急性力竭运动导致大鼠跟腱微损伤的超微结构变化及机制

https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.2990

投稿日期：2020-03-04

送审日期：2020-03-11

采用日期：2020-04-15

在线日期：2020-08-18

中图分类号：

R459.9；R318；G804.53

文章编号：

2095-4344(2021)08-01190-06

文献标识码：A

申晋波[1,2]，张 林[2]

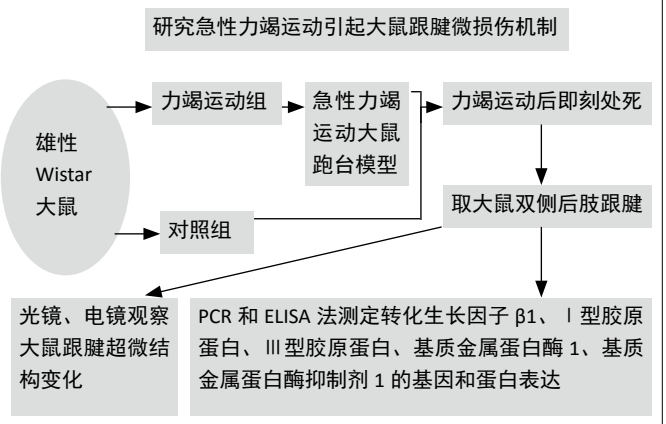
文章快速阅读：

文章特点—

△急性力竭运动导致大鼠跟腱腱细胞肿胀甚至破裂，细胞外胶原纤维排列混乱；

△力竭运动过程中大鼠跟腱胶原合成代谢及形状排列紊乱，其降解和清除暂时加速，导致跟腱功能受损、微损伤持续；

△力竭运动后大鼠跟腱基质金属蛋白酶 1 与其抑制剂变化趋势相同，表明急性力竭运动导致跟腱微损伤尚未发生不可逆损伤



文题释义：

转化生长因子β1：是转化生长因子β的一种亚型，是常见的生长因子，几乎存在于所有细胞中，在调节细胞增殖与分化、细胞外基质合成及损伤愈合修复等方面发挥作用。由多基因家族编码的多肽因子，有特异的氨基端序列，以前多肽形式存在，在酸性环境中或经蛋白溶解酶水解后被激活。

基质金属蛋白酶：水解细胞外基质的蛋白裂解酶，作用过程需要钙、锌等离子作为辅助离子参与而得名，包括基质中的各种胶原酶和弹性蛋白酶等，是参与降解全身各种组织细胞外基质的蛋白酶家族。

摘要

背景：有研究表明末端病大鼠跟腱所形成的损伤和瘢痕修复难以痊愈，而力竭运动所致大鼠跟腱微损伤的早期治疗有避免损伤累积和预防末端病发生的作用，因而有必要探索急性力竭运动引发跟腱微损伤的机制。

目的：通过对比急性力竭运动前后大鼠跟腱的超微结构、转化生长因子β1、Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原、基质金属蛋白酶1和基质金属蛋白酶抑制剂1基因与蛋白表达变化，探讨急性力竭运动引起跟腱微损伤的机制。

方法：将大鼠随机分为2组，对照组不运动为空白对照，力竭运动组进行急性力竭跑台运动，力竭运动后即刻麻醉处死对照组和力竭运动组大鼠，对大鼠跟腱进行苏木精-伊红染色光学显微镜及透射电镜观察，通过反转录聚合酶链式反应技术和双抗体夹心ABC-ELISA法测定两组大鼠跟腱组织转化生长因子β1、Ⅰ型胶原蛋白，Ⅲ型胶原蛋白、基质金属蛋白酶1及基质金属蛋白酶抑制剂1的基因表达和蛋白含量。

结果与结论：与对照组相比，力竭运动组大鼠跟腱胶原纤维排列紊乱，腱细胞局部结构被破坏，转化生长因子β、基质金属蛋白酶1、基质金属蛋白酶抑制剂1基因表达和蛋白含量显著升高($P < 0.05$)，Ⅰ型胶原蛋白、Ⅲ型胶原蛋白基因表达和蛋白含量显著下降($P < 0.05$)。上述数据说明，急性力竭运动过程中大鼠跟腱发生微损伤并逐步累积导致转化生长因子β1过高表达；大鼠跟腱胶原合成下降，降解加速，跟腱功能受损、微损伤持续；基质金属蛋白酶1与基质金属蛋白酶抑制剂1变化趋势相同，表明尚未发生不可逆损伤；提示急性力竭运动后跟腱发生的微损伤应及时治疗和修复，以避免形成过度损伤和瘢痕修复。

关键词：运动；力竭；跟腱；胶原；蛋白；因子；软组织；鼠

Micro-injury of the Achilles tendon caused by acute exhaustive exercise in rats: ultrastructural changes and mechanism

Shen Jinbo[1,2], Zhang Lin[2]

[1]Department of Physical Education, Yuncheng University, Yuncheng 044000, Shanxi Province, China; [2]School of Physical Education, Soochow University, Suzhou 215021, Jiangsu Province, China

Shen Jinbo, PhD, Department of Physical Education, Yuncheng University, Yuncheng 044000, Shanxi Province, China; School of Physical Education, Soochow University, Suzhou 215021, Jiangsu Province, China

Corresponding author: Zhang Lin, PhD, Doctoral supervisor, Professor, School of Physical Education, Soochow University, Suzhou 215021, Jiangsu Province, China

