

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A01N 43/04

A61K 31/70



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02821684.9

[43] 公开日 2005年2月9日

[11] 公开号 CN 1578624A

[22] 申请日 2002.8.29 [21] 申请号 02821684.9

[30] 优先权

[32] 2001.8.31 [33] US [31] 60/316,287

[86] 国际申请 PCT/US2002/027677 2002.8.29

[87] 国际公布 WO2003/020031 英 2003.3.13

[85] 进入国家阶段日期 2004.4.29

[71] 申请人 南加利福尼亚大学

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 托马斯·P·海德曼

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

权利要求书2页 说明书16页 附图1页

[54] 发明名称 无毒性交联试剂在增强椎间盘及其他白纤维组织的抗疲劳性并减轻其机械性退化中的用途

[57] 摘要

本发明涉及一种增强白纤维组织抵抗机械性退化的方法，其步骤包括将白纤维组织的至少一部分与一种有效量的交联试剂相接触。所述的交联试剂包括一种交联剂，例如京尼平和/或原花色素。进一步地，所述的交联试剂可以包括一种存在于载体介质中的交联剂。所述的与该交联试剂相接触的白纤维组织优选地为椎间盘或关节软骨的一部分。组织与交联试剂之间的接触可通过使用针头直接注射入所选组织的内部而实现。或者，组织与交联试剂之间的接触可通过将一种缓释输送体系，例如一种凝胶或药膏或一种经过处理的膜或贴片，直接置于靶组织的内部或表面而实现。还可以通过例如浸泡而实现接触。

ISSN 1008-4274

- 1、一种增强白纤维组织对机械性退化的抗性的方法，包含的步骤为：
将一种白纤维组织的至少一部分与有效量的一种交联试剂相接触。
- 2、权利要求 1 的方法，其中所述的交联试剂包括京尼平。
- 3、权利要求 1 的方法，其中所述的交联试剂包括原花色素。
- 4、权利要求 1 的方法，其中所述的交联试剂包括一种存在于一种载体介质中的交联剂。
- 5、权利要求 4 的方法，其中所述的交联剂选自京尼平或原花色素，且所述的载体介质是一种缓冲盐溶液。
- 6、权利要求 4 的方法，其中所述的交联剂是京尼平，所述的载体介质是一种缓冲盐溶液，且京尼平在该缓冲盐溶液中的浓度大于 0.033%。
- 7、权利要求 1 的方法，其中所述的白纤维组织是椎间盘。
- 8、权利要求 1 的方法，其中所述的白纤维组织是关节软骨。
- 9、权利要求 1 的方法，其中所述的白纤维组织与交联试剂之间的接触是通过使用针头直接注射到所述的白纤维组织的该部分的内部而实现的。
- 10、权利要求 1 的方法，其中所述的白纤维组织与交联试剂之间的接触是通过将一种缓释输送体系直接置于所述的白纤维组织的该部分的内部或表面而实现的。
- 11、权利要求 10 的方法，其中所述的缓释输送体系是一种凝胶或药膏。
- 12、权利要求 10 的方法，其中所述的缓释输送体系是一种经过处理的膜或贴片。
- 13、权利要求 10 的方法，其中所述的缓释输送体系是一种经过处理的贴片。
- 14、权利要求 1 的方法，其中所述的白纤维组织与交联试剂之间的

接触是通过浸泡而实现的。

15、权利要求 1 的方法，进一步包括以下步骤：

周期性地将所述的白纤维组织的该部分与有效量的一种交联试剂进行再次接触。

16、一种交联试剂，包括一种溶解于一种载体介质中的交联剂，其中所述的交联剂的量可有效增强一种白纤维组织的一部分的抗疲劳性，且其中所述的交联剂和载体介质基本上无细胞毒性。

17、权利要求 16 的交联试剂，其中所述的交联剂选自京尼平或原花色素。

18、一种增强白纤维组织对机械性退化的抗性的方法，包含的步骤为：

通过将一种交联剂溶解于一种载体介质中而制备一种交联试剂；并将一种白纤维组织的至少一部分与有效量的所述交联试剂相接触。

19、权利要求 18 的方法，其中所述的白纤维组织与交联试剂之间的接触是通过使用针头直接注射到所述的白纤维组织的该部分的内部而实现的。

20、权利要求 18 的方法，其中所述的白纤维组织与交联试剂之间的接触是通过将一种缓释输送体系直接置于所述的白纤维组织的该部分的内部或表面而实现的。

21、权利要求 18 的方法，其中所述的白纤维组织与交联试剂之间的接触是通过浸泡而实现的。

22、权利要求 18 的方法，其中所述的白纤维组织与交联试剂之间的接触是通过喷涂而实现的。

23、权利要求 1 的方法，进一步包括以下步骤：

周期性地将所述的白纤维组织的该部分与有效量的一种交联试剂进行再次接触。

无毒性交联试剂在增强椎间盘及其他白纤维组织的 抗疲劳性并减轻其机械性退化中的用途

相关申请的交叉参考

本申请要求 2001 年 8 月 31 提交的美国临时专利申请 60/316,287 的权益。

技术领域

本发明涉及一种在有害的机械性负载环境造成组织退化的情况下对所述的组织（例如白纤维组织（collagenous tissue））进行处理的方法。更具体地，本发明涉及一种用于对受损的椎间盘进行处理以增强其抗疲劳性的方法，并涉及作为有效的疲劳抑制剂的无毒性交联试剂（non-toxic crosslinking reagent）。

