

- physical activity on the NAD(P)H oxidase and angiotensin receptor system in patients with coronary artery disease[J]. *Circulation*, 2005, 111(5):555—562.
- [23] Wisløff U, Støylen A, Loennechen JP, et al. Superior cardiovascular effect of aerobic interval training versus moderate continuous training in heart failure patients: a randomized study[J]. *Circulation*, 2007, 115(24):3086—3094.
- [24] Whellan DJ, O'Connor CM, Lee KL, et al. Heart failure and a controlled trial investigating outcomes of exercise training (HF-ACTION): design and rationale[J]. *Am Heart J*, 2007, 153(2):201—211.
- [25] Palevo G, Keteyian SJ, Kang M, et al. Resistance exercise training improves heart function and physical fitness in stable patients with heart failure[J]. *J Cardiopulm Rehabil Prev*, 2009, 29(5):294—298.
- [26] McKelvie RS, McCartney N, Tomlinson C, et al. Comparison of hemodynamic responses to cycling and resistance exercise in congestive heart failure secondary to ischemic cardiomyopathy[J]. *Am J Cardiol*, 1995, 76:977—979.
- [27] Hare DL, Ryan TM, Selig SE, et al. Resistance exercise training increases muscle strength, endurance, and blood flow in patients with chronic heart failure[J]. *Am J Cardiol*, 1999, 83(12):1674—1677.
- [28] Oka RK, De Marco T, Haskell WL, et al. Impact of a home-based walking and resistance training program on quality of life in patients with heart failure[J]. *Am J Cardiol*, 2000, 85(3):365—369.
- [29] Pu CT, Johnson MT, Forman DE, et al. Randomized trial of progressive resistance training to counteract the myopathy of chronic heart failure[J]. *J Appl Physiol*, 2001, 90(6):2341—2350.
- [30] Selig SE, Carey MF, Menzies DG, et al. Moderate-intensity resistance exercise training in patients with chronic heart failure improves strength, endurance, heart rate variability, and forearm blood flow[J]. *J Card Fail*, 2004, 10(1):21—30.
- [31] Levinger I, Bronks R, Cody DV, et al. The effect of resistance training on left ventricular function and structure of patients with chronic heart failure[J]. *Int J Cardiol*, 2005, 105: 159—163.
- [32] Swank AM, Funk DC, Manire JT, et al. Effect of resistance training and aerobic conditioning on muscular strength and submaximal fitness for individuals with chronic heart failure: influence of age and gender[J]. *J Strength Cond Res*, 2010, 24(5):1298—1305.

·综述·

激活肌腱干细胞:启动肌腱再生的条件?

宋海新¹ 陈晓² 李建华^{3,4}

肌腱损伤是临床上的一种常见病,好发于各种外伤及剧烈运动过程中,由于肌腱自身再生能力较差,由传统治疗再生的肌腱主要是由瘢痕组织构成,很难达到结构的完整性及满足生理活动所需的强度^[1-2]。近年来,组织工程技术的发展给肌腱损伤的治疗带来了新的希望,组织工程技术包括种子细胞、支架材料和生长因子三要素,干细胞具有全能性及自我更新能力,因而是组织工程首选的种子细胞。肌腱组织工程的常用种子细胞主要有自体肌腱细胞、成纤维细胞、间充质干细胞等^[3]。随着人们对肌腱损伤研究兴趣的增加,有学者发现在肌腱组织中存在一些特殊的细胞群,这类细胞具有自我更新及多向分化的潜能^[4-5],2007年Bi等^[6]直接从人和鼠的肌腱组织中成功的分离提取出这种细胞,发现在体外培养时这种细胞表现出克隆形成能力、自我更新及多向分化潜能等干细胞的普遍特性,而且植入体内后可生成肌腱样组

织,于是将这种细胞群定义为肌腱干/祖细胞(tendon stem/progenitor cells, TSPCs),并提示肌腱干细胞是肌腱组织工程良好的种子细胞。本文主要对肌腱干细胞的特性及近年来以肌腱干细胞作为种子细胞用于肌腱缺损修复的研究成果进行综述,并讨论如何有效的激活肌腱干细胞用于肌腱组织缺损的修复。

