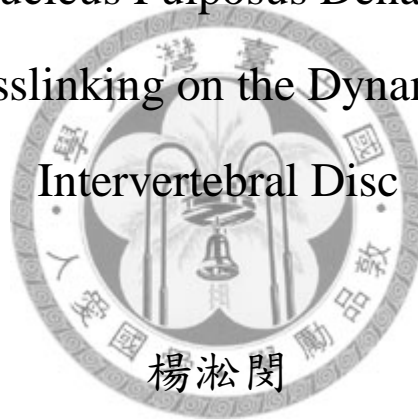


國立臺灣大學醫學院暨工學院醫學工程學研究所
碩士論文

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

椎間核變性水解與外生性交聯
對椎間盤動態性質的影響

Effect of Nucleus Pulposus Denaturation and
Exogenous Crosslinking on the Dynamic Properties of
Intervertebral Disc



Sung-Min Yang

指導教授：王兆麟 博士
Advisor: Jaw-Lin Wang, Ph.D.

中華民國 98 年 7 月

July, 2009

國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

椎間核變性水解與外生性交聯
對椎間盤動態性質的影響

Effect of Nucleus Pulposus Denaturation and
Exogenous Crosslinking on the Dynamic Properties of
Intervertebral Disc

本論文係楊淞閔君 (R96548040) 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 98 年 06 月 30 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：

王柏禎

曾永輝

(指導教授)

孫瑞昇

黃世欽

所長：



中文摘要

目的：探討椎間核變性水解與外生性交聯對椎間盤動態性質的影響。

背景：椎間盤受傷後，會造成椎間盤的生化組成的變化，因而影響椎間盤的力學功能，若椎間盤的力學特性產生不可逆的變化，在日經月累的負重之下可能引起其他脊椎疾病的發生。然而椎間盤受傷於急性期基質降解與亞急性期交聯產生後的力學反應仍不清楚。

材料與方法：使用六個月大的豬隻腰椎運動單元作為試樣(L1-L2, L3-L4, 共 45 副)，椎間核水解組有 27 組，椎間環損傷組有 18 組。在椎間核水解組，18 組試樣為注射 1 毫升胰蛋白酶入椎間盤降解椎間核細胞基質，並施予第一次 30 分鐘循環負載，隨後給予 24 小時休息修復，然後在施於第二次 30 分鐘循環負載。第一次 30 分鐘循環負載後，將 9 組試樣直接浸泡生理食鹽水，另 9 組為注射 1 毫升梔子素溶液後在浸泡生理食鹽水，進行 24 小時休息修復。其餘 9 組試樣為沒有注射任何溶液的健康椎間盤，直接施予第一次 30 分鐘循環負載，隨後給予 24 小時浸泡生理食鹽水中休息修復，然後在施於第二次 30 分鐘循環負載。在循環負載期間每十分鐘間隔會施予一次衝擊測試。椎間環損傷組為施予第一次 2 小時循環負載產生椎間環傷害，隨後給予 24 小時休息修復，然後再施於第二次 2 小時循環負載。第一次 2 小時循環負載後，將 9 組試樣直接浸泡生理食鹽水，另 9 組為浸泡梔子素溶液中，進行 24 小時休息修復。在 2 小時循環負載期間在 0、0.5、1 和 2 小時時間點上會施予一次衝擊測試。椎間盤勁度係數 $K(N/mm)$ 及阻尼係數 $C(Ns/mm)$ 由衝擊過程的資料求的。

結果：椎間核降解椎間盤阻尼係數則顯著性的小於健康椎間盤。降解椎間盤經由外生性交聯後，降解椎間盤的動態性質都有顯著性上升，勁度初始值與健康椎間盤的無顯著性差異，但在循環負載期間都顯著小於健康椎間盤；而阻尼係數雖顯著性的小於健康椎間盤，但都已顯著的大於降解椎間盤。椎間環斷裂組中，本實驗重現了文獻相同的實驗結果，在 0.5 小時循環負載後，椎間環斷裂椎間盤的動

態性質就到達穩態。而經由外生性交聯後，勁度初始值與健康椎間盤無顯著性差異，則阻尼係數初始值時明顯沒有恢復；但在循環負載其間勁度都顯著小於健康椎間盤，而阻尼係數則與健康椎間盤相同。

結論：本實驗的模擬結果顯示，當椎間盤受傷處於急性期時，因椎間核基質降解，使的椎間盤的緩衝能力下降，且椎間盤孔洞性也變大。而當椎間盤受傷來到亞急性期時，因膠原蛋白交聯的增生，使的受傷椎間盤孔洞收縮，且緩衝能力提升，但增生交聯組織卻會降低膠原纖維對循環負載的耐受力，最後使椎間盤整體強度降低。

【關鍵詞】 椎間盤傷害、基質降解、外生性交聯、動態性質



Abstract

Objective: The purpose of this study is to evaluate the effect of nucleus denaturation and exogenous crosslinking on disc dynamic properties.

Summary of Background Data: Fatigue loading can damage disc structure integrity. In early stage of tissue healing post disc injury, disc matrix crosslinkings, especially nucleus pulposus, are denatured by disc enzymes. In the following subacute stage, new crosslinking forms with the growth of fibrosis tissue from the injured sites. However, the interaction of nucleus denaturation and crosslinking generation with the disc dynamic properties remains unclear.

Methods: In total of 45 porcine lumbar body-disc-body constructs (L1-L2, L3-L4) were assigned to “nucleus pulposus (NP) denaturation protocol” (n=27) and “anular fibrosus (AF) damage protocol” (n=18). For the “NP denaturation protocol”, 9 specimens were selected as “healthy discs”, receiving no injection, and applied with a 30 min fatigue loadings twice. These discs rehydrated in saline solution for 24 hr before and after the first fatigue loading. The other 18 specimens were injected with 1ml trypsin solution, immersed in saline solution for 24 hr and then loaded with a 30 min fatigue loading. After the fatigue loading, 9 discs out of these 18 specimens were immersed in saline bath for 24 hr, while the other 9 discs were injected with 1ml 0.33% genipin solution before saline bath immersion. Each disc was then loaded with another 30 min fatigue loading. An impulse test was applied to every disc in NP-denatured group at 0, 10, 20, and 30 min of second fatigue loading. For the “AF damage protocol”, each specimen was loaded with 2 hr fatigue loading first, followed by a 24 hr rest, and then applied with another 2 hr fatigue loading. After the first 2 hr fatigue loading, 9 specimens were immersed in saline bath, while the other 9 specimens were immersed in 0.33% genipin solution. During the second 2 hr fatigue loading, an impulse test was applied at time point of 0, 0.5, 1, and 2 hr. The stiffness

(K, N/mm) and damping coefficient (C, Ns/mm) of disc was calculated using the one-dimension spring-damping model and impulse test loading information.

Results: (1) NP denaturation protocol: compared to the healthy disc, NP denaturation did not change the disc stiffness but significantly decreased the damping coefficient ($P= 0.000$) at the end of fatigue loading. NP degeneration also increased the change rate of disc stiffness and damping coefficient with the fatigue loading time. In comparison with the NP-denatured disc, after crosslinking generation the disc stiffness significantly decreased ($P= 0.024$) but the damping coefficient significantly increased ($P= 0.024$) at the end of fatigue loading. The change rates of disc stiffness and damping coefficient was the same as those of healthy discs. (2) AF damage protocol: the disc stiffness and damping coefficient reached plateau at 1 hr of the first fatigue loading but at 0.5 hr of the second fatigue loading. The plateau value of disc stiffness and damping coefficient were the same comparing the first and the second fatigue loading. After crosslinking, the disc stiffness and damping coefficient reached plateau at 1 hr of the second fatigue loading. The plateau value of disc stiffness significantly decreased ($P= 0.042$), while that of damping coefficient was not changed.

Conclusion: Faster fluid outflows during fatigue loading is caused by both of NP denaturation and AF damage based on the increased change rate of disc dynamic properties. Disc damping coefficient decreases after NP denaturation and recovers after crosslinking generation in NP, indicating positive relation between shock attenuation capacity and NP crosslinking level. The crosslinking generation in disc decreases disc stiffness, reducing disc strength to external loading.

【Keywords】 disc injury, matrix denaturation, crosslinking, dynamic properties

目錄

口試委員會審定書	i
中文摘要	ii
英文摘要	iv
第一章 前言	1
1-1 脊椎的基本構造	1
1-2 椎間盤的構造及功能	1
1-3 椎間盤傷害	5
1-4 組織癒合過程的急性期	5
1-5 組織癒合過程的亞急性期	7
1-6 椎間盤力學性質與循環負載	9
1-7 研究動機與實驗目的	9
第二章 實驗設備	11
2-1 連續式衝擊測試平台(Continuous Impact Testing Apparatus).....	11
2-2 衝擊錘(Impactor).....	12
2-3 撞擊承受器(Impounder)	12
2-4 往復式衝擊模組(Cyclic Loading).....	12
2-5 線性電位計(Potentiometer).....	14
2-6 線性位移計(Liner Variable Differential Transformer)	14
2-7 一維測力元(1-D Load Cell).....	14
2-8 訊號擷取處理及控制系統.....	15
第三章 材料與方法	16
3-1 試樣準備.....	16

3-2 實驗流程.....	17
3-2-1 椎間核變性水解模型流程.....	17
3-2-2 椎間環損傷模型流程.....	17
3-3 實驗方法.....	18
3-4 數學模型.....	20
3-5 統計分析方法.....	21
第四章 結果.....	22
4-1 椎間核變性降解/外生性交聯產生後的椎間盤之動態性質分析.....	22
4-2 椎間環破裂/外生性交聯產生後的椎間盤之動態性質分析.....	26
4-3 椎間盤切面觀察.....	28
第五章 討論.....	30
5-1 椎間盤動態性質隨循環負載時間增加的變化.....	30
5-2 椎間盤傷害對椎間盤動態性質的影響.....	30
5-3 外生性交聯對椎間盤傷害的影響.....	31
5-4 實驗限制.....	33
第六章 結論與未來展望.....	35
6-1 結論.....	35
6-2 未來展望.....	35
參考文獻.....	36



圖目錄

圖 1-1、脊椎構造圖.....	3
圖 1-2、椎骨構造圖.....	4
圖 1-3、椎間盤構造圖.....	4
圖 1-4、膠原蛋白與蛋白多醣聚合物受壓示意圖.....	4
圖 1-5、梔子素與胺基產生交聯機制.....	8
圖 2-1、連續式衝擊測試平台(CITA).....	11
圖 2-2、撞擊承受器(Impounder).....	13
圖 2-3、往復式衝擊模組(Cyclic Loading).....	13
圖 3-1、入針方向示意圖.....	16
圖 3-2、椎間核變性水解組流程圖.....	18
圖 3-3、椎間環損傷組流程圖.....	18
圖 3-4、實驗時機台示意圖.....	19
圖 3-5、一維彈簧阻尼系統.....	20
圖 3-6、椎間盤位移與時間關係圖.....	21
圖 4-1、椎間核變性降解椎間盤 K 值與負載時間關係圖.....	23
圖 4-2、椎間核變性降解椎間盤 C 值與負載時間關係圖.....	24
圖 4-3、椎間核變性降解/外生性交聯椎間盤 K 值與負載時間關係圖.....	25
圖 4-4、椎間核變性降解/外生性交聯椎間盤 C 值與負載時間關係圖.....	26
圖 4-5、椎間環損傷/外生性交聯椎間盤 K 值與負載時間關係圖.....	27
圖 4-6、椎間環損傷/外生性交聯椎間盤 C 值與負載時間關係圖.....	28
圖 4-7、椎間盤切面觀察(A)健康完整、(B)椎間核變性水解後、(C)水解椎間盤注入梔子素溶液、(D)椎間環損傷後經浸泡梔子素溶液.....	29

第一章 前言

1-1 脊椎的基本構造

人類脊椎(spine)是為人體主要組成的一軸向骨架，總共包含三十三個脊椎骨及二十三個椎間盤所組成。如圖 1-1 所示，脊椎骨由上到下分別由七節頸椎(cervical spine)、十二節胸椎(thoracic spine)、五節腰椎(lumbar spine)、五節薦椎(sacral spine)以及四節尾椎(coccygeal spine)。每個椎骨(vertebrae)形狀大小略有不同，但是其構造大致相同，主要是由椎體(vertebral body)、椎間孔(vertebral foramen)、椎弓根(pedicle)、椎板(lamina)、脊突(spinous process)、一對橫突(transverse process)、一對上關節突(superior articular process)、一對下關節突(inferior articular process)所組成，如圖 1-2 所示。椎體為傳遞椎骨承重，而椎弓根與椎板兩者組成椎管來保護脊髓。脊突為從椎骨延伸出的骨頭，提供了肌肉與韌帶的附著點。上關節突與下關節突結合稱為小面關節(facet joints)。除了前兩節頸椎、薦椎與尾椎外，所有脊椎椎骨與椎骨之間都由一個椎間盤相連在一起。脊椎是由椎間盤與小面關節將每一椎骨連接起來，使整條脊椎由側面看起來為直立 S 型的弧度，提供人體可做出屈曲(flexion)、伸展(extension)、側彎(lateral bending)及扭轉(rotation)四種主要運動方式。

1-2 椎間盤的構造及功能

椎間盤是相連於兩節椎骨之間，以加強椎骨與椎骨之間的穩定性外，同時提供脊椎適當活動的功能。椎間盤提供了脊柱在承重和運動時，產生對抗彈力以減輕和緩衝外力對脊柱的壓迫力。如圖 1-3 所示，椎間盤的構造可分為內部膠狀的椎間核(nucleus pulposus, NP)、外部環狀的椎間環(anulus fibrosus, AF)及與椎骨連結的椎終板(endplate, CEP)。椎間核由水、第二型膠原蛋白(collagen type II)及蛋白多醣(proteoglycan, 簡稱 PG)所組成¹，為灰白色膠狀黏液組織，具有韌性與彈性，其功能主要是用來抵抗軸向的壓力²。椎間環是由水、第一型膠原蛋白(collagen type I)纖維及蛋白多醣交錯組成，其橫向纖維為與椎骨軸向成

60°夾角層狀環形結構，約為15~25層^{3,4}，其功能主要是用來抵抗脊椎彎曲或扭轉時產生的拉力；椎終板為一平行厚度約略1mm的透明軟骨，是椎間盤與椎骨養分交換的主要管道，利用滲透及擴散方式將養分與代謝廢物輸出和輸入椎間核中。

椎間盤是一個黏彈性組織⁵，它具有儲存能量的功能。椎間盤受壓時，因椎間核徑向延展，使的椎間環纖維向外推，椎間環纖維為了抵抗這種伸展，會施予一個反力於椎間核⁶，由於膠原蛋白纖維具有彈性，此椎間環纖維就像是彈簧變形。所以由於椎間核的關係，避免椎間環受垂直軸向負載下其纖維產生挫曲⁶。此外椎間核也因椎間環的限制，使其產生的徑向變形受到限制。當壓力移除後，椎間環纖維彈力收回會將能量轉移給椎間核，幫助它恢復負荷所造成的變形，因此椎間盤可視為椎骨的減震系統。當椎間盤受到迅速軸向衝擊時，剛開始會先由椎間環變形吸收能量，然後再將力傳送到椎體，藉由椎間盤的減震可以保護椎骨受衝擊的破壞。衝擊吸收能力會隨多次負載而降低，

