

# 肌腱干细胞在骨肌腱接点纤维软骨带重建中的作用机制研究进展



秦胜男, 董飞, 王文

广州市红十字会医院 暨南大学附属广州红十字会医院骨科 广州市创伤外科研究所 (广州 510220)

**【摘要】** 目的 对肌腱干细胞 (tendon-derived stem cells, TDSCs) 在骨肌腱接点 (bone-tendon junction, BTJ) 纤维软骨带重建中的作用机制进行综述。方法 广泛查阅国内外有关 TDSCs 促进 BTJ 纤维软骨带重建的研究文献, 并总结分析。结果 TDSCs 具有向骨细胞、纤维软骨细胞及肌腱细胞分化的能力, 因此具备形成纤维软骨带的潜能; 决定 TDSCs 向骨、软骨分化的因素有力学刺激、生物活性因子、细胞外基质及炎症因子等。结论 TDSCs 因其来源的特殊性, 具有成为重建 BTJ 纤维软骨带的种子细胞的潜能, 通过外界刺激可诱导 TDSCs 形成类似于纤维软骨带结构。

**【关键词】** 肌腱干细胞; 骨肌腱接点; 纤维软骨带; 重建

## Mechanism research progress of tendon-derived stem cells in reconstruction of fibrocartilage zone at bone-tendon junction

QIN Shengnan, DONG Fei, WANG Wen

Department of Orthopaedics, Guangzhou Red Cross Hospital, Guangzhou Red Cross Hospital Affiliated to Jinan University, Guangzhou Institute of Traumatic Surgery, Guangzhou Guangdong, 510220, P.R.China

Corresponding author: WANG Wen, Email: wangwarren88@hotmail.com

**【Abstract】 Objective** To summarize the mechanism research progress of tendon-derived stem cells (TDSCs) in the reconstruction of fibrocartilage zone at bone-tendon junction (BTJ). **Methods** The domestic and foreign related literature about TDSCs in the reconstruction of fibrocartilage zone at BTJ was summarized and analyzed. **Results** TDSCs can be induced to osteocytes, fibrochondrocytes, and tenocytes *in vitro*. Therefore, TDSCs have potential to reconstruct fibrocartilage zone at BTJ. Factors, such as mechanical stimulation, bioactive factor, extracellular matrix, inflammatory factors, and so on, may influence osteogenic or chondrogenic differentiation of TDSCs. **Conclusion** Because of the specificity of origin and location of TDSCs, TDSCs have the potential to be the seed cells for BTJ fibrocartilage zone repair. By applying external stimuli, TDSCs can be induced to form structures which are similar to fibrocartilage zone.

**【Key words】** Tendon-derived stem cells; bone-tendon junction; fibrocartilage zone; Reconstruction

**Foundation items:** Guangdong Provincial Medical Science and Technology Research Funds (2015120155252798); Science and Technology Program Project-Production and Research Collaborative Innovation Major Project (People's Livelihood Science and Technology Special Funds) of Guangzhou (201704020145)

骨肌腱接点 (bone-tendon junction, BTJ) 是骨与肌腱之间的结合部位, 是骨组织向肌腱组织的过渡组织, 包含了骨组织、纤维软骨带和肌腱组织

3 种完全不同的组织结构。纤维软骨带分为未钙化的纤维软骨带和钙化的纤维软骨带, 其主要作用是缓冲由骨传导来的拉力, 避免肌腱组织因剧烈拉力而断裂。由于不恰当的运动方式、意外事故以及人逐步衰老, 肌腱因持续不断或突然承受大量机械负荷而发生病变, 最终发展成肌腱撕裂<sup>[1]</sup>, 如肩袖撕裂、肌腱止点撕脱损伤、髌腱断裂或撕脱、跟腱止点撕裂等<sup>[2]</sup>。肌腱损伤发病率很高<sup>[3]</sup>, 据统计美国每

DOI: 10.7507/1002-1892.201612078

基金项目: 广东省医学科学技术研究基金 (2015120155252798); 广州市科技计划项目产学研协同创新重大专项-民生科技专项 (201704020145)

