

韧带组织工程中物理环境影响干细胞分化的研究进展

张亚强^{1,2}, 杨成伟¹, 封国超¹, 李闯兵¹, 时培晟¹, 甄平¹

(1.解放军联勤保障部队第 940 医院骨科中心, 甘肃 兰州 730050; 2.兰州大学第二临床医院, 甘肃 兰州 730030)

【摘要】 韧带组织工程是目前治疗韧带损伤的一种新型的方法,其可以替代自体移植物的不足。韧带组织工程包括 4 个基本要素:种子细胞、纳米支架、生长因子、机械刺激。目前韧带组织工程存在的主要问题是更可控的使种子细胞向韧带细胞分化。研究发现天然生物韧带的每一个物理特性及机械刺激(单轴拉伸)在干细胞向韧带细胞分化中起十分重要的作用,所以纳米纤维支架的设计必须要考虑材料的弹性模量、材料的结构(材料的排列方式、孔隙率及直径等),不同范围内的弹性模量及材料结构会引导细胞向不同谱系分化。考虑到韧带是人体主要的受力组织,所以机械刺激对干细胞分化也是必不可少的,尤其是单轴拉伸,其最符合韧带在体内的受力情况,大量研究发现拉伸的频率、幅度及时间也会引导细胞向不同方向分化。RhoA/卷曲螺旋蛋白激酶对细胞骨架的重构和分化起调节作用,同时研究发现 RhoA/卷曲螺旋蛋白激酶蛋白参与了纳米纤维排布及单轴拉伸引导干细胞向韧带细胞分化的过程,具体是如何影响干细胞分化的,目前并不清楚,了解物理特性对干细胞分化的影响并且弄清 RhoA/卷曲螺旋蛋白激酶蛋白的作用机制,将为进一步优化韧带组织工程提供了新的理论依据。

【关键词】 韧带组织工程; 机械刺激; 弹性模量; 单轴拉伸

中图分类号:R320.2745

DOI:10.12200/j.issn.1003-0034.2020.11.019

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Advances on research of physical environment affecting stem cell differentiation in ligament tissue engineering
ZHANG Ya-qiang, YANG Cheng-wei, FENG Guo-chao, LI Chuang-bing, SHI Pei-sheng, and ZHEN Ping*. *The 940th Hospital of Joint Logistics Support Force of Chinese People's Liberation Army, Lanzhou 730050, Gansu, China

ABSTRACT Ligament tissue engineering is currently a novel approach to the treatment of ligament injury, which can replace the deficiency of autografts. Ligament tissue engineering consists of four basic elements: seed cells, nanoscaffolds, growth factors, and mechanical stimulation. At present, the main problem in ligament tissue engineering is how to control seed cells to ligament cells more controllably. The study found that each physical property of the natural bio-ligament and mechanical stimulation (uniaxial stretching) plays an important role in the differentiation of stem cells into ligament cells. Therefore, the design of nanofiber scaffolds must consider the elastic modulus of the material and the material. Structure (material arrangement, porosity and diameter, etc.), elastic modulus and material structure in different ranges will guide cells to differentiate into different lineages. Considering that the ligament is the main force-bearing tissue of the human body, mechanical stimulation is also essential for stem cell differentiation, especially uniaxial stretching, which best meets the stress of the ligament in the body. A large number of studies have found the frequency and amplitude of stretching. And time will also lead the cells to differentiate in different directions. RhoA/ROCK plays a regulatory role in cytoskeletal remodeling and cell differentiation. It is also found that RhoA/ROCK protein participates in the process of nanofiber arrangement and uniaxial stretching to guide stem cells to differentiate into ligament cells, specifically how to influence stem cell differentiation. It is not clear at present that understanding the effects of physical properties on stem cell differentiation and understanding the mechanism of action of RhoA/ROCK protein will provide a new theoretical basis for further optimization of ligament tissue engineering.

