

复合 HRZ/PLGA 缓释抗结核药涂层材料 在兔脊柱结核病灶释药研究

岳学锋¹, 张俊¹, 施建党², 牛宁奎², 何胤¹, 杨宗强¹, 王自立²

(1 宁夏医科大学 750004 银川市; 2 宁夏医科大学总医院脊柱骨科 750004 银川市)

【摘要】目的:观察复合 HRZ/PLGA 缓释抗结核药涂层材料在兔脊柱结核病灶的释药特性。**方法:**应用兔脊柱结核模型 120 只,按三联抗痨药异烟肼(INH,H)、利福平(RFP,R)和吡嗪酰胺(PZA,Z)给药剂型及途径不同,随机分为 4 组(各 30 只):A 组(复合 HRZ/PLGA 缓释材料局部给药组);B 组(局部给药组);C 组(灌胃给药组);D 组(假手术灌药组)。其中 A、B、C 三组行 L4/5 脊柱结核病灶清除及自体髂骨植骨术,D 组行假手术。采用高效液相色谱(HPLC)检测术后 3d、7d、14d、28d、56d、84d 各组病灶骨组织中 H、R 及 Z 的浓度,绘制药物浓度-时间曲线;使用 DAS 3.2.1 统计软件对药动学参数进行分析。**结果:**A 组病灶骨组织中 H、R 及 Z 的浓度均在术后 3d 时达最高,此后随检测时间点的后移三种药物浓度均逐渐下降,至给药后 84d 时最低(H 为 $6.69 \pm 1.42 \mu\text{g/ml}$;R 为 $6.28 \pm 0.77 \mu\text{g/ml}$;Z 为 $19.88 \pm 0.90 \mu\text{g/ml}$),三种药物浓度在各检测时间点均 ≥ 10 倍的 MIC(即杀菌浓度),对同种药物在不同时间检测的浓度进行两两比较,均有统计学意义($P < 0.05$);B 组病灶骨组织中 H、R 及 Z 的浓度在术后 3d 时均明显增高,此后较快衰减,至给药后 14d 时三种药物浓度均检测不到,对同种药物在 3d 与 7d 检测的浓度进行比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);C 组及 D 组随检测时间点的后移,病灶骨组织中 H、R 及 Z 的药物浓度均维持在相对平稳的较低水平,对同组中同种药物在不同时间检测的浓度进行两两比较均无统计学意义($P > 0.05$),术后 84d 检测时 C 组 H 为 $3.21 \pm 0.32 \mu\text{g/ml}$ 、R 为 $3.68 \pm 0.42 \mu\text{g/ml}$ 、Z 为 $6.68 \pm 0.25 \mu\text{g/ml}$,D 组 H 为 $3.24 \pm 0.33 \mu\text{g/ml}$ 、R 为 $3.53 \pm 0.44 \mu\text{g/ml}$ 、Z 为 $6.39 \pm 0.45 \mu\text{g/ml}$ 。对 A、B、C、D 四组同时同种药物浓度进行比较:C、D 两组间同时间点同种药物浓度比较均无统计学差异($P > 0.05$);A 组病灶骨组织中 H、R 及 Z 的浓度均高于 C 组及 D 组的浓度,84d 检测时 A 组中的 H、R 及 Z 的浓度分别为 C 组的 3.02、1.70 及 2.97 倍,差异有统计学意义($P < 0.05$);A、C、D 三组药物浓度-时间曲线平缓,均未见突释现象;B 组存在明显突释现象,药物浓度衰减较快,术后 14d 后检测不到 H、R 及 Z 的浓度。药动学数据分析:A 组的曲线下面积、生物半衰期均显著高于 B 组及 C 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**复合 HRZ/PLGA 缓释抗结核药涂层材料在兔脊柱结核病灶局部可实现三药同时长程、高效、平缓释药。

【关键词】 脊柱结核;三联抗结核药;涂层材料;体内实验;缓释

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2016.06.09

中图分类号:R529.2 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2016)-06-0537-08

Drug-release properties of sustained-release of anti-tuberculosis drugs composite HRZ/PLGA bone graft material in spinal tuberculosis in rabbits/YUE Xuefeng, ZHANG Jun, SHI Jiandang, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2016, 26(6): 537-544

