

## 综述

## 肌腱细胞培养方法的研究进展

余华辉 张延洁\*

(昆明医科大学基础医学院细胞生物学与医学遗传学系, 昆明 650500)

**摘要** 肌腱细胞是构建组织工程肌腱最早使用的种子细胞, 但由于取材面积较小使分离得到的细胞数量有限, 并且体外扩增时, 随传代次数增加而增殖速度下降并逐渐失去表型和功能。因此, 仍需改进肌腱细胞的培养方法以减少上述现象的发生。目前, 除了常用的添加生长因子方法外, 施加力学刺激、使用富含血小板血浆和低氧培养等方法也应用于肌腱细胞培养, 这些方法促进了肌腱细胞体外增殖和维持改善了表型功能, 使得肌腱细胞能更好地用于构建肌腱。该文就目前常用的肌腱细胞培养方法作一综述, 旨在为进一步改进肌腱细胞培养方法提供理论依据。

**关键词** 肌腱细胞; 细胞培养; 生长因子; 牵拉力; 富含血小板血浆; 低氧培养; 平行沟槽

## Progress in the Methods of Tenocyte Cultivation

Yu Huahui, Zhang Yanjie\*

(Department of Cell Biology and Medical Genetics, Basic Medical College, Kunming Medical University, Kunming 650500, China)

**Abstract** Tenocytes are the first seed cell choice for tendon engineering. However, only limited amount of tenocytes can be isolated because of the small size of tissue biopsy. Moreover, during monolayer expansion, their proliferation ability decreases with shifting properties in cell phenotype and functions. Therefore, it is important to improve the tenocyte culture strategy. At present, several culturing methods have been applied to promote proliferation of tenocytes as well as to maintain or improve their phenotype and functions. These methods usually involve growth factors, mechanical loading, platelet rich plasma (PRP), and hypoxic culture conditions. Here we review the methods of tenocyte culture to provide a theoretical basis for potential improvement of tendon construction.

**Keywords** tenocyte; cell culture; growth factor; stretching force; platelet-rich plasma (PRP); hypoxic culture; parallel microgroove

肌腱缺损是手外科、运动医学科常见的疾病之一, 但是由于肌腱自身修复能力差且缺乏具有一定

功能的肌腱移植体, 肌腱损伤的治疗效果一直不甚理想, 而组织工程技术为肌腱缺损的临床修复提供

收稿日期: 2015-07-06 接受日期: 2015-12-29

国家自然科学基金(批准号: 81101447)、云南省教育厅科学研究基金(批准号: 2014Z069、2014J041)、云南省创新团队(批准号: 2014HC018)和昆明医科大学硕士研究生创新基金(批准号: 2015S43)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0871-65922855, E-mail: yanjiezhang2013@126.com

Received: July 6, 2015 Accepted: December 29, 2015

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81101447), Science Research Foundation of Yunnan Provincial Education Department (Grant No.2014Z069, 2014J041), Innovation Team of Yunnan Province (Grant No.2014HC018) and Graduate Student Innovation Foundation of Kunming Medical University (Grant No.2015S43)

\*Corresponding author. Tel: +86-871-65922855, E-mail: yanjiezhang2013@126.com

网络出版时间: 2016-03-15 11:35:43

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160315.1135.002.html>

了新的途径。组织工程化组织构建的关键因素之一是种子细胞, 构建肌腱最早使用的种子细胞是肌腱细胞, 它来源于肌腱, 构建出的组织在形态、结构和功能上与正常肌腱更为相似。但是由于肌腱取材面积较小, 所以分离得到的肌腱细胞数量有限, 而且肌腱细胞体外培养增殖相对缓慢, 随着细胞传代次数的增加, 细胞表型逐渐丧失、分泌细胞外基质能力下降, 所以改进肌腱细胞培养方法仍然是肌腱组织工程的研究内容之一。

近年来, 肌腱细胞培养已不仅限于添加生长因子这种常见方法, 施加力学刺激、低氧培养等方法也逐渐被推广应用。基于构建组织时普遍先使用平面培养, 待细胞扩增到一定数量后再接种到支架材料上, 所以本文仅对目前肌腱细胞的二维平面培养方法进行综述, 并比较了常用方法的优缺点, 从而为进一步改进肌腱细胞培养方法提供理论依据。

## 1 肌腱(细胞)的发育成熟

肌腱起源于中胚层, 是一种高度分化的致密结缔组织, 主要由胶原、蛋白聚糖[如饰胶蛋白聚糖(decorin, DCN)和聚集蛋白聚糖(aggrecan)等]、糖蛋白[如腱生蛋白-C(tenascin-C, TN-C)与纤连蛋白(fibronectin)等]以及肌腱细胞组成。胶原是成熟肌腱的主要成分, 其中以I型胶原为主。肌腱细胞来源于胚胎时期的间充质细胞, 呈梭形、沿肌腱长轴排列在胶原纤维间, 可持续合成、分泌胶原及可溶性蛋白聚糖等, 同时可降解吸收基质中的代谢产物, 调节周围微环境。Scx(scleraxis)是肌腱细胞相对特异的标志分子之一, 也是肌腱早期发育的标志。自从该分子发现以后, 肌腱发育研究得以有所进展。

中轴肌腱(axial tendon)和四肢肌腱(limb tendon)发育过程有所不同。中轴肌腱细胞来源于体节腹侧部生骨节的背外侧区, 即靠近生肌节的区域, 该区域称之为syndetome。Syndetome的发育即肌腱前体细胞形成会受到周围区域信号分子的影响, 例如, 生肌节中存在成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factors, FGFs), FGFs会通过ERK/MAPK(extracellular signal-regulated kinases/mitogen-activated protein kinases)途径或转录因子Pea3(polyomavirus enhancer activator 3)、Erm(ets-related molecule)诱导Scx表达, 所以生肌节缺失会导致Scx不表达, 也就意味着肌腱前体细胞无法正确形成; 而生骨节里Pax1(paired

