

间充质干细胞在韧带组织修复领域的应用进展

钱地坤¹ 综述 吴术红² 审校

1. 遵义医科大学, 贵州 遵义 563006;

2. 遵义医科大学附属医院关节外科, 贵州 遵义 563003

【摘要】 随着医疗基础研究的飞速发展, 间充质干细胞的功能用途也日益多样化。间充质干细胞具有强大的增殖能力和多向分化潜能, 使得其在人体的多种系统里都可以充分发挥作用; 它同时还具有较好的免疫调节功能和低程度的异体移植排异性。此外, 间充质干细胞来源相对广泛易得, 易于进行培养增殖分化, 即使传代多次, 其干细胞特性仍可维持稳定。诸多优势使它成为近年来研究的前沿热点, 而对于骨科而言, 它的成骨性、成软骨性及成纤维细胞性最博得学者们的关注。随着研究的深入, 间充质干细胞向韧带成纤维细胞定向分化的程度得到了关节外科的重视, 该研究对于关节韧带及重要肌腱组织损伤的治疗具有临床意义。本文就近年来国内外有关间充质干细胞在韧带组织修复领域的应用进展进行综述。

【关键词】 间充质干细胞; 诱导分化; 韧带修复; 成纤维细胞; 综述

【中图分类号】 R686.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2022)10-1346-05

Application progress of mesenchymal stem cell in the field of ligament tissue repair. QIAN Di-kun¹, WU Shu-hong².

1. Zunyi Medical University, Zunyi 563006, Guizhou, CHINA; 2. Department of Joint Surgery, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563003, Guizhou, CHINA

【Abstract】 With the rapid development of medical basic research, the function and application of mesenchymal stem cells (MSCs) become increasingly diversified. MSCs have strong proliferation and multi-directional differentiation potential, which enables them to play a full role in various systems of the human body. It also has good immune regulating function and low-degree of allografts complementarity-mutual exclusiveness. In addition, MSCs are relatively widely available and easy to be cultured, proliferated and differentiated. Even if they are subcultured many times, their stem cell characteristics can remain stable. Due to the advantages, it has now become the forefront of research in recent years, and for orthopedics, its osteoblast, chondroblast, and fibroblast have attracted the most attention from scholars. With the development of research, the degree of directional differentiation of MSCs to ligament fibroblasts has been paid attention to by joint surgery, and the related study has great clinical significance for the treatment of articular ligament and important tendon tissue injury. This review is conducted to summarize the application of MSCs in the field of ligament tissue repair at home and abroad in recent years.

【Key words】 Mesenchymal stem cells; Induced differentiation; Ligament repair; Fibroblasts; Review

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一种拥有强多分化能力的细胞集群, 它们具有长期活性以及自我更新能力, 可以经由炎症因子、细胞因子、多肽及物理刺激的诱导生成软骨、骨骼、肌肉、肌腱、韧带和脂肪等多系细胞, 因此在组织修复治疗的研究中成为了新型热点^[1]。随着对 MSCs 的深入研究, 人们发现 MSCs 具有三个特别属性: (1) 具备分化成多种细胞系的能力; (2) 具备独特的低免疫原性及免疫抑制能力; (3) 可以分泌与接受一些可调节性的关键生物学功能因子, 并诱导目标细胞增殖和分化^[2]。现今的研究进展已证实许多生长因子在韧带损伤的修复过程中可显著调节和改善 MSCs 的分化增殖能力^[3]。肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、骨形成蛋白 1 (BMP-1)、骨形成蛋白 2 (BMP-2)、白介素 IL-17A、白介素 IL-17F、转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)、血小板衍生生长因子 (PDGF)、富血小板纤维蛋白 (PRF)、碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 和细胞外基质均起到促进 MSCs 分化增殖的作

用, 而环氧化酶-2 (COX-2) 与白介素 IL-1 β 则对 MSCs 有抑制功能^[4]。随着社会发展及医疗需求, 深入开发利用间充质干细胞的多向潜力来促进骨骼再生、修复韧带和肌腱损伤已经成为一项迫切的任务。结合基因治疗和组织工程的快速进步, 它们有可能大幅提高患者的早期康复程度, 减少康复时间和提升生活质量。