背景技术

与脊柱退化及稳定性下降相关的背痛和能力丧失一直是困扰西方社会的最为普遍且代价巨大的健康难题之一。包括脊椎融合术在内的当前用于治疗脊柱不稳定和腰背部疼痛的手段通常并不能减缓退化的进程。流行病学和形态学研究已经证实，脊柱组织抵抗重复性负载的能力是影响脊柱骨性关节炎进展的一个至关重要的因素（Magora 1972, Kelsey 1975, Frymoyer 1983, Videman 1990）。

椎间盘内部的胶原和蛋白多糖的组织结构在决定椎间盘的生物力学特性方面具有重要的作用。环状基质结构的生化改变可影响椎间盘的耐久性，即抵抗重复性机械负载的能力。以往的研究已经发现，不可分解的吡啶啉交联（nonreducible pyridinoline crosslink）在成年人的软骨、骨骼

和椎间盘中十分显著，且这些胶原交联被认为对于成人结缔组织的结构完整性（酶性和机械性）是至关重要的（Burgeson 和 Nimni, 1992, Eyre, 1988）。已经发现，随着年龄增长，关节软骨和椎间盘中的 pentosidine 交联会增加（Bank 1998, Pokharna 1998）。

已经有证据提示天然出现的交联在稳定退化的椎间盘方面的作用。Duance (1998) 发现，尽管非酶性产生的交联 pentosidine 显示出年龄相关性的增加，但其水平在更加严重的退化样品中是偏低的。可能是年龄相关性组织改变——即微损伤的积累——加之交联化水平不足共同引起这些椎间盘更加易于发生机械性退化。已经发现，年龄相关性交联（pentosidine）可增加关节软骨的强度和硬度（Chen 2001），而年龄相关性微损伤的积累会使得强度和硬度降低。在粘弹性方面，Lee (1989) 发现乙醛固定（交联化）降低了牛心包的应力松弛（stress-relaxation）和蠕变（creep），而我们对椎间盘的初步测试发现疲劳负载会增加应力松弛和蠕变。

交联试剂能够提高以胶原为基础的生物材料的张力特性。Osborne 等 (1998) 发现使用一种组合的交联剂（crosslinking agent）使一种细胞胶原凝胶的机械强度得到了最大程度的提高。其他研究人员也发现，交联化处理可增加白纤维组织的强度（Wang 1994, Chachra 1996, Sung 1999, Zeeman 1999）。Sung (1999) 发现，与其他交联试剂相比，一种天然存在的交联剂京尼平（genipin）可产生更佳的极限抗张强度（ultimate tensile strength）和韧性（toughness）。同时，京尼平的细胞毒性也显著低于其他更加常用的交联剂。不过，就消除牛心包组织的各向异性而言也有突出的负面的意见。一些研究者已经预期白纤维组织的交联化会使得该组织更易于发生疲劳衰竭（fatigue failure）（Bank 1998, Chen 2001, Kerin 2001）。不过，相反的观点——即白纤维组织的交联化有益于抗疲劳性——在医学文献中还未曾有报道。据认为胶原交联可作为“牺牲性”连接，通过使能量得以消散以保护白纤维组织并增强抗疲劳性。

疲劳是重复性施加的应力所引起的材料的弱化。

疲劳衰竭只不过是重复性的应力已经使得材料发生弱化，以至于其在原有的极限应力水平以下即衰竭。在骨骼中，生物修复和疲劳是两种相反的过程，而修复通常起主导作用。在椎间盘中，后环 (posterior annulus) 机械性退化的发病率 (Osti 1992) 提示疲劳是主导过程。

主动性组织反应 (适应、修复) 在成熟椎间盘的环状物质 (annular material) 中的作用并不突出。作为一种基本上无血管的结构，椎间盘依赖于扩散作用为其数目有限的活细胞提供营养。年龄相关性改变干扰了扩散作用，可能是促成细胞活力和生物合成功能下降的原因 (Buckwalter 等 1993, Buckwalter 1995)。年龄相关性的细胞数量和细胞功能性下降损害了细胞对基质的机械性损伤的修复能力。尽管已经存在酶性降解可引起核内基质退化的认识 (虽然并未得到一致认可) (Deutman 1992)，但尚未认识到功能性环状物质的退化。

