

文章编号: 1004-7220(2022)02-0225-06

保存时间对兔髌韧带压缩力学性能的影响

刘力夫¹, 尹梦虹², 齐志明³, 王鹏⁴, 吴承伟¹, 张伟¹

(1.大连理工大学 工程力学系生物与纳米力学实验室,工业装备结构分析国家重点实验室,辽宁 大连 116024;

2.大连市中心医院 运动医学科,辽宁 大连 116033; 3.大连市骨科医院,辽宁 大连 116011;

4.大连西岗王鹏口腔诊所,辽宁 大连 116011)

摘要:目的 研究保存时间对兔髌韧带压缩力学性能的影响,以期为韧带的离体保存提供参考信息。方法 通过万能拉伸试验机,测试兔髌韧带在-20℃下经不同保存时间(36 d内)后的压缩力学性能,通过扫描电镜观察胶原纤维的微观形态,差示扫描量热法检测胶原纤维的热焓和变性温度。结果 随着保存时间的增加,髌韧带在40%应变下压应力由19 kPa增至112 kPa,随后降至57 kPa。扫描电镜下观察发现,胶原纤维交联先增强后减弱。差示扫描量热法结果显示,热焓由59.47 J/g增至67.10 J/g,随后降至54.43 J/g;而变性温度由67.62℃增至77.28℃,随后降至64.10℃。结论 兔髌韧带在-20℃下保存,随着保存时间的增加,韧带的抗压强度先增强后减弱。该变化可能是胶原纤维的交联程度差异所致,胶原纤维的交联越强,压缩力学性能越强。

关键词: 髌韧带; 保存时间; 力学性能; 胶原纤维

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2022.02.005

Effects of Storage Duration on Compressive Mechanical Properties of Rabbit Patellar Ligament

LIU Lifu¹, YIN Menghong², QI Zhiming³, WANG Peng⁴, WU Chengwei¹, ZHANG Wei¹

(1.State Key Laboratory of Structure Analysis for Industrial Equipment, Biomechanics and Nanomechanics Laboratory in Department of Engineering Mechanics, Dalian University of Technology, Dalian 116024, Liaoning, China; 2.Department of Sports Medicine, Dalian Municipal Central Hospital, Dalian 116033, Liaoning, China; 3.Dalian Orthopedic Hospital, Dalian 116011, Liaoning, China; 4.Dalian Xigang Wang Peng Dentistry Clinic, Dalian 116011, Liaoning, China)

Abstract: Objective To study the effect of storage duration on compressive mechanical properties of rabbit patellar, so as to provide references for *in vitro* ligament storage. **Methods** The compressive mechanical properties of rabbit patellar ligament stored at -20℃ at different storage durations (in 36 d) were tested with the universal tensile test machine. The microscopic morphology of collagen fibers was observed under the scanning electron microscopy (SEM). The enthalpy and denaturation temperature of collagen fibers were measured with differential scanning calorimetry (DSC). **Results** With the increase of storage duration, the compressive stress of the patellar ligament at 40% strain increased from 19 kPa to 112 kPa and then decreased to

收稿日期:2021-05-17; 修回日期:2021-06-25

基金项目:国家重点研发计划项目(2018YFA0704103,2018YFA0704104),辽宁省自然科学基金项目(2019-KF-02-01),中央高校基本科研业务
费项目(DUT20YG129)

通信作者:张伟,教授,博士生导师,E-mail: wei.zhang@dlut.edu.cn

57 kPa. SEM observation showed that the cross-linking of collagen fibers was initially strengthened and then weakened. DSC results showed that the enthalpy increased from 59.47 J/g to 67.10 J/g and then decreased to 54.43 J/g. The denaturation temperature increased from 67.62 °C to 77.28 °C and then decreased to 64.10 °C.