box 1)和Sox5[SRY (sex determining region Y)-box 5]、Sox6都会抑制Scx表达<sup>[1-3]</sup>。

四肢肌腱细胞直接在四肢原位起源。与中轴肌腱和鸡胚胎肌腱发育的影响相反, FGFs对小鼠四肢肌腱发生即Scx表达没有影响, 并且早期发育时抑制ERK/MAPK信号通路会激活Scx表达, 这一点提示, FGF信号通路对不同物种肢体肌腱发生发育影响不一定相同。在小鼠四肢肌腱发育过程中, 转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )在发生发育整个过程中都起作用, 它不仅通过Smad2/3(SMA- and MAD-related protein 2/3)驱动间充质干细胞向肌腱细胞系分化, 而且会影响I型胶原表达<sup>[4]</sup>。属于TGF- $\beta$ 超家族成员的骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)对肌腱发育则影响不一: BMP2、BMP4、BMP7抑制Scx表达<sup>[5]</sup>; 而BMP12、BMP13、BMP14即GDF7(growth and differentiation factor 7)、GDF6、GDF5促进肌腱分化, 任何一种BMP缺失都会降低胶原含量和力学性能, 其中, 以GDF5对肌腱发育的影响最显著<sup>[6-8]</sup>。此外, 肌腱分化成熟需要转录因子Mkx(mohawk homeobox)、Egr(early growth response)的作用, *Mkx*、*Egr1*基因如果缺失会降低发育晚期阶段和成熟肌腱中I型胶原、DCN、腱调蛋白(tenomodulin, TNMD)等分子的表达<sup>[9-10]</sup>。

个体出生后肌腱还要经历成熟过程, 这一过程主要涉及细胞比例的减少、胶原重塑和力学性能的提高。在肌腱成熟过程中, 上述提及的Scx、Mkx、Egr1会继续作用于胶原合成从而影响肌腱成熟。除此之外, 由于个体出生后肌腱开始受力, 所以力学刺激对肌腱成熟也至关重要。

## 2 肌腱细胞常规培养存在的问题

由于肌腱细胞是一种终末分化细胞, 所以体外培养时随着传代次数增加增殖速度下降, 并且细胞形态难以维持长梭形, I/III型胶原比例降低<sup>[11]</sup>。Mazzocca等<sup>[12]</sup>对传代6次的肌腱细胞进行研究发现, 随着传代次数增加, *DCN*、*TN-C*和*TNMD*基因表达呈下降趋势; 传代2次后, I、III型胶原基因表达明显下降; 到第5代时, 其蛋白水平也有所下降。因此认为, 第3代以后的肌腱细胞不宜应用于临床。但是由于肌腱取材面积有限, 并且成人肌腱中细胞比例低, 所以分离得到的原代细胞数量不多; 如果对肌腱细

胞体外培养存在的增殖慢、表型功能易丧失的问题不加以改进,将不利于构建肌腱。

### 3 肌腱细胞培养方法进展

#### 3.1 促进肌腱细胞增殖为主的方法

3.1.1 添加生长因子 生长因子通常是指能调节细胞增殖及其功能的多肽类物质。由于它们大多具有促进细胞增殖的作用,所以添加生长因子较早用于肌腱细胞培养。目前,常添加的生长因子有:胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)、血小板源性生长因子-BB(platelet-derived growth factor-BB, PDGF-BB)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、BMPs以及TGF- $\beta$ 等,它们主要对肌腱细胞增殖起到促进作用,同时还对细胞外基质合成具有一定作用。

IGF-1是IGF家族成员。早在20世纪90年代的研究发现,在应用无血清培养时,IGF-1可以促进肌腱细胞有丝分裂以及DNA、胶原、蛋白聚糖的合成,同时,比IGF-2的作用更强<sup>[13]</sup>;并且,肌腱细胞增殖速度与IGF-1在一定浓度范围内(50~150 ng/mL)呈正相关<sup>[4]</sup>。这种促增殖作用不仅体现在二维平面培养的肌腱细胞上,对三维支架上培养的肌腱细胞同样有效。Caliari等<sup>[15]</sup>研究发现,添加100 ng/mL IGF-1的无血清培养液促进了接种在胶原-糖胺聚糖支架上的肌腱细胞增殖和代谢,并且还能促使肌腱细胞进入支架中生长。

PDGF-BB作为有丝分裂原也能够促进肌腱细胞增殖<sup>[16-17]</sup>。有研究表明,PDGF-BB促进大鼠肌腱细胞增殖的最适浓度为20 ng/mL,促增殖效应在12 h后开始显现,24~48 h效果最显著,且在48 h达到高峰,随后逐渐下降<sup>[18]</sup>;但也有研究发现,50 ng/mL PDGF-BB促增殖效应最佳<sup>[17,19]</sup>。这种最佳浓度的差异可能是因为细胞和生长因子来源不同所致。

bFGF也是一种常用的促进细胞增殖的生长因子。对于肌腱细胞而言,大部分研究结果显示,bFGF可以促进肌腱细胞体外扩增和胶原表达<sup>[16,18-19]</sup>;但是Caliari等<sup>[17]</sup>研究发现,0.1~10 ng/mL bFGF对肌腱细胞增殖和胶原合成并无明显促进作用。这些研究的主要差异在于大部分研究使用二维平面培养,而Caliari等的研究则使用三维支架,因此,当肌腱细胞接种到支架后,bFGF是否还能促进肌腱细胞增殖需要进一步研究证实。

除了上述经典常用的生长因子外,对肌腱发育有影响的BMPs也被用于肌腱细胞培养。BMPs是一类具有相似结构的高度保守的功能蛋白,目前至少有20多种成员。该类蛋白质在肢体生长、软骨内骨化、骨折早期及肌腱修复时表达,对骨的发生、诱导、修复和肌腱修复以及干细胞向肌腱样细胞分化具有一定作用<sup>[20-21]</sup>。目前发现,有几种BMPs对肌腱细胞增殖和胶原合成具有促进作用。Klatte-Schulz等<sup>[22]</sup>将肌腱细胞接种在I型胶原支架上,在含有5% FBS培养液中,添加200 ng/mL或1 000 ng/mL BMP7进行培养,第5 d和第7 d检测发现,1 000 ng/mL BMP7添加组可以明显促进肌腱细胞的扩增和I型胶原的合成。Fu等<sup>[23]</sup>和Wong等<sup>[24]</sup>的研究结果显示,25 ng/mL或50 ng/mL BMP12(BMP13)对肌腱细胞均具有促增殖和I型前胶原基因表达的作用,但浓度低于5 ng/mL时,则与对照组无差异。而BMP14除了上述作用外,还能够促使肌腱细胞迁移,从而有利于在三维支架上生长<sup>[25]</sup>。应当注意的是,目前用于培养肌腱细胞的BMPs中,BMP2、BMP7具有诱导肌腱干细胞向成骨方向分化的作用<sup>[26-27]</sup>,这种诱导分化性对于肌腱-骨连接处生长愈合有指导意义,但对于肌腱细胞扩增无益。

