



末端病大鼠跟腱修复中胶原表达的研究

张林¹, 沈勇伟¹, 齐红梅²

摘要: 以雄性 Wistar 大鼠为实验材料, 采用电刺激跳跃法建立末端病大鼠跟腱损伤模型, 通过动态观察造模后末端病大鼠跟腱修复过程中胶原 I 和胶原 III 基因表达和蛋白含量的变化, 探讨胶原在末端病大鼠跟腱修复中的作用及其机制。结果显示: (1) 在末端病大鼠跟腱修复过程中胶原 I 在转录水平上的表达和蛋白含量的变化表现出先下降后升高的规律, 表明胶原 I 在跟腱早期修复过程中被抑制。(2) 胶原 III 在转录水平上的表达和蛋白含量均出现先升高后降低的变化特点, 提示胶原 III 在跟腱修复的早期阶段起着十分重要的作用, 这种作用在修复的前 7 d 效果非常明显。(3) 末端病大鼠跟腱修复初期胶原 I 合成被抑制和胶原 III 含量的增加, 表明胶原 III 能代偿被抑制合成的胶原 I, 积极参与肌腱的再生, 直至胶原 I 代谢被激活后, 两者共同促进肌腱的修复。

关键词: 末端病; 跟腱; 胶原 I; 胶原 III

中图分类号: G804.5 文献标志码: A 文章编号: 1006-1207(2013)02-0035-03

Researches on Collagen Express of Achilles Tendon Repair of Enthesiopathy of Rats

ZHANG Lin¹, SHEN Yong-wei¹, QI Hong-mei²

(School of Physical Education, Soochow University, Suzhou 215021, China)

Abstract: With male Wistar rats as the subjects, the author adopted the method of electrical stimulation jumping to form a model of Achilles tendon enthesiopathy of rats. The Collagen-I and Collagen-III gene expression and the variation of protein content in the course of tendon repair of the rats with enthesiopathy were observed dynamically so as to explore the function and mechanism of collagen in tendon repair of rats with enthesiopathy. The result shows that in the course of repair, Collagen-I mRNA express and protein content decreased at first and then increased. This means that Collagen-I is restrained at the early stage of repair. The mRNA expression and protein synthesis of Collagen-III showed the characteristics of increasing at first and decreasing later. This means that Collagen-III plays a pivotal role in early-stage repair, especially in the first 7 days of repair. The restriction of Collagen-I synthesis and the increase of Collagen-III at the first stage of Achilles tendon repair indicate that Collagen-III may compensate synthesis-restrained Collagen-I and participate actively in regeneration of tendon until the activation of Collagen-I metabolism. Then they improve the repair of tendon together.

Key words: enthesiopathy; Achilles tendon; Collagen-I; Collagen-III

末端病的发病率在运动员中较高, 其多发在四肢远端及关节部位, 其中又以跟腱末端病患者居多。跟腱末端区的结构比较复杂, 其病变呈现多样性, 使得众多学者对于末端病的认识不统一, 因而末端病的发病机制尚无定论。跟腱病变是末端结构的主要病变, 而肌腱是乏细胞和乏血管的组织, 代谢慢, 愈合也较慢, 而且通常是瘢痕愈合, 因此损伤的肌腱可能不能恢复到健康和正常的肌腱功能水平。尽管近年来对肌腱损伤修复的研究有了一定的进展, 但在临床上尚未找到预防和治疗肌腱损伤的特效方法, 为了弥补肌腱低效率的愈合过程, 很多研究者尝试了各种治疗策略。由于人们逐渐认识到肌腱具有一定的代谢活动和良好的适应能力, 因此通过对肌腱损伤机制的研究, 能为肌腱损伤的修复提供重要的理论依据。本实验以末端病大鼠为实验对象, 通过观察末端病大鼠跟腱修复过程中胶原 I 和胶原 III 基因表达和蛋白含量的动态变化, 探讨胶原在末端病大鼠跟腱修复中的作用及其

机制, 为完善末端病的发病机制及促进肌腱损伤的恢复提供实验依据。

1 实验对象与方法

1.1 实验材料

4 周龄健康清洁级雄性 Wistar 大鼠 56 只 (由苏州大学动物实验中心提供), 均体重为 $(108 \pm 7.8) \text{ g}$, 适应性喂养一周后随机分组: (1) 空白对照组 ($N=8$); (2) 模型对照组 ($N=8$); (3) 模型自然愈合组 40 只, 按取材时间点不同分为 1 d 组、2 d 组、3 d 组、7 d 组、14 d 组, 每组 8 只。实验动物分组情况见表 1。