1 肌腱干细胞的特性

肌腱干细胞相继从成人、大鼠、小鼠、家兔及人胎儿的肌腱中成功分离获得^[6-9]。与肌腱细胞相比,肌腱干细胞体型较小,多呈鹅卵石形,细胞核较大,表达干细胞的标志基因OCT4、SSEA-4和nucleostemin。而且,不同部位肌腱中的肌腱干细胞的特性可能存在一定的差异,家兔髌韧带来源的肌腱干细胞在克隆的数量和大小以及在细胞增殖速度上明显

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2012.05.025

1 浙江中医药大学第二临床医学院; 2 浙江大学医学院干细胞与组织工程中心; 3 浙江大学医学院附属邵逸夫医院康复医学科; 4 通讯作者

作者简介:宋海新,男,硕士研究生; 收稿日期:2011-11-03

高于跟腱来源的肌腱干细胞^[8],不同年龄大鼠的肌腱提取的肌腱干细胞在自我更新和分化能力方面也存在差异,从24—26个月的大鼠肌腱中分离的肌腱干细胞与从3—4个月的大鼠中分离得到的相比,肌腱干细胞的数量减少70%,老年大鼠的肌腱组织来源的肌腱干细胞克隆形成能力降低,增值率下降,细胞周期延迟,细胞命运改变^[10]。

1.1 肌腱干细胞的免疫表型

肌腱干细胞具有和间充质干细胞等普通干细胞类似的表面抗原,目前已证明的细胞表面标志物为CD90、CD90.1、CD90.2、CD44、CD105、CD146、Sca-1、Stro-1、nucleostemin、Oct-4及SSEA-4,但肌腱干细胞不具有CD18、CD31、CD34、CD45、CD106、CD117、CD144及Flk-1的抗原^[6-12]。Zhou等^[10]研究发现,老年及幼年大鼠所表现出的免疫表型不同:两种大鼠分离出的肌腱干细胞均表达nucleostemin、Oct-4和SSEA-4,老年大鼠来源的肌腱干细胞CD90.1的表达水平低于幼年大鼠来源的肌腱干细胞,但CD44的表达水平与之相反。有学者研究发现CD44是多种组织损伤后修复期的标志,在羊胚胎肌腱愈合形成疤痕期时表达量下调,并且在鼠类髌韧带损伤修复时CD44表达量降低^[13],以上研究表明肌腱干细胞的修复能力与提取个体的年龄有关,年龄越大修复能力越差^[10]。

1.2 肌腱干细胞的增殖和分化潜能

肌腱干细胞在增殖速度上具有与其他干细胞类似的特性,在低密度种植时增殖速度较快。Zhang等^[8,14]研究报道,从家兔髌韧带中分离获得的肌腱干细胞在克隆形成能力和增值速度上优于跟腱组织,而且低强度的力学刺激可以促进肌腱干细胞的增殖能力^[14],同时,高水平的炎症因子PGE2对肌腱干细胞的增殖有明显的抑制作用^[15]。Zhou等^[10]研究发现从幼年大鼠肌腱中提取的肌腱干细胞在增殖速度及克隆形成能力上优于老年大鼠。肌腱干细胞的多向分化及自我更新能力优于相同个体来源的间充质干细胞,在体外培养及体内移植时,肌腱干细胞均可表现出向骨、软骨和脂系分化的潜能^[6]。这一点说明肌腱干细胞可能是更理想的肌腱组织工程的种子细胞。

2 影响肌腱干细胞分化的因素

对于调控肌腱干细胞定向分化的信号机制及诱导因素并不十分明确,细胞生长的微环境及各种外界刺激对干细胞的分化方向有重要的影响。目前的研究数据表明,生物力学刺激、生物活性因子、细胞外基质纳米结构等对肌腱干细胞的命运有重要的调控作用。