KEYWORDS Ligament tissue engineering; Mechanical stimulation; Elastic modulus; Uniaxial stretching

基金项目:国家自然科学基金(编号:81601905,81371983);全军后勤科研面上项目(编号:CWH17J007)

Fund program: Chinese National Natural Science Foundation (No. 81601905, 81371983)

通讯作者:甄平 E-mail: Zhenpinggok@163.com

Corresponding author: ZHEN Ping E-mail: Zhenpinggok@163.com

韧带肌腱损伤是肌肉骨骼疾病发病率最高的疾病之一,全球每年韧带肌腱相关损伤占运动损伤的 30%~50%^[1]。韧带组织由高度取向性的胶原纤维组成,作为体内主要的辅助固定结构,在体内承担着各种巨大应力。韧带相关的损伤或疾病是关节功能受损的常见原因,损伤可引起关节不稳定、疼痛及运动

障碍,严重影响患者生活质量。目前临床上韧带损伤修复的主要策略是韧带成形术,在这种干预中使用的移植物包括自体移植物、异体移植物和人工替代物^[2]。然而,这些手术仍存在许多缺点,包括供区骨关节炎、免疫排斥和有限的移植物来源。随着组织工程的兴起,韧带组织工程可成为修复损伤韧带功能的一种新颖、有吸引力的替代方法^[3]。值得注意的是,生物材料与干细胞结合的应用是一种新的和广泛探索的组织工程方法,用于再生受损组织,利用功能细胞加强修复过程的机会。然而,这一策略的关键点是如何确定有效和准确地促进干细胞分化成期望的细胞类型,其中物理环境对干细胞分化的影响值得探究。

目前用于组织工程的材料包括天然生物材料和人工合成生物材料。天然生物材料主要有胶原、透明质酸、壳聚糖、蚕丝、海藻酸盐、硫酸软骨素等,这些生物材料虽然具有良好的生物相容性和生物活性、易被细胞识别、有利于细胞黏附、迁移和增殖等优点,但植入人体后易降解,且力学强度不足。人工合成生物材料主要包括单一合成材料和复合材料,目前研究的主要有聚己内酯、聚左旋乳酸、聚乙醇酸以及聚乳酸-聚羟基乙酸等,这些合成材料在机械性能、降解速度得到了极大改善,其在组织工程领域的应用也越来越广泛,但其生物相容性与天然生物材料相比,仍有很大不足^[3]。所以两种材料的结合也是一种目前研究的热点。

组织工程韧带的关键是设计模拟纤维结构和天然肌腱细胞外基质的机械和功能特性的纤维支架以及可控的干细胞分化诱导方式。对仿生材料构建物与干细胞之间的相互作用的协调研究促进了再生的潜力和可能直接替换患病的细胞和组织。目前可利用各种纤维形成技术和纺织技术构建微结构与韧带相似的纳米支架。然而,这些纳米级别的支架不同于天然细胞外基质固有的纳米级纤维组织,导致细胞交互作用减少以及很难刺激组织再生,机械刺激可以更好的诱导组织的再生^[4]。目前组织工程面临的最大障碍之一是生物材料支架及机械刺激产生的特定细胞外信号如何影响干细胞的增殖和分化。如果解决这些问题,可以更好的将机械刺激与仿生支架相结合,进一步优化韧带组织工程。

1 材料对干细胞向韧带细胞分化的影响

细胞分化、增殖、迁移、凋亡或执行其他功能的最终决定是对与细胞外细胞外基质的物理和化学相互作用的协调响应^[4]。所以在设计用于体内外产生具有特定微结构组件的组织材料时,必须考虑细胞与周围基质之间的动态相互作用。研究发现材料弹

