

论著·基础研究

肌腱去应力退化机制的生物信息学分析

李清林¹, 王文波^{2#}, 刘 伟^{2#}

1. 潍坊医学院整形外科研究所, 潍坊 261042; 2. 上海交通大学医学院附属第九人民医院整复外科, 上海市组织工程研究重点实验室, 上海 200011

[摘要] **目的**·建立新生大鼠发育肌腱去应力模型, 通过生物信息学分析可能的分子机制。**方法**·选择60只出生10 d的SD大鼠, 切断左侧跟腱作为实验组(去应力组), 钳夹损伤右侧跟腱作为对照组(力刺激组)。手术处理后第10日和第20日收集肌腱组织样本, 大体观察肌腱发育情况; 苏木精-伊红(H-E)染色观察肌腱组织学结构变化; 透射电子显微镜观察肌腱胶原超微结构的变化; 免疫组织化学检测肌腱组织中CD31的表达。运用蛋白质组分析技术获得2个时间点的组间差异表达蛋白, 并对差异蛋白行GO分析、KEGG富集分析、蛋白互作(protein-protein interaction, PPI)网络分析。**结果**·去应力组肌腱呈现组织膨大及充血的大体观, 以及肌腱组织结构紊乱、胶原纤维不成熟的病理改变。透射电子显微镜下观察到去应力组肌腱胶原纤维发育和成熟障碍; 术后第20日, 去应力组肌腱胶原纤维直径显著小于力刺激组($P=0.001$)。免疫组织化学染色结果显示肌腱呈血管化改变。蛋白质组分析结果显示: 术后第10日鉴定出差异常表达蛋白1 865种, 其中1 835种蛋白上调; 术后第20日鉴定出差异常表达蛋白965种, 其中837种蛋白上调。GO分析结果显示, 上调的差异表达蛋白主要参与细胞内蛋白运输、蛋白质稳定性、mRNA剪接、蛋白质折叠、蛋白质导入细胞核等生物过程。KEGG分析结果显示, 血管内皮生长因子(VEGF)信号通路、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路、吞噬作用等信号通路增强。PPI分析结果显示, Akt1、Hspa4、Hspa5、Eef2、ACTC1、RhoA等多种蛋白表达上调。**结论**·去应力可激活细胞内多条信号通路, 引起组织血管化、胶原发育异常等, 造成肌腱退化性病理改变。

[关键词] 去应力刺激; 肌腱退化; 胶原; 蛋白组学; 生物信息学; 信号通路

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2023.05.006 **[中图分类号]** R686 **[文献标志码]** A

Bioinformatics analysis of pathological mechanism of degenerated tendon via stress deprivation

LI Qinglin¹, WANG Wenbo^{2#}, LIU Wei^{2#}

1. Plastic Surgery Research Institute, Weifang Medical University, Weifang 261042, China; 2. Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine; Shanghai Tissue Engineering Key Laboratory, Shanghai 200011, China

[Abstract] **Objective**·To explore relevant molecular mechanisms of the stress deprivation model of newborn rats by using bioinformatics analysis. **Methods**·A total of 60 SD rats (10 d post-natal) were enrolled in the study. Those the left Achilles tendon of which was severed were chosen as the experimental group (stress deprivation group), and the right Achilles tendon of which was injured by clamping were chosen as the control group (stress group). On the 10th and 20th day after treatment, tissue samples were collected for gross observation of the tendon development, histological staining of the tendon structure, transmission electron microscope observation of the tendon ultrastructure and immunohistochemical analysis of CD31 expression. Differentially expressed proteins between the two groups at two time points were obtained by using protein mass spectrometry, and GO and KEGG enrichment analysis as well as protein-protein interaction (PPI) network analysis were performed on differential proteins. **Results**·The stress-deprived tendon showed tissue enlargement and congestion, disorganized tendon tissue structure and immature collagen fibers. Transmission electron microscopy showed that the development and maturation of collagen fibrils were significantly impaired in the experimental group, and the diameter of collagen fibrils of the severed tendon became thinner on the 20th day after treatment ($P=0.001$). Immunohistochemistry showed that the severed tendon was relatively vascularized. The results of protein mass spectrometry analysis showed there were 1 865 and 965 differentially expressed proteins on the 10th and 20th day after treatment,

[基金项目] 国家自然科学基金(31870967, 81701841); 国家重点研发计划(2018YFC1105800)。

[作者简介] 李清林(1989—), 男, 硕士生; 电子信箱: qinglinli346@163.com。

[通信作者] 刘 伟, 电子信箱: liuwei_md@126.com。王文波, 电子信箱: wangwenbo0903@126.com。[#]为共同通信作者。

[Funding Information] National Natural Science Foundation of China (31870967, 81701841); National Key R&D Program of China (2018YFC1105800)。

[Corresponding Author] LIU Wei, E-mail: liuwei_md@126.com. WANG Wenbo, E-mail: wangwenbo0903@126.com. [#]Co-corresponding authors.

including 1 835 and 837 upregulated proteins respectively. GO analysis showed that the upregulated proteins were involved in biological processes such as intracellular protein transport, protein stabilization, mRNA splicing *via* spliceosome, protein folding and protein import into nucleus. KEGG analysis identified enhancement of vascular endothelial growth factor (VEGF) signal pathway, mammalian target of rapamycin (mTOR) signal pathway, endocytosis and other signal pathways in the experimental group. PPI network analysis showed various upregulated proteins including Akt1, Hspa4, Hspa5, Eef2, ACTC1 and RhoA.

Conclusion Stress deprivation can activate multiple signal pathways in tendon cells and lead to tissue vascularization, abnormal collagen development, etc., resulting in degenerative pathological changes of tendons.

[Key words] stress deprivation; tendon degeneration; collagen; proteomics; bioinformatics; signal pathway

肌腱是连接骨与肌肉的组织,由胶原蛋白纤维束构成,具有独特生物力学特点。肌腱组织的发育、形态维持、损伤修复以及老化均与力学生物学环境密切相关。生理范围内机械负荷增加会促进胶原蛋白和细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的合成,有助于肌腱发育和成熟;若失力学刺激,则会阻碍肌腱的发育,引起肌腱退化^[1]。相关研究^[2]已表明,力学刺激可通过调控肌腱组织ECM的沉积和降解进而调控肌腱干细胞的增殖与分化,并可引起表观遗传修饰改变。但去应力刺激后肌腱的退化机制尚不明确。因此,研究失力学刺激后肌腱的退化机制对肌腱损伤修复至关重要,同时具有重要临床意义。本研究采用组织学和组织超微结构检测以及蛋白质谱分析技术,在去应力刺激的发育肌腱模型中观察去应力对肌腱的组织结构和胶原超微结构的影响,并采集肌腱组织进行蛋白质谱分析和差异表达蛋白生物信息学分析,以期探讨失去应力刺激导致肌腱退行性变的分子机制。

1 材料与方法

1.1 模型制备及样本采集

SPF级雄性10日龄SD大鼠60只,体质量8~12 g,平均(10±2) g。大鼠购自上海斯莱克实验动物有限公司,动物生产许可证号为SCXK(沪)2022-0004,使用许可证号为SYXK(沪)2022-0012。