【Abstract】Objectives: To observe the drug-release properties of sustained-release of anti-tuberculosis drugs and bone graft complex in spinal tuberculosis in rabbits. **Methods:** Spinal tuberculosis model was introduced in 120 rabbits. The models were randomly divided into sustained-release material group(group A), local administration group(group B), oral gavage group(group C) and sham operation group(group D) based on the dosage and administration of isoniazid(INH, H), rifampicin(RFP, R) and pyrazinamide(PZA, Z). Among them, the rabbits of group A, B and C underwent L4/5 spinal tuberculosis debridement and autologous iliac bone

基金项目:国家自然科学基金项目(81360275);宁夏自然科学基金项目(NZ13131);宁夏医科大学重点项目(XZ20150152013)

第一作者简介:男(1984-)硕士研究生,研究方向:脊柱外科

电话:(0951)6743242 E-mail:yxfxyhello@gmail.com

共同第一作者:张俊 E-mail:15008611557@163.com

通讯作者:施建党 E-mail:shi_jiandang@163.com

graft surgery, group D underwent sham surgery. The concentration of H, R and Z in the focal bone tissue was detected by the method of high performance liquid chromatography(HPLC) on the 3rd, 7th, 14th, 28th, 56th and 84th day after surgery. Then the drug concentration-time curve was drawn, followed by analyzing the pharmacokinetic parameters by DAS software 3.2.1. **Results:** The highest concentration of H, R and Z in the focal bone tissue was detected on the 3rd day in group A, thereafter the concentration decreased gradually over time. By the 84th day, the concentration reached the lowest point (H, $6.69 \pm 1.42 \mu\text{g/ml}$; R, $6.28 \pm 0.77 \mu\text{g/ml}$; Z, $19.88 \pm 0.90 \mu\text{g/ml}$). The concentration of all the three drugs was 10 times higher than MIC in each detecting time point, which was known as minimal inhibitory concentration. Comparing the concentration of each drug at different detecting time points, a significant level was set at $P < 0.05$. In group B, the detecting concentration of H, R and Z in the focal bone tissue significantly increased on the 3rd day, then dropped sharply over time, which became undetectable on the 14th day. While the difference between concentration of each drug on the 3rd day and that on the 7th day was statistically significant ($P < 0.05$). The concentration of H, R and Z in the focal bone tissue was kept in a relatively stable low level over time in group C and group D. In group C, on the 84th day after surgery, the concentration of H was $3.21 \pm 0.32 \mu\text{g/ml}$, R was $3.68 \pm 0.42 \mu\text{g/ml}$, and Z was $6.68 \pm 0.25 \mu\text{g/ml}$. In group D, on the 84th day after surgery, the concentration of H was $3.24 \pm 0.33 \mu\text{g/ml}$, R was $3.53 \pm 0.44 \mu\text{g/ml}$, and Z was $6.39 \pm 0.45 \mu\text{g/ml}$. Pairwise comparisons of concentration of each drug detected at different time points did not show statistically significant difference ($P > 0.05$). Comparing the concentration of each drug at the same time point among group A, B, C and D, there was no significant difference in the same time between group C and D ($P > 0.05$). The drug concentration-time curves in group A, C and D were flat, without burst release, and the concentration of H, R and Z in group A was higher than that in group C and group D. On the 84th day, the concentration of H, R and Z in group A was 3.02, 1.7 and 2.97 times as high as that in group C, respectively, and a significant level was set at $P < 0.05$. In group B, there was a significant burst release phenomenon. The drug concentration dropped sharply, and on the 14th day, there was no H, R or Z detected. Pharmacokinetic data analysis: the area under the curve, the biological half-life in group A were significantly higher than those in group B and group C, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusions:** The three drugs in slow-releasing anti-tuberculosis drugs bone graft complex is sustained, efficient and gentle release locally in the model of spinal tuberculosis in rabbits.

[Key words] Spinal tuberculosis; Triple anti-tuberculosis drugs; Coating material; In vivo; Slow release

[Author's address] Ningxia Medical University, 750004, Yinchuan, China

脊柱结核治疗仍面临着复发、耐药病例不断出现以及病灶不愈、修复不良病例增多的困境^[1]。抗结核药物治疗是脊柱结核治疗的基础,但病灶局部药物浓度达不到杀菌浓度,或药物浓度持续时间不足是造成上述现状的主要原因^[2-5]。兼具药物缓释与成骨性能的局部药物缓释系统(LDDS)研究有望解决这一难题^[6]。然而,LDDS的药物载体人工骨存在着成骨修复作用差、支撑强度弱及排斥反应导致不愈合等缺点需要进一步解决。聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)已被广泛应用于LDDS的实验研究并被美国FDA所认证^[7]。基于此,本研究利用PLGA作为载体,使其负载三联抗结核药异烟肼(INH,H)、利福平(RFP,R)和吡嗪酰胺(PZA,Z),制备出复合HRZ/PLGA缓释抗结核药涂层材料,并以自体髂骨作为粘附支架,在兔

