

國立臺灣大學醫學院暨工學院醫學工程學研究所

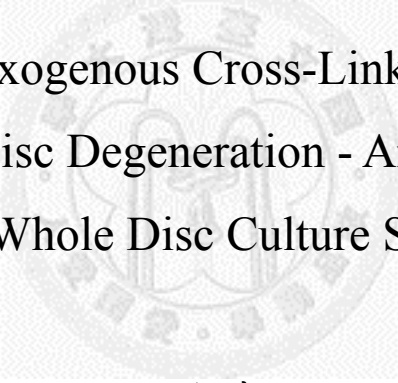
碩士論文

Institute of Biomedical Engineering  
College of Medicine and Engineering  
National Taiwan University  
Master Thesis

使用全椎間盤培養系統之體外實驗

探討外生性交聯療法對治療退化性椎間盤之可能性

Assessment of Exogenous Cross-Linking Therapy for  
Intervertebral Disc Degeneration - An *ex vivo* Study  
Using Whole Disc Culture System



張雅晴

Ya-Ching Chang

指導教授：王兆麟 博士

Advisor: Jaw-Lin Wang, Ph.D.

中華民國 100 年 7 月

July, 2011

# 國立臺灣大學碩士學位論文 口試委員會審定書

使用全椎間盤培養系統之體外實驗

探討外生性交聯療法對治療退化性椎間盤之可能性

Assessment of Exogenous Cross-Linking Therapy for

Intervertebral Disc Degeneration - An ex vivo Study

Using Whole Disc Culture System

本論文係張雅晴君 (R98548018) 在國立臺灣大學醫學工程學研究所完成之碩士學位論文，於民國 100 年 07 月 14 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

王柏勳

(指導教授)

陳文凱

蕭仲凱

趙季平

所長：

工學院 楊台灣  
醫工所所長

## 誌謝

古人云：「光陰似箭，日月如梭。」猶記得當初進入研究所時的懵懂無知與不安，誰知轉眼間就到了畢業之時，這兩年的時光雖短，卻回憶滿滿；離開實驗室在即，心中千言萬語化作一篇謝辭獻給各位。首先必須感謝無論是在論文撰寫、實驗設計亦或是邏輯思考上給予許多建議與肯定的王兆麟教授，感謝老師讓大家在進行學術研究之餘還可以有機會出國參與國際學術研討會，使我們藉此拓展視野並建立良好的國際觀及溝通表達能力。其次要感謝的人是楊炳德博士，感謝楊博每週與大家一同開會且適時給予一針見血的意見，使我們當頭棒喝恍若撥開雲霧見藍天。另外感謝紐約時代新女性趙本秀教授，謝謝老師總是給予許多寶貴建言，使我們實驗順利進行。在此也感謝親愛的黃千姊，您親手烹調的美味早午餐是大家的精力來源，感謝黃姊的關懷與照顧，讓我在台北也能感受到家的溫暖。

接著是博班的學長姊，首先想感謝我第一個認識的大學長-竣凱學長，學長在我眼裡是個有威嚴卻又不失親切感及幽默感的長輩，感謝學長總是不吝惜指導及鼓勵，幫助大家一起學習成長。其次是個性十分可愛但又不失睿智的雅雯學姊，無論是在學術研究或是生活娛樂上，學姊都扮演著一個 leader 的角色，帶領大家吃喝玩樂努力向上，學姊堪稱琴棋書畫樣樣精通(除了電子產品以外)，廚藝也是一級棒，大概可以封個 603 阿郭師名號不為過，感謝學姊讓我的碩班生涯中充滿歡樂與挑戰(例如在雪地裡當個學姊專用扶手那類的)!接著感謝奇林學長，學長跟我一樣從純樸的成大來到這，所以學長讓我覺得很有家鄉 fu，之前獨立撰寫國科會計畫時，學長給予的建議及鼓勵，都是支持我把計畫寫完的動力。另一個要感謝的人是 LabVIEW 神手于鈞學長，只要是跟 3C 產品相關的問題，似乎到學長手上就迅速迎刃而解，感謝學長在我的實驗設計、操作及論文撰寫上都給予很大的幫助，雖然在你手下作事一開始真的壓力很大(因為自己太弱常常怕作錯事會被罵)，但是適應了以後就如虎添翼般地進步神速，如果沒有學長的調教就沒有今日的我!

此外，恭喜學長榮登全實驗室裡面僅次於老師成為我最不敢惹的人物!!(鏘鏘鏘鏘)  
最後感謝電腦及各項技能也很強大的文凱學長，感謝學長之前在我假日來實驗室  
第一次遇到大冰箱漏水手足無措的時候，一通電話就瞬間趕到實驗室幫忙處理!

接下來是我剛進實驗室時的碩二學長，阿富、勝元、阿泰、偉程以及淞閔，  
當初跟你們學習操作各種材料試驗機台與試樣處理，感謝你們讓我感覺到實驗室的  
溫暖!以及當初的碩一學長，檸檬、瑞安、強哥和奇文，感謝你們的細心指導與  
技術支援，其中特別感謝檸檬辛苦架設培養系統原型(雖然你說的”壓克力管可以  
泡酒精”宣言讓我幾近崩潰，但秉持著學長都是為我好的信念，我只好相信那是  
你給我的試煉!)，以及瑞安的影像處理教學及LabVIEW指導，學長的認真向學讓  
我佩服，我永遠不會忘記學長那驚人的電腦桌面。

噢!接著感謝跟我一起進實驗室同甘共苦的得鈞、啟軒和俊顯，從一年級的一  
起修課、處理試樣到二年級的各自趕實驗、趕論文，我只能說，有你們真好!大家  
一起努力奮鬥才有進步，感謝得鈞讓我搭了很多次的醫院<->總區來回順風車，感  
謝啟軒提供多種有用軟體以及貼心的公車到站提醒，感謝俊顯的幽默談諧讓實驗  
室增添歡笑。同時感謝小我一屆的小米、小白、老涂跟蝦子，有你們的支持與幫  
忙才換來我們的畢業證書!特別感謝小米及小白，每次五點多早起作實驗真的很痛  
苦，但是有你們的大力相助，讓實驗本身跟紀錄紙上不再枯燥，也辛苦你們要常  
常聽我發牢騷碎碎念!然後老涂阿，你脾氣真的很好欸，欺負你都不會生氣，謝謝  
你平常都默默被我鬧，幫助緩解我焦慮的情緒☺。小我兩屆的彥凱、哲豪、momo  
跟志維，實驗室的未來就靠你們了!要認真努力不要被挫折打倒!!

最後，我想感謝一路支持我走過來的家人及摯友，親愛的爸爸、媽媽、姐姐  
以及遠在台南的大家(阿煙、阿蔥、阿悶以及怡雯)，因為有你們的關心與陪伴，  
我才能堅持到最後!研究所兩年的時間，於眾人相助下學習成長，最終得以完成實  
驗及論文，謹以此篇論文獻給所有幫助我的人，謝謝你們!

雅晴 記於 2011.07.21 展書樓 603 室

## 中文摘要

**目的：**利用體外椎間盤培養系統探討外生性交聯療法對於不同退化程度椎間盤之療效。

**背景簡介：**一般中老年人常見的脊椎退化性病徵為下背痛，許多文獻指出下背痛可能源自於椎間盤退化，而椎間盤退化是由許多影響因子共同調控的結果，其機制目前尚未完全明瞭，為了針對退化性椎間盤作全面性的治療，完整模擬椎間盤退化即為首要課題。現今研究中，用於治療椎間盤退化的藥物之一為天然胜肽交聯劑-梔子素，其生化作用機制為增加蛋白質或膠原蛋白之間的胺基鍵結，用以增加椎間盤整體結構穩定度、提高動態強度與緩衝能力，然而，尚未有研究對於梔子素於不同退化程度之椎間盤治療成效作詳細探討與比較。

**材料與方法：**實驗使用六個月大的年輕豬隻，試樣取用為胸椎骨第一到第六節(T1~T6)之間的椎間盤，為確保試樣新鮮將於豬隻屠宰後四個小時內進行實驗。本研究使用胰蛋白酶(trypsin)模擬椎間盤退化早期蛋白質變性的過程，模擬退化組中每個試樣於第一天處理完畢後打入 0.5 ml, 0.25%的胰蛋白酶，模擬椎間盤晚期嚴重退化的組別將於第二天施加高強度之疲勞負載(平均力量420N, 負載頻率2.5Hz, 負載時間4hours, 負載次數約36000 cycles), 而治療組則進一步於第二天打入 1 ml, 0.33%的梔子素(genipin)作治療，各組試樣均放置於生物培養系統中，並於培養一週後作力學測試及生化測試。

**結果：**模擬早期退化之蛋白質變性椎間盤，其靜態及動態力學性質皆有顯著性降低，染色切片結果顯示椎間盤組織結構鬆散、排列不一致；模擬晚期退化之蛋白質變性加破壞椎間盤，其聚合模數及勁度上升但衝擊緩衝能力及滲透度下降，染色切片結果顯示其組織破壞損傷嚴重、失去結構完整性，因此無法維持原本高度被壓得更緊緻。加入梔子素治療後，蛋白質變性椎間盤的椎間盤高度、聚合模數、循環負載後勁度值、循環負載前阻尼係數及椎間核水份含量，相對於治療前皆有

顯著性回復；然而，梔子素治療對於蛋白質變性加破壞的椎間盤，其內部組織缺損破壞無法修復，但治療後組織強度仍然有回復的趨勢，而椎間核含水量大幅增加，可推測其相比於破壞嚴重的退化組有較好的緩衝能力，因此阻尼係數於循環負載前後皆有顯著地回復。

**結論：**天然胜肽交聯劑-梔子素可用於治療早期退化性椎間盤，並回復其生物力學性質；若椎間盤退化嚴重且伴隨組織缺損，則梔子素可以回復椎間盤喪失之部分動態力學性質，但無法完全修復缺損的組織，而這些組織破壞可能導致椎間盤退化持續進行。

**關鍵詞：**椎間盤、退化模型、外生性交聯、梔子素、體外椎間盤培養系統



## Abstract

**Objective:** To investigate the efficacy of exogenous cross-linking therapy in treating the degenerated intervertebral disc by using *ex vivo* whole disc culture system.

**Summary of background data:** Disc degeneration induced low back pain syndrome is observed in elderly human. The disc degeneration can be induced by factors such as protein denaturation and micro-defect within disc fiber. A disc degeneration model can be effectively used for the screening of clinical strategy for disc degeneration treatment. The treatment based on this model can be studied to find the physiological effect. In recent studies, exogenous cross-linking therapy has been shown to enhance stability and dynamic properties of disc by increasing protein cross-linking. Nevertheless, the mechanical and biological effects of peptide cross-linking reagent on different degrees of disc degeneration shall be concerned to further assess the feasibility of exogenous cross-linking therapy.

**Methods:** Total 40 porcine thoracic discs (T1~T6) were dissected from 6-month-old juvenile pigs within 4 hours after sacrifice. After specimen preparation, discs were equally assigned to five groups (n=8 for each group), and all specimens were incubated for 1 week before test. Groups were divided as follows: intact group, early degenerated group, early degenerated with treatment group, severely degenerated group, severely degenerated with treatment group. For all groups except intact group, 0.5 ml 0.25% trypsin solution was injected into specimen on Day 1 to produce protein denaturation, which is the simulation for early degenerated disc, and high strength fatigue loading ( $F_{rms}= 420$  N, frequency= 2.5 Hz, loading period= 4 hours) was given to produce micro-defects within disc fiber to resembling the severe disc degeneration on Day 2.

For groups with treatment, specimens were injected with 1 ml 0.33% genipin solution after simulation of disc degeneration. Mechanical test and biological detection were performed after one week incubation.

**Result:** In group of early degenerated disc, the results showed that the mechanical property of disc significantly decreased both in static and dynamic test, and also the disorganization of the laminate structure was found in histological stain. If the disc is damaged by fatigue loading after protein denaturation, the aggregate modulus and stiffness increase with height loss, but damping coefficient, permeability and water content decrease because of structural defects. This defect was also found in histological stain. After taking exogenous cross-linking therapy, the degenerated disc recover its mechanical property and restores the water content to normal condition, but the structural defects which occur in severely degenerated disc cannot be repair by cross-linker.

**Conclusion:** Genipin-treated discs show the recovery of mechanical properties after protein denaturation which presumes to be process of early disc degeneration, and the efficacy maintains for at least one week; however, mechanical defects which occur in severely degenerated disc cannot be treated by protein cross-linking.

**Key words:** intervertebral disc, degeneration model, exogenous cross-linking, genipin, *ex vivo* whole disc culture system



## 目錄

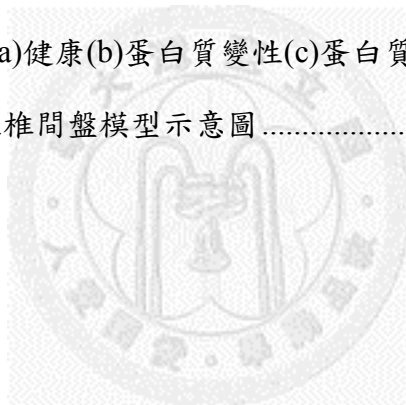
|  |           |
|--|-----------|
| 口委審定書 .....  | i         |
| 誌謝 .....   | ii        |
| 中文摘要 .....   | iv        |
| Abstract .....   | vi        |
| 圖目錄 .....  | x         |
| 表目錄 .....  | xii       |
| <b>第一章 前言 .....</b>                                      | <b>1</b>  |
| 1.1 椎間盤的基本生理構造及功能介紹 .....                                | 1         |
| 1.2 椎間盤的力學性質 .....                                       | 3         |
| 1.2.1 靜態力學性質 .....                                       | 3         |
| 1.2.2 動態力學性質 .....                                       | 4         |
| 1.3 退化性椎間盤 .....   | 5         |
| 1.3.1 病理特徵 .....   | 5         |
| 1.3.2 模擬退化模型 .....                                       | 6         |
| 1.3.3 臨床治療方法 .....                                       | 7         |
| 1.4 體外椎間盤培養系統 .....                                      | 8         |
| 1.5 研究動機與實驗目的 .....                                      | 9         |
| 1.6 實驗假說 .....   | 10        |
| <b>第二章 實驗設備 .....</b>                                    | <b>11</b> |
| 2.1 全椎間盤培養系統(Whole Disc Culture System) .....            | 11        |
| 2.1.1 生物培養器 .....  | 12        |
| 2.1.2 循環系統 .....   | 13        |
| 2.1.3 負載系統 .....   | 14        |
| 2.1.4 動力系統 .....   | 16        |
| 2.2 潛變測試機台(Creep Testing Apparatus) .....                | 18        |
| 2.3 連續式衝擊測試平台(Continuous Impact Testing Apparatus) ..... | 19        |

|       |                 |    |
|-------|-----------------|----|
| 第三章   | 材料與方法           | 20 |
| 3.1   | 試樣準備            | 20 |
| 3.2   | 實驗流程            | 21 |
| 3.3   | 實驗方法            | 22 |
| 3.4   | 數學模型            | 24 |
| 3.4.1 | 流變性質            | 24 |
| 3.4.2 | 動態力學性質          | 25 |
| 3.5   | 統計分析方法          | 26 |
| 第四章   | 實驗結果            | 27 |
| 4.1   | 力學性質測試結果        | 27 |
| 4.1.1 | 椎間盤高度           | 27 |
| 4.1.2 | 流變性質測試          | 28 |
| 4.1.3 | 動態性質測試          | 30 |
| 4.2   | 生化測試結果          | 34 |
| 4.2.1 | 水份含量            | 34 |
| 4.2.2 | 染色切片            | 35 |
| 第五章   | 綜合討論            | 38 |
| 5.1   | 椎間盤退化模型討論       | 38 |
| 5.2   | 外生性交聯治療退化性椎間盤討論 | 39 |
| 5.3   | 實驗限制            | 41 |
| 第六章   | 結論與未來展望         | 42 |
| 6.1   | 結論              | 42 |
| 6.2   | 未來展望            | 42 |
| 第七章   | 參考文獻            | 43 |

## 圖目錄

|  |    |
|--|----|
| 圖 1-1 脊椎示意圖 (a)後視圖 (b)脊椎活動單元 (c)側視圖 .....      | 1  |
| 圖 1-2 椎間盤結構示意圖 .....                           | 2  |
| 圖 1-3 胰蛋白酶作用機制 .....                           | 6  |
| 圖 1-4 Junger 等人在 2009 年發展之生物培養器示意圖 .....       | 8  |
| 圖 1-5 梔子素與蛋白質交聯作用機制示意圖 .....                   | 9  |
| 圖 2-1 恆溫培養箱內部系統架設圖 .....                       | 11 |
| 圖 2-2 生物培養器各部件示意圖 .....                        | 12 |
| 圖 2-3 微量蠕動式幫浦(四流路) .....                       | 14 |
| 圖 2-4 小型單動向氣壓缸 (a)實體圖 (b)內部示意圖 (c)作用方式簡圖 ..... | 15 |
| 圖 2-5 負載系統整體設計圖 .....                          | 15 |
| 圖 2-6 動力系統配置圖 .....                            | 16 |
| 圖 2-7 空氣壓縮機 .....                              | 16 |
| 圖 2-8 控制系統配置圖 .....                            | 17 |
| 圖 2-9 潛變測試機台 .....                             | 18 |
| 圖 2-10 連續式衝擊測試機台示意圖 .....                      | 19 |
| 圖 3-1 試樣準備示意圖 (a)準備步驟流程圖(b)切除部位示意圖(c)完整椎間盤 ... | 20 |
| 圖 3-2 實驗流程圖 .....                              | 21 |
| 圖 3-3 組織取樣部位示意圖 .....                          | 23 |
| 圖 3-4 染色切片流程圖 .....                            | 23 |
| 圖 3-5 (a)一維自由震盪彈簧阻尼系統 (b)衝擊測試時椎間盤軸向位移-時間圖 ...  | 25 |
| 圖 4-1 各組別椎間盤高度示意圖 (**表示 $p<0.001$ ) .....      | 27 |
| 圖 4-2 聚合模數與椎間盤退化階段及梔子素治療之關係圖 .....             | 29 |
| 圖 4-3 液體滲透度與椎間盤退化階段及梔子素治療之關係圖 .....            | 29 |

|   |    |
|---|----|
| 圖 4-4 各組別之勁度模數於疲勞負載前後比較圖 .....                  | 30 |
| 圖 4-5 各組別之阻尼係數於疲勞負載前後比較圖 .....                  | 30 |
| 圖 4-6 勁度於不同退化程度及梔子素治療後之負載前後關係圖 .....            | 31 |
| 圖 4-7 阻尼係數於不同退化程度及梔子素治療後之負載前後關係圖 .....          | 32 |
| 圖 4-8 不同退化階段及梔子素治療後椎間盤各部位之水份含量 .....            | 34 |
| 圖 4-9 健康椎間盤之組織染色切片 (a)椎間環 (b)椎間核 .....          | 36 |
| 圖 4-10 蛋白質變性之椎間盤組織切片 (a)椎間環 (b)椎間核 .....        | 36 |
| 圖 4-11 蛋白質變性後治療之椎間盤組織切片 (a)椎間環 (b)椎間核 .....     | 36 |
| 圖 4-12 蛋白質變性加破壞之椎間盤組織切片 (a)椎間環 (b)椎間核 .....     | 37 |
| 圖 4-13 蛋白質變性加破壞後治療之椎間盤組織切片 (a)椎間環 (b)椎間核 .....  | 37 |
| 圖 5-1 退化模型示意圖 (a)健康(b)蛋白質變性(c)蛋白質變性後椎間環損傷 ..... | 39 |
| 圖 5-2 梔子素治療退化性椎間盤模型示意圖 .....                    | 40 |