在手术开始前,通过吸入异氟醚麻醉大鼠。用胶带将大鼠四肢固定,用碘伏消毒其背部和后腿。用手术刀在大鼠双侧小腿背部沿其跟腱走行方向切开皮肤,钝性分离并暴露出跟腱。将大鼠左侧跟腱切断作为实验组(去应力组),右侧跟腱仅行钳夹损伤作为对照组(力刺激组),建立自身对照去应力肌腱退化模型。上述操作过程均在无菌条件下进行。将处理后大鼠置于SPF环境中饲养,在笼中可自由活动并能获取母乳、饲料和水。

在手术处理后第10日、第20日,通过吸入异氟醚麻醉大鼠后,固定其四肢并剃毛暴露后肢,分别收集去应力组和力刺激组肌腱组织样本。将组织放于4%多聚甲醛或2.5%戊二醛中固定,用于后续的实验检测。

1.2 肌腱组织学观察

将肌腱组织样本放于4%多聚甲醛中过夜固定后,行脱水、浸蜡、包埋及切片,然后进行苏木精-伊红(H-E)染色。具体步骤如下:将石蜡切片在70℃气浴箱里烘烤后取出,立刻放入二甲苯中脱蜡,依次在100%、95%、85%、70%和50%浓度乙醇中梯度水化30 s。将切片浸入苏木精染液中10 min,再经过流水清洗后完全浸入盐酸乙醇溶液约5 s,将切片放入流水中返蓝约20 min后进行伊红染色,时间为3 min。将切片放入浓度为50%、70%、85%、95%、100%乙醇中梯度脱水各30 s,再将沥干后的切片依次放入二甲苯中透明10 min。用中性树脂封片,在显微镜下观察和拍照。

1.3 免疫组织化学检测肌腱组织中CD31的表达

以3,3'-二氨基联苯胺为显色剂,采用免疫组织化学方法检测实验组和对照组肌腱的血管生成情况。具体步骤如下:将收集的肌腱组织样本放入4%多聚甲醛中过夜固定后行脱水、浸蜡、包埋及切片。将切片在70℃烘箱内烘烤约3 h后放入二甲苯中脱蜡,放入梯度浓度乙醇中进行水化。将切片放入浓度为0.01 mol/L (pH值为6)的柠檬酸缓冲液中,并置入蒸汽锅加热约20 min。为了完成内源性过氧化物酶阻断,将其放入3%过氧化氢溶液中浸泡约10 min。将一抗(CD31, Abcam, 美国)滴加在载玻片上并置入湿盒中。在4℃条件下包裹保鲜膜过夜,用PBS清洗3次以去除多余的抗体。滴加二抗进行孵育,再使用蒸馏水清洗多余二抗,使用DAB显色。用苏木精

复染,并用蒸馏水洗净。梯度浓度乙醇脱水后在二甲苯中透明,中性树胶封片后置于阴凉处晾干。使用显微镜观察和拍照。

1.4 透射电子显微镜观察肌腱胶原纤维

将处理后第10日和第20日大鼠肌腱组织样本放入2.5%戊二醛中固定,使用1%的锇酸-PBS固定溶液处理2 h。用PBS对其漂洗2次,每次15 min。依次在30%、50%、70%浓度乙醇中梯度脱水15 min,再用70%乙醇(含有3%醋酸双氧铀)染15 min。依次在80%、95%、100%浓度乙醇中梯度脱水15 min。用环氧丙烷置换2次,每次15 min。进行浸透、包埋和切片处理。用枸橼酸铅电子染色后,在透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)下观察和拍照。使用KS400(3.0, Zeiss)图像分析软件进行统计分析。

1.5 蛋白质谱分析

1.5.1 蛋白提取与定量 肌腱组织总蛋白采用苯酚法提取,总蛋白浓度采用二辛可宁酸测定。根据定量的浓度,每个样品选取50 μg 蛋白质,使用胰蛋白酶(1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)消化。在Agilent Zorbax Extend RP色谱柱(5 μm , 150 mm \times 2.1 mm)和1100高效液相色谱(HPLC)系统(Agilent, 美国)上进行RP分离。RP分离梯度溶剂为流动相A(2%乙腈的HPLC水溶液)和流动相B(90%乙腈的HPLC水溶液)。胰蛋白酶肽以250 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速分离,并在210 nm处监测。共采样10 min,每分钟将洗脱液依次收集在单独的离心管中。

1.5.2 质谱分析 将分离获取的冻干肽用于配备Nanospray Flex源的Q-Exactive HF质谱仪(ThermoFisher)分析。样品在EASY-1200系统(ThermoFisher)上通过C18柱(50 cm \times 75 μm)上样和分离。用Spectronaut系统搜索样本蛋白质数据库中的原始数据,将半胱氨酸烷基化作为固定修饰,数据非依赖采集(data independent acquisition, DIA)数据、定量错误发现率(false discovery rate, FDR)设为0.01,蛋白、肽和肽谱匹配质谱图(peptide-spectrum matches, PSM)的FDR也均设为0.01。

1.6 生物信息学分析

使用R Studio 1.1.463软件进行统计分析和绘图。

将LC-MS/MS原始文件导入Spectronaut Pulsar软件进行搜库建库,使用Spectronaut Pulsar软件的“Analysis”模块,选择“+”新建分析;根据软件提示逐步完成参数设置,开始分析;分析完成后,进入“Report”模块导出定量数据。将表达值 $\geq 50\%$ 的蛋白样本保留,用同一组样品的均值填充缺失值 $\leq 50\%$ 的蛋白。通过log2转换和中位数归一化获得可信蛋白。基于获得的可信蛋白,选择2种不同标准计算样本之间的差值。在处理数据时,用1.5倍数变化评估样本之间某一蛋白表达水平倍数变化。

运用欧易生物有限公司的云平台(cloud.oebiotech.com)对差异表达蛋白进行GO和KEGG富集分析,并使用STRING数据库(<http://string-db.org>; version 11.5)对差异蛋白进行互作网络(protein-protein interaction, PPI)分析。

1.7 统计学分析

采用SPSS 22.0软件进行统计学分析。采用至少3个平行样本进行重复实验,所得数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。不同时间点不同组之间的胶原纤维直径的比较,采用最小显著差异事后检验和单因素方差分析, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