Wistar 大鼠每笼 4 只进行饲养, 自由进食与饮水, 用国家标准啮齿类动物饲料进行喂养。保持动物房温度为 $18 \sim 24^\circ\text{C}$ 、相对湿度为 $45\% \sim 55\%$, 充足的自然光照。

收稿日期: 2013-03-10

基金项目: 江苏省社会发展项目 (BS2006020)

第一作者简介: 张林, 男, 博士, 教授, 博士生导师、博士后合作导师. 主要研究方向: 运动骨代谢学、运动与肌腱研究。

作者单位: 1. 苏州大学 体育学院, 江苏 苏州 215021; 2. 南通大学体育科学学院, 江苏 南通 226019



表1 实验动物分组

Table I Groups of the Rats for Experiment

组别	N	1d	2d	3d	7d	14d
空白对照组	8					
跟腱末端病模型对照组	8					
跟腱末端病自然愈合组		8	8	8	8	8

1.2 研究方法

1.2.1 造模方法

用电刺激跳跃法造模：造模组的大鼠放在造模装置里，每15 s通电一次，共持续20 min，休息10 min，再持续20 min。每天造模1次，每周6次，持续5周。通电电压由小逐步加大，直到大鼠出现有效跳跃为止，一般在50 V左右，个别情况下达到80~100 V。

1.2.2 指标测试方法

(1) ELISA 法测定跟腱内胶原 I 和胶原 III 的含量。

(2) 实时定量PCR 方法测定跟腱内胶原 I mRNA 和胶原 III mRNA 的表达情况。

1.2.3 统计分析

结果采用平均数±标准差 (X ± SD) 表示，所有数据用 SPSS17.0 统计软件包处理，采用方差分析，显著性水准为 0.05。

2 实验结果

2.1 大鼠跟腱胶原 I 测试结果

2.1.1 跟腱末端病模型对照组与正常对照组比较

模型对照组与正常对照组比较，胶原 I mRNA 的表达和胶原 I 蛋白的合成量明显下降，且具有统计学显著性意义 (见表2)。

表2 正常对照组与跟腱末端病模型对照组胶原 I 合成量比较 (N=8)

Table II Comparison between the Quantity of Collagen-I Synthesis of the Control Group and the Group of Achilles Tendon Enthesiopathy Model (N=8)

	胶原 I mRNA /2 ^{-ΔΔCT}	胶原 I 蛋白 / (ng · mg ⁻¹ 湿重)
正常对照组	1.00	163.72 ± 9.58
造模对照组	0.39 ± 0.19*	161.35 ± 4.87*

注：与正常对照组比较，* 表示 P < 0.05 ** 表示 P < 0.01

2.1.2 跟腱末端病自然愈合组大鼠跟腱胶原 I mRNA 和胶原 I 蛋白含量变化

测试结果显示，随着愈合时间的延长，跟腱末端病模型自然愈合组的胶原 I mRNA 的表达逐渐增加。与造模对照组比较，自然愈合 1 d 组、2 d 组、3 d 组、7 d 组都没有显著性的差异 (P > 0.05)。

胶原 I 的变化出现了先小幅降低而后增加的过程 (见表3)。在自然愈合组，与造模对照组相比，第 1 d、2 d、3 d、7 d 胶原 I 呈下降的趋势，直到第 14 d 才出现显著性增加 (P < 0.05)，提示在第 14 d 时，胶原 I 参与跟腱修复能力显著增强。

表3 胶原 I mRNA 表达和胶原 I 蛋白含量变化

Table III Collagen-I mRNA Expression and Protein Content Variation of Collagen-I (N=8)

	胶原 I mRNA /2 ^{-ΔΔCT}	胶原 I 蛋白 / (ng · mg ⁻¹ 湿重)
造模对照组	0.39 ± 0.19	161.35 ± 4.87
自然愈合 1d 组	0.27 ± 0.19	155.31 ± 5.39
自然愈合 2d 组	0.42 ± 0.16	150.82 ± 5.19
自然愈合 3d 组	0.56 ± 0.18	154.51 ± 4.69
自然愈合 7d 组	0.67 ± 0.26	154.34 ± 5.02
自然愈合 14d 组	1.03 ± 0.32**	162.58 ± 5.05*

注：与造模对照组比较，* 表示 P < 0.05 ** 表示 P < 0.01

2.2 大鼠跟腱胶原 III 测试结果

2.2.1 模型对照组与正常对照组大鼠跟腱胶原 III mRNA 和胶原 III 合成量

跟腱末端病模型对照组与正常对照组比较，模型对照组大鼠跟腱胶原 III mRNA 表达迅速上调，胶原 III 的合成量增加，两者与正常对照组比较均具显著性差异 (P < 0.05)。测试结果如表4。

