



低功率激光对一次性离心力竭运动大鼠跟腱蛋白多糖含量的影响

申晋波¹, 沈勇伟², 张林²

摘要: 采用低功率激光对一次性离心力竭运动大鼠跟腱进行照射, 采用生物化学测定和组织学技术观察的方法, 分析低功率激光照射对跟腱蛋白多糖含量影响, 探讨低功率激光照射对力竭运动后早期跟腱微损伤修复中的作用。结果显示: 一次性离心力竭运动大鼠跟腱中蛋白多糖含量显著高于空白对照组; 激光照射组蛋白多糖含量的变化与自然愈合组一样, 是随时间增加而逐渐升高, 但增加幅度要大于自然愈合组。表明低功率激光照射能促进大鼠跟腱蛋白多糖的合成, 加快跟腱细胞外基质成分的恢复, 有利于受损跟腱的修复。

关键词: 低功率激光; 力竭; 跟腱; 蛋白多糖

中图分类号: G804.5 文献标志码: A 文章编号: 1006-1207(2013)02-0038-04

Impact of Low-power Laser Irradiation on Proteoglycan Content of Achilles Tendon of Rats Which Experienced One-time Exhaustive Eccentric Exercise

SHEN JIN-bo¹, SHEN Yong-wei², ZHANG Lin²

(Department of Physical Education, Yuncheng University, Yuncheng 044000, China)

Abstract: Low-power laser irradiation was applied to the Achilles tendon of the rats which experienced one-time exhaustive eccentric exercise, as well as the method of biochemical measurement and histological technology observation. The effect of low-power laser irradiation on the proteoglycan content of Achilles tendon was analyzed so as to explore the function of low-power laser irradiation in the early-stage micro-damage repair of Achilles tendon after exhaustive exercise. The result shows that the proteoglycan content of the rat's Achilles tendon after one-time exhaustive eccentric exercise was significantly higher than that of the control group. The changes of the proteoglycan content of the laser irradiation group was the same as that of the natural healing group. The content of both increased gradually as time passed. However, the rate of increase was greater than that of the natural healing group. This indicates that low-power laser irradiation can promote the proteoglycan synthesis of the rat's Achilles tendon and accelerate the recovery of Achilles tendon extracellular matrix, which is conducive to the repair of damaged Achilles tendon.

Key words: low-power laser; exhaustion; Achilles tendon; proteoglycan

跟腱损伤在跨栏、跳高、跳远、短跑等田径以及足球、篮球、网球等球类运动项目中十分常见。跟腱损伤之后很难治疗, 一旦跟腱断裂, 运动员将很有可能永远离开赛场, 结束运动生涯。力竭性跟腱损伤作为急性跟腱损伤的代表, 在运动员中占有很大的比例, 对于普通人来说, 不合理的生活方式、重复性的工作活动很容易产生跟腱损伤; 对运动员和军人来说, 持续性的运动训练也会发生跟腱损伤^[1]。因此对于力竭性跟腱损伤的诊断、预防、治疗、恢复就显得格外重要。

由于跟腱结构的复杂性以及其病变的多样性, 使得众多学者对于跟腱损伤的认识不统一, 目前对于跟腱损伤治疗方法的研究比较少, 有的也只是停留在药物治疗和手术治疗阶段。近年来众多研究表明, 跟腱并不是无活性的, 由此尽可能选择一种微创甚至无创的治疗方法进而激发跟腱的自愈能力、提高其恢复效果。而低功率激光疗法 (low level light

therapy, LLLT) 作为一种常用的物理疗法, 能对生物体产生特定的生物刺激作用 (光生物调节作用), 引起某些生物学效应的同时并不产生热量。因此, 探讨低功率激光照射跟腱, 对跟腱组织所起的作用和影响, 探索跟腱损伤的发病机制, 筛选一些与跟腱损伤和修复有关并且有效的指标, 探寻一种治疗跟腱损伤科学、合理的方法显得十分必要和急需。目前, 低功率激光已经在许多国家应用, 但一些学者对低功率激光的疗效和作用还存在异议, 也许这与研究过程中采用的激光参数 (如波长、照射强度、剂量、照射时间) 不同有关, 也可能与所选动物类型及照射部位不同有一定的关系。