有研究指出，衝擊吸收能力會隨椎間盤含水量與完整性而改變⁷。對一個正常健康的椎間盤來說，其椎間核應該保持為半流體狀與具有高膨潤壓(swelling pressure)特性，椎間盤要保持正常機械特性需要依賴於椎間核吸附和保持水的能力，然而椎間核吸附和保持水的能力與蛋白多醣含量有關⁸，因此椎間盤機械特性會受到椎間核含水量與蛋白多醣含量所影響⁹。椎間盤是含水量極高，水分分別在椎間核與椎間環中各佔80%¹⁰及70%¹¹。椎間盤受壓後，水份被擠出，椎間盤內的蛋白多醣濃度提高，造成滲透壓(osmotic pressure)上升。而滲透壓與蛋白多醣上的糖胺聚醣(glycosaminoglycan，簡稱GAG)鍵上的負電極有關。具有正電極的分子會被糖胺聚醣鍵上的負電極吸引，因此產生滲透壓使椎間盤組織具有吸附水和鎖水的功能^{2,5}，有研究也指出椎間盤蛋白多醣含量對椎間盤水分吸附能力與抗壓能力有關¹。如圖1-4所示，水分在椎間核和椎間環中是由蛋白多醣所吸附，但受擠壓後蛋白多醣變形把水分擠出，等到蛋白多醣產生的滲透壓力與外部壓力達到平衡狀態，水分流失就會停止；而負載移除後，蛋白多醣會恢復吸水能

力。因此研究也指出，人體在白天生理活動情況下所造成的水分流失，只要經過晚上的睡眠休息，就能將流失的水分完全回復至椎間盤內¹¹。

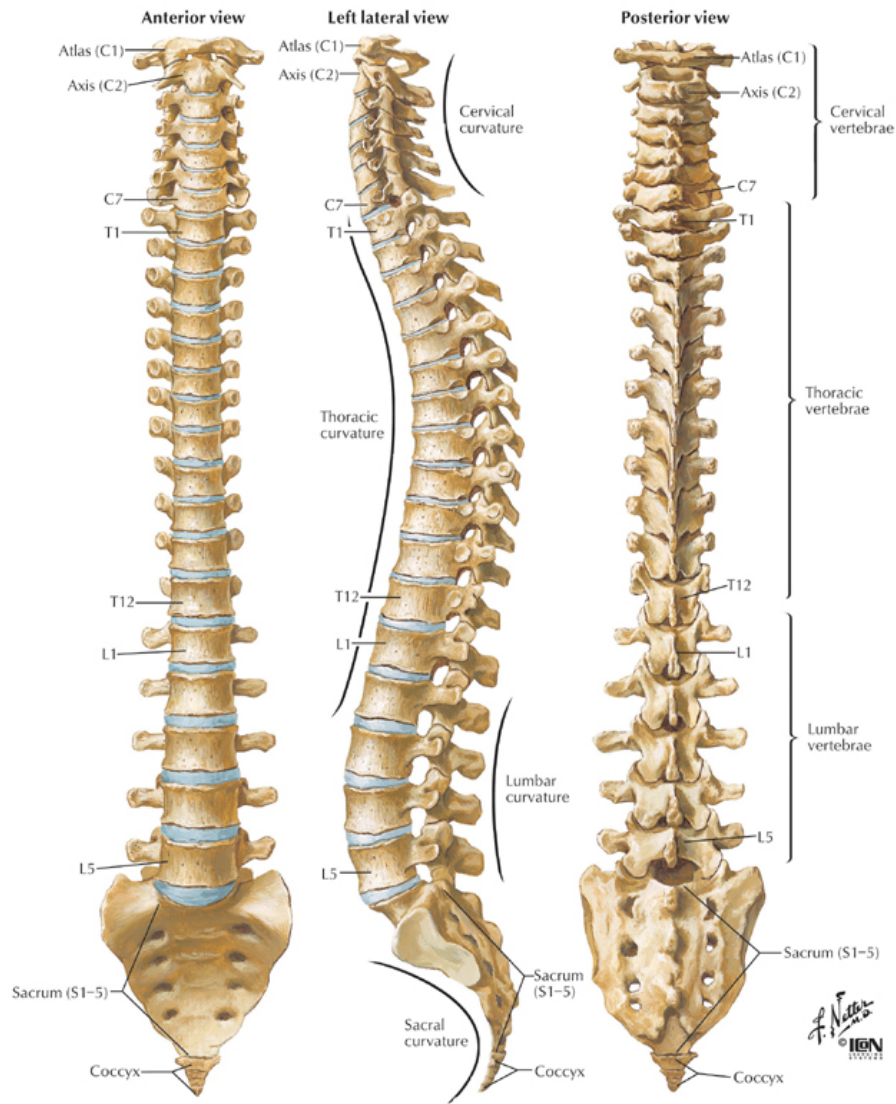


圖 1-1、脊椎構造圖¹²

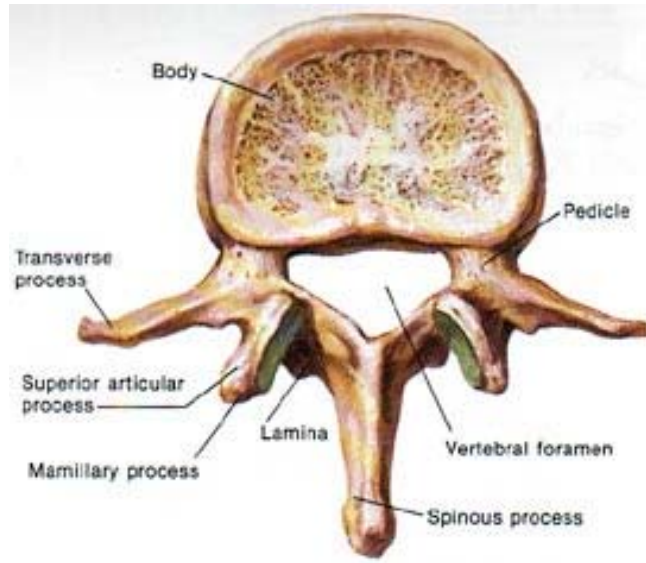


圖 1-2、椎骨構造圖¹²



圖 1-3、椎間盤構造圖¹³

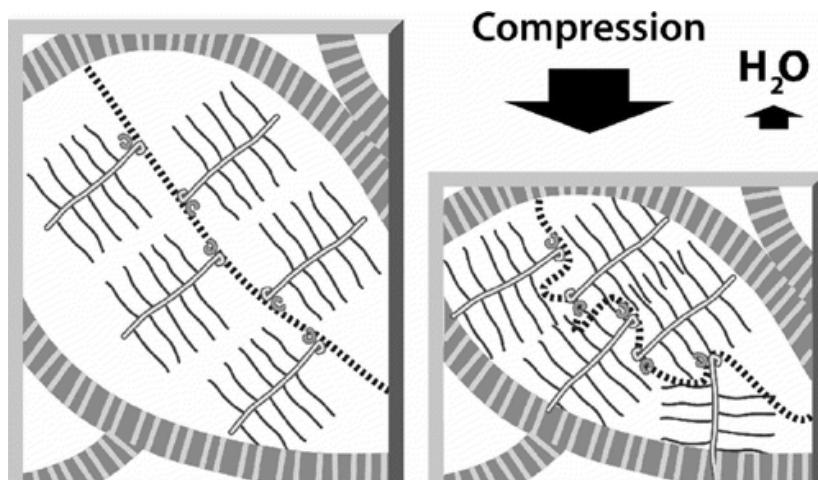


圖 1-4、膠原蛋白與蛋白多醣聚合物受壓示意圖¹⁴

1-3 椎間盤傷害

椎間盤因在日常生活中承受人體軀幹及上肢的重量，因此較其他組織容易發生損傷，椎間盤傷害主要為椎間盤過大外力的急性損傷以及受長期循環的循環損傷^{7,15-20}。常見的椎間盤急性損傷為椎間環斷裂，有研究指出長期彎腰、高勞力及長時間在震動環境下工作的人，被視為產生椎間環斷裂的好發族群¹⁹。有研究指出，椎間環產生的孔徑越大越會使椎間盤水分洩漏的可能性²¹，受到負載水分容易被擠出。所以有研究也指出，當循環負載造成椎間盤損傷後，量測椎間盤的動態性質變化，結果發現受傷後椎間盤動態性質較受傷前快達到穩定狀態⁷。椎間環斷裂後，如果沒有足夠的休息去修復受傷的椎間環，最後會造成椎間核隨著裂縫被擠出，因而導致椎間盤突出¹⁷。椎間核會隨年齡增加由水膠狀變成纖維狀，主要是由於水分與蛋白多醣含量減少^{14,22}。椎間核失去水分後，椎間盤的壓力會由原本均一分布的等向壓力轉變成集中在椎間環上²³⁻²⁵。因此當椎間核失去其澎潤特性後，會造成外力全由椎間環抵抗，而且當椎間核功能降低後，當椎間盤受負載時，會導致椎間環纖維失去椎間核支撐產生向內彎曲(inward bulging)⁶。這樣會增加椎間環所受的剪應力，因此會造成椎間環撕裂(tear)或裂縫(fissure)。因此椎間核蛋白多醣降解影響椎間盤力學性質的改變²⁶，甚至會導致更嚴重椎間盤退化，所以椎間核蛋白多醣降解為一個潛在使椎間盤退化的機制^{2,5,8,14,19,22,27}。

1-4 組織癒合過程的急性期

椎間盤受傷時，會影響到椎間核細胞基質合成與變性降解的平衡，造成蛋白多醣、膠原蛋白及彈性纖維的減少²⁶。椎間盤受傷處於急性期時，椎間盤細胞會使基質金屬蛋白酶(matrix metalloproteinases, 簡稱 MMPs)等變性降解酵素活化，開始分解蛋白多醣、膠原蛋白及蛋白質細胞基質，以利椎間盤受傷組織的吸收。隨著椎間核的蛋白多醣基質減少，椎間盤對水的吸附能力就下降，椎間盤的滲透性變大，椎間盤受到負載時水分流失加速，因此椎間核內細胞基質的變性降解勢必會影響椎間盤的材料性質與力學特性。探討此議題的研究多以動物椎間

盤為實驗對象，然而欲使動物椎間核產生自然變性降解並不容易，因此研究者多將變性降解酵素注射入椎間盤來達到此目的，這個方法稱為化學髓核溶解術 (chemonucleolysis)。常用的變性降解酵素有硫酸軟骨激酶(Chondroitinase ABC，簡稱 ChABC)以及胰蛋白酶(trypsin)。實驗證明兩種酵素對椎間盤生化成份、機械性質上的影響並沒有明顯差別。

在生化成份上，硫酸軟骨激酶和胰蛋白酶皆會造成椎間核內 GAG 數減少變性膠原蛋白增多，與椎間核內的基質金屬蛋白酶有類似的效果。Perie 等人在 2006 年以牛尾巴的椎間盤作為研究對象，分別在椎間盤中注射胰蛋白酶²⁸ 以及 ChABC²⁹ 後發現，椎間盤的 GAG 含量、膠原蛋白含量皆有顯著性變少。Roberts 等人³⁰ 在 2008 年以牛尾巴的椎間盤作為研究對象，在椎間盤中注射胰蛋白酶後，將椎間盤置於恆溫箱內培養三個禮拜，發現注射胰蛋白酶後的椎間盤內部 GAG 含量顯著性減少，且因為細胞基質降解而產生空腔。

在機械性質上，研究顯示硫酸軟骨激酶和胰蛋白酶會造成椎間盤的高度降低、椎間盤內壓下降、椎間盤勁度變大、滲透係數上升、聚合模數下降等現象。Sasaki 等人³¹ 在 2001 年以活體羊腰椎的椎間盤作為研究對象，在椎間盤中注射劑量為 1、5 和 50 U 的硫酸軟骨激酶，以及一組注射生理食鹽水的對照組，分別在注射前一星期、注射後一星期和注射後四星期量測椎間盤壓力與高度。實驗結果發現，注射 ChABC 後一星期的椎間盤內壓力會有顯著性下降，四星期後觀察同樣還是會下降，椎間盤高度也會有下降趨勢。Perie 等人在 2006 年以牛尾巴的作為研究對象，分別在椎間盤中注射胰蛋白酶²⁸ 以及硫酸軟骨激酶²⁹ 後發現，椎間核²⁸、椎間環²⁹ 的滲透係數(k_0)顯著性上升，聚合模數(H_A)顯著性下降，Mwale 等人³² 在 2008 年以牛尾巴作為研究對象，在椎間盤中注射胰蛋白酶後，也得到類似的結果。Boxberger 等人³³ 在 2006 年以老鼠腰椎作為研究對象，在椎間盤中分別注射濃度為 0.01、0.1、1 和 10 U/ml 的硫酸軟骨激酶，對椎間盤做循環拉伸與壓縮測試。實驗結果發現，注射硫酸軟骨激酶後，椎間盤的中性區位移量都顯著變大。

1-5 組織癒合過程的亞急性期

椎間盤受傷後的亞急性期，椎間盤組織中開始增生血管組織，變性降解酵素抑制酶(matrix degrading enzyme inhibitors)、生長素(growth factor)等亦開始活化，抑制變性降解酵素的分泌及活性，並促進椎間盤內的細胞開始分泌蛋白多醣以及膠原蛋白等細胞基質以修補受傷的組織³⁴。過去的實驗顯示，當變性降解酵素注射入活體動物的椎間盤後，在初期酵素可迅速造成椎間盤的蛋白多醣含量變性降解且伴隨著椎間盤體積、高度與壓力減少^{31,35}，但經過一段時間後酵素即被動物體吸收，而原本受損的細胞基質結構則呈現修復現象。Boxberger 等人³⁶在 2008 年以活體老鼠腰椎的椎間盤作為研究對象，在椎間盤中注射硫酸軟骨激酶後，經過 4 個禮拜和 12 個禮拜將老鼠犧牲並取其椎間盤壓縮與拉伸測試，並觀察椎間盤的生化含量變化。實驗結果發現，注射硫酸軟骨激酶 4 個禮拜後，椎間盤的機械性質與 GAG 含量皆有顯著性的變化，但經過 12 個禮拜後則無顯著性變化。