通信作者: 王文, Email: wangwarren88@hotmail.com

年至少有 3 000 万肌腱受损患者<sup>[4]</sup>。一旦肌腱组织发生损伤, 需要行 BTJ 重建术, 重接肌腱与骨; 然而术后 BTJ 愈合缓慢, 纤维软骨带结构多难以再生, 以纤维化修复为主。但纤维化修复无法达到纤维软骨带原力学传导功能, 其缓冲能力大大降低, 患者常再次发生肌腱从骨组织撕脱, 造成手术失败, 影响术后肌肉-肌腱-骨关节整体运动功能的恢复, 是目前临床一个难题。目前 BTJ 损伤的治疗方法主要包括保守治疗, 例如改变运动方式、口服非甾体类抗炎镇痛药、局部注射糖皮质激素、理疗和体外冲击波治疗等, 以及手术治疗。绝大多数保守治疗方法只能缓解疼痛或炎症, 长期疗效欠佳; 手术重建又存在并发症发生风险<sup>[5]</sup>。

BTJ 的纤维软骨带中分布了成骨细胞、纤维软骨细胞和肌腱细胞。纤维软骨细胞是由何种细胞转化而来, 目前尚无定论。既往研究多关注于 BMSCs 向纤维软骨细胞分化的潜力, 因为 BTJ 组织重建过程中, 新骨形成时会有大量 BMSCs 参与<sup>[6]</sup>。但也有学者提出纤维软骨带的纤维软骨细胞是由肌腱细胞分化而来的假设, 成熟的肌腱组织在应力刺激或生长因子刺激下化生成纤维软骨带, 而其中的肌腱细胞分化成了纤维软骨细胞<sup>[7]</sup>, 但此假设未被研究证实, 因为肌腱细胞是高度分化的细胞, 不具备向其他细胞分化的潜力。直到肌腱干细胞 (tendon-derived stem cells, TDSCs) 被成功地分离出来, 研究证实其具有多向分化潜能和干细胞特性<sup>[8-10]</sup>, 而且与 BMSCs 相比, TDSCs 表现出更好的向骨细胞、纤维软骨细胞以及肌腱细胞分化的潜力<sup>[11]</sup>。由于 TDSCs 起源和部位的特殊性, 提示其可能是 BTJ 纤维软骨带中纤维软骨细胞的来源。

由于纤维软骨带的重建在 BTJ 修复中起重要作用, 因此研究 BTJ 修复中纤维软骨带重建的细胞学和分子学机制, 对于了解和寻找促进 BTJ 愈合的机制及改进骨肌腱重接术后康复锻炼方案都有重大意义。本文围绕 TDSCs 在 BTJ 纤维软骨带中作用机制的研究进展进行综述。

## 1 TDSCs 向纤维软骨细胞分化的潜力和优势

由于纤维软骨带的重建对于 BTJ 修复具有重要作用, 因此 TDSCs 向纤维软骨细胞分化的能力也尤其重要。肌腱组织中多为肌腱成纤维细胞, 其在肌腱的发育及发展过程中起到维持、修复和重建肌腱组织的重要作用。Bi 等<sup>[8]</sup>研究发现肌腱组织中存在干细胞, 他们从人和小鼠中成功分离出 TDSCs, 其具有干细胞的自我更新能力、克隆形成能力及成

骨、成脂、成软骨分化潜力。研究也证实, TDSCs 能够修复肌腱组织<sup>[11]</sup>和骨组织缺损<sup>[12]</sup>。与 BMSCs 不同的是, TDSCs 具有组织特异性分化的优点<sup>[13-14]</sup>。Bi 等<sup>[8]</sup>实验发现, 所有小鼠来源 TDSCs 均有 I 型胶原蛋白表达, 而 BMSCs 中仅有少量细胞表达 I 型胶原蛋白, 表明 TDSCs 除本身具有干细胞特性外, 还具有成纤维细胞特性, 这可能会影响细胞最终分化方向。因为 I 型胶原蛋白是否表达是区分纤维软骨细胞和透明软骨细胞的指标, 只有纤维软骨细胞才同时表达 I 型胶原蛋白和 II 型胶原蛋白。Bi 等还发现, 小鼠来源 TDSCs 还可少量表达软骨细胞特征性蛋白——软骨寡聚基质蛋白。这些结果表明 TDSCs 比 BMSCs 更具有向纤维软骨细胞分化的优势, 其在促进 BTJ 修复方面可能更有潜力。