[1] 运城学院体育系，山西省运城市 044000；[2] 苏州大学体育学院，江苏省苏州市 215021

第一作者：申晋波，男，1985 年生，山西省人，汉族，2019 年苏州大学体育学院毕业，博士。

通讯作者：张林，博士，博士生导师，教授，苏州大学体育学院，江苏省苏州市 215021

https://orcid.org/0000-0003-1346-4739(申晋波)；https://orcid.org/0000-0001-9901-0118(张林)

基金资助：山西省青年科技研究基金 (201801D221443)，项目负责人：申晋波；运城学院体育学科基金，项目参与人：申晋波

引用本文：申晋波，张林 . 急性力竭运动导致大鼠跟腱微损伤的超微结构变化及机制 [J]. 中国组织工程研究，2021，25(8): 1190-1195.

Abstract

BACKGROUND: Studies have shown that injury and scar of the Achilles tendon in rats with terminal disease are difficult to heal, and the early treatment of Achilles tendon micro-injury caused by exhaustive exercise can avoid the accumulation of injury and prevent the occurrence of terminal disease. Therefore, it is necessary to explore the mechanism of Achilles tendon micro-injury caused by acute exhaustive exercise.

OBJECTIVE: Through the comparison of the changes of ultra-structure, transforming growth factor-β1 (TGF-β1), Collagen-I, Collagen-III, matrix metalloproteinases-1 (MMP-1) and tissue inhibitors of metalloproteinase-1 (TIMP-1) mRNA and protein expression in the Achilles tendon before and after exhaustive exercise, to discuss the mechanism of Achilles tendon micro-injury caused by acute exhaustive exercise in rats.

METHODS: Wistar rats were randomly divided into a control group and an exhaustive exercise group. No intervention was performed in the control group. In the exhaustive exercise group, rats were subjected to treadmill running. After exhaustive exercise, the two groups of rats were immediately killed under anesthesia. Through the observation using hematoxylin-eosin staining and transmission electronic microscopy, Achilles tendons were measured by reverse transcription-polymerase chain reaction and double antibody sandwich ABC-ELISA to show the genetic expression and protein expression of TGF-β1, Collagen-I, III, MMP-1 and TIMP-1.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the control group, the acute exhaustive exercise group showed the disordered arrangement of collagen fibers in Achilles tendon and the partially damaged structure of tendon cells. The mRNA and protein expressions of TGF-β1, MMP-1 and TIMP-1 were significantly higher in the exhaustive exercise group than the control group ($P < 0.05$), whereas the mRNA and protein expressions of Collagen-I and Collagen-III were significantly decreased ($P < 0.05$). These findings indicate that the over-expression of TGF-β1 results from the gradual accumulation of Achilles tendon micro-injuries caused by acute exhaustive exercise. Collagen synthesis decreases while the degradation accelerates; the tendon function is impaired as the micro-injuries continue. There is a similar variation tendency of MMP-1 and TIPM-1, which reminds an irreversible damage do not occur. Micro-injuries of the Achilles tendon caused by acute exhaustive exercise should be treated and repaired in time, avoiding excessive damage and scar repair.

Key words: exercise; exhaustion; tendon; collagen; protein; factor; soft tissue; rat

Funding: *Shanxi Provincial Youth Science and Technology Research Fund, No. 201801D221443 (to SJB); Sports Science Foundation of Yuncheng University (to SJB [project participant])*

How to cite this article: *SHEN JB, ZHANG L. Micro-injury of the Achilles tendon caused by acute exhaustive exercise in rats: ultrastructural changes and mechanism. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2021;25(8):1190-1195.*

0 引言 Introduction

在大强度的跑跳练习中，跟腱受到反复的牵拉会使其出现疲劳性损伤，导致跟腱超微结构发生改变、跟腱功能出现下降[1]。如今马拉松、超级马拉松和铁人三项等运动作为力竭运动的代表风靡全球，其爱好者众多，但在此类运动中出现的各种运动损伤甚至猝死事件比比皆是，也为其运动员和参与者带来诸多困扰[2]。跟腱损伤多为累积性损伤，而力竭运动不同于一般的一次性运动，运动中出现的跟腱代谢异常或微损伤若未得到及时恢复或治疗，经损伤累积就很可能发展成为跟腱末端病，从而导致严重的运动损伤或提前结束运动员的运动生涯。目前研究多集中于跟腱末端病细胞外基质变化以及末端病的治疗方法，对于末端病的预防以及力竭运动引起跟腱细胞外基质的变化未见报道。

实验通过苏木精－伊红染色及透射电镜对比观察急性力竭运动大鼠前后跟腱超微结构变化，采用分子生物学和生物化学方法测定急性力竭运动前后大鼠跟腱转化生长因子β1、Ⅰ，Ⅲ型胶原蛋白、基质金属蛋白酶1(matrix metalloproteinases-1，MMP-1)及基质金属蛋白酶抑制剂(tissue inhibitors of metalloproteinase-1，TIMP-1)的基因表达及蛋白含量变化，主要从细胞外基质变化来研究急性力竭运动造成大鼠跟腱代谢异常的机制，对急性力竭运动所致的跟腱代谢异常的恢复、微损伤治疗时机以及跟腱末端病的预防提供一定的理论依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 于2016年6月至2016年10月在苏州大学医学部动物实验中心完成。