## 表目錄

|                                       |    |
|---------------------------------------|----|
| 表 2-1 鐵氟龍材料特性表.....                   | 13 |
| 表 2-2 空氣壓縮機工作參數.....                  | 17 |
| 表 4-1 模擬不同退化階段對於椎間盤聚合模數及液體滲透度的影響..... | 28 |
| 表 4-2 使用梔子素治療對於不同退化階段之椎間盤影響.....      | 28 |
| 表 4-3 模擬不同退化階段對於椎間盤動態性質的影響.....       | 33 |
| 表 4-4 使用梔子素治療對於不同退化階段之椎間盤動態性質的影響..... | 33 |



# 第一章 前言

## 1.1 椎間盤的基本生理構造及功能介紹

脊椎(spine)於人體中佔有不可或缺的地位，其扮演的角色除了作為支撐人體的骨架以外還包括許多功能如提供活動度、維持肢體平衡以及保護相對脆弱的脊索神經。如圖 1-1 所示，一組脊椎活動單元為兩節椎骨(vertebrae)及一個椎間盤(intervertebral disc, IVD)，其中椎間盤為人體中最大的無血管組織，具有良好的撓性(flexibility)及吸收震盪的能力(damping ability)，人體腰椎間盤厚度約為 7-10mm，前後側長度約為直徑 4cm<sup>77</sup>，其基本構造為上下椎終板(endplate, EP)以及位於兩椎終板間的軟組織，包括外側纖維環與中間凝膠狀組織，為了負擔人體日常活動過程中脊椎所承受各種力學負載及衝擊，椎間盤各部位的組織構造及成分組成皆有其不同的作用。

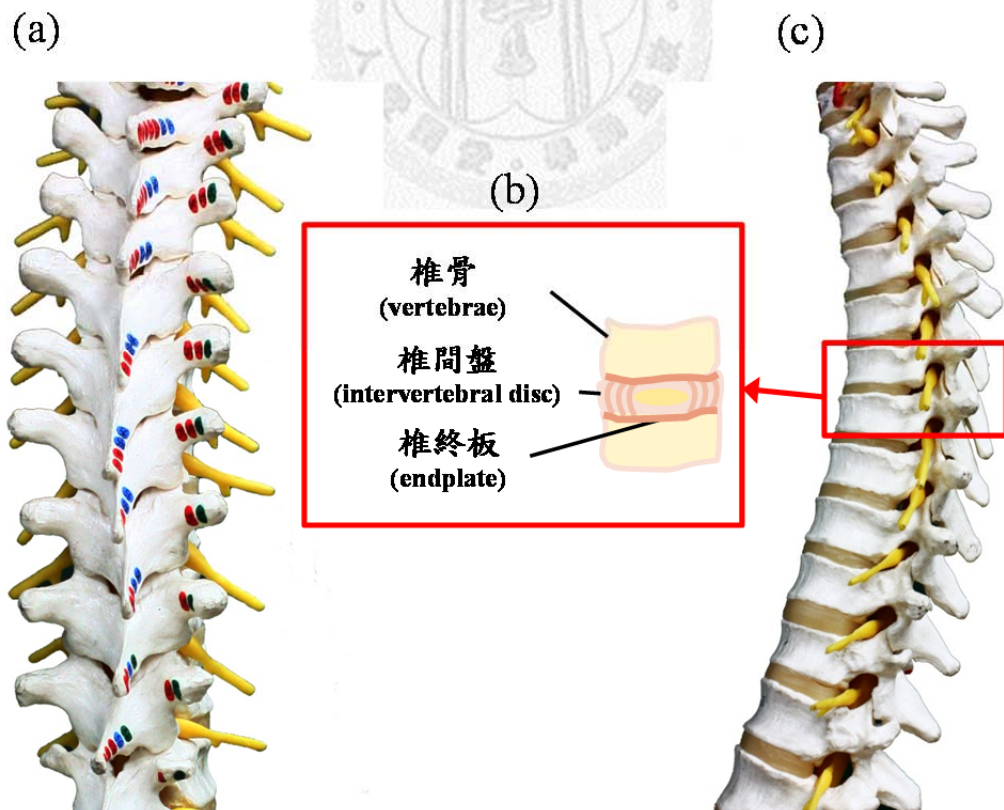


圖 1-1 脊椎示意圖 (a)後視圖 (b)脊椎活動單元 (c)側視圖

如圖 1-2 所示，外側纖維環一般稱之椎間環(anulus fibrosus, AF)，是由交錯式(cross-woven)纖維束所組成的層狀結構(lamella)，主要成分為水、第一型膠原蛋白纖維(type I collagen fiber)及蛋白多醣(proteoglycan, PG)，其纖維薄層之數量依所在部位及年齡而有所不同，約有 15-25 層<sup>47</sup>，每層環狀纖維中間由彈性蛋白纖維(elastic fiber)相連接，內外層纖維走向不同，外層纖維束之間排列較平行，內層纖維束走向則近似於十字交錯(criss-cross)，此網狀結構可幫助維持椎間核靜水壓及椎間盤整體結構<sup>85</sup>。椎間盤中間凝膠狀組織稱之椎間核(nucleus pulposus, NP)，其結構主要是由不規則排列之第二型膠原蛋白纖維(type II collagen fiber)及徑向排列之彈性蛋白纖維分佈於富含水分的膠狀蛋白多醣基質(aggrecan-containing gel)中所組成<sup>33,60,85</sup>，其為具黏彈性(viscoelastic)特徵之凝膠態組織，故同時兼具液態及固態材料特性，有良好的抗壓縮能力，而其承受負載的機制主要來自於椎間核膨潤壓力(swelling pressure)變化及其彈性纖維結構<sup>36</sup>。椎終板為椎間盤養分代謝之重要通道，胚胎早期分佈於椎間盤內的血管將隨著人體成長逐漸減少<sup>29</sup>，而後椎間盤成為一無血管組織，此時其與外界養分運輸代謝需仰賴椎終板上不規則分佈之微血管及孔洞<sup>28,55</sup>，隨著年紀增長與老化，椎終板會逐漸鈣化且孔隙變少導致養分傳輸受阻，一般認為這是致使椎間盤退化的重要因素之一<sup>53,62,78</sup>。

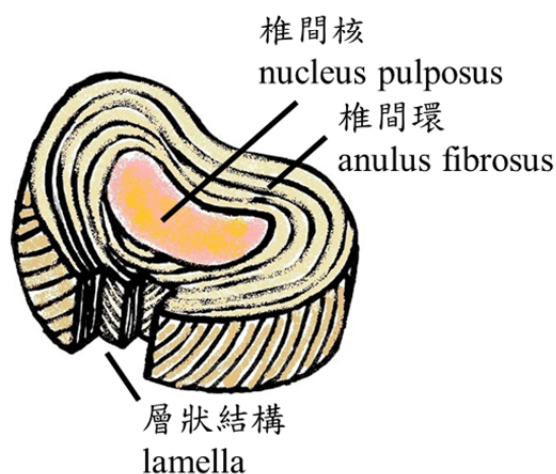


圖 1-2 椎間盤結構示意圖

## 1.2 椎間盤的力學性質

椎間盤為人體中重要的吸震緩衝器官，因日常生活作息中無論是靜態行為(如坐臥、休息)或動態行為(如行走、奔跑、跳躍)都會對椎間盤產生力學負載，所以探討椎間盤之力學性質是評估其功能完整性的重要課題。

### 1.2.1 靜態力學性質

椎間盤為高含水量之組織，水份含量於椎間核及椎間環內分別約佔 80%與 70%，已知組織間固相與液相介面之交互作用將導致機械力學性質及細胞表徵改變<sup>30,82</sup>，且椎間盤含水量與蛋白多醣吸附水分的能力有關，因此椎間盤之生物力學性質會同時受到含水量及蛋白多醣含量所影響<sup>58,63,68</sup>，其中用以研究椎間盤內流體與細胞基質間相互作用的理論稱作流變學(rheology)<sup>43</sup>。椎間盤由纖維環及凝膠狀髓核所組成，可視為一非等向性複合結構，為了探討椎間盤流變學性質，本研究將利用 Mow 等人<sup>54</sup>於 1980 年提出而後由 Soltz 等人<sup>74</sup>於 1998 年修正的線性雙相數學模型(linear biphasic mathematical model)描述之。Mow 等人提出的雙相線性數學模型有四個重要假設如下：假設一、固相與液相本質皆為不可壓縮(uncompressible)，不可衰減(nondissipative)，材料特性包含線性與彈性；假設二、能量衰減源於固液相交界面相互移動所產生的摩擦；假設三、待測物的固相與液相體積(或重量)比值會隨待測物深度而改變；假設四、待測物的水分滲透度為常數。其中，流變學包含兩個材料參數，分別為代表固相特性的聚合模數(aggregate modulus,  $H_A$ )以及代表液相特性的滲透性(hydraulic permeability,  $\check{k}$ )。聚合模數可用來描述受外力負載時椎間盤之整體機械強度，其值越大表示結構剛性高、強度越好；滲透性則用來描述流體於細胞基質與組織間流通的能力，其值越高表示流體越容易於組織間流動進出。



## 1.2.2 動態力學性質

椎間盤是一個具黏彈性特徵的軟組織，所以相較於機械強度高的椎骨其具有良好地抵抗外來衝擊、緩衝震盪及儲存能量的功能<sup>5,34,81</sup>。由於椎間核含水量高，當椎間盤受壓時，將導致核內靜水壓升高，為了平衡內外壓力椎間核會順勢向外展延，而椎間環會因椎間核向外推擠而產生形變，此時含有許多膠原蛋白的纖維環組織就像彈簧形變一樣同時產生一股反作用力抵抗椎間核，限制並防止其過度膨脹<sup>49</sup>。當外在負載移除後，核內靜水壓減少，椎間環向內縮回同時將原先形變時儲存的能量轉移給椎間核，能量傳遞來往間減緩脊椎受到衝擊時可能產生的直接傷害，因此椎間盤可視為一個具有彈簧阻尼效果之減震緩衝系統。本研究將椎間盤模擬成一維自由震盪之彈簧阻尼系統，此系統使用兩個參數來探討椎間盤動態力學性質，分別為勁度模數  $K$ (stiffness)及阻尼係數  $C$ (damping coefficient)；

如前所述，椎間盤的基本力學功能為抵抗外力負載與緩解震盪衝擊能量，因此，前者可用勁度模數描述，後者則用阻尼係數來代表。當勁度越高表示物體越硬、越不易因受力而產生形變、抵抗外力負載的能力越好，阻尼係數越大則代表物體受到力量衝擊後震盪速度越慢、吸震效果越好。由此可見，若將椎間盤整體類比成一種複合材料的構造，其力學性質也同時受到椎間核、椎間環及椎終板多種不同材料性質所共同影響，因此椎間盤裡任何組織構造及生化的改變都可能影響椎間盤整體的力學性質；倘若椎間盤退化使組織變性、力學性質改變，則其性質改變勢必造成不同於健康椎間盤的受力模式，而受力模式的改變也會導致組織結構或生化性質受影響，環環相扣的交互影響下可能使得椎間盤吸震抗負載的功能日益衰減。

### 1.3 退化性椎間盤

隨著年齡漸增，組織細胞衰變老化的同時將伴隨著許多退化性疾病產生，其中下背痛(low back pain)更是多數人於中老年時期可能會發生的問題<sup>6,40</sup>，這是由於脊椎受力分布不均導致骨頭不正常增生或椎間盤突出壓迫到神經所致，而致使脊椎受力分布不均的成因有很多種，常見的成因可能是椎間盤退化後機械性質改變導致其緩衝能力降低或結構不完整<sup>9,20</sup>，其中，椎間盤退化可能來自於養分代謝不良、細胞衰老、代謝後廢物累積或是細胞受到疲勞負載破壞死亡<sup>13,75,79</sup>，但目前還無法明瞭其完整機制，因此許多研究致力於瞭解完整的退化機制進而針對退化早期研發最適當的治療方法。

#### 1.3.1 病理特徵

根據文獻可知，椎間盤退化過程中包含一連串細胞生化衰老反應及整體結構改變，前者常見於椎間核、而後者則多數見於椎間環及椎終板<sup>1-3,10</sup>。椎間盤退化過程一般始於椎間核，隨著年齡增長椎間核合成蛋白多醣及第二型膠原蛋白的速率及產量降低、營養代謝效率也變差<sup>55</sup>，同時第二型膠原蛋白的降解速率及第一型膠原蛋白的合成速率上升，這將使得椎間核喪失保水能力亦即無法維持正常滲透壓，最後導致其組織纖維化，進而因其傳遞及緩衝外力的能力降低改變外圍椎間環的受力分佈狀況<sup>67</sup>；當椎間核逐漸乾涸且纖維化越來越嚴重時，內側椎間環開始因為受力不均而產生環向裂縫，最後發展成徑向裂縫，因此退化晚期的椎間盤通常伴隨有明顯的椎間環徑向破壞<sup>1,10,27</sup>。目前臨床上常用來觀測並推斷病人椎間盤退化程度的方式為核磁共振造影(magnetic resonance imaging, MRI)，其影像主要針對退化性椎間盤水分含量與健康椎間盤不同而有明顯的變化，文獻上指出使用核磁共振造影可於尚未發生退化症狀的病人身上觀測到早期退化徵兆<sup>66</sup>，一般根據 Thompson 等人<sup>76</sup> 制定的標準來表示退化程度，由第一級無退化(grade I, non-degenerated)到第五級嚴重退化(grade V, severely degenerated)，藉由觀測影像上椎間盤各部位之型態變化可以區別其退化程度。

### 1.3.2 模擬退化模型

為了找出治療退化性椎間盤的有效療法，許多研究利用動物實驗模擬退化性椎間盤，並針對其病徵加以治療。目前有幾種較常使用的退化模型，第一種方式為利用口徑較大的針頭於椎間盤製造一破壞性針孔，此針傷可能造成椎間盤結構被破壞、高度降低、局部組織產生發炎反應以及原有力學性質受影響，並導致椎間盤持續退化<sup>51,72,73</sup>。文獻指出針頭直徑與椎間盤高度比是影響椎間盤性能的重要參數<sup>38</sup>，若針頭直徑與椎間盤高度比介於 25%~40%之間，則針傷可能會影響椎間盤功能或產生其內部微小破壞；但若比值高於 40%，將會明顯降低椎間盤的力學性質，並導致退化持續進行<sup>17</sup>。第二種方式為使用長時間且高強度之疲勞負載使得椎間環纖維產生類似於退化晚期的微小破壞(micro-fracture)，而此破壞將導致椎間盤因結構不完全而機械強度降低<sup>81</sup>，曾有文獻提到椎間環層與層之間的結構與剪應力分佈是影響椎間盤功能的重要因素<sup>23</sup>，因此部分學者認為機械外力可能破壞組織結構進而加速椎間盤退化<sup>31,81,84</sup>。第三種方式則是利用注射酵素產生酶解作用，用以模擬椎間盤退化早期的蛋白質變性過程，一般常使用的酵素是胰蛋白酶(trypsin)，如圖 1-3 所示，其作用方式為切斷蛋白質中由賴氨酸(Lysine)或精氨酸(Arginine)的羧基所構成的肽鏈，使蛋白質變性水解成肽，最佳作用環境酸鹼值 pH 值 8.0、溫度 37°C。文獻中指出，注射胰蛋白酶將導致蛋白多醣及水份含量隨時間增加而減少，但不會使得整體膠原纖維組織受損<sup>35</sup>，學者認為應針對不同退化階段使用相對應的治療方式<sup>70</sup>，研究指出使用藥物治療椎間盤退化最為有效的時期在於退化早期蛋白質變性但其他纖維組織並未受損的狀態<sup>45,48,64,71</sup>，因此一般認為使用酵素酶解蛋白質適合作為椎間盤早期退化模型的模擬方式。

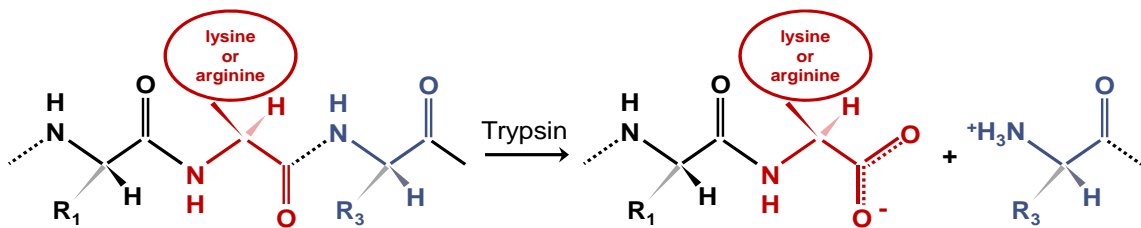


圖 1-3 胰蛋白酶作用機制

### 1.3.3 臨床治療方法

治療椎間盤退化疾病的理想方法在於同時減緩患者病徵以及恢復椎間盤基本功能<sup>70</sup>，一般常見的臨床治療方式有物理治療(physical therapy)<sup>4</sup>、脊椎融合手術(spinal fusion surgery)<sup>52</sup>、椎間盤修補(disc repair)<sup>50</sup>、全椎間盤置換(total disc replacement)<sup>19</sup>、外生性交聯療法(exogenous cross-linking therapy)<sup>14-16,26</sup>、椎間盤再生(disc regeneration)<sup>21</sup>等；其中，物理治療、脊椎融合手術及椎間盤修補偏向於減輕患者疼痛症狀或延緩退化，較無法回復成健康椎間盤的狀態，椎間盤置換手術過程及術後感染風險較高，目前較少醫生建議使用這項療法，外生性交聯療法與椎間盤再生療法皆為生物性之藥物治療，較有可能同時達成減緩病徵及恢復椎間盤基本功能的目的，此外，目前椎間盤再生研究中常使用的材料皆屬價位較高且取得不易的藥劑(例如:生長因子、幹細胞、基因療法)，然而，外生性交聯藥劑則相對價位低且容易取得，因此目前也有一些研究針對外生性交聯療法對於治療退化性椎間盤的未來可行性作探討。另一方面，臨床上選用治療方法的策略和退化程度相關<sup>70</sup>，若為退化早期椎間盤內部細胞自我修復能力較好的時期，則此時較適當之前瞻性治療為注射可增加組織間強度或能刺激細胞增生、回復細胞外間質的藥物，如再生療法與交聯療法；反之，若為退化晚期椎間盤內部組織結構已經嚴重破損且細胞表徵能力變差，則此時椎間盤修補可能為較恰當的治療方法。

治療成效之驗證方法，可以分為生化測試及力學測試兩大類。生化測試目前主要觀測的主體是細胞，只需要取出一部分椎間盤組織或細胞即可進行檢測，常見的檢測參數包含細胞活性(cell viability)、醣胺多醣(glycosaminoglycans, GAGs)及蛋白多醣(proteoglycan)含量、去氧核糖核酸(DNA)及核糖核酸(RNA)之表徵、細胞型式(phenotype)、第一及第二型膠原蛋白(type I & type II collagen)含量等。力學測試方面則大多屬於巨觀之椎間盤功能性測試，受測試樣經常使用完整椎間盤組織，檢測包含整體靜態力學性質、動態性質及型態學上的改變；此外，也有少部分基礎研究為了瞭解組織與組織間的相互作用而探討微觀之組織生物力學性質。