## 2 TDSCs 促进纤维软骨带重建的可能影响因素

BTJ 修复中纤维软骨带的重建可能是新骨形成中软骨性化生或肌腱钙化中软骨性化生的结果, 因此诱导或刺激 TDSCs 向骨、软骨分化是纤维软骨带重建的关键。TDSCs 可能受微环境中各种因素的调控而发生骨、软骨分化, 主要包括力学刺激、生物活性因子、细胞外基质和炎症因子等。

### 2.1 力学刺激 TDSCs 向骨、软骨分化

既往众多研究表明, 于 BTJ 处施加力学刺激可有效促进新骨形成及纤维软骨带重建, 有利于患者术后功能恢复。Qin 等<sup>[15]</sup>和 Lu 等<sup>[16]</sup>研究发现, 低强度超声对 BTJ 愈合过程中的新骨、纤维软骨、软骨性化生、肌腱中的基质硬度均有增强作用。Hu 等<sup>[17]</sup>观察了低强度超声和功能性电刺激对 BTJ 愈合的影响, 结果提示低强度超声可促进 BTJ 早期修复。Wang 等<sup>[18]</sup>也通过功能性电刺激对 BTJ 进行拉力刺激, 结果显示拉力可有效促进纤维软骨带重建。

力学刺激是肌腱组织微环境中的一部分, 在维持肌腱正常生理功能方面起着重要作用。在无张力的静态环境中肌腱细胞会去分化<sup>[19]</sup>, 甚至会诱导细胞死亡<sup>[20]</sup>。有研究显示, 适当的力学刺激可促进肌腱细胞增殖、肌腱相关细胞外基质以及细胞活性因子分泌<sup>[21]</sup>。力学刺激对 TDSCs 的影响也很显著。研究发现, 低强度低频率的拉力虽然会抑制软骨细胞核转录因子 Sox-9 表达, 但拉力消失 24 h 后 Sox-9 表达明显增多, 甚至高于静态培养细胞, 说明合适的拉力条件会刺激 TDSCs 向软骨细胞分化, 这可能是拉力促进 BTJ 纤维软骨带重建的一个细胞机制<sup>[22]</sup>。Shi 等<sup>[23]</sup>实验证实, 单轴机械压力会促

使大鼠来源 TDSCs 成骨分化。Zhang 等<sup>[24]</sup>研究指出,低强度的机械刺激会促进 TDSCs 向肌腱细胞分化,而较高强度的机械刺激则会使 TDSCs 向骨、软骨分化。Rui 等<sup>[25]</sup>的研究也发现,体外重复的拉力刺激会促使 BMP-2 表达上调,而 BMP-2 会诱导 TDSCs 成骨分化,表明拉力刺激间接诱导了 TDSCs 的成骨分化,这可能是拉力促进 BTJ 纤维软骨带重建的内在原因。

## 2.2 BMP-2 诱导 TDSCs 形成类似纤维软骨带结构

生物活性因子 BMP-2 能够促进软骨或骨缺损的修复<sup>[26]</sup>。Kim 等<sup>[27]</sup>研究表明,BMP-2 混合纤维蛋白胶可加速 BTJ 修复,且修复后的 BTJ 生物力学性能有所提高。Hashimoto 等<sup>[28]</sup>发现 BMP-2 能够促进软骨骨化,从而加速 BTJ 的修复。

BMP-2 还可诱导 TDSCs 在体内形成纤维软骨带。Bi 等<sup>[8]</sup>将经 BMP-2 预处理的小鼠来源 TDSCs 移植至裸鼠皮下,组织学观察发现类似纤维软骨带形成。Zhang 等<sup>[10]</sup>将兔来源 TDSCs 移植至裸鼠皮下,8 周后组织学观察发现有骨、肌腱和纤维软骨组织形成。这些研究结果显示,部分 TDSCs 在 BMP-2 刺激下向纤维软骨细胞和骨细胞分化,在裸鼠皮下形成了纤维软骨和骨组织,而部分 TDSCs 则自分化成肌腱组织,最终形成类似于 BTJ 的纤维软骨带结构。而 Zhang 等<sup>[10]</sup>研究证实 BMSCs 在 BMP-2 刺激下只发生成骨分化,在裸鼠皮下形成了骨组织。