1.3 材料 健康1月龄雄性Wistar清洁级大鼠20只，平均体质量(109.0±7.2) g，于苏州大学医学部动物实验中心购买并饲养，许可证号：SYXK(苏)2016−0050，自由进食及饮水，采用国家标准啮齿类动物饲料进行喂养，充足自然光照，室温18−24 ℃，湿度45%−55%。

1.4 实验方法

1.4.1 建模及干预 大鼠20只适应性喂养1周后进行随机分组：对照组(n=10)，力竭运动组(n=10)。对照组不进行运动，力竭运动组采用根据Bedford方法修改的递增负荷力竭跑台运动方案[3-4]：大鼠在力竭跑台运动前，先有3次适应性训练，运动速度10 m/min，每次运动时间5 min，跑台角度为−16°；力竭运动负荷共分3级：Ⅰ级速度10 m/min，时间15 min；Ⅱ级速度15 m/min，时间15 min；Ⅲ级速度20 m/min，运动至力竭为止，大鼠跑台采用中国杭州段式跑台(BCPT-98型号)。

力竭判定标准：大鼠跑台姿式由蹬地式变为伏地式，滞留于跑道末端不能继续跑动，且声波和光刺激均不能驱使大鼠继续维持跑动状态。

1.4.2 取材 急性力竭运动结束后即刻麻醉处死所有大鼠：注射体积分数10%水合氯醛溶液进入大鼠腹腔进行麻醉(0.3 mL/g)，取大鼠后肢跟腱，迅速去除腱围及相连肌肉，得到跟腱样品，迅速将样品放入冷冻管中，然后置于−80 ℃冰箱储存。

1.4.3 苏木精－伊红染色 将标记为右后肢跟腱样品迅速放于体积分数10%的甲醛溶液中固定，固定后进行梯度乙醇脱水，二甲苯透明，用Leica-EG1160型全自动石蜡包埋机进行包埋，后用Leica-RM2145型石蜡切片机将蜡块进行横纵连续切片，进行二甲苯脱蜡，梯度乙醇脱水，水洗后进行苏木精－伊红染色，再经乙醇脱水，二甲苯透明后，中性树胶封固。苏木精－伊红染色组织切片置于OLYMPUS-BX51型光学显微镜下，首先在10×10倍下观察标本，确定观察位置，然后在40×10倍下观察跟腱中的胶原纤维状态及腱细胞有无炎性变化。

1.4.4 透射电镜观察 取约1 mm^3标记为左后肢跟腱组织，先将跟腱组织在体积分数2.5%戊二醛固定液中固定1 h，然后0.18 mol/L蔗糖溶液中浸泡2 h然后冲洗，再用体积分数1%

实验动物造模过程的相关问题	
造模目的：	观察急性力竭运动大鼠前后跟腱超微结构变化及转化生长因子 β1、Ⅰ，Ⅲ型胶原蛋白、基质金属蛋白酶 1、基质金属蛋白酶抑制剂 1 基因与蛋白表达变化
选择动物的条件：	① Wistar 大鼠 20 只；②鼠龄 1 个月；③体质量 (109.0±7.2) g；④雄性
模型与所研究疾病的关系：	实验急性力竭运动与前期研究以证实的一次性跑台运动、末端病大鼠跟腱细胞外基质变化相比较
动物来源及品系：	Wistar 大鼠由苏州大学医学部动物实验动物中心提供
造模技术描述：	力竭运动组采用根据 Bedford 方法修改的递增负荷力竭跑台运动方案
动物数量及分组方法：	20 只大鼠随机分为对照组 10 只和力竭运动组 10 只
造模成功评价指标：	力竭判定标准为：大鼠跑台姿式由蹬地式变为伏地式，滞留于跑道末端不能继续跑动，且声波和光刺激均不能驱使大鼠继续维持跑动状态
造模后观察指标：	①大鼠跟腱苏木精－伊红染色观察；②大鼠跟腱透射电镜观察；③ RT-PCR 测定转化生长因子 β1、Ⅰ，Ⅲ型胶原蛋白、MMP-1 及 TIMP-1 基因表达；④双抗体夹心 ABC-ELISA 法测定转化生长因子 β1、Ⅰ，Ⅲ型胶原蛋白、MMP-1、TIMP-1 及蛋白多糖蛋白含量
造模后动物处理：	急性力竭运动结束后即刻麻醉处死所有大鼠，右后肢跟腱样品采用苏木精－伊红染色，左后肢跟腱组织取约 1 mm^3 进行透射电镜观察
伦理委员会批准：	通过苏州大学伦理委员会对该研究相关伦理学问题的审查

锇酸溶液固定 2 h，从锇酸溶液中取出后依次进入梯度丙酮脱水 (体积分数 50%，70%，90% 丙酮中各 1 次，每次 10 min；100% 丙酮 3 次，每次 10 min)，然后浸脂 (纯包埋剂与 100% 丙酮按 1 ： 1 调配)、包埋，放入 37 ℃温箱过夜，移入 60 ℃温箱 48 h。使用超薄切片机连续切片。醋酸双氧铀和柠檬酸铅双重染色。采用 HITACHIH-600 透射电镜观察制备好的切片，首先在低倍下初步观察，然后在较高的放大倍数下进行细致的观察，主要观察内容为：胶原纤维排列、腱细胞、细胞核及细胞器的变化。