Conclusions When rabbit patellar ligament is stored at -20 °C, with the increase of storage duration, the compressive stress of rabbit patellar ligament at 40% strain increases at first and then decreases. This change may be due to the variation of cross-linking level of collagen fibers. The stronger the cross-linking of collagen fibers, the stronger the compressive mechanical properties will be.

Key words: patellar ligament; storage duration; mechanical properties; collagen fiber

韧带在肌肉骨骼系统中起着稳定关节和引导运动的作用,对关节运动十分重要。膝关节最前方的髌韧带也称髌腱,是股四头肌腱的延续部分,其中部1/3被认为是力学性能最强的部分^[1]。髌腱病是一种常见的临床退行性疾病,以髌韧带组织病理学的改变为主要特征^[2]。目前普遍认为,受力方式的改变使得髌韧带的结构发生病理性改变,从而导致髌韧带病变。髌韧带的发病率呈逐年升高的趋势,患者一般以年龄在14~40岁活跃人群为主,尤其是运动员^[3]。在篮球运动员和排球运动员中,髌韧带患病率分别高达32%和50%^[4]。髌韧带患病后脆性增加,断裂的可能性增加数倍^[5]。研究表明,韧带会受到侧向的压缩载荷,而频繁、超载的压缩都会导致韧带产生病变或断裂^[6-9]。此外,压缩载荷还可能改变韧带的结构,并导致韧带细胞外基质的结构和功能发生变化,使韧带组织发生适应性改变。因此,对髌韧带的压缩性能进行研究,对髌韧带的损伤预测和韧带替代材料评估具有参考意义。

出于安全性和伦理考虑,韧带的力学性能测试通常先从活体解剖出韧带,经低温冷冻保存,继而进行力学性能测试,故测试的力学性能都是经冷冻保存后样本的力学性能^[10-11]。然而,目前保存方法千差万别,无统一标准。Salisbury等^[7]解剖出韧带后放入-18 °C冰箱保存;Danto等^[12]将整只后肢用生理盐水纱布包裹,保存在-20 °C环境中,直到实验前解冻,并解剖出韧带进行试验。Quirk等^[13]将小鼠足部浸泡在生理盐水溶液里,在-80 °C环境下保存,实验前解剖出跟腱。生物样本的保存方式和保存时间通常会对材料的性质和结构产生影响。研究表明,冷冻保存时间对韧带力学性能具有较大影响。Goh等^[14]在冷冻保存1 d后发现,鼠尾肌腱抗拉强度和刚度会增加。而Giannini等^[15]发现,人体

胫骨后肌腱在保存30 d后,极限载荷和伸长率有所降低,但刚度增加。Ng等^[16]在生理盐水中保存鸡指深屈肌腱,结果发现,其力学性能呈先升高(170 d达到峰值)后降低的趋势。但低温保存时间对韧带压缩力学性能的影响规律及其生物学机制还鲜有文献报道。因此,本文研究保存时间对兔髌韧带压缩力学性能的影响,并分析生物学机制,为韧带的保存方法提供参考。

1 材料与方法

1.1 样本准备及处理

所采用的髌韧带样本取自母新西兰兔,10月龄,体重2 kg,由大连医科大学提供。经过预实验得知,左右腿的力学性能并无差异,故忽略左右腿的影响。兔处死后,将其后肢切下,保存在-20 °C冰箱里,经过不同的保存时间(0、1、3、6、18、36 d)后,在室温下自然解冻12 h。用手术刀切出髌韧带中1/3部分,在远离近骨端的中间部位,小心切割出用于压缩实验的方形样本(见图1)。

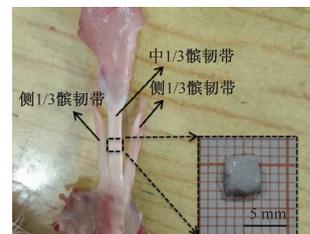


图1 髌韧带样本

Fig.1 Sample of patellar ligament

由电子游标卡尺测量(精度为0.01 mm)样本的长度和宽度,由于样本厚度较小(一般只有1 mm),为避免人为误差,采用Williams等^[9]的测量方式。实验采用MTS静态万能材料试验机(Criterion.43.104, MTS公司,美国)。