2.1 生物力学刺激

肌腱是连接骨和肌肉的重要组织结构,由于其结构的特殊性,所以一直处于机械负荷状态,肌腱的新陈代谢及各种

生理活动与力学刺激息息相关。Rui等^[16]在体外培养肌腱干细胞时观察反复的拉伸负荷对肌腱干细胞内成骨蛋白2(BMP2)表达的影响及成骨蛋白2对肌腱干细胞向骨系分化的影响,研究发现反复的拉力负荷增加了肌腱干细胞中成骨蛋白2的表达,成骨蛋白2的增加促进肌腱干细胞向骨系的分化,说明了肌腱受到反复的高强度的拉伸负荷后可增加成骨蛋白2的表达,使肌腱更容易发生钙化。Zhang等^[14]研究发现,低强度的生物力学刺激可以促进肌腱干细胞向肌腱细胞分化,高强度的力学刺激可导致向脂肪、骨、软骨分化,而且在经过1周的跑台运动训练的小鼠体内分离出的肌腱干细胞合成胶原的能力显著提高^[11]。

2.2 生物活性因子

干细胞的生长分化及其他的生理功能离不开其特定的微环境,微环境中的各种生物活性因子是调控干细胞行使生理功能的重要因素,例如,造血干细胞脱离其解剖位置便失去造血功能^[17],同样,肌腱干细胞维持肌腱的自我平衡也受到其他生物活性因子的调控。Zhang等^[15]研究发现,肌腱干细胞对肌腱中的一种主要的炎症介质前列腺素E2(PGE2)存在着明显的剂量依赖,高水平的PGE2对肌腱干细胞的增殖有明显的抑制作用,而且导致肌腱干细胞向脂系及骨系分化,可以解释为什么过量的运动负荷引起肌腱中脂肪组织及钙结节的形成。在另一项研究中,该学者用富含血小板的血浆对损伤后的肌腱处理后,发现可促进肌腱干细胞增殖及形态增大,且排列更加有序,肌腱相关基因和蛋白表达及胶原含量升高,而且更重要的是可以促进肌腱干细胞向肌腱细胞分化,用于肌腱损伤后的修复^[12]。Scutt等^[18]研究发现糖皮质激素对肌腱干细胞的募集及肌腱细胞胶原的合成有抑制作用,在体外培养肌腱干细胞时,当地塞米松的浓度大于10nm时菌落的数量和大小明显减小,而且加入地塞米松的培养基中胶原的合成受到抑制。Pryce等^[18]通过破坏胚胎中TGF β 信号通路后发现,胚胎肢体中大部分肌腱缺失,证明TGF β 信号对肌腱发育形成中具有重要的调控作用。

2.3 细胞外基质

细胞外基质是经过细胞合成后分泌至细胞外的成分,包括纤维性成分、连接蛋白及空间填充分子等,以及细胞外基质中含有的各种生物活性分子^[19-21],对细胞的增殖和分化发挥重要调控作用。Bi等^[6]研究发现细胞外基质中的二聚糖和纤调蛋白聚糖是促进肌腱干细胞定向分化修复肌腱损伤的重要成分;Beattie等^[22]利用猪膀胱脱去细胞的细胞外基质支架修复小鼠跟腱缺损,研究发现,细胞外基质中含有天然的可溶性生长因子及多肽,在细胞外基质降解后释放于组织中,可促进肌腱干细胞向缺损部位迁移,促进肌腱的修复。Zhang等^[23]研究发现肌腱细胞外基质可以增强肌腱干细胞的干性,促进肌腱干细胞形成肌腱样组织。

3 激活肌腱干细胞修复肌腱损伤

在体育运动中,急性及慢性的肌腱损伤比较常见^[24],肌腱损伤后恢复较缓慢,其结构和功能的重建是矫形外科和康复医学领域的一项巨大挑战,损伤处所形成的纤维组织疤痕在结构和功能上的不足增加了第二次损伤的风险^[25]。肌腱组织工程研究为肌腱损伤的治疗提供了新的思路,现有研究表明来源于肌腱组织本身的肌腱干细胞是肌腱组织工程良好的种子细胞^[6],如何有效地激活肌腱干细胞向肌腱细胞分化,提高损伤部位修复效率是目前研究的难度和重点,此方向的突破性进展将具有不可估量的临床价值。