上述生长因子单独使用均可以促进肌腱细胞增殖,而联合使用则具有协同效应。Costa等<sup>[28]</sup>将第4代以前的肌腱细胞补充不同浓度组合的IGF-1和PDGF-BB(10+1、50+10或100+50 ng/mL)或这两种生长因子与bFGF联用(50+10+1、50+10+5、100+50+1或100+50+5 ng/mL),结果发现,与不加生长因子的对照组相比,添加50 ng/mL PDGF-BB组3 d后,肌腱细胞MTT检测吸光度值增加了33%~97%,IGF-1和PDGF-BB联用组(100+50 ng/mL)增加了47%~114%,而三种生长因子联用组(100+50+5 ng/mL)效果最佳,其吸光度值增加了101%~588%,即IGF-1、PDGF-BB和bFGF联合使用促进肌腱细胞增殖效果最显著。Raghavan等<sup>[19]</sup>使用相同的生长因子组合,使用50+50+5 ng/mL(IGF-1、PDGF-BB和bFGF)即可获得最佳促增殖效果,并且促进细胞进入脱细胞支架生长。Caliari等<sup>[17]</sup>在其研究中除了使用上述三种生长因子外,还添加了GDF-5即BMP14。该研究采用了两种生长因子组合的方式对肌腱细胞增殖、代谢和表型等多方面进行了检测,结果发现不同生长因子联用的效果有差异:PDGF-BB联合GDF-5组促增

殖效应最强, PDGF-BB联合bFGF组促代谢效果最明显, 而IGF-1联合GDF-5组则更好地促进了胶原合成、维持肌腱细胞表型及相关基因表达。综合所有结果, 该研究认为, IGF-1联合GDF-5组既能促进肌腱细胞增殖又能维持其表型, 不失为构建组织工程肌腱最好的生长因子组合。

常规使用生长因子的方法是将其添加到培养液里, 但由于生长因子半衰期短, 所以其有效作用不持久。后来有学者采用转染生长因子基因的方法, 使肌腱细胞可以持续合成生长因子<sup>[29]</sup>, 但这种方法往往涉及病毒载体所以存在一定的安全隐患。与此相比, 采用肝素结合运载系统缓释生长因子的方法则更加安全。此方法利用很多生长因子能与肝素结合的特点, 使纤维蛋白支架上肝素结合的生长因子可以持续释放, 所以促进细胞增殖的效果更佳<sup>[30-31]</sup>。

由上述内容可以看出, 生长因子用于肌腱细胞培养时若要取得最佳效果, 最好是联合应用并采用缓释体系。但生长因子价格昂贵, 因此该方法有一定的应用局限性。

**3.1.2 施加机械应力** 作为连接骨骼和肌肉的结构, 肌腱在体内受到轴向牵拉力刺激, 因此体外培养时可以模拟体内环境对肌腱细胞施加牵拉。一般多采用将肌腱细胞接种在具有拉伸性的硅胶膜上, 数小时后, 使用自制或商业化牵拉装置对硅胶膜片进行周期性牵拉, 频率多为0.5~2 Hz、幅度为0.5%~10%。该范围内的牵拉力总体上可以促进肌腱细胞增殖以及胶原、生长因子分泌, 但从细节得到以下结论。(1)促增殖效应未必与牵拉时间、幅度等成正比。Zeichen等<sup>[32]</sup>使用频率1 Hz、幅度5%的周期性拉力, 研究表明, 施加15、60 min牵拉力的肌腱细胞增殖显著增加, 而30 min牵拉组的细胞增殖反而比未牵拉组慢。Deng等<sup>[33]</sup>对肌腱细胞施加的周期性拉力频率为0.5、1 Hz, 幅度为4%、8%和12%, 牵拉时长为2、4、8、12、24 h, 在频率为0.5 Hz、幅度为4%周期性牵拉4 h的条件下凋亡小体最明显。(2)较大幅度可能会促进肌腱干细胞向非肌腱细胞分化。目前, 肌腱干细胞的分离培养方法与肌腱细胞无明显差异, 所以不排除肌腱细胞培养(尤其是原代细胞里)混有肌腱干细胞的情况。在那种情况下, 采用8%的牵拉幅度可以促使肌腱干细胞向成骨、成脂肪等非腱系细胞分化, 因此不利于构建肌腱<sup>[34-35]</sup>。所以, 施加牵拉力应考虑到肌腱细胞中

是否混有肌腱干细胞。

近年来, 研究已不局限于施加牵拉力, 而是结合其他外力研究对肌腱细胞的影响。比如除了牵拉外再施加旋转力, 结果发现, 两种力结合组细胞增殖和细胞外基质合成情况最好, 说明多维周期性应力可以更好地模仿体内生理环境从而更利于细胞扩增<sup>[36]</sup>。

**3.1.3 使用富含血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)** 近年来, PRP以其自体应用、易获取和富含生长因子的优势逐渐应用于细胞培养和组织工程领域。PRP是指与全血相比血小板浓度显著提高的液体, 由于其富含的血小板可分泌多种生长因子[PDGF、TGF- $\beta$ 、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、IGF等], 所以PRP对细胞增殖可起到促进作用。

Tohidnezhad等<sup>[37]</sup>的研究显示, 血小板释放的生长因子(platelet-released growth factors, PRGFs)可以促进肌腱细胞增殖、迁移并提高细胞存活率, 其机制可能与氧化防御性转导通路(nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2)-ARE(antioxidant responsive element)激活有关。但是, 血小板浓度并非越高越好, Giusti等<sup>[38]</sup>的研究发现,  $0.5 \times 10^6$ 和 $1 \times 10^6$  pl $t/\mu$ L浓度能明显促进肌腱细胞增殖、迁移以及胶原和基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)产生, 且 $0.5 \times 10^6$  pl $t/\mu$ L组促增殖效应最明显; 但 $3 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$  pl $t/\mu$ L浓度却对细胞增殖、迁移和胶原合成有抑制效应, 对MMPs产生有明显促进作用, 这一结果提示, 过高浓度血小板不仅不利于肌腱修复, 反而会通过促进生成MMPs降解胶原来降低肌腱力学性能。Sadoghi等<sup>[39]</sup>的研究结果也显示, 1~5倍血小板浓度反而比最高血小板浓度组(10倍)促增殖效应更强。PRP促进肌腱细胞增殖的作用在三维支架上仍然可以得到体现<sup>[40]</sup>, 从而有利于组织构建。