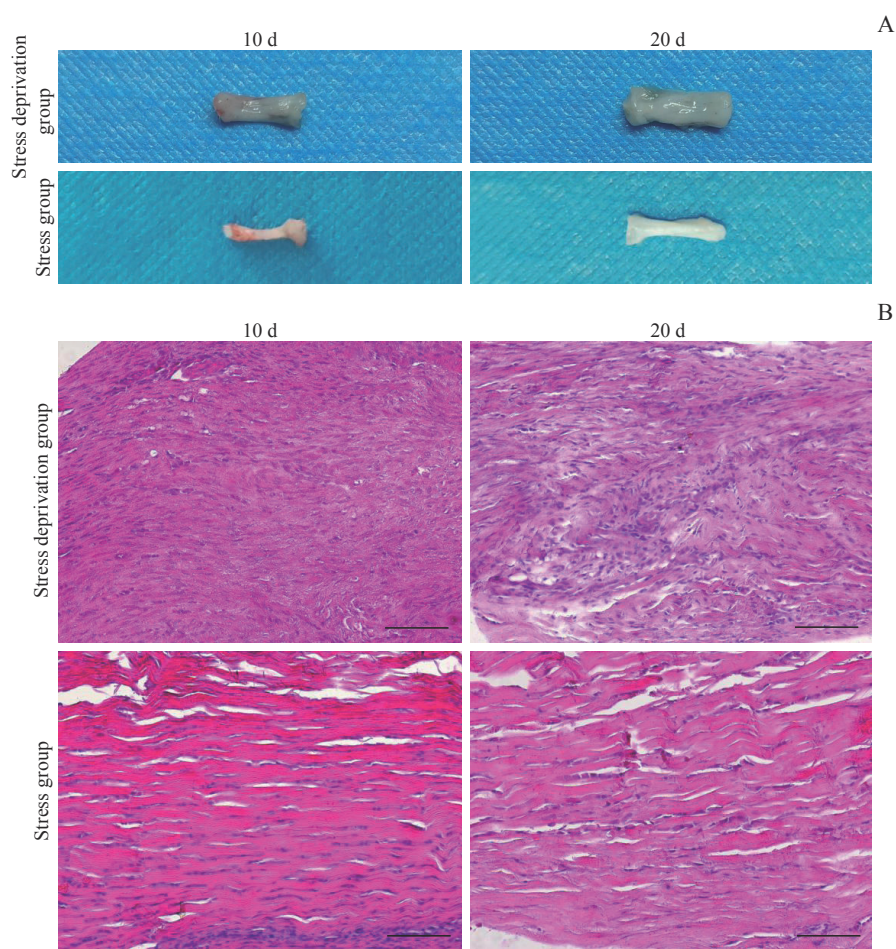
2.1 去应力后肌腱发育异常大体观

手术处理后第10日和第20日,大体观显示对照组肌腱外观呈白色,质韧纤细且有光泽,为富有弹性的致密结缔组织;实验组肌腱粗大,较对照组直径偏大,颜色偏深(图1A)。

H-E染色显示,实验组肌腱细胞在处理后第10日和第20日呈无序分布,出现杂乱无章且发育不成熟的胶原纤维;对照组肌腱细胞有序分布,出现平行排列且发育良好的胶原纤维,呈现出正常肌腱组织学结构(图1B)。

2.2 去应力后肌腱发育的组织学观察

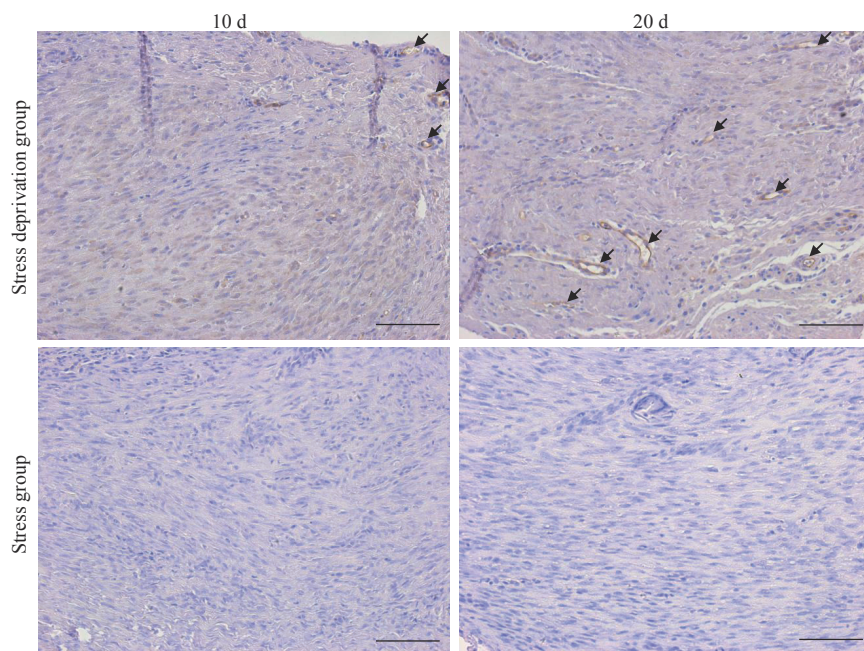
免疫组织化学(CD31)染色分析结果显示:与对照组相比,实验组肌腱组织中可见新生血管形成,呈现组织血管化倾向,主要发生在去应力后第20日的组织结构中(图2)。



Note: A. Macroscopic examination of tendon. B. H-E staining of tendon (Scale bars=200 μm).

图1 应力和去应力刺激的肌腱大体观和H-E染色观察

Fig 1 Gross view and H-E staining of tendon with and without mechanical loading



Note: Immunohistochemical staining images of CD31 (Scale bars=100 μm). The arrows showed CD31-stained vessels.