椎間盤受傷後，椎間盤細胞雖然仍會產生蛋白多醣等細胞基質的主要成份，但新生組織以膠原纖維為主，即所謂的疤痕組織(scar tissue)，膠原纖維是膠原蛋白產生交聯後的緻密結構，機械強度比蛋白多醣或膠原蛋白高，吸水能力較低。因此若椎間盤受傷的部分是椎間核，當大量的纖維結構取代以蛋白多醣及膠原蛋白為主的液狀構造，椎間盤的機械性質即產生改變。椎間盤退化即是最常見的例子，椎間盤退化通常由椎間核開始產生變化，細胞基質變少，水份含量降低，基質金屬蛋白酶活性增加，椎間核與內側椎間環的邊界變得不明顯，一直到退化晚期，可觀察到椎間核完全被膠原纖維所取代。Norcross 等人³⁵在 2003 年以活體老鼠尾巴的椎間盤作為研究對象，在椎間盤中注射硫酸軟骨激酶，兩星期之後犧牲掉老鼠取出椎間盤，發現椎間盤的高度、蛋白多醣及細胞數都減少，但椎間盤的勁度卻顯著增加。

組織的復原是一複雜的生化反應，除非是進行動物活體實驗，否則欲取得

部分組織纖維化、部分組織仍是健康的椎間盤幾乎是不可能的事。蛋白質間的交聯增加是膠原纖維組織的重要特徵，而這特徵可由化學交聯劑來完成。梔子素 (Genipin) 是臨床上常用的交聯劑之一，其分子式為 $C_{11}H_{12}O_5$ ，分子量為 226.23 g/mol，會與化合物(如：蛋白質、膠原蛋白、膠原纖維)中的胺基產生交聯(如圖 1-5 所示³⁷⁾，形成深藍色的物質，提高原化合物的機械強度。實驗顯示，當梔子素與明膠混合之後，可促成明膠內蛋白質產生分子內與分子間的胺基交聯，故可增加明膠的強度；又蛋白質交聯後，分子間的水份被擠出，故明膠的含水量降低³⁸。目前已有研究指出，椎間盤經由梔子素交聯後，有助提升脊椎穩定度³⁹、椎間環的抗壓能力⁴⁰及可讓受穿刺傷的椎間盤回復完整性⁴¹。

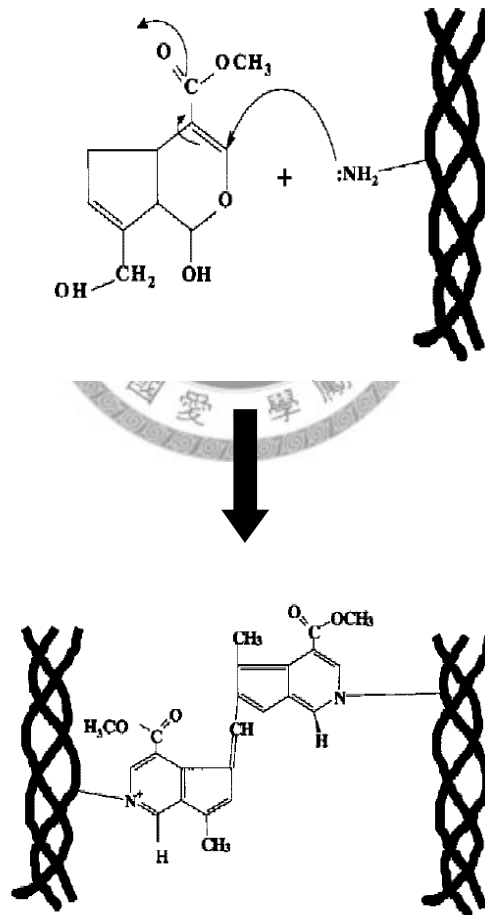


圖 1-5、梔子素與胺基產生交聯機制³⁷

1-6 椎間盤力學性質與循環負載

椎間盤在人體中具有吸震緩衝的功能，不論正常行走、上下階梯或跑步...等，椎間盤在力學上都會適度的將上述負載的能量予以消滅，減低負載對椎骨產生傷害。而人體在活動情況下，會造成椎間盤高度與體積的減小，是因為椎間盤水份被擠出，文獻指出這些流失的水分，只要經過晚上的睡眠休息就能完全回復至椎間盤內¹¹。因此人體椎間盤在一天當中，椎間盤的水分含量會受到日常生活中的負載大小與負載時間影響，因而改變椎間盤的性質。為了模擬日常生活的椎間盤負載受力型態，會將試樣施加適當的循環負載來模擬。而根據文獻指出，循環負載力量平均為 420 牛頓(範圍為 190~590 牛頓)且為負載頻率 5Hz 時，施予椎間盤 30 分鐘(9,000 次循環負載)不會造成椎間盤傷害，且椎間盤性質可經由休息完全回復；而施予椎間盤 2 小時(36,000 次循環負載)會造成椎間盤傷害，椎間盤性質無法經由休息完全回復⁷。且此負載的大小對椎間盤所造成的壓力平均為 0.45MPa⁴²，屬於椎間盤的生理可容忍範圍內，相當於坐著或輕鬆站姿下椎間盤所承受的負載⁴³。因此本實驗會將試樣施於以上兩種循環負載，來模擬椎間盤在日常生活中負載受力型態。

1-7 研究動機與實驗目的

椎間盤傷害是誘發椎間盤提早退化的導火線，當椎間盤受傷造成病人疼痛時，醫師通常以保守治療為優先考量，保守治療包括物理治療以及止痛、消炎藥物，當病人的症狀未獲得改善才考慮侵入式治療，動手術將病人的椎間盤部分移除，並視移除程度考慮是否給予融合手術。在保守治療通常以六個月為基準⁴⁴⁻⁴⁶，在這段期間不論病人的症狀是否緩解，根據以上的文獻探討，椎間盤的生化組成必定有顯著性的變化，這些改變可能會影響椎間盤的力學功能，若椎間盤的力學特性產生不可逆的變化，在日經月累的負重之下可能引起其他脊椎疾病的發生。目前椎間盤受傷後於不同時期的力學反應仍未被研究透徹，該知識的獲得將有助於改善或修正椎間盤受傷的治療方式，並給予病人適當的衛教指導。

本研究的目的是為藉著動物椎間盤、降解酵素與化學交聯劑的應用，以循環負載模擬脊椎於日常活動的受力型態，探討當椎間核或椎間盤受傷時，在急性期與亞急性期時，椎間盤抵抗外來力量的能力。我們以胰蛋白酶注射入椎間盤，使椎間核基質變性降解，模擬處於受傷急性期時的椎間核內部環境，接著以梔子素溶液注射入椎間盤，使椎間核內部組織的交聯增加，模擬受傷亞急性期時新生組織開始產生的狀態。本實驗利用椎間盤被施予長期循環負載後，椎間環纖維產生微斷裂的特性，來模擬處於受傷急性期的椎間環；接著將椎間盤浸泡於梔子素溶液，使椎間環纖維交聯增加，來模擬處於受傷亞急性期的椎間環狀態。



第二章 實驗設備

2-1 連續式衝擊測試平台(Continuous Impact Testing Apparatus)

連續式衝擊測試平台(以下簡稱 CITA)機構為本實驗室自行研發之多功能材料測試機構，如圖 2-1 所示，包含有機台本體機構、手動控制面板與訊號擷取處理系統等部分所組成。CITA 機台可依實驗需求裝設所需的感測器，可用於量測位移、應變、載重、應力及加速度等參數。目前機台上裝有三個一維測力元、一個線性電位計及一個線性位移計等感測器，可用來量測試樣在測試時所承受的軸向載重與軸向形變量。藉由訊號處理系統裡的訊號處理放大器、類比/數位轉換擷取卡等硬體，透過訊號擷取系統裡訊號擷取程式即可儲存實驗測試過程中的各種感測器的擷取資料。

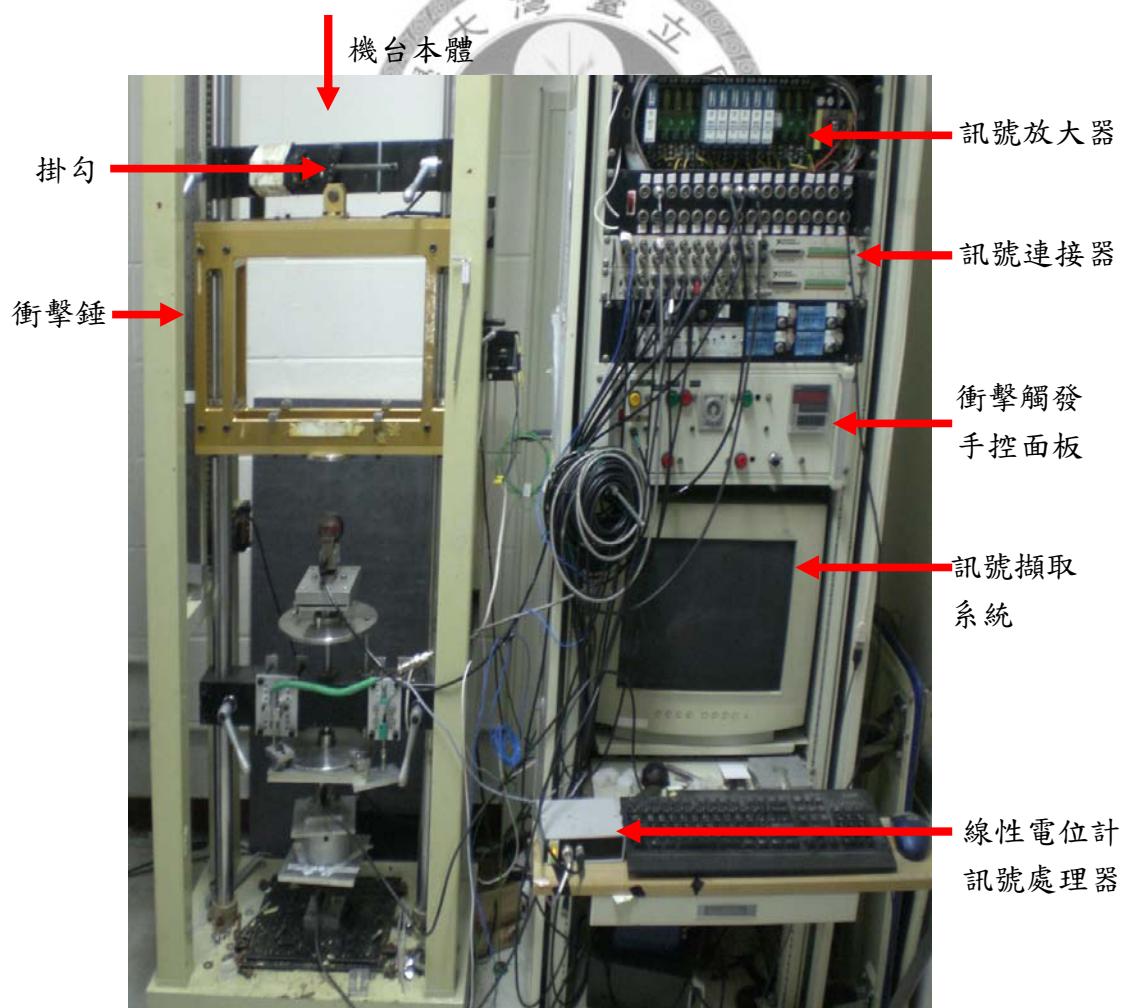


圖 2-1、連續式衝擊測試平台(CITA)

本實驗使用 CITA 機台做的材料測試有以下兩種：

(一)自由落體衝擊測試，主要是藉由機台上固定架改變衝擊錘高度使其自由落下，用來模擬生物試樣在承受不同衝擊荷載下，所產生的動態力學特性量測，本實驗即使用此測試方法進行衝擊測試。

(二)動態循環負載測試，主要是藉由將自製的往復式衝擊負載模組裝置衝擊錘上，產生連續之動態循環負載，用於模擬生物體日常生活承受的連續循環負載，另外載荷大小與負載頻率皆可以依實驗所需要而調整。

2-2 衝擊錘(Impactor)

如圖 2-1 所示,其重量為 12 公斤，懸掛於固定架的掛勾上，其衝擊高度可以隨固定架任意調動，最大的自由衝擊高度可達到 1.5 公尺，最大產生的衝擊能量為 176.4J。而本衝擊測試實驗的自由衝擊高度為 1 公分，所產生的衝擊能量為 1.2J。

2-3 撞擊承受器(Impounder)

如圖 2-2 所示，其重量為 9 公斤，為試樣受衝擊錘衝擊時用來傳遞衝擊力量的機構，藉由機構上導桿的方向限制，確保試樣只承受垂直方向的軸向力且為均佈施力，可配合試樣高度做上下位置調整，包含有兩個一維測力元與線性電位計。撞擊承受器上方會裝有不同緩衝墊，可用來調整衝擊試樣的接觸時間及力量大小，如圖 2-2 所示，衝擊測試實驗會使用 20ms 的緩衝墊材料；下方會利用 C 型夾來與試樣的上補土固定，主要確保線性電位計所量測的位移量為試樣上方椎骨的位移。

2-4 往復式衝擊模組(Cyclic Loading)

往復式衝擊模組是由一顆直流馬達與兩個偏心情輪所組成，如圖 2-3 所示，可以固定於衝擊錘上。作動模式為由直流馬達帶動兩個偏心情輪產生相反方向的旋轉，此方法是為了相互抵消情輪旋轉時產生的力矩，使試樣只受到垂直的軸向上下週期性的循環負載。此模組也可依實驗的需要去調整載荷大小與頻率，載荷

大小可由惰輪上的砝碼孔去調整，載荷頻率可以由面板調整馬達轉速來控制。本衝擊測試實驗時使用的載荷大小為 190~590N，平均力量為 420N，頻率為 5Hz(依面板調整馬達轉速為 1500rpm)。

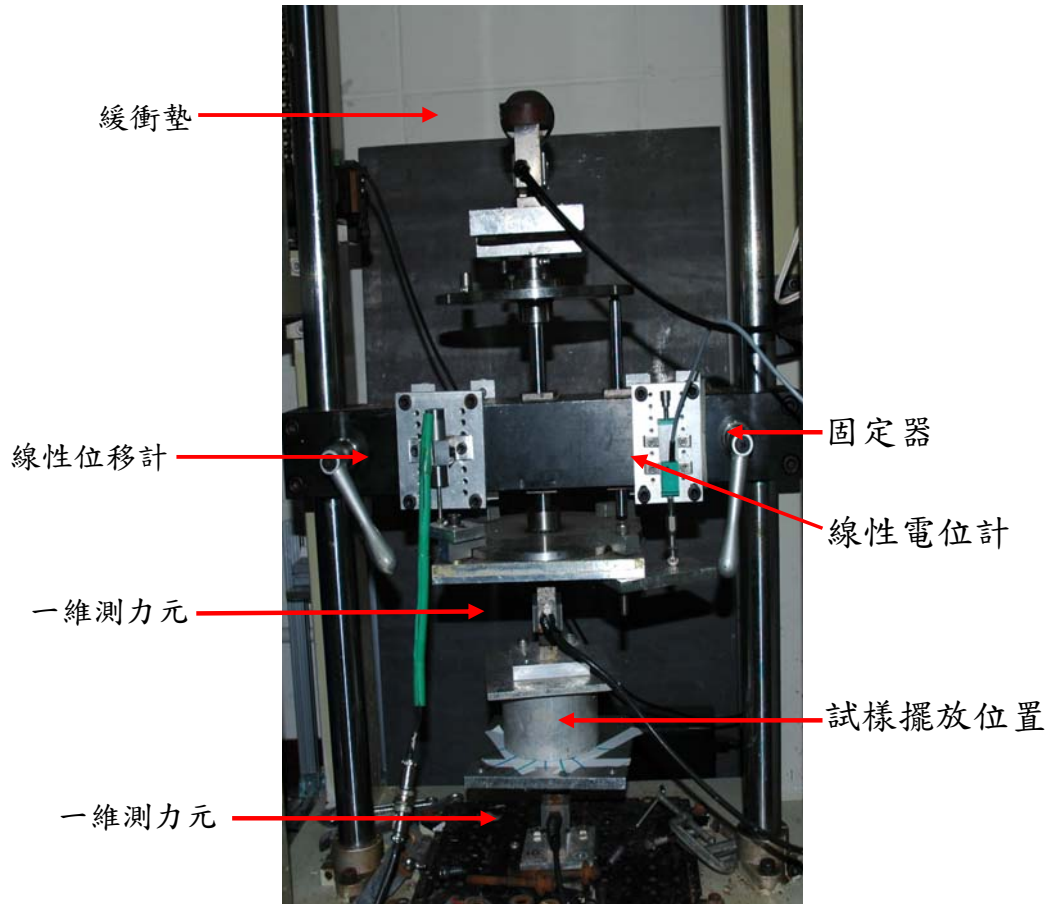


圖 2-2、撞擊承受器(Impounder)