除了直接应用PRP之外, 还有一些研究比较了富含血小板凝块释放物(platelet-rich clot releasate, PRCR)和乏血小板凝块释放物(platelet-poor clot releasate, PPCR)的效果。PRCR和PPCR分别是PRP和乏血小板血浆(platelet-poor plasma, PPP)加入CaCl<sub>2</sub>促凝后, 于37 °C孵育1 h析出的上清液。Anitua等<sup>[41]</sup>在研究PRCR、PPCR和PPP对肌腱细胞增殖的影响中, 观察到促增殖能力为PRCR>PPCR>PPP, 这一结果与PRCR中血小板含量和释放的生长因子浓

度有关。另外, PRCR还能上调内源性生长因子(例如VEGF-A、TGF- $\beta$ 1)的表达, 从而间接促进细胞增殖<sup>[42]</sup>。

PRP不仅促进正常肌腱细胞增殖和胶原合成, 还对肌腱撕裂患处的肌腱细胞起到促增殖和促进胶原等细胞外基质合成的作用<sup>[43-44]</sup>; 而且早期使用PRCR能够抑制肌腱干细胞向非腱系细胞分化<sup>[45]</sup>; PRP还能够促进肌腱细胞和成骨细胞的共同增殖, 消除两者共培养时产生的细胞因子对另一类细胞的生长抑制作用<sup>[46]</sup>。此外, 临床治疗肌腱损伤时往往会局部应用糖皮质激素缓解症状或局麻药减轻疼痛, 但这两类药物具有导致细胞死亡的副作用; 研究发现, PRP可以保护细胞降低或免受这些药物的副作用, 从而提高细胞存活率<sup>[47-48]</sup>, 但由于糖皮质激素和局麻药也可以降低PRP的促细胞增殖和存活效应<sup>[49]</sup>, 所以三者共同使用时, 应考虑PRP的使用剂量和时间。

目前, 制备PRP一般是用抗凝全血经两次离心后得到血小板浓缩物, 但具体方法尚未统一和标准化。最常用的是PRP法, 主要流程为抗凝全血低速离心后将上清和buffy coat转移到另一离心管, 经高速离心后整管内容物上部2/3为PPP, 底部1/3为PRP, 弃PPP后将PRP混匀即可。另一种方法是buffy coat法, 该方法首次离心为高速离心, 将上清层去除后转移中间的buffy coat到另一离心管后再行低速离心, 去除白细胞即得到PRP<sup>[50]</sup>。尽管已有获取PRP的商业化试剂盒和设备, 但离心的转速、时间和温度在不同文献中都有差异, 所以得到的血小板含量和质量也会有所不同, 这就影响到对PRP效果的准确评价。另外, PRP保存是否得当也会影响其后续使用效果, 传统观点认为, 于22 °C振荡保存效果最好。但这种保存方式不利于其用于长期细胞培养, 而(深)低温保存效果目前仍有争议。细胞培养时最好使用新鲜制备的PRP, 而且构建肌腱需要大量肌腱细胞, 这就需要较多的血浆用于制备PRP, 因此需多次抽取患者血液, 给患者带来一定的痛苦。

**3.1.4 低氧培养** 由于认识到机体内多数组织氧浓度低于大气氧浓度, 体外应用低氧培养细胞已经逐渐受到重视。目前低氧培养应用于越来越多的细胞种类, 比如胚胎干细胞、成体干细胞、肿瘤细胞和许多终末分化细胞等<sup>[51-53]</sup>。

肌腱血管较少, 因此肌腱细胞应处于低氧环境

中。研究发现, 低氧对肌腱细胞最显著的效应是促进了细胞增殖, 处于2% O<sub>2</sub>的肌腱细胞群体倍增时间是常规氧浓度培养的一半左右, 因此用低氧浓度培养可获得更多数量的肌腱细胞用于构建肌腱<sup>[54]</sup>。除此之外, 5% O<sub>2</sub>还可以促使肌腱细胞分泌VEGF, 从而促进新生血管生成, 这有利于肌腱修复和组织工程肌腱植入后的血供<sup>[55]</sup>。但是低氧不等于缺氧, Liang等<sup>[56]</sup>的研究结果显示, 0.1% O<sub>2</sub>可以促进肌腱细胞凋亡。我们目前正在观察检测不同低氧浓度对肌腱细胞增殖和凋亡的影响, 初步结果显示随着氧浓度升高(2%~10% O<sub>2</sub>), 肌腱细胞增殖速度有所减缓, 但是所有低氧组之间以及与常规氧浓度组相比其凋亡都无显著差异, 一方面, 提示2%~10%氧浓度中, 2%仍然最利于细胞增殖, 另一方面, 提示氧并非通过影响细胞凋亡而导致增殖速度发生改变。

**3.1.5 理疗刺激** 低频脉冲电磁场是一种主要用于治疗骨关节疾病的理疗方法。近年来, 该方法也应用于肌腱细胞培养以探究其对细胞的影响。de Girolamo等<sup>[57]</sup>用强度1.5 mT、频率75 Hz的脉冲电磁场分别作用于肌腱细胞4、8、12 h, 结果发现, 肌腱细胞形态和凋亡不受影响, 但肌腱特异基因Scx和I型胶原表达增强, 且与电磁场作用时间呈正相关; 此外, 白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、IL-10和TGF- $\beta$ 这些促愈合因子和VEGF-A表达显著上调。后来他们发现, 尽管强度1.5 mT和3 mT的低频脉冲电磁场均能促进肌腱细胞增殖, 但从Scx和胶原产生方面来看, 强度1.5 mT处理组效果优于3 mT组<sup>[58]</sup>。但是也有研究发现, 强度0.4 mT、频率50 Hz的电磁场作用于肌腱细胞后, 细胞增殖、细胞周期和胶原合成并没有改变, 只是在细胞划痕后愈合速度较快<sup>[59]</sup>; 而Seeliger等<sup>[60]</sup>的研究结果则表明, 低频脉冲电磁场不仅可以促进细胞划痕愈合还可以促进细胞增殖。这些研究结果差异的原因, 可能在于所使用的强度和频率不同。目前的研究尽管从其对于肌腱损伤治疗的机制研究角度入手, 但大部分结果提示, 此方法处理的肌腱细胞也有利于组织构建。

除此之外, 用于治疗肌腱损伤的超声波、激光和冲击波也可以促进肌腱细胞增殖, 胶原合成和NO(nitric oxide)、TGF- $\beta$ 1分泌, 并且增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)和某些细胞周期蛋白表达上调<sup>[61-63]</sup>。