骨关节外科中的肌腱和韧带损伤很常见, 韧带本身的强度与胶原纤维的数量和大小有关, 而胶原纤维在发育过程中会随着身体需求或发育而增加, 但随着年龄的增加, 胶原纤维的生成速度也随之减缓, 因此一旦韧带遭受损伤, 修复通常比较缓慢, 整个治疗过程也较复杂与漫长^[5]。即使韧带得到修复, 创伤后愈合的韧带组织的生化和机械特性永远无法完整恢复至未损伤时的状态。随着医疗服务水平的提升和患者生活需求的不断增加, 为了使患者更快地从韧带损伤中康复, 相关科研人员正在不断探索新的治疗方案^[6]。细胞学组织工程的飞速发展为之提供了一

基金项目: 贵州省科技支撑计划项目(编号: 黔科合支撑[2017]2882)

通讯作者: 吴术红, 主任医师, 研究生导师, E-mail: 15329112966@163.com

些方案, MSCs 的出现给韧带快速修复提供了新的可能, MSCs 已证明具有自我更新和多向分化潜能的能力, 在此基础上给予 MSCs 正确且适当的分化环境, 就可以改善韧带组织的修复和再生效率^[7]。本综述评估了用于韧带组织修复的间充质干细胞向韧带成纤维细胞定向分化的相关研究, 并进一步探讨了该方向的前沿性与实用性。

1 人羊膜间充质干细胞(hAMSCs)在韧带组织修复中的应用

人羊膜间充质干细胞是 MSCs 家族中分化能力较强的一类, 除继承了 MSCs 的生物学特点之外, 还可通过体外诱导后大幅度上调韧带特异性基因的表达, 提高韧带特异性蛋白的合成率, 因此, 它已成为韧带组织工程种子细胞的重要来源之一^[8]。在 hAMSCs 体外诱导过程中发现, 其高度相关的基因为韧带成纤维细胞相关基因和血管生成相关基因, 因此可以增强韧带成纤维细胞相关蛋白的合成, 并加速微血管的再生, 加快韧带修复速度^[9]。hAMSCs 可从胎盘中大量获得, 且它们的提取不会对患者本身造成任何创伤, 也不受到明显的伦理或道德限制^[10]。在相关研究中, hAMSCs 显示出对白细胞共同抗原 CD45 和人白细胞 DR 抗原 (HLA-DR) 的低表达, 这证明了 hAMSCs 具有低免疫原性, 大幅度降低了免疫反应, 提升了应用安全程度^[11], 因此, hAMSCs 可以成为修复组织或器官损伤而不引起免疫排斥的细胞资源。此外, 该研究发现在 bFGF 和 TGF- β_1 诱导联合 Transwell 共培养条件下, hAMSCs 分化为人前交叉韧带成纤维细胞(hACLFS)最为成功, 其过程中细胞增殖能力明显增强, 韧带修复相关的基因和蛋白质的 mRNA 表达也显著上调。ZHANG 等^[12]发现经成纤维细胞生长因子-2 (FGF-2) 诱导后的 hAMSCs 能促进胶原纤维形成, 进而加速韧带愈合, 同时 FGF-2 在发挥功能时还可能同步激活其他重要因素的释放, 从而加速腱到骨的愈合, 但其详细机制目前尚未明朗, 仍需要进一步研究探索。Scleraxis 基因是至今鉴定的唯一直接调节细胞分化的因子, 它是一个碱性螺旋环螺旋(basic helix-loop-helix, bHLH)转录因子, 在肌腱和韧带的祖细胞以及这些韧带的分化细胞中表达, 可以促进腱细胞分化和成熟以及肌腱形成^[13]。桑鹏等^[14]实验发现 Scleraxis 基因和 bFGF 联合作用后, 可大幅促进 hAMSCs 向人韧带成纤维细胞分化, 这为韧带损伤修复治疗提供了新的思路。而邹刚等^[15]通过试验也同样证明了在 Scleraxis 基因协同诱导 hAMSCs 成韧带分化的过程中, 人脱细胞羊膜支架贡献了积极的调控作用。汤井洋^[16]的论文中阐述了选取 9:1 纳米纤维膜制备的 hAMSCs/PVA/CS 纳米纤维生物膜在 bFGF 和 TGF- β_1 的共同作用下, 增强了兔髌韧带损伤的修复能力, 但该结果只限于动物, 还未联合临床实验, 因此仍有进一步研究价值。而李豫皖等^[10]