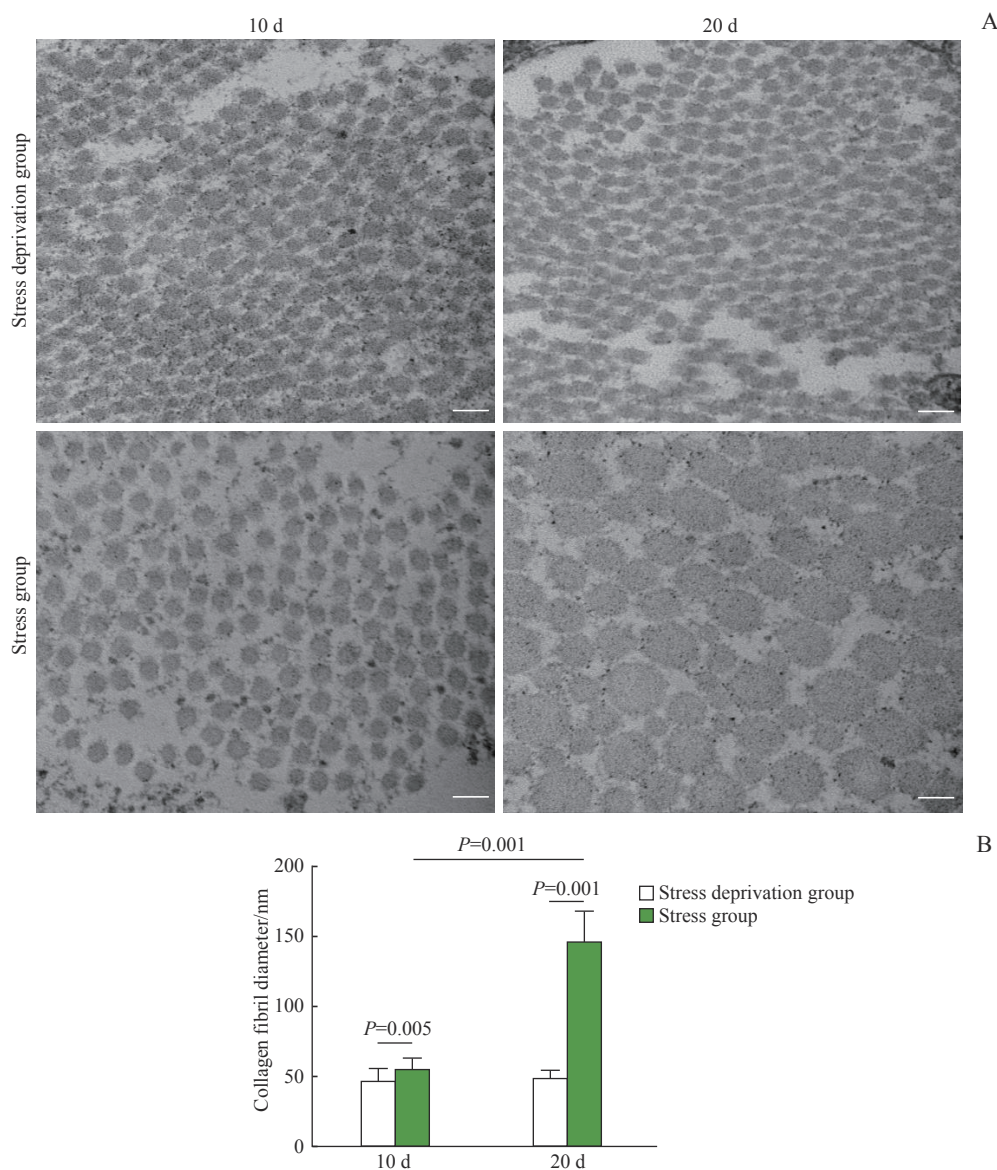
图2 去应力组肌腱的组织血管化

Fig 2 Tissue vascularization in stress-deprived tendon

2.3 去应力肌腱组织胶原纤维变化

TEM观察显示,实验组肌腱胶原在手术处理后第10日和第20日维持发育不良和直径细小的胶原纤维结构,2个时间点间无明显差异。对照组肌腱在手术处理后第10日呈现未成熟的纤细胶原纤维,

而至第20日时胶原发育良好,胶原纤维直径明显增大 ($P=0.001$),亦大于同时点实验组的胶原纤维直径 ($P=0.001$),且呈现出粗细相间的典型的肌腱胶原纤维的双极分布 (bipolar) 特征。详见图3。



Note: A. TEM of fibrils in tendon tissues (Scale bars=50 nm). B. Quantitative analysis of collagen fibril diameter.

图3 实验组和对照组肌腱胶原超微结构和胶原纤维直径比较

Fig 3 Ultrastructural comparison of tendon with and without mechanical loading and quantitative analysis of fibril diameters

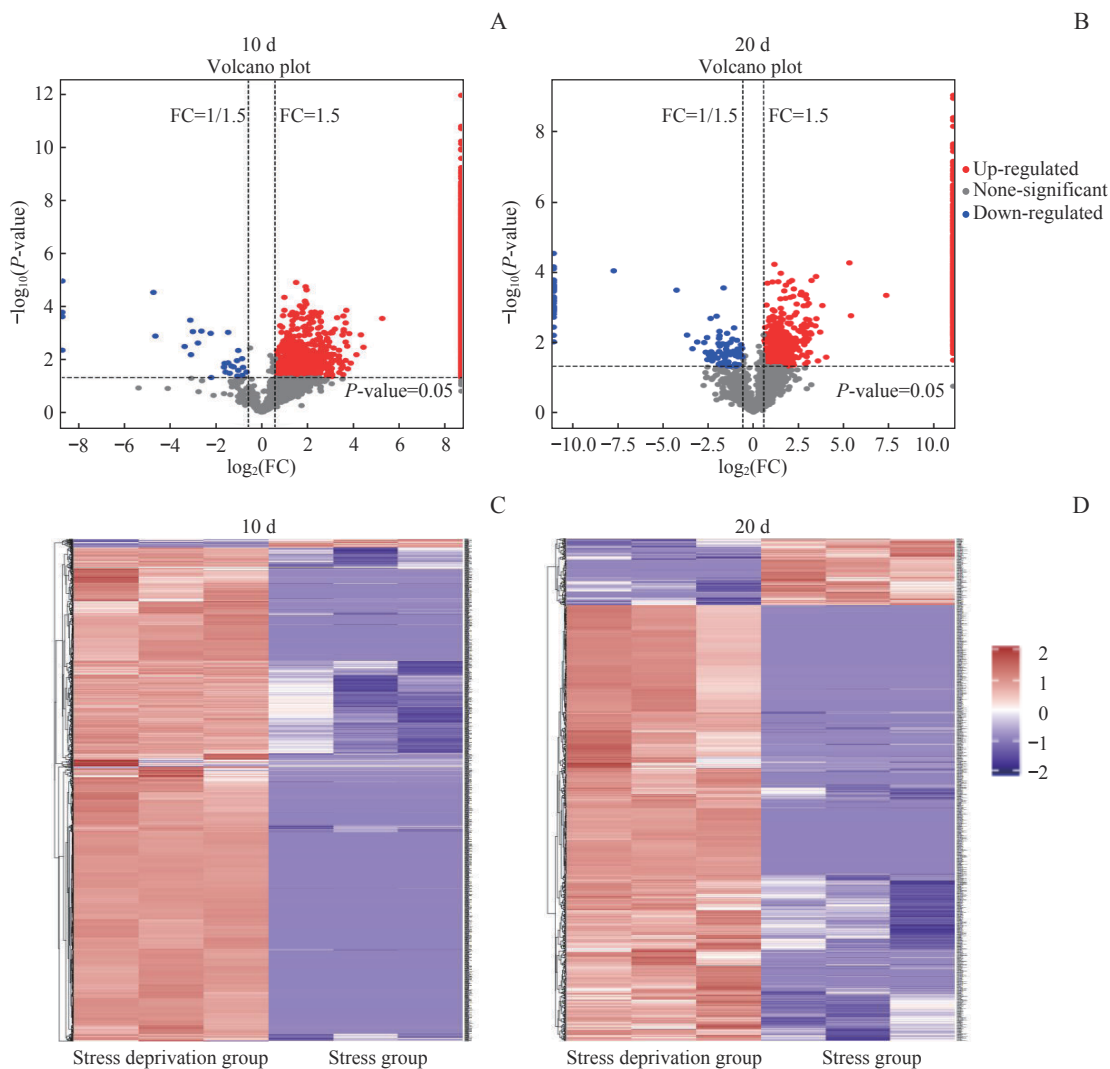
2.4 蛋白质质谱分析

在手术处理后第10日和第20日,对2组肌腱组织标本行蛋白质质谱分析,检测差异表达蛋白。火山图(图4A、B)显示:与对照组相比,实验组在处理第10日共鉴定出差异表达蛋白1 865种,其中1 835种蛋白上调,30种蛋白下调(图4A);在处理第20

日鉴定出差异表达蛋白965种,其中837种蛋白上调,128种蛋白下调(图4B)。差异表达蛋白分层聚类热图见图4C、D。

2.5 GO分析

在手术处理后第10日,分析实验组相对于对照



Note: A/B. Differentially expressed protein volcano maps on the 10th (A) and 20th (B) day. C/D. Differential expression cluster heat maps on the 10th (C) and 20th (D) day.