## 1.4 體外椎間盤培養系統

由於藥物治療仰賴生物作用之進行，於是各種療法之研發階段皆需藉由動物實驗模擬藥物於生物體內實際作用的情形，但活體動物實驗(in vivo)花費昂貴且飼養費時不易，同時須顧及道德倫理的衝突與考量，故早期有學者將椎間盤細胞移植到培養基上觀察，並進行生化測試來驗證細胞培養用於藥物治療研發之可行性<sup>7,12,39</sup>，結果顯示，細胞存活率及分化能力降低，可能原因在於細胞脫離原本生物體內的三維環境，造成週遭環境參數巨幅改變，使得細胞表徵無法真實呈現，因此，此作法成效僅侷限於細胞階段，無法用來驗證藥物治療是否能夠有效回復退化性椎間盤的整體功能。

細胞培養對於椎間盤功能探討仍有其限制存在，故近年來有學者為了瞭解整體椎間盤功能表現而進行體外椎間盤培養系統(ex vivo)之研究<sup>24,25,32,37,42</sup>，此方法保留椎間盤完整構造並利用系統模擬出符合其生理條件的環境，可用以探討藥物於椎間盤內與組織間相互作用的結果<sup>11</sup>，且花費相對於活體動物實驗便宜，亦比一般活體外實驗(in vitro)更趨近於體內椎間盤表現。然而，體外椎間盤培養系統相較於單純細胞培養其考量層面較為複雜，必需克服營養傳輸及失去椎骨構造限制可能膨潤的問題。因此，學者提出保留上下椎終板限制椎間盤膨潤並使用抗凝血劑減少血塊阻塞傳輸孔道的作法<sup>22,44</sup>，同時將椎間盤置於高濃度葡萄糖溶液中配合模擬生理條件之動態式外力負載<sup>32,37,42</sup>，並將整體系統放置於恆溫 37°C 之生物培養箱。(如圖 1-4)

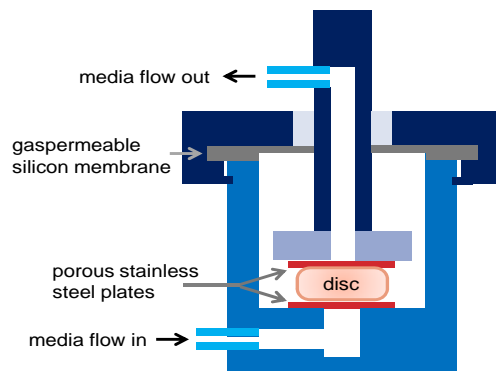


圖 1-4 Junger<sup>37</sup> 等人在 2009 年發展之生物培養器示意圖

## 1.5 研究動機與實驗目的

目前已有許多文獻使用動物實驗探討外生性交聯藥物治療對於退化性椎間盤之治療效果，其中一種常見的外生性交聯藥物為梔子素(genipin)<sup>13-15,25</sup>，其分子式為  $C_{11}H_{14}O_5$ (分子量：226.23)，已知為一種低毒性的天然胜肽交聯劑，如圖 1-5 所示，其生化作用機制為增加蛋白質或膠原蛋白之間的胺基鍵結，用以增加椎間盤整體結構穩定度、提高動態強度與緩衝能力，若梔子素與胺基根產生交聯反應(cross-linking)則會明顯生成深藍色產物，由於其具有良好的生物相容性，亦常用於組織支架與填充物之研發應用。但此療法對於不同退化程度之椎間盤是否療效不同尚屬未知，因此本研究主要目的為利用體外椎間盤培養系統探討外生性交聯療法對於不同退化程度椎間盤之療效。

本研究重點主要分為兩大部分：

1. 模擬不同階段之退化性椎間盤
2. 探討外生性交聯療法對於不同階段之退化性椎間盤的治療效果

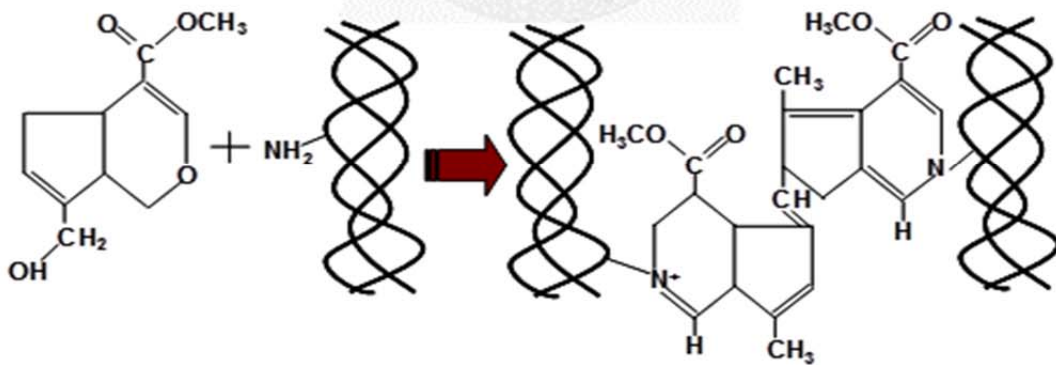


圖 1-5 梔子素與蛋白質交聯作用機制示意圖

## 1.6 實驗假說

本實驗主要量測參數為代表椎間盤流變性質之聚合模數( $H_A$ )與滲透度( $\check{k}$ )以及代表動態力學性質之勁度( $K$ )與阻尼係數( $C$ )，而椎間盤的流變性質及動態力學性質與其退化程度相關，其中的調控因子包括負載條件、生化組成及組織結構。文獻指出聚合模數與水份含量及蛋白多醣含量成正比<sup>8</sup>，因此若使用胰蛋白酶模擬退化早期蛋白質變性過程，推斷此時蛋白多醣的結構被破壞，椎間盤吸附水分分子的能力降低，將使其整體聚合模數及水份含量降低；而同時將會因為椎間盤結構不穩定，使其受外力負載時椎間盤高度及液體滲透度降低、受衝擊時勁度及阻尼係數皆降低(亦即緩衝能力下降)。倘若於蛋白質變性後再進一步施加疲勞負載，預期椎間盤纖維會產生微小破壞、結構強度無法維持<sup>81</sup>，受壓後將使得椎間盤高度下降、組織與組織間孔隙被壓縮得更緊緻，此時代表組織固相特性的聚合模數及代表剛性的勁度上升，液體滲透度與阻尼係數為下降。最後若使用梔子素治療，將增加膠原蛋白間的肽鏈鍵結，使得椎間盤整體生物力學性質趨向於健康椎間盤的表徵。

## 第二章 實驗設備

### 2.1 全椎間盤培養系統(Whole Disc Culture System)

本實驗利用自製生物培養器搭配營養傳輸循環系統及動態負載系統模擬日常生活中椎間盤於生物體內的生長環境，如圖 2-1 所示，實驗過程中會將生物培養器、培養液及負載系統置入恆溫培養箱(溫度 37°C、濕度 95%、CO<sub>2</sub> 5%)，而將循環幫浦及動力源系統置於培養箱外，整體系統固定於每週定期保養清潔以保持培養系統之穩定性。

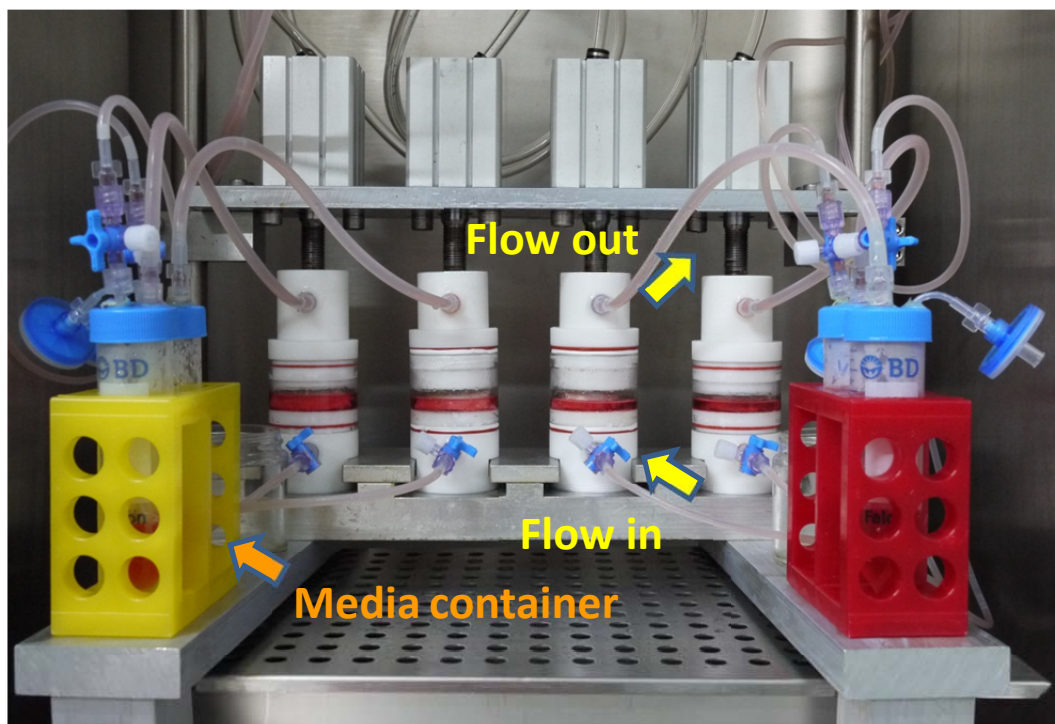


圖 2-1 恆溫培養箱內部系統架設圖



### 2.1.1 生物培養器

如圖 2-2 所示，本實驗之生物培養器包含一活塞頭、活塞環、透明管壁、底座、三個止水 O-ring 及兩個靜脈帽。其中，基於耐久性及生物相容性考量，活塞頭、活塞環及底座三部分之材質選用聚四氟乙烯 (polytetrafluoroethylene, PTFE) 亦稱鐵氟龍® (Teflon®)，如表 2-1 所示，其材料特性為良好的耐熱性、化學惰性(耐酸鹼性)和優異的絕緣穩定性及低摩擦性。為了可以於實驗期間清楚觀察生物培養器內部狀況，管壁選用透明 PC (polycarbonate)管，PC 全名為聚碳酸酯，是一種綜合性能優良的非晶型熱塑性樹脂，具良好的電絕緣性、穩定性、耐熱性、耐寒性及耐化學腐蝕性，同時強度高、韌性佳，還具有無毒、自熄、阻燃等優點。止水 O-ring 分別裝置於各活動部件接合處，用以防止活塞作用期間培養液洩漏溢流；靜脈帽設計作為方便接管之快速接頭，其與鐵氟龍件接合處以生物組織黏膠(3M Vetbond™)黏合固定，下方為入液口、上方則為出液口，為了防止培養液從活動部件接合處溢出，故設計入液口面積小於出液口，用以調整培養液之進出速率。

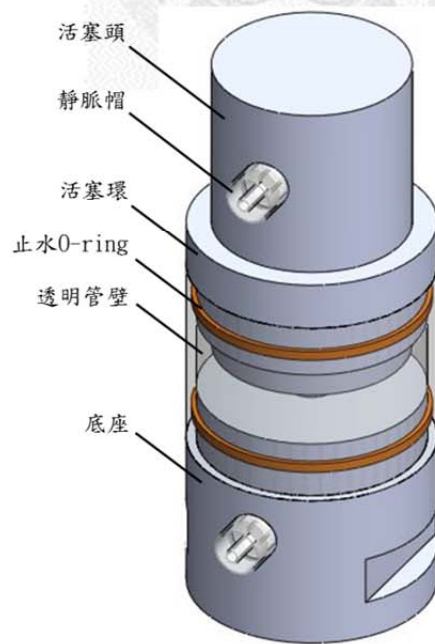


圖 2-2 生物培養器各部件示意圖

表 2-1 鐵氟龍材料特性表

| 鐵氟龍 Teflon - 分子式(C <sub>2</sub> F <sub>4</sub> ) <sub>n</sub> |                      |  |
|---|----------------------|--|
| 性質  | 數值                   | 單位                                       |
| 比重  | 2.10 - 2.30          | gr/cm <sup>3</sup>                       |
| 抗拉強度  | 280 - 352            | kg/cm <sup>2</sup>                       |
| 伸長率   | 200 - 400            | %  |
| 抗拉彈性係數  | 0.41*10 <sup>4</sup> | kg/cm <sup>2</sup>                       |
| 壓縮強度  | 120                  | kg/cm <sup>2</sup>                       |
| 壓縮彈性係數  | 0.50*10 <sup>4</sup> | kg/cm <sup>2</sup>                       |
| 硬度  | 塑氧 D 55-55           | ROCK well                                |
| 熔點  | 317 - 327            | °C                                       |
| 熱變形溫度(4.6 kg/cm <sup>2</sup> )                                | 260                  | °C                                       |
| 絕緣破壞強度  | 45                   | Kv/mm                                    |
| 熱傳導率(C/cm)  | 5.9                  | 10 <sup>4</sup> -cal/sec/cm <sup>2</sup> |
| 熱膨脹係數   | 9.9                  | 10 <sup>5</sup> cm/°C                    |
| 吸水率(24 Hrs)   | < 0.01               | %  |
| 弱酸影響  | 耐性非常強                | 耐性                                       |

\*註:資料來源-晶利實業股份有限公司 <http://www.jing-li.com.tw/table03.php>

### 2.1.2 循環系統

椎間盤之養分傳輸是影響其健康與否的重要因子，為了達到體外實驗之最佳類比效果，本實驗利用養分循環系統模擬人體內部養分傳輸循環效應。循環系統主要分為兩大部分，第一部分為位於培養箱內部用以存放培養液之離心管(容量 50 ml)，該離心管使用自制三孔蓋作為培養液傳輸之通道，其作用分別為吸取培養液、回收培養液以及氣體交換，吸取培養液的通道使用三通接頭增加更換管線

的便利性，氣體交換孔道則使用孔徑  $0.2\mu\text{m}$  的過濾器防止空氣中的髒污或細菌藉由氣體交換進入培養液；第二部分則為放置於培養箱外部之微量蠕動式幫浦 (ChromTech, TP-400T)，如圖 2-3 所示，幫浦用以提供傳輸動力，使得培養液經由蠕動式幫浦連續作用下推動前進，其可調參數為轉速、運作時間及休息時間，為符合生理條件，幫浦轉速設定為  $0.8\text{rpm}$  ( $200\ \mu\text{l}/\text{min}$ )。整體循環系統使用矽膠管相連，使用小口徑入液管及大口徑出液管，如前所述，此設計乃用以防止培養液釋出速度過慢導致液體滿溢後由培養器部件接合處洩漏。



圖 2-3 微量蠕動式幫浦(四流路)

### 2.1.3 負載系統

日常生活中無論是行走、跑動或休息，椎間盤皆處於載重狀態，同時根據文獻所述<sup>61</sup>，若沒有給予適當負載，可能導致椎間盤內部細胞基質基因表徵下降，並加速椎間盤退化；因此為了模擬人體內椎間盤的實際生理環境，本實驗利用動態式負載系統給予椎間盤符合生理條件之重量負荷。本實驗之作動元件選用小型單動向氣壓缸(Koganei, CSA40X30)，如圖 2-4，其缸徑  $40\text{mm}$ 、行程  $30\text{mm}$ 、最大推力可達  $1200\text{N}$  (輸入氣壓  $1\text{MPa}$ )，單動向氣壓缸之壓縮空氣僅於活塞單側施加，壓力源消失後活塞回行靠其內裝彈簧、外力或自重復位，其優點在於僅需單側輸入氣源，故可節省一半壓縮空氣。如圖 2-5 所示，整體設計為四組氣壓缸平行架設於高強度鎳鋼合金架板上，再使用不銹鋼導桿及可調整高度之導桿架固定

架板，而底板部分則使用鋁板製作滑槽用以配合生物培養器之底座設計。為模擬人體日常活動時椎間盤受力狀況，日夜循環負載之參數設定為 8 小時的靜態負載 (0.2MPa) 以及 16 小時的動態負載(peak to peak=0.2-0.8MPa, freq.=0.2Hz)。

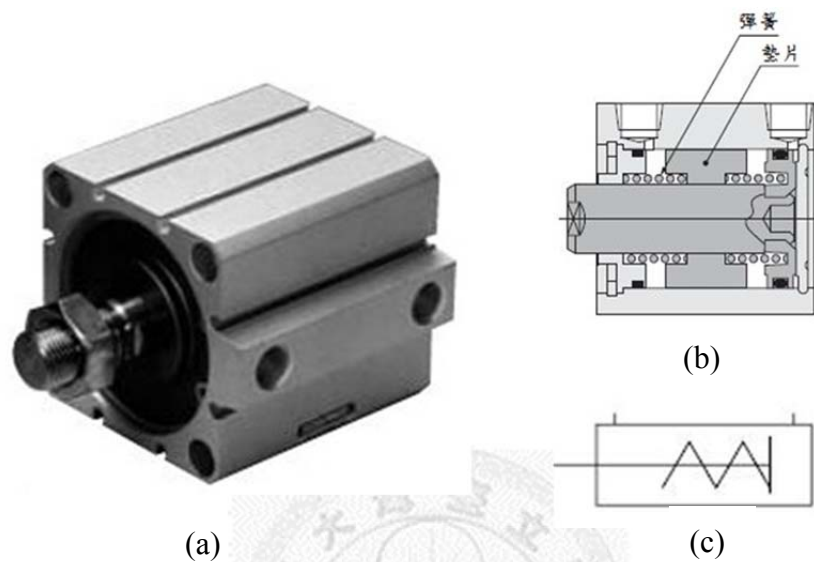


圖 2-4 小型單動向氣壓缸 (a)實體圖 (b)內部示意圖 (c)作用方式簡圖

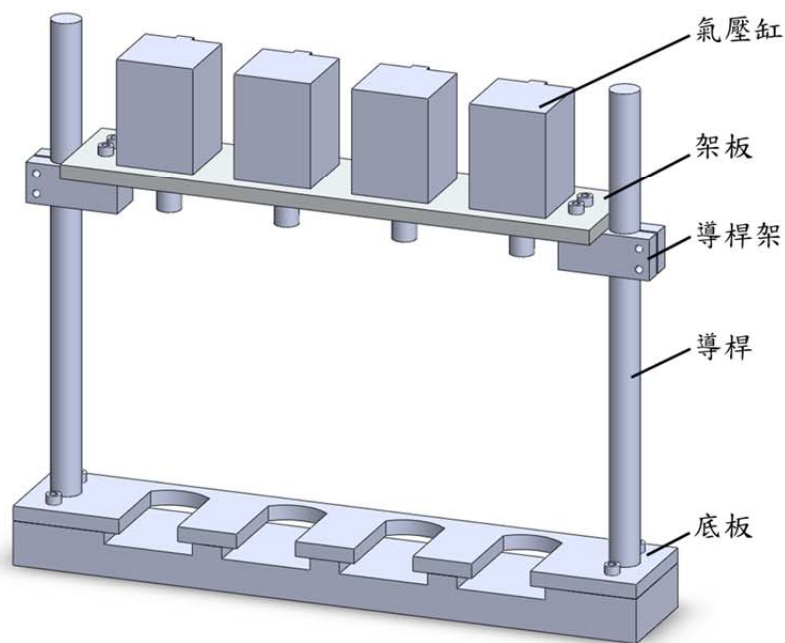


圖 2-5 負載系統整體設計圖

## 2.1.4 動力系統

本實驗之動力系統配置方塊圖如圖 2-6，其氣壓發生源來自於培養箱外部之靜音型空氣壓縮機(Jun-air, JA12-40)，如圖 2-7 所示，此空壓機主要部件為兩個電動加壓馬達、一個儲氣桶、一個出口調壓過濾閥以及電流過載安全斷電裝置，其各項工作參數如表 2-2；此為油潤式空壓機，特點在於馬達作用時十分安靜，為維護儲氣量及壓縮空氣品質須定時排水及清洗調壓過濾閥之濾芯。