**3.1.6 药物作用** 活化蛋白C(activated protein C,

APC)是一种具有抗凝和抗感染作用的血浆蛋白。近年来研究发现, APC与内皮蛋白C受体(endothelial protein C receptor, EPCR)结合后具有激活MMP2、促进皮肤创伤愈合和表皮细胞增殖的功能<sup>[64]</sup>。Xue等<sup>[65]</sup>研究发现, 外源性APC能以浓度依赖性方式促进肌腱细胞增殖、激活MMP2和刺激I型胶原合成; 并且本来低表达EPCR的肌腱细胞在经过APC处理后EPCR表达上调; 受体阻断抗体和RNA干扰实验结果显示, APC通过与EPCR结合并激活ERK/MAPK通路发挥促进肌腱细胞增殖和I型胶原合成等上述作用。

白细胞介素通常与免疫应答、炎症反应有关, 但Courneya等<sup>[66]</sup>的研究发现, 重组人白细胞介素-4(recombinant human interleukin-4, rhIL-4)和rhIL-13均会通过调控细胞周期基因*CDK6*(cyclin-dependent kinase 6)和*CDKN2B*(cyclin-dependent kinase inhibitor 2B)表达促进肌腱细胞增殖, 但对于胶原合成无明显作用。

### 3.2 维持肌腱细胞表型功能为主的方法

3.2.1 在接种表面蚀刻平行沟槽 体内的肌腱细胞呈梭形, 沿肌腱长轴平行排列在胶原纤维间。但是体外培养时由于都接种在底面光滑的培养瓶(皿)中, 所以肌腱细胞随机分布且随着代次增加常伸展为不规则形态, 这种表型的改变和丧失常伴随或导致胶原、TNMD和Scx等分子表达降低。而如果利用激光蚀刻技术在聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)或硅胶膜片上刻出适当宽度的平行沟槽, 那么落到槽里生长的肌腱细胞会被迫以梭形形态且平行排列的方式生长<sup>[67]</sup>。在沟槽宽度10 μm的硅胶膜上, 由于肌腱细胞的形态和分布模式得以维持, 所以即使肌腱细胞传到第4代, I型胶原和TNMD表达仍然维持在较高水平; 更有意思的是, 如果将本来接种在光滑表面的肌腱细胞重新接种到平行沟槽表面, TNMD表达会升高, 提示去分化的肌腱细胞在平行沟槽里生长时会发生再分化<sup>[68]</sup>。但是Kapoor等<sup>[69]</sup>的研究发现, 肌腱细胞

表1 肌腱细胞常用培养方法的比较

Table 1 Comparison of common methods used in tenocyte culture

培养方法 Cultivation methods	主要效果 Main effects	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
Growth factors	Promoting cell proliferation and extracellular matrix synthesis	No special equipment is needed; the amount of FBS and the residual amount of animal components can be reduced.	If multiple growth factors are used in combination, the price is relatively high.
Mechanical stimulation	Promoting cell proliferation and extracellular matrix synthesis. If parallel microgrooved culture is introduced, cell phenotype and function can be better maintained	Because simulating environment <i>in vivo</i> , cell proliferation can be promoted and cell phenotype can be maintained to a certain extent.	Mechanical equipment is needed and the cells must be cultured on the stretchable surface, which is not favorable to large-scale cell amplification. No commercially available parallel micropatterned substrates can be obtained.
PRP	Promoting cell proliferation and extracellular matrix synthesis	PRP preparation protocol is simple. It is safe to use and avoid the residue of animal components in the culture.	More PRP is needed for large-scale cell expansion, which may be necessary to extract the patient's blood sometimes. There is no uniform standard at present, resulting in the different effect in application.
Hypoxic culture	Promoting cell proliferation	A certain low oxygen concentration can promote cell proliferation. The culture way is simple because it only needs hypoxia incubator.	If no hypoxic station, the cells will be in 21% O <sub>2</sub> during passage, which causes cells in intermittent hypoxic state.
Physiotherapy stimulation	Promoting cell proliferation and collagen synthesis		Physiotherapy equipment is needed in the incubator, which is not favorable to large-scale cell amplification.

在宽度为50  $\mu\text{m}$ 的沟槽里增殖和I型胶原、TNMD无明显变化;当然与250  $\mu\text{m}$ 宽的沟槽相比,肌腱细胞在50  $\mu\text{m}$ 沟槽中基本呈平行排列趋势、胶原纤维呈正弦曲线样规则分布。之所以出现差异结果,可能是由于沟槽宽度、深度等参数不同导致,也有可能是接种的材料不同所致。

在平行沟槽里接种肌腱细胞可以维持其表型甚至功能;如果再结合力学刺激,则可以更真实地模拟体内肌腱细胞的环境。Park等<sup>[70]</sup>将细胞接种在嵴/沟宽度为10/50  $\mu\text{m}$ 和20/50  $\mu\text{m}$ 平行沟槽的硅胶膜片上,对膜片施加频率0.5 Hz、幅度4%或8%的牵拉,结果显示,牵拉后细胞增殖和胶原合成均有所提高,并且接种在20/50  $\mu\text{m}$ 膜片并施加幅度8%牵拉力组效果最好。Yang等<sup>[71]</sup>施加同样频率、幅度的拉力作用于接种在10/10  $\mu\text{m}$ 平行沟槽硅胶膜片的肌腱细胞后得到相似的结果,并且推测I型胶原的产生与TGF- $\beta$ 有关。尽管8%幅度更有利于细胞增殖和胶原产生,但是在单纯施加机械应力内容里曾经提到8%牵拉幅度可能会促进肌腱干细胞向非肌腱细胞分化,而平行沟槽联合施加牵拉的方法也发现,频率0.5 Hz、8%牵拉幅度可以增强 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)的表达,提示肌腱细胞可能向肌成纤维细胞转分化<sup>[72]</sup>。因此,无论接种表面是否有平行沟槽、原代肌腱细胞里是否混有肌腱干细胞,从维持细胞表型功能方面出发应谨慎使用8%牵拉幅度的拉力。此外,该策略由于需要膜片蚀刻和力学设施,所以对于大规模扩增肌腱细胞而言存在一定的应用局限性。

#### 4 总结与展望

尽管近年来,构建肌腱使用的种子细胞种类越来越多,但最早使用的肌腱细胞至今仍在用,而肌腱细胞体外培养时,增殖相对缓慢和容易丧失表型功能会影响到肌腱构建效果,因此,促进细胞增殖和维持其表型功能是改进肌腱细胞各种培养方法的目标。在上述提及的培养方法中,多数以促进肌腱细胞增殖为主要效应,少数以维持其表型功能为主。如果侧重于组织工程肌腱的临床应用,还需要考虑到培养方法是否安全、简便易行等,我们将常用的培养方法进行比较,如表1所示。由表1可以看出,上述方法各有优缺点,而PRP因为更加安全简便而备