结合这种有限的修复能力或者说是退化，研究发现，当承受非创伤性的、生理性的重复性负载时，后侧椎间盘组织易于发生退化和疲劳衰竭。现有的研究结果显示，中等强度的生理性重复性负载可损害后侧椎间盘组织的弹塑性 (elastic-plastic) 物质特性 (Hedman 99) 和粘弹性物质特性 (Hedman 00)。以程度为 30% 极限抗张强度的重复性负载，仅仅 2000 次循环即产生了明显的物质特性的损害。Green (1993) 对配对的外侧环标本的极限抗张强度和疲劳寿命进行了研究。他们发现，当垂直方向张力的重复性峰值超过配对的对照标本的极限抗张应力的 45% 时，不足 10000 次循环即可引起疲劳衰竭。此外，Panjabi 等 (1996) 发现，对膝盖的前十字韧带施加一个循环的亚衰竭张力，可改变该韧带的弹性特性 (负载-变性)。Osti (1992) 发现，环状撕裂明显见于椎间盘的侧后区域。Adams (1982) 证明，当处于高度弯曲状态时，轻度退化的椎间盘具有向后侧脱出的倾向，他们还发现，当弯曲状态承受重度负载时，由于外侧后环在垂直方向发生过度伸展，可造成腰椎间盘的疲劳衰竭。一项分析

性研究发现，椎间盘的后外侧区域的层间剪切应力（其可造成剥离 (delamination)）最为强烈(Goel 1995)。这些现有的结果说明：1) 后侧椎间盘和后侧纵向韧带易于发生退化性改变，且 2) 退化的机制可能涉及弯曲疲劳。

不过，迄今为止还没有能够减轻白纤维组织的机械性退化的治疗方法。实际上，尚未推出其他的白纤维组织疲劳抑制剂。因此亟需一种能够增强人体的白纤维组织的抗疲劳性、以及减轻人体的白纤维组织（特别是椎间盘的后环区域）的机械性退化的方法。

发明内容

本发明的一个目的是提供一种通过将组织与交联试剂相接触而增强人体的白纤维组织对机械性退化的抗性的方法。

本发明的另一个目的是提供一种通过增加胶原的交联以增强机体自身稳定老化的椎间盘的努力从而减缓椎间盘组织的进行性机械性退化的方法。

本发明的另一个目的是提供一种方法，其使用与通常的醛类固定剂 (aldehyde fixation agents) 相比具有基本上较少的细胞毒性的交联试剂以便将这些试剂与活人体内的组织直接接触。

本发明的另一个目的是通过将活人的椎间盘组织与合适浓度的无毒性交联试剂（或交联试剂的混合物）例如京尼平（一种京尼平苷 (geniposide)）或原花色素（一种生物类黄酮）直接接触以增加椎间盘环状组织的交联化。

本发明的另一个目的是提供一种治疗方法，其用于以最低限度的创伤性方式输送所述的非细胞毒性交联试剂，例如使用针头直接注射到选定的组织，或将一种缓释 (time-release) 输送系统，例如一种载体凝胶或药膏或者一种经过处理的膜或贴片，直接置于靶组织的内部或表面。

本发明的另一个目的是提供一种由可用作有效的疲劳抑制剂的无毒

性交联试剂所组成的组合物。

根据本发明，提供了一种用于在有害的机械性负载环境造成组织退化的情况下对该组织进行治疗的方法。所述的有害的机械性负载环境可由正常的生理性重复性负载（另外已知为疲劳）组成。本发明提供了一种用于治疗退化的椎间盘以增强其抗疲劳性的方法。本发明还提供了无毒性交联组合物，其为有效的疲劳的抑制剂。

本发明的一种增强白纤维组织对机械性退化的抗性的方法包含的步骤为，将一种白纤维组织与一种有效量的交联试剂相接触。所述的交联试剂包括交联剂例如京尼平和/或原花色素 (proanthocyanidin)。此外，所述的交联试剂可包括一种存在于载体介质中的交联剂。所述的与交联试剂相接触的白纤维组织优选地为椎间盘或关节软骨的一部分。所述的组织与交联试剂的接触是通过使用针头直接注射到选定的组织内部而实现的。或者，所述的组织与交联试剂的接触是通过将一种缓释输送体系，例如一种凝胶或药膏或者一种经过处理的膜或贴片，直接置于靶组织的内部或表面而实现的。接触也可通过例如浸泡或喷涂而实现。

附图说明

图 1 是松弛 (N) 与循环次数的图示，显示出京尼平交联化处理 ($G1=0.033$ g/mol, $G2=0.33$ g/mol) 在后侧椎间盘应力松弛方面的作用。

图 2 是 Brinnell's 硬度指数与循环次数的图示，显示出京尼平交联化处理 ($G1=0.033$ g/mol, $G2=0.33$ g/mol) 对后侧椎间盘的硬度或穿透抗性方面的作用。

具体实施方式

本发明提供了一种增强人体内的白纤维组织对机械性退化的抗性的方法，其步骤包括将一种白纤维组织的至少一部分与有效量的一种交联试剂相接触。本发明还提供了一种通过增加胶原的交联以增强机体自身