蛋白多糖是肌腱细胞外基质的主要成分之一, 它对肌腱胶原修复的作用主要是通过TGF的调节和抑制胶原纤维的形成等机制来实现的。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

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: 申晋波, 男, 助教, 硕士. 主要研究方向: 运动与肌腱研究。

作者单位: 1. 运城学院, 山西 运城 044000; 2. 苏州大学 体育学院, 江苏 苏州 215021



肌腱的结构与功能中起着至关重要的作用^[3]。

本实验以一次性离心力竭跑台运动大鼠为研究对象，通过低功率激光照射其跟腱，观察低功率激光照射对一次性离心力竭大鼠跟腱的胶原纤维排布，测定蛋白多糖含量的变化，探讨低功率激光在跟腱微损伤后早期恢复中是否有效，是否能加快和促进微损伤的修复。

1 材料与方法

1.1 实验动物及其分组

8周龄健康清洁级雄性Wistar大鼠60只(由苏州大学动物实验中心提供)，平均体重为(189±6.6)g，经适应性喂养一周后进行随机分组。

空白对照组：N=6；一次性离心力竭跑台运动组：N=54；造模对照组(即刻)：N=6；自然愈合组：N=24，分为自然愈合1d、2d、3d、7d；激光治疗组：N=24，分为激光治疗1d、2d、3d、7d。实验动物分组见表1。

表1 实验动物分组
Table 1 Groups of the Rats for Experiment

组别	处理手段	处死时间	样本数
空白对照组	无	无限制	6
造模对照组	力竭跑台	力竭后立即	6
自然愈合组	力竭跑台自然愈合	力竭后1d	6
	力竭跑台自然愈合	力竭后2d	6
	力竭跑台自然愈合	力竭后3d	6
	力竭跑台自然愈合	力竭后7d	6
激光治疗组	力竭跑台激光治疗	力竭后1d	6
	力竭跑台激光治疗	力竭后2d	6
	力竭跑台激光治疗	力竭后3d	6
	力竭跑台激光治疗	力竭后7d	6

1.2 动物的饲养

将60只Wistar大鼠分组后，每笼6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。动物房温度保持在18~24℃、相对湿度为45%~55%，予以充足的自然光照，每天12h。

1.3 实验方法

1.3.1 运动方案

大鼠进行一次性离心力竭跑台运动前，将运动组大鼠进行3次适应性训练，运动速度为10m/min，每次运动时间为5min(跑台运动组大鼠均在中国杭州段式跑台BCPT-98型号跑步机上进行)，正式运动前，先将跑台调整至-16°(即下坡跑)，然后将大鼠置于跑台中，让其安静30min，随后进行跑台运动，负荷共分为3级：I级负荷：速度为10m/min，时间15min；II级负荷：速度为15m/min，时间15min；III级负荷：速度为20m/min，运动至力竭为止。力竭运动模型参照北京师范大学体育与运动学院和Bedford方法加以修改的递增负荷力竭跑台运动方案^[15]。

大鼠力竭的判断标准为：大鼠跑台姿势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。

1.3.2 激光照射方法

激光照射采用半导体低功率激光器(苏州大学物理激光研究所制造)，波长为635nm，功率为15mW，照射面积为1.2cm²，照射时间为10min，每日1次。在大鼠力竭跑台造模结束后，对激光治疗组大鼠跟腱部位采用该低功率激光照射方法。

自然愈合组与激光照射组在处死之前均给予以充足的水和纯鼠料喂养。

1.4 样品取材与处理

采用10%的水合氯醛溶液(3mL/100g)注射大鼠腹腔进行麻醉，并保证每组于同一时间点取材。

1.4.1 HE染色光镜观察

HE染色光镜观察样品：取右侧跟腱，去除腱围，得到跟腱样品，迅速放入10%的福尔马林中固定。固定后的组块依次入梯度酒精脱水(75%→85%→95%→100%)，二甲苯透明，使用德国Leica-EG1160型全自动石蜡包埋机进行包埋。使用Leica-RM2145型石蜡切片将蜡块进行横向和纵向连续切片，切片厚度为5μm。再进二甲苯脱蜡，梯度酒精脱水(100%→95%→85%→75%)，水洗后进行HE染色，经酒精脱水，二甲苯透明后，中性树胶封固。按常规方法进行HE染色。然后将HE染色组织切片置于OLYMPUS-BX51型光学镜下，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症变化。