1.2 扫描电镜观察

通过扫描电镜(Quanta 200, FEI 公司, 荷兰)观察韧带经不同保存时间后的微观形态, 韧带经过4%戊二醛固定12 h后, 分别在30%、60%、90%、100%浓度酒精下依次脱水, 每次脱水15 min。随后将样本放入液氮中冷冻15 min, 待韧带完全冷却后沿其矢状面迅速脆断, 并放入真空冷冻干燥机干燥12 h。将韧带表面镀金, 放入扫描电镜中, 对其断面的微观形貌进行高分辨率成像。

1.3 差示扫描量热法

通过差示扫描量热仪(Q2000, 耐驰公司, 德国)检测韧带经不同保存时间后的热焓和变性温度的变化, 采用氮气环境保护, 以维持样本测试环境的稳定性。样本种类及取样位置和力学实验一致, 保存时间选取0、1、3、6、18、36 d, 在-20 ℃下保存, 每个保存时间有5个重复样本。研究表明, 髌韧带中的胶原蛋白在70 ℃左右会发生变性^[17]。因此, 差示扫描量热法的测试条件为从20 ℃升温至100 ℃, 升温速率为5 ℃/min。

2 结果

2.1 保存时间对力学性能影响

为探究保存时间对髌韧带压缩力学性能的影响, 分别对保存0、1、3、6、18、36 d的兔髌韧带进行单轴无侧限压缩实验, 每组保存时间有6个独立重复样本。结果表明, 不同保存时间下韧带的应力-应变关系具有相同趋势, 压应力随应变的增加表现出明显的非线性升高。在低应变水平(即10%左右)下, 压应力不超过5 kPa, 重复样本曲线之间的差别很小; 在应变超过20%后, 压应力呈现快速升高趋势。由兔髌韧带保存时间为0 d的压缩曲线可知, 在应变为10%时, 韧带的应力很小, 只有不到2 kPa; 当应变超过20%以后, 应力曲线开始加速上升, 最终在应变为40%时, 应力达到15 kPa左右[见图2(a)]。由保存1、3 d的兔髌韧带压缩曲线可见, 在应变为40%时, 应力分别达到60、90 kPa, 明显高于新鲜韧带[见图2(b)、(c)]。由保存时间为6、18 d的兔髌韧带压缩曲线可见, 当应变为40%时, 应力分别为70、40 kPa; 相比保存时间为3 d的韧带, 应力出现下降趋势。由保存时间为36 d的兔髌韧带压缩曲线可见, 当应变为40%时, 应力达到