表4 正常对照组与造模对照组胶原 III mRNA 和胶原 III 合成量比较 (N=8)

Table IV Comparison between Collagen-III mRNA and the Quantity of Collagen-III Synthesis of the Control Group and the Model Group (N=8)

	胶原 III mRNA /2 ^{-ΔΔCT}	胶原 III 蛋白 / (ng · mg ⁻¹ 湿重)
正常对照组	1	12.27 ± 0.28
造模对照组	2.45 ± 1.72*	13.50 ± 0.76*

注：与正常对照组比较，* 表示 P < 0.05 ** 表示 P < 0.01

2.2.2 跟腱末端病自然愈合组大鼠跟腱胶原 III mRNA 和胶原 III 蛋白含量变化

由测试结果发现，跟腱末端病自然愈合组大鼠跟腱胶原 III 变化规律是：随着愈合时间的推移，胶原 III mRNA 的表达和胶原 III 的合成呈现先升高后降低的趋势。

跟腱末端病自然愈合组大鼠与造模对照组大鼠比较，第 1 d、2 d、3 d，跟腱胶原 III mRNA 表达和胶原 III 的含量逐渐增加，差异非常显著 (P < 0.01)，此后胶原 III mRNA 表达开始迅速增加，并在第 7 d 达到峰值 (P < 0.01)，之后开始下降，但在第 14 d 仍高于对照组 (P < 0.05)，而胶原 III 的合成仍显著增加 (P < 0.05)，至 14 d 增加非常明显 (P < 0.01)。测试结果如表5。

3 讨论

3.1 末端病大鼠跟腱胶原 I mRNA 和胶原 I 蛋白含量变化规律

胶原 I 是肌腱细胞外基质强度的重要承担着，其含量占肌腱干重的 60% 左右，在正常肌腱的胶原中占 95%，另外 5% 为胶原 III 及少量的 V 型。胶原 I 的结构是由排列紧密的粗胶原原纤维组成，因而具有强度大弹性低的特点，起稳定组



表5 胶原III mRNA表达和胶原III含量变化的比较
Table V Comparison between Collagen-III mRNA Expression and Content Variation of Collagen-III (N=8)

	胶原 III /2 ^{-ΔΔCT}	胶原 III / (ng · mg ⁻¹ 湿重)
造模对照组	2.45 ± 1.72	13.50 ± 0.76
自然愈合 1d 组	4.78 ± 1.70**	18.13 ± 1.25**
自然愈合 2d 组	5.03 ± 1.68**	19.49 ± 0.93**
自然愈合 3d 组	5.14 ± 1.04**	20.48 ± 1.18**
自然愈合 7d 组	5.57 ± 1.41*	15.15 ± 1.23*
自然愈合 14d 组	3.21 ± 0.52*	14.03 ± 0.99**

注：与造模对照组比较，* 表示 P < 0.05 ** 表示 P < 0.01

织的作用。跟腱的功能主要靠胶原来维持，因此测定胶原 I 含量的变化能较好地反应跟腱的机能状态。

有关运动训练对肌腱胶原 I 含量及其基因表达影响的研究已见报道。Olesen 等^[1]通过去除腓肠肌和比目鱼肌及部分跟腱后给跖肌牵拉，并测定加载后 1 d、2 d、4 d、8 d 和 16 d 后跖肌腱中前胶原 I α 1 mRNA 的水平，结果发现 1 d 后前胶原 I α 1 mRNA 水平显著降低，在 8 d 和 16 d 后其表达显著上升，前胶原 I α 1 mRNA 降低的具体机制目前还不清楚，可能与其开始载荷时其降解有关，其后基因水平的上调表明在 8 d、16 d 后胶原 I 的合成加快，有利于受损肌腱的修复。李敏^[2]的研究表明，一次性跑台运动后即刻、12 h、72 h 时前胶原 I α 1 mRNA 水平与对照组相比无显著性变化，表明一次性跑台运动不能在转录水平上调肌腱胶原 I 的表达，在转录水平上调肌腱胶原 I 的合成，可能需要较大的强度负荷和时间负荷。但在一次性跑台后即刻和 12 h 时跟腱中胶原 I 蛋白含量显著降低，表明一次性跑台后可抑制跟腱胶原的合成，其原因可能是由于不适应负荷作用下暂时的抑制或清除胶原的能力的增加，也可能是运动时肌腱腱周液体的溢出等缘故。因而他们的研究结果具有相同的观点：在运动载荷后 12 h 内胶原 I 的合成被抑制。本研究中末端病大鼠跟腱内的胶原 III mRNA 表达和胶原 I 含量明显下降，且具有显著性差异 (P < 0.05)，表明末端病大鼠跟腱胶原 I 在转录水平上的表达和蛋白水平的合成量都下降，这正说明胶原代谢被抑制，分析其原因，笔者认为在造模过程中过载的负荷诱导腱细胞的凋亡以及胶原合成和分泌被抑制所致，也可能是受损的跟腱破裂造成胶原流失的原因。因此本研究的结果表明在造模后胶原 I 水平的下降与上述的报道是一致的。