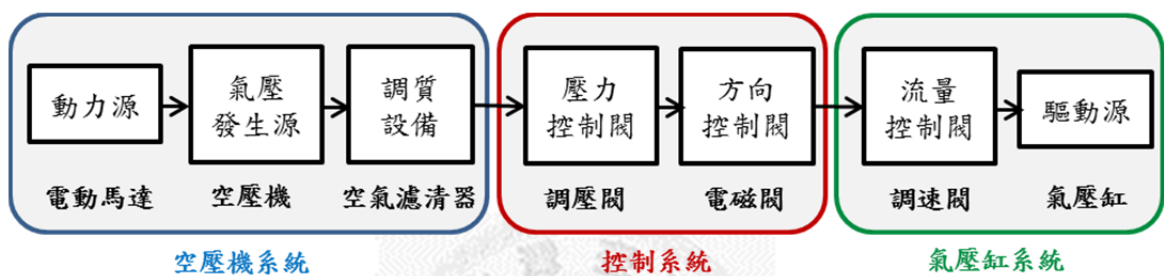


圖 2-6 動力系統配置圖



圖 2-7 空氣壓縮機

表 2-2 空氣壓縮機工作參數

| 型號        | JA 12-40 靜音空氣壓縮機             |
|-----------|------------------------------|
| 馬達功率 / 馬力 | 0.79 kw / 1.08 HP            |
| 出氣量       | 120 L/min (@ 8 bar 74 L/min) |
| 出氣最大壓力    | 8 bar (120 psi)              |
| 儲氣瓶容量     | 40 L                         |
| 機器重量      | 48 kg                        |
| 壓縮機噪音     | 48 dB(A) / 1 meter           |
| 電源        | AC 115V, 60 Hz, 12.4 A       |
| 外部尺寸      | 556*446*581 mm (L*W*H)       |

整體控制系統如圖 2-8 所示，使用五口二位電磁閥搭配電子式計時器用以調控氣壓大小及動態作用之給氣頻率，內含四個電磁閥、兩個調壓過濾器、兩個計時器、兩個逆止閥，作動方式如下：調壓過濾器 1 之壓力設定為 60psi，過濾器 2 設定為 20psi，當計時器 1 的狀態為 on 時，60 psi 的壓縮空氣經由上方電磁閥通過逆止閥，再藉由計時器 2 控制後方兩組電磁閥以頻率 0.2 Hz 持續性開關，使四組氣壓缸以同時間兩組推出、兩組回彈的方式進行動態負載；當計時器 1 的狀態為 off 時，20 psi 的壓縮空氣經由下方電磁閥通過逆止閥，再通過後方兩組常開電磁閥同時給予四組氣壓缸持續性靜態負載。

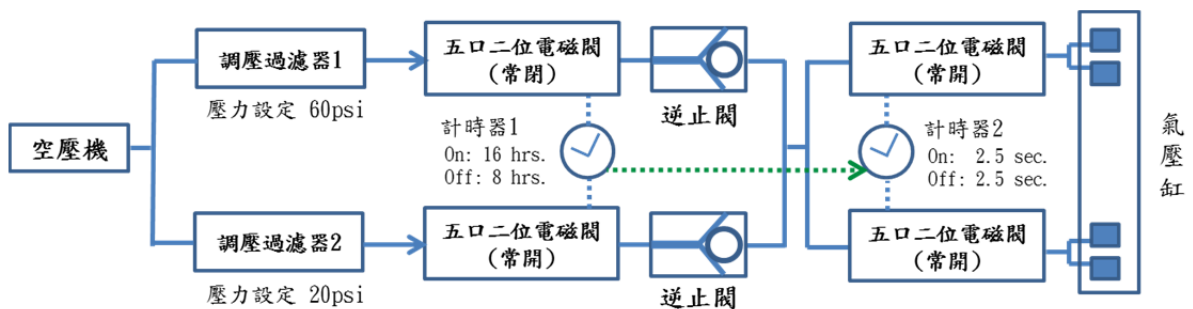


圖 2-8 控制系統配置圖

## 2.2 潛變測試機台(Creep Testing Apparatus)

此機台主要搭配 LabVIEW 控制程式用以測試黏彈性體之潛變性質，如圖 2-9 所示，各部位名稱分別為砝碼、載重平台、導桿、一維測力元及光學尺。此外，由於平均荷重須達 500N 左右，所使用之砝碼數量多且生物培養器之活塞頭頂面積小，故設計上下各一平板作為平均受力之用，測試平台使用鋁擠型作為腳撐，並以角鋼數個固定於桌上。經由測試過程中接收到定力負載下之椎間盤位移變化量，可計算求出試樣的潛變性質。

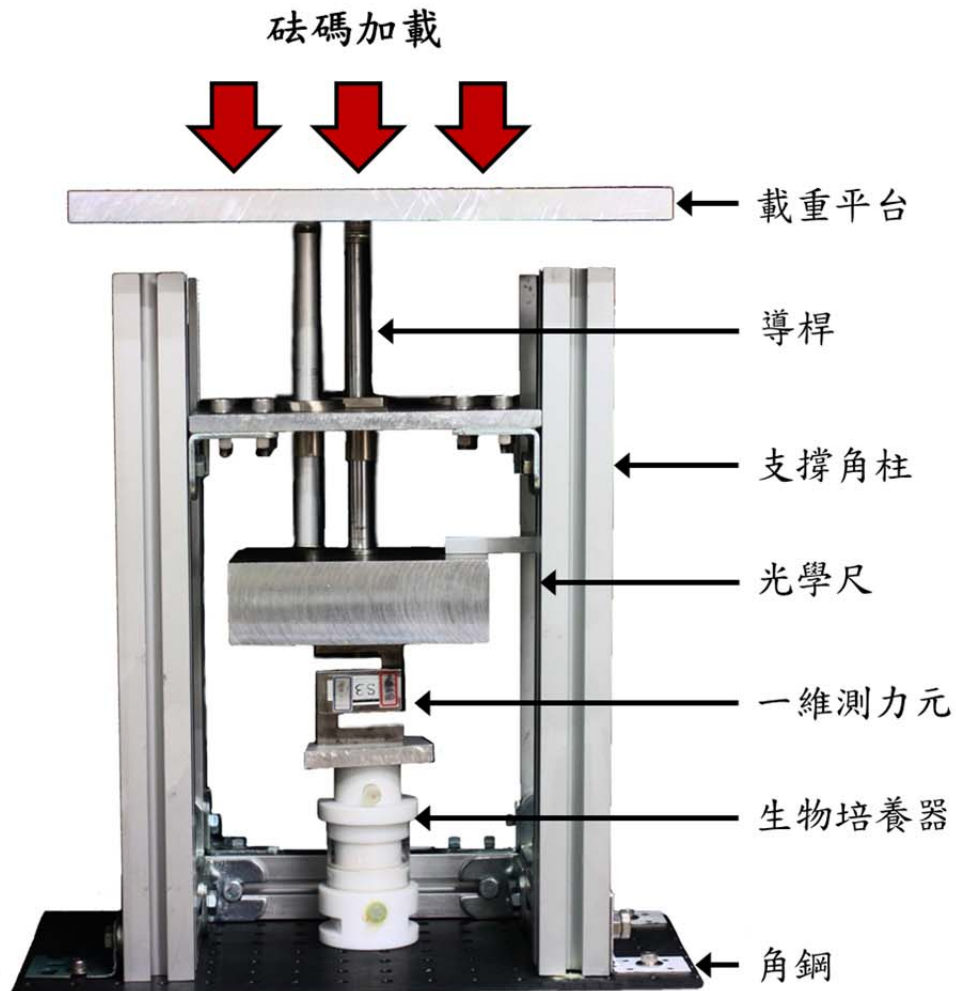


圖 2-9 潛變測試機台

### 2.3 連續式衝擊測試平台(Continuous Impact Testing Apparatus)

連續式衝擊測試平台(簡稱 CITA)為多功能材料測試機，其整體機構如圖 2-10 所示，可依照實驗需求裝設相對應之感測器，目前機台上裝有一個線性電位計(linear potential meter)以及三個一維測力元(load cell)，其量測參數為試樣在測試時所承受的軸向載重與軸向形變位移量，最後經由訊號擷取可儲存實驗測試過程中各種感測器的數據資料。往復式衝擊模組包含一個直流馬達與兩個偏心情輪，可固定於衝擊錘上，乃利用兩個轉向相反的偏心情輪產生週期性的軸向循環負載，本實驗使用之負載大小為 190~590N，平均力量為 420N，頻率為 5Hz(馬達轉速為 1500rpm)。若衝擊過程接觸試樣的時間為 40ms，則衝擊能量約 1.2J。

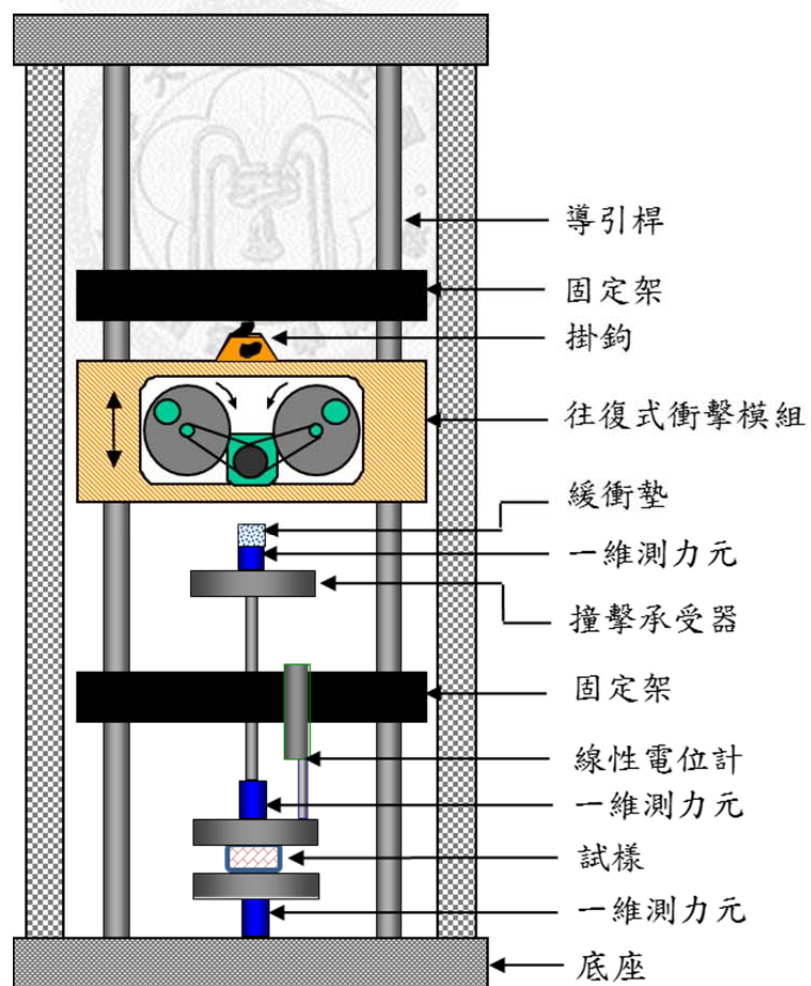


圖 2-10 連續式衝擊測試機台示意圖



## 第三章 材料與方法

### 3.1 試樣準備

本實驗使用六個月大的年輕豬隻，試樣取用為胸椎第一到第六節(T1~T6)椎骨間的椎間盤，為確保試樣新鮮使椎間盤內部保有一定數量之活細胞，根據文獻於豬隻屠宰後四個小時內進行實驗<sup>41,42</sup>，並於實驗前確保椎間盤健康無損傷以及完整包覆於肌肉組織中。準備流程如圖 3-1(a)所示，所有工具及手套使用前皆須經過滅菌處理，試樣切除及實驗操作皆於無菌操作台上進行。將試樣置入無菌操作台前，需將取下之 T1 至 T6 整節脊椎使用清潔劑及清水來回沖洗兩次，用於清除表面殘餘之血塊或異物，清潔後將試樣浸入 70% 的酒精溶液中浸泡約 30 分鐘消毒，等工具備齊、試樣消毒完畢後開始處理所需試樣。如圖 3-1(b)所示，試樣取法參照文獻所指<sup>22,41,42</sup>沿著上下椎骨終板(vertebrae endplate)邊緣平行切除並盡量保留軟骨椎終板(cartilage endplate)，移除不必要之肌肉、韌帶、小面關節及後脊突部分，最後取下完整椎間盤包含椎間環、椎間核及上下軟骨椎終板如圖 3-1(c)所示。

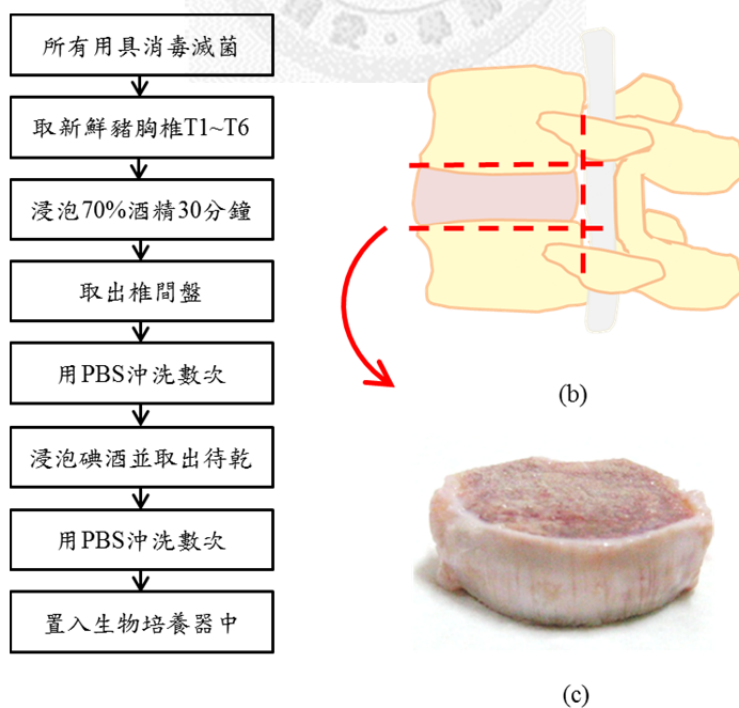


圖 3-1 試樣準備示意圖 (a)準備步驟流程圖(b)切除部位示意圖(c)完整椎間盤

最後將取下之試樣用無菌生理食鹽水(phosphate buffered saline, PBS)加入 0.5%的  
 抗生素(gentamicin)配合針筒沖洗數次，確認清除多餘的血塊及組織後，將試樣浸  
 入醫用碘酒(beta-iodine)中，待液體完全覆蓋表面後取出靜置 2~5 分鐘待乾，最後  
 使用含抗生素之食鹽水將表面碘酒清洗乾淨，上述步驟完成後即可將處理完的試  
 樣置入自製生物培養器中。生物培養液參考文獻<sup>37</sup>之配方如下：DMEM 4.5 g/L,  
 NaHCO<sub>3</sub> 3.7 g/L, FBS 10%, HEPES 25mM, P/S 1%, Gentamicin 3mL/L。

### 3.2 實驗流程

本實驗主要分為五個組別，分別是健康組(intact, 簡稱 I)、蛋白質變性組(trypsin, 簡稱 T)、蛋白質變性後治療組(trypsin+genipin, 簡稱 G)、蛋白質變性加破壞組 (trypsin+fatigue, 簡稱 TF)、蛋白質變性加破壞後治療組(trypsin+fatigue+genipin, 簡稱 GF)，實驗流程如圖 3-2 所示，每組各 8 個試樣，五組共 40 個試樣，每個試樣將於培養 7 天後進行潛變測試及動態性質測試。

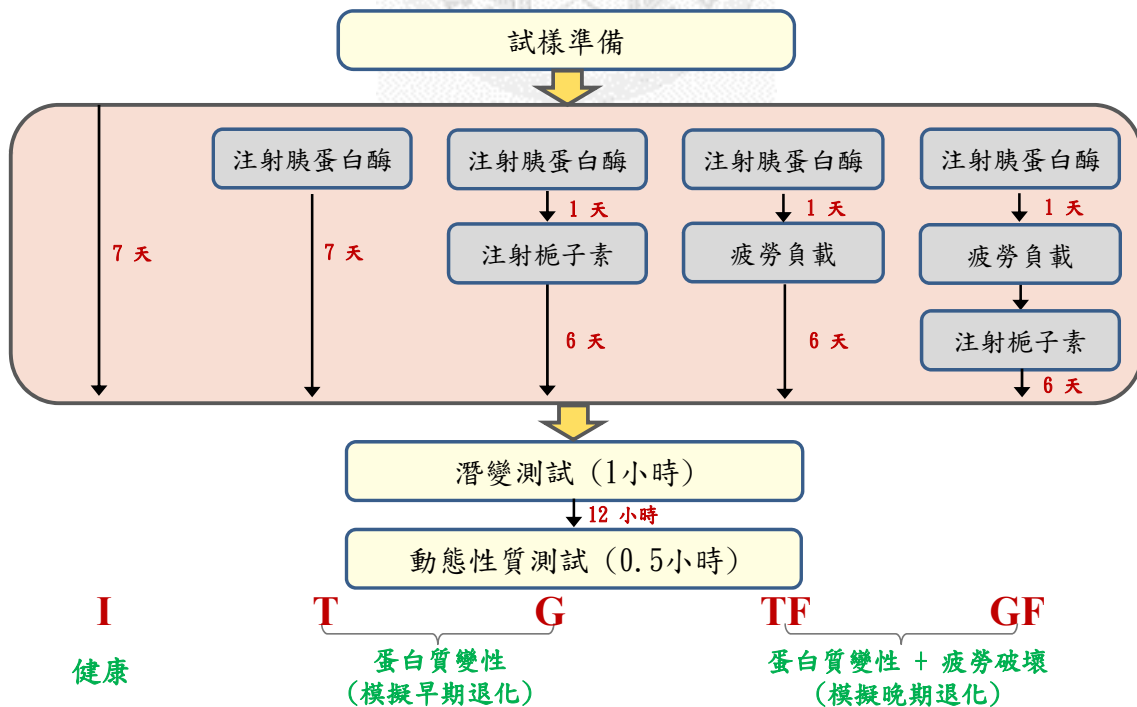


圖 3-2 實驗流程圖

### 3.3 實驗方法

實驗流程中健康對照組不作任何破壞或治療，處理試樣完畢隨即置入恆溫培養箱，培養一週後取出作材料測試。本研究使用胰蛋白酶(trypsin)模擬椎間盤退化早期蛋白質變性的過程，模擬退化組中每個試樣於第一天處理完畢後打入 0.5 ml, 0.25%的胰蛋白酶，模擬椎間盤晚期嚴重退化的組別將於第二天施加高強度之疲勞負載(平均力量 420N, 負載頻率 2.5Hz, 負載時間 4hours, 負載次數約 36000 cycles)，而治療組則進一步於第二天打入 1 ml, 0.33%的梔子素(genipin)作治療，各組均於培養一週後作力學測試及生化測試。

