

肌腱挛缩机制在分子水平的研究进展

赵华昆,马燕红

【关键词】 肌腱挛缩;细胞因子;胶原纤维;代谢

【中图分类号】 R49;R686.1 【DOI】10.3870/zgkf.2012.02.023

肌腱是肌腹两端的致密结缔组织,主要由胶原纤维束、束间结缔组织及散在分布的肌腱细胞构成。以往的研究证实应力作用下肌腱会按照 Wolff 定律进行更新和重建^[1]。但在长时间制动的情况下,细胞外基质中各种细胞因子、胶原酶及其抑制物的含量会出现异常改变,导致肌腱细胞、胶原纤维和细胞外基质的代谢紊乱,在形态上表现为肌腱的挛缩。本文就国内外肌腱内主要结构在代谢平衡紊乱时其分子水平的改变情况的相关研究进展综述如下。

1 胶原纤维的代谢平衡及其影响因素

正常肌腱组织中已知的胶原类型中 I 型胶原占 95%, III 型胶原和 V 型胶原占大约 5%。III 型胶原主要存在于腱内膜和腱鞘^[2]。V 型胶原分布在胶原原纤维束的中心起调节纤维形成的作用。研究显示胶原原纤维的稳定性与其结构有密切关系,正常的三聚体结构可以抵抗基质金属蛋白酶(MMPs)对其的分解作用^[3]。以上各种纤维主要由肌腱细胞及腱鞘细胞合成,老化或损伤后由基质中的 MMPs 家族中的胶原酶类(MMP-1、8、13、18)特别是 MMP-1 和 MMP-13 分解,正常情况下合成与分解保持相对的平衡状态。在各种损伤因素的作用下平衡被打破,就会出现各种病理表现。Wang 等^[4]研究发现,长时间制动后,肌腱组织中直径在 100nm 左右的纤维明显减少且排列紊乱,直径在 40nm 左右的纤维数量明显增加,细胞数量明显增加。上述表现可能是由于胶原的分解代谢大于合成代谢的结果。直接降解胶原的 MMPs 主要是胶原酶类,包括 MMP-1、MMP-8、MMP-13 和 MMP-18。胶原酶的天然抑制剂是基质金属蛋白酶抑制剂(TIMPs)。两者的比例关系决定了胶原的稳定性。Zanotti 等^[5]研究发现,TIMP 与 MMP-1 和 MMP-3 的比例失调会导致各种基质病变如纤维化、滑膜挛缩和肌腱断裂等。Fu 等^[6]的研究也发现在正常人的跟腱组织中 TIMP-1 阳性细胞占的百分比要高于 MMP-1 阳性细胞,在肌腱炎的患者跟腱组织中这个比例关系发生了反转。Arnoczky 等^[7]研究也证实外源性的 TIMP 可以抑制制动肌腱组织中过高水平的 MMPs 引起的分解代谢。研究证实锻炼可以使血清和腱周组织中的 TIMP-1 含量增加^[8-9]。而长期制动可能会使 MMPs 之间以及 MMPs 和 TIMP 之间的比例关系发生紊乱,使胶原纤维的分解与合成的平衡被打破。Gardner 等^[10]报道体外培养鼠

肌腱组织在应力屏蔽 24 h 后 TIMP-1 与 MMP-13 的 mRNA 表达的比例关系就发生了反转,其原因是 MMP-13 的 mRNA 表达显著增加导致。在这种分解因素占主导地位的情况下,成熟的胶原纤维束会被逐步分解变细,而新生成的原纤维束在过强的分解因素作用下也无法聚合成较为稳定的纤维束,随着制动时间的延长,胶原代谢的平衡会越来越向分解方向倾斜,最终表现为肌腱直径的缩小和生物力学性质的下降。除此之外,MMPs 中各种酶的平衡关系对胶原的代谢也有很大的影响,其中基质溶素类中的 MMP-3 就有激活酶原特别是 MMP-1 的作用。而且在 MMP-3 对胶原周围基质中的蛋白多糖和糖胺聚糖降解后使胶原表面的特定位点暴露,MMP-1 等胶原酶才能与之结合并发挥作用^[11-12]。最近的研究还发现,不同部位的肌腱组织中 MMPs 和 TIMPs 的比例关系在相同的环境下也会有差异。Thornton 等^[12]的研究发现,在相同的应力屏蔽条件下大鼠的冈上肌肌腱中 MMP-13、MMP-3 和 TIMP-2 的上升幅度远大于跟腱;在间歇性循环静压力下冈上肌肌腱中 MMP-13 的表达增加而跟腱中没有改变,提示在机体运动过程中承担不同作用的肌腱组织的代谢平衡不是建立在同一水平上的,所以不应该以完全一致的标准来制订治疗方案和进行疗效评定。目前的实验研究是以体外环境下短时间的单一分解或合成因素的影响为主要研究对象。对于在体内长时间制动导致的挛缩情况下,胶原分解与合成因素之间的相互影响引起的平衡改变还需要进一步的研究。

