

·综述·

## 基于力学生物学的跟腱愈合研究现状

胡超<sup>1</sup> 李旭<sup>1,2</sup>

跟腱断裂的修复、愈合及功能恢复是骨科医师关注的重点。新兴技术和修复材料的应用,使跟腱临床修复效果显著提高。但是,临床难题是跟腱愈合过程中瘢痕组织的形成、肌腱结构的改变,最终降低跟腱的力学性质,增加再次断裂风险。近年来,许多学者对跟腱修复做了大量的研究<sup>[1-4]</sup>,对比分析了跟腱断裂后手术与非手术治疗的生物力学性质,结果显示手术组较非手术组早期生物力学强度大,但是长期结果没有显著差异性。然而,对于跟腱愈合康复的研究和临床应用却相对较少。本文综述了跟腱的力学生物学特点及其对跟腱愈合过程的影响,指导跟腱的功能恢复。

### 1 跟腱的修复

跟腱<sup>[5-9]</sup>是连接骨与肌肉,传导力量,维持关节活动及稳定的有较高抗拉强度的腱性组织,具有非线性、黏弹性、非均质性等特性。跟腱损伤后组织愈合分为三个阶段:炎性期、增殖修复期、重建塑形期。炎性期在伤后即刻出现,初期持续24h,主要是红细胞、血小板、炎性细胞(中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞)向损伤部位的趋化聚集和吞噬坏死组织,释放血管活性因子和趋化因子,新生的成纤维细胞开始合成胶原,逐渐沉积。伤后数天,增殖修复开始并持续至术后12周左右<sup>[10]</sup>。此期,肌腱成纤维细胞增殖与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)成份合成增加,并沉积在损伤部位。约6周,重塑期开始,该阶段细胞结构减小,合成速率减慢,胶原纤维开始沿腱纵轴排列,修复组织逐渐演变为纤维组织。最后,跟腱基本恢复原有结构。

### 2 跟腱的力学生物学特点

#### 2.1 成纤维细胞

跟腱中有多种不同来源的细胞,肌腱成纤维细胞是最重要的细胞,其参与创伤愈合修复、ECM基因和蛋白的表达。在愈合过程中,力学负荷强度可以促进跟腱成纤维细胞的增殖分化。已有许多关于肌腱成纤维细胞对力学负荷敏感性的体内外研究报道<sup>[5,11-13]</sup>。力学负荷不仅可使肌腱成纤维细胞的细胞核发生变形,肌腱细胞之间连接紧密,使更多的胞质肌动蛋白进入原肌球蛋白的张力纤维<sup>[9]</sup>,同时,也可通过调

节其合成和分解代谢来影响肌腱成纤维的增殖合成能力及转归<sup>[8,15-18]</sup>。Tanaka等<sup>[19]</sup>将鸡断裂后的趾深屈肌腱进行周期性张力负荷作用,再进行体外培养,一段时间后显示成纤维细胞沿张力方向包绕损伤部位排列并向肌腱内生长,而在无张力负荷作用下,腱细胞仅仅排列于肌腱表面,表明张力负荷作用可以促进腱细胞的增殖和迁移。Wang JH等<sup>[20]</sup>设计了单轴向负荷环境下人跟腱体外模型,模拟了体内肌腱细胞的排列、形状和单轴向负荷环境,结果显示肌腱成纤维细胞数量明显增加。同时,在拉伸强度依赖性和周期性的拉伸负荷形式下,I型胶原的基因表达、蛋白生成明显增加,加快了EMC的合成,促进跟腱的发育和愈合。然而,在拉伸强度依赖性的形式下,人肌腱成纤维细胞中COX-2表达增加,PGE2和LTB4生成也增加。但在人肌腱中,PGE2是炎性介质,能降低成纤维细胞的增殖和胶原的合成,高水平PGE2可能会导致跟腱疾病的发生。