从末端病大鼠跟腱中胶原 I 蛋白和胶原 III mRNA 的表达动态变化来看，随着时间的推移，跟腱中的胶原 III mRNA 的表达逐渐增加，但胶原 I 蛋白的合成第 1 d、2 d、3 d 出现了小幅下降，随后开始逐渐增加，说明受损跟腱恢复早期胶原 I 合成代谢被抑制，这和李敏^[2]的研究结果相一致，但是在随后的恢复过程中这种抑制作用逐渐减弱，表现出随时间增加而逐步增长的规律，也预示着被受损的跟腱逐渐被修复的过程。造成这种变化的原因，笔者认为，其一是在恢复早期，受损的跟腱中胶原合成代谢被不适宜的运动载荷的抑制未被解除。二是胶原 I 合成代谢被其它因素的制约，包括：(1) 可能是胶原 III 合成的快速增加代偿了胶原 I 的下降；(2) 酶活性的改变，如 MMP-1 mRNA 的表达和 MMP-1 蛋白含量

的明显增加导致胶原降解；(3) 细胞因子的激活，如 TGF-β 1 具有明显的促进胶原合成的作用；(4) 某些代谢产物增多等。三是胶原从受损的肌腱中溢出等。这些原因造成了胶原的含量出现暂时下降的现象，但随着载荷取消后恢复时间的延长，跟腱中血液供应逐步得到恢复，腱细胞又被激活，合成和分泌到基质中的胶原蛋白和蛋白多糖也增多，从而稳固了肌腱组织的结构，有利于肌腱的重塑。

3.2 末端病大鼠跟腱胶原 III mRNA 和胶原 III 蛋白含量变化规律

与胶原 I 相比，肌腱中胶原 III 的含量很少，不足 10%，其形成的纤维与胶原 I 明显不同，纤维较细但弹性较高。肌腱中胶原 III 主要分布在腱内膜和腱鞘，也分布在衰老的肌腱或承受高应力肌腱的附着处。Eriksen 等的研究表明，当肌腱受到损伤进行修复时，会出现胶原 III 的暂时表达^[3]，从而促进胶原 III 的合成，胶原 III 合成的增加是组织代谢活跃的标记^[4]，因而可用胶原 III 代谢水平的变化来评价肌腱的功能状态。

有关末端病大鼠跟腱对胶原 III 表达的研究至今未见报道。但运动训练对跟腱胶原 III 影响的研究已有相关的报道。李敏^[2]在研究一次性跑台运动对大鼠跟腱影响时发现，运动后 24 h 胶原 III 含量开始增加，至 72 h 显著增加，胶原 III 型 α 1 链在转录后水平也显著增加，而胶原 III 合成的增加标志着组织代谢的活跃，提示一次性跑台后跟腱组织内代谢活跃，它可刺激跟腱在转录前或后水平上调胶原 III 的合成和装配。任洪峰^[5]对大鼠进行为期 8 周的中等强度的强化训练，并用免疫组化方法测定其训练 1 周、2 周后跟腱胶原 III 的表达，结果显示在第 1 周胶原 III 含量升高。这表明运动刺激促进胶原 III 的表达呈现训练早期增强，训练早期胶原 III 的含量增加提示应力作用下胶原代谢活动加速，促进组织结构发生改建。Olesen 等^[1]通过去除腓肠肌和比目鱼肌及部分跟腱后给跖肌加载，研究加载后 2 d、4 d、8 d 和 16 d 后跖肌腱中前胶原 III α 2 mRNA 的水平，结果发现 1 d 后其表达显著增加，同样表明胶原 III 在运动载荷后早期表达增加。艾进伟^[6]的研究发现中等强度的负荷没有引起胶原 III 含量的显著性变化，但强化训练豚鼠跟腱胶原 III 含量显著增加，与前述不一致，提示运动后引起肌腱组织中胶原 III 与应力的强度有关。以上研究的结果虽然有所不同，但大多数的研究都支持了运动载荷导致跟腱中胶原 III 在早期表达增加的观点。本研究结果显示，末端病大鼠造模后跟腱中无论是胶原 III mRNA 在转录水平的表达还是胶原 III 在蛋白水平的合成都表现出明显增加，且具有显著性差异 (P < 0.05)，提示在受损跟腱中胶原 III 的表达增加，与上述的运动引起早期阶段胶原 III 含量增加的结果相一致。笔者认为，末端病大鼠跟腱胶原 III 表达的提高与运动后早期引起胶原 III 表达增加具有相同的原因，可能是运动应激增加了跟腱内的损伤速率，限制了胶原原纤维自我装配的末端肽的切除，使原胶原 III 快速形成分子内、分子间交联，从而快速合成胶原原纤维，加上分子间双硫键的存在，对肌腱内组织起着坚实的固定作用，因此重塑性胶原 III 合成的增加预示着组织修复的增强。