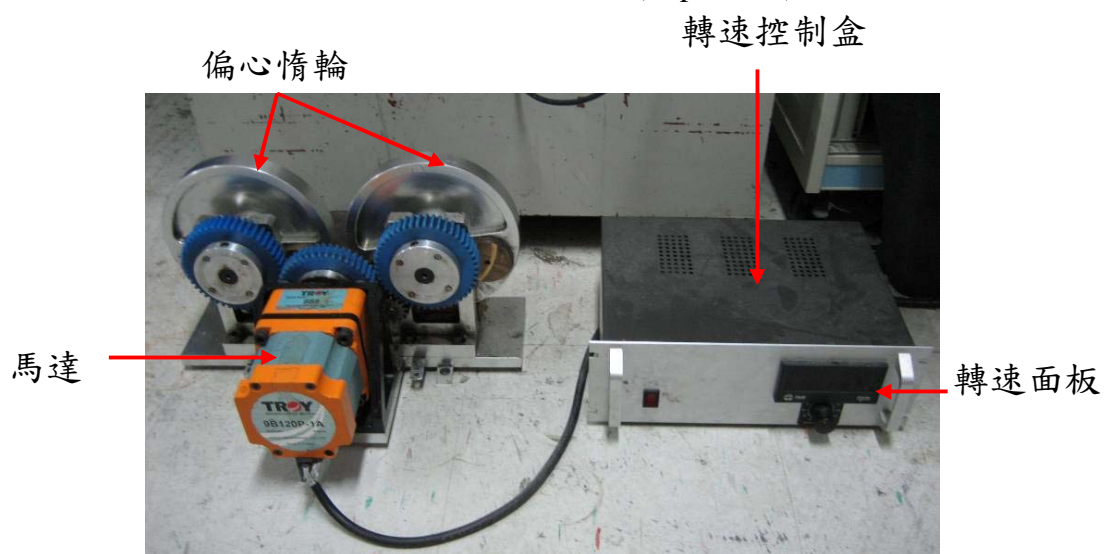


圖 2-3、往復式衝擊模組(Cyclic Loading)

2-5 線性電位計(Potentiometer)

如圖 2-2 所示，本實驗所使用的線性電位計最大位移行程為 25mm，線性度為±0.1%。線性電位計訊號由線性電位計訊號處理器(如圖所示 2-1)轉換，將訊號由 3-pin 接頭接收轉換成 BNC 接頭輸入 CITA 訊號擷取系統，此訊號處理器可以提供線性電位計 0~10V 電壓。線性電位計固定於固定器上，其前端頂於撞擊承受器上，藉由撞擊承受盤移動時改變線性電位計電壓訊號，作為量測衝擊實驗時椎間盤的形變量。其位移(y)-電壓值(x)校正公式如下所示(單位： $y = mm, x = v$)。

$$y = -2.1867x$$

2-6 線性位移計(Liner Variable Differential Transformer)

如圖 2-2 所示，本實驗所選用之線性位移計(以下簡稱 LVDT) 最大量測範圍為 15mm，線性度為±0.5%。此 LVDT 為兩件式的感測器，包含一個圓筒線圈和一根感應圓棒。首先我們會將圓筒線圈固定於固定器上，而感應圓棒固定在撞擊承受器上，調整固定器至 LVDT 可感測範圍，再藉由撞擊承受盤移動時改變 LVDT 電壓訊號，作為量測衝擊實驗時椎間盤的形變量。其位移(y)-電壓值(x)校正公式如下所示(單位： $y = mm, x = v$)。

$$y = -0.9152x$$

2-7 一維測力元(1-D Load Cell)

如圖 2-2 所示，本實驗所使用的一維測力元為 S-type Load Cell，主要利用懸臂梁的微小變形改變裡面應變規的電壓值輸出值。本實驗主要使用的兩個一維測力元分別固定在撞擊承受器與機台底座上，兩個測力元之間為試樣擺放處，因此可量測出試樣的輸入與輸出軸向力。測力元的量測最大範圍為 250Kg，力量(y)-電壓值(x) 校正公式如下所示(單位： $y = N, x = v$)。

$$\text{上方測力元： } y = -205.82x$$

$$\text{下方測力元： } y = -208.97x$$

2-8 訊號擷取處理及控制系統

如圖 2-1 所示，上述感測器的電壓訊號會由系統裡的訊號放大器放大訊號後，經由訊號連接器傳送到類比數位轉換擷取卡轉換擷取訊號後，再傳送到系統電腦裡經由程式分析後存取。訊號放大器為 3B Amplifier (Analog Device)，其具有 32 條通道，可經由 Ranging card(AC1301)調整放大卡的增益來放大擷取訊號，最大輸出電壓為 $\pm 10V$ ，本實驗使用三張放大卡(兩張 3B18 和一張 3B17)，而 3B18 放大卡用來放大一維測力元的訊號，用 3B17 的放大卡來放大 LVDT 訊號。訊號連接器為美商慧基公司 (National Instrument Inc.) 所推出的 BNC-2090 訊號連接器，本身除了可以執行訊號輸入的工作之外，還可以透過它來進行訊號的輸出以達到對硬體的觸發動作。類比數位轉換擷取卡(AD/DA card)也是美商慧基公司出產的產品，型號為 PCI-MIO-64E-1，本實驗會使用其中三個通道，擷取頻率為 10,000Hz，時間為 0.5 秒。另外使用 1 個類比輸出訊號來觸發衝擊錘自由落下的掛勾。最後本實驗以 LabVIEW8.0 圖控軟體撰寫出一人機介面程式，透過類比數位轉換擷取卡送出觸發訊號，去觸發 CITA 上的掛勾，使撞擊錘落下執行衝擊測試，接著執行訊號擷取與處理的工作。

第三章 材料與方法

3-1 試樣準備

本實驗使用六個月大的豬隻腰椎為試樣，試樣大小為一個運動單元(椎骨-椎間盤-椎骨)，總共取 36 個試樣。試樣的處理方式為先取下豬腰椎，利用線鋸機分成運動單元大小並移除後側椎骨小面關節部份，再利用手術刀將週邊的軟組織剔除後，在椎骨的兩端利用補土包埋，包埋時會使用水平儀確保上下補土為水平，主要是為了確保實驗時試樣能與實驗儀器保持平面接觸且為均佈荷載。之後我們會將試樣分成兩組，一組為 intact 組(N=18)，一組為 denatured 組。intact 組試樣為用紗布包上並噴上生理食鹽水保溼，先放入-20°C 的冰箱中保存，在實驗前 24 小時拿到 4°C 的冰箱中解凍，解凍過程會將試樣浸泡在生理食鹽水中。椎間核變性水解組需將試樣椎間核產生變性水解，而我們是採用胰蛋白酶(T4799，Sigma)。注射前會將 0.5g 胰蛋白酶加入 99.5ml 的生理食鹽水中，均勻攪拌後成 0.5% 胰蛋白酶溶液。注射時會使用 22G 號針頭將 1ml 的胰蛋白酶溶液由四個不同方向等量注入試樣中，如圖 3-1 所示為注射時四個入針方向(A、L、P 和 R)。為了確保胰蛋白酶溶液與椎間核產生作用，會將注射完的試樣先放於室溫 25°C 下 12 小時，再放入 4°C 冰箱保存 12 小時，實驗前 2 小時拿到室溫下退冰，以上過程皆會將試樣浸泡在生理食鹽水中。

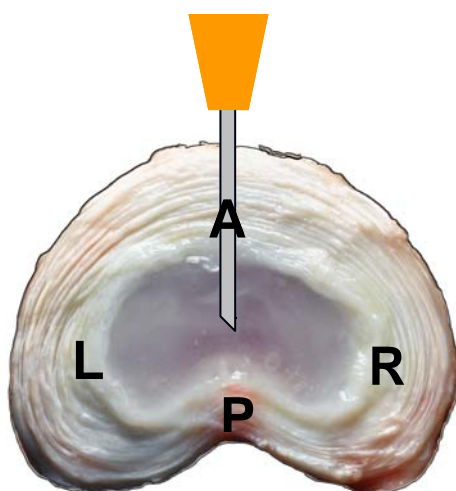


圖 3-1、入針方向示意圖

3-2 實驗流程

本實驗測試的椎間盤損傷模型會分成椎間核變性水解與椎間環損傷模型兩種，椎間核變性水解模型在動態性質測試時會施予短時間的循環負載(30 分鐘)；椎間環損傷模型在動態性質測試時會施予短時間的循環負載(2 小時)，以下章節會加以詳細介紹整個實驗流程。

3-2-1 椎間核變性水解模型流程

本實驗的流程如圖 3-2 所示，試樣未受循環負載之前會先作衝擊測試，再施予第一次 30 分鐘循環負載，循環負載期間每 10 分鐘會一次作衝擊測試。完成第一次循環負載後會將試樣分成兩組，一組(n=9)為直接浸泡生理食鹽水放入 4°C 冰箱 24 小時保存，實驗前 2 小時拿到室溫下退冰，再施予第二次 30 分鐘循環負載，同樣每 10 分鐘會一次作衝擊測試，此組稱為 control group；另一組(n=9)為使用 22G 號針頭由之前入針方向注入 1ml 的梔子素溶液後(078-03021, Wako, Japan)，為了確保梔子素溶液與椎間核產生作用，會先注射完的試樣先放於室溫 25°C 下 12 小時，再放入 4°C 冰箱保存 12 小時，實驗前 2 小時拿到室溫下退冰，再施予第二次 30 分鐘循環負載，同樣每 10 分鐘會一次作衝擊測試，此組稱為 crosslinking group。梔子素溶液濃度為 0.33% (0.33g 加入 99.67ml 的生理食鹽水調配而成)。

3-2-2 椎間環損傷模型流程

本實驗的流程如圖 3-3 所示，試樣未受循環負載之前會先作衝擊測試，再施予第一次 2 小時循環負載，循環負載期間在 0.5、1 和 2 小時會一次作衝擊測試。完成第一次循環負載後會將試樣分成兩組，一組(n=9)為直接浸泡生理食鹽水放入 4°C 冰箱 24 小時保存，實驗前 2 小時拿到室溫下退冰，再施予第二次 2 小時循環負載，同樣在 0.5、1 和 2 小時會一次作衝擊測試，此組稱為 control group；另一組(n=9)為直接浸泡梔子素溶液後(078-03021, Wako, Japan)放入 4°C 冰箱 24 小時保存，實驗前 2 小時拿到室溫下退冰，再施予第二次 2 小時循環負載，同樣

在 0.5、1 和 2 小時會作一次衝擊測試，此組稱為 crosslinking group。梔子素溶液溶度為 0.33% (0.33g 加入 99.67ml 的生理食鹽水)。

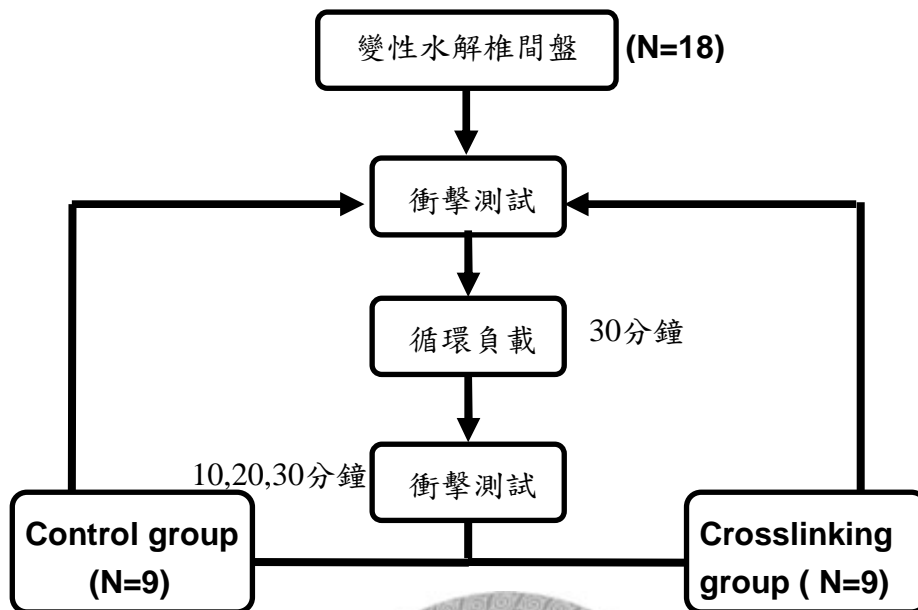


圖 3-2、椎間核變性水解組流程圖

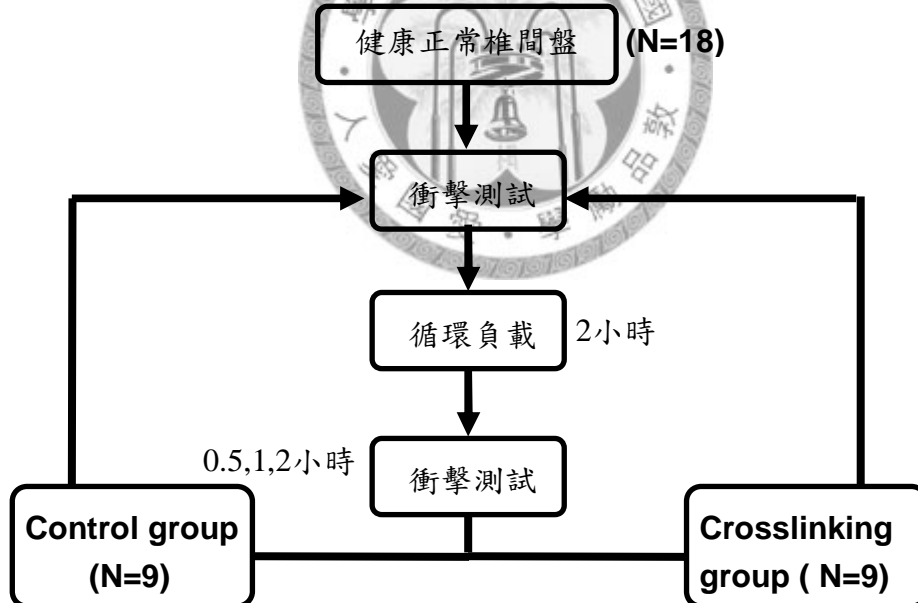


圖 3-3、椎間環損傷組流程圖

3-3 實驗方法

衝擊測試.本實驗的衝擊測試高度為 1 公分的衝擊試驗，所產生的衝擊能量為 1.2J，緩衝墊使用 20ms 的材料。如圖 3-4 所示，首先會將試樣擺放在 CITA