稳定老化的椎间盘的努力从而减缓椎间盘组织的进行性机械性退化的方法。这种机械性退化可以是对生理性水平的重复性负载的反应。

本发明的交联试剂并没有特别的限制。可以使用任何已知的基本上无细胞毒性的且是有效的胶原材料的交联剂的交联试剂。所述的交联试剂要求基本上无细胞毒性，以便于该交联剂与活人体内的组织进行直接的接触。优选地，该交联试剂的细胞毒性基本上低于常用的醛类固定剂。更优选地，使用一种无细胞毒性的交联试剂。

该交联试剂包括至少一种交联剂。根据本发明选用的交联剂是一种有效的胶原材料的交联剂。当用于一种交联试剂时，当一种有效的交联剂与白纤维组织的一部分接触时，该交联剂可增加该白纤维组织内的交联数量。一种有效分交联剂可增强被处理的组织的抗疲劳性，减轻由于重复性生理性负载所引起的材料特性的退化，或减轻由疲劳负载导致的被处理组织的粘弹性特征的增加。类似地，一种有效的交联剂可以减轻由疲劳负载引起的被处理组织的弹塑性特性的下降。在本发明的一个实施方案中，所述的交联剂是京尼平，一种无毒性的、天然存在的交联剂。京尼平来自其母体化合物京尼平苷，后者可分离自梔子 (*Gardenia jasminoides*) 的果实。京尼平可购自 Challenge Bioproducts Co., Ltd., 7 Alley 25, Lane 63, TzuChiang St. 404 Taichung Taiwan, Tel 886-4-3600852。在本发明的另一个实施方案中，所述的交联剂是一种生物类黄酮，且更具体地，该生物类黄酮是原花色素。一种含有原花色素的混合物 MegaNatural™ Gold 可得自 Polyphenolics, Inc, 22004 Rd. 24, Medera, CA 93638, Tel 559-637-5961。可使用不只一种的交联剂。

除了交联剂，所述的交联试剂还可包括一种载体介质。所述的交联剂可溶解或悬浮于该载体介质中以形成所述的交联试剂。在一个实施方案中，交联剂被溶解于一种无毒性的且具有生物相容性的载体介质中。该载体介质要求基本上无细胞毒性，以便于其介导该交联剂与活人体内的组织进行接触，而不会对该组织或其周围的组织造成损害。优选地，

所选择的载体介质是水，且更优选地作为一种盐溶液。载体介质的 pH 被调整为与该组织环境的 pH 相同或相似。更加优选地，该载体介质是缓冲的。在本发明的一个实施方案中，所述的载体介质磷酸缓冲液 (PBS)。

将交联剂溶解于一种载体介质中时，交联剂在该载体介质中的浓度并无特别的限定。其浓度可以是任何既能有效提高组织的交联化而同时又保持基本上无细胞毒性的量。如果用京尼平作为交联剂，交联剂的浓度优选地为大于 0.033% (wt %) (溶于 PBS)，且更加优选地为大约 0.33% (wt %) (溶于 PBS)。

根据本发明，将交联试剂与一种白纤维组织的一部分相接触。在此，白纤维组织被定义为机体内的一种结构性的或负载支持性的组织，其由大量的胶原组成。其实例包括椎间盘、关节软骨、韧带、肌腱、骨骼以及皮肤。一般而言，所述的与交联试剂相接触白纤维组织的一部分是该组织中承受负载的部分。此外，在该白纤维组织已经发生至少一定程度的退化的情况下，与所述交联试剂相接触的该组织的部分应至少是组织中已经发生退化的那部分组织。优选地，将承受负载的整个部分或发生退化的整个部分与交联试剂相接触。此外，与白纤维组织中承受负载的部分相邻近的组织也可与所述的交联试剂相接触。

特别适合用于本发明的白纤维组织包括椎间盘和关节软骨。若白纤维组织是椎间盘，则优选地与交联试剂相接触的椎间盘的部分是后环和后外侧环纤维变性。

所选的部分白纤维组织必须与有效量的无毒性交联试剂相接触。“有效量”是指交联试剂的量足以在被处理的那部分组织产生机械效应。具体而言，“有效量”的交联试剂是指其量足以增强被处理组织的抗疲劳性、减轻因重复性生理性负载导致材料特性退化、或减轻因疲劳负载导致的粘弹特性的增加、或减轻因疲劳负载导致的被处理组织的弹塑性特性的下降。可以根据实施例 1 和 2 所述的粘弹性测试和/或弹塑性测试而确定有效量。

本发明的方法包括将白纤维组织的至少一部分与一种有效量的交联试剂相接触。所述的接触可通过多种途径而实现。优选地，通过以最低限度的创伤性方式输送无细胞毒性的交联试剂而实现与白纤维组织的接触。优选地，通过使用针头直接注射入所选组织的内部而实现组织与交联试剂之间的接触。优选地，通过在单一或最少数量的注射部位进行注射而实现组织与交联试剂之间的接触。优选地，使用针头或注射器将一定量的交联化溶液直接注射到靶组织的内部。优选地，沿待处理的该部分组织进行足够量次的注射以便达到对待处理的该部分白纤维组织的完全覆盖。