1.4.5 反转录聚合酶链式反应技术 (reverse transcription-pcrolymerase chain reaction，RT-PCR) 测定　用 Trizol 提取跟腱样品总 RNA，测纯度后进行反转录，cDNA 的荧光定量 PCR 引物序列根据 Primer 5.0 软件进行设计，由上海生工合成，所用引物序列为：GADPH 为内参照物，其序列见**表 1**。用 Rotor -Gene Real-Time Analysis Software 6.1(Build 71) 软件对所得结果进行分析，结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法 [5]。最终得到的值为样品实验组目的基因相对于对照组目的基因的含量。

1.4.6 双抗体夹心 ABC-ELISA 法测定　用抗大鼠转化生长因子 β1、Ⅰ，Ⅲ型胶原蛋白、MMP-1、TIMP-1 及蛋白多糖单抗包被于酶标板上，标准品和样品中的转化生长因子 β1、Ⅰ，Ⅲ型胶原蛋白、MMP-1、TIMP-1 及蛋白多糖与单抗结合，加入生物素化的抗大鼠转化生长因子 β1、Ⅰ，Ⅲ型胶原蛋白、MMP-1、TIMP-1 及蛋白多糖，形成免疫复合物连接在板上，辣根过氧化物酶标记的 Streptavidin 与生物素结合，

表 1 ｜引物信息列表
Table 1 ｜ **Primer information**

名称	顺序	引物信息	片段长度 (bp)
GADPH	上游	5'-AGG TGA CCG CAT CTT CTT GTG-3'	21
	下游	5'-CGT GGG TAG AGT CAT ACT GGA AC-3'	23
转化生长因子 β1	上游	5'-TGC GCC TGC AGA GAT TCA AG-3'	20
	下游	5'-AGG TAA CGC AGG AAT TGT TGC TA-3'	23
Ⅰ型胶原蛋白	上游	5'-TCA CCT ACT GCA CGC TTG TGG-3'	21
	下游	5'-TTG GCT TTT GGG GAA ATT GA -3'	20
Ⅲ型胶原蛋白	上游	5'-GAA CTC AAG AGC GGA GAG TAC TGG-3'	24
	下游	5'-TGG TAT GTA ATG TTC TGG GAG GC-3'	23
MMP-1	上游	5'-CTC TTC CAT CCA ACA TGG ATA GCT G-3'	25
	下游	5'-ACT CCA ACT GTG AAG ATC CGC TGA-3'	24
TIMP-1	上游	5'-CCT GAC CGG AGG AGG AAT GCT GTT-3'	24
	下游	5'-GGA GCA GCT GTC GCC GCG ATA CCT AAC TCT T-3'	31

表注：MMP-1：基质金属蛋白酶 1；TIMP-1：基质金属蛋白酶抑制剂

加入底物工作液显蓝色，最后加终止液硫酸，在紫外线波长 450 nm 处测吸光度值，转化生长因子 β1、Ⅰ，Ⅲ型胶原蛋白、MMP-1、TIMP-1 及蛋白多糖浓度与吸光度值成正比，可通过绘制标准曲线求出标本中转化生长因子 β1、Ⅰ，Ⅲ型胶原蛋白、MMP-1、TIMP-1 及蛋白多糖浓度 [6]。选用上海西唐生物科技有限公司试剂盒并检测。

1.5 主要观察指标　两组大鼠跟腱组织苏木精－伊红染色、透射电镜以及转化生长因子 β1、Ⅰ，Ⅲ型胶原蛋白、MMP-1 和 TIMP-1 基因表达及蛋白含量。

1.6 统计学分析　检测数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，用 SPSS 17.0 统计软件包进行数据分析，采用独立样本 t 检验分析组间差异，检验水准 α= 0.05。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析　对照组和力竭运动组大鼠各 10 只，均进入结果分析，无死亡和感染，无脱失值。

2.2 大鼠跟腱苏木精－伊红染色形态　对照组：整体跟腱组织顺应力方向排列整齐，胶原纤维呈规则平行排列，结构致密，胶原纤维之间距离均匀、紧凑。力竭运动组：可见跟腱周围组织充血、水肿，胶原纤维局部排列扭曲、错乱，胶原纤维之间间隔增多，见**图 1**。

2.3 大鼠跟腱透射电镜结果　对照组大鼠跟腱胶原纤维排列有序，典型周期性横纹明显。腱细胞处于安静状态，见**图 2**。力竭运动组：局部胶原纤维纵向间隔增大，排列紊乱，粗细不均，甚至由交叉及部分断裂；可见腱细胞，但腱细胞及胶原纤维局部结构被破坏，见**图 3**。

2.4 大鼠跟腱基因及蛋白测定结果　**表 2** 显示，力竭运动组大鼠跟腱的转化生长因子 β1 mRNA 表达升高近 50 倍，显著高于对照组 ($P < 0.05$)，力竭运动组大鼠跟腱转化生长因子 β1 蛋白含量显著高于对照组 ($P < 0.05$)。力竭运动组大鼠跟腱的Ⅰ，Ⅲ型胶原蛋白 mRNA 表达蛋白含量与对照组比较均下降 ($P < 0.05$)。与对照组比较，力竭运动组大鼠跟腱中蛋白多糖含量明显下降 ($P < 0.05$)。力竭运动组大鼠跟腱的 MMP-1、TIMP-1 mRNA 表达和 MMP-1、TIMP-1 蛋白含量与对照组相