機台上且與機台同軸心後，利用 C 型夾將試樣補土固定在上下兩個一維測力元中，再將緩衝墊固定在撞擊承受器上面，接著利用 1 公分的塊規去調整衝擊錘固定座，使的衝擊錘底部與緩衝墊距離為 1 公分。

循環負載.就上述試樣衝擊完後，會將緩衝墊拿掉，將衝擊錘放置撞擊承受器上，接著將往復式衝擊模組放入衝擊錘上固定，如圖 3-4 所示。循環負載力量平均為 420 牛頓(範圍為 190~590 牛頓)，負載頻率 5Hz，循環負載時間總共分為短時間與長時間的兩種。短時間循環負載為總共為 30 分鐘，循環次數為 9,000 次，並每 10 分鐘間隔會做一次衝擊測試。短時間循環負載為總共為 2 小時，循環次數為 36,000 次，並會在 0.5 小時、1 小時及 2 小時時做一次衝擊測試。

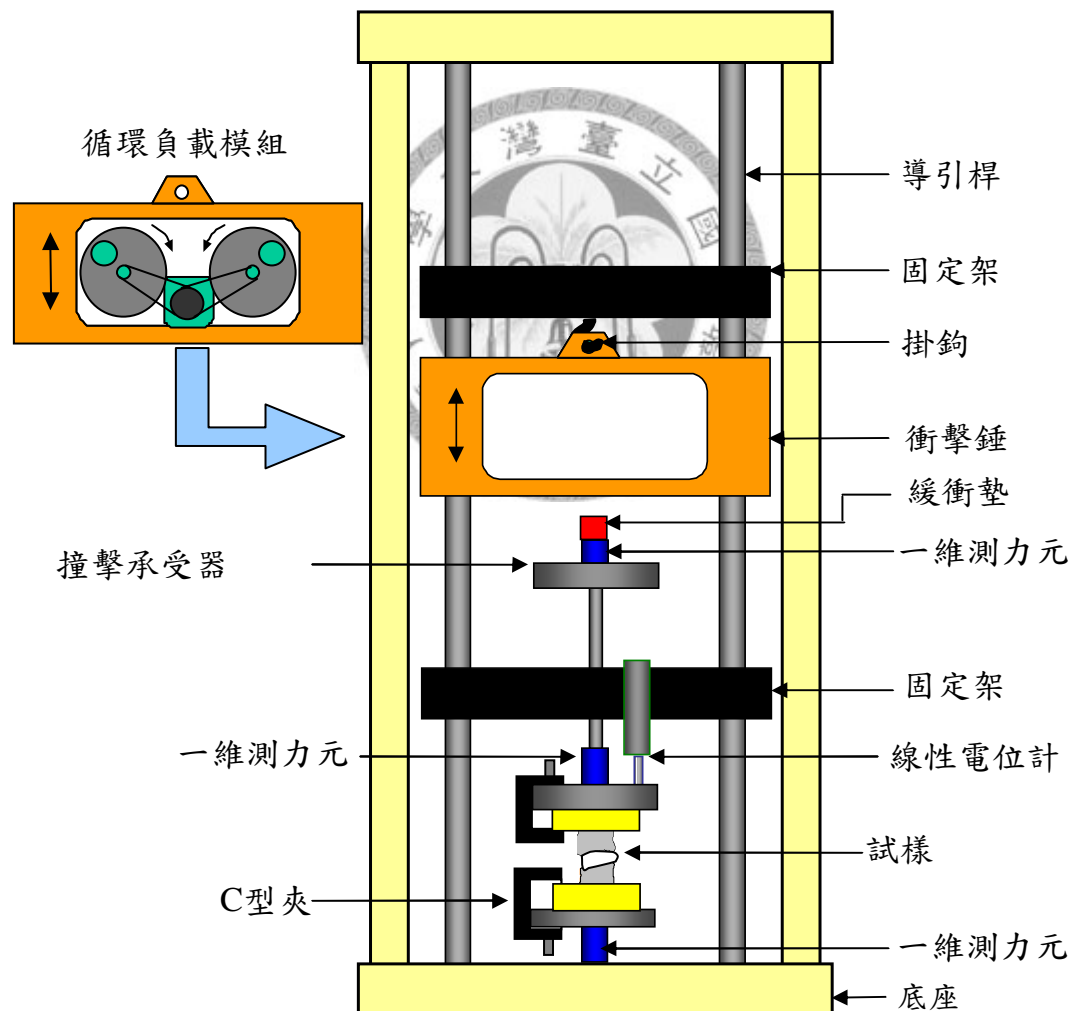


圖 3-4、實驗時機台示意圖

3-4 數學模型

椎間盤是一個黏彈性的材料，所以就將椎間盤視為一個彈簧阻尼系統，如圖 3-5 所示，其一維自由震盪運動方程式為如式 3-1 所示。式中質量體(M)為包含衝擊承受器、上補土及椎骨的重量，總重約為 9 公斤。勁度係數 K (stiffness) 與阻尼係數 C (damping coefficient) 即為椎間盤的動態性質。本實驗量測資料為椎間盤受衝擊時的位移量變化，如圖 3-6 所示。第一個峰值為衝擊錘衝擊錘過程，本實驗會取椎間盤自由震盪的部份來分析，即第二和第三峰值過程。第二個峰值為 x_1 ，第三個峰值為 x_2 ，自由震盪週期為 τ_d 。之後經由公式推導，可導出 K、 ξ 及 C，如式 3-2~式 3-4 所示。

$$M\ddot{x} + C\dot{x} + Kx = 0 \dots\dots\dots (\text{式 3-1})$$

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

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

$$C = 2\xi\sqrt{KM} \dots\dots\dots (\text{式 3-4})$$

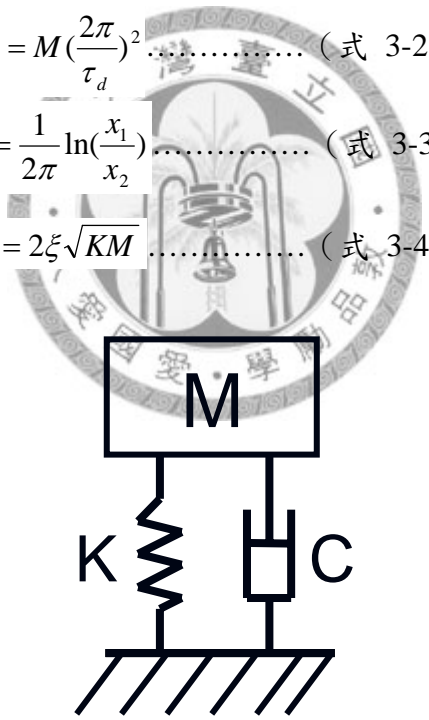


圖 3-5、一維彈簧阻尼系統⁷

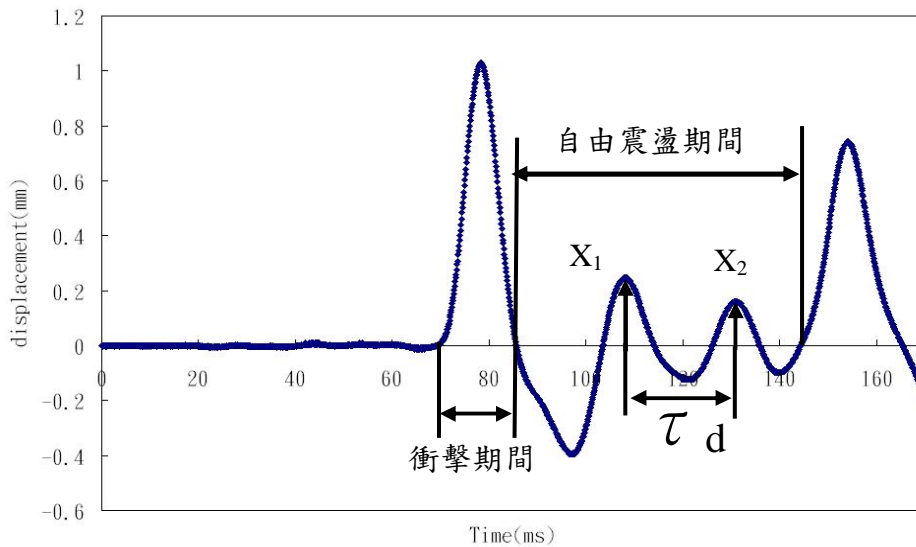


圖 3-6、椎間盤位移與時間關係圖

3-5 統計分析方法

椎間核變性降解/外生性交聯的影響

先使用 Two-way ANOVA 來分析椎間核變性降解前、椎間核變性降解後、椎間核變性降解並產生外生性交聯後，椎間盤的勁度、阻尼係數於循環負載期間的差異。兩個主要的分析因子為「椎間核特性」以及「循環負載的時間」。椎間核變性降解前的實驗資料則是取自實驗室資料庫，該資料已被刊登至 SPINE 期刊⁷。接著，採用 One-way ANOVA 來檢驗循環負載是否對椎間核變性降解後之椎間盤產生無法回復的破壞。如果檢定結果為否定，則取第二次循環負載後的實驗數據並使用 Two-way ANOVA，來分析椎間核產生外生性交聯之後椎間盤的勁度、阻尼係數於循環負載期間的變化，並與健康椎間盤做比較。以上兩次 Two-way ANOVA，最後皆以 LSD 法做後設分析。所有統計檢定皆以 $p < 0.05$ 視為達顯著性差異。

椎間環斷裂/外生性交聯的影響

使用 Two-way ANOVA 來分析椎間環斷裂前、椎間環斷裂後、椎間環斷裂並產生外生性交聯後，椎間盤的勁度、阻尼係數於循環負載期間的差異。兩個主要的分析因子為「椎間環特性」以及「循環負載的時間」。接著以 LSD 法針對該兩個主要因子做後設分析。以上統計檢定皆以 $P < 0.05$ 視為達顯著性差異。

第四章 結果

4-1 椎間核變性降解/外生性交聯產生後的椎間盤之動態性質分析

在短時間循環負載中，椎間盤的勁度值如圖 4-1 所示。健康椎間盤的勁度初始值為 788.5 (48.7) N/mm⁷，但當椎間核變性降解後，椎間盤的勁度初始值顯著地降低，僅有 593.1 (48.3) N/mm，一直到循環負載經過 10 分鐘之後，其勁度值才增加至與健康椎間盤相同的程度。在第一次循環負載期間，健康椎間盤的勁度值隨著負載時間的增加而緩慢上升，一直到 30 分鐘之後勁度的增加量才明顯地大於初始值(K=924.34(29.6) N/mm，P=0.000)⁷。但椎間核變性降解後，椎間盤的勁度值經 10 分鐘循環負載以後即顯著地大於初始值(K=882.2(72.63) N/mm，P=0.000)，但之後直到循環負載結束，勁度值則沒有顯著地改變，換句話說，椎間核變性降解之後，椎間盤的勁度值在循環負載 10 分鐘後即達到平衡。

第一次循環負載結束後，椎間盤即浸泡於生理食鹽水中以回復循環負載期間所流失的水份。經過 24 小時之後，健康椎間盤的勁度值即回復至第一次負載前的程度⁷，同樣的情形也出現在椎間核變性降解後的椎間盤。健康椎間盤的勁度隨循環負載時間而變化的趨勢與第一次負載相同，都是在 30 分鐘之後才有顯著地增加⁷。對於椎間核變性降解後的椎間盤，其勁度值於循環負載期間的變化也與第一次相同，都是在 10 分鐘後即顯著地升高，之後維持持平直到循環負載結束。

在短時間循環負載中，椎間盤的阻尼係數值如圖 4-2 所示。健康椎間盤的阻尼係數初始值為 0.67(0.05)Ns/mm，但當椎間核變性降解後，椎間盤的阻尼係數初始值顯著地降低，僅有 0.45(0.02)Ns/mm，而且在循環負載期間，勁度值一直顯著地低於健康椎間盤。第一次循環負載期間，健康椎間盤的阻尼係數隨著負載時間而緩慢地減少，一直到 30 分鐘之後才明顯地低於初始值(C=0.42(0.67) Ns/mm，P=0.000)。當椎間核變性降解後，椎間盤的阻尼係數經 10 分鐘循環負載以後即顯著地減少(C=0.365(0.035) Ns/mm，P=0.000)，但之後直到循環負載結

束，阻尼係數值則沒有顯著地改變，此趨勢與勁度的變化一樣。

24 小時浸泡於食鹽水後，健康椎間盤的阻尼係數即回復至第一次負載前的程度⁷，同樣的情形也出現在椎間核變性降解後的椎間盤。健康椎間盤的阻尼係數隨循環負載時間而變化的趨勢與第一次負載相同，都是在 30 分鐘之後才顯著地低於初始值⁷。對於椎間核變性降解後的椎間盤，其阻尼係數值於循環負載期間的變化也與第一次相同，都是在 10 分鐘後即顯著地減少，之後即呈現持平狀態，直到循環負載結束後都沒有顯著性地變化。