或者，通过将一种缓释输送体系直接置于靶组织的内部或表面而实现组织与交联试剂之间的接触。可采用的一种缓释输送体系是一种经过处理的膜或贴片。可将一种含有试剂的贴片卷成圆柱状并经由一个经皮套管插入至组织部位，将其展开，并用一种生物学粘合剂或再吸收型固定装置（医用缝合线或钉）将其附着于靶组织的周围。

另一种可采用的缓释输送体系是一种凝胶或药膏。凝胶或药膏是可降解的粘性载体，可用于靶组织的外部。

还可以通过浸泡或喷涂而实现接触，例如囊内（intra-capsular）浸泡或喷涂，由此可将一定量的交联化溶液注射到囊或滑膜腔内部。

需要注意的是，所述的方法和组合物并不需要永久性地增强人体的白纤维组织对机械性退化的抗性。假定人每天做 2-20 次直立前屈，由白纤维组织与交联试剂的接触所伴随产生的增强的抗疲劳性会随时间而下降。不过，优选地，增强的抗疲劳性可维持数月至数年而不会发生机械性退化。在这种情况下，可在一定时间阶段内重复上述的处理过程，以便足以维持增强的抗疲劳性。根据上述假设，可定期地重复进行接触以维持增强的抗疲劳性。就特定的处理而言，某些个体在两次接触之间的时间估计为大约 1 年。因此，通过单次处理或重复注射/处理，本发明的方法能够长时期地将白纤维组织的机械性退化降至最低。

实施例 1 和 2

自 10 头 4 月龄的小牛的脊柱取得 33 个腰椎间关节。将椎间关节人为分为 3 组：无处理对照组-12 个标本，京尼平处理组 1 (G1)-6 个标本，以及京尼平处理组 2 (G2)-13 个标本。对 G1 组的处理包括将整个标本在含有浓度为 0.033%的京尼平的 PBS 中浸泡 72 小时。相似地，对 G2 组的处理包括将整个标本在含有浓度为 0.33%的京尼平的 PBS 中浸泡 72 小时。含 0.33%的京尼平的 PBS 是通过将 50 ml 的 10 x PBS (磷酸缓冲液) 以蒸馏水稀释 10 倍达 500 ml (500 克) 的 PBS，然后加入 1.65 克的京尼平，得到 0.33 % (wt%，克/克) 的溶液。以往对心包和肌腱组织样品的测试证实，组织交联化可降低组织膨胀 (水依渗透压流入组织)。一些对照样品在进行疲劳测试前未进行浸泡。其他的则在盐水溶液中浸泡 72 小时。进行水损失实验以便在经京尼平浸泡的样品和经 0.9 %盐水浸泡的对照样品之间建立相当的外侧环的水化作用。依脊柱和水平而随机化选择处理方法。然后将标本的椎骨端以聚氨酯封装以便进行机械测试。

按照表 1 所示的顺序进行压痕测试和压缩/弯曲疲劳循环。

表 1. 实验方案

检测顺序	检测	位置
1	应力松弛	后环的中心
2	硬度	后环的中心
3000 次压缩/弯曲疲劳循环		
3	应力松弛	中心旁侧 4 mm
4	硬度	后环的中心
额外的 3000 次压缩/弯曲疲劳循环		
5	应力松弛	中心旁侧 4 mm (对侧)
6	硬度	后环的中心

在施加负载方案的各个指定点，如下使用压痕测试以研究粘弹性特

征。以直径 3 mm 的半球形压头斜坡加载 10 N 的力，然后移开 60 秒，同时记录应力的减小量（称为应力松弛），由此收集应力松弛数据。同时采用压痕测试，通过斜坡加载数据计算硬度指数（对压痕的抗性），以确定弹塑性特性。在记录硬度测定值前，对该组织进行重复压印 10 次（60 秒/循环，距移开最初 10 N 负载）。

测试方案基于两个原理。首先，粘弹性效应随着重复加载而渐近性下降。其次，硬度测定值容易受到组织的加载时间过程的影响。不过，此影响在 10 次加载循环后可被忽略不计。为将这些影响最小化，自未曾进行压印的组织收集粘弹性数据（应力松弛）。或者，自曾经进行重复加载（预处理）的组织收集弹塑性数据（硬度）。在这种情况下，故意进行重复压印以减少变化的粘弹性特征（即缺乏可重复性）对硬度测定值的不利影响。通过不同的加载时间过程和位置，对测定值的可重复性进行若干次预实验，从而得到这些测试程序。