受瞩目。针对应用PRP时需求量较多的缺点,还需要:(1)探索更高效的PRP分离方法或更有效的保存方法并使之标准化;(2)联合使用PRP和低氧培养或许可以降低PRP使用量;(3)研究同种异体PRP使用是否有效和安全。此外,待细胞接种到支架材料后上述方法是否继续有效也是需要研究的问题。比如,2%  $\text{O}_2$ 对平面培养的肌腱细胞有明显促增殖作用,但是肌腱细胞接种后是一个三维空间结构且细胞密度极高,氧气能否迅速渗透到支架中心关系到处于中心的肌腱细胞能否存活。随着研究的深入和技术的改进,相信肌腱细胞的培养方法会更加完善,从而能构建出结构功能更好的组织工程肌腱。

#### 参考文献 (References)

- 1 Brent AE, Schweitzer R, Tabin CJ. A somatic compartment of tendon progenitors. *Cell* 2003; 113(2): 235-48.
- 2 Brent AE, Tabin CJ. FGF acts directly on the somatic tendon progenitors through the Ets transcription factors Pea3 and Erm to regulate scleraxis expression. *Development* 2004; 131(16): 3885-96.
- 3 Brent AE, Braun T, Tabin CJ. Genetic analysis of interactions between the somatic muscle, cartilage and tendon cell lineages during mouse development. *Development* 2005; 132(3): 515-28.
- 4 Havis E, Bonnin MA, Olivera-Martinez I, Nazaret N, Ruggiu M, Weibel J, *et al.* Transcriptomic analysis of mouse limb tendon cells during development. *Development* 2014; 141(19): 3683-96.
- 5 Schweitzer R, Chyung JH, Murtaugh LC, Brent AE, Rosen V, Olson EN, *et al.* Analysis of the tendon cell fate using Scleraxis, a specific marker for tendons and ligaments. *Development* 2001; 128(19): 3855-66.
- 6 Mikic B, Entwistle R, Rossmeier K, Bierwert L. Effect of GDF-7 deficiency on tail tendon phenotype in mice. *J Orthop Res* 2008; 26(6): 834-9.
- 7 Mikic B, Rossmeier K, Bierwert L. Identification of a tendon phenotype in GDF6 deficient mice. *Anat Rec (Hoboken)* 2009; 292(3): 396-400.
- 8 Mikic B, Schalet BJ, Clark RT, Gaschen V, Hunziker EB. GDF-5 deficiency in mice alters the ultrastructure, mechanical properties and composition of the achilles tendon. *J Orthop Res* 2001; 19(3): 365-71.
- 9 Liu W, Watson SS, Lan Y, Keene DR, Ovitt CE, Liu H, *et al.* The atypical homeodomain transcription factor Mohawk controls tendon morphogenesis. *Mol Cell Biol* 2010; 30(20): 4797-807.
- 10 Guerquin MJ, Charvet B, Nourissat G, Havis E, Ronsin O, Bonnin MA, *et al.* Transcription factor EGR1 directs tendon differentiation and promotes tendon repair. *J Clin Invest* 2013; 123(8): 3564-76.
- 11 Yao L, Bestwick CS, Bestwick LA, Maffulli N, Aspden RM. Phenotypic drift in human tenocyte culture. *Tissue Eng* 2006; 12(7): 1843-9.
- 12 Mazzocca AD, Chowaniec D, McCarthy MB, Beitzel K, Cote