40 kPa; 相比保存时间为18 d的韧带, 应力几乎一致[见图2(f)]。

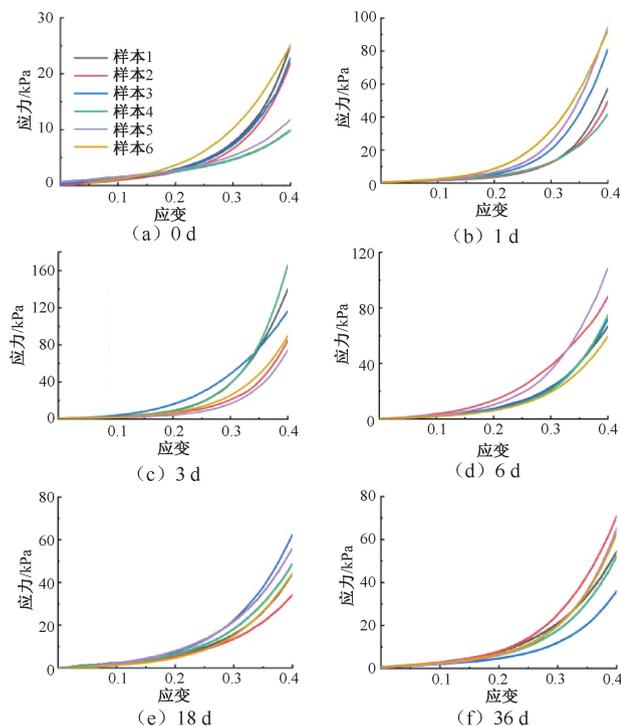


图2 不同保存时间下韧带压缩应力-应变曲线

Fig.2 Compressive stress-strain curves of ligament at different storage durations (a) 0 d, (b) 1 d, (c) 3 d, (d) 6 d, (e) 18 d, (f) 36 d

通过力学实验发现, 韧带压缩响应呈非线性, 和Williams等^[9]观察到的韧带压缩现象一致, 推测原因是随着应变的增加, 韧带纤维之间的间隙减少, 纤维更加紧凑, 宏观表现为韧带硬化。此外, 髌韧带在压缩到50%应变时便会发生破坏。因此, 可以取40%应变下的应力 $\sigma_{40\%}$ 作为髌韧带压缩力学性能的参考依据。提取韧带经不同保存时间后的 $\sigma_{40\%}$, 计算均值和标准差。

为从统计学上进一步说明髌韧带压缩力学性能的变化趋势, 通过SPSS对每条均值曲线 $\sigma_{40\%}$ 进行统计学分析, 采用非配对t检验方法, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。结果发现, 0 d组和1 d组之间、1 d组和3 d组之间韧带 $\sigma_{40\%}$ 差异显著($P < 0.05$), 表明在0~3 d韧带 $\sigma_{40\%}$ 有显著的增加趋势, 且在第3天达到峰值。3 d组和6 d组、6 d组和18 d组之间韧带 $\sigma_{40\%}$ 差异显著($P < 0.05$), 表明髌韧带的压缩力学性能在3~18 d随保存时间增加

呈显著的降低趋势。18 d 组和 36 d 组之间韧带 $\sigma_{40\%}$ 没有显著差异 ($P>0.05$), 表明髌韧带的压缩力学性能从 18 d 以后开始平稳。因此, 髌韧带在保存 36 d 内, 其压缩力学性能有着显著性的先增强后降低, 随后稳定的变化趋势 (见图 3)。

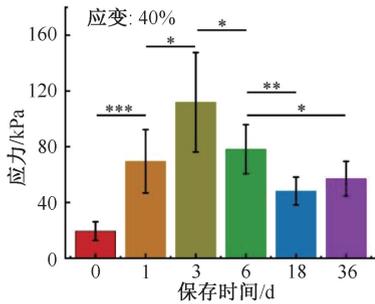


图 3 不同保存时间下 $\sigma_{40\%}$ 对比

Fig.3 Comparison of $\sigma_{40\%}$ at different storage durations

注: * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$ 。

2.2 胶原纤维的微观形态

通过扫描电镜 (scanning electron microscopy, SEM) 从微观尺度对压缩前的髌韧带进行定性观察。由不同保存时间下髌韧带矢状面结构的电镜照片可见, 新鲜韧带的纤维结构散乱, 方向发散, 纤维之间有大量空隙; 保存 1 d 后, 韧带纤维变得紧密, 纤维间空隙减小; 保存 3 d 后, 韧带纤维进一步聚合; 保存 6 d 后, 纤维开始变得松散, 纤维间空隙变大, 同时纤维不完整, 发生如 Liu 等^[18] 所看到的胶原水解现象; 保存 18、36 d 后, 韧带开始变得脆弱, 纤维弯曲, 缺陷明显, 结构破坏严重 (见图 4)。