2 胶原纤维束周结缔组织的代谢平衡及其影响因素

束周结缔组织主要由肌腱细胞合成,除血管神经外主要由胶原、非胶原糖蛋白、蛋白聚糖和弹性蛋白构成。其中胶原以 III 型为主,成网状松散排列,其特点是可以快速形成分子内、分子间交联,为胶原纤维束的排列提供结构支撑^[13]。其分解代谢主要由基质金属蛋白酶中的明胶酶(MMP-2、MMP-9)、基质溶素(MMP-3、MMP-10)和基质裂解蛋白(MMP-7、MMP-26)完成^[14]。明胶酶可以分解变性的胶原、明胶和层粘蛋白等。基质溶素能分解几乎所有基质中的糖蛋白和蛋白多糖,MMP-3 还能分解 III、IV、V、VI 型胶原,虽然它不直接分解 I 型胶原,但可以激活其他 MMPs 酶原如 MMP-1 来间接促进其分解。MMP-10 的生物学活性不如 MMP-3,所以 MMP-3 被认为是胞外基质最主要的分解因素^[15]。基质裂解蛋白除分解基质,也参与处理细胞表面分子如防御蛋白 α 、钙粘素-E 等^[11]。以上分解因素在正常情况下与其天然抑制剂 TIMP 保持相对平衡以维持胞外基质和胶原的正常结构。对基质代谢有重要影响的还有

基金项目:上海交通大学医学院自然科学基金资助(YZ1061)

收稿日期:2011-01-15

作者单位:上海交通大学附属第六人民医院康复科,上海 200233

作者简介:赵华昆(1979-),男,在读研究生,主要从事骨关节康复方面的研究。

Decorin 和 MMPS 之间的比例关系。Decorin 是一种小分子蛋白多糖,基本结构包括一个蛋白质核心和连接在其上的 GAGs 链。Ferdous 等^[16]报道 Decorin 可与 I、II、III、VI、XIV 型胶原结合,其 GAGs 链从原纤维表面伸出与周围的原纤维相连接,形成原纤维间桥,调节胶原原纤维的直径和紧张度。Ferdous 等^[16]研究发现体外静态培养正常胚胎成纤维细胞和 Decorin 基因敲除的细胞,4 周后敲除组生成的细胞基质表现出更大的收缩性、细胞密度、抗张强度和弹性系数。以上结论提示 Decorin 过多表达可能会抑制细胞增殖,被缩短的 GAGs 链可能会使胶原原纤维束难以聚合,导致胶原原纤维束变细。研究发现长时间制动肌腱组织胶原纤维直径明显变细,胶原总量明显减少,这可能与 Decorin 的平衡失调有关^[17]。另外,Decorin 的蛋白核心区可以结合 TGF- β ,且不影响其与胶原原纤维的结合^[16],但会阻断 TGF- β 的生物学活性,使其对肌腱细胞的促合成作用受到抑制。Baghy 等^[18]在研究肝脏纤维化时发现敲除 Decorin 基因的小鼠在致纤维化的因素作用下成纤维细胞比正常小鼠显著增强表达 I、III、IV 型胶原和 TIMP-1,而 MMP-2 和 MMP-9 的表达下降。这与 TGF- β 对细胞的作用相吻合。综上所述,MMPs 与 Decorin 之间的比例关系的改变影响对胶原纤维的合成和聚合及肌腱组织的抗张强度和正切模量。Jones 等^[19]研究发现跟腱退变患者的肌腱组织中 MMP-13 和 MMP-1 变化不明显,只有 MMP-3 显著下降,退变的肌腱的力学性质会逐渐下降,使断裂的可能性增高。由此推断 MMP-3 降低对胶原本身起保护作用,不导致力学性质的下降,但 MMP-3 下降使 Decorin 的含量逐渐增多,导致新生成的胶原原纤维难以聚合成正常直径的纤维束,而且增多的 Decorin 会结合更多的 TGF- β ,抑制前胶原的生成和肌腱细胞的增殖,导致肌腱力学性质的下降,发生挛缩和断裂。