在最初的压痕测试后，标本被重复加载 200 N 的弯曲-压缩，共 3000 次循环，频率为 0.25 Hz。该负载被垂直施加于横截面上，在标本横截面中点前方 40 mm 处。然后在疲劳循环后收集第二组压痕测试数据。此程序后继续进行两次疲劳加载循环。在所有的测试过程中，标本被包裹于湿的盐水纱布中以保持其水分。疲劳循环和非破坏性压痕测试在 MTS 858.02 双轴台面式 10kN 容量伺服系统-水压材料测试站 (MTS, Eden Prairie, MN) 进行，使用 MTS Test Star 数据接受系统。进行若干种统计学测量以评价结果的显著性差异。采用嵌套数据双因素方差分析 (nested two-way analysis of variance, ANOVA) 以确定处理方式和疲劳循环的次数的影响。由于数据的非变量性质，采用了 Mann-Whitney 非变量秩和检验 (Mann-Whitney non-parametric rank-sum test) 以评价处理不起作用这一无效假设：1) 循环前的组织的机械参数，或 2) 由疲劳加载引起的弹塑性的粘弹性机械参数的变化量（退化）。统计学显著性的可信水平为 $p < 0.05$ 。

嵌套数据双因素方差分析证实，粘弹性（松弛）和弹塑性（硬度）机械参数均各自受到疲劳循环和处理类型的影响。统计学结果示于表 2。

松弛测试的结果如图 1 所示。交联化处理引起松弛曲线最初下移。这可能代表了一种有益的影响，因为退化越严重的组织可能伴有越高的应力松弛 (Lee 1989)。G1 和 G2 处理组的最初的疲劳前松弛分别较对照组的疲劳前松弛低 26%和 19% ($p=0.009$ 和 $p=0.026$)。经过 6000 次的非创伤性加载循环之后，松弛的改变证实了抗疲劳性具有显著的改善。在 G2 处理的椎间盘，6000 次疲劳循环引起的松弛的改变低于对照组的三分之一 ($p=0.044$)。但更低浓度的京尼平并未产生相同的抗疲劳性的改善。

硬度测试结果如图 2 所示。G2 交联化处理引起硬度数据最初上移。这可能代表了一种有益的影响，因为硬度的降低可能显示组织结构完整性的降低。G2 处理组的疲劳前硬度较对照高 17% ($p=0.026$)。但这种有益的影响似乎在 3000 次疲劳循环前已经消失，且在 3000 次和 6000 次循环之间，两组的硬度的改变基本上相同 ($G2 = -0.94$ ，对照组 = -1.01)。

表 2. 嵌套数据双因素方差分析的结果

材料特性	因素	F-值	可能性
应力松弛	处理	16.060	1.085E-06
	疲劳循环	9.676	2.500E-03
	相互作用	1.402	2.515E-01
硬度	处理	20.023	6.405E-08
	疲劳循环	5.898	1.710E-02
	相互作用	4.228	1.760E-02

以上数据对重复性、非创伤性负载引起的椎间盘组织的弹性和粘弹性机械性退化进行了定量。这些实验的结果表明，无毒性交联试剂可减轻白纤维组织（即椎间盘）的材料特性的疲劳相关性退化。将小牛椎间

盘组织浸泡于浓度为 0.33g/mol 的京尼平中使得粘弹性退化降低了 3 倍。所测试的配方无法对 3000 次测试循环维持弹性机械特性 (硬度) 的改善。

一个普通人需要多长时间会使其椎间盘经受与此相当量的磨损, 对此难以作出精确的估计。当然, 除了上述测试中所造成的机械性退化, 测试环境也会对这些死组织造成额外的——“自然”——退化。非加载的对照组显示, 材料特性的此类“自然”退化是可以忽略的。通过在测试过程中保持标本的湿度并加快加载的频率等措施, 可将这种自然退化降至最低。同时, 加载频率需要维持在生理学限度内以避免组织过热。需要注意的是, 这些措施是对尸体组织进行体外机械测试的标准方案。假定一个人每天进行 2 至 20 次的直立前屈, 这些数据可粗略代表数月至数年的生理性机械性退化。

上述的处理可以按照一定的时间间隔进行重复, 时间间隔可以例如以目前的负载程度的 3000 次疲劳循环来代表。采用以上的假定, 此循环的数量对一些个体而言可以估计为相当于 1 年。因此, 通过单次处理或重复注射/处理, 一个个体有可能长时期地将其椎间盘的机械性退化降至最低。另一种选择可以涉及一种缓释输送体系, 例如可直接施用的经处理的贴片、一种凝胶或药膏。

以上结合一些特定的优选的和替代的实施方案对本发明进行了描述, 这些方案仅仅是实施本发明的基本概念的不同途径的一部分。本领域人员可以对本发明的概念的实施方式进行一些改良或变更, 但正如所附权利要求书所定义的, 此类改良或变更同样属于本发明及其等价物的范畴。

参考文献

Adams, MA, Green, TP, Dolan, P, 腰椎间盘前屈的力量, Spine, 19: 2197-2203,1994.