脊柱结核病灶清除后将其植入骨缺损部位,对复合药物植骨材料体内释药特性进行了观察。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

异烟肼、利福平、吡嗪酰胺标准对照品以及庚烷磺酸钠(中国药品技术监督检验所);聚乳酸-羟基乙酸(90:10,分子量 9.5 万,济南岱罡生物工程有限公司);二氯甲烷、甲醇、氯化钠、氯化钾、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾(重庆川江化学试剂厂);乙腈(色谱纯,美国 Fisher 公司);PBS 磷酸盐缓冲液(美国 Sigma 公司)。

高效液相色谱仪 D-2000 (日本日立公司);Waters 色谱柱(4.6×250mm, 5 μm)(美国 Waters 公司);精密电子天平(北京赛多利思科学仪器有限

公司);79HW-1 型恒温磁力搅拌器(浙江乐成电器厂);涡旋震荡仪(上海青浦沪西仪器厂);超声波清洗器(昆山市超声仪器公司);真空冷冻干燥机(上海比朗仪器有限公司);S-3400N 扫描电镜(日本电子公司);Z-323K 高速离心机(上海安亭科技仪器厂);磨钻(西安三才电子有限公司)。

1.2 复合 HRZ/PLGA 缓释抗结核药涂层材料的制备

按体外实验中筛选的最优配比方案(H:R:Z=1:1:2;药物总质量与 PLGA 之比为 1:5)制备复合 HRZ/PLGA 缓释抗结核药涂层材料:避光准确称取 RFP 25mg 和 PLGA 500mg 溶于二氯甲烷(10ml)中,在常温下超声振荡使其完全溶解;再准确称取 INH 25mg 溶于超纯水(5ml)中;将上述两种溶液在 37℃下置于涡旋仪上混合均匀;将 PZA 50mg 溶于上述混合液中,涡旋仪上分散均匀;将最终溶有 HRZ 三种药物的混合溶液均匀喷涂于模具内冷冻干燥,待其中有机溶剂挥发干净后继续涂层。制备同规格复合 HRZ/PLGA 缓释抗结核药涂层材料,钴-60 辐射消毒,无菌封装,并低温、避光保存备用(图 1)。

1.3 兔脊柱结核动物模型的制作

本研究获宁夏医科大学伦理委员会审批。实验动物为新西兰大白兔,体重 $3.00\pm 0.25\text{kg}$ 。将实验对象置于安静、干燥、温暖的环境中分笼隔离饲养。控制温度、相对湿度在特定范围之内,并按标准方式饲养。在每个时间点执行操作之前,实验动物禁食过夜。全身麻醉后选用人型结核分枝杆菌 H37Rv 标准菌株混悬液接种入免疫佐剂致敏后的兔 L4/5 椎间隙,建立兔脊柱结核模型^[8,9](图 2)。饲养 2 个月后,通过影像学(X 线片、CT、MRI)观察,符合椎体破坏、椎间隙变窄、椎体旁脓肿者为成功的模型,并通过 CT 观察排除活动性肺结核及内脏结核的实验兔。

1.4 实验分组及手术方法

采用构建成功的兔脊柱结核模型 120 只,按 H、R 及 Z 给药途径及剂型不同,随机分为 4 组,每组 30 只:A 组,复合 HRZ/PLGA 缓释材料组;B 组,局部给药组;C 组,灌胃给药组;D 组,即假手术灌药组,分别接受下述处理。