性模量、材料结构对干细胞向韧带细胞分化都有很大的影响,了解这些因素如何影响细胞分化,可以更准确、更可控的诱导干细胞向特定谱系分化^[5-6]。

1.1 材料弹性模量对干细胞向韧带细胞分化的影响

人体内的韧带组织是有很定的弹性强度的,所以纳米纤维支架的设计要充分考虑到与天然韧带相匹配的弹性模量,但目前存在的问题是如何确定最佳的弹性模量^[4]。研究发现基质弹性(刚度)在细胞粘附、迁移、形态和分化中起着重要作用^[5,7]。细胞可以动态地感知微环境的弹性模量,并通过整合素介导的粘着斑复合物施加收缩力,增加细胞的粘附。但细胞仅对与细胞刚性相当的窄范围内的刚性差异敏感^[8]。例如,神经干细胞在具有近似脑组织硬度的基质上才显示出神经原性生物标志^[6]。Mousavi 等^[9]初步证明通过改变聚丙烯酰胺凝胶弹性模量可以指导干细胞的谱系特异性,在 0.1~1、20~25 和 30~45 kPa 的弹性基质上骨髓间充质干细胞分别向神经源性、软骨性和成骨性的分化。细胞与基底弹性之间的物理相互作用已经显示出可以引导干细胞向腱系分化。Sharma 等^[10]用胶原包被聚丙烯酰胺作为基质,证实 30~50 kPa 的弹性可以促进人骨髓间充质干细胞的韧带细胞分化。Whitehead 等^[11]得出的结果与 Sharma 报道的结果吻合,发现增加弹性模量导致肌腱/韧带相关基因 I 型胶原, III 型胶原,生腱蛋白-C 和巩膜素的表达增加。他们观察到在 30~50 kPa 的弹性范围内 BMSCs 向韧带样分化更强。有趣的是,Sharma 等^[10]在 70~90 kPa 基质上没有观察到明显的成腱分化,但有明显的成骨分化,他们把这个结果归因于分化的成骨细胞和间充质干细胞之间的旁分泌信号传导,抑制了肌腱的分化。同时,Rehmann 等^[12]发现,随着弹性从 50 kPa 增加到 90 kPa,腱源性标记基因表达水平恒定。尽管在特定范围内基质弹性的增加并不抑制间充质干细胞向腱源性谱系分化的能力,但随着基质弹性的增加,观察到腱源性祖细胞和成骨性祖细胞的混合。由于细胞来源、底物制备和分化方案的差异,在不同的研究中,最佳的底物刚度是不同的。因此,了解干细胞感受弹性、启动腱源性分化的机制是十分必要的,从而为进一步促进韧带生成和抑制成骨提供线索。

1.2 材料结构对干细胞向韧带细胞分化的影响

纳米纤维支架的排列和直径大小对干细胞的分化有一定的影响^[13]。Lee 等^[14]比较聚左旋乳酸纤维排列对肌腱干细胞的影响。当在取向排列的支架上培养时,肌腱干细胞显示纺锤形的形态,典型的成纤维细胞表型。此外,与随机排列的支架相比,在取向排列的纤维支架上培养的细胞呈现出肌腱上调的表

达和基质沉积(胶原)并抵抗骨诱导。当将相同的支架植入异位小鼠模型中时,纤维排列也能增强细胞排列的形态和胶原合成。Engelbrecht 等^[15]研究了纤维直径对细胞活性的影响,他们在不同纤维大小的聚乳酸-羟基乙酸共聚物支架上培养人肩袖成纤维细胞。细胞与不同基质接触后,在直径较小的纳米纤维支架中呈现高产量的肌腱样基质(胶原和糖胺聚糖),而在较大的纤维支架中培养 28 d 后呈现高表达的肌腱相关标志物(I 型胶原、III 型胶原和腱调蛋白)。在类似的研究中,Cardwell 等^[16]也研究了纤维直径对干细胞分化为腱韧带谱系的影响。培养 9 d 后,细胞实现了肌腱韧带的分化,不管纤维排列如何,在较大的纤维上产生更多的胶原。综上所述,小的、纳米级的随机纤维提供了类似于肌腱愈合过程中的炎症阶段的细胞环境,促进了细胞外基质的合成和细胞增殖,而较大、规则排列的纤维则模仿了肌腱中胶原的正常结构,维持肌腱细胞表型。这可以解释为什么大纤维促进高水平的肌腱相关基因表达,确保成纤维细胞表型的维持。