实验发现复合使用 bFGF 和 TGF- β_1 可提升 hAMSCs 向 hACLFS 分化的效率及诱导效果。

hAMSCs 作为间充质干细胞家族的一员, 标志性的特点就是其较强的分化及组织修复能力。在向韧带组织分化过程的基因调控中, 高亲和的韧带成纤维细胞相关基因和血管生成相关基因发挥主要作用。Scleraxis 基因是标志性的一种成韧带向调控基因, 其在细胞内部进行转录调控, 同时与 bFGF 联合作用, 提升分化能力; 此外在胶原蛋白的产生调控中, FGF-2 可促使胶原纤维生成; 分化后期在 TGF- β_1 的作用下 hAMSCs 的增殖能力进一步得到提升。但 hAMSCs 的免疫抑制功能研究较少, 且所抑制的白细胞共同抗原种类也偏少, 这与其他种类的间充质干细胞存在一定的差异, 有进一步深入研究的价值; 此外关于该分化过程中的信号分子通路尚不清楚。

综上所述, 在近 5 年的 hAMSCs 向韧带组织分化的研究中, 多篇文章均已证明该细胞种类的高度实用性, 且通过 bFGF 和 TGF- β_1 与多种材料支架或辅助膜的联合作用下, hAMSCs 可显著分化为韧带组织, 加速韧带的恢复愈合, 并可在一定程度下分化为 hACLFS。

2 骨髓间充质干细胞(BMSCs)在韧带组织修复中的应用

骨髓间充质干细胞具有向肌肉、骨组织多向分化潜能, 是第一类被发现并进行临床使用的细胞, 现已被应用于多种软组织损伤的修复, 然而, 骨髓间充质干细胞向肌腱细胞分化的相关研究报道较少。2013 年孙芳菲^[17]便进行了该类细胞的研究, 该实验联合应用 TGF- β_1 和 bFGF 诱导兔的 BMSCs 定向分化为韧带组织类细胞, 之后把诱导后兔 BMSCs 移植于脱细胞真皮支架进一步培养, 完成目标组织工程韧带的构建。实验发现该方法能显著促使兔 BMSCs 定向转化为韧带组织类细胞, 并能在脱细胞真皮支架材料上生长增殖, 同时, 该细胞的胶原蛋白分泌能力得到提升。张亚强等^[18]经实验证明调控 BMSCs 向韧带系分化的早期细胞内结构信号之一可能是细胞骨架的变化, 因此他进行单轴拉伸联合定向的纳米纤维诱导 BMSCs 分化实验, 实验中 BMSCs 的分化程度得到一定的提升, 实验结果证实了通过体外小幅度低频率周期性单轴拉伸刺激联合定向纳米支架能促进 BMSCs 向韧带方向分化, 局部黏着斑激酶(FAK)和 Rho 激酶(ROCK)可能参与此过程, 但具体机制需要进一步研究。周盛源等^[19]实验证明转染 bFGF 基因的 BMSCs 能明显促进韧带分化, 加速损伤愈合, 并增加韧带愈合强度。朱乐全等^[20]发现骨形态发生蛋白 2 (BMP-2) 可通过纤维蛋白的作用明显增强 BMSCs 的韧带分化, 提升前交叉韧带重建效果。杨继祥等^[21]发现 BMSCs 附着蚕丝韧带上进行韧带修复时, 可以在一定程度上向成纤维细胞