Adams, MA, Hutton, WC,椎间盘脱出——一种过度弯曲损伤, Spine, 7: 184-191,1982.

Bank, RA, Bayliss, MT, Lafeber, FPJG, Maroudas, A, Tekoppele, JM, 正常人关节软骨中胶原的翻译后修饰的老化和带状改变: 年龄相关性非酶性 glycation 影响软骨的生物力学特性, Biochem. J, 330: 345-351,1998.

Biering-Sorensen, F, 普通人群中腰背部疼痛的前瞻性研究. I. 起病、复发和病因学, Scandinavian Journal of Rehabilitation Medicine, 15: 71-79,1983

Buckwalter, JA, 人椎间盘的老化和退化, Spine, 20: 1307-1314,1995.

Buckwalter, JA, Woo, SL-Y, Goldberg, VM, Hadley, EC, Booth, F, Oegema, TR, Eyre, DR, 当前概念的综述. 软组织老化与肌肉骨骼功能, Journal Bone Joint Surgery, 75A: 1533-1548,1993.

Burgeson,RE, Nimni, ME, 胶原类型. 分子结构和组织分布. [综述], Clinical Orthopaedics & Related Research, (282) : 250-72,1992

Chachra, D, Gratzner, PF, Pereira, CA, Lee, JM, 施加单轴应力对组织来源的生物材料的交联化的速度和机械效应的影响, Biomaterials, 17: 1865-75,1996

Chen, AC, Temple, MM, Ng, DM, Richardson, CD, DeGroot, J, Verzijl, N,teKoppele, JM, Sah, RL, 老化相关性交联化改变关节软骨的抗张特性, Orthopaedic Research Society Transactions, 26: 0128,2001.

Deutman, R, The case for chemonucleolysis in discogenic sciatica. A review., Acta Orthopaedica Scandinavia, 63: 571-575,1992.

Duance, VC, Crean, JKG, Sims, TJ, Avery, N, Smith, S, Menage, J,Eisenstein, SM, Roberts, S, 退化性椎间盘疾病和脊柱侧凸中胶原交联化

的改变, *Spine*, 23: 2545-2551,1998.

Eyre DR, Dickson IR, VanNess K, 人骨骼和关节软骨中的胶原交联化, *Biochem J*, 252: 495-500,1988.

Farfan, HF, Huberdeau, RM, Dubow, HI, 腰椎间盘突出, *J. Bone Jt Surg.*, 54A: 492-510,1972.

Frymoyer, JW, Pope, MH, Clements, JH, Wilder, DG, MacPherson, B, Ashikaga, T, 腰背痛的危险因素, *Journal Bone and Joint Surgery*, 65A: 213-218,1983.

Glazier, R, Fry, J, Badley, E, 关节炎和风湿病是被忽视的健康问题: 文献研究, *Journal of Rheumatology*, 28 : 706-711,2001.

Goel, VK, Monroe, BT, Gilbertson, LG, Brinckmann, P, 层间剪切应力和椎间盘板层分离, *Spine*, 20: 689-698,1995.

Green, TP, Adams, MA, Dolan, P, 纤维环的抗张特性. II. 极限抗张强度和疲劳寿命, *European Spine Journal*, 2: 209-214,1993.

Hedman, TP, Fernie, GR, 腰椎对坐姿负载的力学反应, *Spine*, 22: 734-743,1997.

Hedman, TP, Liao, WL, Yu, J, Watkins, R, Liker, M, 重复性亚衰竭负载导致的后侧椎间盘力量减弱, *Orthopaedic Research Society Transactions*, 24: 1017,1999.

Hedman, TP, 用非破坏性材料测试技术评价进行非创伤性重复负载的椎间盘的退化, 发表于 USC/GOS 年会, Los Angeles, California, June 22-23,2000.

Hirsch, C, Schajowicz, F, 腰纤维环的结构改变的研究, *Acta Orthop. Scand.*, 22: 184-231,1953.

Kelsey, JL, 急性腰椎间盘突出症的流行病学研究, *Rheumatology and Rehabilitation*, 14: 144-159,1975.

Kerin, A, Hung, G, Verzijl, N, DeGroot, J, TeKoppele, J, Grodzinsky, A,

非酶性 glycation 关节软骨力学特性的影响, Orthopaedic Research Society Transactions, 26: 0130,2001.

Klein, BP, Jensen, RC, Sanderson, LM, 评价工人的背部扭伤的赔偿要求, J Occup Med, 26: 443-448,1984.

Lee, JM, Haberer, SA, Boughner, DR, 牛心包的异种移植: I. 无约束乙醛固定对牛心包的抗张粘弹性特征的影响, JournalofBiomedical Materials Research, 23: 457-475,1989.

Magora, A, 腰背痛与职业的关联研究: 坐、站和负重, Industrial Medicine, 41: 5-9,1972.

