

基础研究

抗结核药物复合支架的制备及其性能研究

张世旺^{1,2}, 马远征², 杨 飞³, 李大伟², 刘宝霞³, 王天天², 雷鹏蛟²

(1 山西医科大学 030001 太原市; 2 解放军第 309 医院全军骨科中心 100091 北京市;

3 中国科学院化学研究所 100191 北京市)

【摘要】目的:制备抗结核药物复合支架,并观察其载药性能、药物释放性能和组织相容性。**方法:**应用乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)、磷酸三钙(β -TCP)、异烟肼(INH),通过结合相分离/粒子沥滤法制备成复合药物支架。采用扫描电镜观察支架的形貌;测定支架的孔隙率;在体外测定支架的生物力学强度、载药率、包封率以及药物释放特性;将复合支架(PLGA/ β -TCP/INH)埋入大鼠肌肉中,4 周后取材固定、染色行组织切片观察其组织相容性。**结果:**PLGA/ β -TCP/INH 复合支架表面及内部呈均匀多孔状,孔隙分布较均匀,在大孔的周围布满了相互贯通的微孔,外形多为近似圆形,大孔直径约 150~300 μ m,平均 222 $\pm$ 23 μ m,小孔直径约 10 μ m;孔隙率为(86 $\pm$ 3)%;抗压强度为 1.93 $\pm$ 0.65MPa,药物包封率为(66.73 $\pm$ 2.65)%;在体外药物释放过程较平稳,其释放曲线较平滑;组织学检查显示埋入大鼠肌肉中 4 周支架周围组织正常,细胞无变性坏死。**结论:**PLGA/ β -TCP/INH 复合支架具有良好的孔隙率、力学强度、释药特性和组织相容性,有望在脊柱结核病灶清除术后利用其修复骨缺损的同时发挥局部抗结核治疗作用。

【关键词】脊柱结核;抗结核药;药物载体;乳酸-羟基乙酸共聚物;磷酸三钙

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2014.03.12

中图分类号:R318.08, R529.2 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2014)-03-0266-05

Preparation and property of anti-tuberculosis drug carrying composite scaffold/ZHANG Shiwang, MA Yuanzheng, YANG Fei, et al/Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2014, 24(3): 266-270

【Abstract】Objectives: To prepare composite scaffold and investigate its drug-loaded property, drug delivery and biocompatibility. **Methods:** The porous poly(lactic-co-glycolic)/tri-calcium phosphate/anti-tuberculosis drug (INH) composite scaffold was prepared by combining particle leaching and phase separation technique. The morphology and the structure of scaffold were observed by SEM. The compressive strength and porosity were measured in vitro. INH release behavior, drug loading and encapsulation efficiency of scaffold were determined by ultraviolet spectrophotometry. The scaffolds were implanted into the SD rats, and gross observation and histology assay were conducted 4 weeks after operation. **Results:** It could be seen that the scaffold possessed a highly interconnected porous structure with the diameter of macro-pore about 150-300 μ m, and the average diameter was about 222 $\pm$ 23 μ m, and a lot of micro-pores with diameter of about 10 μ m were found in the wall of intro-and inter-macro-pores. The porous composite scaffold possessed good physical properties with 1.93 $\pm$ 0.65MPa compressive strength and (86 $\pm$ 3)% porosity and (66.73 $\pm$ 2.65)% encapsulation. Drug release process was stable in vitro and the release curve was smooth. Surrounding tissue was normal in vivo with no degeneration and necrosis of cells. **Conclusions:** The porous composite scaffold perceives good biomechanical properties, porosity, INH release and biocompatibility, which can be used as bone repair as well as anti-tuberculosis material after debridement.

【Key words】 Bone tuberculosis; Anti-TB drugs; Drug carriers; Poly(lactic-co-glycolic); Tri-calcium phosphate

【Author's address】 Shanxi Medical University, Taiyuan, 030001, China

近年来,结核病在全球范围内呈上升趋势。骨

关节结核是常见的肺外结核,其中一半为脊柱结核,而脊柱结核的治疗仍是一个难题。当前主要通过药物和手术治疗,其中药物治疗包括口服和注射,但两种方法都很难准确控制病灶区的药物浓度^[1]。对于重症脊柱结核患者,还需要进行病灶清

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81071454)