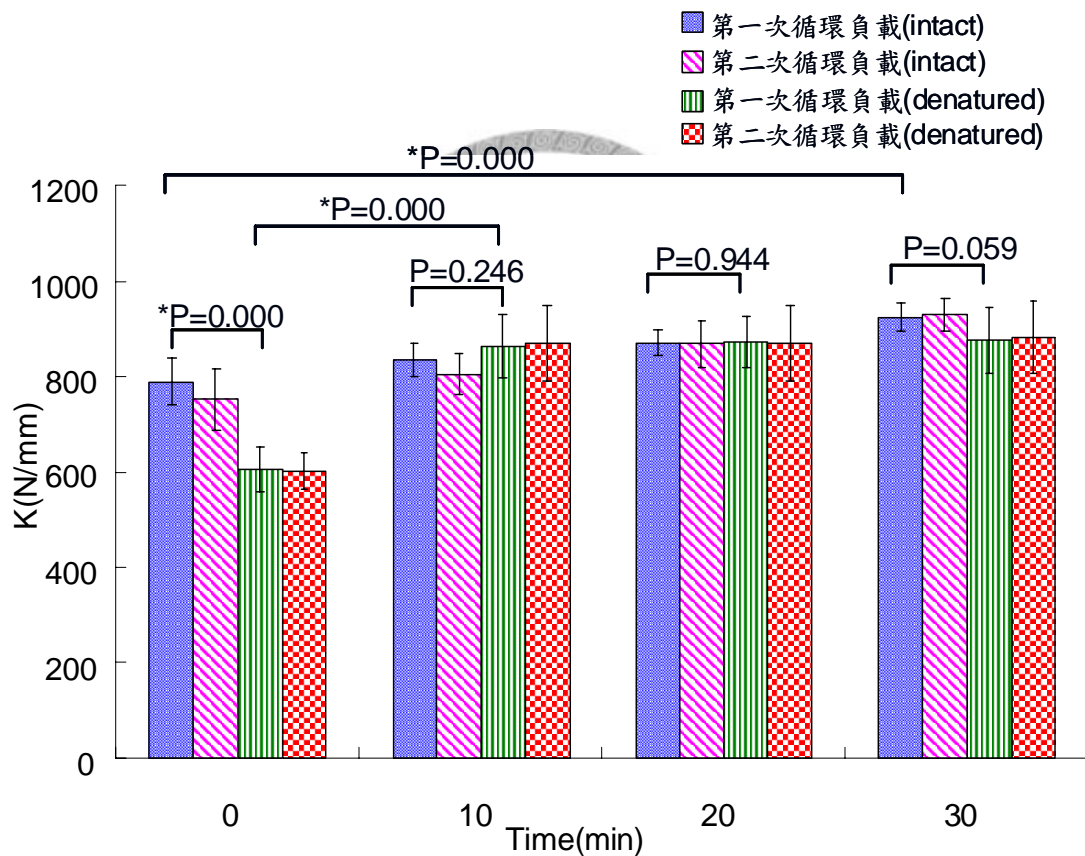


圖 4-1、椎間核變性降解椎間盤 K 值與負載時間關係圖

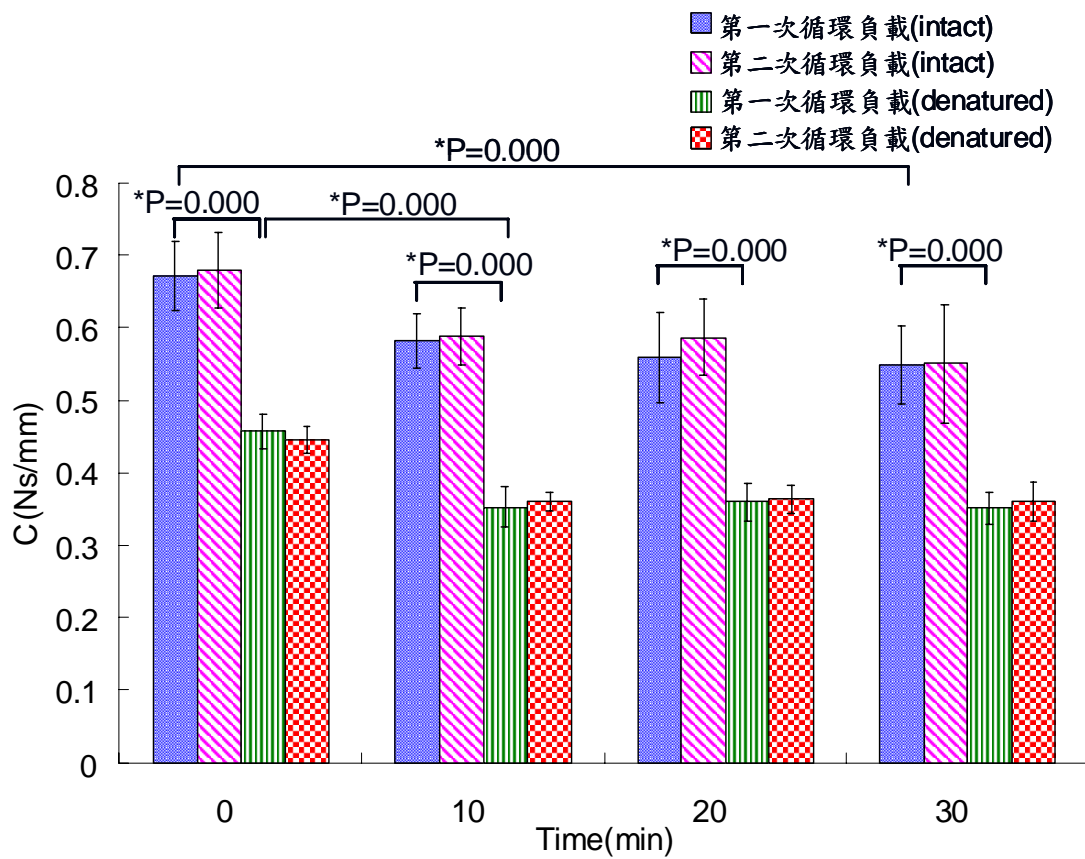


圖 4-2、椎間核變性降解椎間盤 C 值與負載時間關係圖

根據 one-way ANOVA 的結果顯示，椎間核變性降解後椎間盤的勁度、阻尼係數於在前、後兩次循環負載期間的變化並沒有顯著性的差異($P=0.259$)，表示 1)變性降解酵素與椎間核間的化學作用，已於循環負載實驗前完成；2)循環負載並不會加強變性降解酵素對椎間盤的破壞。因此我們採用三種椎間盤(健康、椎間核變性降解、椎間核變性降解並產生外生性交聯)於第二次循環負載間的變化，來探討外生性交聯對椎間盤動態性質的修復情形。

如圖 4-3 所示，當變性降解後的椎間核產生外生性交聯後，椎間盤的勁度顯著上升($K=725.42(26.7)$ N/mm, $P=0.000$)，但仍低於健康椎間盤的勁度，而隨著負載時間增加，椎間盤的勁度以更緩慢的速度上升，雖然與健康椎間盤一樣，都是在循環負載 30 分鐘之後椎間盤的勁度才顯著地高於初始值($K=795.98(45.7)$),

P=0.002)，但是與健康椎間盤或椎間核變性降解後的椎間盤比較起來，在 30 分鐘的循環負載期間，椎間盤的勁度都明顯較低。

如圖 4-4 所示，當變性降解後的椎間核內部外生性交聯增加之後，椎間盤的阻尼係數顯著上升(C=0.598(0.064)Ns/mm，P=0.000)，但仍顯著低於健康椎間盤的阻尼係數(P=0.008)，在循環負載期間，雖然椎間盤的阻尼係數一直低於健康椎間盤，但已高於椎間核變性降解之椎間盤。外生性交聯產生之後，椎間盤的阻尼係數隨著負載時間增加而緩慢地下降，並且與健康椎間盤一樣，都是在循環負載達到 30 分鐘之後才顯著地低於初始值(C=0.471(0.05)Ns/mm，P=0.000)。

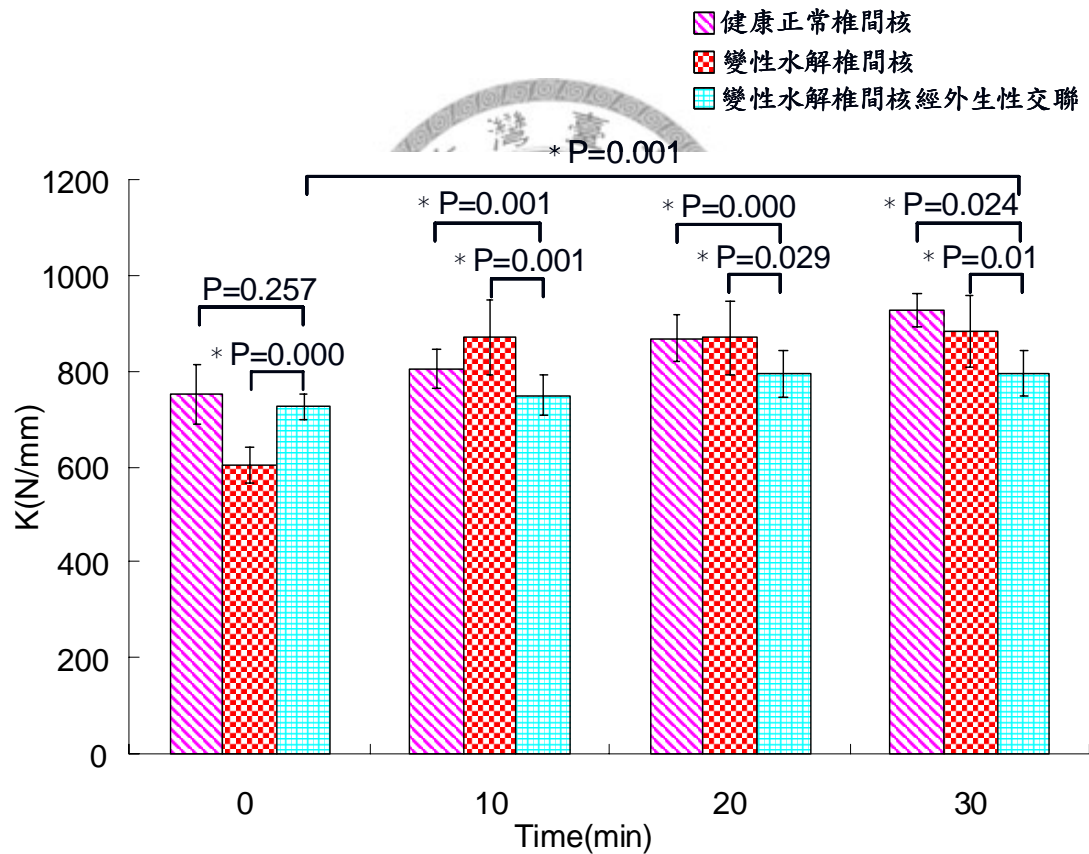


圖 4-3、椎間核變性降解/外生性交聯椎間盤 K 值與負載時間關係圖

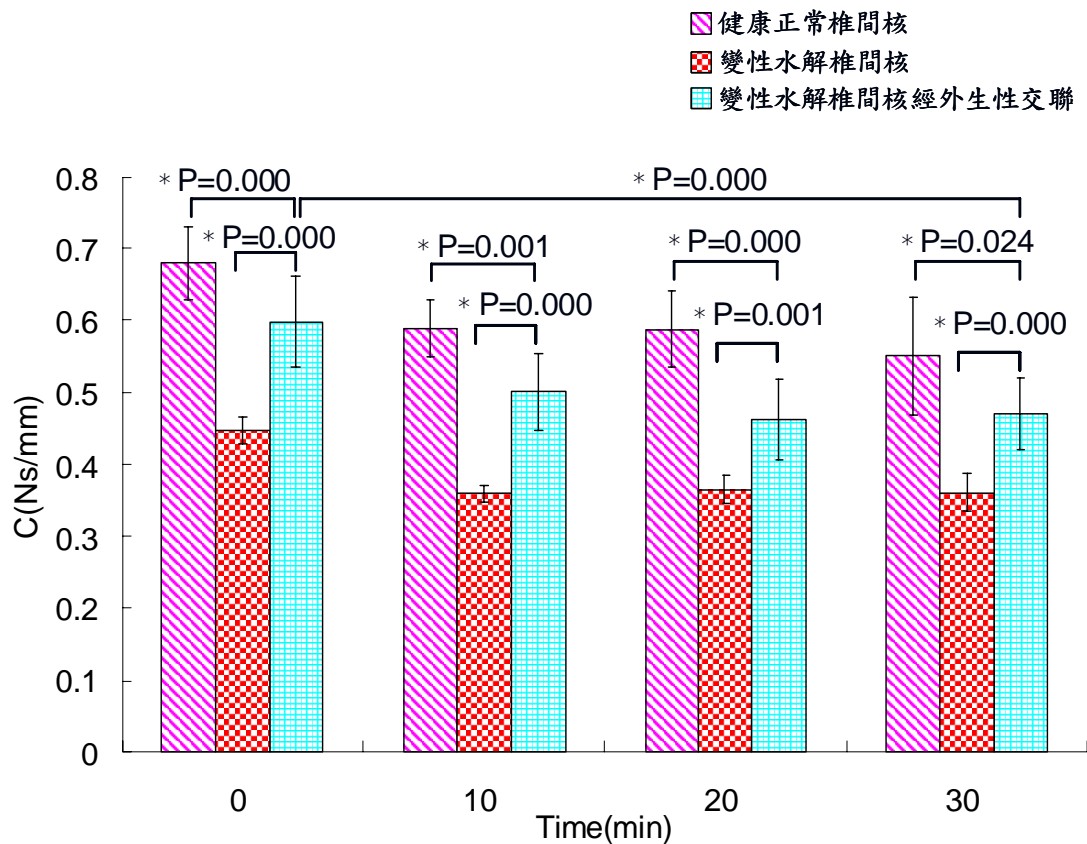


圖 4-4、椎間核變性降解/外生性交聯椎間盤 C 值與負載時間關係圖

4-2 椎間環破裂/外生性交聯產生後的椎間盤之動態性質分析

根據文獻，椎間盤經過 2 小時的循環負載後椎間盤即產生無法回復的椎間環傷害，這種傷害雖然不影響椎間盤水份的回復，但是卻會加快椎間盤於負載期間水份流失的速度⁷，而本實驗重現了相同的實驗結果。如圖 4-5 所示，健康椎間盤的勁度初始值為 655.88(60.5) N/mm，不論椎間環的狀態健康與否，椎間盤的勁度皆隨負載時間增加而變大。但健康椎間盤的勁度增加速度較慢，當循環負載 0.5 小時後，勁度顯著高於初始值(P=0.000)，而當循環負載繼續進行 0.5 小時後(即循環負載達 1 小時)，椎間盤勁度亦有顯著性的增加(P=0.000)，但之後勁度即到達定值不再有顯著性的變化。但是當椎間環斷裂之後，雖然循環負載前的勁度值與健康椎間盤無異(P=0.169)，但是勁度隨循環負載時間增加的速率變快，在負載 0.5 小時後勁度值即增加至與健康椎間盤受到循環負載 1 小時後的程度，而且從

此至循環負載結束，勁度不再有顯著性的改變。當椎間環外生性交聯產生之後，椎間盤的勁度初始值仍與健康椎間盤無異(P=0.193)，但是勁度值的上升速度卻十分緩慢，雖然和健康椎間盤一樣都是在循環負載 1 小時後才到達穩態，但是在 2 個小時的循環負載期間，椎間盤的勁度值卻比健康椎間盤或是外生性交聯未生成之前還要低。