比均升高 ($P < 0.05$)。

3 讨论 Discussion

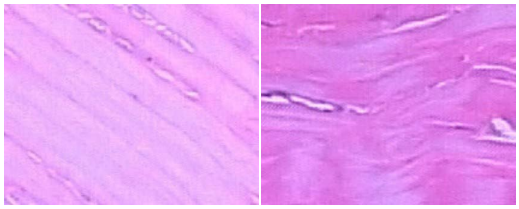
实验选取肌腱细胞外基质胶原代谢的相关因子 (转化生长因子 β1)、胶原类型 (Ⅰ，Ⅲ型胶原蛋白)、酶类 (MMP-1、TIMP-1) 及蛋白多糖作为测试指标。主要依据胶原的合成与降解会影响细胞外基质稳态，Ⅰ，Ⅲ型胶原蛋白与肌腱损伤修复关系密切[7]，细胞外基质由胶原纤维、弹性蛋白、非胶原糖蛋白和蛋白多糖等构成，其中胶原为最主要的细胞外基质，正常健康跟腱富含的胶原纤维主要是Ⅰ，Ⅲ型胶原蛋白，Ⅰ型胶原蛋白约占细胞干质量的 60%，占总胶原量的 95%[8]，具有很好的抗牵拉性能，而Ⅲ型胶原蛋白含量较少[9]，被认为是不成熟的胶原或重建型胶原，在肌腱修复早期Ⅲ型胶原蛋白快速合成，随着修复的进行逐步被Ⅰ型胶原蛋白替代[10-11]。

转化生长因子 β1 是一种常见的生长因子，其分布广泛，遍布机体各类细胞，具有多种生物效应，参与细胞的增殖、分化、凋亡及生理病理等调节过程，其在肌腱修复中表现出既参与肌腱粘连和瘢痕的形成又能促进肌腱愈合的多重生物学效应[12]，但已有研究证实在肌腱修复过程中转化生长因子 β1 的表达升高能刺激Ⅰ型胶原基因和蛋白表达的升高，同时能增加Ⅰ，Ⅱ，Ⅲ型胶原蛋白含量提高[13-14]，细胞外基质主要由成纤维细胞合成的Ⅰ型胶原蛋白构成，蛋白多糖可调节Ⅰ型胶原蛋白的形成与最终形状，其对于肌腱的修复作用主要通过转化生长因子 β1 的调节和抑制来实现[11]，而胶原可以被特异性的胶原酶降解，MMP-1 是Ⅰ型胶原蛋白的特异性胶原酶，调节其代谢。有研究表明，当肌腱受损或断裂时，会出现 MMP-1 蛋白表达的增加[15]，MMP-1 还参与肌腱重塑，调节肌腱代谢[16]。TIMP-1 作为 MMP-1 的天然抑制剂具有抑制胶原降解、保持跟腱中胶原相对稳定的功能[17]。

3.1 力竭大鼠跟腱超微结构变化　光学显微镜下苏木精－伊红染色切片观察结果显示力竭运动组相比对照组大鼠跟腱周围组织充血，水肿，细胞质染色不均匀，局部排列紊乱，且胶原纤维间隔增多。透射电镜切片观察结果显示力竭运动组相比对照组大鼠跟腱胶原纤维纵向间隔增大，排列紊乱，周期性横纹不明显，且局部出现胶原纤维结构破坏，腱细胞肿胀，空泡减少，粗面内质网增多且内有颗粒状分泌物。这与高尚等[18]研究不同强度跑台对大鼠跟腱微损伤形态学观察结果一致，各组均出现微损伤且程度相似，具有可比性。相比李敏等[19]研究一次性跑台运动大鼠跟腱组织学观察结果，实验中胶原纤维排列紊乱局部结构破坏明显，可能是由于急性力竭运动持续时间更长、运动量更大，导致大鼠跟腱超微结构变化更为明显，但腱细胞仍清晰可见，表明力竭运动导致跟腱微损伤的形成，但尚未达到胡亚哲等[20]报道的末端病大鼠跟腱细胞凋亡明显，很难在切片中找到腱细胞的情况，提示力竭运动跟腱微损伤累积与末端病形成存在一定关系。

3.2 力竭大鼠跟腱转化生长因子 β1 变化　实验中对照组跟腱组织中就有转化生长因子 β1 产生，当跟腱受到刺激时转化生长因子 β1 会发生变化，力竭运动组大鼠跟腱转化生长因子 β1 mRNA 和蛋白表达均有显著性上升，长时间的运动致使大鼠跟腱应激反应持续，腱细胞内与细胞外基质的代谢变化逐步进行，出现大鼠跟腱在力竭运动中代谢异常逐步累积的结果，而转化生长因子 β1 作为调节腱细胞及胶原代谢的重要因子[21]，可以使腱细胞增殖，同时能调节细胞外基质，促进胶原和蛋白多糖的合成与分泌。实验通过急性力竭运动刺激大鼠跟腱将其激活，在力竭运动后参与了腱细胞代谢的恢复和细胞外基质的调节过程。但也有研究发现转化生长因子 β1 在跟腱组织修复过程中有两种调节机制，既能使腱细胞增殖、刺激胶原合成并调节细胞外基质，又能加速跟腱纤维化，产生瘢痕修复[22]。这与实验结果中转化生长因子 β1 mRNA 表达 50 倍和转化生长因子 β1 蛋白表达近 10 倍的增长相吻合，即急性力竭运动刺激大鼠跟腱使得转化生长因子 β1 过高表达，既表现出力竭运动后大鼠跟腱细胞外基质代谢紊乱，其多重生物效应还可能会影响大鼠跟腱修复过程中纤维化及瘢痕的形成，为日后运动中产生更严重的跟腱损伤带来隐患。