韧带多由型胶原构成。为此,大多数研究都集中在胶原单独或与其他分子混合,如糖胺聚糖作为肌腱组织工程的载体,以进一步模拟腱系细胞外基质的性质。目前已经有很多不同的方案来生产理想的胶原支架,例如三维胶原海绵、挤压胶原纤维或电化学胶原线,所有这些都适用于肌腱重建^[17-18]。Youngstrom 等^[19]制造了胶原-硫酸软骨素性海绵,其通过在定向与无规孔隙分布的海绵上培养马肌腱细胞,发现与无规孔隙海绵相比,定向孔隙海绵上细胞增殖、代谢活性更强,且细胞沿着孔隙方向排列。同时与小孔隙相比,大孔隙(>150 μm)也增强了细胞增殖和代谢活性,且上调肌腱相关标记物(I 型胶原,III 型胶原)的表达。Kishore 等^[20]比较了电化学取向胶原线(直径 50~100 μm)与随机胶原线,以更好地阐明胶原排列对人间充质干细胞的影响。有趣的是,与随机胶原线相比,细胞在取向胶原线中容易粘附,但随机细胞的增殖高于取向胶原线。14 d 后通过取向胶原线培养的细胞呈现纺锤形的成纤维细胞形态,并且高表达腱调蛋白。另一方面,在随机胶原线上培养的细胞呈现随机形态和较少的腱系相关标记物表达。同时没有任何分化因子刺激的情况下,胶原线的排列足以产生肌腱分化。可以肯定的是不管是何种材料,其结构(直径大小、排列方式、孔径大小)对于干细胞向腱系分化有很大的影响。在制造纳米纤维支架时,应充分考虑这些物理特性,并将这些特性结合起来,结合之后是否对引导干细胞向特定谱系分化,目前仍然不知,仍需要大量的研究去证明。

2 机械刺激力对干细胞向韧带细胞分化的影响

目前,组织工程和再生工程最关键的目标是提供适当刺激使干细胞预先确定分化并最终分化为特定谱系^[21]。机械刺激本身可以有效地控制间充质干细胞的分化^[22]。间充质干细胞先前已被证明是高度机械敏感性的,机械刺激可诱导干细胞向肌腱样细胞分化,在体内和体外上调韧带特异性标志物的表达和细胞外基质的产生^[23]。因此机械刺激是非侵入性引导其分化的理想方法。在体内和体外可能有许多不同类型的力可应用于间充质干细胞,如剪应力、拉伸应力、压缩应力,这些力对间充质干细胞的不同分化途径具有显著的作用。Youngstrom 等^[19]研究显示动态拉伸和扭转应变可以上调人间充质干细胞在胶原凝胶中的 I 型和 III 型胶原表达,并引导干细胞向成纤维细胞表型。类似地,最近的研究也显示了压缩应变和剪切应变分别用于软骨、骨和血管组织工程的潜力^[21,24-25]。机械刺激对于干细胞的分化是必不可少的,研究力型是如何影响干细胞分化的方向,是下一步的研究重点,尤其是其作用机制。

研究发现单轴拉伸是目前诱导和指导干细胞向腱源性分化的最佳力型。相比于难以控制时间和浓度的化学诱导,机械刺激,尤其是单轴拉伸在诱导干细胞向腱源性分化的过程更可控,更易引起机械转导反应,特别是调节反应基因表达,促进纤维发育过程中的基质沉积^[25]。Subramony 等^[26]研究了力型是如何影响间充质干细胞的增值和分化,发现单轴拉伸应变能更好地模拟体内的肌腱韧带细胞的受力情况,能够促进干细胞的增值,增加肌腱/韧带相关标记物的表达,然而,最佳载荷的大小、持续时间、频率仍不清楚。Engelbrecht 等^[15]将干细胞种植在脐带静脉管上,施加单轴拉伸,持续时间为(0.5、1、2 h/d),频率为(0.5、1、2 Hz),干细胞增殖率最高的是 0.5 h 和 0.5 Hz,紧随其后的是 1 h 和 1 Hz,培养 7 d 后,韧带相关标记物 I 型胶原、III 型胶原、生腱蛋白-C、巩膜素表达上调,成骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞表型下降。表明,在早期培养中,较慢频率和较短持续时间可以指导干细胞向腱源性分化。考虑到材料不同,最佳载荷也不同,但可以肯定的是载荷大小对于干细胞谱系特异性分化有一定影响。Chen 等^[27]在硅树脂材料上的间充质干细胞施加低强度拉伸时,间充质干细胞表达成骨分化标记基因,但有趣的是,当长期使用高强度拉伸时,肌腱和韧带相关基因反而上调。其以 10% 拉伸 48 h 后,腱生成标志物 I 型胶原、III 型胶原和腱蛋白-C 的表达显著增加。这一研究得到了 Mousiva 等^[9]的研究结果的支持,他通过对人骨髓间充质干细胞以 1 Hz 的循环频率进行 3 种循环