3 肌腱内细胞的代谢平衡及影响因素

肌腱内细胞数量稀少,只占总体积的 5%。其中 95% 为肌腱细胞,在肌腱止点处还有少量纤维软骨细胞,偶可见滑膜细胞和内皮细胞。肌腱细胞由腱母细胞分化而成,属于成纤维细胞类。肌腱细胞的形状很特殊,其胞体沿胶原纤维的长轴平铺延展成膜状包裹于胶原纤维表面,通过特化的细胞外基质-整合素-细胞骨架结构与胞外基质或其他细胞连接。其胞质极薄,胞浆中富含粗面内质网和高尔基体,几乎不含线粒体。整合素连接的纤毛结构周围力的变化非常敏感,Gardner 等^[20]对肌腱细胞纤毛的研究发现,应力屏蔽后 24 h 细胞表面纤毛的长度明显较正常对照组变长,而周期性应力下纤毛的长度与正常对照组无差异。屏蔽后变长的纤毛在恢复周期性应力作用后很快会恢复到正常长度。表明在应力减弱或消失的情况下细胞会通过调节纤毛的长度来增强其敏感性。以往的研究发现纤毛通过整合素将力学信号转换成胞内钙离子浓度的变化,进而引起一系列的细胞因子的转录和翻译过程的变化^[21]。Yamamoto 等^[22]将兔的髌腱离体后在无应力的条件下培养 1 周后其正切模量和抗张强度明显降低,上述处理后再给与持续性应力 2 周后这两项指标又明显升高但还是低于正常对照组。Yang 等^[23]研究发现细胞表达的 IL-1 β 、PGE2 在无应力和 8% 应力时增高,

4% 应力时降低。表明应力屏蔽和过大应力可能会通过纤毛-整合素-钙离子浓度途径引起分解代谢的加强,使胶原和基质出现挛缩或炎症改变。肌腱细胞可以合成和分泌多种结构蛋白质、生长因子、细胞因子、激素和酶类物质,同时也受其分泌的各种物质的调节。在正常情况下,肌腱细胞的合成和分泌活动在外界应力和胞外各种细胞介质的作用下维持在一个相对稳定的状态,从而使肌腱的结构和功能保持稳定。Uchida 等^[24]研究发现长时间制动会引起肌腱细胞大量表达 IL-1 β 、TNF- α 和 TGF- β 。IL-1 β 和 TNF- α 属于促炎因子,Xiao 等^[25]用不同浓度的 IL-1 β 处理体外培养的心脏成纤维细胞发现其可以促进 MMP-2 和 MMP-9 的活性和表达且促进程度与 IL-1 β 有剂量依赖性;低剂量(<0.01ng/ml)对细胞增殖无影响,>0.1ng/ml 会抑制细胞的分裂,这可能会降低胶原的合成。研究发现体外培养的肌腱细胞用 IL-1 β 处理后 MMP-1 和 MMP-3 的表达明显增加,I 型胶原的表达明显下降。而其会引起 MAPKs 的激活,促进 PGE2 的表达和合成增加,这会抑制细胞增殖^[26]。Kawabata 等^[27]研究发现 Jun N-末端激酶(JNK)和丝裂原活化的蛋白激酶(MAPK P38)阳性细胞明显增加,导致细胞凋亡的发生。综上所述 IL-1 β 会引起胶原和基质的分解加强以及合成减少。TGF- β 可以促进 I 型胶原和 III 型胶原以及几乎所有的细胞外基质的合成,抑制 MMPs 的合成、促进 TIMPs 的合成,促进细胞增殖^[28]。应力屏蔽后 IL-1 β 、TNF- α 和 TGF- β 都大量增加说明细胞可能进入了一个高代谢状态而不是单纯的分解或合成增加的状态。以前的研究就发现在制动后短时间内虽然基质和胶原的代谢发生了明显改变但胶原的总量变化并不明显^[29]。这种状态的持续很可能扰乱了基质中的酶、蛋白和胶原的正常代谢,最终导致了肌腱挛缩。除了上述细胞因子外 IGF-1、PDGF、NO、FGF、IL-6 等对肌腱挛缩的影响还有待进一步研究。