另外,纤维软骨带的一个特征性结构是夏氏纤维结构,夏氏纤维结构是指纤维软骨带中纤维软骨细胞呈串状分布在胶原纤维中,胶原纤维沿骨肌腱纵轴有序排列。夏氏纤维结构是保证纤维软骨带力学缓冲能力的主要结构,能使刚度从肌腱到骨逐层增加,张力得以梯度分布,这种弹性分布降低了肌腱所受到的牵张负荷,保证了肌腱在受到巨大拉力后不被撕裂或损伤。Bi 等<sup>[8]</sup>利用羟基磷灰石/磷酸三钙作为载体,将经 BMP-2 预处理的人来源 TDSCs 移植至裸鼠颅盖骨表面,TDSCs 形成了类似于肌腱组织的致密胶原纤维,这些胶原纤维嵌入颅骨,沿骨肌腱纵轴排列,形成类似夏氏纤维样结构。

以上研究结果说明,TDSCs 不仅可同时向骨细胞、纤维软骨细胞和肌腱细胞分化,还能够在外界因素刺激下形成类似于纤维软骨带的特殊性结构,提示 TDSCs 在 BTJ 的纤维软骨带重建中有着良好潜力。

## 2.3 细胞外基质调节 TDSCs 纤维软骨分化的作用

小分子蛋白多糖是细胞外基质的一种,在调节 BTJ 的完整性方面也起着重要作用。Biglycan 和 Fibromodulin 是小分子蛋白多糖家族成员,在骨、

肌腱和软骨组织中均有表达<sup>[29-30]</sup>。小分子蛋白多糖能够通过和软骨蛋白的网络交叉控制细胞外基质的功能,并且通过与 TGF 家族结合调节细胞新陈代谢<sup>[21, 31]</sup>。研究报道<sup>[8]</sup>,从野生小鼠分离出的 TDSCs,在体内分化实验中只能向肌腱组织分化;而从敲除 Biglycan 和 Fibromodulin 基因的小鼠分离出的 TDSCs,在体内分化实验中不仅向肌腱组织分化,还向骨组织发生分化。说明改变与 TDSCs 特性相关的细胞外基质成分,可能打乱某些特定的生长因子,并因此改变 TDSCs 的分化方向,使其从成肌腱分化转变为成骨分化。并且,从敲除 Biglycan 和 Fibromodulin 基因的小鼠分离出的 TDSCs 有 II 型胶原表达,而 II 型胶原是软骨细胞的特征性表达。这些结果表明, Biglycan 和 Fibromodulin 蛋白缺失会导致 TDSCs 的骨、软骨分化,可能在调节 TDSCs 的纤维软骨分化中起着重要作用,其有望作为调节纤维软骨带重建的关键因子。

## 2.4 炎症因子促进 TDSCs 纤维软骨分化

近年也有一些关于炎症因子在 TDSCs 骨、软骨分化中作用的研究。Zhang 等<sup>[32]</sup>研究发现,小鼠肌腱内前列腺素 E2 (prostaglandin E2, PGE2) 含量随小鼠肌腱所承受的运动负荷强度加大而增加, PGE2 对 TDSCs 的影响呈剂量依赖关系,高浓度 PGE2 可使 TDSCs 增殖降低,同时诱导 TDSCs 向骨细胞分化,从而导致肌腱的骨分化。

Hu 等<sup>[33]</sup>研究发现,炎症环境会诱导并促进 TDSCs 成骨分化,TDSCs 会分化为软骨细胞或骨细胞。其机制可能是损伤后的促炎性微环境导致 TDSCs 高表达低氧诱导因子 2 $\alpha$  (hypoxia inducible factor 2 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ ), HIF-2 $\alpha$  转录水平上调抑制肌腱系关键转录因子 Scx 表达及其介导的肌腱系基因网络,降低腱系分化能力,从而促进骨、软骨分化的发生。