第一作者简介:男(1985-),医学硕士,研究方向:脊柱外科

电话:(010)66775051 E-mail:zsw8082091@163.com

通讯作者:马远征 E-mail:myzzxq@sina.com

除和长期局部抗结核治疗。病灶清除后的缺损需要通过植骨进行修补。目前自体骨的应用仍然是植骨材料的金标准,但取骨量有限;异体骨因存在免疫排斥反应,且有传播疾病的可能,使其应用受到限制;组织工程是一种新的组织缺损修复技术,可以从根本上解决移植物的来源和疾病传播的问题。乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)是一类具有优异生物相容性、良好生物力学性能的可降解生物材料,在生物医学领域尤其是组织工程研究中获得了广泛的应用^[2-4]。PLGA 与磷酸三钙(β -TCP)复合是一种理想的骨修复材料^[5-6]。同时,PLGA 在药物控制释放体系中也获得了广泛的应用,它最早作为载体被用于肺部疾病的治疗,可通过控制吡啶类药物在局部的释放速度,维持数周甚至数月的持续释放^[7]。本研究将抗结核药物异烟肼(INH)载入到 PLGA 与 β -TCP 的复合支架中制备成抗结核药物复合支架,并从生物力学强度、载药性能、释放性能以及体内组织相容性等方面对支架进行评价。

1 材料与方法

1.1 主要材料及动物

PLGA(70/30)(中国科学院化学研究所提供,提纯后使用); β -TCP 粉剂(上海瑞邦公司);异烟肼(中国药品技术监督检验所);二氧六环以及其他市售试剂等均为分析纯。健康成年 SD 大鼠,雌雄不限,体重 250g 左右,由解放军 309 医院实验动物中心提供。

1.2 PLGA/ β -TCP/INH 复合支架的制备

复合支架采用相分离/粒子沥滤法制备^[8-9]:首先将纯化后的 PLGA 按照预定比例置入二氧六环中,磁力搅拌 12h 后,加入与 PLGA 等质量的 β -TCP 粉剂、PLGA/ β -TCP 总质量 4% 的 INH,搅拌均匀形成稳定的悬浊液。再加入 60~80 目的 NaCl (NaCl:悬浊液=2:1,质量比),快速机械搅拌成均匀的浆液,将其置入模具中(支架的形状由模具决定),深冷后冷冻干燥 24h。所得到的支架以去离子水洗去 NaCl,每隔 1h 换 1 次水,直至用 AgNO₃ 不能检出 NaCl 为止。然后将材料真空干燥。放入 4℃冰箱中避光保存以备使用。

1.3 复合支架的微观形貌和孔隙率测定

将 PLGA/ β -TCP/INH 复合支架切成薄片后,以导电胶贴附于样品台上,用喷金台 (E-1010

Hitachi Ltd.) 喷铂金处理,在扫描电子显微镜 (SEM,JSM-6700F;JEOL Ltd.) 下观察微观形貌。

选取 50 倍下的 SEM 照片,随机抽取 10 个以上的完整孔,每个孔在不同方向上测定三次孔的直径。所得结果进行统计分析,计算得到 PLGA/ β -TCP/INH 复合支架的平均孔径大小。复合支架孔隙率的测定采用文献报道的体积排除方法^[10]:将密度瓶装满乙醇放入 30℃恒温水浴中 30min 以上,取出密度瓶擦干外部水与溢出的乙醇后称重记为 M₁;将支架材料放入瓶中并抽真空 30min 以上,补满乙醇放入恒温热水浴中 30min,温度恒定后取出擦干称重记为 M₂。材料质量为 M₃,体积为 V(可计算出)。乙醇密度采用同样方法测得并记为 ρ ,孔隙率 $p=1-(M_1+M_3-M_2)/\rho V$

1.4 复合支架生物力学测定

将制备好的载药支架切成直径为 1cm、高度为 1.5cm 的圆柱体。通过电子力学测试机 (CMT4101) 测试支架的弹性模量与抗压强度。压缩速度为 1mm/min,每组样品取 10 个进行测试,最后求其平均值。

1.5 复合支架含药量测试

配制含 INH 0.01%~0.001% 的 PBS 溶液,测定 0.001%、0.002% 等 10 个浓度的紫外图谱。取 0.1040g INH 置入 100ml 容量瓶中,加入 100ml 磷酸缓冲液 (PBS) 中,配成 1040 μ g/ml 的 PBS 溶液,取该溶液 1ml 分别配成 104 μ g/ml、78 μ g/ml、52 μ g/ml、26 μ g/ml、10.4 μ g/ml、1.04 μ g/ml 的溶液。测定各浓度溶液的紫外图谱,绘制 INH 在 PBS 中的标准曲线。取少量复合支架称其重量(精确到 0.0001g),用适量氯仿溶解后加入一定量的 PBS 搅拌均匀并静置 24h,使 PBS 与氯仿分层,取上层液体,测定其紫外吸光度,依据标准曲线及线性拟合方程计算其浓度,从而计算出载药率和包封率,载药率=支架含药量/支架总重量 $\times$ 100%,包封率=支架载药量/药物投料量 $\times$ 100%。