图4 去应力肌腱和应力刺激肌腱之间差异表达蛋白火山图和聚类热图

Fig 4 Volcanic diagram and cluster thermogram of differentially expressed proteins between tendons with and without mechanical loading

组上调的差异表达蛋白。GO分析结果(图5)显示:差异表达蛋白主要参与细胞内蛋白运输、蛋白质稳定性、mRNA剪接、蛋白质折叠、蛋白质导入细胞核等生物过程;主要分布于细胞质、核质、线粒体、含蛋白质复合物等部位;与相同蛋白结合、RNA结合、含蛋白质复合物结合、酶结合、肌动蛋白结合等分子功能密切相关。手术处理后第20日,GO分析结果与第10日情况相近,差异表达蛋白主要与蛋白合成相关(图5)。

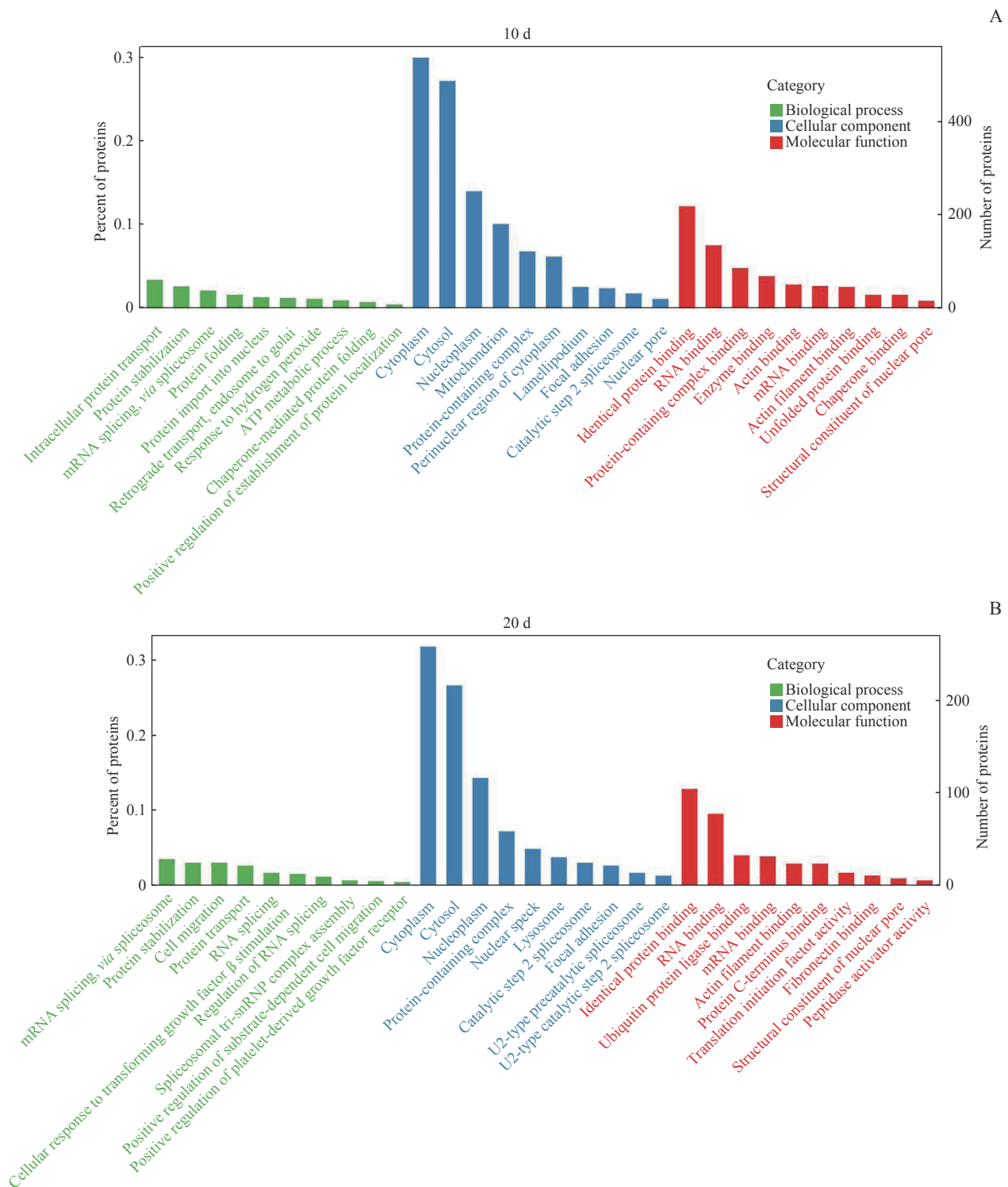
2.6 KEGG 分析

将手术处理后第10日和第20日上调差异蛋白分别进行KEGG通路富集,结果显示:处理后第10日富集到310条信号通路,处理后第20日富集到289条

信号通路。对2次富集到的信号通路进行筛选(图6),发现排名靠前的与肌腱胶原退行病理改变相关通路包括溶酶体、黏着斑、自噬、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)信号通路、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路、吞噬作用等通路。

2.7 蛋白PPI分析

PPI分析结果(图7)显示, α 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶1(Akt1)、热休克蛋白4(Hspa4)、热休克蛋白5(Hspa5)、延长因子2(Eef2)、蛋白质二硫键异构酶(P4hb)、心肌肌动蛋白 $\alpha 1$ (ACTC1)、T复合蛋白1亚单位 β (Cct2)、受体蛋白酪氨酸激酶



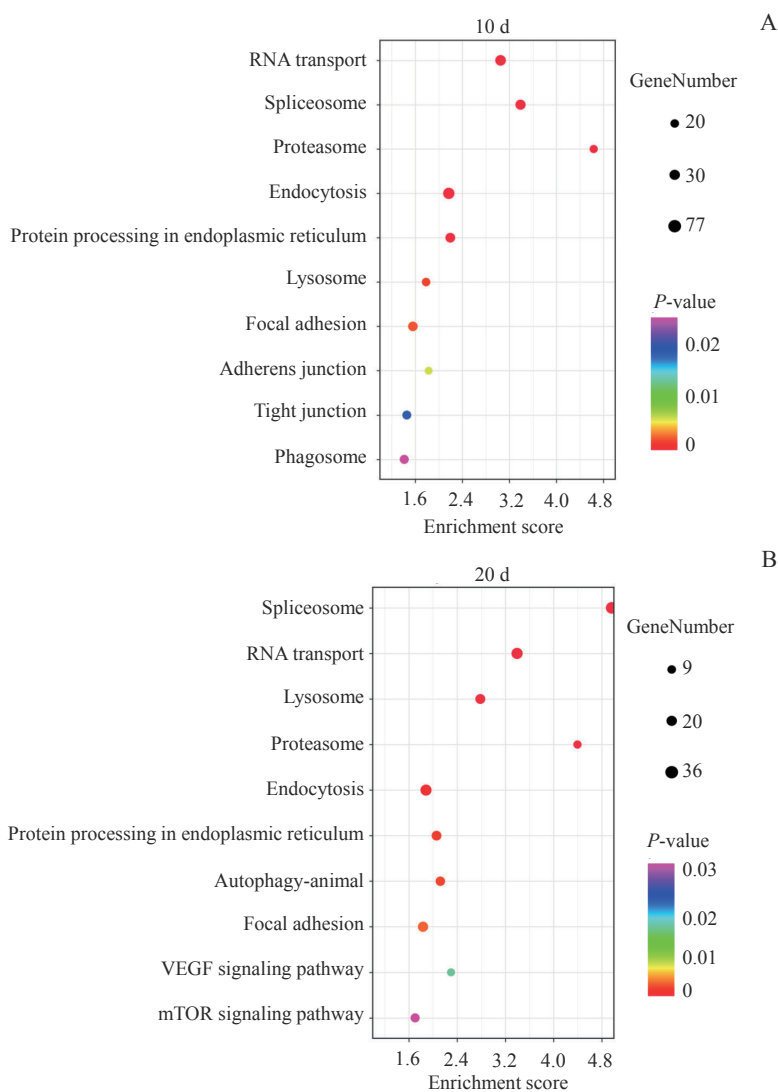
Note: A and B represent the differentially expressed protein GO analysis between stress deprivation and stress-stimulated tendons on the 10th and 20th day after surgery, respectively.