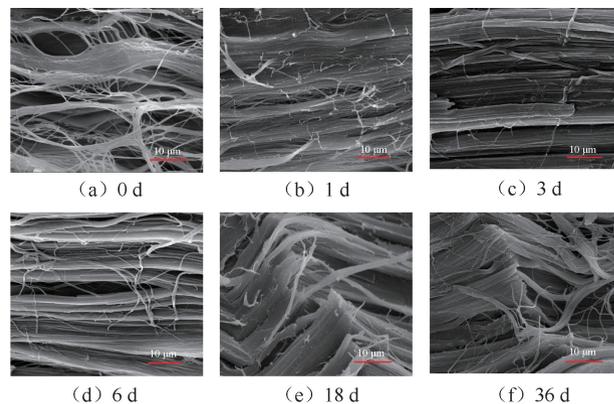


图 4 不同保存时间下压缩前髌韧带扫描电镜照片 (标尺 = 10 μm)

Fig.4 SEM photograph of patellar ligaments before compression at different storage durations (a) 0 d, (b) 1 d, (c) 3 d, (d) 6 d, (e) 18 d, (f) 36 d

2.3 胶原纤维的交联程度

作为韧带的基本组成部分, 胶原纤维的结构直接影响韧带的力学性能^[19]。胶原纤维的结构变化可以通过差示扫描量热法 (differential scanning calorimetry, DSC) 表征。Miiles 等^[20] 利用 DSC 检测马指浅屈肌腱的热焓及变性温度。Mintál 等^[21] 利用 DSC 检测冷冻保存后人髌韧带热焓和变性温度的变化。研究表明, 热焓降低是因为胶原纤维的解聚和变性^[20]。热焓越低, 胶原纤维降解程度越高。变性温度代表胶原纤维的热稳定水平, 变性温度越高, 胶原纤维的结构越稳定^[22]。

为此, 通过 DSC 对不同保存时间髌韧带的热焓和变性温度进行定量检测。不同保存时间髌韧带的原始 DSC 曲线如图 5 所示。

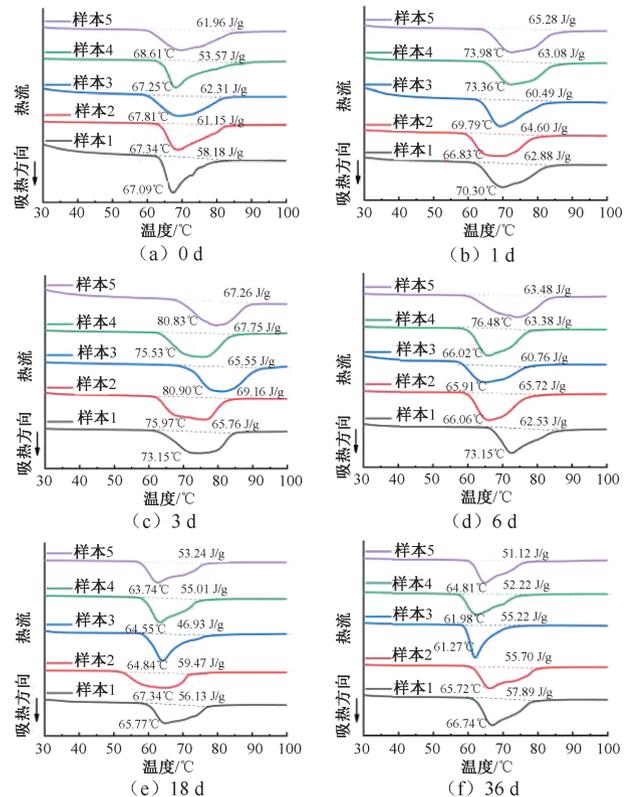


图 5 不同保存时间韧带 DSC 曲线

Fig.5 DSC curves of ligament after different storage durations

(a) 0 d, (b) 1 d, (c) 3 d, (d) 6 d, (e) 18 d, (f) 36 d

由于纵坐标热流的绝对值与韧带热焓和变性温度无关, 故舍弃绝对值, 取适当间距将重复样本曲线放入同一坐标, 其中热焓值取相变峰的面积 (即虚线和 DSC 曲线围绕区域的面积) 进行积分计