#### 流變性質測試

利用本實驗室自製之潛變測試機台作測試，根據每個椎間盤大小給予 0.8MPa 的定力負載，測試時間 1 小時。

#### 動態性質測試

利用本實驗室自製之連續式衝擊測試平台作測試，於試樣擺放完畢後作一次衝擊測試(接觸時間 40ms, 衝擊能 1.2J), 再施予試樣一循環負載 30 分鐘(平均力量 420N, 負載頻率 5Hz, 負載次數 9000 cycles), 循環負載後再作一次衝擊測試。此測試中，循環負載之用意在於了解椎間盤於休息及日常活動狀態下(人體脊椎一週疲勞負載約 18000 次)可能表現出的動態性質。

#### 水份含量

將作完力學測試的試樣對半剖開，如圖 3-3 分別取下三個部位的組織，椎間核(nucleus pulposus)、內層椎間環(inner anulus fibrosus)、外層椎間環(outer anulus fibrosus)，取樣大小約為直徑 5mm。試樣取下後放入事先量好重量的小鐵盒，量取試樣濕重後使用冷凍乾燥法去除水份，再量取乾重並求出水份含量(式 3-1)。

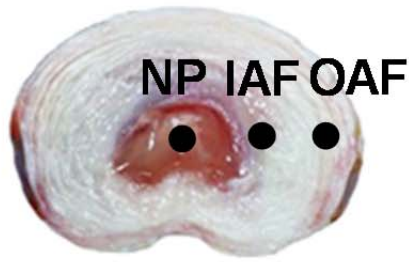


圖 3-3 組織取樣部位示意圖

$$\text{水份含量} = \frac{\text{試樣濕重} - \text{試樣乾重}}{\text{試樣濕重}} \times 100\% \quad (\text{式 3-1})$$

### 染色切片

染色切片準備步驟如圖 3-4 所示，首先使用鑽石切割機將椎間盤沿著正中矢狀面 (mid-sagittal) 以及左右兩側各切厚度為 2mm 的粗切片，再使用 10% 中性福馬林緩衝液固定組織，浸泡 3~4 天後將溶液置換成 10% EDTA 脫鈣液，浸泡脫鈣液約兩週 (2~3 天更換一次脫鈣液)，確認已無硬組織後使用石蠟包埋，利用精密切片機將試樣切成厚度 6  $\mu$ m 的薄切片。接著使用 Masson's trichrome 染色法，Masson's trichrome 染色法可將膠原蛋白組織染成藍色，將骨組織染成紅色。組織染色完成後，將蓋玻片覆於載玻片上封存，便可進行顯微觀察及攝影，本實驗使用放大倍率為 5X 及 10X 之顯微鏡分別用於觀察椎間環及椎間核。



圖 3-4 染色切片流程圖

### 3.4 數學模型

#### 3.4.1 流變性質

線性雙相數學模型的統御方程式(governing equation)如式 3-2 所示， $H_A$  代表聚合模數(aggregate modulus)， $\check{k}$  代表滲透性(permeability)， $u(z, t)$  代表椎間盤位移量(disc displacement)， $z$  代表從椎間盤從中心縱向往外延伸的直線距離， $t$  則代表負載時間；其中，初始條件(initial condition)為  $u(z, 0) = 0$ ，邊界條件(boundary condition)為  $u(0, t) = 0$ 。椎間盤流變學線性雙向數學模型中  $H_A$  跟  $\check{k}$  這兩項材料參數可透過潛變測試(creep test)求解，潛變測試中椎間盤所受應力可由式 3-3 表示 (i.e., 範圍由椎間盤中心  $z = 0$  至椎終板邊緣  $z = h/2$ )，其中  $p(z, t)$  代表椎間盤受壓狀態時內部液體壓力，應力值  $\sigma(t)$  於實驗中為定值(i.e.,  $-P_A$ )，假設邊界條件為椎終板端液體壓力為零(i.e.,  $p(h/2, t) = 0$ )，此時式 3-3 可由式 3-4 表示，最後計算得到此式通解(general solution)如式 3-5 所示。

$$\frac{\partial^2 u}{\partial z^2} - \frac{1}{H_A \check{k}} \frac{\partial u}{\partial t} = 0 \quad (\text{式 3-2})$$

$$\sigma(t) = -p(z, t) + H_A \frac{\partial u}{\partial z} \quad (\text{式 3-3})$$

$$H_A \frac{\partial u}{\partial z} \Big|_{z=\frac{h}{2}} = -P_A \quad (\text{式 3-4})$$

$$u(z, t) = -\frac{P_A}{H_A} \left\{ z - \frac{2h}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{(-1)^n}{\left(n + \frac{1}{2}\right)^2} \sin \left[ \left(n + \frac{1}{2}\right) \frac{2\pi z}{h} \right] \times \exp \left( \frac{-4H_A \check{k}}{h^2} \left(n + \frac{1}{2}\right)^2 \pi^2 t \right) \right\} \quad (\text{式 3-5})$$

### 3.4.2 動態力學性質

本研究將椎間盤模擬成一維自由震盪之彈簧阻尼系統，系統示意如圖 3-5(a)，此系統之統御方程式如式 3-6 所示，其中  $M$  為質量(mass)代表衝擊承受器及椎骨的質量總和， $X$  代表椎間盤的軸向位移量， $K$  代表勁度模數(stiffness)，而  $C$  代表阻尼係數(damping coefficient)。衝擊測試期間，椎間盤軸向位移相對於時間的變化波形有四個主峰(如圖 3-5(b))，較大的峰值位於第一及第四個波，代表衝擊期間(impulse period)衝擊錘接觸椎間盤與椎間盤共同震盪的位移量，第二及第三個波的峰值較小，代表衝擊錘彈離椎間盤後，椎間盤自由震盪(free vibration)的位移量。若令第二波峰值為  $x_1$ ，第三波峰值為  $x_2$ ，自由震盪週期  $\tau_d$  為第二波峰與第三波峰的時間間隔，則經由公式 3-7, 3-8, 3-9，可求得椎間盤的勁度( $K$ )與阻尼係數( $C$ )。

$$M\ddot{x} + C\dot{x} + Kx = 0 \quad (\text{式 3-6})$$

$$K = M \left( \frac{2\pi}{\tau_d} \right)^2 \quad (\text{式 3-7})$$

$$\xi = \frac{1}{2\pi} \ln \left( \frac{x_1}{x_2} \right) \quad (\text{式 3-8})$$

$$C = 2\xi\sqrt{KM} \quad (\text{式 3-9})$$

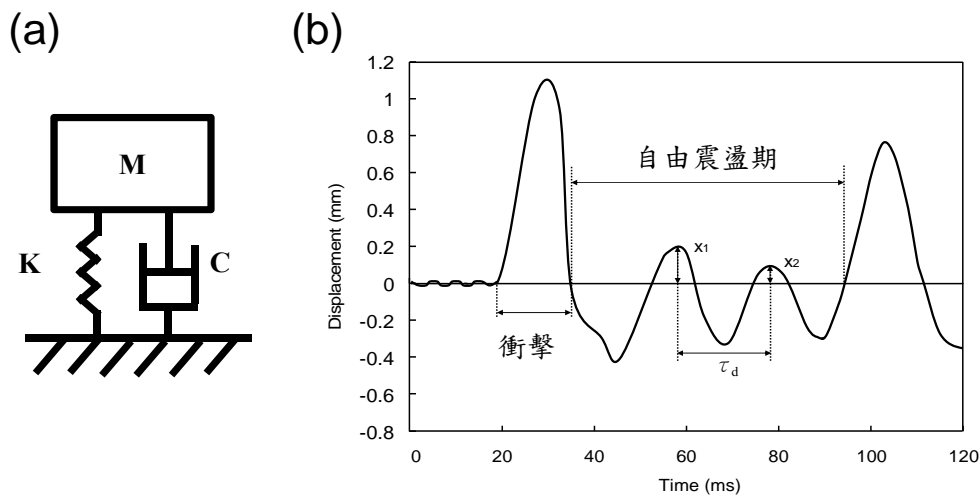


圖 3-5 (a)一維自由震盪彈簧阻尼系統 (b)衝擊測試時椎間盤軸向位移-時間圖

### 3.5 統計分析方法

以單因子變異數分析法(One-way ANOVA)分析「健康組(I)」、「蛋白質變性組(T)」、「蛋白質變性後治療組(G)」、「蛋白質變性加破壞組(TF)」、「蛋白質變性加破壞後治療組(GF)」五組間是否有顯著性差異，使用 LSD 後設分析法判定  $p$  值 $<0.05$  代表兩組間具顯著性差異。動態性質測試中，各組疲勞負載前後(0min,30min)的比較使用相依樣本 T 檢定(pair t-test)分析，判定  $p$  值 $<0.05$  有顯著性差異。



## 第四章 實驗結果

### 4.1 力學性質測試結果

#### 4.1.1 椎間盤高度

由於椎間盤高度代表其結構穩定性，且於本研究中潛變測試實驗主要量測參數為椎間盤位移量，故椎間盤起始高度及高度改變量是必要量測值。如圖 4-1 所示，椎間盤高度(disc height)於第一天各組別間無顯著差異，而培養一週後，健康椎間盤高度為 4.267 (0.240) mm，注射胰蛋白酶產生蛋白質變性的椎間盤高度下降為 2.989 (0.242) mm，於蛋白質變性後使用梔子素治療，其椎間盤高度明顯回復為 3.511 (0.226) mm；此外，蛋白質變性再加上疲勞破壞，其椎間盤高度明顯低於各組別 2.838 (0.334) mm，然而加入梔子素治療後，其高度一樣有回復的效果 3.213 (0.230) mm。其中，各組別相對於健康椎間盤皆有顯著性差異( $p < 0.001$ )，梔子素治療對於蛋白質變性以及變性後加上疲勞破壞的椎間盤高度皆有顯著回復效果( $p < 0.001$ ,  $p = 0.006$ )，比較不同退化程度的椎間盤治療效果也有顯著性差異( $p = 0.032$ )。

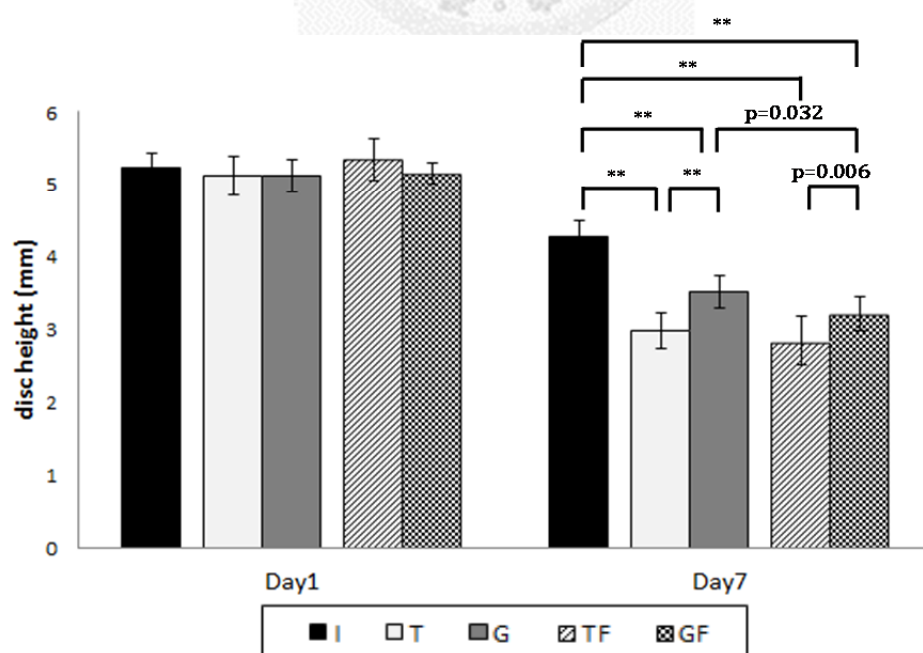


圖 4-1 各組別椎間盤高度示意圖 (\*\*表示  $p < 0.001$ )



#### 4.1.2 流變性質測試

健康椎間盤於培養一週後的聚合模數為 1.737 (0.478) MPa、液體滲透度為 0.269 (0.038)  $\times 10^{-15} \text{m}^4/\text{Ns}$ ，蛋白質變性水解後使得椎間盤聚合模數顯著下降為 1.304 (0.244) MPa ( $p=0.027$ )、液體滲透度也顯著下降成 0.197 (0.052)  $\times 10^{-15} \text{m}^4/\text{Ns}$  ( $p=0.007$ )；若再加上疲勞破壞，相對於蛋白質變性組，其椎間盤聚合模數 1.478 (0.283) MPa 沒有顯著變化 ( $p>0.05$ )，但液體滲透度顯著下降為 0.143 (0.041)  $\times 10^{-15} \text{m}^4/\text{Ns}$  ( $p=0.040$ )，如表 4-1 所示。加入梔子素交聯會使得蛋白質水解後的椎間盤聚合模數及液體滲透度皆趨近於健康椎間盤( $H_A=1.809\pm 0.315$  MPa;  $\check{k}=0.224\pm 0.062 \times 10^{-15} \text{m}^4/\text{Ns}$ )，與治療前比較，聚合模數上升且有顯著性差異( $p=0.011$ )，但液體滲透度沒有顯著變化；然而，對於水解後加入疲勞破壞的椎間盤，梔子素交聯會使得聚合模數及液體滲透度皆有上升趨勢( $H_A=1.906\pm 0.479$  MPa;  $\check{k}=0.204\pm 0.056 \times 10^{-15} \text{m}^4/\text{Ns}$ )，相對於治療前有顯著性差異( $p=0.028$ ,  $p=0.021$ )，如表 4-2 所示。流變學性質測試之整體結果如圖 4-2 及圖 4-3 所示。

表 4-1 模擬不同退化階段對於椎間盤聚合模數及液體滲透度的影響

|         | 聚合模數 $H_A$ (MPa) | 液體滲透度 $\check{k}$ ( $\times 10^{-15} \text{m}^4/\text{Ns}$ ) |
|---------|------------------|--|
| 蛋白質變性   | 1.304 (0.244)    | 0.197 (0.052)  |
| 變性+疲勞破壞 | 1.478 (0.283)    | 0.143 (0.041)  |
| p-value | $p>0.05$         | * $p=0.040$  |

表 4-2 使用梔子素治療對於不同退化階段之椎間盤影響

|         | 蛋白質變性         |  | 蛋白質變性+疲勞破壞    |  |
|---------|---------------|--|---------------|--|
|         | $H_A$ (MPa)   | $\check{k}$ ( $\times 10^{-15} \text{m}^4/\text{Ns}$ ) | $H_A$ (MPa)   | $\check{k}$ ( $\times 10^{-15} \text{m}^4/\text{Ns}$ ) |
| 治療前     | 1.304 (0.244) | 0.197 (0.052)  | 1.478 (0.283) | 0.143 (0.041)  |
| 治療後     | 1.809 (0.315) | 0.224 (0.062)  | 1.906 (0.479) | 0.204 (0.056)  |
| p-value | * $p=0.011$   | $p>0.05$   | * $p=0.028$   | * $p=0.021$  |

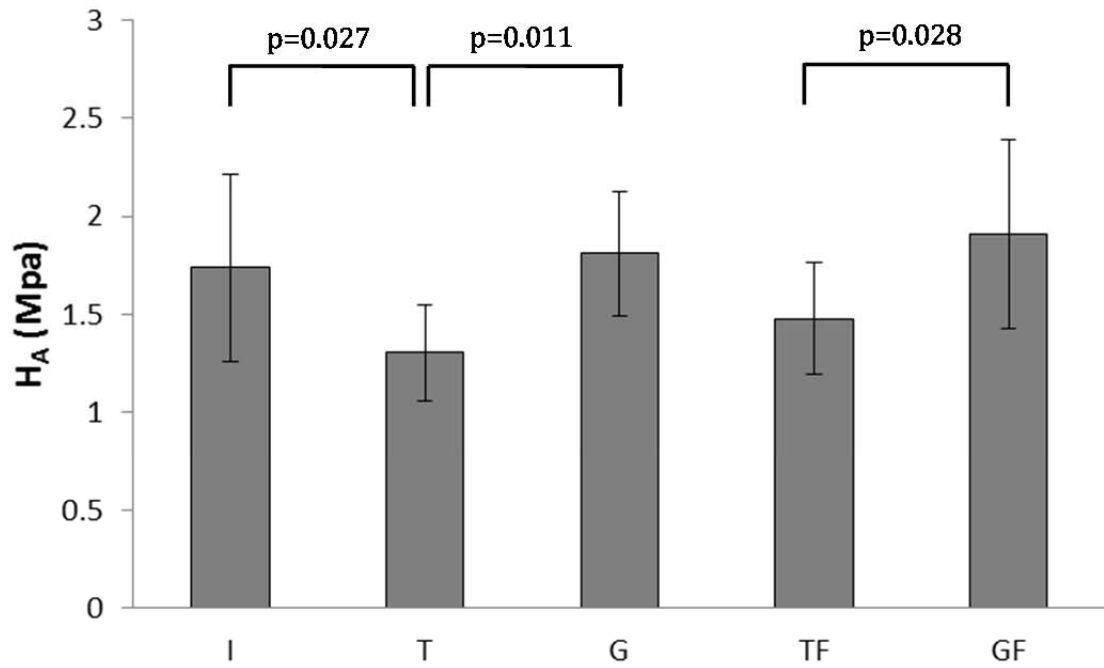


圖 4-2 聚合模數與椎間盤退化階段及梔子素治療之關係圖

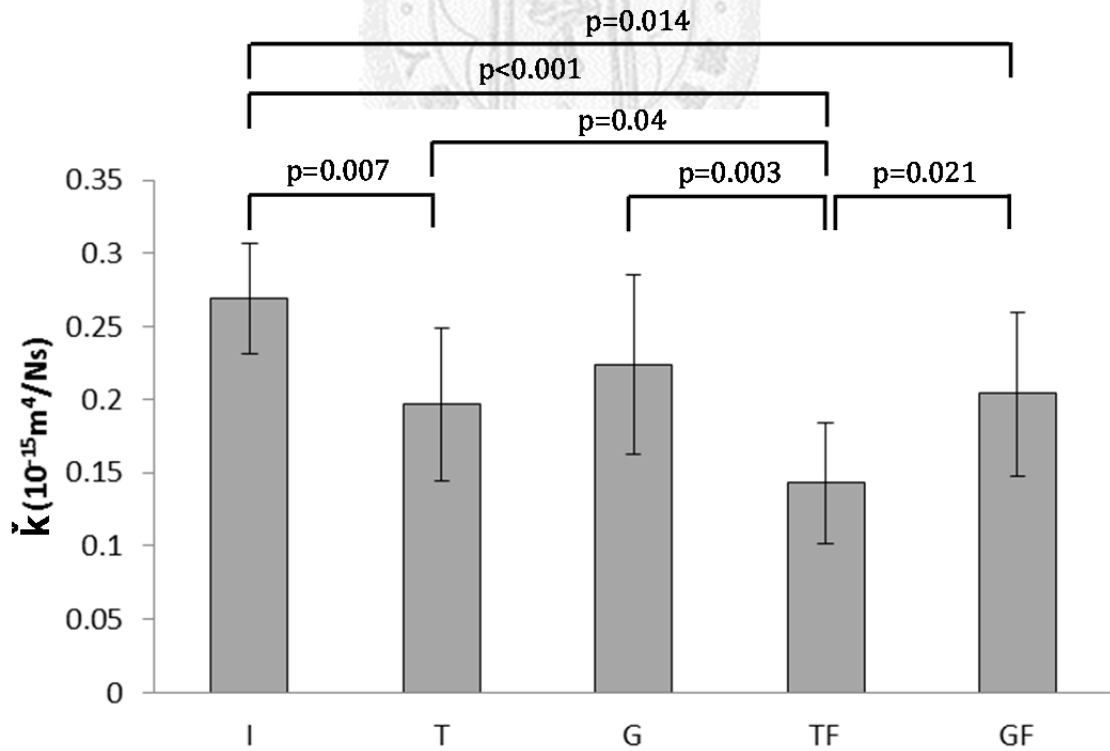


圖 4-3 液體滲透度與椎間盤退化階段及梔子素治療之關係圖

### 4.1.3 動態性質測試

健康椎間盤於在 30 分鐘循環負載前後勁度值及阻尼係數皆沒有顯著變化，顯示其功能完整性。各組別於負載前後之數值變化如圖 4-4 及圖 4-5 所示，在蛋白質變性加上治療組以及蛋白質變性加上破壞組的勁度值結果有顯著性上升 ( $p=0.027, p=0.031$ )，其餘組別於負載前後勁度值及阻尼係數皆沒有顯著變化。