1.6 复合支架药物释放测定

取 0.2g 复合支架置于离心管中,加入 5ml pH 值为 7.4 的 PBS 溶液。用真空水泵抽去支架中空气,使支架与 PBS 溶液接触完全并封口。将试管放入水浴摇床中,于 37℃恒温浴振荡器中震荡孵育;每隔 3d 分别从试管中取出所有液体,然后补充 5ml 的 PBS 至试管内,测定紫外吸光度,根

据标准曲线计算样本中 INH 含量。并以时间为横坐标, 累积释放百分度为纵坐标绘制药物在 60d 内的释放趋势图。

1.7 复合支架的组织相容性观察

取 6 只 SD 大鼠, 用 2% 的戊巴比妥钠进行腹腔麻醉后固定于架上, 在股骨外侧偏前方处常规剃毛消毒并铺巾, 切开皮肤及筋膜, 找到两块肌肉的分界处后逐步分离, 将用环氧乙烷消毒的支架切成小块埋于两块肌肉之间, 逐层缝合。术后分笼喂养并每日注射青霉素, 持续 3d, 于 4 周时取与支架表面接触部位的组织, 用 10% 甲醛固定, 常规石蜡包埋 HE 染色, 光学显微镜下观察组织细胞变化情况。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件进行分析, 数据以均数 $\pm$ 标准差表示。

2 结果

2.1 支架的形貌结构特征

制备的复合支架如图 1 所示。SEM 观察到支架表面及内部呈均匀多孔状, 孔隙分布较均匀, 在大孔的周围布满了相互贯通的微孔, 外形多为近似圆形, 大孔直径约 150~300 μ m, 平均为 222 $\pm$ 23 μ m, 小孔直径约为 10 μ m。同时在支架孔壁上能观察到 TCP 颗粒(图 2)。

2.2 复合支架的孔隙率和生物力学强度

支架孔隙率为(86 $\pm$ 3)%, 证明支架内部具有较好的贯通结构。其抗压强度与弹性模量分别为 1.93 $\pm$ 0.65MPa 和 2.17 $\pm$ 0.35MPa, 与松质骨比稍有降低。

2.3 复合支架的含药量

INH 在 PBS 溶液中的特征峰为 262nm。其紫外光谱图见图 3。以药物浓度(C)为横坐标, 吸光度(Abs)为纵坐标, 得到 INH 在 PBS 液中的散点图和线性拟合曲线(图 4)。散点图的线性拟合方程为: $y=0.04076x+0.05135$ ($R^2=0.99896$)。支架中 INH 的紫外吸光度为 2.937 $\pm$ 0.451, 代入线性方程计算出药物浓度, 从而计算出复合支架的载药率为(2.67 $\pm$ 1.35)%, 包封率为(66.73 $\pm$ 2.65)%。

2.4 复合支架中 INH 的体外释放情况

共观察 60d, 其结果显示该支架体外释放过程较平稳, 其释放曲线较平滑(图 5)。有一定的突释现象, 前 9d 累积释放度 48.04%, 到 30d 时体外累积释放 80.82%; 60d 时累积释放 85.56%。

2.5 复合支架体内组织相容性

支架置于大鼠肌肉间 4 周后取材肉眼观察到材料已被肌肉组织包裹, 很难将包裹的组织与支架分开, 说明组织与支架表面粘附紧密。其组织切片结果显示, 肌肉组织与支架表面分界处明显炎症反应(图 6)。说明生物相容性较好。

3 讨论

一般认为人的成骨细胞可以通过 30 μ m 的空隙, 但只有孔隙率达到 30% 以上, 空隙之间才可以相互连通, 孔径大于 50 μ m 时才有利于骨单元的形成^[10]。本研究制备的支架孔径为 150~300 μ m, 孔隙率为(86 $\pm$ 3)%, 可达到上述要求。复合支架要作为人工骨必须具有一定的生物力学强度, 满足手术操作和术后恢复期的需要。但在目前的研究中, 支架的力学强度与孔隙率是一对矛盾, 高力学