1.4.2 大鼠跟腱蛋白多糖含量

蛋白多糖含量样品：大鼠麻醉固定后迅速剥离后肢跟腱，去除腱围及相连肌肉，置于冻存管中，在液氮中速冻1h，然后转移至-80℃冰箱保存。测定原理：采用双抗体夹心ABC-ELISA法，用抗大鼠I型胶原、III型胶原及IGF-I单抗包被于酶标板上，标准品和样品中的蛋白多糖与单抗结合，加入生物素化的抗大鼠蛋白多糖，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，加入酶底物OPD，出现黄色，加终止液硫酸，颜色变深，在492nm处测OD值，各检测指标浓度与OD值成正比，可通过绘制标准曲线求出标本中检测指标浓度(试剂盒由上海西唐生物科技有限公司提供)。

1.5 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 结果

2.1 跟腱HE染色光镜观察结果

空白对照组：跟腱组织顺应力方向排列整齐，胶原呈平行排列且规则，其结构致密，胶原与胶原之间距离均匀、紧凑，可以清晰观察到腱细胞，一般都处于安静期；一次性离心力竭运动后立即造模对照组：可见跟腱周围组织充血、水肿，局部排列错乱；胶原纤维间隔增多(图1)。

一次性离心力竭运动后3d：两组均有部分腱细胞变大，核清晰，染色浅，嗜碱性；激光治疗组更明显，表示腱细

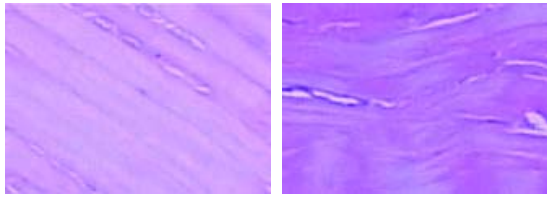


图1 空白对照组与即刻造模对照组大鼠跟腱光镜下表现(HE, 10 × 40)

Figure 1 Behavior of the Control Group and the Instant Model Establishing Group in the Achilles Tendon Light Microscope(HE,10 × 40)

胞活跃,且代谢加快,提示其胞外组成蛋白多糖的能力增强(图2)。

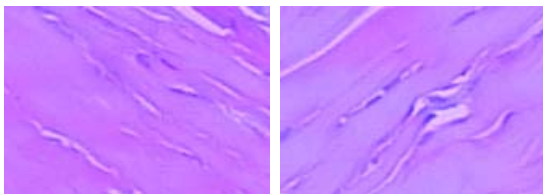


图2 自然愈合3天组激光治疗3天组大鼠跟腱光镜下表现(HE, 10 × 40)

Figure 2 Behavior of the 3-day Natural Healing Group and the 3-day Laser Irradiation Group in the Achilles Tendon Light Microscope (HE,10 × 40)

一次性离心力竭运动后7d:自然愈合组尚未愈合,胶原纤维排列依旧紊乱;激光治疗组基本愈合,腱细胞数量增多,胶原纤维排列趋于整齐,基本未见胶原瘢痕出现(图3)。

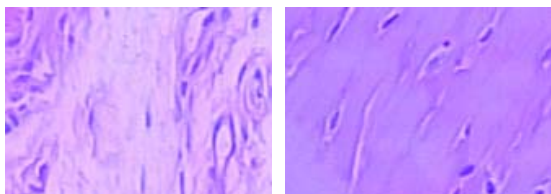


图3 自然愈合7d组与大鼠激光治疗7d组跟腱光镜下表现(HE, 10 × 40)

Figure 3 Behavior of the 7-day Natural Healing Group and the 7-day Laser Irradiation Group in the Achilles Tendon Light Microscope (HE,10 × 40)

2.2 大鼠跟腱蛋白多糖测试结果

2.2.1 空白对照组和造模对照组大鼠跟腱蛋白多糖含量

不同对照组大鼠跟腱蛋白多糖含量的测试结果显示,造模后大鼠跟腱中蛋白多糖含量明显下降,与空白对照组比较,具有显著性差异($P < 0.05$)(见表2)。

表2 空白对照组与造模对照组蛋白多糖含量的比较(N=6)

Table II Comparison between the Proteoglycan Content of the Control Group and That of the Model Group (N=6)