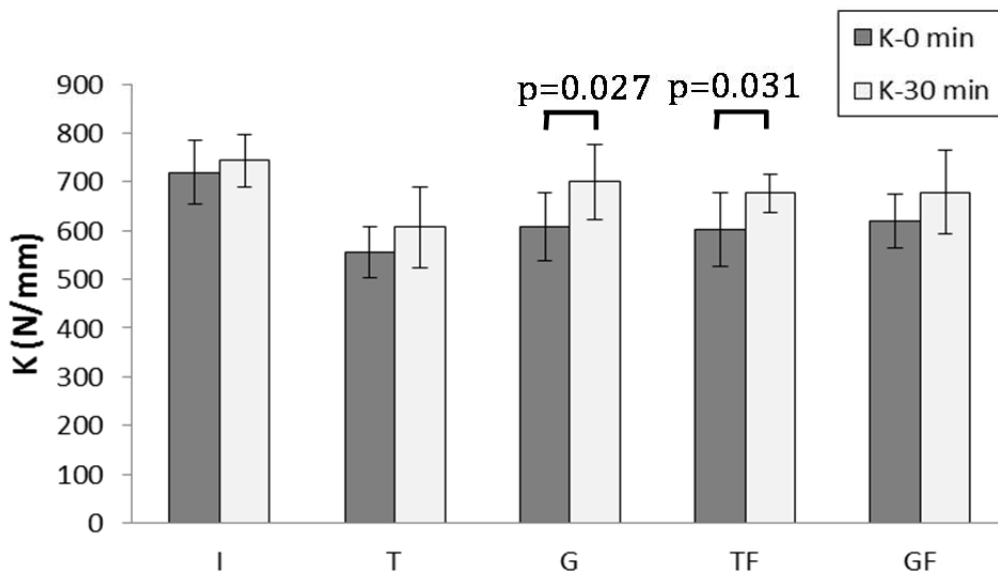


圖 4-4 各組別之勁度模數於疲勞負載前後比較圖

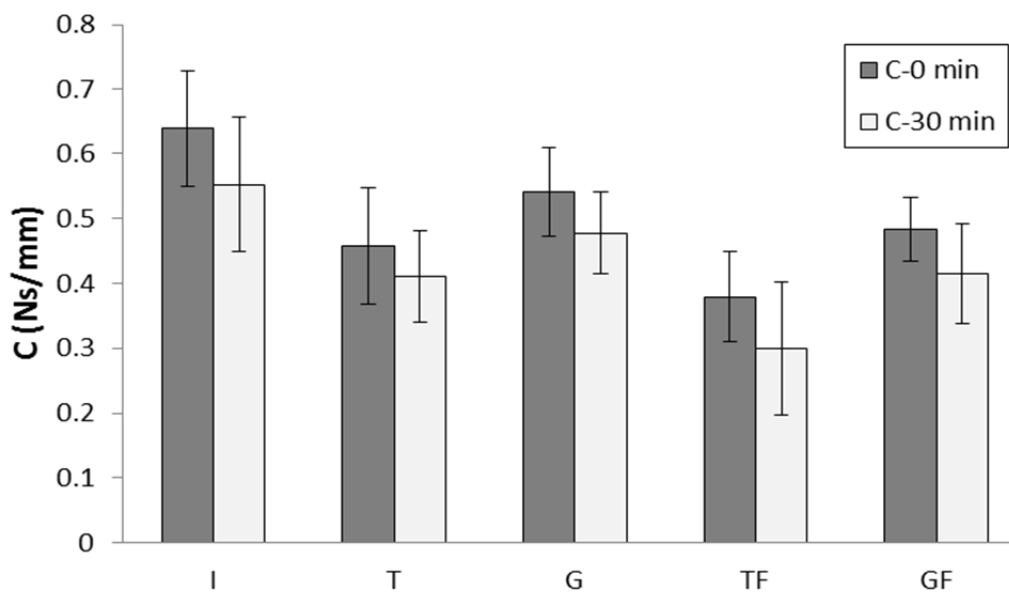


圖 4-5 各組別之阻尼係數於疲勞負載前後比較圖

以下比較勁度於本研究各組別間的差異，循環負載前(0 min)，無論是不同退化階段或加入梔子素治療，各組別相對於健康椎間盤(718.90±64.19 N/mm)皆有顯著性下降：蛋白質變性組為 555.41 (51.46) N/mm ( $p<0.001$ )，蛋白質變性後治療組為 608.09 (70.21) N/mm ( $p=0.001$ )，蛋白質變性加破壞組為 601.01 (75.31) N/mm ( $p=0.001$ )，蛋白質變性加破壞後治療組為 618.17 (54.86) N/mm ( $p=0.003$ )。循環負載後(30 min)，各組勁度值有上升趨勢，除了蛋白質變性組為 606.55 (83.41) N/mm ( $p<0.001$ )以外，各組表現相對於健康椎間盤無顯著性差異。加入梔子素治療後，勁度值亦有回復的趨勢，其中，無論是蛋白質變性後治療 699.22 (76.84) N/mm，或是蛋白質變性加上疲勞破壞後治療 678.01 (85.68) N/mm，其相對於勁度值幾乎沒有恢復的蛋白質變性組皆有顯著性差異( $p=0.012$ ,  $p=0.049$ )。(結果如圖 4-6)

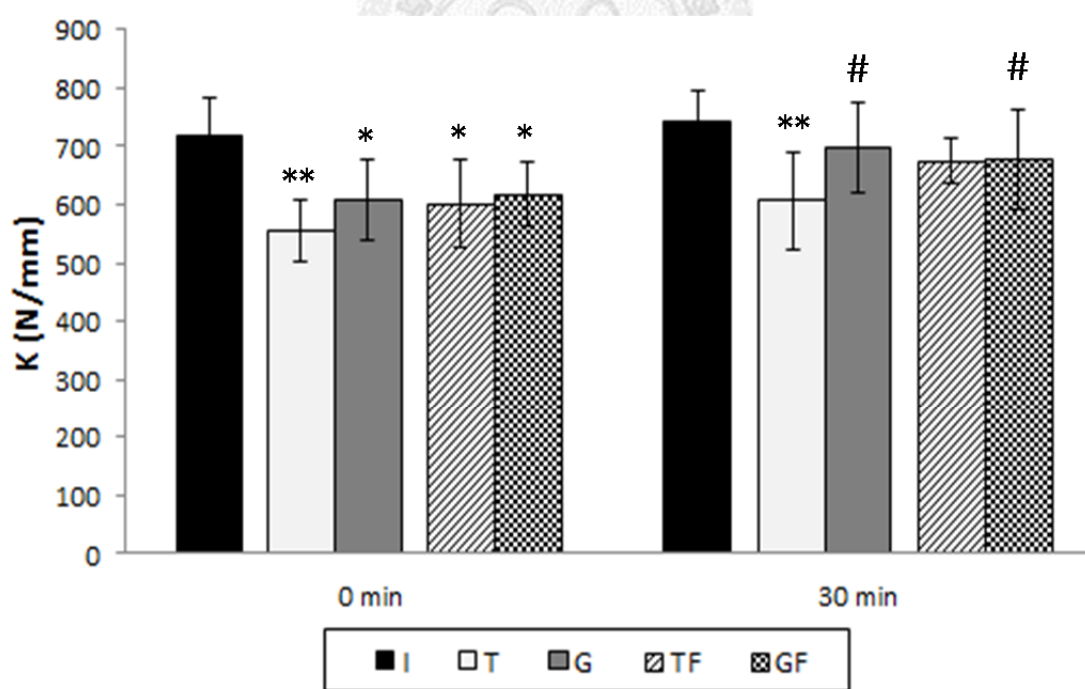


圖 4-6 勁度於不同退化程度及梔子素治療後之負載前後關係圖

[\*及\*\*表示相對於健康椎間盤(I)  $p<0.05$  及  $p<0.001$ , #表示相對於蛋白質變性組(T)  $p<0.05$ ]

於本研究中，阻尼係數為相對敏感之參數，故其各組間差異較大，無論是循環負載前後，one-way ANOVA 統計結果顯示其各組間及組內皆有顯著性差異 ( $p < 0.001$ )。以下經後設分析比較阻尼係數於本研究各組別間的差異，循環負載前 (0 min)，各組別之阻尼係數相對於健康椎間盤(0.639(0.089) Ns/mm)皆有顯著性下降：蛋白質變性組為 0.458 (0.089) Ns/mm ( $p < 0.001$ )，蛋白質變性後治療組為 0.541 (0.069) Ns/mm ( $p = 0.013$ )，蛋白質變性加破壞組為 0.380 (0.070) Ns/mm ( $p < 0.001$ )，蛋白質變性加破壞後治療組為 0.483 (0.050) Ns/mm ( $p < 0.001$ )。循環負載後(30 min)，各組之阻尼係數皆有下降的趨勢，其中蛋白質變性後治療組為 0.478(0.062) Ns/mm，其表現最趨近於健康椎間盤(0.552 (0.104) N/smm)，其餘組別如蛋白質變性組為 0.411(0.071) Ns/mm、蛋白質變性加破壞組 0.299 (0.102) Ns/mm、蛋白質變性加破壞後治療組為 0.414 (0.077) Ns/mm，相對於健康椎間盤皆有顯著性差異( $p = 0.002$ ,  $p < 0.001$ ,  $p = 0.003$ )。加入梔子素治療後，比較結果如表 4-4 所示，阻尼係數相對於退化組於循環負載前後皆有回復的趨勢。(結果如圖 4-7)

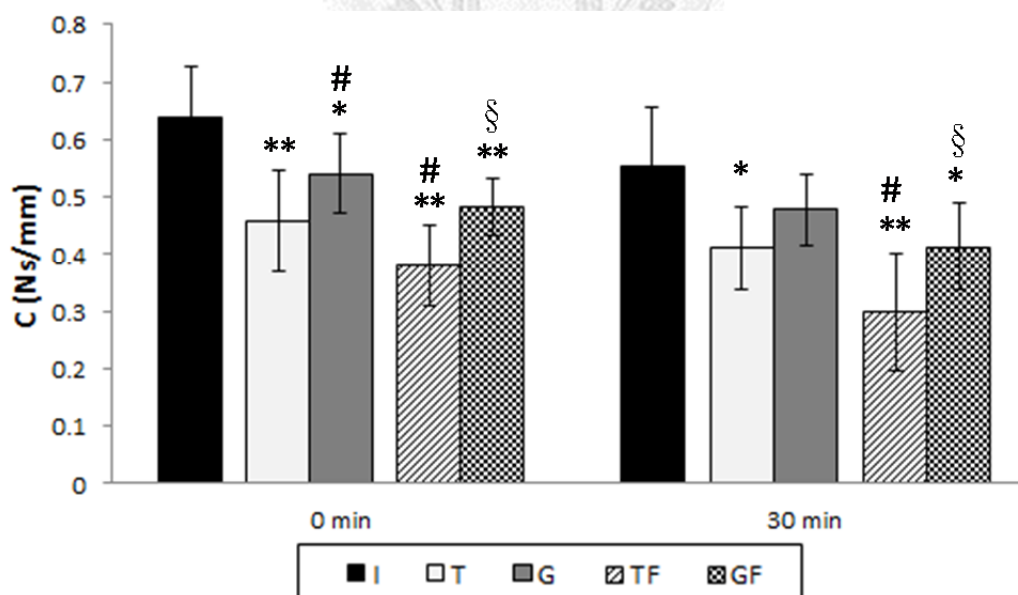


圖 4-7 阻尼係數於不同退化程度及梔子素治療後之負載前後關係圖

[\*及\*\*表示相對於健康椎間盤(I)  $p < 0.05$  及  $p < 0.001$ , #表示相對於蛋白質變性組(T)  $p < 0.05$ ,

§表示相對於蛋白質變性加破壞組(TF)  $p < 0.05$ ]

以下將模擬不同退化階段之椎間盤動態性質比較整理成表 4-3，另外將不同退化階段之梔子素治療效果整理成表 4-4。

表 4-3 模擬不同退化階段對於椎間盤動態性質的影響

|         | 循環負載前 (0min)   |               | 循環負載後 (30min)  |               |
|---------|----------------|---------------|----------------|---------------|
|         | K (N/mm)       | C (Ns/mm)     | K (N/mm)       | C (Ns/mm)     |
| 蛋白質變性   | 555.41 (51.46) | 0.457 (0.089) | 606.55 (83.41) | 0.411 (0.071) |
| 變性加破壞   | 601.01 (75.31) | 0.380 (0.070) | 675.70 (38.24) | 0.299 (0.102) |
| p-value | p>0.05         | *p=0.044      | p>0.05         | *p=0.013      |

表 4-4 使用梔子素治療對於不同退化階段之椎間盤動態性質的影響

|                   |         | 蛋白質變性          |               | 蛋白質變性+疲勞破壞     |               |
|-------------------|---------|----------------|---------------|----------------|---------------|
|                   |         | K (N/mm)       | C (Ns/mm)     | K (N/mm)       | C (Ns/mm)     |
| 循環負載前<br>(0 min)  | 治療前     | 555.41 (51.46) | 0.457 (0.089) | 601.01 (75.31) | 0.380 (0.070) |
|                   | 治療後     | 608.09 (70.21) | 0.541 (0.069) | 618.17 (54.86) | 0.483 (0.050) |
|                   | p-value | p>0.05         | *p=0.033      | p>0.05         | *p=0.009      |
| 循環負載後<br>(30 min) | 治療前     | 606.55 (83.41) | 0.411 (0.071) | 675.70 (38.24) | 0.299 (0.102) |
|                   | 治療後     | 699.22 (76.84) | 0.478 (0.062) | 678.01 (85.68) | 0.414 (0.077) |
|                   | p-value | *p=0.012       | p>0.05        | p>0.05         | *p=0.010      |

## 4.2 生化測試結果

### 4.2.1 水份含量

待力學測試結束後，取出三個部位的椎間盤組織分別為椎間核(nucleus pulposus, 簡稱NP)、內層椎間環(inner anulus fibrosus, 簡稱IAF)、外層椎間環(outer anulus fibrosus, 簡稱OAF)作水份含量的量測。結果顯示，各部位趨勢一致，健康椎間盤水份含量最高(NP: 91.48(3.87)%, IAF: 82.14(5.21)%, OAF: 71.15(3.01)%), 其次為兩組模擬退化後加入梔子素治療的椎間盤，然而，模擬嚴重退化的蛋白質變性加破壞組水份含量最低(NP: 81.05(6.48)%, IAF: 70.99 (3.65)%, OAF: 67.29 (2.95)%), 於椎間核及內層椎間環和各組別間有顯著性差異。各組別於椎間核的水份含量約介於80~95%, 內層椎間環約介於70~85%, 外層椎間環約介於65~75%。(結果示於圖 4-8)

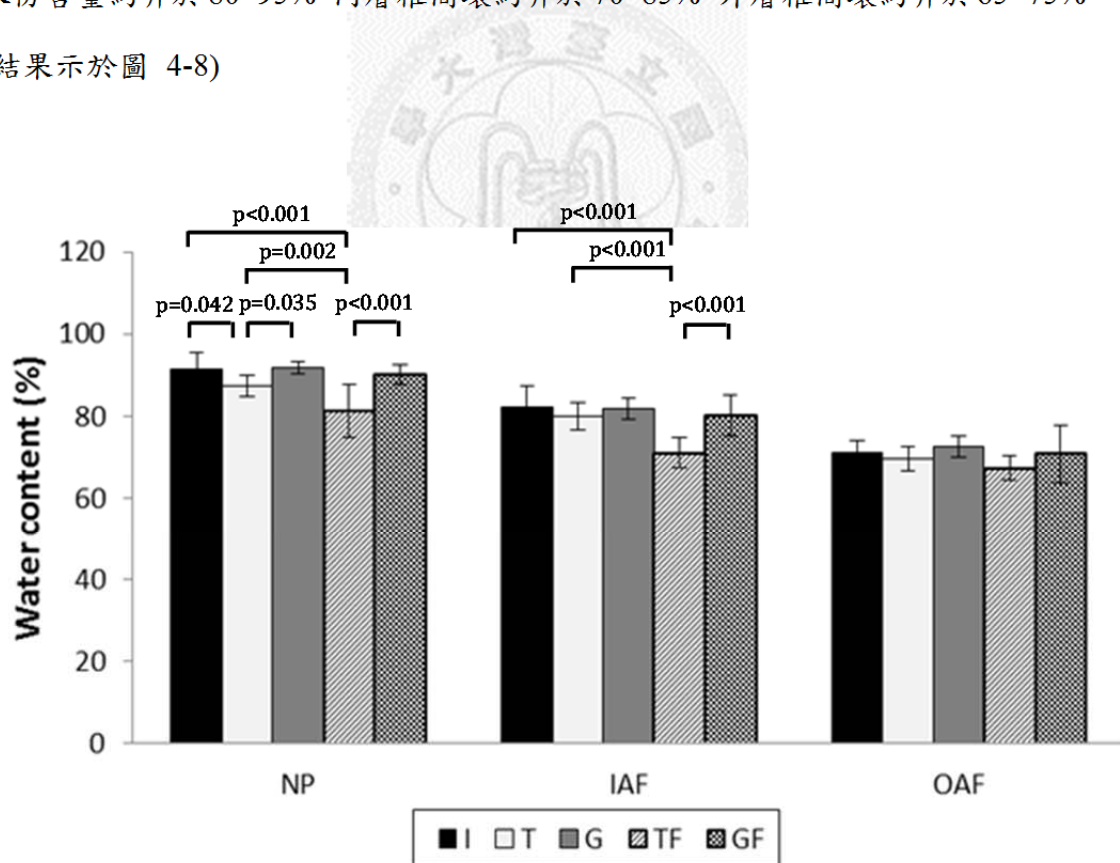


圖 4-8 不同退化階段及梔子素治療後椎間盤各部位之水份含量

## 4.2.2 染色切片

由於椎間核構造為凝膠狀組織，故切片過程中容易分離脫落，大部分封存之試樣玻片中椎間核組織所剩不多，故椎間環整體組織觀察使用 5X 顯微鏡，而比起椎間環相對微量的椎間核則使用 10X 顯微鏡觀察拍攝之。