3.1 激活内源性肌腱干细胞

成体干细胞在组织内以保持沉默态和处于激活态两种方式并存的形式存在,对正常组织的生理性稳态的维持和损伤组织的再生具有重要的调节作用^[26]。肌腱损伤后自愈能力较差的原因并非肌腱中不含有干细胞,而是肌腱干细胞处于沉默状态。因此,如何有效地激活内源性肌腱干细胞并诱导其向肌腱细胞分化,是治疗肌腱损伤后再生的新思路。如前文所述,生物活性因子、力学刺激、细胞外基质成分等可激活内源性肌腱干细胞,促进肌腱干细胞向肌腱细胞分化,进而调节肌腱内部的稳态。Zhang等^[11]在对小鼠进行1周的运动锻炼后,肌腱中肌腱干细胞的含量增加1倍。有研究表明肌腱内钙化灶的形成可能是一种细胞介导的通路被激活引起的,而不是无机盐离子的沉积^[27-28]。Rui等^[29]认为肌腱干细胞的错误分化引起肌腱细胞的数量降低,修复再生能力下降从而导致肌腱腱病的发生。所以在激活肌腱干细胞的同时,正确的诱导肌腱干细胞向腱系分化也是修复肌腱损伤的重要环节。

3.2 植入外源性肌腱干细胞

肌腱干细胞存在于由平行排列的胶原纤维组成的微环境中,而这种微环境对调节肌腱干细胞的功能和分化有重要的作用^[30]。Yin等^[7]将肌腱干细胞种在平行排列及随机排列的纳米纺丝材料中,然后移植入大鼠跟腱缺损部位,研究这两种形态的生物支架对肌腱干细胞分化效果的影响,结果显示平行排列的纳米纤维支架组在细胞排列、肌腱系基因的表达方面明显优于随机排列的纳米纤维支架组,同时将这两种支架和肌腱干细胞放在骨诱导培养基中培养时发现,将肌腱干细胞种植于平行排列的纳米纤维支架上具有抑制其向骨系分化的作用,在体内移植后发现平行排列的电纺丝支架可更好的促进肌腱干细胞向肌腱细胞分化,而且有研究表明平行排列的纳米纤维在力学刺激下可促进韧带细胞有序排列和增值能力^[31],研究中同时检测到与整联蛋白相关的基因上调,证明细胞微环境中的基质可通过由整联蛋白介导的力学转导通路调节肌腱干细胞的分化,进一步表明平行排列的基质形态可激活肌腱干细胞向肌腱细胞分化。

在我们已经结束的研究中,利用新西兰兔肩袖损伤模型,采用同源异体的肌腱干细胞复合蚕丝胶原海绵支架修复损伤部位的肌腱,研究发现:在体外培养肌腱干细胞时,蚕丝胶原海绵支架具有增加肌腱干细胞的附着、增殖及向肌腱细胞分化的能力,体内实验证明肌腱干细胞复合蚕丝胶原支架修复后在功能和结构上均优于单纯蚕丝胶原海绵组,而且免疫组织化学的结果可以得出实验组产生较多的细胞外基质和胶原。有研究发现骨髓间充质干细胞无免疫原性并且可以抑制免疫反应^[32-35],在我们的研究中发现同源的肌腱干细胞具有类似的特性,肌腱干细胞分泌的抗炎因子有效地抑制了免疫排斥及术后炎症反应的发生。

Zhang等^[23]利用肌腱脱细胞基质探索对肌腱干细胞分化的影响,研究发现,体外培养时加入细胞外基质成分后可增加肌腱干细胞的自我更新及多系分化能力,能更好的保持肌腱干细胞的干性;在将含有肌腱干细胞和细胞外基质成分注入免疫缺陷鼠背部及大鼠跟腱缺损处有肌腱样组织生成,而单独注入肌腱干细胞仅有少量的肌腱样组织形成,说明肌腱细胞外基质中的成分具有激活肌腱干细胞,促进向肌腱细胞分化的作用,与其他材料相比,抑制了肌腱干细胞向脂肪、软骨、骨等组织的分化。