肌腱挛缩的过程非常复杂,从分子水平对其病因和发展过程的研究可以为将来的治疗提供更多的思路和方法。通过对以往研究结果的分析发现应力的非正常改变可能是诱发因素,它通过影响肌腱细胞表面的应力感受纤毛的活动改变了细胞内钙离子的浓度,从而诱发了多种细胞因子的表达改变如 IL-1 和 TGF- β 等,这些细胞因子会作用于肌腱细胞,使其代谢加快,导致前胶原蛋白、MMPs、TIMP、基质蛋白等的表达与合成的平衡被打破,胶原排列出现紊乱。同时会引起细胞数量的改变。如果应力的改变持续下去,可能会导致肌腱细胞凋亡或合成原料的不足,使代谢平衡最终向分解方向倾斜,出现胶原和基质的减少,力学性质的退变,形态学上表现为肌腱挛缩。当然,挛缩本身是一种多因素作用的结果,各种因素在各个阶段所起的具体作用还需要大量的研究来证实。

【参考文献】

- [1] 艾伟进,黄昌林,吕荣,等. 制动对豚鼠跟腱基质的影响 [J]. 中国骨与关节损伤杂志,2005,20:325-327.
- [2] Wang JH. Mechanobiology of tendon [J]. J Biomech, 2006, 39 (9):1563-1582.
- [3] Birk DE, Fitch JM, Babiarz JP, et al. Collagen fibrillogenesis in vitro: interaction of types I and V collagen regulates fibril diameter