**健康組：**由圖中可以看出椎間環組織排列整齊且分層明顯，免除掉平行的切片刀痕，可發現各層組織間有小縫隙存在，整體椎間環走向微微向外突出，表徵正常無破壞；椎間核部分，組織分布均勻無異樣。(圖 4-9)

**蛋白質變性組：**可以明顯看出打入胰蛋白酶變性的組織已經失去椎間盤原有抗壓強度，使得椎間環組織整體向外突出，且組織邊界變得不明顯，內部分層開始產生剝離的現象；椎間核變性水解後，可以看到結構變得不完整，組織分布有些區域零散、有些則聚集在一起，整體表現不均勻。(圖 4-10)

**蛋白質變性後治療組：**蛋白質變性水解後加入梔子素治療，椎間環組織分層依舊不如健康椎間盤明顯，但可以發現梔子素對於組織強度有回復的作用，使得原本蛋白質變性後應該向外突出的椎間環回復至類似於健康椎間盤的組織走向；椎間核組織經梔子素治療後，可以從圖中發現組織有被凝聚的現象，使得群聚數量增加、零星散布的組織數量減少。(圖 4-11)

**蛋白質變性加破壞組：**若對已變性之椎間盤作機械式疲勞破壞，則由圖中觀察到，椎間環組織間出現大量裂縫及缺損，且缺損部位組織走向紊亂不一致；椎間核組織較為零散不緊密，從圖中可看出疲勞破壞對於椎間核影響不大，其組織分布與蛋白質變性組有相同的特徵。(圖 4-12)

**蛋白質變性加破壞後治療組：**使用梔子素治療已被蛋白質變性且疲勞破壞的椎間盤，可以從切片圖中看出其椎間環組織有多處明顯損傷，但椎間環彎曲突出的曲率不大且排列走向較為一致，推測梔子素使變性水解後的組織增強鍵結，並回復部分機械強度；從椎間核部分可以看出，組織排列變得較緊密，表徵類似於蛋白質變性後治療的組別。(圖 4-13)



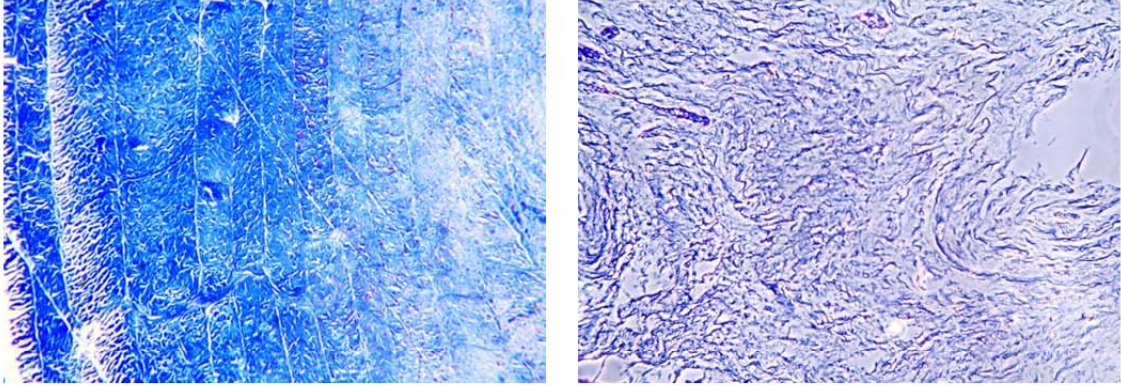


圖 4-9 健康椎間盤之組織染色切片 (a)椎間環 (b)椎間核

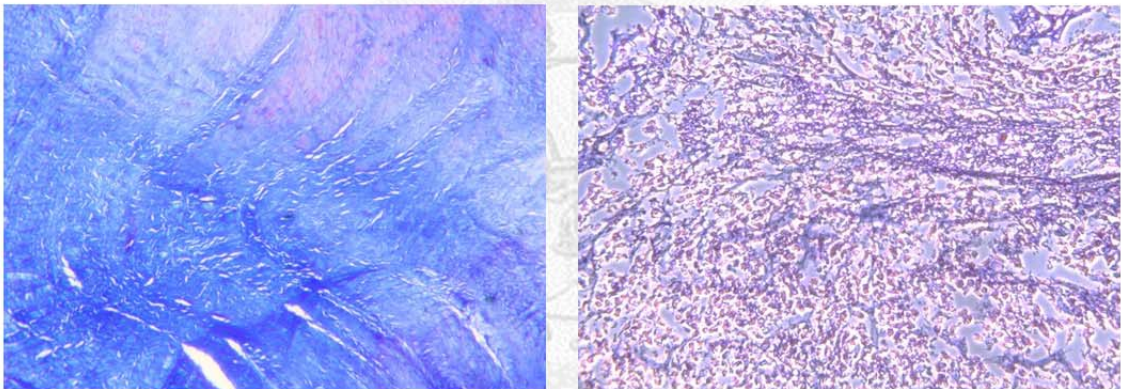


圖 4-10 蛋白質變性之椎間盤組織切片 (a)椎間環 (b)椎間核

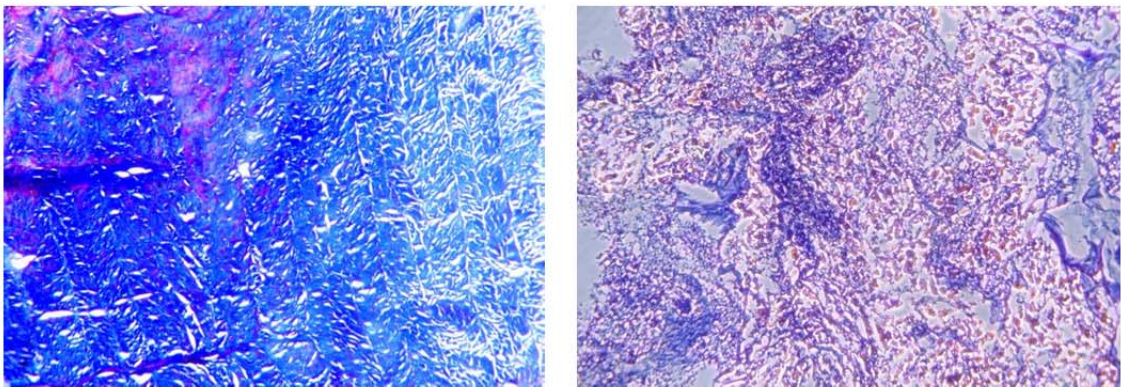


圖 4-11 蛋白質變性後治療之椎間盤組織切片 (a)椎間環 (b)椎間核

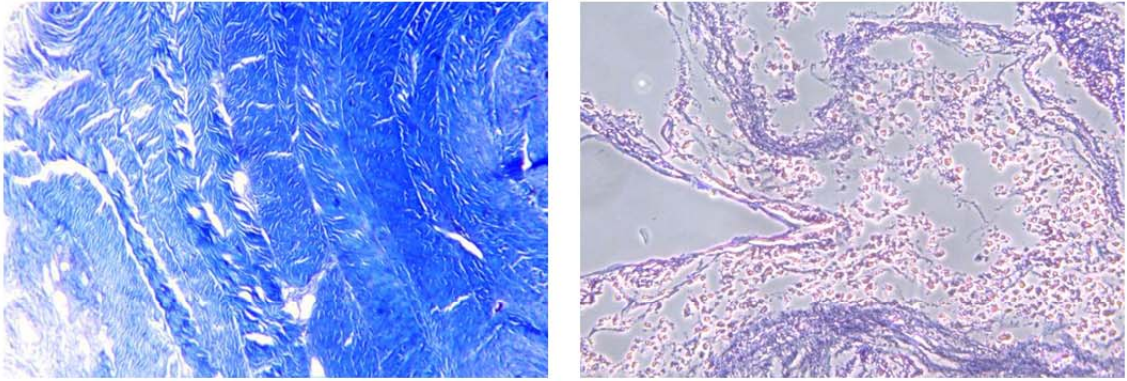


圖 4-12 蛋白質變性加破壞之椎間盤組織切片 (a)椎間環 (b)椎間核

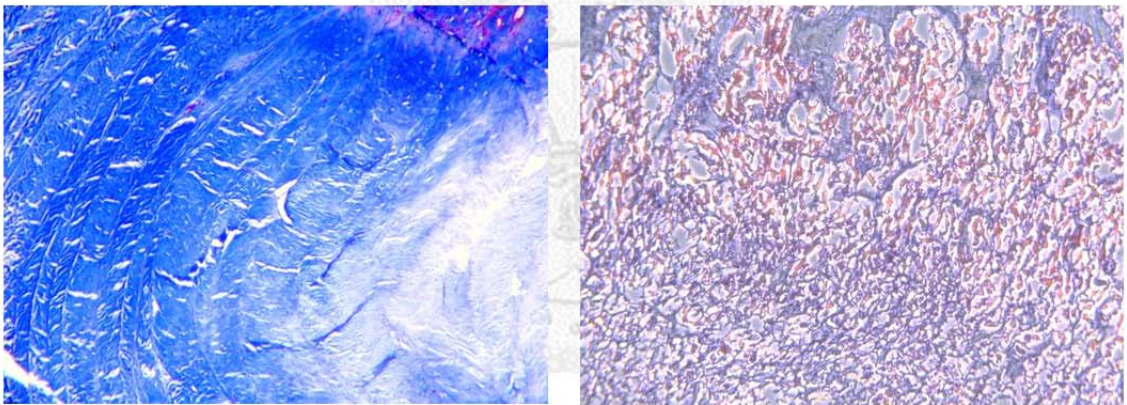


圖 4-13 蛋白質變性加破壞後治療之椎間盤組織切片 (a)椎間環 (b)椎間核

## 第五章 綜合討論

### 5.1 椎間盤退化模型討論

目前對於模擬退化性椎間盤的方式眾說紛紜，仍然沒有一個理想方式可用來類比椎間盤真實的退化過程，由文獻中可知，椎間盤退化早期之組織生化反應為蛋白質變性，近而因組織力學性質改變影響受力分佈狀況，最後導致纖維組織因疲勞負載產生局部機械損傷<sup>65</sup>，因此本研究利用蛋白質變性水解及疲勞負載造成的機械損傷來比擬不同退化階段之椎間盤。

由實驗結果可以發現，僅注射胰蛋白酶產生蛋白質變性的組別，其靜態力學性質中椎間盤高度、聚合模數及液體滲透度於培養一週後皆有明顯下降，而動態性質部分，勁度值、阻尼常數及水份含量也顯著性下降，由染色切片結果可以瞭解，其蛋白質變性後組織與組織間肽鍊鍵結被打斷，導致椎間核水解及椎間環組織走向不一致、椎間盤高度無法維持且內部結構不完整，進而因力量傳遞模式改變使其原有的生物力學性質也受到影響。關於椎間盤蛋白質變性後的生物力學性質，前人主要針對椎間核及椎間環分別研究之，學者 Périé 等人於文獻中提到，胰蛋白酶會降低椎間核聚合模數並升高液體滲透度<sup>57</sup>，而學者 Iatridis 等人使用椎間環試樣亦得到相同的趨勢<sup>83</sup>，但本實驗結果顯示注射胰蛋白酶產生變性後，椎間盤整體聚合模數與液體滲透度相比於健康椎間盤皆為降低，滲透度結果不一致之原因推測如下，前人研究中所使用的模型為限制模型(confined model)，其主要限制組織於測試期間產生徑向膨脹，若負載力量大時可能低估組織真實形變量，文獻指出關節軟骨(articular cartilage)的液體滲透度與其壓縮應變量(compression strain)相關<sup>46</sup>，若壓縮應變量增加則滲透度相對降低(孔隙體積減少)，而本實驗使用非限制模型(unconfined model)，允許試樣於潛變測試期間產生徑向變形，注射胰蛋白酶變性後的椎間盤組織強度降低，受壓瞬間組織整體強度無法維持而軸向位移量增加、椎間盤高度下降，導致液體滲透度降低。

然而，注射胰蛋白酶一天後給予疲勞負載的組別，其聚合模數與勁度值相對於健康組別為降低、而相對於蛋白質變性組別為升高，椎間盤高度、液體滲透度、阻尼常數及水份含量相對於各組皆為顯著性下降。於此，藉由染色切片結果可知，蛋白質變性後組織排列不一致，加入疲勞負載將會造成組織結構進一步被破壞，產生局部組織斷裂或剝離；因此，相對於只有蛋白質變性的椎間盤，經過疲勞負載後其內部結構崩塌、組織間隙變小，導致液體滲透度變差，失去結構完整性的椎間盤無法維持原本高度被壓得更緊緻，因而代表整體固相特性的聚合模數及勁度上升但衝擊緩衝能力下降。(示意如圖 5-1)

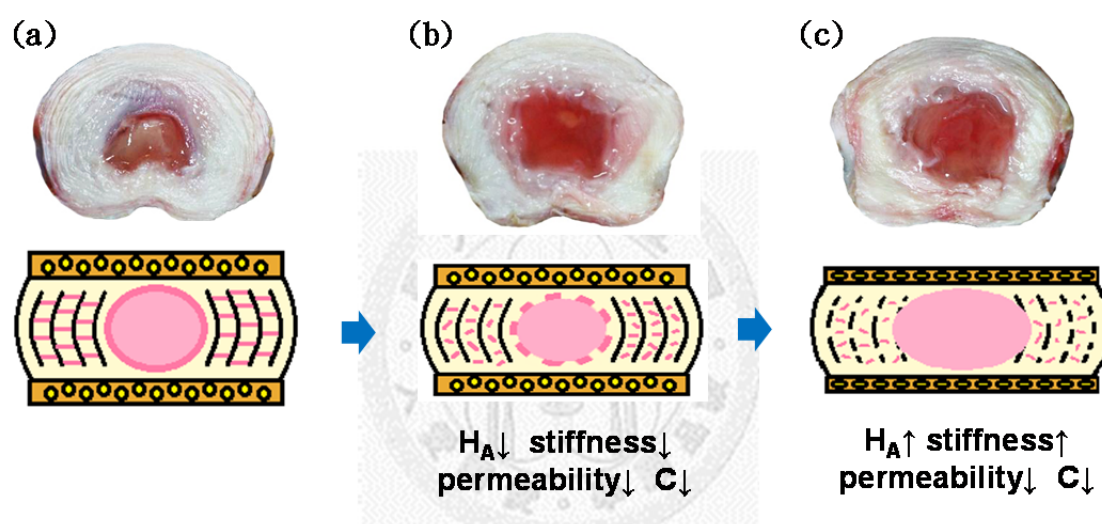


圖 5-1 退化模型示意圖 (a)健康(b)蛋白質變性(c)蛋白質變性後椎間環損傷

## 5.2 外生性交聯治療退化性椎間盤討論

許多文獻指出，膠原蛋白交聯在維持組織結構強度及負載耐受能力上扮演很重要的角色<sup>18,59</sup>，隨著年齡增長膠原蛋白含量降低，其交聯結構也會逐漸因生物降解作用(biodegradation)而減少鍵結，所以學者認為利用外生性交聯藥劑幫助膠原蛋白恢復交聯結構可能幫助退化性椎間盤回復原有之生物力學性質<sup>14,15</sup>。

本研究中以天然胜肽交聯劑-梔子素治療不同退化階段之椎間盤，並比較其生物力學性質及生化性質回復的效果。由實驗結果中得知，模擬退化早期的蛋白質變性組加入梔子素治療後，其椎間盤高度、聚合模數、循環負載後勁度值、循

環負載前阻尼係數及椎間核水份含量，相對於治療前皆有顯著性回復；然而，用來模擬椎間盤退化晚期的蛋白質變性且疲勞破壞組，打入梔子素作用後，其椎間盤高度、聚合模數、液體滲透度、循環負載前後阻尼係數以及椎間核與內層椎間環之水份含量，皆有顯著性回復(水份含量變化尤其顯著，統計結果  $p < 0.001$ )。配合染色切片結果可以發現，蛋白質變性的椎間盤經梔子素交聯後，纖維環沒有因受壓而向外突出(no herniation)，其組織強度明顯比治療前高，推測梔子素對於早期退化性椎間盤有增強組織交聯結構的作用，因此，與固相特性有關之聚合模數及負載後勁度值皆有顯著提升；若將蛋白質變性後疲勞破壞組使用梔子素治療，其內部組織缺損破壞無法修復，但組織強度仍然有回復的趨勢，而含水量大幅增加，可推測其相比於破壞嚴重的退化組有較好的緩衝能力，因此阻尼係數於循環負載前後皆有顯著地回復。(治療模型如圖 5-2) 文獻中提到，經梔子素交聯作用後，椎間環的拉伸勁度模數環向大於軸向，而壓縮勁度模數軸向大於徑向<sup>15</sup>，其與本實驗結果相符，當梔子素作用後，增加膠原蛋白肽鏈鍵結、增加組織強度，使得組織受壓縮時相較於健康椎間盤有較好的抗壓縮強度，當椎間盤受到軸向衝擊，組織與組織間之交聯亦提供良好的阻尼效果。

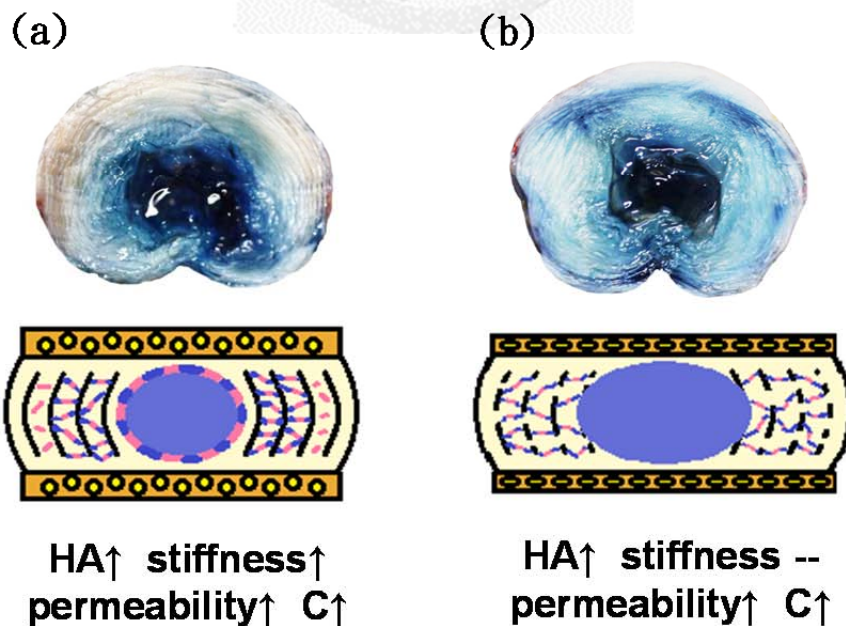


圖 5-2 梔子素治療退化性椎間盤模型示意圖

### 5.3 實驗限制

本研究所使用的非限制模型可能因為測試期間椎間盤徑向變形使得其截面積增加，因而高估椎間盤真正受到的壓應力。如前所述，本研究潛變測試中使用之定力負載 0.8MPa 為椎間盤受力大小除以受壓前的椎間盤截面積所得。文獻中指出，若椎間盤受定力 500N 達 15 分鐘，其徑向突出量約為 0.55mm 至 0.86mm<sup>56</sup>，則約使椎間盤截面積增加 5% 亦即減少壓力 5%。依此類推，在本研究中，椎間盤受到的真正壓力應比本研究所估算的小 5%。