算得到,变性温度取 DSC 曲线峰值点对应的温度。韧带曲线下降时代表韧带吸热。

将不同保存时间下韧带的热焓和变性温度分别取均值,计算标准差。可以看到,随保存时间的增加,韧带热焓和变性温度在保存 0~3 d 呈增加的趋势,随后开始降低,在 18 d 以后趋于平稳。为从统计学上验证不同保存时间下髌韧带热焓和变性温度的变化趋势,通过 SPSS 进行差异显著性分析,采用非配对 t 检验方法, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。结果表明,0 d 组和 1 d 组、1 d 组和 3 d 组之间韧带热焓有显著性差异($P<0.05$),表明韧带在保存 3 d 内,胶原纤维的聚合程度随着保存时间的增加而显著上升。韧带热焓在 3 d 组和 6 d 组、6 d 组和 18 d 组之间有显著性差异($P<0.05$),表明此段时间内胶原纤维开始解聚,胶原蛋白水解;韧带热焓在 18 d 组和 36 d 组之间没有显著性差异($P=0.904$),证明此段时间胶原纤维聚合程度趋于稳定。髌韧带经不同时间保存后的变性温度,除 18 d 组和 36 d 组之间的变性温度没有显著性差异($P=0.391$),其余相邻保存时间组之间的变性温度差异显著($P<0.05$)。该结果表明,韧带在保存 3 d 内,随着保存时间的增加,胶原纤维开始交联,其热稳定水平显著增加,随后交联程度降低,在 18 d 后逐渐稳定(见图 6)。

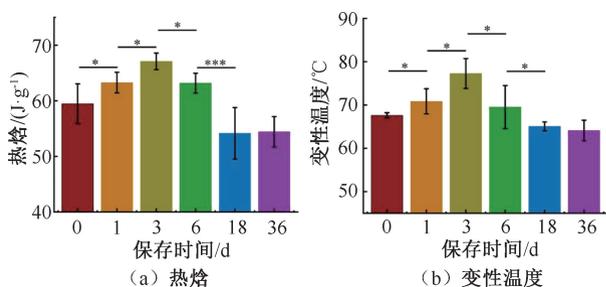


图 6 不同保存时间髌韧带力学性能比较

Fig. 6 Comparison of mechanical properties for patellar ligament at different durations (a) Enthalpy, (b) Denaturation temperature

注: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

3 讨论

本文研究了不同保存时间对兔髌韧带压缩力学性能的影响。结果显示,髌韧带从新鲜组织中取出并在 -20°C 冷冻保存的 36 d 里,髌韧带的抗压强

度在前 3 天呈逐渐增强的趋势,在第 3 天达到峰值,随后开始降低,并在第 18 天后趋于稳定。为探究髌韧带力学性能变化的生物学机制,通过 SEM 和 DSC 分析样品。

SEM 观察发现,随着保存时间的增加,韧带纤维在前 3 天发生聚合,这可能是由于胶原纤维发生交联,使得纤维聚合,结构紧凑,同时宏观上使得韧带压缩力学性能增强;随后胶原纤维解聚,结构松散,胶原蛋白开始水解,宏观上韧带的压缩性能开始下降,在保存 18 d 以后,韧带纤维已产生明显的缺陷。

DSC 结果则进一步验证,随着保存时间的增加,胶原纤维的变性温度和热焓在前 3 天均呈升高的趋势,表明胶原纤维的交联聚合程度在前 3 天随保存时间增加而逐渐增强。随后变性温度和热焓下降,表明胶原纤维开始解聚,并在第 18 天后达到稳定。结合 SEM 下的微观形貌,说明胶原纤维的交联聚合程度可能是影响韧带压缩力学性能的原因。