- ter [J]. *J Cell Sci*, 1990, 95(4): 649—657.
- [4] Wang W, Tang X, Zhang J, et al. Complete stress shielding of the Achilles tendon; ultrastructure and level of interleukin-1 and TGF-beta [J]. *Orthopedics*, 2010, 33 (11): 810—810.
- [5] Zanotti S, Gibertini S, Mora M. Altered production of extra-cellular matrix components by muscle-derived Duchenne muscular dystrophy fibroblasts and after TGF-beta1 treatment [J]. *Cell Tissue Res*, 2010, 339 (2): 397—410.
- [6] Fu SC, Chan BP, Wang W, et al. Increased expression of matrix metalloproteinase 1 (MMP1) in 11 patients with patellar tendinosis [J]. *Acta Orthop Scand*, 2002, 73 (6): 658—662.
- [7] Arnoczky SP, Lavagnino M, Egerbacher M, et al. Matrix metalloproteinase inhibitors prevent a decrease in the mechanical properties of stress-deprived tendons: an in vitro experimental study [J]. *Am J Sports Med*, 2007, 35(5): 763—769.
- [8] Mackey AL, Donnelly AE, Turpeenniemi T, et al. Skeletal muscle collagen content in humans after high-force eccentric Contractions [J]. *J Appl Physiol*, 2004, 97(3): 197—203.
- [9] Tayebjee MH, Lip GY, Blann AD, et al. Effects of age, gender, ethnicity, diurnal variation and exercise on circulating levels of matrix metalloproteinases (MMP)-2 and -9, and their inhibitors, tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMP)-1 and -2 [J]. *Thromb Res*, 2005, 115(3): 205—210.
- [10] Gardner K, Arnoczky SP, Caballero O. 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.
- [11] Asundi KR, Rempel DM. Cyclic loading inhibits expression of MMP-3 but not MMP-1 in an in vitro rabbit flexor tendon model [J]. *Clin Biomech*, 2008, 23(1): 117—121.
- [12] Thornton GM, Shao X, Chung M, et al. Changes in mechanical loading lead to tendonspecific alterations in MMP and TIMP expression: influence of stress deprivation and intermittent cyclic hydrostatic compression on rat supraspinatus and Achilles tendons [J]. *Br J Sports Med*, 2010, 44(10): 698—703.
- [13] Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs [J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 69(3): 562—573.
- [14] Moon PD, Jeong HS, Chun CS, et al. Baekjeolysin-tang and its active component berberine block the release of collagen and proteoglycan from IL-1beta-stimulated rabbit cartilage and down-regulate matrix metalloproteinases in rabbit chondrocytes [J]. *Phytother Res*, 2011, 23(6): 844—850.
- [15] Ferdous Z, Lazaro LD, Iozzo RV, et al. Influence of cyclic strain and decorin deficiency on 3D cellularized collagen matrices [J]. *Biomaterials*, 2008, 29(18): 2740—2748.
- [16] Ferdous Z, Wei VM, Lozzo R, et al. Decorin-transforming growth factor-interaction regulates matrix organization and mechanical characteristics of three-dimensional collagen matrices [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(49): 35887—35898.
- [17] 汤小雨, 马燕红. 关节制动对肌腱形态学和力学特性的影响 [J]. *中国康复*, 2008, 23(2): 129—130.
- [18] Baghy K, Dezsó K, Laszlo V, et al. Ablation of the decorin gene enhances experimental hepatic fibrosis and impairs hepatic healing in mice [J]. *Lab Invest*, 2011, 91(3): 439—451.
- [19] Jones GC, Corps AN, Pennington CJ, et al. Expression profiling of metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in normal and degenerate human achilles tendon [J]. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(3): 832—842.
- [20] Gardner K, Arnoczky SP, Lavagnino M. Effect of in vitro stress-deprivation and cyclic loading on the length of tendon cell cilia in situ [J]. *J Orthop Res*, 2011, 29(4): 582—587.
- [21] Temiyasathit S, Jacobs CR. Osteocyte primary cilium and its role in bone mechanotransduction [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2010, 1192 (164): 422—428.
- [22] Yamamoto E, Kogawa D, Tokura S, et al. Biomechanical response of collagen fascicles to restressing after stress deprivation during culture [J]. *J Biomech*, 2007, 40(9): 2063—2070.
- [23] Yang G, Im HJ, Wang JH. Repetitive mechanical stretching modulates IL-1beta induced COX-2, MMP-1 expression, and PGE2 production in human patellar tendon fibroblasts [J]. *Gene*, 2005, 363(19): 166—172.
- [24] Uchida H, Tohyama H, Nagashima K, et al. Stress deprivation simultaneously induces over-expression of interleukin-1beta, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta in fibroblasts and mechanical deterioration of the tissue in the patellar tendon [J]. *J Biomech*, 2005, 38(4): 791—798.
- [25] Xiao H, Ji AM, Li Z, et al. Interleukin-1beta inhibits collagen synthesis and promotes its decomposition in cultured cardiac fibroblasts [J]. *Journal of Physiology*, 2008, 60(3): 355—361.
- [26] Thampatty BP, Li H, Im HJ, et al. EP4 receptor regulates collagen type-I, MMP-1, and MMP-3 gene expression in human tendon fibroblasts in response to IL-1 beta treatment [J]. *Gene*, 2007, 386 (1—2): 154—161.
- [27] Kawabata H, Katsura T, Kondo, et al. Stress deprivation from the patellar tendon induces apoptosis of fibroblasts in vivo with activation of mitogen-activated protein kinases [J]. *J Biomech*, 2009, 42 (15): 2611—2615.
- [28] Heinemeier K, Langberg H, Olesen JL, et al. Role of TGF-beta1 in relation to exercise-induced type I collagen synthesis in human tendinous tissue [J]. *J Appl Physiol*, 2003, 95(6): 2390—2397.
- [29] Amiel D, Akeson WH, Harwood FL, et al. Stress deprivation effect on metabolic turnover of the medial collateral ligament collagen. A comparison between nine- and 12-week immobilization [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 1983, 172(11): 265—270.