易导致隧道扩大。术前移植物的处理过程可能对腱骨愈合存在一定影响, 但是具体情况并不清楚。

目的: 探讨同种异体移植物术前处置方法对韧带重建术后腱骨愈合过程中骨重塑的影响。

方法: 取32只雄性比格犬, 建立双侧后膝前交叉韧带断裂模型后, 采用抛硬币法随机分4组进行前交叉韧带重建手术: A组以新鲜自体跟腱为移植物, B组以新鲜同种异体跟腱为移植物, C组以γ射线辐照后低温冷藏的同种异体跟腱为移植物, D组以冻干后经γ射线辐照的同种异体跟腱为移植物, 每组8只。术后3, 6个月取股骨-移植物-胫骨复合体, 行Micro CT扫描和组织切片破骨细胞抗酒石酸酸性磷酸酶染色, 扫描图像进一步行骨微观结构参数测量, 并建立3D骨隧道模型测量隧道面积。

结果与结论: ①Micro CT扫描: 术后3个月, D组连接密度、骨小梁数量、骨小梁厚度、骨体积与总体积比值及结构模型指数均低于A、C组(P < 0.05), 骨小梁分离度高于A组(P < 0.05); B组连接密度、骨小梁数量及结构模型指数均低于A组(P < 0.05), 骨小梁分离度高于A组(P < 0.05), 骨体积与总体积比值低于A、C组(P < 0.05)。术后6个月, D组连接密度、骨小梁数量及骨体积与总体积比值均低于A组(P < 0.05), 骨小梁厚度及结构模型指数均低于A、C组(P < 0.05), 骨小梁分离度高于A组(P < 0.05); B组连接密度、结构模型指数低于A组(P < 0.05), 骨小梁厚度低于A、C组(P < 0.05), 骨小梁分离度高于A组(P < 0.05); ②抗酒石酸酸性磷酸酶染色: 与A组相比, B、D组破骨细胞染色更深且数量更多; C组破骨细胞在形态和数量上类似于A组, 体积偏小且着色偏淡; ③隧道面积: 相同时间点下, D组股骨与胫骨隧道扩大程度最大; B组术后3个月的股骨隧道内口、术后3, 6个月的股骨隧道内口与中部面积均大于A组(P < 0.05), 术后3, 6个月的胫骨隧道内口面积大于A组(P < 0.05); ④结果显示: 前交叉韧带重建术后腱骨愈合过程中骨隧道扩大现象普遍存在, 移植物处置方法通过影响腱骨界面破骨细胞介导的骨吸收导致骨微观结构的改变, 从而干预腱骨愈合过程中的骨重塑。

关键词: 前交叉韧带重建; 同种异体移植物; 跟腱; 处置方法; 腱骨愈合; 骨重塑

Disposal methods of allografts affect bone remodeling at the tendon-bone healing interface after canine anterior cruciate ligament reconstruction

Shang Xiaoke¹, Ma Zhanjun², Wen Peng¹, Wang Hao³, Ma Shaowei³, Hu Jianzhong⁴, Li Jian⁵, Zheng Jun¹, Li Qi⁵

¹The First Affiliated Hospital of Northwest Minzu University (People's Hospital of Ningxia Hui Autonomous Region), Yinchuan 750000, Ningxia Hui Autonomous Region, China; ²Tongxin County People's Hospital, Wuzhong 751300, Ningxia Hui Autonomous Region, China; ³The Third Clinical Medical College of Ningxia Medical University, Yinchuan 750000, Ningxia Hui Autonomous Region, China; ⁴Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410000, Hunan Province, China; ⁵West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Shang Xiaoke, PhD, Master's supervisor, Associate chief physician, The First Affiliated Hospital of Northwest Minzu University (People's Hospital of Ningxia Hui Autonomous Region), Yinchuan 750000, Ningxia Hui Autonomous Region, China

Corresponding author: Li Qi, PhD, Chief physician, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Corresponding author: Zheng Jun, Nurse-in-charge, The First Affiliated Hospital of Northwest Minzu University (People's Hospital of Ningxia Hui Autonomous Region), Yinchuan 750000, Ningxia Hui Autonomous Region, China

¹ 西北民族大学第一附属医院(宁夏回族自治区人民医院), 宁夏回族自治区银川市 750000; ² 同心县人民医院, 宁夏回族自治区吴忠市 751300; ³ 宁夏医科大学第三临床医学院, 宁夏回族自治区银川市 750000; ⁴ 中南大学湘雅医院, 湖南省长沙市 410000; ⁵ 四川大学华西医院, 四川省成都市 610041

第一作者: 尚小可, 男, 1981年生, 陕西省咸阳市人, 汉族, 博士, 硕士生导师, 副主任医师, 主要从事运动医学疾病研究。

通讯作者: 李棋, 博士, 主任医师, 四川大学华西医院骨科, 四川省成都市 610041

通讯作者: 郑君, 主管护师, 西北民族大学第一附属医院(宁夏回族自治区人民医院), 宁夏回族自治区银川市 750000

https://orcid.org/0000-0003-3583-979X(李棋); https://orcid.org/0009-0007-8095-1293(郑君)

基金资助: 西北民族大学中央高校基本科研业务费项目(青年教师创新项目)(31920210045), 项目负责人: 尚小可; 宁夏自然科学基金项目(2020A0534), 项目负责人: 尚小可

引用本文: 尚小可, 马占军, 温鹏, 王浩, 马少伟, 胡建中, 李箭, 郑君, 李棋. 同种异体移植物处置方法影响犬前交叉韧带重建术后腱骨愈合界面的骨重塑[J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(34):5516-5522.



Abstract

BACKGROUND: The process of tendon-bone healing after anterior cruciate ligament reconstruction with allografts is complex, and tunnel enlargement may occur due to poor healing. The process of preoperative graft treatment may have some influence on tendon-bone healing, but the specific situation is not clear. **OBJECTIVE:** To explore the effects of allograft disposal methods on bone remodeling during tendon-bone healing after anterior cruciate ligament reconstruction surgery.