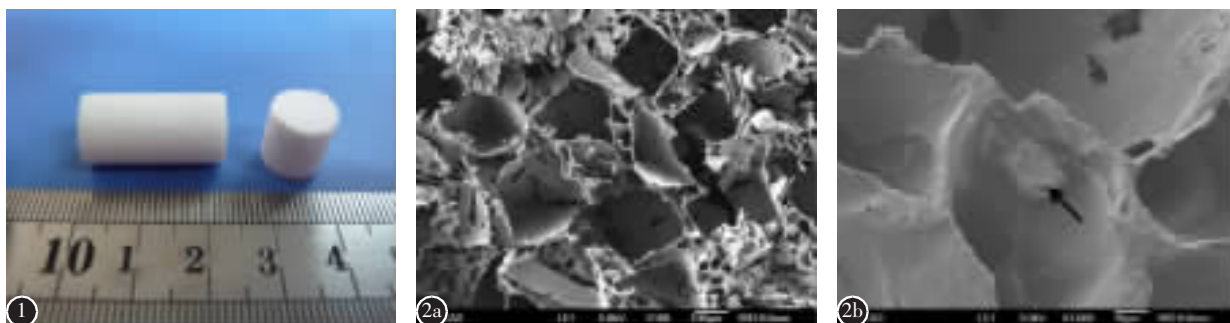


图 1 支架外观形貌 图 2 SEM 观察复合支架呈均匀多孔状, 周围布满了相互贯通的微孔 a 低倍观察(×100) b 高倍观察(×1000), 箭头所指为 β -TCP 颗粒

Figure 1 Macroscopic view of PLGA/ β -TCP/INH composite scaffold **Figure 2** SEM images of morphology structure of composite scaffold. Scaffold possessed a porous structure and a lot of micropores in the wall a Low magnification (×100) b High magnification(×1000), Arrow for β -TCP particles

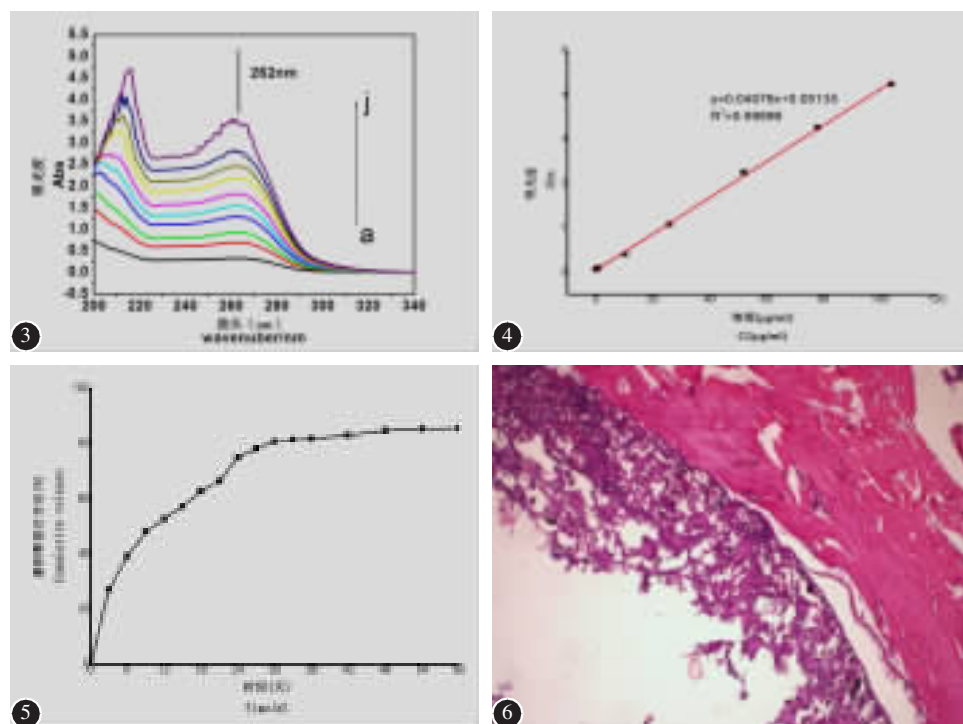


图3 不同浓度INH溶液的紫外光谱图(a→j 分别代表0.01%→0.1%) 图4 异烟肼在PBS中的散点图和线性拟合曲线 图5 复合支架的药物释放曲线 图6 4周时光学显微镜下观察支架与组织接触面无明显炎性细胞浸润,组织细胞无变性坏死(HE ×40)