Osborne, CS, Barbenel, JC, Smith, D, Savakis, M, Grant, MH, 研究胶原/硫酸软骨素凝胶的抗张特性: 交联剂和二元胺的影响, Med. Biol. Eng. Comput., 36: 129-134,1998.

Osti, OL, Vernon-Roberts, B, Moore, R, Fraser, RD, 腰椎环状撕裂和椎间盘退化: 135 例椎间盘的尸解研究, J. Bone JtSurg., 74B: 678-682,1992.

Panjabi, MM, Yoldas, E, Oxland, TR, Crisco, JJ, 兔前十字韧带的亚衰竭损伤, J. Orthop. Res., 14: 216-222,1996.

Pokharna, HK, Phillips, FM, 人腰椎间盘老化中的胶原交联化, Spine, 23 (15): 1645-1648,1998.

Sung, HW, Chang, Y, Chiu, CT, Chen, CN, Liang, HC, 用一种天然存在的交联剂固定的牛心包的交联化特征和力学特性, Journal Biomed. Materials Res., 47: 116-126,1999.

Sung, HW, Huang, RN, Huang, LL, Tsai, CC, 对一种用于生物学组织固定中的天然存在的交联试剂的细胞毒性的体外评价, Journalof Biomaterials Science, Polymer Edition, 10: 63-78,1999.

Videman, T, Nurminen, M, Troup, JDG, 尸体材料的腰椎病理学与背痛病史、职业和物理负载的关联, Spine, 15: 728-738,1990.

Waddell, G, Low back pain: 二十世纪的健康难题, Spine, 21: 2820-

2825,1996.

Wang, XD, Masilamani, NS, Mabrey, JD, Alder, ME, Agrawal, CM, 骨的断裂韧性的改变不一定是骨密度、松度和抗张特性的反映, *Bone*, 23: 67-72,1998.

Zeeman, R, Dijkstra, PJ, van Wachem, PB, van Luyn, MJ, Hendriks, M, Cahalan, PT, Feijen, J, 用 1,4-butanediol diglycidyl ether 对皮肤绵羊胶原进行交联化和修饰, *Journal of Biomedical Materials Research*, 46 (3): 424-33,1999.

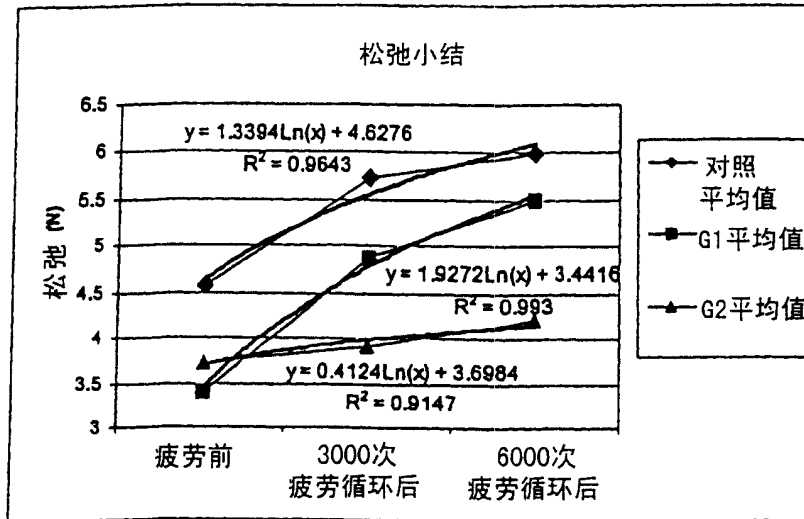


图1

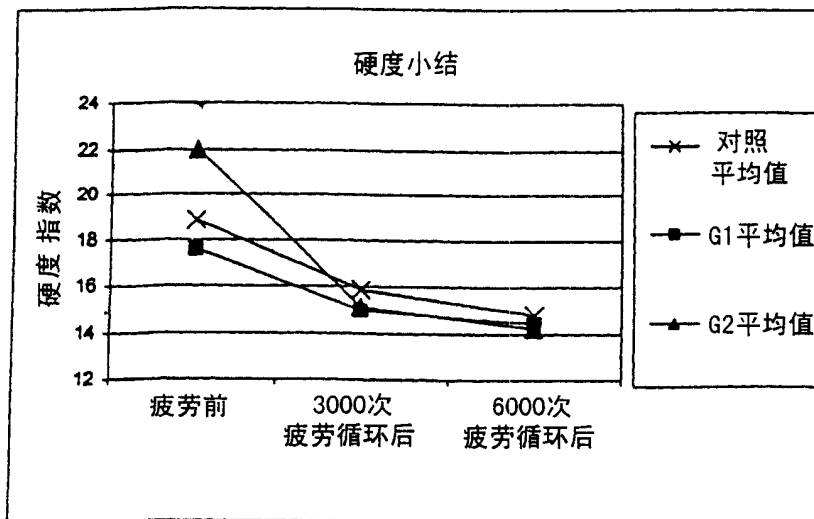


图2