延伸,即 5%,10%或 15%,持续 24 h 或 48 h,通过聚合酶链反应测定基因表达水平和蛋白质印迹分析蛋白质表达水平的两种方法评估分细胞分化效果,结果显示标志物 I 型胶原、III 型胶原、生腱蛋白-C、巩膜素表达水平均增加,10%单轴拉伸刺激较其他组蛋白明显增加,说明 10%拉伸刺激有效诱导人骨髓间充质干细胞分化为肌腱细胞。不同的载荷大小、频率都会影响干细胞的分化方向,探究其应力转导的具体机制,可以更好的掌握不同仿生材料在单轴拉伸刺激下引导干细胞向韧带分化的最佳载荷大小、持续时间、频率。

3 RhoA/卷曲螺旋蛋白激酶信号在干细胞向韧带细胞分化的作用

近年来的研究发现,小分子量 G 蛋白家族成员 RhoA 及其下游的 Rho 相关卷曲螺旋蛋白激酶能够控制肌动蛋白的产生和重组,对细胞的骨架结构、细胞粘附、细胞形变和分化都具有重要的调节作用^[28]。细胞外基质和单轴拉伸会激活整合素通道,该通路下游的 RhoA/卷曲螺旋蛋白激酶作为细胞应力转导过程的关键分子,能感受细胞所处的力学微环境,调节细胞骨架结构使细胞形态与其所处的力学环境相适应,这对于感知机械刺激和指导干细胞分化是必不可少的^[29]。值得注意的是,在受到机械刺激后,已经发现 RhoA/卷曲螺旋蛋白激酶、细胞骨架组织和黏着斑激酶在 Tyr397 上的磷酸化是必不可少的。TYR397 磷酸化可调节机械牵张诱导间充质干细胞的腱源性分化。这种磷酸化过程可以通过抑制 RhoA/卷曲螺旋蛋白激酶、细胞骨架组织或黏着斑激酶而被阻断,这意味着这三者都是信号网络中的重要组成部分,该信号网络感知机械拉伸,然后驱动人类间充质干细胞的腱源性分化。RhoA/卷曲螺旋蛋白激酶、黏着斑激酶是机械牵张诱导人间充质干细胞向腱源性细胞分化的必要条件^[29-30]。Xu 等^[31]通过对细胞进行 1 Hz 和 10%应变的机械拉伸 48 h 后,发现机械牵张可诱导人骨髓间充质干细胞 I 型胶原、III 型胶原、生腱蛋白-C、巩膜素等腱源性相关蛋白表达显著增加,给予 RhoA/卷曲螺旋蛋白激酶的特异性抑制剂(Y-27632)、黏着斑激酶的特异性抑制剂(PF 573228)后相关的蛋白表达明显减弱。表明卷曲螺旋蛋白激酶、黏着斑激酶在干细胞分化过程中起着关键的作用。

之前的研究发现纳米纤维支架的排列也可以指导干细胞的分化。在取向纳米纤维材料上培养的干细胞保持细长的成纤维细胞形态,卷曲螺旋蛋白激酶通路是激活的,细胞高表达腱源性的蛋白,无规纳米纤维材料上的干细胞随意排列,卷曲螺旋蛋白激

酶通路未激活的,未表达相关腱源性蛋白^[30]。值得注意的是,在单轴牵张应力诱导间充质干细胞韧带分化的试验中,取向纳米纤维表面的细胞拉伸时,RhoA/卷曲螺旋蛋白激酶信号激活,且高表达韧带特异性蛋白^[32]。纤维随意排列的无规纳米纤维支架表面的干细胞受到单轴牵张应力刺激后,细胞内 RhoA/卷曲螺旋蛋白激酶信号也激活,可分化为成纤维细胞,但并不表达韧带细胞的标记物,甚至有骨化的倾向^[33]被认为是瘢痕细胞。以上的研究表明,RhoA/卷曲螺旋蛋白激酶同时参与取向纳米材料和机械刺激引导干细胞向韧带细胞的分化,但 RhoA/卷曲螺旋蛋白激酶是否是单轴牵张应力联合取向纳米纤维排布诱导干细胞向韧带细胞分化的必要条件,还需进一步研究,弄清 RhoA/卷曲螺旋蛋白激酶在干细胞分化中的具体机制,了解卷曲螺旋蛋白激酶通路上下游相关蛋白的激活情况,有利于优化韧带组织工程。