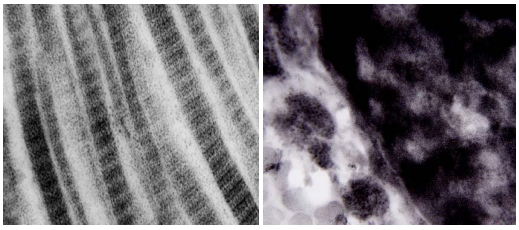
3.3 力竭大鼠跟腱胶原与蛋白多糖变化　实验胶原及蛋白多糖结果显示急性力竭运动后大鼠跟腱胶原代谢异常，跟腱功能下降，提示跟腱出现微损伤且未进入修复期。胶原纤维和蛋白多糖之间存在复杂的编织排列可能就是肌腱的功能、结构基础，蛋白多糖在维持肌腱的结构与功能中起着至关重要的作用。华卫平[23]的研究中发现运动会使Ⅰ型胶原蛋白增加及形成，并能改变胶原蛋白纤维面积及纤维密度，强化跟腱组织及机械特性。张前法等[24]的研究中发现，成纤维细胞能合成Ⅰ，Ⅲ型胶原蛋白，跟腱细胞仅能够合成Ⅰ型胶原蛋白。Ⅰ型胶原蛋白是跟腱最主要的细胞外基质，由紧密排列的粗胶原纤维构成、强度高弹性低，呈束状排列，胶原蛋白Ⅲ跟腱中含量不足 10%，由疏松的细胶原纤维构成，弹性高强度低，呈网状结构[25]。实验结果中Ⅰ，Ⅲ型胶原蛋白的 mRNA 及蛋白表达均呈下降趋势，急性力竭运动过程中胶原的合成被抑制，暂时的胶原的清除能力的增加，是导致Ⅰ，Ⅲ型胶原蛋白的 mRNA 及蛋白含量下降的原因，腱细胞在急性力竭运动过程中过量负荷下局部循环发生障碍有关，加之急性力竭运动时间长，跟腱腱周有液体渗出，这也是胶原表达下降的原因。实验蛋白多糖呈显著下降结果以及透射电镜观察结果，胶原纤维和蛋白多糖的结合及排列异常，进一步说明了急性力竭运动导致大鼠跟腱胶原合成代谢以及形状排列紊乱的原因。实验急性力竭运动前后Ⅲ型胶原蛋白 mRNA 变化与李敏等[26]对一次性跑台研究结果不同，这可能由于调节胶原代谢的酶类在力竭运动状态下对重建型胶原Ⅲ型胶原蛋白的调节结果，提示急性力竭运动后跟腱尚未进入重建或修复阶段，跟腱功能下降、微损伤处于持续状态或可能在力竭运动后继续加重，在此阶段应通过调整与休息注意跟腱代谢异常的恢复，以避免微损伤累积，同时也是介入治疗与修复手段的关键时期。



图注：对照组跟腱组织顺应力方向排列整齐，胶原纤维规则平行排列，结构致密，胶原纤维之间距离均匀、紧凑；力竭运动组跟腱周围组织充血、水肿，胶原纤维局部排列扭曲、错乱，胶原纤维之间间隔增多

图 1 | 对照组 (左) 与力竭运动组 (右) 大鼠跟腱光学显微镜下表现 (苏木精－伊红染色，×400)

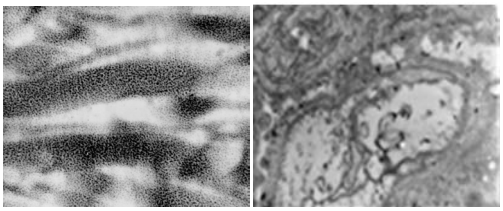
Figure 1 | Optical microscope observation of the rat Achilles tendon in the control (left) and exhaustive exercise (right) groups (hematoxylin-eosin staining, ×400)



图注：对照组大鼠跟腱胶原纤维排列有序，典型周期性横纹明显；腱细胞处于安静状态

图 2 | 对照组大鼠跟腱胶原纤维排列 (左) 与腱细胞 (右) 电镜表现 (透射电镜，×50 000)

Figure 2 | Observation of Achilles tendon collagen fibers (left) and tendon cells (right) in control group (transmission electron microscopy, ×50 000)



图注：力竭运动组大鼠跟腱胶原纤维局部纵向间隔增大，排列紊乱，粗细不均，出现交叉及部分断裂；腱细胞及胶原纤维局部结构被破坏

图 3 | 力竭运动组大鼠跟腱胶原纤维排列 (左) 与腱细胞 (右) 电镜表现 (透射电镜，×50 000)

Figure 3 | Observation of Achilles tendon collagen fibers (left) and tendon cells (right) in exhaustive exercise group (transmission electron microscopy, ×50 000)

表 2 | 对照组与力竭运动组转化生长因子 β1 比较 ($\bar{x}\pm s$，n=10)

Table 2 | Comparison of transforming growth factor β1 expression between control and exhaustive exercise groups