图5 去应力肌腱和力刺激肌腱之间差异蛋白GO分析

Fig 5 GO analysis of differentially expressed proteins between tendons with and without mechanical loading

(EGFR)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (Gapdh)、帕金森病蛋白7同源物 (Park7)、转化蛋白 (RhoA)、Rho 相关蛋白激酶 (ROCK) 等表达上调。其中 Akt1 与其他

蛋白相互作用最强烈, 度值最高, 主要富集于 PI3K-Akt 信号通路、mTOR 信号通路和黏着斑信号通路等。



Note: A and B represent KEGG analysis of differentially expressed protein between stress deprivation and stress-stimulated tendons on the 10th and 20th day after surgery, respectively.

图6 去应力肌腱和应力刺激肌腱之间差异蛋白的KEGG分析

Fig 6 KEGG analysis of differentially expressed proteins between tendon with and without mechanical loading

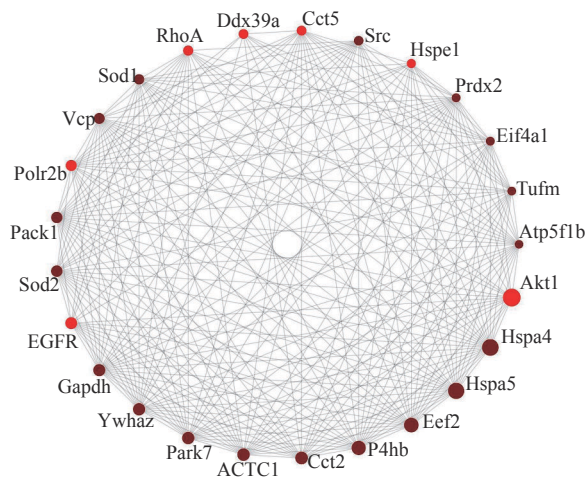


图7 去应力肌腱和力刺激肌腱之间差异蛋白的PPI分析

Fig 7 PPI analysis of differential proteins between tendon with and without mechanical loading

3 讨论

肌腱具有生物力学敏感特性，机械力刺激对肌腱发育和功能维持至关重要，对ECM的稳态和维持起着十分重要的作用。肌腱断裂或局部微创伤后，即失去应力刺激后，会导致肌腱组织的蛋白分解，组织结构和力学性能严重恶化^[3]。肌腱去应力退化性变的动物模型较为罕见，目前肌腱外植体提供了一种组织模型来研究肌腱退化机制^[4]，但同样具有局限性。主要是因为已经发育成熟的肌腱要通过去应力造模形成退化性病理改变，通常需要长期的应力刺激限制，动物造模存在一定的困难，而肌腱外植体又难以完全模拟内环境作用。相对而言，发育

过程中的肌腱对于失应力刺激较为敏感。在前期工作中,我们将新生大鼠失应力刺激肌腱与正常应力刺激肌腱比较,发现了力学刺激促进肌腱发育和胶原成熟的重要机制^[5]。

本研究采用同样的模型探索正常发育肌腱失去应力刺激后的病理改变及相关机制,以进一步探究失应力刺激导致肌腱退行性变的病理机制。本研究结果显示,失去力学刺激后,肌腱组织停止发育并发生退行性变,表现为组织血管化、组织结构紊乱和缺乏排列有序的胶原纤维。肌腱超微结构观察也显示了失应力肌腱的胶原纤维直径纤细、发育不成熟和缺乏粗细相间的双极分布特征。

为了进一步研究失应力导致退行性变的相关机制,本研究通过蛋白组学和生物信息分析探索相关的分子机制。结果发现,这些退行性病理改变涉及的主要机制包括血管化、细胞自噬、组织溶解和纤维化等。具体而言,在无机机械力存在的肌腱组织中,Akt1、Hspa4、Hspa5、Eef2、Actc1、Rhoa等多种蛋白表达上调,其中Akt1与其他蛋白相互作用最强烈,主要富集于PI3K-Akt信号通路、mTOR信号通路等。

Akt1属于类丝氨酸/苏氨酸激酶,主要参与细胞的生存通路和生长控制,可促进肿瘤细胞过度增殖^[6-7]以及血管生成^[8]。作为PI3K-Akt-mTOR信号通路中的关键位点,可调控mTOR,为一种保守的丝/苏氨酸蛋白激酶。mTOR信号通路是调控生物体内蛋白质合成、细胞代谢和生长的重要途径^[9]。mTOR蛋白通过与不同的配体相互作用,形成2个不同的信号复合物mTORC1和mTORC2。在间充质干细胞诱导肌腱分化模型中,mTORC1信号通路被激活,肌腱标志蛋白Tnc、Tnmd、Collagen I表达增高^[10]。在肌腱内特异性敲除mTOR和raptor均导致小鼠肌腱发育不良,胶原纤维直径变小^[11]。尽管mTOR信号通路的激活可促进肌腱的发育,但mTOR的高度活化也可导致肌腱发育不正常。本实验也发现,在失去力学刺激后,尽管肌腱细胞合成并分泌ECM的能力增强,但所形成的胶原纤维排列紊乱,承受外力作用差。这提示,在去应力后,肌腱组织中AKt表达上调并过度激活mTOR信号通路,可能是导致肌腱发育不正常的一个内在因素。相关研究^[12]也表明,mTOR与肌腱退行性病变相关,使用mTOR的抑制剂雷帕霉素可改善衰老导致的肌萎缩、骨质疏松,以及肌腱退行性病变。

RhoA是一种小GTP蛋白,Rho家族的重要一员,具有机械敏感性。机械牵伸可使其激活而产生生物学效应,引起细胞骨架重组,促进细胞骨架装配,转导力学信号,最终影响各种基因的表达^[13]。RhoA是化学信号和力信号传递过程中的共同信号分子,起着交通枢纽的作用^[14],参与调节ERK、JNK、NF- κ B等信号通路,还可通过调节应力纤维聚合介导黏着斑的形成与黏着斑激酶(FAK)信号通路相互作用,并进一步引起下游的反应^[15]。ROCK是RhoA家族主要的下游受体,有2种亚型(ROCK I和ROCK II),广泛参与细胞黏附、增殖、代谢、凋亡及细胞周期的调节等。当受到外界应力时,RhoA/ROCK可通过调节肌动蛋白和肌球蛋白,导致干细胞形状变化,使干细胞向不同方向分化^[16]。有研究表明,在机械牵伸诱导骨髓间充质干细胞向成骨细胞表型分化过程中,RhoA/ROCK是重要的调节因子,参与介导细胞骨架肌动蛋白的组装、细胞形态及软骨细胞相关基因的表达^[17]。本研究中蛋白组学分析也显示,在失去力学刺激的肌腱中RhoA、ROCK蛋白表达上调,主要富集于肌动蛋白细胞骨架的调节、紧密连接等与细胞外力信号转导相关的信号通路。这提示,在无外力刺激情况下,RhoA、ROCK蛋白的表达上调可激活细胞内多条信号通路,促使肌腱干细胞向成骨方向分化,进而阻碍肌腱的发育与成熟。