Figure 3 UV patterns of INH and PBS solution indifferent concentrations (a→j represent 0.01%→0.1%) **Figure 4** The standard curve of INH **Figure 5** Drug delivery pattern of composite scaffold **Figure 6** Optical microscope for histology observation of 4 weeks after operation, inflammatory cells were not observed at the contact surface between composite scaffolds and tissue, degeneration and necrosis of cells were not observed in tissue sections(HE ×40)

强度意味着低孔隙率,可是低孔隙率又不利于骨细胞的生长,制备既具有较高抗压强度同时具有高孔隙率的复合型支架难度较大,必须寻求二者之间的平衡。本研究使用了高孔隙率的支架,抗压强度比松质骨略低,但可以满足植骨手术的需求。

载药率与包封率是衡量支架性能的两个重要指标,支架中药物含量的提高,不仅可降低材料量,而且可提高组织周围局部药物浓度,故载药率应调整在一定的范围之内。包封率反映了支架在制备过程中药物利用率的高低,如果包封率过低,在制备过程中浪费的药物就多,不符合药物载体的要求。本研究所得支架的载药量与包封率分别为 $(2.67 \pm 1.35)\%$ 和 $(66.73 \pm 2.65)\%$ 。与赵天倚等^[11]用复乳溶剂挥发法制备包裹次血红蛋白六肽的两种聚酯微球的研究结果很接近。在药物缓释方面,由于聚乳酸与不同的材料复合、制备方法不同等,使其在释放方面差距很大。作为药物载体,释放主要通过扩散和降解两种方式进行,刚开始是吸附在

支架表面的药物快速释放,随着载体逐渐降解形成更多的孔道,使支架内部负载的药物逐渐溶出。谭红香等^[12]采用复乳溶剂挥发法制备复合硫酸庆大霉素 PLGA 微球,其 30d 体外累积释放率达 80%以上;卢来春等^[13]采用超声复乳法制备缓释阿霉素 PLGA 纳米微球,其 10d 后释放度达 95%;Otsuka 等^[14]将胰岛素与磷酸钙骨水泥复合后获得了较好的效果,药物在 500h 后仅释放了 50%。本研究中支架前 9d 有明显的释放,并在 30d 左右达到一个平台,持续释放约 2 个月,但存在一定的突释现象,这也是本支架存在的缺陷,相信随着制备技术的更新,该体系将会更加完善。

PLGA 是一种可降解的高分子聚合物,由于具有良好的生物相容性和可降解性,已被美国 FDA 批准用于药物的缓释制剂。复合支架中的 β -TCP 是天然骨组织的无机成分,具有良好的生物相容性^[15-17]。将 β -TCP 与 PLGA 复合后能有效中和 PLGA 降解后形成的局部酸性环境,降低炎

症反应^[18,19],并且 β -TCP 的成分主要是骨的构成元素钙、磷,将二者结合成为骨组织工程一种理想的材料^[20,21]。但 PLGA 作为 INH 的缓释载体与 TCP 复合制成的支架生物相容性如何,是本研究重点探讨的问题。一般骨修复材料应具备以下几个条件^[22]:(1)良好的生物相容性,即对生物体不产生毒副作用,也不产生炎症反应;(2)具有良好的孔隙率和强度;(3)能促进细胞的粘附、增殖、引导骨细胞再生作用;(4)材料完成支架使命后可完全降解。本研究制备的复合支架置入体内后,可以观察到支架与组织结合很紧密,部分组织已深入到支架表面空隙中,组织切片观察未见明显炎症反应。由此可以认定支架中 INH 的加入不影响正常组织,复合支架具有良好的组织相容性,可以为细胞的生长提供良好的条件。

综上所述,PLGA/ β -TCP/INH 复合支架具有良好的力学强度、孔隙率和生物相容性,同时具有较好的载药性能和药物释放性能,可望用于骨结核所致骨缺损的修复重建与长效抗结核治疗。然而目前的药物释放时间还不够长,药物释放行为也不够平稳,要应用到临床上还需要对其进行深入的研究。