手术方法:采用全身静脉麻醉(3%戊巴比妥钠;30mg/kg;耳缘静脉注射给药)。麻醉成功后, A、B、C 三组经左侧横突腹侧入路显露 L4/5 脊柱

结核病灶,予以彻底病灶清除术(切除病灶边缘 2mm,切除病灶周围硬化骨边缘 2mm 亚正常骨及病变节段椎间盘);用磨钻将相邻上、下椎体处磨平,形成病灶清除术后邻椎骨缺损(长×宽×深约为 $5.0\times 3.0\times 3.0\text{mm}$)的骨槽;同侧髂骨取骨植入骨缺损处;A 组病灶局部植入复合 HRZ/PLGA 缓释抗结核药涂层材料,并将其粘附于自体髂骨表面,若有剩余则置于椎体旁(给药剂量:HRZ/PLGA, 300mg/kg,其中每 300mg 缓释材料含 HRZ 的剂量分别为 12.5mg、12.5mg 及 25.0mg)(图 3);B 组病灶局部植入 HRZ 药物晶体(给药剂量:H, 12.5mg/kg;R, 12.5mg/kg;Z, 25.0mg/kg);C 组每日固定时间予以 HRZ 灌胃给药(给药剂量:H, 12.5mg/kg/d;R, 12.5mg/kg/d;Z, 25.0mg/kg/d);再用明胶海绵覆盖压迫止血,分层缝合。无菌敷料包扎,不作外固定。D 组行假手术,即仅显露病灶,而不做病灶清除及自体髂骨植骨术,余手术处理及灌药方法同 C 组。

本研究中 A、B、C、D 四组中 H、R、Z 各药的单次给药剂量相同(H, 12.5mg/kg;R, 12.5mg/kg;Z, 25.0mg/kg);A、B 两组均为单次给药,C、D 两组均为连续灌胃多次给药(84d);C、D 两组 HRZ 各药的给药总剂量均显著大于 A、B 两组($P<0.05$)。

1.5 术后观察及检测

1.5.1 一般情况观察 术后每日观察实验兔活动、精神及进食情况,伤口有无红肿、感染、脓疡。

1.5.2 标本收集 分别于术后 3d、7d、14d、28d、56d、84d 在灌胃给药后 120~130min 时像点处死实验动物取材,各时间点各组处死各 5 只。高效液相色谱检测各时间点病灶骨组织中 H、R 及 Z 的浓度。

1.5.3 标本中 INH、RFP、PZA 的浓度测定

(1) 色谱条件:CN ($5\mu\text{m}$), $250\times 4.6\text{mm}$ 色谱柱;流动相为甲醇:乙腈=55:44, 0.01mol/L 庚烷磺酸钠 (PH2.2), 流动相流速 270nm;进样体积 20 μl 。

(2) 样本采集、检测及观察指标。取植骨材料植入部位周围椎体(除去开槽放药部分,D 组取假手术部位椎体)1g 左右,剪碎后加入 2ml 生理盐水,使用匀浆仪将其打至匀浆,取 0.5ml 匀浆,加入 1.5ml 的甲醛,使用涡旋混合仪混合 2min,使用高速离心机以 10000r/min 离心 10min,取上清液 20 μl ,使用高效液相色谱对其局部药物浓度进行