末端病大鼠跟腱中胶原 III 变化规律呈现先升高后降低的

4 结论

4.1 低功率激光治疗在末端病大鼠跟腱早期愈合中有一定的促进作用, 这种作用在 7 d 后开始出现。

4.2 低功率激光治疗能通过对蛋白多糖酶活性和细胞因子的调控, 促进蛋白多糖的合成, 调节细胞外基质, 减少疤痕形成。

4.3 低功率激光在增加蛋白多糖的合成同时也促进了胶原的生成, 共同促进跟腱愈合, 提高跟腱修复质量。

参考文献:

[1] 罗丽, 张林. 低功率激光对运动损伤的修复效应[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12 (35): 6907-6910.

- [2] 艾进伟, 黄昌林, 任强. 兔跟腱基质中胶原纤维和蛋白多糖结构的原子力显微镜观察[J]. 中国临床康复, 2005 (06): 45-48.
- [3] Redaelli A, Vesentini S, Soncini M, et al. (2003). Possible role of decorin glycosaminoglycans in fibril to fibril force transfer in relative mature tendons—a computational study from molecular to microstructural level [J]. *Biomech*, 36(10):1555-1569.
- [4] 艾进伟, 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 (05): 123-126.
- [5] Yamaguchi Y, Mann DM, Ruoslahti E. (1990). Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin [J]. *Nature*, 346 (6281):281-284.

(责任编辑: 何聪)

(上接第 37 页)

趋势。造模后大鼠跟腱胶原 III mRNA 表达迅速上调, 胶原 III 的合成量也增加, 两者与对照组相比都具有显著性的差异 ($P < 0.05$), 第 1 d、2 d、3 d, 胶原 III mRNA 表达和胶原 III 的含量逐渐增加, 与对照组相比, 差异非常显著 ($P < 0.01$), 此后胶原 III mRNA 表达开始迅速增加, 并在第 7 d 达到峰值 ($P < 0.01$), 之后开始下降, 但在第 14 d 仍高于对照组 ($P < 0.05$), 而胶原 III 的合成仍显著增加 ($P < 0.05$), 至 14 d 增加还是明显 ($P < 0.05$)。这种变化也说明胶原 III 在跟腱修复的早期阶段起着十分重要的作用, 与上述相关研究的结果和观点相一致。

4 结论

4.1 在末端病大鼠跟腱早期修复过程中胶原 I 的表达被抑制。

4.2 在末端病大鼠跟腱修复的早期阶段胶原 III 起着十分重要的作用, 这种作用在修复的前 7 d 效果非常明显。

4.3 末端病大鼠跟腱修复初期胶原 III 能代偿被抑制合成的胶原 I, 积极参与肌腱的再生, 直至胶原 I 代谢被激活后, 两者共同促进肌腱的修复。

参考文献:

- [1] Olesen JL, Heinemeier KM, Haddad F, et al. (2006). Expression of insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding proteins, and collagen mRNA in mechanically loaded plantaris tendon. [J]. *Appl Physiol*, 101(1):183-188.
- [2] 李敏. 跑台运动对大鼠跟腱的及其机制研究[D]. 中国学位论文全文数据库. 2008
- [3] Eriksen HA, Plajala A, Leppilahti J, et al. (2002). Increased content of type III Collagen at the rupture site of human Achilles tendon [J]. *J Orthop Res*, 20(6):1352-1357.
- [4] 艾进伟. 强化训练队跟腱塑形改建影响的动物实验和人群干预研究[D]. 中国学位论文全文数据库. 2005
- [5] 任洪峰. 不同训练方式对大鼠跟腱改建影响的实验研究[D]. 中国学位论文全文数据库. 2005
- [6] 艾进伟, 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, (05): 123-126.

(责任编辑: 何聪)