METHODS: Thirty-two male beagles were randomly divided into four groups ($n=8$ per group) for anterior cruciate ligament reconstruction by coin toss method after establishing bilateral posterior cruciate ligament rupture models. In group A, fresh autogenous Achilles tendon grafts were used. In group B, a fresh allograft Achilles tendon was used. In group C, an allograft Achilles tendon irradiated by gamma rays and refrigerated at low temperature was used. In group D, lyophilized allograft tendon after γ -ray irradiation was used. Micro CT scanning and osteoclast tartrate-resistant acid phosphatase staining were performed in the femor-graft-tibia complex at 3 and 6 months after anterior cruciate ligament reconstruction. Scanning images were selected to measure the bone microstructural parameters and a 3D bone tunnel model was established to measure the tunnel area.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Micro CT scan: 3 months after operation, the connection density, trabecular number, trabecular thickness, ratio of bone volume to total volume and structural model index in group D were lower than those in groups A and C ($P < 0.05$). The trabecular separation was higher in group D than that of group A ($P < 0.05$). The connection density, trabecular number and structural model index of group B were lower than those of group A ($P < 0.05$). The trabecular separation was higher in group B than that in group A ($P < 0.05$). The ratio of bone volume to total volume was lower in group B than that in groups A and C ($P < 0.05$). Six months after surgery, the connection density, trabecular number and the ratio of bone volume to total volume in group D were lower than those in group A ($P < 0.05$). Trabecular thickness and structural model index were lower in group D than those in groups A and C ($P < 0.05$). The trabecular separation was higher in group D than that in group A ($P < 0.05$). The connection density and structural model index of group B were lower than those of group A ($P < 0.05$). The trabecular thickness was lower in group B than that in groups A and C ($P < 0.05$). The trabecular separation was higher in group B than that in group A ($P < 0.05$). (2) Tartrate-resistant acid phosphatase staining: Compared with group A, osteoclasts in groups B and D were stained more deeply and more in number. The osteoclasts in group C were similar to those in group A in morphology and quantity, with small volume and light staining. (3) Tunnel area: At the same time point, the tunnel expansion of the femur and tibia in group D was the largest. The area of the inner opening of the tibial tunnel at 3 months after operation and the area of the inner opening and middle part of the femoral tunnel at 3 and 6 months after operation in group B were larger than that in group A ($P < 0.05$). The area of the inner opening of the tibial tunnel at 3 and 6 months after operation was larger than that of group A ($P < 0.05$). (4) Those findings suggest that bone tunnel enlargement is common during tendon-bone healing after anterior cruciate ligament reconstruction. The disposal methods may affect bone resorption and the changes in bone microstructure mediated by osteoclasts at the tendon-bone interface. Therefore, it affected bone remodeling during tendon-bone healing.

Key words: anterior cruciate ligament reconstruction; allograft; Achilles tendon; disposal method; tendon-bone healing; bone remodeling

Funding: Central University Basic Scientific Research Business Fee Project of Northwest Minzu University (Young Teachers Innovation Project), No. 31920210045 (to SXK); Ningxia Natural Science Foundation Project, No. 2020A0534 (to SXK)

How to cite this article: SHANG XK, MA ZJ, WEN P, WANG H, MA SW, HU JZ, LI J, ZHENG J, LI Q. Disposal methods of allografts affect bone remodeling at the tendon-bone healing interface after canine anterior cruciate ligament reconstruction. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2023;27(34):5516-5522.

0 引言 Introduction

前交叉韧带是膝关节内维持关节稳定的重要静力性稳定结构，前交叉韧带损伤易导致膝关节不稳，引起半月板和关节软骨的继发性损伤，最终导致膝关节骨关节炎的发生。目前关节镜下前交叉韧带重建手术仍是治疗前交叉韧带损伤断裂的金标准，然而根据文献报道，前交叉韧带重建手术的失败率为 0.7%–10%，术后仅不足 50% 的患者可以恢复到伤前运动水平^[1]，其中 11%–32% 的患者对手术疗效不满意^[2]。尽管导致患者术后不满意的原因较多，然而腱骨愈合一直以来仍是一个重要的问题，有文献报道约有 10% 患者由于腱骨愈合不良存在关节残余不稳^[3]。

关节镜下前交叉韧带重建手术后的腱骨愈合问题是学者们讨论的热门话题，尤其是移植物的选择对腱骨愈合的影响长期以来困扰着临床医生^[4]。同种异体移植物临床上已有使用，其与自体移植物相比的优点是无供区并发症、有多种规格可供选择等，然而由于使用前需要进行消毒保存等处理过程，文献报道的临床结果不尽相同^[5-6]，这种差异被认为与移植物消毒保存的处置方法相关^[7]。LANSDOWN 等^[8]利用 Meta 分析比较不同剂量 γ 射线辐照后移植物生物力学性能的改变，结果发现，即使低剂量 (≤ 20 kGy) γ 射线照射对移植物生物力学的影响也是非常复杂的，当辐照剂量为 10–12 kGy 时，移植物的刚度降低 20%；当辐照剂量为 20 kGy 时，移植物的最大失败载荷降低 20%；而当辐照剂量为 12–18 kGy 时，移植物的生物力学性能没有显著改变。HAMER 等^[9]通过 γ 射线辐照同种异体移植物后认为，低温下辐照可以降低水分子的流动性，减少辐照过程中自由基的形成，因此低温对辐

照的移植物产生一定的保护作用。处置方法影响移植物在体内的转归与塑形，而有关同种异体移植物处置方法对腱骨愈合影响的报道不多。

腱骨愈合是移植物长入骨隧道并长久提供关节稳定性的基础，愈合不良会导致骨质溶解隧道扩大^[10-11]。尽管已有研究分析认为，隧道扩大是生物学因素（如异体移植免疫反应、非特异性炎症、毒性反应造成细胞坏死）和机械性因素（如骨隧道壁应力遮挡、移植物微动、隧道位置不良和激进的康复计划等）共同作用的结果^[12]，然而大量文献报道同种异体移植物重建术后隧道扩大更加明显，进一步的具体情况研究较少^[13-14]。鉴于此设计了此次实验，假设是同种异体移植物处置方法通过影响前交叉韧带重建术后腱骨愈合过程中的骨重塑而导致骨质溶解隧道扩大，通过比较使用自体移植物和不同方法处理同种异体移植物进行前交叉韧带重建术后腱骨界面的骨微观结构变化和破骨细胞的表达，探讨处置方法对腱骨愈合的影响，为临床合理选择同种异体移植物提供实验依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验，组间比较采用 ANOVA 单因素方差分析。

1.2 时间及地点 实验于 2017 年 9 月在四川大学动物实验中心开展，部分数据统计及分析在西北民族大学第一附属医院（宁夏回族自治区人民医院）实施。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 32 只成年健康雄性比格犬来自四川大学动物实验中心，许可证号：SYXK(川)2019-117，体质量 (9.2±3.2) kg。

动物精神状况好,运动能力佳,膝部无外伤破溃,被动关节活动度和关节稳定性检查均正常。动物分笼饲养,仅限笼内活动,适应性饲养2周后进行手术;饲养条件:温度20~25℃和湿度(45±5)%;喂养和处置均遵照国家实验动物饲养及使用标准和《关于善待实验动物的指导性意见》执行。实验已获得四川大学动物实验伦理审查委员会(编号:2019137A)和宁夏回族自治区人民医院(编号:2020-KY-125)批准。