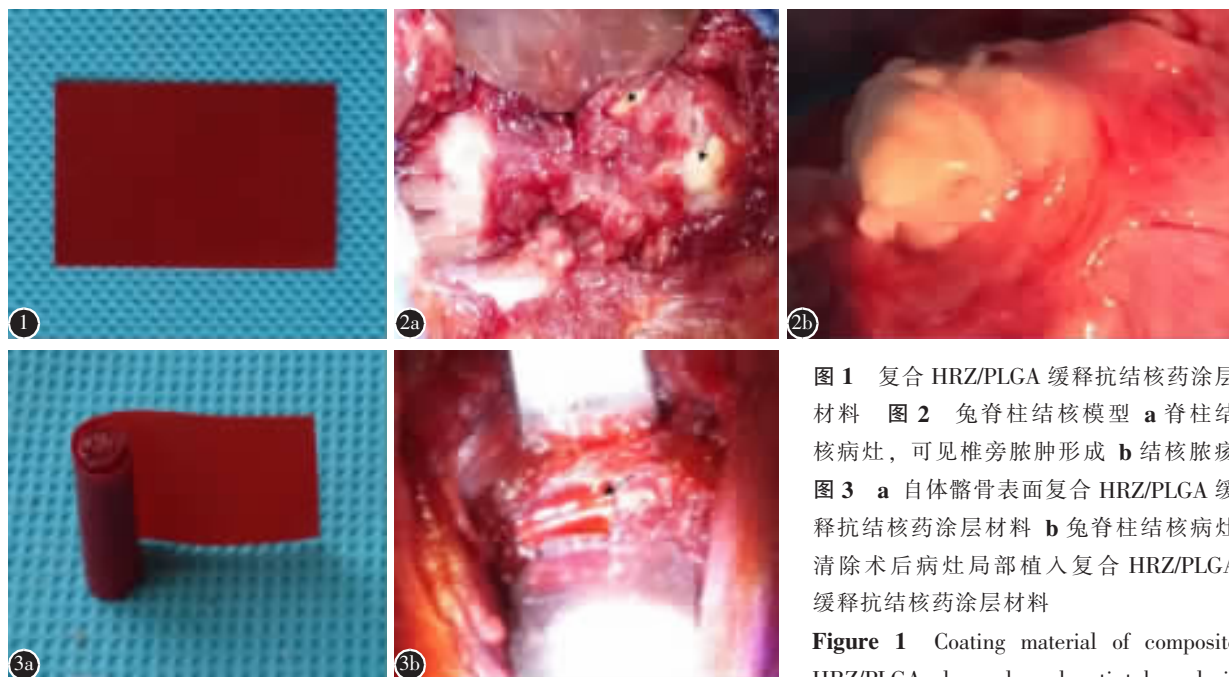


图 1 复合 HRZ/PLGA 缓释抗结核药涂层材料 图 2 兔脊柱结核模型 a 脊柱结核病灶, 可见椎旁脓肿形成 b 结核脓疡 图 3 a 自体髂骨表面复合 HRZ/PLGA 缓释抗结核药涂层材料 b 兔脊柱结核病灶清除术后病灶局部植入复合 HRZ/PLGA 缓释抗结核药涂层材料

Figure 1 Coating material of composite HRZ/PLGA slow-released anti-tuberculosis

drugs **Figure 2** Model of spinal tuberculosis in rabbits **a** Spinal tuberculosis, with paraspinal abscess formation **b** Tuberculosis abscesses **Figure 3** **a** Coating material of autogenous iliac bone surface composite HRZ/PLGA slow-released anti-tuberculosis drugs **b** Focal debridement and implant composite HRZ/PLGA slow-released anti-tuberculosis drugs bone graft material in the model of spinal tuberculosis in rabbits

检测。

1.6 统计分析方法

使用 DAS 3.2.1 统计软件计算药代动力学参数,包括:药物浓度-时间曲线下面积(AUC)、体内平均滞留时间(MRT)、生物半衰期($t_{1/2}$)、达峰时间(T_{max})和达峰浓度(C_{max})。所有实验数据的测定值均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。应用 SPSS 17.0 统计软件分析数据,多组均数间的比较采用方差分析,组间均数比较采用 q 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 动物一般情况

所有实验动物手术顺利。B 组中 1 只实验兔因进食饮水差于术后第 1 周死亡;B 组中另一只实验兔切口感染并于术后第 3 周死亡,解剖见病灶未愈,局部大量脓液形成,考虑与结核感染未控制有关;C 组中 1 例实验兔出现消瘦、精神差及活动量下降并于术后第 4 周死亡,解剖可见病灶局部脓液形成,考虑死亡与结核感染相关。术后切口感染 3 只,除 B 组 1 只死亡外,另 2 只实验兔经换药后 2~3 周后愈合。死亡实验兔均及时予以补充。其余实验兔术后情况良好,三组均未出现排异

反应。

2.2 标本中 H、R 及 Z 的浓度测定结果

2.2.1 H、R 及 Z 的病灶骨组织药物浓度-时间曲线 绘制 H、R 及 Z 的病灶骨组织药物浓度-时间曲线(图 4),A 组药物浓度-时间曲线平缓,无突释现象,病灶骨组织中 H、R 及 Z 的浓度均在给药后 3d 检测时最高,至给药后第 84d 检测时 H、R 及 Z 的浓度均降至最低;病灶骨组织中 H、R 及 Z 的浓度在各检测时间点均 ≥ 10 倍的杀菌浓度(MIC);对同种药物在不同时间点检测的浓度进行两两比较均具有统计学意义($P < 0.05$)。

B 组病灶骨组织中 H、R 及 Z 药物浓度在 3d 时均明显增高,至给药后 14d 时病灶骨组织中三种药物浓度均检测不到;对同种药物在 3d 与 7d 检测的药物浓度进行比较差异具有显著性 ($P < 0.01$)。

C 组及 D 组随检测时间点的推移,病灶骨组织中 H、R 及 Z 的浓度均维持在相对平稳的较低水平,并各自在较小范围内上下波动,但幅度不大,对同组中同种药物在不同时间点检测的浓度进行两两比较均无统计学差异($P > 0.05$)。