性,分别是人羊膜间充质干细胞、骨髓间充质干细胞、前交叉韧带衍生来源的间充质干细胞以及人子宫内
膜间充质干细胞。其中人羊膜间充质干细胞有着最
为显著的分化特性,骨髓间充质干细胞的分化能力较
强,且更容易接受多种生物性因子的诱导,前交叉韧
带衍生来源的间充质干细胞更适用于进行前交叉韧
带这类强度韧带的治疗,人子宫内充质干细胞还
属于研究进程中,但其未来前景应抱有一定期待。

但对于这四种 MSCs 的实用性,仍存在一些问
题:

(1)被诱导后,基因层面是否会存在某些突变;(2)是否
存在化生的可能;(3)被诱导分化成韧带后,在无支架
的辅助下是否可以维持原有韧带细胞平行性排列,或
细胞间连接是否存在问题;(4)韧带内部血运情况是否
受到影响,再生的韧带内部微循环系统与原来的组织
有无差别;(5)再生韧带内部的神愈合情况如何。这
些问题需要进一步研究,现在可以确定的是,MSCs 向
韧带成纤维细胞分化的能力是存在且可调控的,可充
分地填补韧带修复领域细胞分化部分的空白,这为临
床提供了现今最好的治疗指导。

参考文献

- GARCÍA-CASTRO J, TRIGUEROS C, MADRENAS J, et al. Mesenchymal stem cells and their use as cell replacement therapy and disease modelling tool [J]. *J Cell Mol Med*, 2008, 12(6B): 2552-2565.
- RHATOMY S, PRASETYO TE, SETYAWAN R, et al. Prospect of stem cells conditioned medium (secretome) in ligament and tendon healing: a systematic review [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2020, 9(8): 895-902.
- CHAHLA J, KENNEDY MI, AMAN ZS, et al. Ortho-biologics for ligament repair and reconstruction [J]. *Clin Sports Med*, 2019, 38(1): 97-107.
- 陈雪, 邓子翔, 牛云飞. 调节骨髓间充质干细胞的微环境因素研究进展[J]. *实用骨科杂志*, 2018, 24(8): 721-725.
- DHINSA BS, MAHAPATRA AN, KHAN WS. Sources of adult mesenchymal stem cells for ligament and tendon tissue engineering [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2015, 10(1): 26-30.
- HOFFMANN A, GROSS G. Tendon and ligament engineering in the adult organism: mesenchymal stem cells and gene-therapeutic approaches [J]. *Int Orthop*, 2007, 31(6): 791-797.
- QI F, DENG Z, MA Y, et al. From the perspective of embryonic tendon development: various cells applied to tendon tissue engineering [J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(4): 131.
- 金瑛, 李豫皖, 张承昊, 等. 体外诱导人羊膜间充质干细胞向韧带细胞分化的实验研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2016, 30(2): 237-244.
- 邹刚, 李豫皖, 金瑛, 等. TGF- β 联合 VEGF 对人羊膜间充质干细胞向韧带成纤维细胞体外分化作用的研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2017, 31(5): 582-593.
- 李豫皖. 体外共培养条件下定向诱导人羊膜间充质干细胞向人前交叉韧带成纤维细胞分化的实验研究[D]. 遵义: 遵义医学院, 2017.
- LI Y, LIU Z, JIN Y, et al. Differentiation of human amniotic mesenchymal stem cells into human anterior cruciate ligament fibroblast cells by *in vitro* coculture [J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017: 7360354.
- ZHANG J, LIU Z, TANG J, et al. Fibroblast growth factor 2-induced human amniotic mesenchymal stem cells combined with autologous platelet rich plasma augmented tendon-to-bone healing [J]. *J Orthop Translat*, 2020, 24: 155-165.
- KAGUE E, HUGHES SM, LAWRENCE EA, et al. Scleraxis genes are required for normal musculoskeletal development and for rib growth and mineralization in zebrafish [J]. *FASEB J*, 2019, 33(8): 9116-9130.
- 桑鹏, 刘毅. Scleraxis 联合碱性成纤维细胞生长因子体外促进人羊膜间充质干细胞向人韧带成纤维细胞的定向分化[J]. *中国组织工程研究*, 2019, 23(29): 4644-4650.
- 邹刚, 徐志, 刘子铭, 等. 人脱细胞羊膜支架促进 Scleraxis 修饰人羊膜间充质干细胞体外成韧带分化[J]. *中国组织工程研究*, 2021, 25(7): 1037-1044.
- 汤井洋. TGF β 1-bFGF 诱导人羊膜间充质干细胞复合热处理 PVA/CS 纳米纤维生物膜构建及修复兔髌韧带损伤的实验研究[D]. 遵义: 遵义医科大学, 2021.