1.3.2 实验材料 聚醚醚酮螺钉由上海复旦大学附属华山医院骨科实验室提供,该螺钉临床上已在使用,螺钉规格:3.5 mm×10 mm;批次号:BD1701004。抗酒石酸酸性磷酸酶试剂盒购自美国Sigma公司。速眠新II注射液(盐酸赛拉嗪注射液)(批号:2017-070031582)、地西洋注射液(批号:国药准字H12020957)、硫酸阿托品注射液(批号:国药准字H41020324)、青霉素注射液(批号:B160823)均由四川大学动物实验中心提供。Analysis 12.0软件为Quantum GX micro CT系统自带软件;其余包括ImageJ 13.0软件、3D-Slicer 4.8软件、Netfabb软件、Fiji插件和BoneJ插件均为开源软件及插件。

1.4 实验方法

1.4.1 实验分组及干预 采用抛硬币法将32只犬随机分为A、B、C、D 4组,每组8只。每只犬双侧后膝建立前交叉韧带断裂模型,4组按照使用的移植物不同进行前交叉韧带重建手术。C、D组的同种异体移植物来源于四川大学临床医学院实验技能培训中心,系医学生进行临床技能操作实验后获取的比格犬跟腱,取材动物未进行过感染相关或者药物毒性相关实验,之前接受过的实验对跟腱性能无显著影响。从动物死亡到移植物获取的时间间隔小于0.5 h。

A组:即新鲜自体移植物,以自体新鲜跟腱的中1/3束作为前交叉韧带重建的移植物。

B组:即新鲜同种异体移植物组,以同组另一只犬新鲜跟腱的中1/3束作为移植物。

C组:即 γ 射线辐照后低温冷藏同种异体移植物组。同种异体跟腱移植物获取后立即分装,25 kGy剂量下 γ 射线辐照24 h,随后逐渐降温(先4℃ 0.5 h→随后-20℃ 0.5 h→最后-80℃)后保存备用。 γ 射线辐照在四川省辐射工程技术中心完成。

D组:即冻干后经 γ 射线辐照同种异体移植物组。同种异体移植物获取后先进行预冷冻、升华干燥、解吸干燥等冻干处理(移植物含水量<3%),接着双层包装分装,25 kGy剂量 γ 射线辐照24 h,最后4℃冰箱中保存备用。 γ 射线辐照在四川省辐射工程技术中心完成。

1.4.2 前交叉韧带重建手术 每只动物双侧后膝同时造模,术前麻醉下证实关节稳定性良好。臀部肌注速眠新II(0.1 mL/kg)+地西洋注射液1 mL+硫酸阿托品1 mL麻醉。麻醉满意后取膝正中皮肤切口,沿髌骨内侧缘切开并显露关节腔;确认前交叉韧带形态及张力良好,关节软骨无磨损。沿前交叉韧带两端止点切断,预留1 mm残端,前抽屉试验和Lachman试验阳性提示前交叉韧带损伤、膝关节不稳造模成功。

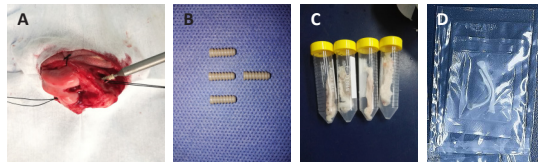
C组移植物术前从冰箱拿出,40℃生理盐水中复温1 h,随后室温下生理盐水纱布包裹备用,使用前确认冰晶已全部融化;D组移植物术前取出,在室温生理盐水中水化2 h,充分变软后使用。所有移植物两端用爱惜康3-0慕丝线锁边缝合后备用。

以残端足印区定位前交叉韧带重建的中心点,钻头直径4.0 mm,先极度屈膝建立股骨隧道,后钻胫骨隧道。钻头方向与股骨纵轴夹角65°~70°;与胫骨平台呈25°~30°,胫骨矢状面夹角15°~30°。将移植物依次引入隧道,先用聚醚醚酮螺钉自外向内固定股骨端,伸直位拉紧移植物后聚醚醚酮螺钉从外向内固定胫骨侧,两端缝线加强缝合在周围软组织和骨膜上。复位髌骨被动活动移植物与髌间窝顶部及内、外侧髌无撞击,前抽屉试验及Lachman试验阴性提示重建模型成功。冲洗后关闭切口,无需包扎,不限制活动。碘伏消毒切口并肌注青霉素 2.5×10^4 U/kg预防感染,1次/d,共3 d,不必拆线,正常饲养至取材(图1)。

1.4.3 MicroCT扫描 术后3,6个月,膝关节稳定性测试后每组处死4只动物取材,进行Micro CT扫描。大体观察后剔除周围软组织仅保留前交叉韧带,制备股骨-移植物-胫骨复合体扫描标本。自膝关节线远近端各5 cm处离断,体积分数10%中性甲醛溶液中固定72 h后湿盐水纱布包裹,扫描前PBS冲洗标本2次,扫描过程中确保标本湿润。将标本固定于Quantum GX micro CT(PerkinElmer公司,美国)载物台上,标本纵轴与检查床滑轨的移动方向平行,每个标本获得512张图片。

将DICOM格式图像导入ImageJ 13.0软件进行骨结构分析,使用Fiji插件和BoneJ插件自隧道中心位置纵向裁切,手动选取隧道周围2 mm层厚的6个点范围为感兴趣区域进行分析。由2名实验员独立测量感兴趣区域内的骨结构指标参数:①骨小梁数量:每mm长度骨小梁平均数量,骨小梁数量越多提示成骨质量越好;②骨小梁厚度:指骨小梁的平均厚度,其值越大提示成骨质量越好;③骨小梁分离度:即2个骨小梁之间髓腔平均宽度,其值越小提示成骨质量越好;④连接密度:表示每立方毫米体积内骨小梁网状结构之间的连接数量;⑤骨体积与总体积比值:表示骨体积与组织体积的比值,可反映骨量变化情况;⑥各向异性程度:是衡量骨小梁排列方向和骨小梁对称性承重的指标;⑦结构模型指数:通过计算骨骼表面的曲率来描述骨小梁板状结构和杆状结构的程度。测量3次后取平均值,进行统计分析(图2A)。

将DICOM格式连续层面图像导入3D-Slicer 4.8软件进行3D建模,勾画隧道的位置和形态,将建好的模型导入Netfabb三维后处理软件进行进一步的处理,包括统一坐标、图像分割、图像渲染、沿骨隧道纵向剖开等。按照OHORI等^[15]的方法,将经过软件处理后的3D隧道提取出来,股骨隧道和胫骨隧道分开测量并分别进行分析;利用Netfabb软件自带的测量工具,经布尔运算计算后可直接读取测量平面面积。每个隧道选择3个平面,隧道内口平面和隧道外口平面根据