2.2.2 病灶骨组织中同种药物在相同时间点的浓

度比较 见表 1。C、D 两组间同时间点同种药物浓度比较均无统计学差异($P>0.05$)。A 组病灶骨组织中 H、R 及 Z 的浓度均高于 C 组及 D 组的浓度,84d 检测时 A 组中的 H、R 及 Z 的浓度分别为

C 组的 3.02、1.70 及 2.97 倍,差异有统计学意义($P<0.05$)。B 组给药 3d 时 H、R 及 Z 的浓度显著高于 A、C 两组 3d 时相应的药物浓度,差异有统计学意义($P<0.01$),但存在明显突释现象,药物浓

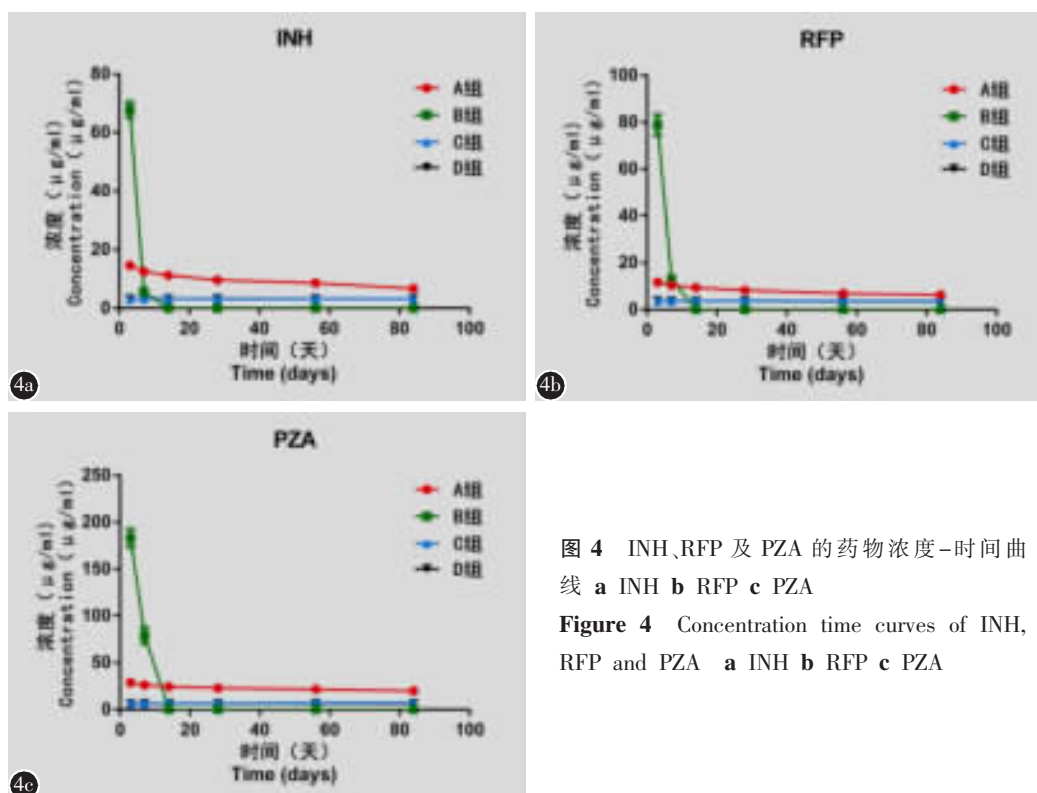


图 4 INH、RFP 及 PZA 的药物浓度-时间曲线 a INH b RFP c PZA

Figure 4 Concentration time curves of INH, RFP and PZA a INH b RFP c PZA

表 1 病灶骨组织中 H、R、Z 的检测结果

($\mu\text{g/ml}$)