以上研究结果表明,肌腱损伤后积极有效的应用各种理化因素、生物材料及生长因子等,激活内源性及外源性肌腱干细胞并促进向肌腱细胞分化,是修复肌腱损伤促进肌腱再生的重要环节,同时也是组织工程肌腱研究的重要靶点。

4 小结

肌腱干细胞的最新研究进展为今后肌腱干细胞作为种子细胞用于肌腱损伤的修复提供了方向:①肌腱损伤后自我修复缓慢的原因可能是由于肌腱中自身含有的干细胞未被激活;②尽管目前对如何激活肌腱干细胞使其向肌腱细胞分化的研究较多,但仍缺乏高效的分化手段及标准化方案;③用于修复肌腱的干细胞既可以是内源性干细胞,也可以是外源性干细胞;如何在肌腱损伤早期快速激活这两类肌腱干细胞,来修复损伤后的肌腱,是今后研究的靶点;④在应用肌腱干细胞作为种子细胞修复肌腱损伤时,为了获得增殖及分化能力较强的肌腱细胞,应尽量从幼年个体中提取肌腱干细胞。

参考文献

- [1] Woo SL, Debski RE, Zeminski J, et al. Injury and repair of ligaments and tendons[J]. Annu Rev Biomed Eng. 2000;2:83—118.
- [2] Takahashi M. Micro-constructive studies of human digital flexor tendon and tendon sheath—observation by scanning electron microscope and light microscope (author's transl)[J]. Ni-