部分文獻提及，組織間內源性非酵素交聯作用(endogenous non-enzymatic crosslinks)亦稱醣化作用(glycation)將隨著年齡增長而增加，而其交聯生成的最終產物(advanced glycation end-products, AGEs)將會導致組織變硬、勁度上升，逐漸失去原本的韌性<sup>69,80</sup>，而養分代謝速率降低及椎終板鈣化也是導致椎間盤退化的重要因素；綜觀而言，整體椎間盤退化機制由許多因子互相調控，無論是生化作用或是機械外力作用都有其影響層面，然而，本研究中所模擬的椎間盤退化模型於生化作用部分僅模擬初期蛋白質變性，缺少其他部分的探究，因此本研究之退化模型僅代表退化過程中，椎間盤於某個時期的生物力學性質，並不能完全比擬真實的椎間盤退化。

## 第六章 結論與未來展望

### 6.1 結論

本研究利用體外培養系統探討不同階段之椎間盤退化模型以及使用外生性交聯療法治療退化性椎間盤之可能性。研究結果顯示：(一)使用胰蛋白酶模擬退化早期蛋白質變性的椎間盤，其靜態及動態生物力學性質皆有顯著性下降，且生化組織結構亦有明顯退變的情形，若注射梔子素對其進行治療，則外生性交聯作用使得膠原蛋白組織交聯鍵結增加，進而恢復部分力學性質及水份含量；(二)利用蛋白質變性加上疲勞破壞模擬退化晚期的椎間盤，綜觀其生物力學性質及生化組織結構，無論是相對於健康椎間盤亦或是早期退化性椎間盤都是顯著性下降，可以得知其原有之功能已被破壞，若使用梔子素對其進行治療，則組織間交聯增加可恢復水份含量及部分動態力學性質，但疲勞破壞造成之組織缺損無法修補。

因此，得知天然胜肽交聯劑-梔子素可用於治療早期退化性椎間盤，並回復其生物力學性質；若椎間盤退化嚴重且伴隨組織缺損，則梔子素可以回復椎間盤喪失之部分動態力學性質，但無法完全修復缺損的組織，而這些組織破壞可能導致椎間盤退化持續進行。

### 6.2 未來展望

為了瞭解更真實的椎間盤退化過程，模擬出合適的退化模型，進而針對退化情形作治療，理想的退化模型必須充分考慮內部組織生化作用(例如：蛋白質醣化作用與椎終板鈣化)，因此，未來研究可以著重探討調控組織變性的因子；然而，目前研究結果指出外生性交聯療法對於治療嚴重退化的椎間盤有其一定瓶頸，未來研究可以利用外生性交聯療法搭配生物材料進行組織修補，用以回復椎間盤整體力學性質並減緩退化持續進行。

## 第七章 參考文獻

1. Adams MA, Dolan P, Hutton WC. The stages of disc degeneration as revealed by discograms. *J Bone Joint Surg Br* 1986;68:36-41.
2. Adams MA, Freeman BJ, Morrison HP, et al. Mechanical initiation of intervertebral disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)* 2000;25:1625-36.
3. Adams MA, Hutton WC. The effect of posture on the fluid content of lumbar intervertebral discs. *Spine (Phila Pa 1976)* 1983;8:665-71.
4. Adams MA, Stefanakis M, Dolan P. Healing of a painful intervertebral disc should not be confused with reversing disc degeneration: implications for physical therapies for discogenic back pain. *Clin Biomech (Bristol, Avon)* 2010;25:961-71.
5. Ambard D, Cherblanc F. Mechanical behavior of annulus fibrosus: a microstructural model of fibers reorientation. *Ann Biomed Eng* 2009;37:2256-65.
6. Andersson GB. Epidemiological features of chronic low-back pain. *Lancet* 1999;354:581-5.
7. Baer AE, Wang JY, Kraus VB, et al. Collagen gene expression and mechanical properties of intervertebral disc cell-alginate cultures. *J Orthop Res* 2001;19:2-10.
8. Best BA, Guilak F, Setton LA, et al. Compressive mechanical properties of the human anulus fibrosus and their relationship to biochemical composition. *Spine (Phila Pa 1976)* 1994;19:212-21.
9. Bogduk N. The lumbar disc and low back pain. *Neurosurg Clin N Am* 1991;2:791-806.
10. Buckwalter JA. Aging and degeneration of the human intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976)* 1995;20:1307-14.
11. Chan SC, Gantenbein-Ritter B, Leung VY, et al. Cryopreserved intervertebral disc with injected bone marrow-derived stromal cells: a feasibility study using organ culture. *Spine J* 2010;10:486-96.
12. Chiba K, Andersson GB, Masuda K, et al. Metabolism of the extracellular matrix formed by intervertebral disc cells cultured in alginate. *Spine (Phila Pa 1976)* 1997;22:2885-93.
13. Choi YS. Pathophysiology of degenerative disc disease. *Asian Spine J* 2009;3:39-44.
14. Chuang SY, Lin LC, Tsai YC, et al. Exogenous crosslinking recovers the functional integrity of intervertebral disc secondary to a stab injury. *J Biomed Mater Res A* 2010;92:297-302.
15. Chuang SY, Odonno RM, Hedman TP. Effects of exogenous crosslinking on in vitro tensile and compressive moduli of lumbar intervertebral discs. *Clin Biomech*



(Bristol, Avon) 2007;22:14-20.

16. Chuang SY, Popovich JM, Jr., Lin LC, et al. The effects of exogenous crosslinking on hydration and fluid flow in the intervertebral disc subjected to compressive creep loading and unloading. *Spine (Phila Pa 1976)* 2010;35:E1362-6.
17. Elliott DM, Yerramalli CS, Beckstein JC, et al. The effect of relative needle diameter in puncture and sham injection animal models of degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)* 2008;33:588-96.
18. Eyre DR, Dickson IR, Van Ness K. Collagen cross-linking in human bone and articular cartilage. Age-related changes in the content of mature hydroxypyridinium residues. *Biochem J* 1988;252:495-500.
19. Fairbank J. Total disc replacement for chronic low back pain. *BMJ* 2011;342:d2745.
20. Freemont AJ. The cellular pathobiology of the degenerate intervertebral disc and discogenic back pain. *Rheumatology (Oxford)* 2009;48:5-10.
21. Freimark D, Czermak P. Cell-based regeneration of intervertebral disc defects: review and concepts. *Int J Artif Organs* 2009;32:197-203.
22. Gantenbein B, Grunhagen T, Lee CR, et al. An in vitro organ culturing system for intervertebral disc explants with vertebral endplates: a feasibility study with ovine caudal discs. *Spine (Phila Pa 1976)* 2006;31:2665-73.
23. Goel VK, Monroe BT, Gilbertson LG, et al. Interlaminar shear stresses and laminae separation in a disc. Finite element analysis of the L3-L4 motion segment subjected to axial compressive loads. *Spine (Phila Pa 1976)* 1995;20:689-98.
24. Haschtmann D, Stoyanov JV, Ettinger L, et al. Establishment of a novel intervertebral disc/endplate culture model: analysis of an ex vivo in vitro whole-organ rabbit culture system. *Spine (Phila Pa 1976)* 2006;31:2918-25.
25. Haschtmann D, Stoyanov JV, Ferguson SJ. Influence of diurnal hyperosmotic loading on the metabolism and matrix gene expression of a whole-organ intervertebral disc model. *J Orthop Res* 2006;24:1957-66.
26. Hedman TP, Saito H, Vo C, et al. Exogenous cross-linking increases the stability of spinal motion segments. *Spine (Phila Pa 1976)* 2006;31:E480-5.
27. Hirsch C, Schajowicz F. Studies on structural changes in the lumbar annulus fibrosus. *Acta Orthop Scand* 1953;22:184-231.
28. Holm S, Maroudas A, Urban JP, et al. Nutrition of the intervertebral disc: solute transport and metabolism. *Connect Tissue Res* 1981;8:101-19.
29. Humzah MD, Soames RW. Human intervertebral disc: structure and function. *Anat Rec* 1988;220:337-56.
30. Hwang D, Gabai AS, Yu M, et al. Role of load history in intervertebral disc mechanics and intradiscal pressure generation. *Biomech Model Mechanobiol* 2011.

31. Iatridis JC, ap Gwynn I. Mechanisms for mechanical damage in the intervertebral disc annulus fibrosus. *J Biomech* 2004;37:1165-75.
32. Illien-Junger S, Gantenbein-Ritter B, Grad S, et al. The combined effects of limited nutrition and high-frequency loading on intervertebral discs with endplates. *Spine (Phila Pa 1976)* 2010;35:1744-52.
33. Inoue H. Three-dimensional architecture of lumbar intervertebral discs. *Spine (Phila Pa 1976)* 1981;6:139-46.
34. Izambert O, Mitton D, Thourot M, et al. Dynamic stiffness and damping of human intervertebral disc using axial oscillatory displacement under a free mass system. *Eur Spine J* 2003;12:562-6.
35. Jim B, Steffen T, Moir J, et al. Development of an intact intervertebral disc organ culture system in which degeneration can be induced as a prelude to studying repair potential. *Eur Spine J* 2011.
36. Johannessen W, Elliott DM. Effects of degeneration on the biphasic material properties of human nucleus pulposus in confined compression. *Spine (Phila Pa 1976)* 2005;30:E724-9.
37. Junger S, Gantenbein-Ritter B, Lezuo P, et al. Effect of limited nutrition on in situ intervertebral disc cells under simulated-physiological loading. *Spine (Phila Pa 1976)* 2009;34:1264-71.
38. Kang JD. Does a needle puncture into the annulus fibrosus cause disc degeneration? *Spine J* 2010;10:1106-7.
39. Kasra M, Goel V, Martin J, et al. Effect of dynamic hydrostatic pressure on rabbit intervertebral disc cells. *J Orthop Res* 2003;21:597-603.
40. Katz JN. Lumbar disc disorders and low-back pain: socioeconomic factors and consequences. *J Bone Joint Surg Am* 2006;88 Suppl 2:21-4.
41. Korecki CL, MacLean JJ, Iatridis JC. Characterization of an in vitro intervertebral disc organ culture system. *Eur Spine J* 2007;16:1029-37.
42. Korecki CL, MacLean JJ, Iatridis JC. Dynamic compression effects on intervertebral disc mechanics and biology. *Spine (Phila Pa 1976)* 2008;33:1403-9.
43. Kuo YW, Wang JL. Rheology of intervertebral disc: an ex vivo study on the effect of loading history, loading magnitude, fatigue loading, and disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)* 2010;35:E743-52.
44. Lee CR, Iatridis JC, Poveda L, et al. In vitro organ culture of the bovine intervertebral disc: effects of vertebral endplate and potential for mechanobiology studies. *Spine (Phila Pa 1976)* 2006;31:515-22.
45. Leung VY, Chan D, Cheung KM. Regeneration of intervertebral disc by mesenchymal stem cells: potentials, limitations, and future direction. *Eur Spine J* 2006;15 Suppl 3:S406-13.

46. Mansour JM, Mow VC. The permeability of articular cartilage under compressive strain and at high pressures. *J Bone Joint Surg Am* 1976;58:509-16.
47. Marchand F, Ahmed AM. Investigation of the laminate structure of lumbar disc annulus fibrosus. *Spine (Phila Pa 1976)* 1990;15:402-10.
48. Masuda K. Biological repair of the degenerated intervertebral disc by the injection of growth factors. *Eur Spine J* 2008;17 Suppl 4:441-51.
49. Meakin JR, Hukins DW. Effect of removing the nucleus pulposus on the deformation of the annulus fibrosus during compression of the intervertebral disc. *J Biomech* 2000;33:575-80.
50. Melrose J, Smith SM, Little CB, et al. Recent advances in annular pathobiology provide insights into rim-lesion mediated intervertebral disc degeneration and potential new approaches to annular repair strategies. *Eur Spine J* 2008;17:1131-48.
51. Michalek AJ, Buckley MR, Bonassar LJ, et al. The effects of needle puncture injury on microscale shear strain in the intervertebral disc annulus fibrosus. *Spine J* 2010;10:1098-105.
52. Mirza SK, Deyo RA. Systematic review of randomized trials comparing lumbar fusion surgery to nonoperative care for treatment of chronic back pain. *Spine (Phila Pa 1976)* 2007;32:816-23.
53. Moore RJ. The vertebral end-plate: what do we know? *Eur Spine J* 2000;9:92-6.
54. Mow VC, Kuei SC, Lai WM, et al. Biphasic creep and stress relaxation of articular cartilage in compression? Theory and experiments. *J Biomech Eng* 1980;102:73-84.
55. Nachemson A, Lewin T, Maroudas A, et al. In vitro diffusion of dye through the end-plates and the annulus fibrosus of human lumbar inter-vertebral discs. *Acta Orthop Scand* 1970;41:589-607.
56. Panjabi MM, Takata K, Goel V, et al. Thoracic human vertebrae. Quantitative three-dimensional anatomy. *Spine (Phila Pa 1976)* 1991;16:888-901.
57. Perie D, Iatridis JC, Demers CN, et al. Assessment of compressive modulus, hydraulic permeability and matrix content of trypsin-treated nucleus pulposus using quantitative MRI. *J Biomech* 2006;39:1392-400.
58. Perie DS, Maclean JJ, Owen JP, et al. Correlating material properties with tissue composition in enzymatically digested bovine annulus fibrosus and nucleus pulposus tissue. *Ann Biomed Eng* 2006;34:769-77.
59. Pokharna HK, Phillips FM. Collagen crosslinks in human lumbar intervertebral disc aging. *Spine (Phila Pa 1976)* 1998;23:1645-8.
60. Raj PP. Intervertebral disc: anatomy-physiology-pathophysiology-treatment.

*Pain Pract* 2008;8:18-44.

61. Risbud MV, Izzo MW, Adams CS, et al. An organ culture system for the study of the nucleus pulposus: description of the system and evaluation of the cells. *Spine (Phila Pa 1976)* 2003;28:2652-8; discussion 8-9.
62. Roberts S, Menage J, Urban JP. Biochemical and structural properties of the cartilage end-plate and its relation to the intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976)* 1989;14:166-74.
63. Roughley PJ, Melching LI, Heathfield TF, et al. The structure and degradation of aggrecan in human intervertebral disc. *Eur Spine J* 2006;15 Suppl 3:S326-32.
64. Sakai D. Future perspectives of cell-based therapy for intervertebral disc disease. *Eur Spine J* 2008;17 Suppl 4:452-8.
65. Schollum ML, Appleyard RC, Little CB, et al. A detailed microscopic examination of alterations in normal anular structure induced by mechanical destabilization in an ovine model of disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)* 2010;35:1965-73.
66. Shambrook J, McNee P, Clare Harris E, et al. Clinical presentation of low back pain and association with risk factors according to findings on magnetic resonance imaging. *Pain* 2011.
67. Siemionow K, An H, Masuda K, et al. The Effects of Age, Gender, Ethnicity, and Spinal Level on the Rate of Intervertebral Disc Degeneration. A review of 1712 Intervertebral Discs. *Spine (Phila Pa 1976)* 2011.
68. Sivan S, Merkher Y, Wachtel E, et al. Correlation of swelling pressure and intrafibrillar water in young and aged human intervertebral discs. *J Orthop Res* 2006;24:1292-8.
69. Sivan SS, Tsitron E, Wachtel E, et al. Age-related accumulation of pentosidine in aggrecan and collagen from normal and degenerate human intervertebral discs. *Biochem J* 2006;399:29-35.
70. Smith LJ, Nerurkar NL, Choi KS, et al. Degeneration and regeneration of the intervertebral disc: lessons from development. *Dis Model Mech* 2011;4:31-41.
71. Sobajima S, Kim JS, Gilbertson LG, et al. Gene therapy for degenerative disc disease. *Gene Ther* 2004;11:390-401.
72. Sobajima S, Kompel JF, Kim JS, et al. A slowly progressive and reproducible animal model of intervertebral disc degeneration characterized by MRI, X-ray, and histology. *Spine (Phila Pa 1976)* 2005;30:15-24.
73. Sobajima S, Shimer AL, Chadderdon RC, et al. Quantitative analysis of gene expression in a rabbit model of intervertebral disc degeneration by real-time polymerase chain reaction. *Spine J* 2005;5:14-23.

74. Soltz MA, Ateshian GA. Experimental verification and theoretical prediction of cartilage interstitial fluid pressurization at an impermeable contact interface in confined compression. *J Biomech* 1998;31:927-34.
75. Stokes IA, Iatridis JC. Mechanical conditions that accelerate intervertebral disc degeneration: overload versus immobilization. *Spine (Phila Pa 1976)* 2004;29:2724-32.
76. Thompson JP, Pearce RH, Schechter MT, et al. Preliminary evaluation of a scheme for grading the gross morphology of the human intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976)* 1990;15:411-5.
77. Twomey L, Taylor J. Age changes in lumbar intervertebral discs. *Acta Orthop Scand* 1985;56:496-9.
78. Twomey LT, Taylor JR. Age changes in lumbar vertebrae and intervertebral discs. *Clin Orthop Relat Res* 1987:97-104.
79. Urban JP, Smith S, Fairbank JC. Nutrition of the intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976)* 2004;29:2700-9.
80. Wagner DR, Reiser KM, Lotz JC. Glycation increases human annulus fibrosus stiffness in both experimental measurements and theoretical predictions. *J Biomech* 2006;39:1021-9.
81. Wang JL, Wu TK, Lin TC, et al. Rest cannot always recover the dynamic properties of fatigue-loaded intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976)* 2008;33:1863-9.
82. Wang P, Yang L, Hsieh AH. Nucleus pulposus cell response to confined and unconfined compression implicates mechanoregulation by fluid shear stress. *Ann Biomed Eng* 2011;39:1101-11.
83. Yao H, Justiz MA, Flagler D, et al. Effects of swelling pressure and hydraulic permeability on dynamic compressive behavior of lumbar annulus fibrosus. *Ann Biomed Eng* 2002;30:1234-41.
84. Yu CY, Tsai KH, Hu WP, et al. Geometric and morphological changes of the intervertebral disc under fatigue testing. *Clin Biomech (Bristol, Avon)* 2003;18:S3-9.
85. Yu J, Winlove PC, Roberts S, et al. Elastic fibre organization in the intervertebral discs of the bovine tail. *J Anat* 2002;201:465-75.