	蛋白多糖 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ 湿重)
空白对照组	370.87 ± 9.24
造模对照组	$218.11 \pm 9.52^*$

注:与空白对照组比较,*表示 $P < 0.05$

2.2.2 激光照射组和自然愈合组大鼠跟腱蛋白多糖含量

随着恢复时间的增加,大鼠跟腱中的蛋白多糖含量呈逐渐增加的趋势(见表3)。

表3 造模后各组蛋白多糖含量的比较(N=6)

Table III Comparison between the Proteoglycan Content of the Different Groups after the Model was Established (N=6)

组别	激光照射组 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ 湿重)	自然愈合组 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ 湿重)
造模对照组	218.11 ± 9.52	218.11 ± 9.52
造模后1d组	221.681 ± 9.95	220.03 ± 10.83
造模后2d组	241.58 ± 8.73	235.11 ± 6.53
造模后3d组	$299.85 \pm 10.53^{**}$	245.59 ± 11.57
造模后7d组	$343.68 \pm 11.54^{**}$	$301.59 \pm 12.63^{\#}$

注:与造模对照组比较,*表示 $P < 0.05$;与自然愈合组同一取材点比较,#表示 $P < 0.05$

自然愈合组的蛋白多糖含量,在7d中缓慢增加,自然愈合7d组与造模对照组比较出现显著性差异($P < 0.05$)。

激光照射组蛋白多糖含量变化趋势与自然愈合组基本相同,但相同取材时间点蛋白多糖含量均比自然愈合组高,激光照射1d组、2d组与造模对照组相比没有显著性差异($P > 0.05$),第3d、7d时开始均出现显著性差异($P < 0.05$)。

激光照射组与自然愈合组比较,在造模后的第3d、7d均出现显著性差异($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 低功率激光照射对一次性离心力竭性大鼠跟腱组织学影响

跟腱在结构上除了腱细胞以外,还存在着胶原及一些其他细胞外基质。其中胶原占跟腱干重的60%以上。正常跟腱组织在光镜下可见胶原顺受力方向上规则的排列,并形成致密结构。跟腱是粘弹性组织,其功能很大程度上取决于胶原的韧性和胶原结构上的排列。一些研究表明:跟腱的微损伤可能是导致跟腱断裂的主要原因之一^[5]。但在机体当中跟腱的微损伤和修复同时存在,力竭运动构成的微损伤需要多久才能修复,修复后会不会存在瘢痕以及低功率激光在跟腱微损伤修复过程中所起的作用都还处于研究阶段,并未达成共识。

本研究中,空白对照组光镜下表现为:胶原呈平行排列且规则,其结构致密,胶原与胶原之间距离均匀、紧凑,腱细胞处于安静期。而经过一次性离心力竭运动后即刻和自然愈合1d组出现跟腱周围组织充血、水肿,局部排列不规则,胶原纤维间隔增多。与李敏^[2]等对一次性跑台大鼠胶原纤维变化的研究结果相符。自然愈合组7d时,胶原纤维仍然排列紊乱。激光治疗组7d时,腱细胞数量增多,胶原纤维排列比较整齐,表明基本愈合。因此,从组织形态学的观察结果来看,低功率激光对一次性离心力竭大鼠跟腱微损伤的修复、提高腱细胞分泌功能有积极作用。

3.2 低功率激光照射对一次性离心力竭运动大鼠跟腱蛋白多糖含量的影响

蛋白多糖这一重要的细胞外基质对肌腱胶原修复的作用



主要是：(1) 提高转化生长因子的调节能力；(2) 抑制胶原纤维的形成机制。蛋白多糖对维持肌腱的结构与功能起着重要的作用，而胶原纤维与蛋白多糖之间存在复杂的编织排列，这可能就是肌腱结构和功能基础。

本研究结果显示，一次性离心力竭运动大鼠跟腱中蛋白多糖含量与空白对照组比，具有显著性差异 ($P < 0.05$)，提示力竭运动后大鼠跟腱蛋白多糖含量明显降低，随着恢复时间的增加，跟腱中蛋白多糖的含量逐渐增加，这与之前的研究结果相吻合。