#### 2.2 干细胞

近年来大量的人体和动物实验研究<sup>[21-24]</sup>证明肌腱组织中存在一种具有自我再生、多向分化潜能特性的细胞,肌腱干细胞(tendon stem cells, TSCs)。TSCs可分化为肌腱成纤维细胞,对跟腱生长发育及修复过程起着重要的作用。在体内外模型中,力学负荷可以促进TSCs的增殖、合成,诱导其分化。小鼠跑台模型中<sup>[25]</sup>发现跑台组与非跑台组相比,跟腱中TSCs的数量明显增加,胶原的生成量也明显增高。在含有TSCs的培养基的体外研究中<sup>[26]</sup>,在力学负荷刺激下,TSCs的增殖速率较对照组明显加快。TSCs细胞是一种力学负荷依赖性分化细胞,在较小(4%)的力学负荷牵拉下,TSCs分化成肌腱细胞,在较大(8%)的力学负荷牵拉下,TSCs除了能分化成肌腱细胞外,还分化为非肌腱细胞(脂肪细胞、软骨细胞、骨细胞)。因此,只有在生理力学负荷强度下,TSCs才能正常表达。

#### 2.3 肌腱内环境

内环境是各种酶、生物信号传递的场所和媒介。内环境的稳定依赖于各种因子的有效表达,这些因子可以促进肌腱的增殖、基质的合成和损伤的愈合等。力学负荷可以通过调节这些因子来影响肌腱的内环境。肌腱细胞通过产生基质

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2015.10.027

1 南方医科大学第三附属医院,广东省骨科研究院儿童骨科,广州,510630; 2 通讯作者

作者简介:胡超,男,在读研究生; 收稿日期:2014-10-05

降解酶(如基质金属蛋白酶,MMPs)与ECM来维持内环境稳态。在体外模型中,去除负荷1d可显著增加MMP-1的mRNA及蛋白表达水平。虽然反复加载负荷增加了金属蛋白酶-1的组织抑制剂与MMP-13(导致合成代谢状态)的比率,但去除应力后可通过增加MMP-13(导致分解代谢状态)的表达反转这一比例<sup>[27-28]</sup>。最近许多研究<sup>[29]</sup>显示转录因子Scleraxis(肌腱生长所必需)和转化生长因子- $\beta$ (调节分化,增殖及ECM产生的主要因子,TGF- $\beta$ )在肌腱生长中的调节作用。力学负荷的变化能引起Scleraxis及TGF- $\beta$ 的表达改变,造成肌腱结构、细胞活力和ECM发生变化。Scott等<sup>[30]</sup>研究发现,随着负荷增加,胰岛素样生长因子-1表达上调,促进细胞增殖和肌腱重塑。去除应力可导致肌腱细胞处于分解代谢状态。不同的力学负荷强度对内环境稳定的调节完全不同<sup>[29]</sup>,给予1%周期性牵拉负荷后发现基质中MMP-1的mRNA表达水平下降,3%或者6%的周期性牵拉负荷后则抑制了MMP-1的mRNA表达水平。这说明内环境的稳定需要有一定强度的力学负荷才能有效维持。

#### 2.4 肌腱组成结构

肌腱的组成结构决定了跟腱的功能和性质。跟腱是力学敏感性组织,可以通过改变自身结构、组成成份来适应力学负荷的刺激。现在大量的研究<sup>[31-35]</sup>集中在纤维的性能和力学性质上,在牛尾肌腱超负荷机械力的研究中发现,三螺旋结构解螺旋发生在离散、重复的部位,原先的直纤维产生扭结。这种现象提示这种纤维容易发生断裂。力学负荷还可通过促进基质蛋白的合成影响纤维之间的连接。蛋白聚糖中的二聚糖可促进微纤维直径的生长,核心蛋白可促进微纤维之间的横向连接,保持纤维间的稳定性。更为重要的是在跟腱修复重塑期,跟腱瘢痕愈合,肌腱纤维排列紊乱。在此阶段,给适当拉伸力学负荷刺激,肌腱纤维可沿力学负荷方向纵向排列,逐渐恢复原有跟腱纤维的排列,重塑跟腱的正常结构。