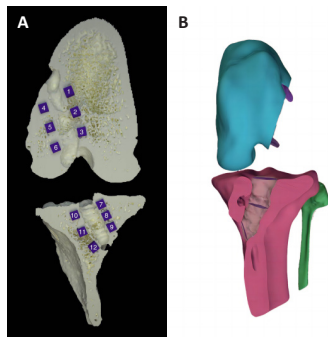


图注: A 为前交叉韧带重建手术过程; B 为聚醚醚酮螺钉; C 为 γ 射线辐照后低温冷藏同种异体移植骨; D 为冻干后经 γ 射线辐照同种异体移植骨

图 1 | 动物模型制备过程

Figure 1 | Process of animal model preparation

建好的模型直接确定; 隧道中间平面确定时首先测量隧道长度, 确定中间 1/2 点, 随后调出分割骨隧道的切面, 隧道中间平面为经过隧道长度中间 1/2 点并且垂直分割骨隧道的切面 (图 2B)。



图注: A 为骨微观结构参数测量感兴趣区域标记点, 图中数据代表标记点, 胫骨和股骨每个隧道各选 6 个区域; B 为骨隧道 3D 建模和测量平面

图 2 | 骨微观结构参数测量感兴趣区域与骨隧道 3D 建模和测量平面

Figure 2 | Region of interest for measuring bone microstructural parameters and 3D modeling and measuring plane of bone tunnel

1.4.4 抗酒石酸酸性磷酸酶染色组织学评价 Micro CT 扫描完成后, 将标本置于二乙烯四乙酸二钠脱钙液中 6-8 周, 随后沿髓骨界面剖开, 并制备成 10.0 mm×5.0 mm×2.0 mm 组织块。常规包埋切片脱蜡及梯度乙醇脱水后, 行抗酒石酸酸性磷酸酶染色。采用 Imager A2 倒置荧光显微镜沿髓-骨交界部位进行图像采集, 每张切片各采集 3-6 张图像进行分析。结果解读: 阳性细胞为 ≥ 3 个核的酒红色多核细胞, 细胞核呈蓝色, 提示破骨细胞。

1.5 主要观察指标 各组股骨-移植骨-胫骨复合体骨微观结构参数测量与骨隧道面积测量结果。

1.6 统计学分析 应用 SPSS 21.0 软件和 Graphpad Prism 7.0 软件进行统计分析和作图。Shapiro-Wilk 检验满足正态分布时数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 ANOVA 单因素方差分析和 SNK 检验进行, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。数据统计分析已经由宁夏回族自治区人民医院统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验过程中动物无死亡, 无影响实验结果的并发症发生, 32 只犬全部进入结果分析。

2.2 各组股骨-移植骨-胫骨复合体体视显微镜观察结果取材后沿隧道方向剖开进行体视显微镜下观察。术后 3 个月, 除 D 组外, 其余 3 组髓-骨-螺钉界面结合紧密, A 组螺钉周围见软骨样组织充填; D 组在整个隧道范围内髓-骨-螺钉结合情况并非一致, 部分区域结合疏松, 移植骨部分吸收, 遗留明显空隙, 螺钉与移植骨易于分开。术后 6 个月, D 组 2 例标本胫骨隧道内口仍可见空隙形成, 余髓骨螺钉界面结

合紧密。

2.3 各组股骨-移植骨-胫骨复合体 Micro CT 扫描结果

2.3.1 骨微观结构指标测量结果 见表 1, 图 3。

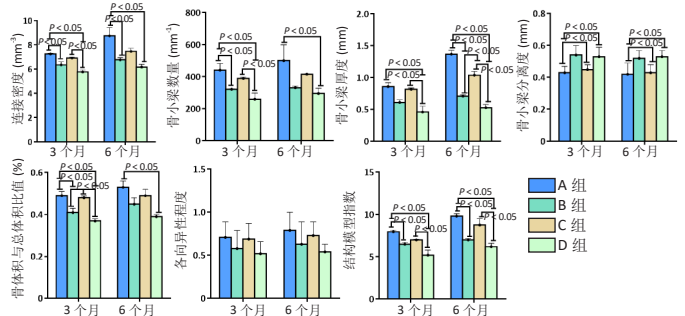
表 1 | 各组股骨-移植骨-胫骨复合体 Micro CT 骨形态结构学参数测量结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 1 | Results of bone morphological and structural parameters measured on Micro CT in femor-graft-tibia complex in each group

参数	术后 3 个月			
	A 组	B 组	C 组	D 组
连接密度 (mm^{-3})	7.27±0.04	6.36±0.26 ^a	6.93±0.07	5.78±0.17 ^{ab}
骨小梁数量 (mm^{-1})	442.25±41.18	322.06±3.27 ^a	389.75±7.07	260.31±38.44 ^{ab}
骨小梁厚度 (mm)	0.86±0.06	0.61±0.04	0.82±0.02	0.46±0.09 ^{ab}
骨小梁分离度 (mm)	0.43±0.04	0.54±0.06 ^a	0.45±0.03	0.53±0.06 ^a
骨体积与总体积比值 (%)	0.49±0.02	0.41±0.02 ^{ab}	0.48±0.01	0.37±0.01 ^{ab}
各向异性程度	0.71±0.18	0.58±0.21	0.69±0.18	0.52±0.14
结构模型指数	7.97±0.21	6.51±0.22 ^a	7.01±0.05	5.21±0.59 ^{ab}

参数	术后 6 个月			
	A 组	B 组	C 组	D 组
连接密度 (mm^{-3})	8.76±0.67	6.79±0.17 ^a	7.48±0.24	6.19±0.23 ^a
骨小梁数量 (mm^{-1})	501.37±98.18	331.85±10.04	417.24±2.10	296.50±31.64 ^a
骨小梁厚度 (mm)	1.37±0.06	0.71±0.02 ^{ab}	1.04±0.06	0.53±0.05 ^{ab}
骨小梁分离度 (mm)	0.42±0.07	0.52±0.05 ^a	0.43±0.05	0.53±0.04 ^a
骨体积与总体积比值 (%)	0.53±0.03	0.45±0.03	0.49±0.03	0.39±0.01 ^a
各向异性程度	0.79±0.21	0.63±0.26	0.73±0.16	0.54±0.09
结构模型指数	9.83±0.28	7.01±0.15 ^a	8.77±0.73	6.21±0.40 ^{ab}

表注: A 组以新鲜自体跟腱为移植骨, B 组以新鲜同种异体跟腱为移植骨, C 组以 γ 射线辐照后低温冷藏的同种异体跟腱为移植骨, D 组以冻干后经 γ 射线辐照的同种异体跟腱为移植骨。与同时点 A 组相比, ^a $P < 0.05$; 与同时点 C 组相比, ^b $P < 0.05$



图注: A 组以新鲜自体跟腱为移植骨, B 组以新鲜同种异体跟腱为移植骨, C 组以 γ 射线辐照后低温冷藏的同种异体跟腱为移植骨, D 组以冻干后经 γ 射线辐照的同种异体跟腱为移植骨

图 3 | 各组股骨-移植骨-胫骨复合体骨微观结构指标测量结果统计图
Figure 3 | Statistics of bone microstructural parameters in femor-graft-tibia complex of each group