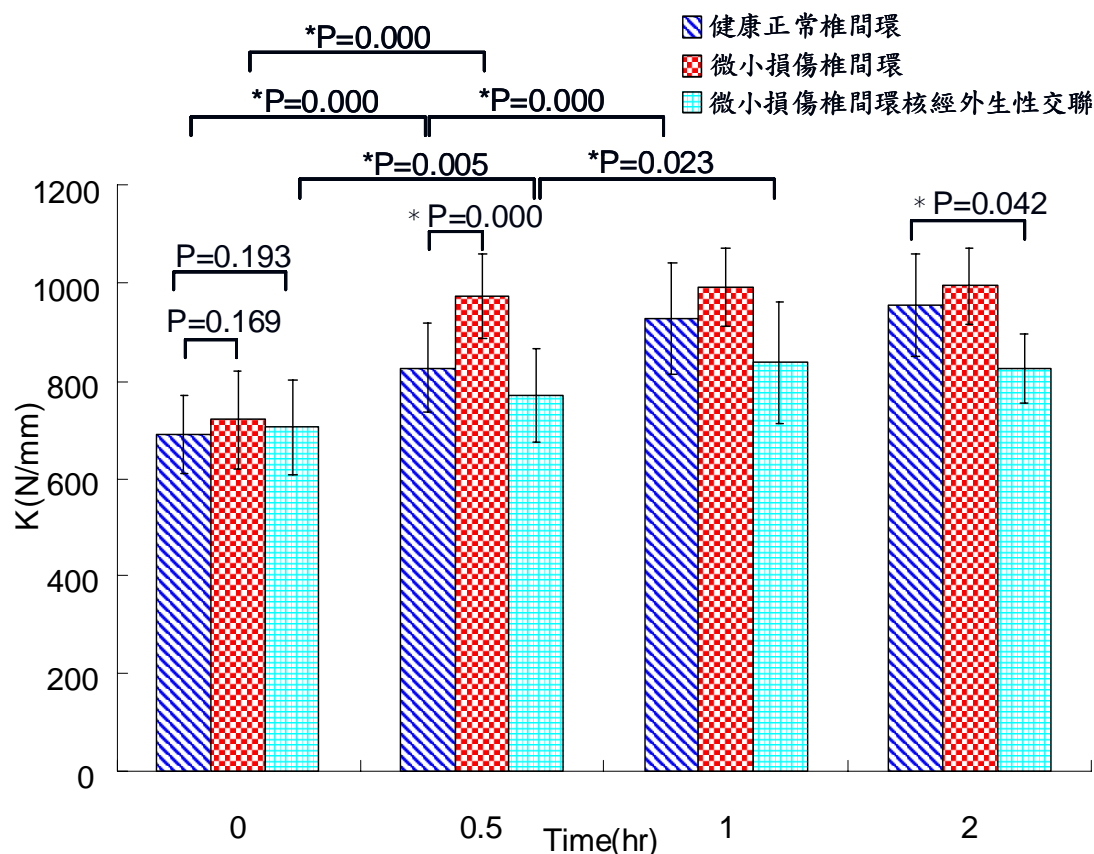


圖 4-5、椎間環損傷/外生性交聯椎間盤 K 值與負載時間關係圖

如圖 4-6 所示，健康椎間盤的阻尼係數初始值為 0.594(0.08)Ns/mm，不論椎間盤的狀態健康與否，椎間盤的阻尼係數皆隨負載時間增加而變小。但健康椎間盤的阻尼係數降低速度較慢，當循環負載 0.5 小時後，阻尼係數顯著低於初始值(P=0.000)，而當循環負載繼續進行 0.5 小時後(即循環負載達 1 小時)，椎間盤阻尼係數亦有顯著性的降低(P=0.000)，但之後阻尼係數即到達定值不再有顯著性的變化。但是當椎間環斷裂之後，雖然循環負載前的阻尼係數與健康椎間盤無異(P=0.302)，但是阻尼係數隨循環負載時間減少的速率變快，在負載 0.5 小時後勁

度值即減少至與健康椎間盤受到循環負載 1 小時後的程度，而且從此直到循環負載結束，阻尼係數不再有顯著性的改變。當椎間環外生性交聯產生之後，椎間盤的阻尼係數初始值不升反降，但當循環負載 0.5 小時後，阻尼係數顯著低於初始值($P=0.001$)，而當循環負載繼續進行 0.5 小時後(即循環負載達 1 小時)，椎間盤阻尼係數亦有顯著性的降低($P=0.002$)，但之後阻尼係數即到達定值不再有顯著性的變化。

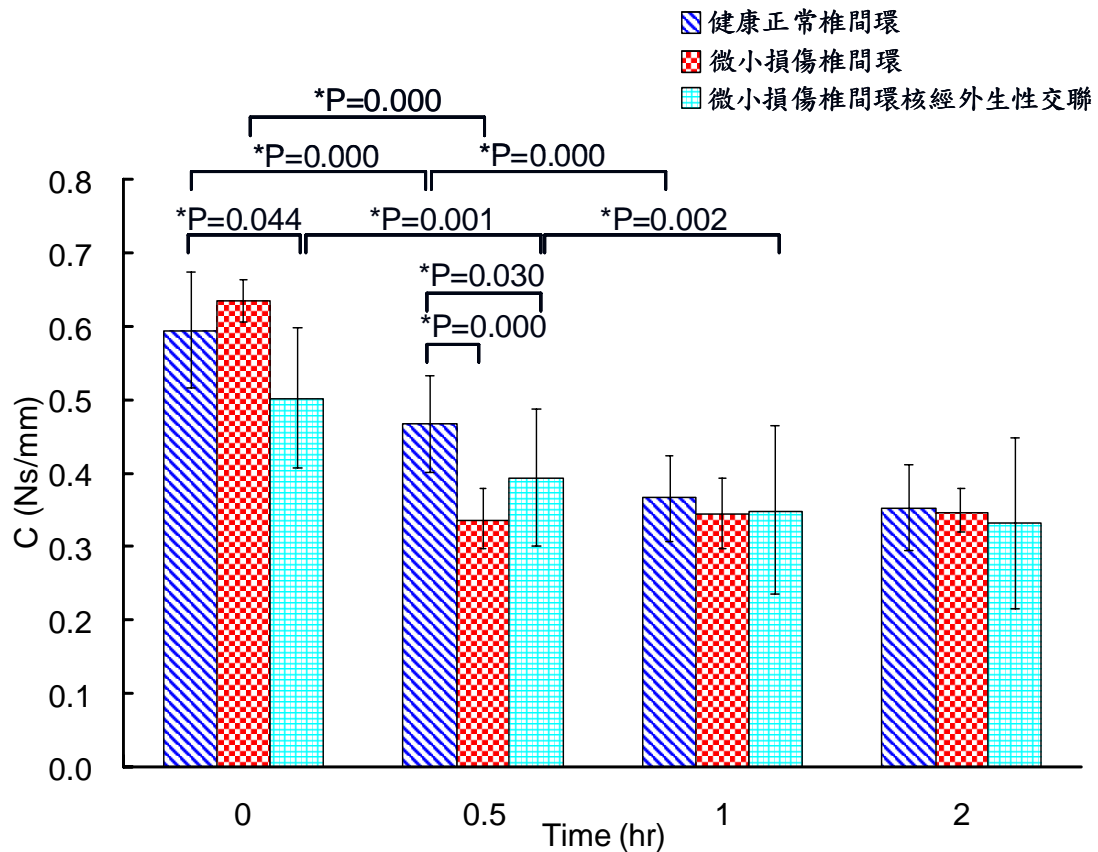


圖 4-6、椎間環損傷/外生性交聯椎間盤 C 值與負載時間關係圖

4-3 椎間盤切面觀察

圖 4-7 表示的是本實驗中各種椎間盤經過循環負載後的縱向切面圖，依序為 (A)健康完整、(B)椎間核變性降解、(C)椎間核變性降解後注入梔子素溶液、(D)椎間環損傷後經浸泡梔子素溶液。由圖中可觀察發現，健康椎間盤的椎間環向外側排列較整齊，椎間核為半透明的膠體，從切面膨潤出一個半球狀。椎間核經過胰蛋白酶變性降解後，椎間核由膠狀變成液狀，無法再膨潤出半球狀，而且內部充血，內側椎間環也有被破壞的現象，椎間環的層狀排列較為混亂。當梔子素溶

液注入變性降解後的椎間核產生交聯後，椎間核、內部椎間環與椎終板都呈現藍色，此現象代表這些地方都有產生外生性交聯，椎間核膨潤狀態不佳，但是內側椎間環破裂並與椎間核相混的現象較不明顯。而椎間環損傷後經浸泡梔子素溶液的椎間盤，其外部椎間環有產生外生性交聯，但內部椎間環與椎間核則沒有外生性交聯現象產生，但椎間核仍舊呈現膨潤狀態。

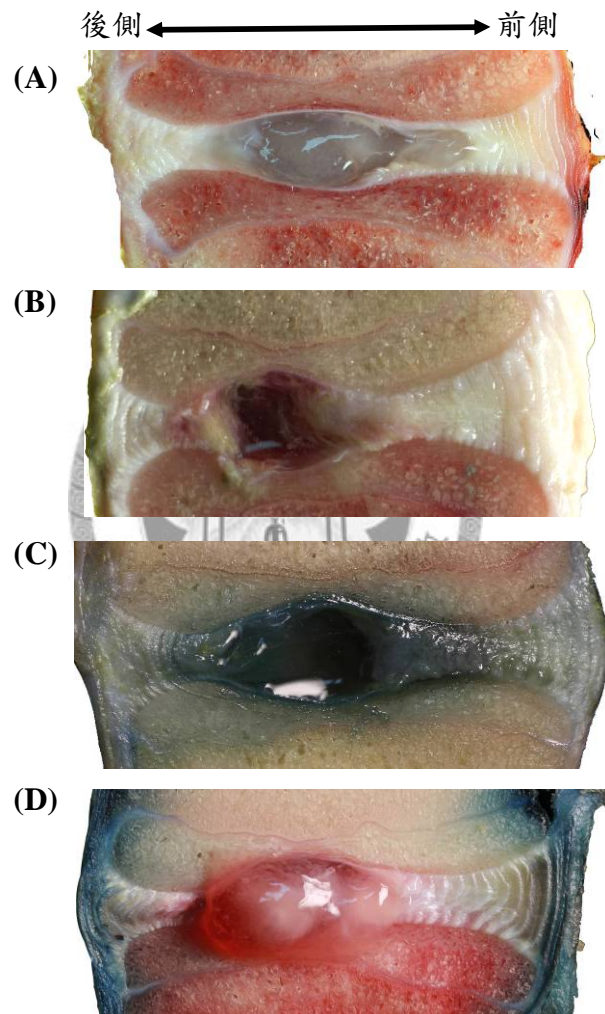


圖 4-7、椎間盤切面觀察(A)健康完整、(B)椎間核變性水解後、(C)水解椎間盤注入梔子素溶液、(D)椎間環損傷後經浸泡梔子素溶液

第五章 討論

5-1 椎間盤動態性質隨循環負載時間增加的變化

本實驗以椎間盤的勁度與阻尼係數的變化來表達椎間盤抵抗外力的功能。勁度代表椎間盤的強度，阻尼係數代表椎間盤緩衝外來能量的能力，這兩種動態性質與椎間盤的水分含量、結構完整度、結構組成成份的材料性質息息相關。當椎間盤受力時，水分会從椎間核往外擠出，並由椎終板(endplate)以及椎間環流出。水分流出的路徑以椎終板為主，椎間環由於結構緻密，加上受力時纖維網狀結構被壓密使得水分流出通道變窄，加上會往外側膨出變形而產生張力，因此水分不易從椎間盤外側流失。椎間盤結構在受力時的形變產生水分流出的阻力，成為椎間盤抵抗外力、緩解衝擊能量的主要機制。本研究結果顯示，正常的椎間盤的勁度值與阻尼係數，當椎間盤受力時間增加，含水量逐漸降低，組織變得乾硬，因此椎間盤的勁度值上升而阻尼係數下降。但當外力解除後，水分又會逐漸流回椎間盤，因此椎間盤的勁度下降而阻尼係數上升。椎間盤勁度隨循環負載時間延長而增加，阻尼係數隨循環負載時間延長而減少的特性並不隨椎間盤的生化組成、結構完整度不同而改變。椎間盤的水分並不會無止境逸散，當外力與椎間盤滲透壓達到平衡時，水分便不再流出椎間盤，外力大部分由椎間環承擔，因此勁度和阻尼係數便停止變化。

5-2 椎間盤傷害對椎間盤動態性質的影響

椎間核變性降解。胰蛋白酶會分解蛋白質，椎間核內含有蛋白質的主要成份有蛋白多醣與膠原蛋白，所以胰蛋白酶會破壞這些物質的結構，甚至破壞內側椎間環纖維以及椎終板表面，造成椎間盤的孔洞性(porosity)增加。由於蛋白多醣及膠原蛋白已被破壞，造成水分與細胞基質的鍵結力量降低，所以在循環負載期間，椎間盤流失水分的速度比正常椎間盤要快，這可解釋實驗中觀察到的兩個現象：1. 椎間盤阻尼係數比正常值低，意即椎間盤的吸震能力變差；2. 椎間盤的勁度與阻尼係數達到平衡狀態的速率，比正常椎間盤快。過去的實驗也證實變性

降解後之椎間核、椎間環，其液體滲透性(hydration permeability)都明顯提高^{28,29}。

實驗結果顯示，在循環負載開始前，椎間核降解之椎間盤的勁度值較正常值為低，推測是椎間盤內部產生多餘的空腔(因為結構被破壞，孔洞增加)可容納回流的水分，使椎間盤於食鹽水溶液的回復過程中吸水過度(over-hydration)，因此在循環負載開始前，椎間盤勁度較正常值低，一直到循環負載開始，迫使水分從椎間盤排出之後，勁度才上升。我們也發現椎間核降解後的椎間盤達到穩態時的勁度值，與健康椎間盤相同，推測可能是胰蛋白酶僅作用於椎間盤內部，外側的椎間環仍保持完整，因此當椎間環開始承擔大部份外力時，椎間核降解後的椎間盤，其勁度便與正常椎間盤相同。在實驗中椎間核降解的椎間盤於前後兩次循環負載期間，動態性質隨時間變化的趨勢完全一致，這表示短時間的負載並不會使椎間核變性降解之椎間盤產生其它不可逆的反應。

椎間核變性降解 vs. 椎間環斷裂. 當比較兩種椎間盤傷害對椎間盤動態性質的影響時，我們發現共同點是兩種傷害都會改變動態性質隨負載時間的變化速率，而不影響椎間盤在負載結束後的勁度值。這表示這兩種傷害都會增加椎間盤的孔洞性，造成椎間盤受力時水分流失快速。但實驗顯示椎間核變性降解會降低椎間盤的阻尼係數，但椎間環傷害並不會，這結果支持椎間核是椎間盤緩衝外力的主要結構，並且顯示椎間核的化學組成是維持椎間盤緩衝外力的重要因子。當椎間核基質與降解酵素作用而變性降解後，改變了水分與椎間核基質原本的鍵結力，使椎間盤吸震能力減弱，故增加了外力對人體傷害的風險。

5-3 外生性交聯對椎間盤傷害的影響

孔洞性的回復. 外生性交聯產生後，使椎間盤的孔洞性降低，故減緩了椎間核基質降解後產生的過度吸水現象，這可以從負載前的勁度值看出：椎間核降解之椎間盤，原本勁度值顯著降低，但椎間核降解經外生性交聯修補後，負載前的勁度值提升可以看出。當椎間盤孔洞性降低後，椎間盤內的水分便不易流出，因此降低了椎間盤傷害後動態性質隨循環負載時間而變化的速率，這在椎間核基質