Table 1 The detection results of H, R and Z in the bone tissue of the lesion

	3d	7d	14d	28d	56d	84d
INH						
A 组(Group A)	14.65 $\pm$ 0.64 ^{①②}	12.46 $\pm$ 0.29 ^{①②}	11.24 $\pm$ 0.45 ^{①②}	9.62 $\pm$ 0.23 ^{①②}	8.62 $\pm$ 0.37 ^{①②}	6.69 $\pm$ 1.42 ^{①②}
B 组(Group B)	67.76 $\pm$ 0.27 ^{③④}	5.70 $\pm$ 1.25	—	—	—	—
C 组(Group C)	3.18 $\pm$ 0.14 ^⑤	3.38 $\pm$ 0.39 ^⑤	3.32 $\pm$ 0.32 ^⑤	3.16 $\pm$ 0.19 ^⑤	3.23 $\pm$ 0.39 ^⑤	3.21 $\pm$ 0.32 ^⑤
D 组(Group D)	3.26 $\pm$ 0.43	3.31 $\pm$ 0.18	3.20 $\pm$ 0.31	3.22 $\pm$ 0.19	3.26 $\pm$ 0.25	3.24 $\pm$ 0.33
RFP						
A 组(Group A)	11.69 $\pm$ 0.71 ^{①②}	10.34 $\pm$ 0.32 ^{①②}	9.37 $\pm$ 0.29 ^{①②}	8.21 $\pm$ 0.67 ^{①②}	6.88 $\pm$ 0.54 ^{①②}	6.28 $\pm$ 0.77 ^{①②}
B 组(Group B)	78.86 $\pm$ 4.41 ^{③④}	13.06 $\pm$ 1.26	—	—	—	—
C 组(Group C)	3.71 $\pm$ 0.16 ^⑤	3.73 $\pm$ 0.22 ^⑤	3.61 $\pm$ 0.40 ^⑤	3.78 $\pm$ 0.36 ^⑤	3.65 $\pm$ 0.34 ^⑤	3.68 $\pm$ 0.42 ^⑤
D 组(Group D)	3.71 $\pm$ 0.25	3.65 $\pm$ 0.33	3.65 $\pm$ 0.46	3.73 $\pm$ 0.14	3.52 $\pm$ 0.38	3.53 $\pm$ 0.44
PZA						
A 组(Group A)	28.91 $\pm$ 1.32 ^{①②}	26.21 $\pm$ 0.82 ^{①②}	24.42 $\pm$ 0.49 ^{①②}	23.06 $\pm$ 0.66 ^{①②}	21.55 $\pm$ 1.27 ^{①②}	19.88 $\pm$ 0.90 ^{①②}
B 组(Group B)	183.07 $\pm$ 9.57 ^{③④}	79.00 $\pm$ 8.68	—	—	—	—
C 组(Group C)	6.51 $\pm$ 0.47 ^⑤	6.41 $\pm$ 0.27 ^⑤	6.80 $\pm$ 0.27 ^⑤	6.66 $\pm$ 0.24 ^⑤	7.01 $\pm$ 0.40 ^⑤	6.88 $\pm$ 0.25 ^⑤
D 组(Group D)	5.90 $\pm$ 0.37	6.41 $\pm$ 0.50	6.50 $\pm$ 0.49	6.45 $\pm$ 0.48	6.49 $\pm$ 0.45	6.39 $\pm$ 0.45

注:①与 B 组比较 $P<0.05$;②与 C 组比较 $P<0.05$;③与 A 组比较 $P<0.01$;④与 D 组比较 $P<0.01$;⑤与 D 组比较 $P>0.05$

Note: ①Compared with group B, $P<0.05$; ②Compared with group C, $P<0.05$; ③Compared with group A, $P<0.01$; ④Compared with group D, $P<0.01$; ⑤Compared with group D, $P>0.05$

度衰减较快,14d 时已检测不到 H、R 及 Z 的浓度。

2.2.3 对药代动力学参数的分析 使用 DAS 3.2.1 统计软件进行分析,A 组的曲线下面积(AUC)、生物半衰期均高于 B 组及 C 组,差异有统计学意义($P<0.05$,表 2)。

3 讨论

LDDS 是近年来发展较快的病灶局部给药新方式^[10]。本研究按体外实验优化的参数制备复合 HRZ/PLGA 缓释抗结核药涂层材料,将其粘附于自体髂骨表面,欲获得兼具高效抗结核和支撑成骨的病灶植入新材料。前期体外实验显示:复合 HRZ/PLGA 缓释抗结核涂层材料载药量及包封率较高;HPLC 测定 H、R 及 Z 可平缓释放有效抗结核浓度的药物 70d。本实验对体内释药情况进行了研究,在兔脊柱结核病灶清除之后将复合 HRZ/PLGA 缓释抗结核药植骨材料植入骨缺损处,观察体内病灶释药性能,结果表明,该材料可在兔脊柱结核病灶局部长程、高效、平缓释药,病灶局部单次使用可维持杀菌浓度至术后 3 个月,效果优于连续口服给药。