术后 3 个月, D 组连接密度、骨小梁数量、骨小梁厚度、骨体积与总体积比值及结构模型指数均低于 A、C 组 ($P < 0.05$), 骨小梁分离度高于 A 组 ($P=0.000$); B 组连接密度、骨小梁数量、结构模型指数低于 A 组 ($P < 0.05$), 骨小梁分离度高于 A 组 ($P=0.002$), 骨体积与总体积比值低于 A、C 组 ($P < 0.05$); 其余组间各指标比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。

术后 6 个月, D 组连接密度、骨小梁数量、骨体积与总体积比值均低于 A 组 ($P < 0.05$), 骨小梁厚度、结构模型指数低于 A、C 组 ($P < 0.05$), 骨小梁分离度高于 A 组 ($P < 0.05$); B 组连接密度、结构模型指数低于 A 组 ($P < 0.05$), 骨小梁厚度低于 A、C 组 ($P < 0.05$), 骨小梁分离度高于 A 组 ($P < 0.05$); 其余组间各指标比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。

2.3.2 骨隧道面积测量结果 见表 2。

表 2 | 各组股骨-移植骨-胫骨复合骨隧道面积比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$, mm^2)
Table 2 | Comparison of bone tunnel area in femor-graft-tibia complex among groups

隧道部位	术后 3 个月股骨隧道			
	A 组	B 组	C 组	D 组
隧道内口	22.00±0.81	23.75±0.96	22.75±0.96	25.25±0.96 ^{bc}
隧道外口	16.75±0.50	17.50±0.58	17.00±0.82	18.00±0.82
隧道中部	19.75±0.96	21.50±1.29 ^a	20.25±0.96	22.50±1.00 ^{bc}
隧道部位	术后 6 个月股骨隧道			
	A 组	B 组	C 组	D 组
隧道内口	23.75±0.50	26.00±0.82 ^a	25.25±0.96	29.50±1.91 ^{abc}
隧道外口	17.50±0.58	19.00±0.82	18.75±0.96	19.75±0.50 ^a
隧道中部	21.75±0.96	23.25±1.26 ^a	22.25±0.96	26.25±2.21 ^a
隧道部位	术后 3 个月胫骨隧道			
	A 组	B 组	C 组	D 组
隧道内口	19.50±0.68	24.30±1.50 ^a	21.00±1.50	27.00±1.40 ^a
隧道外口	12.00±0.00	12.50±0.68	12.50±0.68	13.50±0.68
隧道中部	18.50±0.68	22.50±0.68	20.50±2.10	26.00±1.40 ^a
隧道部位	术后 6 个月胫骨隧道			
	A 组	B 组	C 组	D 组
隧道内口	20.50±1.00	24.50±0.68 ^a	24.00±1.40	27.60±1.50 ^{bc}
隧道外口	12.50±0.68	13.00±0.00	12.50±0.68	14.00±1.40
隧道中部	20.50±0.68	24.00±0.00	22.00±1.40	27.50±2.10 ^{bc}

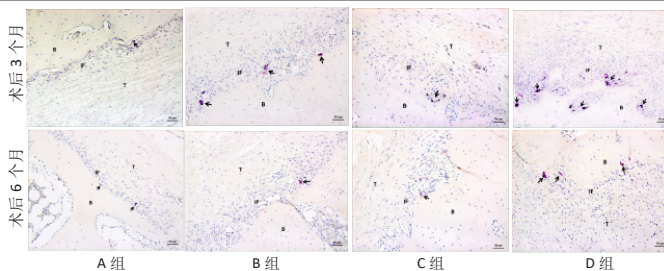
表注: A 组以新鲜自体跟腱为移植骨, B 组以新鲜同种异体跟腱为移植骨, C 组以 γ 射线辐照后低温冷藏的同种异体跟腱为移植骨, D 组以冻干后经 γ 射线辐照的同种异体跟腱为移植骨。与同时点 A 组相比, ^a $P < 0.05$; 与同时点 B 组相比, ^b $P < 0.05$; 与同时点 C 组相比, ^c $P < 0.05$

股骨隧道面积: 术后 3 个月, D 组隧道内口扩大程度高于 A、C 组 ($P=0.003$, $P=0.001$), D 组隧道中部扩大程度高于 A、C 组 ($P=0.016$, $P=0.012$), B 组隧道中部扩大程度高于 A 组 ($P < 0.05$); 其余组间比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。术后 6 个月, 在隧道内口, D 组隧道内口扩大程度均高于其他 3 组 ($P=0.001$, $P=0.014$, $P=0.001$), B 组隧道内口扩大高于 A ($P=0.001$); D 组隧道中部扩大程度高于 A 组 ($P=0.023$), B 组隧道中部扩大程度高于 A 组 ($P=0.002$); 其余组间比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。

胫骨隧道面积: 术后 3 个月, D 组隧道内口扩大程度高于 A 组 ($P=0.008$), B 组隧道内口扩大高于 A 组 ($P=0.002$); D 组隧道中部扩大程度高于 A 组 ($P=0.022$); 其余组间比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。术后 6 个月, D 组隧道内口扩大程度高于 A、C 组 ($P=0.012$, $P=0.012$), B 组隧道内口扩大程度高于 A 组 ($P=0.005$); D 组隧道中部扩大程度高于 A、C 组 ($P=0.012$, $P=0.018$); 其余组间比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。

2.4 各组股骨-移植骨-胫骨复合体抗酒石酸酸性磷酸酶染色结果 见图 4。

抗酒石酸酸性磷酸酶染色阳性细胞的细胞浆呈紫红色, 细胞核呈蓝色。阳性表达区域位于前交叉韧带重建术后的骨隧道壁、腱骨界面的新生骨壁及骨髓腔内。阳性细胞主要为破骨细胞, 未完全分化成熟的破骨细胞前体也表达阳性, 但表达稍弱且着色偏淡。



图注: A 组以新鲜自体跟腱为移植骨, B 组以新鲜同种异体跟腱为移植骨, C 组以 γ 射线辐照后低温冷藏的同种异体跟腱为移植骨, D 组以冻干后经 γ 射线辐照的同种异体跟腱为移植骨。A、C 组腱骨界面可见单个分布的阳性细胞, 着色浅体积小, 胞核呈单核状, 类似于未发育成熟的破骨细胞前体; B、D 组腱骨界面阳性细胞着色更深、胞核更大, 数量更多。B 代表骨, T 代表肌腱, IF 代表腱骨界面, 黑色箭头指示破骨细胞, 标尺 =50 μm

Figure 4 | Tartrate-resistant acid phosphatase staining of femor-graft-tibia complex in each group

术后 3 个月, A、C 组腱骨界面可见散在分布的阳性细胞, 着色深但体积小; B、D 组沿腱骨界面可见着色深、胞核更大的阳性细胞, 细胞数量多于 A、C 组。

术后 6 个月, A、C 组腱骨界面可见单个分布的阳性细胞, 着色浅体积小, 胞核呈单核状, 类似于未发育成熟的破骨细胞前体; B、D 组腱骨界面阳性细胞着色更深、胞核更大, 数量更多, 提示破骨细胞更加成熟, 功能更加活跃。