- 孙芳菲. TGF- β 1 和 bFGF 促 MSC 定向分化为韧带样细胞的实验研究[D]. 西安: 第四军医大学, 2013.
- 张亚强. 单轴拉伸联合取向纳米纤维诱导骨髓间充质干细胞向韧带细胞分化的研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2020.
- 周盛源, 朱巍, 陈雄生, 等. 转基因骨髓间充质干细胞修复严重韧带损伤的实验观察[J]. *中华医学杂志*, 2014, 94(19): 1494-1498.
- 朱乐全, 卢剑华, 冉俊岭, 等. 骨形态发生蛋白 2 基因转染骨髓间充质干细胞复合纤维蛋白胶促进前交叉韧带重建后的腱-骨愈合[J]. *中国组织工程研究*, 2019, 23(1): 30-34.
- 杨继祥, 刘庆鹏, 高勇, 等. 蚕丝韧带复合骨髓干细胞重建兔前交叉韧带[J]. *中国矫形外科杂志*, 2020, 28(20): 1883-1887.
- LUI H, DENBEIGH J, VAQUETTE C, et al. Fibroblastic differentiation of mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) is enhanced by hypoxia in 3D cultures treated with bone morphogenetic protein 6 (BMP6) and growth and differentiation factor 5 (GDF5) [J]. *Gene*, 2021, 788: 145662.
- ZHAO B, HU M, WU H, et al. Tenascin-C expression and its associated pathway in BMSCs following co-culture with mechanically stretched ligament fibroblasts [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(5): 2465-2472.
- WANG R, XU B, XU HG. Up-regulation of TGF- β promotes tendon-to-bone healing after anterior cruciate ligament reconstruction using bone marrow-derived mesenchymal stem cells through the TGF- β /MAPK signaling pathway in a new zealand white rabbit model [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41(1): 213-226.
- BI F, CHEN Y, LIU J, et al. Bone mesenchymal stem cells contribute to ligament regeneration and graft-bone healing after anterior cruciate ligament reconstruction with silk-collagen scaffold [J]. *Stem Cells Int*, 2021, 2021: 6697969.
- ZHAO B, HU M, WU H, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ and its related pathway in bone marrow mesenchymal stem cell differentiation co-cultured with mechanically stretched ligament fibroblasts [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(1): 219-227.
- HEXTER AT, SANGHANI-KERAI A, HEIDARI N, et al. Mesenchymal stromal cells and platelet-rich plasma promote tendon allograft healing in ovine anterior cruciate ligament reconstruction [J]. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2021, 29(11): 3678-3688.
- SETIAWATI R, UTOMO DN, RANTAM FA, et al. Early graft tunnel healing after anterior cruciate ligament reconstruction with intratunnel injection of bone marrow mesenchymal stem cells and vascular endothelial growth factor [J]. *Orthop J Sports Med*, 2017, 5(6): 2325967117708548.
- STEINERT AF, KUNZ M, PRAGER P, et al. Mesenchymal stem cell characteristics of human anterior cruciate ligament outgrowth cells

后疫情时代护理本科生专业认同与学习投入现状调查

李青青, 蔡华娟, 马小琴, 叶红芳, 王宪, 王丽敏, 王彦茹

浙江中医药大学护理学院, 浙江 杭州 310000

【摘要】 目的 了解后疫情时代浙江省护理本科生的专业认同与学习投入现状,并分析其相关性。方法 通过方便抽样法于2020年10~12月选取浙江省两所高校的570名护理本科生作为研究对象。采用通用的大学生专业认同量表、大学生学习投入量表对浙江省护理专业本科学生进行调查。**结果** 浙江地区护理本科生专业认同感各条目均分为(3.57±0.55)分,学习投入各条目均分为(3.19±0.61)分;不同年级、志愿填报原因和抗疫期间志愿者参与情况的护理本科生的专业认同与学习投入得分比较差异均有统计学意义($P<0.05$);护理本科生专业认同各维度及总分均与学习投入各维度及总分呈显著正相关($r=0.199\sim 0.578, P<0.01$)。**结论** 后疫情时代浙江省护理本科生专业认同与学习投入均处于中等水平,做好专业引导,增加志愿者活动等社会实践活动有助于提高护理本科生专业认同感及其学习投入。