#### 3 力学负荷对跟腱愈合的影响

虽然制动可以防止肌腱的再次断裂,但是完全去除修复位点的负荷刺激,这不利于肌腱愈合,限制愈合肌腱组织的生长,导致肌力降低<sup>[36-37]</sup>。Galatz等<sup>[36]</sup>研究表明,使用A型肉毒毒素等方法对肌肉制动可降低修复组织的结构特性。体外实验显示当肌腱细胞丧失应力时,MMPs会快速、持续释放,其组织抑制剂减少。肌腱切断术后去除肩袖肌腱的负荷及肌肉神经会导致脂肪变性、肌肉萎缩、脂肪生成及纤维化增加<sup>[36,38]</sup>。在近端屈肌切断术后的腱-骨修复中,去除力学负荷对力学强度和胶原组织的生成也产生不利影响<sup>[37]</sup>。因此,力学负荷的完全丢失,不利于肌腱的愈合和功能的恢复。然而在长期重复过大的力学负荷作用下,跟腱可能会导致胶原

纤维的微断裂,达到一定程度最终可导致跟腱的完全断裂。因此,力学负荷对跟腱愈合起着十分重要的作用。

#### 4 基于力学生物学的临床跟腱愈合

在跟腱损伤早期,由于缺乏连续性,有效的制动可以防止炎症的加重,避免影响跟腱的愈合及再次断裂。在修复增殖早期,跟腱细胞开始增殖分化,ECM产生增加,此时给予适当力学负荷刺激可以增加跟腱细胞的增殖和迁移,刺激基因表达,蛋白、胶原的合成,有利于跟腱加速愈合。但如何平衡固定(导致粘连)与活动(增加修复位点破裂的风险)对肌腱愈合的不利影响。现已证明被动运动可为其提供最佳的力学负荷强度,可有效防止肌腱纤维化粘连,促进成纤维细胞合成ECM,增加二聚糖的表达、减少核心蛋白的表达,提高跟腱力学性质的恢复。Enwemeka等<sup>[39-40]</sup>研究显示被动活动的最佳时间是修复后5d左右,电镜下此期即出现新合成的胶原纤维。

在跟腱的修复增殖末期,跟腱连续性完整,适当的踝关节主动活动和负重可以提高愈合组织强度,防止肌腱表面与腱鞘间的粘连。李志等<sup>[41]</sup>研究成年人跟腱修复术后超声检查显示术后6周跟腱出现连续信号,其认为此期进行踝关节的功能锻炼比较稳妥,避免跟腱再次断裂。完全的制动不仅不能促进愈合,反而限制愈合肌腱组织的生长和结构的形成并降低肌力<sup>[36-37]</sup>。Twaddle等<sup>[42-43]</sup>对急性跟腱断裂患者术后最后一次随访复查中发现,早期活动组和制动组在踝关节僵硬程度、腓肠肌肌力强度、踝关节功能方面统计学上无显著差异,然而在等功能腓肠肌力量强度中早期活动组要比制动组稍好,因此,他们推荐跟腱断裂后行早期的功能活动。在修复重建期,肌腱纤维排列和结构紊乱,此期给适当拉伸力学负荷刺激,可以改善胶原纤维的排列和跟腱结构的重塑,肌腱纤维可沿力学负荷方向纵向排列,从而恢复肌腱的力学性质和组织强度。

研究证明跟腱愈合过程中的超声表现和肌腱组织学愈合过程匹配,未来可以借助超声监测跟腱的修复阶段,更加准确、清晰、有效指导跟腱愈合和功能锻炼<sup>[44]</sup>。同时,随着细胞工程的发展,干细胞的应用可以使跟腱再生愈合,恢复原有结构和力学性质。未来跟腱愈合的“个体化、精准性、循证性”治疗将是本领域的研究热点。

总之,跟腱的愈合是一个复杂的过程,其愈合与损伤程度、血供、断端间距离、年龄和力学性质等因素有关,这些因素导致其修复时间和愈合速率不尽相同。因此,跟腱功能锻炼的时间选择有所差异。但在跟腱的愈合过程中,力学生物学特点起的作用是肯定的,有效的选择制动-被动活动-主动活动的过程,能促进跟腱的愈合,改善跟腱的预后功能。