ACTC1是心肌肌动蛋白 $\alpha 1$,由位于染色体15q13~q21的ACTC1基因编码。作为一种细胞骨架蛋白,除了其经典功能即参与肌肉收缩,ACTC1也参与了细胞其他的生理功能,如染色体形态的基因转录、细胞周期调控、调节各种膜反应、调节酶的活性和细胞内定位,以及细胞凋亡^[18]。本研究结果显示,在失去力学刺激情况下,肌腱中ACTC1蛋白表达显著上调,其主要富集于与肌肉生长发育相关的信号通路。有研究表明,ACTC1基因可参与早期肌生成,对胚胎期肌肉的生长发育起着重要的作用。当ACTC1基因表达下调,可导致心肌细胞凋亡增加,肌肉发育障碍,进而导致各种心脏畸形^[19]。也有研究发现,ACTC1促进牛成肌细胞和前脂肪细胞的分化,进而影响成肌细胞的增殖^[20]。以上研究提示,在失去力学的情况下,肌腱组织中表达上调的ACTC1可能通过激活体内与肌肉生长发育相关的多条信号通路,促使肌腱干细胞向成肌方向分化,进而影响肌腱的分化与发育。

VEGF 主要包括 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E (病毒编码) 和牛胎盘生长因子 (PLGF), 通过结合和激活表现出酪氨酸激酶活性的膜受体发挥功能, 其主要功能是促进血管生成、增加血管通透性、促进细胞迁移等^[21]。虽然新生血管供应或血管生成对内环境稳态十分重要, 但研究表明血管失调和不受控制的血管生长可促进多种疾病进展^[22]。本研究中, KEGG 分析发现去应力刺激后, VEGF 信号通路表达增强, 提示肌腱组织血管化程度增强。有研究^[23]显示血管生成在退行性肌腱疾病中起作用。本实验大体观和免疫组织化学检测的结果也印证了此发现。TEMPFER 等^[24]研究表明, 肌腱细胞中 VEGF-D 介导的信号转导通路参与肌腱退行性过程。有研究^[25]发现, 在正常成人肌腱中, VEGF 的表达大多受到抑制, 而在慢性过度使用的肌腱中, VEGF 的表达在过度使用过程的早期和后期显著增加。PETERSEN 等^[26]通过实验发现绵羊的跟腱肌腱切断后, VEGF 表达增加。也有研究^[27]表明, 肌腱细胞在损伤反应中上调 VEGF, 因此认为 VEGF 可能是诱导新生血管形成的肌腱变性复杂过程中关键分子。综上, 去应力情况下, VEGF 信号通路表达增强, 引起血管过度增生, 可能是引起肌腱退化的关键因素。

本研究结果还显示, 去应力刺激后, 自噬或者吞噬可能影响胶原组装。溶酶体是一种分解代谢细胞器, 可通过自噬降解细胞成分, 如蛋白质复合物和细胞器。自噬被认为是一种自我消化过程, 使细胞通过溶酶体降解回收不必要的或功能失调的成分, 在维持细胞内稳态以及细胞对外界刺激的重塑中起着重要作用^[28]。自噬具有保护作用, 可促进肌腱细胞的存活^[29]。研究表明, 螺内酯通过 NF- κ B/MAPK 途径调节大鼠腱源干细胞的自噬, 改善衰老和钙化^[30]。自噬可通过抑制活性氧的过量产生来保护 PC12 细胞免受三聚氰胺诱导的细胞死亡^[31]。越来越多的证据表明自噬可调节干细胞的自我更新、分化和体细胞重编程^[32-33]。自噬也与细胞凋亡密切相关, 其会导致细胞生存所必需的蛋白质和细胞器降解, 最终导致细胞死亡, 即可调节程序性死亡过程^[34-35]。本实验也发现自噬可能是肌腱退化的因素之一, 说明了自噬在肌腱细胞凋亡过程中起重要作用。

有报道认为细胞凋亡和自噬与人肩袖撕裂中 ECM 的损伤程度呈正相关^[36]; 也有研究表明肥大细胞可通过吞噬胶原, 影响胶原重塑^[37]。基于这种认识, 在断裂的肌腱中, 自噬也可能以相同的机制引起肌腱退化。

综上, 本研究采用切断肌腱模型模拟失应力刺激导致的肌腱退行性变, 蛋白组学和生物信息分析结果揭示了可能的分子机制, 包括强化的组织血管化过程和组织纤维化, 可能通过 VEGF、mTOR、细胞自噬等通路介导, 最终导致肌腱的退行性变如肌腱组织结构破坏、胶原发育停滞和组织纤维化血管化等病理改变。本研究的发现有可能进一步揭示失力学刺激导致肌腱退行性变的分子机制, 为相关的治疗策略发展提供参考。

利益冲突声明/Conflict of Interests

所有作者声明不存在利益冲突。

All authors disclose no relevant conflict of interests.

伦理批准和动物权利声明/Ethics Approval and Animal Right

本研究涉及的所有动物实验均已通过上海交通大学动物伦理审查委员会批准 (HKDL-2018-234)。所有实验过程均遵照《上海交通大学医学院实验动物相关规章制度》的条例进行。

All experimental animal protocols in this study were reviewed and approved by The Animal Ethics Review Committee of Shanghai Jiao Tong University (Approval Letter No. A-2018-021), and all experimental animal protocols were carried out by following the guidelines of *Rules and Regulations for Experimental Animals of Shanghai Jiao Tong University School of Medicine*.

作者贡献/Authors' Contributions

李清林、刘伟、王文波负责实验思路构思; 刘伟完成实验设计及核实; 李清林和王文波完成数据分析与整理; 李清林完成初稿编撰; 刘伟和王文波完成初稿的审阅和修改。所有作者均阅读并同意了最终稿件的提交。

LI Qinglin, LIU Wei and WANG Wenbo were responsible for conceptualization. Experimental design and verification were done by LIU Wei. Data analysis and collation were done by LI Qinglin and WANG Wenbo. Original draft was written by LI Qinglin. Manuscript review and editing were done by LIU Wei and WANG Wenbo. All the authors have read the last version of paper and consented for submission.