4 参考文献

- Ge Z, Wang Z, Wei M. Measurement of the concentration of three antituberculosis drugs in the focus of spinal tuberculosis [J]. Eur Spine, 2008, 17(11): 1482-1487.
- Murugan R, Ramakrishna S. Design strategies of tissue engineering scaffolds with controlled fiber orientation [J]. Tissue Eng, 2007, 13(8): 1845-1866.
- Puppi D, Chiellini F, Piras A, et al. Polymeric materials for bone and cartilage repair[J]. Prog Polym Sci, 2010, 35(4): 403-404.
- Shoichet M S. Polymer scaffolds for biomaterials applications [J]. Macromolecules, 2009, 43(2): 581-591.
- Yang Y, Zhao J, Zhao Y, et al. Formation of porous PLGA scaffolds by a combining method of thermally induced phase separation and porogen leaching[J]. J Appl Polym Sci, 2008, 109(2): 1232-1241.
- Kim J, McBride S, Tellis B, et al. Rapid-prototyped PLGA/ β -TCP/hydroxyapatite nanocomposite scaffolds in a rabbit femoral defect model[J]. Biofabrication, 2012, 4(2): 025003.
- Fu J, Fiegel J, Krauland E, et al. New polymeric carriers for controlled drug delivery following inhalation or injection [J]. Biomaterials, 2002, 23(22): 4425-4433.
- Tu C, Cai Q, Yang J, et al. The fabrication and characterization of poly (lactic acid) scaffolds for tissue engineering by improved solid-liquid phase separation[J]. Polym Adv Technol, 2003, 14(8): 565-573.
- Yang F, Qu X, Cui W, et al. Manufacturing and morphology structure of polylactide -type microtubules orientation -structured scaffolds[J]. Biomaterials, 2006, 27(28): 4923-4933.
- Simon C G, Khatri C A, Wight S A, et al. Preliminary report on the biocompatibility of a moldable, resorbable, composite bone graft consisting of calcium phosphate cement and poly (lactide-co-glycolide) microspheres [J]. J Orthop Res, 2002, 20(3): 473-482.
- 赵天倚, 赵继鹏, 雷莉妍, 等. 可降解聚合物包覆次血红素六肽微球的制备及生物活性[J]. 高等学校化学学报, 2013, 34(1): 236-241.
- 谭红香, 叶建东. PLGA 包埋硫酸庆大霉素缓释微球的制备及体外释放行为 [J]. 中国抗生素杂志, 2007, 32(11): 682-684.
- 卢来春, 张蓉, 张纲, 等. ADM-PLGA 缓释纳米微球的制备及体外释药的研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(13): 1280-1281.
- Otsuka M, Matsuda Y, Suwa Y, et al. A novel skeletal drug-delivery system using self - setting calcium phosphate cement. 3. Physicochemical properties and drug - release rate of bovine insulin and bovine albumin[J]. J Pharm Sci, 1994, 83(2): 255-258.
- Sous M, Bareille R, Rouais F, et al. Cellular biocompatibility and resistance to compression of macroporous beta-tricalcium phosphate ceramics [J]. Biomaterials, 1998, 19 (23): 2147-2153.
- 王丹, 郑昌琼. 可降解多孔 β -TCP/rhBMP-2 人工骨的骨诱导活性研究[J]. 中华骨科杂志, 1998, 18(11): 689-691.
- Boo J S, Yamada Y, Okazaki Y, et al. Tissue-engineered bone using mesenchymal stem cells and a biodegradable scaffold[J]. J Craniofac Surg, 2002, 13(2): 231-239.
- Kotani S, Fujita Y, Kitsugi T, et al. Bone bonding mechanism of β -tricalcium phosphate [J]. J Biomed Mater Res, 1991, 25(10): 1303-1315.
- Yang F, Cui W, Xiong Z, et al. Poly (l, l-lactide-co-glycolide)/tricalcium phosphate composite scaffold and its various changes during degradation in vitro[J]. Polym Degrad Stab, 2006, 91(12): 3065-3073.
- Zhou H, Lawrence JG, Bhaduri SB. Fabrication aspects of PLA-CaP/PLGA-CaP composites for orthopedic applications: a review[J]. Acta Biomater, 2012, 8(6): 1999-2016.
- Yunoki S, Ikoma T, Monkawa A, et al. Control of pore structure and mechanical property in hydroxyapatite/collagen composite using unidirectional ice growth [J]. Mater Lett, 2006, 60(8): 999-1002.
- 郑磊, 王前. 骨组织工程中理想细胞外基质材料的选择[J]. 中国创伤骨科杂志, 2000, 2(4): 320-322.

(收稿日期:2013-08-20 末次修回日期:2014-02-24)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 卢庆霞)