- hon Seikeigeka Gakkai Zasshi, 1982,56(2):133—147.
- [3] Little D, Guilak F, Ruch DS. Ligament-derived matrix stimulates a ligamentous phenotype in human adipose-derived stem cells[J]. Tissue Eng Part A, 2010,16(7):2307—2319.
- [4] Salingcarnboriboon R, Yoshitake H, Tsuji K, et al. Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property[J]. Exp Cell Res, 2003,287(2):289—300.
- [5] Scutt N, Rolf CG, Scutt A. Glucocorticoids inhibit tenocyte proliferation and Tendon progenitor cell recruitment[J]. J Orthop Res, 2006,24(2):173—182.
- [6] Bi Y, Ehreichou D, Kilts TM, et al. Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche[J]. Nat Med, 2007,13(10):1219—1227.
- [7] Yin Z, Chen X, Chen JL, et al. The regulation of tendon stem cell differentiation by the alignment of nanofibers[J]. Biomaterials, 2010,31(8):2163—2175.
- [8] Zhang J, Wang JH. Characterization of differential properties of rabbit tendon stem cells and tenocytes[J]. BMC Musculoskeletal Disord, 2010,11:10.
- [9] Rui YF, Lui PP, Li G, et al. Isolation and characterization of multipotent rat tendon-derived stem cells[J]. Tissue Eng Part A, 2010,16(5):1549—1558.
- [10] Zhou Z, Akinbiyi T, Xu L, et al. Tendon-derived stem/progenitor cell aging: defective self-renewal and altered fate[J]. Aging Cell, 2010,9(5):911—915.
- [11] Zhang J, Pan T, Liu Y, et al. Mouse treadmill running enhances tendons by expanding the pool of tendon stem cells (TSCs) and TSC-related cellular production of collagen[J]. J Orthop Res, 2010,28(9):1178—1183.
- [12] Zhang J, Wang JH. Platelet-rich plasma releasate promotes differentiation of tendon stem cells into active tenocytes[J]. Am J Sports Med, 2010,38(12):2477—2486.
- [13] Anson HL, Beredjikian PK, Soslowsky LJ. CD44 deficiency improves healing tendon mechanics and increases matrix and cytokine expression in a mouse patellar tendon injury model[J]. J Orthop Res, 2009,27(10):1386—1391.
- [14] Zhang J, Wang JH. Mechanobiological response of tendon stem cells: implications of tendon homeostasis and pathogenesis of tendinopathy[J]. J Orthop Res, 2010,28(5):639—643.
- [15] Zhang J, Wang JH. Production of PGE(2) increases in tendons subjected to repetitive mechanical loading and induces differentiation of tendon stem cells into non-tenocytes[J]. J Orthop Res, 2010,28(2):198—203.
- [16] Rui YF, Lui PP, Ni M, et al. Mechanical loading increased BMP-2 expression which promoted osteogenic differentiation of tendon-derived stem cells[J]. J Orthop Res, 2011,29(3):390—396.
- [17] Levesque JP, Helwani FM, Winkler IG. The endosteal 'osteoblastic' niche and its role in hematopoietic stem cell homing and mobilization[J]. Leukemia, 2010,24(12):1979—1992.
- [18] Pryce BA, Watson SS, Murchison ND, et al. Recruitment and maintenance of tendon progenitors by TGFbeta signaling are essential for tendon formation[J]. Development, 2009,136(8):1351—1361.
- [19] Hodde JP, Ernst DM, Hiles MC. An investigation of the long-term bioactivity of endogenous growth factor in OASIS Wound Matrix[J]. J Wound Care, 2005,14(1):23—25.
- [20] Hodde JP, Record RD, Liang HA, et al. Vascular endothelial growth factor in porcine-derived extracellular matrix[J]. Endothelium, 2001,8(1):11—24.
- [21] McDevitt CA, Wildey GM, Cutrone RM. Transforming growth factor-beta1 in a sterilized tissue derived from the pig small intestine submucosa[J]. J Biomed Mater Res A, 2003,67(2):637—640.
- [22] Beattie AJ, Gilbert TW, Guyot JP, et al. Chemoattraction of progenitor cells by remodeling extracellular matrix scaffolds[J]. Tissue Eng Part A, 2009,15(5):1119—1125.
- [23] Zhang J, Li B, Wang JH. The role of engineered tendon matrix in the stemness of tendon stem cells in vitro and the promotion of tendon-like tissue formation in vivo[J]. Biomaterials, 2011,32(29):6972—6981.
- [24] Maffulli N, Wong J, Almekinders LC. Types and epidemiology of tendinopathy[J]. Clin Sports Med, 2003,22(4):675—692.
- [25] Butler DL, Juncosa N, Dressler MR. Functional efficacy of tendon repair processes[J]. Annu Rev Biomed Eng, 2004,6:303—329.
- [26] Li L, Clevers H. Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals[J]. Science, 2010,327(5965):542—545.
- [27] Uthoff HK, Sarkar K, Maynard JA. Calcifying tendinitis: a new concept of its pathogenesis[J]. Clin Orthop Relat Res, 1976,(118):164—168.
- [28] Fenwick S, Harrall R, Hackney R, et al. Endochondral ossification in Achilles and patella tendinopathy[J]. Rheumatology (Oxford), 2002,41(4):474—476.
- [29] Rui YF, Lui PP, Chan LS, et al. Does erroneous differentiation of tendon-derived stem cells contribute to the pathogenesis of calcifying tendinopathy[J]? Chin Med J (Engl), 2011, 124(4):606—610.
- [30] Kannus P. Structure of the tendon connective tissue[J]. Scand J Med Sci Sports, 2000,10(6):312—320.
- [31] Lee CH, Shin HJ, Cho IH, et al. Nanofiber alignment and direction of mechanical strain affect the ECM production of human ACL fibroblast[J]. Biomaterials, 2005,26(11):1261—1270.
- [32] Liu H, Kemeny DM, Heng BC, et al. The immunogenicity and immunomodulatory function of osteogenic cells differentiated from mesenchymal stem cells[J]. J Immunol, 2006,176(5):2864—2871.
- [33] Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo[J]. Exp Hematol, 2002,30(1):42—48.
- [34] Arinze TL, Peter SJ, Archambault MP, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect[J]. J Bone Joint Surg Am, 2003,85-A(10):1927—1935.
- [35] Griffin MD, Ritter T, Mahon BP. Immunological aspects of allogeneic mesenchymal stem cell therapies[J]. Hum Gene Ther, 2010,21(12):1641—1655.