• Received: 2023-01-03

• Accepted: 2023-04-28

• Published online: 2023-05-28

参·考·文·献

- [1] WANG J H. Mechanobiology of tendon[J]. *J Biomech*, 2006, 39(9): 1563-1582.
- [2] HEO S J, SZCZESNY S E, KIM D H, et al. Expansion of mesenchymal stem cells on electrospun scaffolds maintains stemness, mechano-responsivity, and differentiation potential[J]. *J Orthop Res*, 2018, 36(2): 808-815.
- [3] FRIZZIERO A, FINI M, SALAMANNA F, et al. Effect of training and sudden detraining on the patellar tendon and its enthesis in rats[J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2011, 12: 20.
- [4] WUNDERLI S L, BLACHE U, BERETTA PICCOLI A, et al. Tendon response to matrix unloading is determined by the pathophysiological niche[J]. *Matrix Biol*, 2020, 89: 11-26.
- [5] CHEN Z, ZHOU B, WANG X, et al. Synergistic effects of mechanical stimulation and crimped topography to stimulate natural collagen development for tendon engineering[J]. *Acta Biomater*, 2022, 145: 297-315.
- [6] SMYTH L M, TAMURA K, OLIVEIRA M, et al. Capivasertib, an AKT kinase inhibitor, as monotherapy or in combination with fulvestrant in patients with AKT1 E17K-mutant, ER-positive metastatic breast cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26(15): 3947-3957.
- [7] FUJIMOTO Y, MORITA T Y, OHASHI A, et al. Combination treatment with a PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitor overcomes resistance to anti-HER2 therapy in PIK3CA-mutant HER2-positive breast cancer cells[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 21762.
- [8] CHEN J, ZHANG X, LIU X, et al. Ginsenoside Rg1 promotes cerebral angiogenesis via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in ischemic mice[J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 856: 172418.
- [9] EL HIANI Y, EGOM E E, DONG X P. mTOR signalling: jack-of-all-trades[J]. *Biochem Cell Biol*, 2019, 97(1): 58-67.
- [10] CONG X X, RAO X S, LIN J X, et al. Activation of AKT-mTOR signaling directs tenogenesis of mesenchymal stem cells[J]. *Stem Cells*, 2018, 36(4): 527-539.
- [11] LIM J, MUNIVEZ E, JIANG M M, et al. mTORC1 signaling is a critical regulator of postnatal tendon development[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 17175.
- [12] ZASECK L W, MILLER R A, BROOKS S V. Rapamycin attenuates age-associated changes in tibialis anterior tendon viscoelastic properties[J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2016, 71(7): 858-865.
- [13] TUMMINIA S J, MITTON K P, ARORA J, et al. Mechanical stretch alters the actin cytoskeletal network and signal transduction in human trabecular meshwork cells[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1998, 39(8): 1361-1371.
- [14] SARASA-RENEO A, TUNÇ-CIVELEK V, CHIQUET M. Role of RhoA/ROCK-dependent actin contractility in the induction of tenascin-C by cyclic tensile strain[J]. *Exp Cell Res*, 2006, 312(8): 1361-1370.
- [15] RIDLEY A J, HALL A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors[J]. *Cell*, 1992, 70(3): 389-399.
- [16] TERAMURA T, TAKEHARA T, ONODERA Y, et al. Mechanical stimulation of cyclic tensile strain induces reduction of pluripotent related gene expressions via activation of Rho/ROCK and subsequent decreasing of AKT phosphorylation in human induced pluripotent stem cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 417(2): 836-841.
- [17] CHEN J C, JACOBS C R. Mechanically induced osteogenic lineage commitment of stem cells[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2013, 4(5): 107.
- [18] MATSSON H, EASON J, BOOKWALTER C S, et al. Alpha-cardiac actin mutations produce atrial septal defects[J]. *Hum Mol Genet*, 2008, 17(2): 256-265.
- [19] TSAO J, VERNET D A, GELFAND R, et al. Myostatin genetic inactivation inhibits myogenesis by muscle-derived stem cells *in vitro* but not when implanted in the mdx mouse muscle[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2013, 4(1): 4.
- [20] LI A, SU X, TIAN Y, et al. Effect of actin alpha cardiac muscle 1 on the proliferation and differentiation of bovine myoblasts and preadipocytes[J]. *Animals (Basel)*, 2021, 11(12): 3468.
- [21] FERRARA N, ADAMIS A P. Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2016, 15(6): 385-403.
- [22] CARMELIET P. Angiogenesis in health and disease[J]. *Nat Med*, 2003, 9(6): 653-660.
- [23] PUFE T, PETERSEN W J, MENTLEIN R, et al. The role of vasculature and angiogenesis for the pathogenesis of degenerative tendons disease[J]. *Scand J Med Sci Sports*, 2005, 15(4): 211-222.
- [24] TEMPFER H, SPITZER G, LEHNER C, et al. VEGF-D-mediated signaling in tendon cells is involved in degenerative processes[J]. *FASEB J*, 2022, 36(2): e22126.
- [25] PERRY S M, MCILHENNY S E, HOFFMAN M C, et al. Inflammatory and angiogenic mRNA levels are altered in a supraspinatus tendon overuse animal model[J]. *J Shoulder Elbow Surg*, 2005, 14(1 suppl s): 79S-83S.
- [26] PETERSEN W, VAROGA D, ZANTOP T, et al. Cyclic strain influences the expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) and the hypoxia inducible factor 1 alpha (HIF-1alpha) in tendon fibroblasts[J]. *J Orthop Res*, 2004, 22(4): 847-853.
- [27] PETERSEN W, PUFE T, UNTERHAUSER F, et al. The splice variants 120 and 164 of the angiogenic peptide vascular endothelial cell growth factor (VEGF) are expressed during Achilles tendon healing[J]. *Arch Orthop Trauma Surg*, 2003, 123(9): 475-480.
- [28] SANDRI M. New findings of lysosomal proteolysis in skeletal muscle[J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2011, 14(3): 223-229.
- [29] HU J, DING X, TIAN S, et al. TRIM39 deficiency inhibits tumor progression and autophagic flux in colorectal cancer via suppressing the activity of Rab7[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(4): 391.
- [30] XU K, LIN C, MA D, et al. Spironolactone ameliorates senescence and calcification by modulating autophagy in rat tendon-derived stem cells via the NF- κ B/MAPK pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 5519587.
- [31] WANG H, GAO N, LI Z, et al. Autophagy alleviates melamine-induced cell death in PC12 cells via decreasing ROS level[J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(3): 1718-1729.
- [32] PAN H, CAI N, LI M, et al. Autophagic control of cell 'stemness'[J]. *EMBO Mol Med*, 2013, 5(3): 327-331.
- [33] VESSONI A T, MUOTRI A R, OKAMOTO O K. Autophagy in stem cell maintenance and differentiation[J]. *Stem Cells Dev*, 2012, 21(4): 513-520.
- [34] MARIÑO G, NISO-SANTANO M, BAEHRECKE E H, et al. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(2): 81-94.
- [35] RYTER S W, MIZUMURA K, CHOI A M. The impact of autophagy on cell death modalities[J]. *Int J Cell Biol*, 2014, 2014: 502676.
- [36] WU B, CHEN J, DELA ROSA T, et al. Cellular response and extracellular matrix breakdown in rotator cuff tendon rupture[J]. *Arch Orthop Trauma Surg*, 2011, 131(3): 405-411.
- [37] ARBI S, EKSTEEN E C, OBERHOLZER H M, et al. Premature collagen fibril formation, fibroblast-mast cell interactions and mast cell-mediated phagocytosis of collagen in keloids[J]. *Ultrastruct Pathol*, 2015, 39(2): 95-103.

[本文编辑] 吴 洋