## 3 小结

目前纤维软骨带重建机制尚未阐明,因此对 BTJ 重建手术的治疗效果并不理想。随着 TDSCs 的发现,人们对纤维软骨带重建及其纤维软骨细胞来源的可能机制有了新的研究角度。学者们提出由于一系列理化因素,使得 TDSCs 发生了骨、软骨分化,可能在纤维软骨带重建机制中起着重要作用。通过促进 BTJ 的 TDSCs 骨、软骨分化,调控 TDSCs 使其向骨细胞或软骨细胞分化,进而重建骨肌腱接点处的纤维软骨带,可能会为临床 BTJ 重建手术的改进及治疗带来新思路。

## 参考文献

- 1 Khan KM, Maffulli N. Tendinopathy: an Achilles' heel for athletes and clinicians. *Clin J Sport Med*, 1998, 8(3): 151-154.
- 2 Benjamin M, Toumi H, Ralphs JR, *et al.* Where tendons and ligaments meet bone: attachment sites ('entheses') in relation to exercise and/or mechanical load. *J Anat*, 2006, 208(4): 471-490.
- 3 Sullo A, Maffulli N, Capasso G, *et al.* The effects of prolonged peritendinous administration of PGE1 to the rat Achilles tendon: a possible animal model of chronic Achilles tendinopathy. *J Orthop Sci*, 2001, 6(4): 349-357.
- 4 Ljungqvist A, Schweltnus MP, Bachl N, *et al.* International Olympic Committee consensus statement: molecular basis of connective tissue and muscle injuries in sport. *Clin Sports Med*, 2008, 27(1): 231-239, x-xi.
- 5 Maffulli N, Sharma P, Luscombe KL. Achilles tendinopathy: aetiology and management. *J R Soc Med*, 2004, 97(10): 472-476.
- 6 Song F, Jiang D, Wang T, *et al.* Mechanical Loading Improves Tendon-Bone Healing in a Rabbit Anterior Cruciate Ligament Reconstruction Model by Promoting Proliferation and Matrix Formation of Mesenchymal Stem Cells and Tendon Cells. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41(3): 875-889.
- 7 Benjamin M, Ralphs JR. Biology of fibrocartilage cells. *Int Rev Cytol*, 2004, 233: 1-45.
- 8 Bi Y, Ehrlichou D, Kilts TM, *et al.* Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. *Nat Med*, 2007, 13(10): 1219-1227.
- 9 Rui YF, Lui PP, Li G, *et al.* Isolation and characterization of multipotent rat tendon-derived stem cells. *Tissue Eng Part A*, 2010, 16(5): 1549-1558.
- 10 Zhang J, Wang JH. Characterization of differential properties of rabbit tendon stem cells and tenocytes. *BMC Musculoskelet Disord*, 2010, 11: 10.
- 11 Tan Q, Lui PP, Rui YF, *et al.* Comparison of potentials of stem cells isolated from tendon and bone marrow for musculoskeletal tissue engineering. *Tissue Eng Part A*, 2012, 18(7-8): 840-851.
- 12 Ni M, Lui PP, Rui YF, *et al.* Tendon-derived stem cells (TDSCs) promote tendon repair in a rat patellar tendon window defect model. *J Orthop Res*, 2012, 30(4): 613-619.
- 13 Rui YF, Lui PP, Lee YW, *et al.* Higher BMP receptor expression and BMP-2-induced osteogenic differentiation in tendon-derived stem cells compared with bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. *Int Orthop*, 2012, 36(5): 1099-1107.
- 14 Tan Q, Lui PP, Rui YF. Effect of *in vitro* passaging on the stem cell-related properties of tendon-derived stem cells-implications in tissue engineering. *Stem Cells Dev*, 2012, 21(5): 790-800.
- 15 Qin L, Fok P, Lu H, *et al.* Low intensity pulsed ultrasound increases the matrix hardness of the healing tissues at bone-tendon insertion-a partial patellectomy model in rabbits. *Clin Biomech (Bristol, Avon)*, 2006, 21(4): 387-394.
- 16 Lu H, Qin L, Fok P, *et al.* Low-intensity pulsed ultrasound accelerates bone-tendon junction healing: a partial patellectomy model in rabbits. *Am J Sports Med*, 2006, 34(8): 1287-1296.