3 讨论 Discussion

前交叉韧带重建术后的腱骨愈合是两种性质不同组织的相互连接融合的复杂过程, 涉及到由软的移植骨向硬的骨结构移行的过渡区域, 腱骨愈合过程受多种因素的影响, 其实质实际上是腱骨止点重新形成的过程^[16-18]。尽管前交叉韧带重建手术从宏观空间上恢复了韧带的连续性, 但是想要获得长久稳定的关节则必须依赖于微观结构上良好的腱骨愈合。腱骨愈合与手术成败和患者术后恢复情况密切相关, 腱骨愈合不良会导致骨质溶解骨隧道扩大, 而最早是在应用同种异体移植骨中发现了隧道扩大现象^[19]。SCHÄR MICHAEL 等^[20]在研究中发现, 腱骨愈合过程以骨向肌腱方向生长占主要地位而不是肌腱向骨内长入。隧道扩大与腱骨愈合界面在骨重塑时的骨形成和骨吸收失衡有关, 尤其是与破骨细胞介导的骨吸收关系密切。然而, 以往的研究要么着眼于移植肌腱的转归方面, 要么集中于促进腱骨界面的骨形成方面, 对于骨丢失方面研究的较少^[21-22]。尽管 HJORTH AUG 等^[23]在通过单剂量唑来膦酸抑制破骨细胞来增强腱骨愈合的研究中取得了阴性结果, 然而他指出研究方向是合理的。FENG 等^[24]也认为破骨细胞是治疗腱骨界面骨溶解的一个很有前途的靶点, 并与改善腱-骨愈合强度和更好的临床结果有关。因此, 研究腱骨愈合界面的骨重塑问题具有重要意义。

同种异体肌腱作为前交叉韧带重建的移植骨一直备受争议, 讨论的焦点在于使用前消毒保存的处理上^[8, 25-26]。同种异体移植骨的消毒方法多样, 包括物理方法 (γ 射线辐照、电

子束、巴氏消毒法、干热及湿热灭菌法等)和化学方法(环氧乙烷、乙醇等药物浸泡、BioCleanse®等)等多个方面,其中 γ 射线辐照是临床上最常用的方法。 γ 射线是由同位素 ^{60}Co 产生的电子束,通过电离辐射作用产生电离和激发作用在物体上并释放轨道电子形成自由基,破坏微生物的核酸分子、蛋白质以及细胞活性酶从而起到灭菌作用。 γ 射线辐照的消毒作用存在剂量依赖性,辐照剂量过大会破坏移植物的胶原纤维,导致交联密度减少,影响移植物的结构性能和生物力学特性,然而究竟多大的辐照剂量才是安全的目前仍没有定论^[27]。保存是同种异体移植物使用前的重要环节,常用的保存方法包括冷冻保存、玻璃化法保存和冻干保存3类,冷冻保存可进一步区分为普通低温保存、深低温保存和超深低温保存。低温冷冻保存过程中移植物细胞周围容易形成大量的冰晶而对移植物产生损伤作用,为降低冰晶引起的细胞损害,移植物冻融过程常采取“缓慢降温、快速复温”原则。冻干保存移植物最大的优势是保存和携带方便,冻干后移植物含水量低于5%,室温下可保存5年左右。冻干保存的移植物使用前需要进行充分的水化后才能应用^[28]。YU等^[27]通过研究以往的手术方案后发现,10 190例同种异体移植物前交叉韧带重建的手术中,8 425例(82.7%)同种异体肌腱术前进行过辐照或者化学方法处理。正是由于同种异体移植物使用前消毒保存的处理过程,已有大量研究发现相比于自体移植物,同种异体移植物的细胞爬行替代和再血管化程度都更加缓慢,容易出现因腱骨愈合延迟导致的隧道扩大现象^[29-30],然而进一步的具体情况研究较少,尤其是对腱骨愈合过程中骨重塑带来的影响鲜有报道。此次实验发现,无论是自体移植物还是同种异体移植物,4组间隧道扩大程度并不完全一致:术后同一时间点,冻干组无论在股骨隧道还是胫骨隧道扩大程度都是最大的;新鲜同种异体组术后隧道扩大也较明显,与自体移植物组相比有统计学意义;冷藏组尽管术后也存在隧道扩大,但与新鲜自体组相比无统计学意义。此次实验结果说明,同种异体移植物处置方法对术后的骨隧道扩大情况存在影响,与自体移植物相比,不同方法处理的同种异体移植物重建后的骨隧道扩大存在差异,分析可能的原因:通过前期3个月的预实验电镜扫描发现,处置方式影响移植物胶原纤维的排列,新鲜自体移植物和低温冷藏移植物大、小直径纤维分布平整清晰、疏密有致,大直径纤维之间通过稀疏的小直径纤维连接;新鲜同种异体移植物胶原纤维相互粘连融合明显,大、小直径纤维相互交织不易分辨;冻干处理的移植物胶原纤维排列明显紊乱,大、小直径纤维无层次感,多数纤维已见断裂。组织学染色(苏木精-伊红、Masson)也发现,新鲜自体移植物转归进程快、程度高;低温冷藏的同种异体移植物的转归进程和程度近似于新鲜自体移植物;新鲜同种异体移植物炎症反应明显,易出现关节内粘连,胶原纤维间粘连也较明显;冻干处理的移植物脆性高、柔韧性差易断裂,移植物塑形转归的进程及程度均较差。另外,LEE等^[31]指出,前交叉韧带重建术后的骨隧道扩大并不局限于特定的方向,并且可以发生在任何位置。此次实验在

动物造模时按照特定的方向和角度钻取隧道,目的是保证实验组基线的同质性。隧道扩大情况的比较,采用电脑数据建模提取3D隧道形态并选择3个平面进行面积测量,更加直观地再现术后隧道扩大情况。TACHIBANA等^[32]报道前交叉韧带重建术后股骨隧道扩大主要发生在隧道的开口处,而不是在隧道中部;随着时间推移,由于骨长入股骨隧道开口会向前方和远端迁移。然而,此次实验发现除隧道开口处外,隧道中部扩大程度组间比较也有统计学差异。STROBEL等^[33]将隧道扩大类型分为3类即圆柱型、烟筒型和囊袋型。此次实验中发现,隧道中部扩大相当于STROBEL描述的囊袋型,部分原因可能为术中挤压螺钉是自隧道外口向关节内方向拧入的,螺钉并没有完全充填整个隧道,隧道中部及隧道内口的活动度相比于隧道外口更大,因此造成了隧道的进一步扩大。国内学者陈永良等^[34]也发现,隧道内包含无挤压螺钉部分的比例越大,无螺钉部分就更容易扩大。隧道扩大与骨微观结构的改变密不可分,也直接影响着前交叉韧带重建术后腱骨愈合的质量。MARIGI等^[35]利用定量CT发现,最早可在前交叉韧带重建术后8周内检测到胫骨隧道周围骨密度的改变。此次实验发现,A、C组骨微观结构参数均处于较高水平,提示骨退变较轻,骨量丢失较少,骨小梁数量多、连续性好,尽管术后骨隧道也有扩大,但是扩大程度较低;而B、D组表现较差,尤其是D组测量指标多数处于较低水平,与A组和C组相比具有统计学意义,提示骨微观结构退变和骨量丢失,骨小梁数量减少,骨量丢失和骨微观结构改变导致骨隧道显著扩大。