降解或椎間環傷害的實驗都可看到。Chuang 等人的實驗也顯示，外生性交聯可修補椎間環上的穿刺傷，恢復椎間盤含養水分的功能⁴¹

勁度的回復。從實驗結果可以發現，不論是椎間核變性降解還是椎間環斷裂，外生性交聯對椎間盤傷害的勁度回復沒有顯著性幫助，甚至還會降低椎間盤的勁度。從椎間盤斷裂的實驗結果可以看出，當椎間環纖維斷裂產生外生性交聯後，椎間盤在循環負載前的勁度仍與正常值相同，可是經過循環負載後椎間盤勁度反而比椎間環斷裂之椎間盤還要低，這結果與過去椎間盤交聯作用的實驗相反，Chuang 等人顯示當椎間環交聯增加，其環向伸張應力(circumferential tensile modulus)和軸向伸張降伏應力(axial tensile yield stress)隨之變大⁴⁰。因此本實驗結果很可能顯示交聯劑改變了原本纖維結構的連結方式，而這種鍵結對循環負載的耐受度不佳，因此經過循環負載後，椎間環反而產生更多斷裂而導致勁度降低。

外生性交聯組織對循環負載耐受度不佳的現象與退化的椎間盤類似。椎間盤退化後會產生膠原纖維替代原有健康的椎間核與椎間環，這些新生的膠原交聯為醅化反應產物(glycation end product)，這種交聯產物使椎間盤彈性降低，變得硬、脆，促使椎間環更易破裂，產生裂縫⁴⁷。本實驗中的椎間環破裂試樣是直接泡在交聯劑溶液中，因此大部分的外生性交聯產生在椎間環的部分，而椎間核降解的椎間盤試樣，交聯劑是注射入椎間盤內，因此交聯主要產生在椎間核、椎終板以及內側椎間環。椎間環是椎間盤抵抗外力的主要部分，因此比較兩種椎間盤傷害產生外生性交聯後椎間盤的勁度變化，可以發現椎間盤勁度降低的現象在椎間環斷裂的試樣較明顯。

阻尼係數的回復。根據以上的討論得知，降低阻尼係數的主要原因來自椎間核的變性降解，而本實驗結果還顯示了，當椎間核經交聯修復後，椎間盤的阻尼係數值明顯改善，不論是循環負載前或是循環負載期間，椎間盤的阻尼係數都比椎間核變性降解前高，推測原因是外生性交聯修復了椎間盤內部蛋白質化合物間的鍵結，使水分與細胞間質的鍵結力增強。而外生性交聯可能也降低了椎間盤的孔洞性，使水分於循環負載期間流出椎間盤的速度變慢，因而降低阻尼係數隨負

載時間的變化速率，並且回復至與健康椎間盤相同的狀態。

相反的，椎間環斷裂經交聯修復後，阻尼係數值沒有改變，但因椎間環纖維產生的新鍵結對循環負載的耐受度較差，而且強度變弱，因此推測在循環負載期間，椎間盤產生新的孔洞，因此阻尼係數隨負載循環而降低的速度與椎間環未經修復時相同，沒有改善。

5-4 實驗限制

大多數的椎間盤傷害都是由椎間盤內部開始產生，因為椎間核和內側椎間環的機械強度較弱，而大部分的椎間盤細胞都位於椎間核，又椎間盤的新陳代謝、組織汰舊換新都由椎間盤細胞所調控，故當椎間盤一受傷，這些細胞便會開始分泌降解酵素，啟動組織的癒合過程。因此在活體內，僅單純椎間環斷裂而椎間核基質沒有改變的傷害應該是不可能存在的。但由於椎間環和椎間核的功能不同，因此本研究特將這兩種傷害單獨分離出來，以區分這兩種結構對椎間盤動態性質的影響。若是在活體內的椎間盤傷害，那麼椎間盤的動態性質應是本實驗兩種椎間盤傷害的綜合結果：椎間盤緩衝能力下降，並且於受力其間水分快速流失。

本實驗以天然交聯劑梔子素模擬人體椎間盤自行修復破壞組織產生的交聯，其修補機制上與椎間盤自行修復並不相同。椎間盤受傷癒合的疤痕組織是纖維母細胞分泌出來的膠原纖維，通常其含量豐富並且排列凌亂，已與原來的椎間盤結構不同。梔子素對蛋白質化合物的交聯反應十分複雜，因此交聯出的蛋白質化合物是否與膠原纖維類似有待未來實驗證明，再者本實驗的交聯作用的原料是椎間盤內部已存在的蛋白質化合物，因此在數量上比新生疤痕組織低，推測強度比真正纖維化的椎間盤低。但本實驗顯示由梔子素產生的交聯結構對疲勞負載的低耐受度與椎間盤老化的情形雷同，因此以梔子素交聯來模擬組織纖維化仍有其合理性。

本實驗所使用的試樣為六個月大的豬隻腰椎椎間盤，雖然豬隻的腰椎與人的腰椎的幾何構造上有差異⁴⁸⁻⁵⁰，但豬隻腰椎椎間盤與人的腰椎椎間盤的高度與

面積蠻相似的⁷，且本實驗會將豬隻的腰椎的後側椎骨、小面關節和肌肉軟組織給移除，只單純對椎間盤受軸向負載後的變化做探討。因此，本文認為此實驗結果可以模擬實際人體椎間盤所受到軸向負載後的變化情形。

本實驗以胰蛋白酶注入豬隻腰椎椎間盤模擬人體椎間核細胞基質降解的椎間盤破壞，雖然此實驗為體外試驗，沒有生物體修復機制來修復破壞的基質，但豬隻椎間盤椎間盤與人體的組成成分類似⁵¹，而且胰蛋白酶可降解的成分與人體降解酶也類似。因此，本研究可以提供一個資訊，來瞭解細胞基質降解後對椎間盤性能的影響。



第六章 結論與未來展望

6-1 結論

本研究模擬椎間盤傷害依椎間盤結構分成兩類，一是椎間核基質降解為生化性傷害，二是椎間環斷裂為物理性傷害。本研究模擬結果發現，當椎間盤受傷處於急性期時，因椎間核基質降解的影響，使的椎間盤的緩衝能力下降，並且會造成椎間盤的孔洞性增加。當椎間盤受傷自癒來到亞急性期時，因外生性交聯產生後，使的受傷椎間盤的孔洞性下降，並且提升椎間盤因椎間核基質降解而降低的緩衝能力，但外生性交聯卻會降低膠原纖維對循環負載的耐受力，最後使椎間盤整體強度降低。

6-2 未來展望

本實驗使用蛋白水解酵素與梔子素，可以立即達到細胞基質降解與組織增生交聯的效果，但本實驗忽略了生物體自體修復的狀況，因此如要更了解這兩種藥物長時間在體內產生的效果，未來可以進行生物活體的試驗。另外，本實驗只探討細胞基質降解與組織增生交聯後對椎間盤動態性質的影響，而細胞基質降解與組織增生交聯後組織上、生化成分上與細胞上的影響未加以探討，因此如要更了解這兩種藥物在組織學上的影響，未來也可以將試樣做切片觀察。

參考文獻

1. Urban J, Roberts S, Ralphs J. The Nucleus of the Intervertebral Disc from Development to Degeneration 1: Soc Integ Comp Biol, 2000:53-61.
2. Singh K, Masuda K, Thonar EJ, et al. Age-related changes in the extracellular matrix of nucleus pulposus and annulus fibrosus of human intervertebral disc. *Spine* 2009;34:10-6.
3. Roughley PJ. Biology of intervertebral disc aging and degeneration: involvement of the extracellular matrix. *Spine* 2004;29:2691-9.
4. Roberts S. Disc morphology in health and disease. *Biochem Soc Trans* 2002;30:864-9.
5. 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.
6. 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.
7. Wang JL, Wu TK, Lin TC, et al. Rest cannot always recover the dynamic properties of fatigue-loaded intervertebral disc. *Spine* 2008;33:1863-9.
8. Vresilovic E, Johannessen W, Elliott D. Disc mechanics with trans-endplate partial nucleotomy are not fully restored following cyclic compressive loading and unloaded recovery. *Journal of Biomechanical Engineering* 2006;128:823.
9. 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.
10. Allen M, VetMB P, Schoonmaker J, et al. Preclinical Evaluation of a Poly (Vinyl Alcohol) Hydrogel Implant as a Replacement for the Nucleus Pulposus. *Spine* 2004;29:515.
11. Malko JA, Hutton WC, Fajman WA. An in vivo magnetic resonance imaging study of changes in the volume (and fluid content) of the lumbar intervertebral discs during a simulated diurnal load cycle. *Spine* 1999;24:1015-22.
12. Frank Netter M. Atlas of Human Anatomy, 1989.
13. Urban J, Roberts S. Degeneration of the intervertebral disc. *Arthritis Research and Therapy* 2003;5:120-38.
14. Adams M, Roughley P. What is intervertebral disc degeneration, and what causes it? *Spine* 2006;31:2151.
15. Adams M, Freeman B, Morrison H, et al. Mechanical initiation of intervertebral disc degeneration. *Spine* 2000;25:1625.
16. Adams M, Hutton W. The effect of fatigue on the lumbar intervertebral disc.

- Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume* 1983;65:199-203.
17. Adams M, Hutton W, CEng M. Gradual disc prolapse. *Spine* 1985;10:524.
 18. GORDON S, YANG K, MAYER P, et al. Mechanism of disc rupture: a preliminary report. *Spine* 1991;16:450.
 19. Stokes IA, Iatridis JC. Mechanical conditions that accelerate intervertebral disc degeneration: overload versus immobilization. *Spine* 2004;29:2724-32.
 20. 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.
 21. Wang JL, Tsai YC, Wang YH. The leakage pathway and effect of needle gauge on degree of disc injury post anular puncture: a comparative study using aged human and adolescent porcine discs. *Spine* 2007;32:1809-15.
 22. Roughley P, Alini M, Antoniou J. The role of proteoglycans in aging, degeneration and repair of the intervertebral disc. *Biochem Soc Trans* 2002;30:869-74.
 23. McNally DS, Shackelford IM, Goodship AE, et al. In vivo stress measurement can predict pain on discography. *Spine* 1996;21:2580-7.
 24. Adams MA, McNally DS, Dolan P. 'Stress' distributions inside intervertebral discs. The effects of age and degeneration. *J Bone Joint Surg Br* 1996;78:965-72.
 25. Sato K, Kikuchi S, Yonezawa T. In vivo intradiscal pressure measurement in healthy individuals and in patients with ongoing back problems. *Spine* 1999;24:2468-74.
 26. Roberts S, Caterson B, Menage J, et al. Matrix metalloproteinases and aggrecanase: their role in disorders of the human intervertebral disc. *Spine* 2000;25:3005-13.
 27. Yerramalli C, Chou A, Miller G, et al. The effect of nucleus pulposus crosslinking and glycosaminoglycan degradation on disc mechanical function. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology* 2007;6:13-20.
 28. 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.
 29. 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.
 30. Roberts S, Menage J, Sivan S, et al. Bovine explant model of degeneration of the intervertebral disc. *BMC Musculoskelet Disord* 2008;9:24.
 31. Sasaki M, Takahashi T, Miyahara K, et al. Effects of chondroitinase ABC on intradiscal pressure in sheep: an in vivo study. *Spine* 2001;26:463-8.
 32. Mwale F, Demers CN, Michalek AJ, et al. Evaluation of quantitative magnetic resonance imaging, biochemical and mechanical properties of trypsin-treated

intervertebral discs under physiological compression loading. *J Magn Reson Imaging* 2008;27:563-73.

33. Boxberger JI, Sen S, Yerramalli CS, et al. Nucleus pulposus glycosaminoglycan content is correlated with axial mechanics in rat lumbar motion segments. *J Orthop Res* 2006;24:1906-15.

34. Peng B, Chen J, Kuang Z, et al. Expression and role of connective tissue growth factor in painful disc fibrosis and degeneration. *Spine* 2009;34:E178-82.

35. Norcross JP, Lester GE, Weinhold P, et al. An in vivo model of degenerative disc disease. *J Orthop Res* 2003;21:183-8.

36. Boxberger JI, Auerbach JD, Sen S, et al. An in vivo model of reduced nucleus pulposus glycosaminoglycan content in the rat lumbar intervertebral disc. *Spine* 2008;33:146-54.

37. Sung HW, Chang Y, Liang IL, et al. Fixation of biological tissues with a naturally occurring crosslinking agent: fixation rate and effects of pH, temperature, and initial fixative concentration. *J Biomed Mater Res* 2000;52:77-87.

38. Liang CC, Tsao HK. Sol-Gel Transition and Microemulsion-Organogel Transition of Gelatin. Graduate Institute of Chemical Engineering and Materials Engineering : National Central University 2002.

39. Hedman TP, Saito H, Vo C, et al. Exogenous cross-linking increases the stability of spinal motion segments. *Spine* 2006;31:E480-5.

40. Chuang SY, Odon 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.

41. Chuang S, Lin L, Tsai Y, et al. Exogenous crosslinking recovers the functional integrity of intervertebral disc secondary to a stab injury. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2009.

42. Lin TC, Wang JL. Effect of Fatigue and Rest on the Rheological Properties of Intact Intervertebral Disc: Institute of Biomedical Engineering College of Medicine and Engineering:National Taiwan University,Taiwan, 2008.

43. Wilke HJ, Neef P, Caimi M, et al. New in vivo measurements of pressures in the intervertebral disc in daily life. *Spine* 1999;24:755-62.

44. George SZ, Bialosky JE, Fritz JM. Physical therapist management of a patient with acute low back pain and elevated fear-avoidance beliefs. *Phys Ther* 2004;84:538-49.

45. George SZ, Fritz JM, Bialosky JE, et al. The effect of a fear-avoidance-based physical therapy intervention for patients with acute low back pain: results of a randomized clinical trial. *Spine* 2003;28:2551-60.

46. Von Korff M, Saunders K. The course of back pain in primary care. *Spine*

1996;21:2833-7; discussion 8-9.

47. Duance VC, Crean JK, Sims TJ, et al. Changes in collagen cross-linking in degenerative disc disease and scoliosis. *Spine* 1998;23:2545-51.

48. Dath R, Ebinesan AD, Porter KM, et al. Anatomical measurements of porcine lumbar vertebrae. *Clin Biomech (Bristol, Avon)* 2007;22:607-13.

49. McLain RF, Yerby SA, Moseley TA. Comparative morphometry of L4 vertebrae: comparison of large animal models for the human lumbar spine. *Spine* 2002;27:E200-6.

50. Wilke HJ, Kettler A, Wenger KH, et al. Anatomy of the sheep spine and its comparison to the human spine. *Anat Rec* 1997;247:542-55.

51. Nettles DL, Richardson WJ, Setton LA. Integrin expression in cells of the intervertebral disc. *J Anat* 2004;204:515-20.