## 参考文献

- [1] Soroceanu A, Sidhwa F, Aarabi S, et al. Surgical versus nonsurgical treatment of acute Achilles tendon rupture: a meta-analysis of randomized trials[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2012,94(23):2136—2143.
- [2] Willits K, Amendola A, Bryant D, et al. Operative versus nonoperative treatment of acute Achilles tendon ruptures: a multicenter randomized trial using accelerated functional rehabilitation[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2010,92(17):2767—2775.
- [3] Nilsson-Helander K, Silbernagel KG, Thomee R, et al. Acute achilles tendon rupture: a randomized, controlled study comparing surgical and nonsurgical treatments using validated outcome measures[J]. *Am J Sports Med*, 2010,38(11):2186—2193.
- [4] Moller M, Lind K, Movin T, et al. Calf muscle function after Achilles tendon rupture. A prospective, randomised study comparing surgical and non-surgical treatment[J]. *Scand J Med Sci Sports*, 2002,12(1):9—16.
- [5] Wang JH. Mechanobiology of tendon[J]. *J Biomech*, 2006, 39(9): 1563—1582.
- [6] Connizzo BK, Yannascoli SM, Soslowsky LJ. Structure-function relationships of postnatal tendon development: a parallel to healing[J]. *Matrix Biol*, 2013, 32(2): 106—116.
- [7] Wang JH, Guo Q, Li B. Tendon biomechanics and mechanobiology--a minireview of basic concepts and recent advancements[J]. *J Hand Ther*, 2012, 25(2): 133—140,141.
- [8] Galloway MT, Lalley AL, Shearn JT. The role of mechanical loading in tendon development, maintenance, injury, and repair[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2013, 95(17): 1620—1628.
- [9] Lin TW, Cardenas L, Soslowsky LJ. Biomechanics of tendon injury and repair[J]. *J Biomech*, 2004, 37(6): 865—877.
- [10] Niki H, Nakajima H, Hirano T, et al. Ultrasonographic observation of the healing process in the gap after a Ponseti-type Achilles tenotomy for idiopathic congenital clubfoot at two-year follow-up[J]. *J Orthop Sci*, 2013,18(1):70—75.
- [11] Arnoczky SP, Tian T, Lavagnino M, et al. Activation of stress-activated protein kinases (SAPK) in tendon cells following cyclic strain: the effects of strain frequency, strain magnitude, and cytosolic calcium[J]. *J Orthop Res*, 2002, 20(5): 947—952.
- [12] Wall ME, Banes AJ. Early responses to mechanical load in tendon: role for calcium signaling, gap junctions and intercellular communication[J]. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2005, 5(1): 70—84.
- [13] Arnoczky SP, Tian T, Lavagnino M, et al. Ex vivo static tensile loading inhibits MMP-1 expression in rat tail tendon cells through a cytoskeletally based mechanotransduction mechanism[J]. *J Orthop Res*, 2004, 22(2): 328—333.
- [14] Kukreti U, Belkoff SM. Collagen fibril D-period may change as a function of strain and location in ligament[J]. *J Biomech*, 2000, (3): 1569—1574.
- [15] Banes AJ, Horesovsky G, Larson C, et al. Mechanical load stimulates expression of novel genes in vivo and in vitro in avian flexor tendon cells[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 1999, 7(1): 141—153.
- [16] Magnusson SP, Narici MV, Maganaris CN, et al. Human tendon behaviour and adaptation, in vivo[J]. *J Physiol*, 2008, 586(1): 71—81.
- [17] Thomopoulos S, Das R, Birman V, et al. Fibrocartilage tissue engineering: the role of the stress environment on cell morphology and matrix expression[J]. *Tissue Eng Part A*, 2011, 17(7—8): 1039—1053.
- [18] Thomopoulos S, Genin GM, Galatz LM. The development and morphogenesis of the tendon-to-bone insertion - what development can teach us about healing -[J]. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2010, 10(1): 35—45.
- [19] Tanaka H, Manske PR, Pruitt DL, et al. Effect of cyclic tension on lacerated flexor tendons in vitro[J]. *J Hand Surg Am*, 1995, 20(3): 467—473.