腱骨愈合界面同时存在着骨生成与骨吸收,理想状态下两者处于动态平衡时,骨隧道大小将不会发生变化。然而,无论是此次实验还是以往的研究,均证实前交叉韧带重建术后存在骨隧道扩大现象,不管选择的是自体移植物还是同种异体移植物^[36]。WEILER等^[37]的研究也认为,移植物在隧道内的早期愈合阶段很重要,当形成坚固的腱骨界面时可能会出现应力遮挡后的骨吸收。无论骨吸收还是隧道扩大均与破骨细胞关系密切。RODEO等^[38]认为破骨细胞的异常激活是导致隧道增宽的主要原因。抗酒石酸酸性磷酸酶特异性分布于破骨细胞中,是破骨细胞的标志酶,常作为鉴定破骨细胞的重要标志^[39]。此次实验中组织切片抗酒石酸酸性磷酸酶染色发现,无论A组还是同种异体移植物各组,术后各时间点腱骨交界处隧道壁上均发现了数量不等胞浆呈紫红色、胞核呈蓝色的破骨细胞,提示破骨细胞在骨隧道壁上的附着是普遍存在的,这与Micro CT检查中发现的结果相互吻合,即由破骨细胞介导的骨吸收引起的骨微观结构改变导致的隧道扩大现象是骨进行重建塑形的一种普遍现象,是腱骨愈合的自然发展过程。然而,经过不同方法处置后的同种异体移植物术后抗酒石酸酸性磷酸酶染色结果却存在较大差异:与A组相比,B、D组前交叉韧带重建术后聚集在隧道壁上的破骨细胞染色更深且数量更多,形态杂乱且排列粗乱,外形上更倾向于具有多核巨细胞特征的破骨细胞,提示破骨细胞更加成熟,功能上更加活跃;C组术后聚集在骨隧道壁上的破骨

细胞在形态和数量上类似于 A 组，体积偏小且着色偏淡提示酶活性较低，说明破骨细胞功能低下，类似于未发育成熟的破骨细胞前体。破骨细胞数量增多、功能活跃与移植物重建术后隧道扩大密切相关，但是隧道扩大的严重程度与破骨细胞的量效关系以及同种异体移植物不同处理方法在诱导破骨细胞生成和成熟中所起到的作用还没有明确的关系，有待于进一步的研究。

实验的局限性包括：实验是在比格犬前交叉韧带损伤动物模型上进行的，犬膝关节解剖结构与人类存在显著性差异，如胫骨平台后倾角度更大等；另外，研究仅讨论了移植物处置方式对腱骨愈合过程中骨重塑的影响，没有就腱骨界面移植物的转归进行讨论，这也是将来实验进一步深入的研究方向。此次实验结果表明，前交叉韧带重建术后的骨隧道扩大现象普遍存在，移植物处置方法通过影响腱骨界面的破骨细胞介导的骨吸收导致骨微观结构的改变，从而干预腱骨愈合过程中的骨重塑。进一步的研究重点将是施加药物干预，抑制破骨细胞的分化和活性，从而影响骨吸收，以减少隧道扩大提高腱骨愈合质量。有关处置方式对同种异体移植物的影响远不止目前已发表的研究，还有很多的工作需要广大研究者的共同努力。

作者贡献：实验设计、论文撰写与审校为第一作者尚小可和通讯作者李棋；实验实施、数据收集为郑君、马占军、王浩、马少伟；实验评估为温鹏、胡建中、李箭；全体作者参与实验。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让：文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范：该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

[1] KOC BB, RONDEN AE, VLUGGEN T, et al. Predictors of patient satisfaction after primary hamstring anterior cruciate ligament reconstruction. *Knee*. 2022;34:246-251.

[2] UEDA Y, MATSUSHITA T, SHIBATA Y, et al. Satisfaction with playing pre-injury sports 1 year after anterior cruciate ligament reconstruction using a hamstring autograft. *Knee*. 2021;33:282-289.

[3] WICKIEWICZ TL, EDWARDS JC. Sports-related injuries to the shoulder and knee. *Surg Annu*. 1993;25 Pt 2:193-206.

[4] LIN KM, BOYLE C, MAROM N, et al. Graft Selection in Anterior Cruciate Ligament Reconstruction. *Sports Med Arthrosc Rev*. 2020;28(2):41-48.

[5] ZHAO BA, YAO YY, JI QX, et al. No difference in postoperative efficacy and safety between autograft and allograft in anterior cruciate ligament reconstruction: a retrospective cohort study in 112 patients. *Ann Transl Med*. 2022;10(6):359.

[6] SYLVIA SM, TOPPO AJ, PERRONE GS, et al. Revision Soft-Tissue Allograft Anterior Cruciate Ligament Reconstruction Is Associated With Lower Patient-Reported Outcomes Compared With Primary Anterior Cruciate Ligament Reconstruction in Patients Aged 40 and Older. *Arthroscopy*. 2023;39(1):82-87.

[7] LIU Y, LIU X, LIU Y, et al. Comparison of clinical outcomes of using the nonirradiated and irradiated allograft for anterior cruciate ligament (ACL) reconstruction: A systematic review update and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2022;101(32):e29990.

[8] LANSDOWN DA, RIFF AJ, MEADOWS M, et al. What Factors Influence the Biomechanical Properties of Allograft Tissue for ACL Reconstruction? A Systematic Review. *Clin Orthop Relat Res*. 2017;475(10):2412-2426.

[9] HAMER AJ, STOCKLEY I, ELSON RA. Changes in allograft bone irradiated at different temperatures. *J Bone Joint Surg Br*. 1999;81(2):342-344.

[10] TAKETOMI S, INUI H, YAMAGAMI R, et al. Lateral posterior tibial slope does not affect femoral but does affect tibial tunnel widening following anatomic anterior cruciate ligament reconstruction using a Bone-Patellar Tendon-Bone graft. *Asia Pac J Sports Med Arthrosc Rehabil Technol*. 2022;30:25-31.

[11] LEE DK, KIM JH, LEE SS, et al. Femoral Tunnel Widening After Double-Bundle Anterior Cruciate Ligament Reconstruction With Hamstring Autograft Produces a Small Shift of the Tunnel Position in the Anterior and Distal Direction: Computed Tomography-Based Retrospective Cohort Analysis. *Arthroscopy*. 2021;37(8):2554-2563.e1.