测试指标	对照组	力竭运动组
转化生长因子 β1 mRNA	1	50.05±4.42[a]
转化生长因子 β1 蛋白 (mg/g)	17.73±4.55	163.79±3.02[a]
Ⅰ型胶原 mRNA	1	0.37±0.26[a]
Ⅰ型胶原蛋白 (μg/g)	169.72±6.35	119.75±5.06[a]
Ⅲ型胶原 mRNA	1	0.52±0.11[a]
Ⅲ型胶原蛋白 (μg/g)	14.81±0.86	7.84±0.66[a]
蛋白多糖 (mg/g)	361.87±7.73	204.27±10.41[a]
MMP-1 mRNA	1	4.09±0.85[a]
MMP-1 蛋白 (ng/g)	266.13±9.29	344.40±16.83[a]
TIMP-1 mRNA	1	2.66±0.80[a]
TIMP-1 蛋白 (ng/g)	64.28±2.53	74.28±6.63[a]

表注：与对照组比较，[a]P < 0.05。MMP-1：基质金属蛋白酶 1；TIMP-1：基质金属蛋白酶抑制剂

3.4 力竭大鼠跟腱 MMP-1 与 TIMP-1 变化 实验中 MMP-1 与 TIMP-1 基因表达和蛋白含量相同的变化趋势一方面说明力竭运动导致大鼠跟腱胶原清除加速出现微损伤，另一方面 MMP-1 与 TIMP-1 正常比值范围，说明胶原降解处于代偿状态并未出现失代偿的净降解。MMP 作为降解跟腱细胞外基质的主要酶类，被称为胶原酶，具有分解纤维类胶原的能力[27]，MMP-1 功能除了参与细胞外胶原纤维的降解外，还能参与跟腱重塑[28]。TIMP-1 作为 MMP-1 的天然抑制剂[29]，主要作用是通过负反馈控制系统抑制 MMP-1 对胶原的降解作用，使跟腱组织中的胶原能够维持相对稳定。实验力竭运动组大鼠跟腱 MMP-1、TIMP-1 mRNA 的表达和 MMP-1、TIMP-1 蛋白含量均出现协同显著上升趋势，表明了急性力竭运动模型运动持续时间长，导致 MMP-1、TIMP-1 作为调节胶原降解的酶类表达升高，有利于胶原纤维的清除加速，便于细胞外基质的进一步重塑，同时说明了力竭运动引起大鼠跟腱出现了微损伤。这与李敏[30]对一次性跑台大鼠跟腱的结果不一致：MMP-1，TIMP-1 mRNA 表达在运动后持续上升，但运动后即刻没有显著性差异，运动 12 h MMP-1 mRNA 才出现显著性差异，运动 24 h TIMP-1 mRNA 才出现显著性差异。这实验结果又不同于史晓伟等[17]研究末端病大鼠 MMP-1 与 TIMP-1 蛋白表达比值失调，胶原降解发生不可逆式净降解，胶原代谢失衡。实验中 MMP-1，TIMP-1 mRNA 表达和蛋白含量变化趋势相同，提示急性力竭运动大鼠跟腱发生的微损伤尚未达到不可逆式净降解，即尚未形成末端病，若此时进行治疗和修复仍有可能完全恢复。

3.5 结论 急性力竭运动导致大鼠跟腱腱细胞肿胀甚至破裂，细胞外胶原纤维排列混乱；转化生长因子 β1 的过高表达是急性力竭运动中大鼠跟腱发生微损伤的逐步累积出现应激反应的结果；急性力竭运动过程中大鼠跟腱胶原合成受到抑制，其降解和清除暂时加速，导致跟腱功能受损、微损伤持续；力竭运动后大鼠跟腱 MMP-1 与 TIMP-1 变化趋势相同，微损伤的累积尚未发生不可逆损伤，提示急性力竭运动后跟腱发生的微损伤应及时治疗和修复，以避免形成过度损伤累积和瘢痕修复，防止跟腱末端病的发生。

致谢：感谢苏州大学医学部动物实验中心王贵平老师提供的技术支持。感谢苏州大学体育学院研究生马渊源及张明月同学对实验实施的帮助。

作者贡献：实验设计为张林和申晋波。实验实施成文，资料收集为申晋波。实验评估为张林。

经费支持：该文章接受了“山西省青年科技研究基金(201801D221443)及运城学院体育学科基金”的资助。所有作者声明，经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程，没有因其岗位角色影响文章观点和对数据结果的报道，不存在利益冲突。

机构伦理问题：实验方案经苏州大学动物实验伦理委员会批准，批准号：201604A356。饲养及实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

写作指南：该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重：文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审：文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明：文章统计学方法已经通过苏州大学生物统计学专家审核。

4 参考文献 References

[1] LONGO UG, PETRILLO S, MAFFULLI N, et al. Acute Achilles tendon rupture in Athletes. Foot Ankle Clin. 2013;18(2):319-338.

[2] 饶志坚 , 常芸 , 王世强 , 等 . 长期大强度耐力运动对心脏的不利影响 [J]. 体育科学 ,2016,36(6):46-54.

[3] 刘晓莉 , 罗勇 , 乔德才 . 大鼠一次性力竭跑台运动模型的建立与动态评价 [J]. 中国实验动物学报 ,2012,20(3):25-28.

[4] 赵俊 , 邹任玲 , 胡秀枋 , 等 . 大鼠跑台训练模型方法研究进展 [J]. 动物医学进展 ,2014,35(9):101-105.

[5] 郝颖华 , 赵兰 , 王莉等 .RT-PCR 法检测低度恶性纤维黏液样肉瘤 FFPE 组织中的融合基因 [J]. 临床与实验病理学杂志 ,2019,35(2):228-230.