- 17 Hu J, Qu J, Xu D, *et al.* Combined application of low-intensity pulsed ultrasound and functional electrical stimulation accelerates bone-tendon junction healing in a rabbit model. *J Orthop Res*, 2014, 32(2): 204-209.
- 18 Wang W, Chen HH, Yang XH, *et al.* Postoperative programmed muscle tension augmented osteotendinous junction repair. *Int J Sports Med*, 2007, 28(8): 691-696.
- 19 Jelinsky SA, Archambault J, Li L, *et al.* Tendon-selective genes identified from rat and human musculoskeletal tissues. *J Orthop Res*, 2010, 28(3): 289-297.
- 20 Egerbacher M, Arnoczky SP, Caballero O, *et al.* Loss of homeostatic tension induces apoptosis in tendon cells: an *in vitro* study. *Clin Orthop Relat Res*, 2008, 466(7): 1562-1568.
- 21 Yang G, Crawford RC, Wang JH. Proliferation and collagen production of human patellar tendon fibroblasts in response to cyclic uniaxial stretching in serum-free conditions. *J Biomech*, 2004, 37(10): 1543-1550.
- 22 秦胜男, 王文, 傅世铨, 等. 大鼠肌腱干细胞的分离培养鉴定及拉力对其 Sox-9 表达的影响. *中国修复重建外科杂志*, 2015, 29(7): 884-888.
- 23 Shi Y, Fu Y, Tong W, *et al.* Uniaxial mechanical tension promoted osteogenic differentiation of rat tendon-derived stem cells (rTDSCs) via the Wnt5a-RhoA pathway. *J Cell Biochem*, 2012, 113(10): 3133-3142.
- 24 Zhang J, Wang JH. Mechanobiological response of tendon stem cells: implications of tendon homeostasis and pathogenesis of tendinopathy. *J Orthop Res*, 2010, 28(5): 639-643.
- 25 Rui YF, Lui PP, Ni M, *et al.* Mechanical loading increased BMP-2 expression which promoted osteogenic differentiation of tendon-derived stem cells. *J Orthop Res*, 2011, 29(3): 390-396.
- 26 Wang GX, Hu L, Hu HX, *et al.* *In vivo* osteogenic activity of bone marrow stromal stem cells transfected with Ad-GFP-hBMP-2. *Genet Mol Res*, 2014, 13(2): 4456-4465.
- 27 Kim HJ, Kang SW, Lim HC, *et al.* The role of transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein with fibrin glue in healing of bone-tendon junction injury. *Connect Tissue Res*, 2007, 48(6): 309-315.
- 28 Hashimoto Y, Yoshida G, Toyoda H, *et al.* Generation of tendon-to-bone interface "entheses" with use of recombinant BMP-2 in a rabbit model. *J Orthop Res*, 2007, 25(11): 1415-1424.
- 29 Kovacevic D, Fox AJ, Bedi A, *et al.* Calcium-phosphate matrix with or without TGF-beta3 improves tendon-bone healing after rotator cuff repair. *Am J Sports Med*, 2011, 39(4): 811-819.
- 30 Vanderploeg EJ, Imler SM, Brodtkin KR, *et al.* Oscillatory tension differentially modulates matrix metabolism and cytoskeletal organization in chondrocytes and fibrochondrocytes. *J Biomech*, 2004, 37(12): 1941-1952.
- 31 Mouw JK, Connelly JT, Wilson CG, *et al.* Dynamic compression regulates the expression and synthesis of chondrocyte-specific matrix molecules in bone marrow stromal cells. *Stem Cells*, 2007, 25(3): 655-663.
- 32 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 Orthop Res*, 2010, 28(2): 198-203.
- 33 Hu JJ, Yin Z, Shen WL, *et al.* Pharmacological Regulation of *In Situ* Tissue Stem Cells Differentiation for Soft Tissue Calcification Treatment. *Stem Cells*, 2016, 34(4): 1083-1096.

收稿日期: 2016-12-16 修回日期: 2017-06-22

本文编辑: 王雁