- MP, McKinnon W, *et al.* *In vitro* changes in human tenocyte cultures obtained from proximal biceps tendon: Multiple passages result in changes in routine cell markers. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2012; 20(9): 1666-72.
- 13 Abrahamsson SO. Similar effects of recombinant human insulin-like growth factor-I and II on cellular activities in flexor tendons of young rabbits: Experimental studies *in vitro*. *J Orthop Res* 1997; 15(2): 256-62.
- 14 Kang HJ, Kang ES. Ideal concentration of growth factors in rabbit's flexor tendon culture. *Yonsei Med J* 1999; 40(1): 26-9.
- 15 Caliari SR, Harley BA. The effect of anisotropic collagen-GAG scaffolds and growth factor supplementation on tendon cell recruitment, alignment, and metabolic activity. *Biomaterials* 2011; 32(23): 5330-40.
- 16 Thomopoulos S, Harwood FL, Silva MJ, Amiel D, Gelberman RH. Effect of several growth factors on canine flexor tendon fibroblast proliferation and collagen synthesis *in vitro*. *J Hand Surg Am* 2005; 30(3): 441-7.
- 17 Caliari SR, Harley BA. Composite growth factor supplementation strategies to enhance tenocyte bioactivity in aligned collagen-GAG scaffolds. *Tissue Eng Part A* 2013; 19(9-10): 1100-12.
- 18 梁红伟, 林 樾, 李云剑, 陈 曦, 周宏初, 谭 谦. 血小板源性生长因子BB对体外培养肌腱细胞增殖的影响. *中华烧伤杂志* (Liang Hongwei, Lin Yue, Li Yunjian, Chen Xi, Zhou Hongren, Tan Qian. Effect of platelet-derived growth factor-BB on proliferation of tendon cells cultured *in vitro*. *Chin J Burns*) 2009; 25(4): 298-300.
- 19 Raghavan SS, Woon CY, Kraus A, Megerle K, Pham H, Chang J. Optimization of human tendon tissue engineering: Synergistic effects of growth factors for use in tendon scaffold repopulation. *Plast Reconstr Surg* 2012; 129(2): 479-89.
- 20 Schwarting T, Schenk D, Frink M, Benölken M, Steindor F, Oswald M, *et al.* Stimulation with bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) enhances bone-tendon integration *in vitro*. *Connect Tissue Res* 2015; doi: 10.3109/03008207.2015.1087516.
- 21 Dai L, Hu X, Zhang X, Zhu J, Zhang J, Fu X, *et al.* Different tenogenic differentiation capacities of different mesenchymal stem cells in the presence of BMP-12. *J Transl Med* 2015; 13: 200.
- 22 Klatte-Schulz F, Pauly S, Scheibel M, Greiner S, Gerhardt C, Hartwig J, *et al.* Characteristics and stimulation potential with BMP-2 and BMP-7 of tenocyte-like cells isolated from the rotator cuff of female donors. *PLoS One* 2013; 8(6): e67209.
- 23 Fu SC, Wong YP, Chan BP, Pau HM, Cheuk YC, Lee KM, *et al.* The roles of bone morphogenetic protein (BMP) 12 in stimulating the proliferation and matrix production of human patellar tendon fibroblasts. *Life Sci* 2003; 72(26): 2965-74.
- 24 Wong YP, Fu SC, Cheuk YC, Lee KM, Wong MW, Chan KM. Bone morphogenetic protein 13 stimulates cell proliferation and production of collagen in human patellar tendon fibroblasts. *Acta Orthop* 2005; 76(3): 421-7.
- 25 Dines JS, Cross MB, Dines D, Pantazopoulos C, Kim HJ, Razzano P, *et al.* *In vitro* analysis of an rhGDF-5 suture coating process and the effects of rhGDF-5 on rat tendon fibroblasts. *Growth Factors* 2011; 29(1): 1-7.
- 26 Rui YF, Lui PP, Lee YW, Chan KM. 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): 1099-107.
- 27 Schwarting T, Lechler P, Struwer J, Ambrock M, Frangen TM, Ruchholtz S, *et al.* Bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) influences tendon-bone integration *in vitro*. *PLoS One* 2015; 10(2): e0116833.
- 28 Costa MA, Wu C, Pham BV, Chong AK, Pham HM, Chang J. Tissue engineering of flexor tendons: Optimization of tenocyte proliferation using growth factor supplementation. *Tissue Eng* 2006; 12(7): 1937-43.
- 29 Wang XT, Liu PY, Xin KQ, Tang JB. Tendon healing *in vitro*: bFGF gene transfer to tenocytes by adeno-associated viral vectors promotes expression of collagen genes. *J Hand Surg Am* 2005; 30(6): 1255-61.
- 30 Sakiyama-Elbert SE, Das R, Gelberman RH, Harwood F, Amiel D, Thomopoulos S. Controlled-release kinetics and biologic activity of platelet-derived growth factor-BB for use in flexor tendon repair. *J Hand Surg Am* 2008; 33(9): 1548-57.
- 31 Thomopoulos S, Das R, Sakiyama-Elbert S, Silva MJ, Charlton N, Gelberman RH. bFGF and PDGF-BB for tendon repair: Controlled release and biologic activity by tendon fibroblasts *in vitro*. *Ann Biomed Eng* 2010; 38(2): 225-34.
- 32 Zeichen J, van Griensven M, Bosch U. The proliferative response of isolated human tendon fibroblasts to cyclic biaxial mechanical strain. *Am J Sports Med* 2000; 28(6): 888-92.
- 33 邓银栓, 唐康来, 谢美明, 曹洪辉, 陈 磊, 常德海, 等. 不同牵伸载荷对体外培养人肌腱细胞纤维型肌动蛋白的影响. *中华医学杂志* (Deng Yinshuan, Tang Kanglai, Xie Meiming, Cao Honghui, Chen Lei, Chang Dehai, *et al.* Effects of different cyclic mechanical stretching loads on human tenocytic cytoskeleton *in vitro*. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*) 2011; 91(25): 1780-5.
- 34 Zhang J, Wang JH. The effects of mechanical loading on tendons- an *in vivo* and *in vitro* model study. *PLoS One* 2013; 8(8): e71740.
- 35 Zhang J, Wang JH. Mechanobiological response of tendon stem cells: Implications of tendon homeostasis and pathogenesis of tendinopathy. *J Orthop Res* 2010; 28(5): 639-43.
- 36 Sawaguchi N, Majima T, Funakoshi T, Shimode K, Harada K, Minami A, *et al.* Effect of cyclic three-dimensional strain on cell proliferation and collagen synthesis of fibroblast-seeded chitosan-hyaluronan hybrid polymer fiber. *J Orthop Sci* 2010; 15(4): 569-77.
- 37 Tohidnezhad M, Varoga D, Wruck CJ, Brandenburg LO, Seekamp A, Shakibaei M, *et al.* Platelet-released growth factors can accelerate tenocyte proliferation and activate the anti-oxidant response element. *Histochem Cell Biol* 2011; 135(5): 453-60.
- 38 Giusti I, D'Ascenzo S, Mancò A, Di Stefano G, Di Francesco M, Rughetti A, *et al.* Platelet concentration in platelet-rich plasma affects tenocyte behavior *in vitro*. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 630870.
- 39 Sadoghi P, Lohberger B, Aigner B, Kaltenecker H, Friesenbichler J, Wolf M, *et al.* Effect of platelet-rich plasma on the biologic activity of the human rotator-cuff fibroblasts: A controlled *in vitro* study. *J Orthop Res* 2013; 31(8): 1249-53.
- 40 Visser LC, Arnoczky SP, Caballero O, Kern A, Ratcliffe A, Gardner KL. Growth factor-rich plasma increases tendon cell proliferation and matrix synthesis on a synthetic scaffold: An *in vitro* study. *Tissue Eng Part A* 2010; 16(3): 1021-9.