关于冷冻保存对韧带胶原纤维的影响,Tsuchida 等^[23]研究发现,在液氮下保存 18 d 后,韧带纤维的直径增加。Giannini 等^[15]研究表明,在 -80°C 保存 30 d 后韧带纤维的直径增加。而本实验并没有发现纤维直径的变化,推测是保存温度不同造成的差异。Goh 等^[24]研究认为,冷冻保存会影响胶原周围的离子浓度和 pH 值,而离子浓度的变化会影响溶液中胶原的变性温度。因此,本实验胶原纤维变性温度的变化可能是由于冷冻保存导致离子浓度发生变化,从而影响胶原纤维的变性温度。而冷冻过程中韧带胶原蛋白和水之间氢键的形成,则可能是造成胶原纤维交联从而导致热焓变化的原因^[20]。

测试韧带的力学性能,建立本构关系,是研究韧带损伤机制和研发人造替代材料的必然要求。目前,主要利用离体韧带试样开展力学性能测试,但关于离体后保存时间、保存温度等对韧带力学性能影响尚不明确。因此,学者们采用的离体保存条件无统一标准,千差万别,这从一定程度上导致报道的韧带力学性能差别巨大。本文探究保存时间对韧带纤维的微观形貌、交联程度、压缩力学性能的影响,对确定韧带以及肌腱、软骨等以胶原纤维为主要结构的结缔组织的离体保存条件确定具有参考意义。

需要指出, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 是最常用的保存温度,故本文只考虑在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下的干保存条件,在其他保存温度条件下本文结果是否适用,仍待进一步探究。

4 结论

兔髌韧带在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存 36 d,其压缩力学性能在前 3 天持续增强,在第 3 天达到峰值,随后开始降低,在第 18 天以后趋于稳定。胶原纤维的交联程度可能是造成髌韧带压缩力学性能变化的主要原因。本文结果表明,韧带移植或离体性能时需要慎重选择保存方法。

参考文献:

- [1] NOYES F, BUTLER D, GROOD E, *et al.* Biomechanical analysis of human ligament grafts used in knee-ligament repairs and reconstructions [J]. *J Bone Joint Surg*, 1984, 66(3): 344-352.
- [2] MENDON AL, OCARINO JM, BITTENCOURT N, *et al.* The accuracy of VISA-P questionnaire, single-leg decline squat and tendon pain history to identify patellar tendon abnormalities in adult athletes [J]. *J Orthop Sport Phys*, 2016, 46(8): 673-680.
- [3] MAFFULLI N, WONG J, ALMEKINDERS LC. Types and epidemiology of tendinopathy [J]. *Clin Sport Med*, 2003, 22(4): 675-692.
- [4] HUTCHISON MK, HOUCK J, CUDDEFORD T, *et al.* Prevalence of patellar tendinopathy and patellar tendon abnormality in male collegiate basketball players: A cross-sectional study [J]. *J Athl Training*, 2019, 54(9): 953-958.
- [5] AUNE AK, HOLM I, RISBERG MA, *et al.* Four-strand hamstring tendon autograft compared with patellar tendon-bone autograft for anterior cruciate ligament reconstruction. A randomized study with two-year follow-up [J]. *Am J Sport Med*, 2001, 29(6): 722-728.
- [6] BUCKLEY CP, SAMUEL SALISBURY ST, ZAVATSKY AB. Viscoelasticity of tendons under transverse compression [J]. *J Biomech Eng*, 2016, 138(10): 1-8.
- [7] SALISBURY SS, BUCKLEY CP, ZAVATSKY AB. Transverse compression of tendons [J]. *J Biomech Eng*, 2016, 138(4): 041002.
- [8] DOCKING S, SAMIRIC T, SCASE E, *et al.* Relationship between compressive loading and ECM changes in tendons [J]. *Muscles Ligaments Tendons J*, 2013, 3(1): 7-11.
- [9] WILLIAMS LN, ELDER SH, BOUVARD JL, *et al.* The anisotropic compressive mechanical properties of the rabbit patellar tendon [J]. *Biorheology*, 2008, 45(5): 577-586.
- [10] 潘昭勋, 杜德凯, 孙超, 等. 喙锁韧带解剖重建与垂直重建的生物力学对比[J]. *医用生物力学*, 2018, 33(4): 343-347.
- [11] 李海岩, 王晓燕, 崔世海, 等. 膜单元与弹簧单元模拟韧带损伤的生物力学响应[J]. *医用生物力学*, 2018, 33(5): 390-395.
- [12] LI HY, WANG XY, CUI SH, *et al.* Biomechanical response of membrane element and spring element for simulation of ligament injury [J]. *J Med Biomech*, 2018, 33(5): 390-395.
- [13] DANTO MI, WOO SL. The mechanical-properties of skeletally mature rabbit anterior cruciate ligament and patellar tendon over a range of strain rates [J]. *J Orthop Res*, 1993, 11(1): 58-67.
- [14] QUIRK NP, LOPEZ D, DE L, *et al.* Effects of freeze-thaw on the biomechanical and structural properties of the rat achilles tendon [J]. *J Biomech*, 2018, 81: 52-57.
- [15] GOH KL, CHEN Y, CHOU SM, *et al.* Effects of frozen storage temperature on the elasticity of tendons from a small murine model [J]. *Animal*, 2010, 4(9): 1613-1617.
- [16] GIANNINI S, BUDA R, CAPRIO FD, *et al.* Effects of freezing on the biomechanical and structural properties of human posterior tibial tendons [J]. *Int Orthop*, 2008, 32(2): 145-151.
- [17] NG BH, CHOU SM, LIM BH, *et al.* The changes in the tensile properties of tendons after freeze storage in saline solution [J]. *Proc Inst Mech Eng H*, 2005, 219(6): 387-392.
- [18] NÖT LG, NAUMOV I, VÁMHIDY L, *et al.* Comparison of thermal characteristics of degenerated and inflamed human collagen structures with differential scanning calorimetry [J]. *J Therm Anal Calorim*, 2013, 113(1): 273-279.
- [19] LIU ZQ, TUO FY, SONG L, *et al.* Action of trypsin on structural changes of collagen fibres from sea cucumber (*Stichopus japonicus*) [J]. *J Food Biochem*, 2018, 256: 113-118.
- [20] HURSCHLER C, PROVENZANO PP, VANDERBY R. Scanning electron microscopic characterization of healing and normal rat ligament microstructure under slack and loaded conditions [J]. *Connect Tissue Res*, 2003, 44(2): 59-68.
- [21] MILES CA, WARDALE RJ, BIRCH HL, *et al.* Differential scanning calorimetric studies of superficial digital flexor tendon degeneration in the horse [J]. *Equine Vet J*, 2010, 26(4): 291-296.
- [22] MINTÁL T, PATCZAI B, WIEGAND N, *et al.* The effect of deep-freezing on the structure of patellar and achilles tendon allografts used for ACL reconstruction [J]. *J Therm Anal Calorim*, 2016, 127(2): 1171-1175.
- [23] KARISALLEN JJ, VERES SP. Effect of testing temperature on the nanostructural response of tendon to tensile mechanical overload [J]. *J Biomech*, 2020, 104: 109720.
- [24] TSUCHIDA T, YASUDA K, KANEDA K, *et al.* Effects of in situ freezing and stress-shielding on the ultrastructure of rabbit patellar tendons [J]. *J Orthop Res*, 2010, 15(6): 904-910.
- [25] GOH KL, CHEN Y, CHOU SM, *et al.* Effects of frozen storage temperature on the elasticity of tendons from a small murine model [J]. *Animal*, 2010, 4(9): 1613-1617.