目前尚未见有关低功率激光照射对肌腱微损伤修复中蛋白多糖含量影响的研究报道。本研究显示，一次性离心力竭运动大鼠跟腱在恢复阶段，激光照射组蛋白多糖含量的变化与自然愈合组一样，是随时间增加而逐渐升高，但增加幅度要大于自然愈合组，并在第3 d就出现了显著性差异，表明低功率激光照射能促进大鼠跟腱蛋白多糖的合成，加快跟腱细胞外基质成分的恢复，有利于受损跟腱的修复。其原因可能是低功率激光对蛋白多糖合成的调节作用：低功率激光激活了蛋白多糖合成相关酶的活性，调控了蛋白多糖的合成代谢，从增加蛋白多糖的含量。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，这有利于在胶原纤维与蛋白多糖之间形成适合于发挥肌腱性能的复杂的编织排列，从而改变肌腱的构型，增强肌腱的功能，促进肌腱的修复。

4 结论

研究表明，低功率激光照射能通过改善蛋白多糖酶的活性和细胞因子的调控，调节蛋白多糖的合成，从而减少肌腱愈合中疤痕形成，提高跟腱功能恢复的效果。低功率激光虽然显著地提高了跟腱局部组织蛋白多糖含量，但其效果与照射剂量、频率以及激光的类型有很大关系。研究结果的差异可能与激光的类型、波长、剂量参数等的不同有关，低功率激光器的最佳剂量仍有待今后做进一步的研究。

参考文献：

[1] 王人卫, 李擎, 李建平等. 优秀羽乒排网运动员运动创伤流行病学调查研究[J]. 中国运动医学杂志, 2009, 28 (4): 419-422

[2] 李敏. 跑台运动对大鼠跟腱的影响及其机制研究[D]. 苏州大学博士学位论文, 2008.

[3] 辛绍杰, 邹正升. 细胞外基质的代谢[J]. 世界华人消化杂志, 2002, 10 (1): 54-56

[4] Pankaj S, Nicola M. (2005). Tendon injury and tendinopathy:

healing and repair: current concept review[J]. *JBJS [Am]*, 87-A: 187-202.

[5] Ker PF, Xang XT, Anna VL. (2000). Fatigue quality of mammalian tendons[J]. *The Journal of Experimental Biology*, 203:1317-1327.

[6] Worth N, Ghosh S, Msfulli N. (2007). Management of acute Achilles tendon ruptures in the United Kingdom[J]. *J Orth Surg*, 15(3):311-314.

[7] Korula MJ, Roger P. (2007). Surgical repair followed by functional rehabilitation for acute and chronic achilles tendon injuries: excellent functional results, patient satisfaction and no ruptures [J]. *Anz J Surg*, 77:287-291.

[8] 张施龙, 刘泽淼, 林均馨, 等. 普通人群新鲜闭合性跟腱断裂的临床特征和手术疗效[J]. 齐鲁医学杂志, 2007, 22 (1): 55-57.

[9] Jcalder DF, Saxby TS. (2005). Early, active rehabilitation following mini-open repair of Achilles tendon rupture: a prospective study[J]. *Br J Sports Med*, 39:857-859.

[10] Nistor. (1981). Surgical and non-surgical treatment of Achilles tendon rupture. A prospective randomized study [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 63(3):394-399.

[11] Moller M, Movin T, Granhed H, et al. (2001). Acute rupture of tendo Achills: a prospective, randomized study of comparison between surgical and non-surgical treatment[J]. *JBJS[Br]*, 83-B: 843-848.

[12] Pankaj S, Nicola M. (2005). Tendon injury and tendinopathy: healing and repair: current concept review[J]. *JBJS [Am]*, 87-A: 187-202.

[13] Amar AS, Carol S, David CR, et al. (2006). Postoperative rehabilitation protocols for Achilles tendon rupture: a Meta-analysis[J]. *Clinical Orthop edics and Related Research*, 445:216-221

[14] 刘桂香. 青少年运动训练跟腱损伤之防治[J]. 内蒙古体育科技, 2009, 22 (1): 36-38.

[15] 杨东升, 刘晓莉, 乔德才. 力竭运动过程中大鼠纹状体葡萄糖/乳酸代谢的实时观察[J]. 中国运动医学杂志, 2009, 28 (4): 384-387

[16] 熊雁, 张正治. 核心蛋白聚糖在肌腱愈合作用中的研究进展 [J]. 国外医学·骨科学分册, 2005, 26 (3): 185-187.

[17] 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.

[18] 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)