- 41 Anitua E, Andia I, Sanchez M, Azofra J, del Mar Zaldueño M, de la Fuente M, *et al.* Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *J Orthop Res* 2005; 23(2): 281-6.
- 42 de Mos M, van der Windt AE, Jahr H, van Schie HT, Weinans H, Verhaar JA, *et al.* Can platelet-rich plasma enhance tendon repair? A cell culture study. *Am J Sports Med* 2008; 36(6): 1171-8.
- 43 Jo CH, Kim JE, Yoon KS, Shin S. Platelet-rich plasma stimulates cell proliferation and enhances matrix gene expression and synthesis in tenocytes from human rotator cuff tendons with degenerative tears. *Am J Sports Med* 2012; 40(5): 1035-45.
- 44 Hoppe S, Alini M, Benneker LM, Milz S, Boileau P, Zumstein MA. Tenocytes of chronic rotator cuff tendon tears can be stimulated by platelet-released growth factors. *J Shoulder Elbow Surg* 2013; 22(3): 340-9.
- 45 Zhang J, Wang JH. PRP treatment effects on degenerative tendinopathy—an *in vitro* model study. *Muscles Ligaments Tendons J* 2014; 4(1): 10-7.
- 46 Zhai W, Wang N, Qi Z, Gao Q, Yi L. Platelet-rich plasma reverses the inhibition of tenocytes and osteoblasts in tendon-bone healing. *Orthopedics* 2012; 35(4): e520-5.
- 47 Zargar Baboldashti N, Poulsen RC, Franklin SL, Thompson MS, Hulley PA. Platelet-rich plasma protects tenocytes from adverse side effects of dexamethasone and ciprofloxacin. *Am J Sports Med* 2011; 39(9): 1929-35.
- 48 Beitzel K, McCarthy MB, Cote MP, Apostolakis J, Russell RP, Bradley J, *et al.* The effect of ketorolac tromethamine, methylprednisolone, and platelet-rich plasma on human chondrocyte and tenocyte viability. *Arthroscopy* 2013; 29(7): 1164-74.
- 49 Carofino B, Chowaniec DM, McCarthy MB, Bradley JP, Delaronde S, Beitzel K, *et al.* Corticosteroids and local anesthetics decrease positive effects of platelet-rich plasma: An *in vitro* study on human tendon cells. *Arthroscopy* 2012; 28(5): 711-9.
- 50 Dhurat R, Sukesh M. Principles and Methods of Preparation of Platelet-Rich Plasma: A review and author's perspective. *J Cutan Aesthet Surg* 2014; 7(4): 189-97.
- 51 Prasad SM, Czepiel M, Cetinkaya C, Smigielska K, Weli SC, Lysdahl H, *et al.* Continuous hypoxic culturing maintains activation of Notch and allows long-term propagation of human embryonic stem cells without spontaneous differentiation. *Cell Prolif* 2009; 42(1): 63-74.
- 52 Braunschweig L, Meyer AK, Wagenführ L, Storch A. Oxygen regulates proliferation of neural stem cells through Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Mol Cell Neurosci* 2015; 67: 84-92.
- 53 Foldager CB, Nielsen AB, Munir S, Ulrich-Vinther M, Søballe K, Bünger C, *et al.* Combined 3D and hypoxic culture improves cartilage-specific gene expression in human chondrocytes. *Acta Orthop* 2011; 82(2): 234-40.
- 54 Zhang Y, Wang B, Zhang WJ, Zhou G, Cao Y, Liu W. Enhanced proliferation capacity of porcine tenocytes in low O<sub>2</sub> tension culture. *Biotechnol Lett* 2010; 32(2): 181-7.
- 55 Petersen W, Pufe T, Zantop T, Tillmann B, Mentlein R. Hypoxia and PDGF have a synergistic effect that increases the expression of the angiogenetic peptide vascular endothelial growth factor in Achilles tendon fibroblasts. *Arch Orthop Trauma Surg* 2003; 123(9): 485-8.
- 56 Liang M, Cornell HR, Zargar Baboldashti N, Thompson MS, Carr AJ, Hulley PA. Regulation of hypoxia-induced cell death in human tenocytes. *Adv Orthop* 2012; 2012: 984950.
- 57 de Girolamo L, Stanco D, Galliera E, Vigano M, Colombini A, Setti S, *et al.* Low frequency pulsed electromagnetic field affects proliferation, tissue-specific gene expression, and cytokines release of human tendon cells. *Cell Biochem Biophys* 2013; 66(3): 697-708.
- 58 de Girolamo L, Vigano M, Galliera E, Stanco D, Setti S, Marazzi MG, *et al.* *In vitro* functional response of human tendon cells to different dosages of low-frequency pulsed electromagnetic field. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2015; 23(11): 3443-53.
- 59 Denaro V, Ruzzini L, Barnaba SA, Longo UG, Campi S, Maffulli N, *et al.* Effect of pulsed electromagnetic fields on human tenocyte cultures from supraspinatus and quadriceps tendons. *Am J Phys Med Rehabil* 2011; 90(2): 119-27.
- 60 Seeliger C, Falldorf K, Sachtleben J, Griensven M. Low-frequency pulsed electromagnetic fields significantly improve time of closure and proliferation of human tendon fibroblasts. *Eur J Med Res* 2014; 19(1): 37.
- 61 Tsai WC, Hsu CC, Tang FT, Chou SW, Chen YJ, Pang JH. Ultrasound stimulation of tendon cell proliferation and upregulation of proliferating cell nuclear antigen. *J Orthop Res* 2005; 23(4): 970-6.
- 62 Tsai WC, Cheng JW, Chen JL, Chen CY, Chang HN, Liao YH, *et al.* Low-level laser irradiation stimulates tenocyte proliferation in association with increased NO synthesis and upregulation of PCNA and cyclins. *Lasers Med Sci* 2014; 29(4): 1377-84.
- 63 Chao YH, Tsuang YH, Sun JS, Chen LT, Chiang YF, Wang CC, *et al.* Effects of shock waves on tenocyte proliferation and extracellular matrix metabolism. *Ultrasound Med Biol* 2008; 34(5): 841-52.
- 64 Xue M, Thompson P, Kelso I, Jackson C. Activated protein C stimulates proliferation, migration and wound closure, inhibits apoptosis and upregulates MMP-2 activity in cultured human keratinocytes. *Exp Cell Res* 2004; 299(1): 119-27.
- 65 Xue M, Smith MM, Little CB, Sambrook P, March L, Jackson CJ. Activated protein C mediates a healing phenotype in cultured tenocytes. *J Cell Mol Med* 2009; 13(4): 749-57.
- 66 Courneya JP, Luzina IG, Zeller CB, Rasmussen JF, Bocharov A, Schon LC, *et al.* Interleukins 4 and 13 modulate gene expression and promote proliferation of primary human tenocytes. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2010; 3: 9.
- 67 陈曦, 秦廷武, 王治, 杨志明. 表面改性及微沟槽技术对肌腱细胞生长与取向的影响. *生物医学工程学杂志*(Chen Xi, Qin Tingwu, Wang Zhi, Yang Zhiming. Effects of micropatterned surfaces coated with type I collagen on the orientation and growth of tenocytes. *Journal of Biomedical Engineering*) 2008; 25(2): 382-7.
- 68 Zhu J, Li J, Wang B, Zhang WJ, Zhou G, Cao Y, *et al.* The regulation of phenotype of cultured tenocytes by microgrooved surface structure. *Biomaterials* 2010; 31(27): 6952-8.
- 69 Kapoor A, Caporali EH, Kenis PJ, Stewart MC. Microtopographically patterned surfaces promote the alignment of

- tenocytes and extracellular collagen. *Acta Biomater* 2010; 6(7): 2580-9.
- 70 Park SA, Kim IA, Lee YJ, Shin JW, Kim CR, Kim JK, *et al.* Biological responses of ligament fibroblasts and gene expression profiling on micropatterned silicone substrates subjected to mechanical stimuli. *J Biosci Bioeng* 2006; 102(5): 402-12.
- 71 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): 1543-50.
- 72 Wang JH, Yang G, Li Z, Shen W. Fibroblast responses to cyclic mechanical stretching depend on cell orientation to the stretching direction. *J Biomech* 2004; 37(4): 573-6.