[12] KIMURA M, NAKASE J, ASAI K, et al. Tibial graft fixation methods and bone tunnel enlargement: A comparison between the TensionLoc implant system and the double-spike plate. *Asia Pac J Sports Med Arthrosc Rehabil Technol*. 2022;28:31-37.

[13] YUE L, DEFRODA SF, SULLIVAN K, et al. Mechanisms of Bone Tunnel Enlargement Following Anterior Cruciate Ligament Reconstruction. *JBJS Rev*. 2020;8(4):e0120.

[14] SU M, JIA X, ZHANG Z, et al. Medium-Term (Least 5 Years) Comparative Outcomes in Anterior Cruciate Ligament Reconstruction Using 4SHG, Allograft, and LARS Ligament. *Clin J Sport Med*. 2021;31(2):e101-e110.

[15] OHORI T, MAE T, SHINO K, et al. Tibial tunnel enlargement after anatomic anterior cruciate ligament reconstruction with a bone-patellar tendon-bone graft. Part 1: Morphological change in the tibial tunnel. *J Orthop Sci*. 2019;24(5):861-866.

[16] LIU S, LIN J, LUO Z, et al. Changes in Macrophage Polarization During Tendon-to-Bone Healing After ACL Reconstruction With Insertion-Preserved Hamstring Tendon: Results in a Rabbit Model. *Orthop J Sports Med*. 2022;10(5):23259671221090894.

[17] XU Y, ZHANG WX, WANG LN, et al. Stem cell therapies in tendon-bone healing. *World J Stem Cells*. 2021;13(7):753-775.

[18] LEE WY, KIM YM, HWANG DS, et al. Does Demineralized Bone Matrix Enhance Tendon-to-Bone Healing after Rotator Cuff Repair in a Rabbit Model. *Clin Orthop Surg*. 2021;13(2):216-222.

[19] TISHERMAN R, WILSON K, HORVATH A, et al. Allograft for knee ligament surgery: an American perspective. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2019;27(6):1882-1890.

[20] SCHÄR MICHAEL O, RICHARD M, MARCO D, et al. Use of small animal PET-CT imaging for in vivo assessment of tendon-to-bone healing: A pilot study. *J Orthop Surg (Hong Kong)*. 2022;30(1):23094990221076654.

[21] SHI Q, ZHANG T, CHEN Y, et al. Local Administration of Metformin Improves Bone Microarchitecture and Biomechanical Properties During Ruptured Canine Achilles Tendon-Calcaneus Interface Healing. *Am J Sports Med*. 2022;50(8):2145-2154.

[22] TIE K, CAI J, QIN J, et al. Nanog/NFATc1/Osterix signaling pathway-mediated promotion of bone formation at the tendon-bone interface after ACL reconstruction with De-BMSCs transplantation. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1):576.

[23] HJORTH AUG GA, SØREIDE E, NORDSLETEN L, et al. Negative effect of zoledronic acid on tendon-to-bone healing. *Acta Orthop*. 2018;89(3):360-366.

[24] FENG W, JIN Q, MING-YU Y, et al. MIR-6924-5p-rich exosomes derived from genetically modified Scleraxis-overexpressing PDGFRα(+) BMMSCs as novel nanotherapeutics for treating osteolysis during tendon-bone healing and improving healing strength. *Biomaterials*. 2021;279:121242.

[25] 赵彦涛, 刘思扬, 尹惠琼, 等. γ射线终末辐照对同种异体肌腱病毒灭活效果及生物力学性能影响的研究[J]. *中国骨与关节杂志*, 2018,7(5):389-393.

[26] BAIT C, RANDELLI P, COMPAGNONI R, et al. Italian consensus statement for the use of allografts in ACL reconstructive surgery. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2019;27(6):1873-1881.

[27] YU A, PRENTICE HA, BURFEIND WE, et al. Risk of Infection After Allograft Anterior Cruciate Ligament Reconstruction: Are Nonprocessed Allografts More Likely to Get Infected? A Cohort Study of Over 10,000 Allografts. *Am J Sports Med*. 2018;46(4):846-851.

[28] YU D, PANESAR PS, DELMAN C, et al. Comparing Fusion Rates Between Fresh-Frozen and Freeze-Dried Allografts in Anterior Cervical Discectomy and Fusion. *World Neurosurg*. 2022;16:100126.

[29] SOLOMON R, HOMMEN JP, TRAVASCIO F. Effects of Platelet-Rich Osteoconductive-Osteoinductive Allograft Compound on Tunnel Widening of ACL Reconstruction: A Randomized Blind Analysis Study. *Pathophysiology*. 2022;29(3):394-404.

[30] THAKRAR RR, YASEN SK, KUNDRA R. Allograft use in anterior cruciate ligament reconstruction surgery: a review of the current literature. *Orthop Trauma*. 2019;33(2):76-80.

[31] LEE YS, LEE BK, OH WS, et al. Comparison of femoral tunnel widening between outside-in and trans-tibial double-bundle ACL reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2014;22(9):2033-2039.

[32] TACHIBANA Y, MAE T, SHINO K, et al. Morphological changes in femoral tunnels after anatomic anterior cruciate ligament reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2015;23(12):3591-600.

[33] STROBEL MJ, SCHULZ MS. Anterior cruciate ligament reconstruction with the semitendinosus-gracilis tendon transplant. *Orthopade*. 2002;31(8):758-769.

[34] 陈永良, 徐丛, 吕永明. 关节镜下前交叉韧带重建术后骨隧道扩大与临床疗效的关系[J]. *实用医学杂志*, 2015,31(4):634-637.

[35] MARI GI EM, HOLMES DR, MURTHY N, et al. The Proximal Tibia Loses Bone Mineral Density After Anterior Cruciate Ligament Injury: Measurement Technique and Validation of a Quantitative Computed Tomography Method. *Arthrosc Sports Med Rehabil*. 2021;3(6):e1921-e1930.

[36] AMANO H, TANAKA Y, KITA K, et al. Significant anterior enlargement of femoral tunnel aperture after hamstring ACL reconstruction, compared to bone-patellar tendon-bone graft. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2019;27(2):461-470.

[37] WEILER A, HOFFMANN RF, BAIL HJ, 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. *Arthroscopy*. 2002;18(2):124-135.

[38] RODEO SA, KAWAMURA S, MA CB, et al. The effect of osteoclastic activity on tendon-to-bone healing: an experimental study in rabbits. *J Bone Joint Surg Am*. 2007;89(10):2250-2259.

[39] ZHANG J, FU B, CHEN X, et al. Protocatechuic acid attenuates anterior cruciate ligament transection-induced osteoarthritis by suppressing osteoclastogenesis. *Exp Ther Med*. 2020;19(1):232-240.

(责任编辑: GW, ZN, ZJP)