4 总结与展望

根据韧带的特定生理化学和生物力学特征设计的仿生支架已经被证实为调节韧带再生的细胞功能提供生物活性线索。然而,在韧带组织工程中,材料线索在指导干细胞向韧带细胞分化中的确切机制尚未得到确认。如何微妙地修改这些材料线索,并把它们最佳地结合到支架中,以开发具有生物活性的仿生材料。同时了解机械刺激对干细胞分化的影响,探究其具体的机制,才能有望将接近韧带组织特性的仿生材料与适宜载荷、频率的机械刺激巧妙地相结合,才能更有效、更准确引导干细胞向特定谱系分化。尽管大量的研究评估了细胞对生化和生物物理线索的反应的基本特性,但是将组织工程产品转归到临床中仍然是具有挑战性的。目前可以从 RhoA/卷曲螺旋蛋白激酶信号入手,阐明细胞形变与分化的关系,深入了解其中的应力转导机制,将为韧带的生物学修复提供新的理论依据和实验基础。

参考文献

- [1] Lui PP. Stem cell technology for tendon regeneration: current status, challenges, and future research directions[J]. Stem Cells Cloning, 2015, 8: 163-174.
- [2] Font Tellado S, Balmayor ER, Van Griensven M. Strategies to engineer tendon/ligament-to-bone interface: Biomaterials, cells and growth factors[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2015, 94: 126-140.
- [3] 孙正宇, 李箭. 组织工程韧带的研究进展[J]. 中国修复重建外科杂志, 2015, (9): 1160-1166.
SUN ZY, LI J. Research progress of tissue engineering ligament[J]. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi, 2015, (9): 1160-1166. Chinese.
- [4] Cheng B, Lin M, Huang G, et al. Cellular mechanosensing of the biophysical microenvironment: A review of mathematical models of biophysical regulation of cell responses[J]. Phys Life Rev, 2017,