[6] 胡玉懿 , 吴蕙 , 韩序 , 等 .ELISA 双抗体夹心法检测嗜铬蛋白 A 的性能评价及临床应用 [J]. 检验医学 ,2018,33(1):55-59.

[7] 沈勇伟 . 低功率激光对末端病大鼠跟腱修复作用及其机制研究 [D]. 苏州 : 苏州大学 ,2012.

[8] 陈晓蓝 , 梁孝天 , 张宁 , 等 . 腱止点过度使用性损伤形成过程中细胞外基质的调节机制 [J]. 中国组织工程研究 ,2020,24(20):3174-3179.

[9] LUI PPY, CHAN LS, LEE YW, et al. Sustained expression of proteoglycans and collagen type III/type I ratio in a calcified tendinopathy model. Rheumatology. 2010;49(2):231-239.

[10] SODERSTEN F, HULTENBY K, HEINEGARD D, et al. Immunolocalization of collagens (I and III) and cartilage oligomeric matrix protein in the normal and injured equine superficial digital flexor tendon. Connect Tissue Res. 2013;54(1):62-69.

[11] 史晓伟 , 周学兰 . 转化生长因子 β1 多效性与肌腱修复研究进展 [J]. 中国运动医学杂志 ,2016,35(6):588-593.

[12] 王尉 , 何恢绪 , 彭心昭 , 等 . 转化生长因子 -β1 对肌腱细胞 DNA 及胶原合成的影响 [J]. 中华创伤杂志 ,2001,17(10):618-619.

[13] HEINEMEIER K, LANGBERG H, OLESEN JL, et al. Role of TGF-beta 1 in relation to exercise-induced type Ⅰ collagen synthesis in human tendinous tissue. Appl Physiol. 2003;95(6):2390-2397.

[14] 刘春雨 , 韩小燕 , 王琳 . 末端病与细胞外基质 : 骨腱结合部重要蛋白及酶类的关系尚需深入研究 [J]. 中国组织工程研究 ,2016,20(15):2265-2272.

[15] FU SC, CHAN BP, WANG W, et al. Increased expression of matrix metalloproteinase 1 (MMP1) in 11 patients with patellar tendinosis. Acta Orthop Scand. 2002;73(6):658-662.

[16] LANGBERG H, SKOVGAARD D, PETERSEN LJ, et al. Type I collagen synthesis and degradation in peritendinous tissue after exercise determined by microdialysis in humans. J Physiol. 1999;15(521Pt):299-306.

[17] 史晓伟 , 龙丽娟 , 沈勇伟 , 等 . 末端病大鼠跟腱超微结构、胶原、MMP-1 及 TIMP-1 的研究 [J]. 中国运动医学杂志 ,2014,33(9):902-906.

[18] 高尚 , 唐康来 , 张吉强 , 等 . 不同强度跑台训练对大鼠跟腱微损伤修复影响的实验研究 [J]. 中国修复重建外科杂志 ,2017,31(5):574-581.

[19] 李敏 , 张林 . 跑台运动对大鼠跟腱形态结构和生物力学性能的影响 [J]. 体育科学 ,2009,29(1):72-76.

[20] 胡亚哲 , 扈盛 , 王梅 . 大鼠跟腱末端病的细胞凋亡的检测 [J]. 中国中医骨伤科杂志 ,2000,8(1):9-11.

[21] TSUBONE T, MORAN SL, SUBRAMANIAM M, et al. Effect of TGF-beta inducible early gene deficiency on flexor tendon healing. Orthop Res. 2006;24(3):569-575.

[22] 夏长所 , 洪光祥 , 杨选影 , 等 . 转化生长因子 -β1 对肌腱腱鞘、腱外膜和腱内膜细胞增殖和胶原产生的影响 [J]. 中华实验外科杂志 , 2006,23(9):1109-1111.

[23] 华卫平 . 适量运动对大鼠跟腱复健有促进效应 [J]. 基因组学与应用生物学 ,2018,37(10):4647-4654.

[24] 张前法 , 杨志明 , 彭文珍 . 兔自体肌腱细胞与碳纤维联合培养后体内植入实验研究 [J]. 中华修复重建外科杂志 ,1997, 11(3):44-47.

[25] 申晋波 , 张林 , 沈勇伟 , 等 . 力竭大鼠跟腱低功率激光照射前后 IGF-Ⅰ及胶原含量的变化 [J]. 北京体育大学学报 ,2017,40(11):56-61.

[26] 李敏 , 王平 , 张林 . 急性跑台运动对大鼠跟腱胶原合成和 IGF-I 的影响 [J]. 天津体育学院学报 ,2009,24(4):303-305.

[27] NAGASE H, VISSE R, MURPHY G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. Cardiovasc Res. 2006;69(3): 562-573.

[28] BRAMONO DS, RICHMOND JC, WEITZEL PP, et al. Matrix metalloproteinases and their clinical applications in orthopaedics. Clin Orthop Relat Res. 2004;428(428):272-285.

[29] HAWINKELS LJ, KUIPER P, WIERCINSKA E, et al. Matrix metalloproteinase-14 (MT1-MMP)-mediated endoglin shedding inhibits tumor angiogenesis. Cancer Res. 2010;70(10):4141-4150.

[30] 李敏 . 跑台运动对大鼠跟腱的影响及其机制研究 [D]. 苏州 : 苏州大学 ,2008.