【关键词】 后疫情时代;护理本科生;专业认同感;学习投入;相关性

【中图分类号】 R47 **【文献标识码】** D **【文章编号】** 1003—6350(2022)10—1350—05

Investigation on the current situation of professional identity and learning engagement of undergraduate nursing students in the post-epidemic era. *LI Qing-qing, CAI Hua-juan, MA Xiao-qin, YE Hong-fang, WANG Xian, WANG Li-min, WANG Yan-ru. College of Nursing, Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310000, Zhejiang, CHINA*

【Abstract】 Objective To understand the relationship between professional identity and learning engagement of undergraduate nursing students in Zhejiang Province in the post-epidemic era. **Methods** A total of 570 undergraduate nursing students from 2 universities in Zhejiang Province were selected as the study subjects by convenience sampling method from October to December 2020. The generalized professional identity scale for college students and the learning engagement scale for college students were used to investigate undergraduate nursing students in Zhejiang Province. **Results** The total mean score of professional identity of undergraduate nursing students in Zhejiang Province was (3.57±0.55) points and the total mean score of learning engagement was (3.19±0.61) points; the scores of professional identity and learning engagement of undergraduate nursing students in different grades, reasons for volunteering, and volunteer participation during epidemic fighting showed statistically significant differences ($P<0.05$); the item scores and total score of the professional identity were positively correlated with those of learning engagement in undergraduate nursing students ($r=0.199$ to $0.578, P<0.01$). **Conclusion** In the post-epidemic era, the professional identity and learning engagement of undergraduate nursing students in Zhejiang Province are both at a moderate level, and good professional guidance and increasing social practice activities such as volunteer activities can help improve the professional identity and their learning engagement of undergraduate nursing students.

【Key words】 Post-epidemic era; Undergraduate nursing students; Professional identity; Learning engagement; Correlation

基金项目:浙江中医药大学校级科研人才专项(编号:2020SR01)

通讯作者:王彦茹, E-mail:652952858@qq.com

[J]. Tissue Eng Part A, 2011, 17(9-10): 1375-1388.

[30] PRAGER P, SCHIEKER M, JAKOB F, et al. Characterization of human telomerase reverse transcriptase immortalized anterior cruciate ligament cell lines [J]. Biomed J, 2019, 42(6): 371-380.

[31] FU W, LI Q, TANG X, et al. Mesenchymal stem cells reside in anterior cruciate ligament remnants in situ [J]. Int Orthop, 2016, 40(7): 1523-1530.

[32] OGATA Y, MABUCHI Y, SHINODA K, et al. Anterior cruciate ligament-derived mesenchymal stromal cells have a propensity to differentiate into the ligament lineage [J]. Regen Ther, 2018, 8: 20-28.

[33] TANG Y, TIAN J, LI L, et al. Biomimetic biphasic electrospun scaffold for anterior cruciate ligament tissue engineering [J]. Tissue Eng Regen Med, 2021, 18(5): 819-830.

[34] 乔联桥, 隋晓馨, 吴晓梅, 等. 从子宫内间充质干细胞(eMSC)角度看妇科再生医疗[J]. 转化医学电子杂志, 2018, 5(8): 19-23.

[35] 袁瑞利. 子宫内间充质干细胞在修复大鼠子宫韧带损伤过程中弹性蛋白的表达[D]. 太原: 山西医科大学, 2019.

[36] 王玲玲. LOX和Fibulin-5在人子宫内间充质干细胞修复大鼠子宫韧带损伤中表达的实验研究[D]. 太原: 山西医科大学, 2019.

(收稿日期:2021-12-16)