- 22-23;88-119.
- [5] Sears C, Kaunas R. The many ways adherent cells respond to applied stretch[J]. *J Biomech*, 2016, 49(8): 1347-1354.
- [6] Yang Y, Wang K, Gu X, et al. Biophysical regulation of cell behavior-cross talk between substrate stiffness and nanotopography[J]. *Engineering(Beijing)*, 2017, 3(1): 36-54.
- [7] Islam A, Mbimba T, Younesi M, et al. Effects of substrate stiffness on the tenoinduction of human mesenchymal stem cells[J]. *Acta Biomater*, 2017, 58: 244-253.
- [8] Zemel A, Rehfeldt F, Brown A E, et al. Optimal matrix rigidity for stress fiber polarization in stem cells[J]. *Nature Physics*, 2010, 6(6): 468-473.
- [9] Mousavi SJ, Doweidar MH. Role of mechanical cues in cell differentiation and proliferation: A 3D numerical model[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0124529.
- [10] Sharma RI, Snedeker JG. Biochemical and biomechanical gradients for directed bone marrow stromal cell differentiation toward tendon and bone[J]. *Biomaterials*, 2010, 31(30): 7695-7704.
- [11] Whitehead AK, Barnett HH, Calderera-Moore ME, et al. Poly(ethylene glycol) hydrogel elasticity influences human mesenchymal stem cell behavior[J]. *Regen Biomater*, 2018, 5(3): 167-175.
- [12] Rehmann MS, Luna JI, Maverakis E, et al. Tuning microenvironment modulus and biochemical composition promotes human mesenchymal stem cell tenogenic differentiation[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2016, 104(5): 1162-1174.
- [13] Yau WW, Long H, Gauthier NC, et al. The effects of nanofiber diameter and orientation on siRNA uptake and gene silencing[J]. *Biomaterials*, 2015, 37: 94-106.
- [14] Lee NM, Erisken C, Iskratsch T, et al. Polymer fiber-based models of connective tissue repair and healing[J]. *Biomaterials*, 2017, 112: 303-312.
- [15] Engebretson B, Mussett ZR, Sikavitsas VI. The effects of varying frequency and duration of mechanical stimulation on a tissue-engineered tendon construct[J]. *Connect Tissue Res*, 2018, 59(2): 167-177.
- [16] Cardwell RD, Dahlgren LA, Goldstein AS. Electrospun fibre diameter, not alignment, affects mesenchymal stem cell differentiation into the tendon/ligament lineage[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2015, 8(12): 937-945.
- [17] Pillai DS, Dhinsa BS, Khan WS. Tissue engineering in achilles tendon reconstruction; the role of stem cells, growth factors and scaffolds[J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2017, 12(6): 506-512.
- [18] De France KJ, Xu F, Hoare T. Structured macroporous hydrogels: progress, challenges, and opportunities[J]. *Adv Healthc Mater*, 2018, 7(1).
- [19] Youngstrom DW, Barrett JG. Engineering tendon: scaffolds, bioreactors, and models of regeneration[J]. *Stem Cells Int*, 2016, 2016: 3919030.
- [20] Kishore V, Bullock W, Sun X, et al. Tenogenic differentiation of human MSCs induced by the topography of electrochemically aligned collagen threads[J]. *Biomater*, 2012, 33(7): 2137-2144.
- [21] Hao J, Zhang Y, Jing D, et al. Mechanobiology of mesenchymal stem cells: Perspective into mechanical induction of MSC fate[J]. *Acta Biomater*, 2015, 20: 1-9.
- [22] Bellas E, Chen C S. Forms, forces, and stem cell fate[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2014, 31: 92-97.
- [23] Shah N, Morsi Y, Manasseh R. From mechanical stimulation to biological pathways in the regulation of stem cell fate[J]. *Cell Biochem Funct*, 2014, 32(4): 309-325.
- [24] 季侨丹, 何成奇. 不同机械力学刺激对骨成骨作用的研究进展[J]. *中国骨伤*, 2016, 29(4): 386-390.
- JI QD, HE CQ. Study on different mechanical stimulations for osteogenesis[J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2016, 29(4): 386-390. Chinese with abstract in English.
- [25] 门亚勋, 赵永亮, 程相允, 等. 牵张应变刺激对软骨增殖及分化和细胞基质影响的研究进展[J]. *中国骨伤*, 2017, 30(7): 675-679.
- MEN YX, ZHAO YL, CHENG XY, et al. Research progress on the effects of the tensile strain stimulation on proliferation differentiation and pericellular matrix of cartilage[J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2017, 30(7): 675-679. Chinese with abstract in English.
- [26] Subramony SD, Su A, Yeager K, et al. Combined effects of chemical priming and mechanical stimulation on mesenchymal stem cell differentiation on nanofiber scaffolds[J]. *J Biomech*, 2014, 47(9): 2189-2196.
- [27] Chen YJ, Huang CH, Lee IC, et al. Effects of cyclic mechanical stretching on the mRNA expression of tendon/ligament-related and osteoblast-specific genes in human mesenchymal stem cells[J]. *Connect Tissue Res*, 2008, 49(1): 7-14.
- [28] Kim JG, Islam R, Cho JY, et al. Regulation of RhoA GTPase and various transcription factors in the RhoA pathway[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(9): 6381-6392.
- [29] Maharam E, Yapor M, Villanueva NL, et al. Rho/Rock signal transduction pathway is required for MSC tenogenic differentiation[J]. *Bone Res*, 2015, 3: 15015.
- [30] Andersen JI, Pennisi CP, Fink T, et al. Focal adhesion kinase activation is necessary for stretch-induced alignment and enhanced differentiation of myogenic precursor cells[J]. *Tissue Eng Part A*, 2018, 24(7-8): 631-640.
- [31] Xu B, Ju Y, Song G. Role of p38, ERK1/2, focal adhesion kinase, RhoA/ROCK and cytoskeleton in the adipogenesis of human mesenchymal stem cells[J]. *J Biosci Bioeng*, 2014, 117(5): 624-631.
- [32] Andalib M N, Lee J S, Ha L, et al. The role of RhoA kinase (ROCK) in cell alignment on nanofibers[J]. *Acta Biomater*, 2013, 9(8): 7737-7745.
- [33] Liu X, Chen W, Zhou Y, et al. Mechanical tension promotes the osteogenic differentiation of rat tendon-derived stem cells through the Wnt5a/Wnt5b/JNK signaling pathway[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 36(2): 517-530.

(收稿日期: 2019-10-20 本文编辑: 王玉蔓)