- [20] Wang JH, Jia F, Yang G, et al. Cyclic mechanical stretching of human tendon fibroblasts increases the production of prostaglandin E2 and levels of cyclooxygenase expression: a novel in vitro model study[J]. *Connect Tissue Res*, 2003, 44(3—4): 128—133.
- [21] Bi Y, Ehrichou 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.
- [22] Zhang J, Wang JH. Characterization of differential properties of rabbit tendon stem cells and tenocytes[J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2010, 11: 10.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] Arnoczky SP, Tian T, Lavagnino M, et al. Ex vivo static tensile loading inhibits MMP-1 expression in rat tail tendon cells through a cytoskeletally based mechanotransduction mechanism[J]. *J Orthop Res*, 2004, 22(2): 328—333.
- [28] Gardner K, Arnoczky SP, Caballero O, et al. The effect of stress-deprivation and cyclic loading on the TIMP/MMP ratio in tendon cells: an in vitro experimental study[J]. *Disabil Rehabil*, 2008, 30(20—22): 1523—1529.
- [29] Murchison ND, Price BA, Conner DA, et al. Regulation of tendon differentiation by scleraxis distinguishes force-transmitting tendons from muscle-anchoring tendons[J]. *Development*, 2007, 134(14): 2697—2708.
- [30] Scott A, Cook JL, Hart DA, et al. Tenocyte responses to mechanical loading in vivo: a role for local insulin-like growth factor 1 signaling in early tendinosis in rats[J]. *Arthritis Rheum*, 2007, 56(3): 871—881.
- [31] Veres SP, Lee JM. Designed to fail: a novel mode of collagen fibril disruption and its relevance to tissue toughness[J]. *Biophys J*, 2012, 102(12): 2876—2884.
- [32] Gautieri A, Vesentini S, Redaelli A, et al. Hierarchical structure and nanomechanics of collagen microfibrils from the atomistic scale up[J]. *Nano Lett*, 2011, 11(2): 757—766.
- [33] Svensson RB, Hassenkam T, Hansen P, et al. Viscoelastic behavior of discrete human collagen fibrils[J]. *J Mech Behav Biomed Mater*, 2010, 3(1): 112—115.
- [34] Heim AJ, Koob TJ, Matthews WG. Low strain nanomechanics of collagen fibrils[J]. *Biomacromolecules*, 2007, 8(11): 3298—3301.
- [35] van der Rijt JA, van der Werf KO, Bennink ML, et al. Micromechanical testing of individual collagen fibrils[J]. *Macromol Biosci*, 2006, 6(9): 697—702.
- [36] Galatz LM, Charlton N, Das R, et al. Complete removal of load is detrimental to rotator cuff healing[J]. *J Shoulder Elbow Surg*, 2009, 18(5): 669—675.
- [37] Hays PL, Kawamura S, Deng XH, et al. The role of macrophages in early healing of a tendon graft in a bone tunnel[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2008, 90(3): 565—579.
- [38] Thomopoulos S, Zampakis E, Das R, et al. The effect of muscle loading on flexor tendon-to-bone healing in a canine model[J]. *J Orthop Res*, 2008, 26(12): 1611—1617.
- [39] Duzgun I, Baltaci G, Atay OA. Comparison of slow and accelerated rehabilitation protocol after arthroscopic rotator cuff repair: pain and functional activity[J]. *Acta Orthop Traumatol Turc*, 2011, 45(1): 23—33.
- [40] Enwemeka CS. Inflammation, cellularity, and fibrillogenesis in regenerating tendon: implications for tendon rehabilitation[J]. *Phys Ther*, 1989, 69(10): 816—825.
- [41] 李志, 张文云, 梁忆. 高频超声对跟腱断裂术后的随访[J]. *中华超声影像学杂志*, 2006, 15(8): 637—638.
- [42] Twaddle BC, Poon P. Early motion for Achilles tendon ruptures: is surgery important? A randomized, prospective study[J]. *Am J Sports Med*, 2007, 35(12): 2033—2038.
- [43] Kangas J, Pajala A, Siira P, et al. Early functional treatment versus early immobilization in tension of the musculo-tendinous unit after Achilles rupture repair: a prospective, randomized, clinical study[J]. *J Trauma*, 2003, 54(6): 1171—1181.
- [44] Weigl D, Copeliovitch L, Itzhak Y, et al. Sonographic healing stages of Achilles tendon after tenomuscular lengthening in children with cerebral palsy[J]. *J Pediatr Orthop*, 2001, 21(6): 778—783.