3.1 局部载药缓释系统的研究现状

多药联合长期服用抗结核药是脊柱结核治疗的基础^[11],但此方法存在患者依从性差及容易造成肝、肾等器官副作用的缺点。由于脊柱结核病灶

发生病理改变,抗结核药组织分布存在显著差异,口服给药病灶中的药物浓度极低,致使抗结核无效或低效^[4]。异烟肼、利福平、吡嗪酰胺是 WHO 推荐的临床抗结核治疗中的一线主药^[12-15]。研究表明 H、R 对结核菌的 MIC 分别为 0.005~0.5 $\mu\text{g/ml}$ 和 0.025~0.05 $\mu\text{g/ml}$,PZA 的 MIC 与细胞内酸碱度相关,pH 5.0 时为 1.5 $\mu\text{g/ml}$,一般最低杀菌浓度为最低抑菌浓度的 10 倍^[16,17]。药理学研究证明药物的临床疗效取决于其组织药物浓度。如何提高病灶局部药物浓度为研究的焦点。MinZhu 等^[18]将利福平和异烟肼负载于有生物玻璃包覆的介孔二氧化硅(MSN)及 β -TCP 支架材料中,该载药支架可实现对药物的持续释放。然而联合用药是结核治疗的用药原则,单一用药或 HR 的使用有产生耐药性的风险。Zahoor 等^[19]制备了一种同时负载异烟肼、利福平和吡嗪酰胺的海藻酸钠纳米粒子用于肺结核病的治疗,三种药物可持续释放 15d,若用于脊柱结核局部则有效作用时间不足,并且纳米微粒位置不易固定,容易伴随血液流失。载药人工骨由于兼具释药与成骨而受到关注,但存在不同程度载药量低,降解速度与整合速度难以匹配,支撑成骨性能弱及排斥反应导致不愈合等缺点。PLGA 是目前生物降解高分子材料中最活跃的载体,具有良好的生物相容性、无毒、良好的成囊和成膜性能,被广泛应用^[20-22]。本研究借助支撑成骨性能优良的自体髂骨作为支架^[14],表面

表 2 三种药物剂型/给药方式在兔脊柱结核病灶骨组织中药代动力学参数比较

Table 1 Pharmacokinetic parameter ratio on the type of preparation or administration of the three drugs in the focal bone tissue with the model of spinal tuberculosis

	曲线下面积 AUC (0→t)(mg/L·h)	体内平均驻留 MRT (0→t)(h)	生物半衰期 t1/2(h)	达峰时间 Tmax(h)	达峰浓度 (Cmax) (mg/L)
INH					
A 组(Group A)	773.16±24.85 ^{①②}	37.88±1.05	96.84±28.52 ^{①②}	3±0	14.65±0.64
B 组(Group B)	268.53±10.96	3.46±0.09	2.74±0.07	3±0	67.76±2.67
C 组(Group C)	29.94±21.24	3.10±1.41	2.67±1.19	1.36±0.64	9.05±3.83
RFP					
A 组(Group A)	653.99±17.34 ^{①②}	38.48±0.60	121.67±50.19 ^{①②}	3±0	11.69±0.71
B 组(Group B)	347.86±14.45	3.82±0.08	3.01±0.06	3±0	78.86±4.41
C 组(Group C)	91.03±18.01	6.82±1.06	4.56±0.62	2.58±0.63	11.23±2.28
PZA					
A 组(Group A)	1868.21±39.94 ^{①②}	40.49±0.48	224.12±50.35 ^{①②}	3±0	28.91±1.32
B 组(Group B)	895.07±62.13	4.19±0.12	4.30±0.10	3±0	179.07±13.91
C 组(Group C)	548.87±99.67	12.83±0.87	13.34±1.98	2.00±0.61	36.48±9.17

注:①与 B 组比较 $P<0.05$;②与 C 组比较 $P<0.05$
Note: ①Compared with group B, $P<0.05$; ②Compared with group C, $P<0.05$

粘附“复合 HRZ/PLGA 缓释抗结核药涂层材料”。本研究证实该材料可直接将药物输送致目标部位,实现三药联合施治,使药物作用更集中。

3.2 复合 HRZ/PLGA 缓释抗结核药植骨材料的体内释药特性

由于抗结核药自身半衰期较短、药物吸收屏障及肝药酶诱导首过效应等因素的存在,致使传统口服给药途径的生物利用度仅 30%~50%^[3]。药物利用度很低会造成靶组织药物浓度过低以及细菌耐药性的出现。本研究 A 组中 H、R 及 Z 在病灶中浓度总体下降趋势平缓,表明该材料在体内缓慢持续释药,可避免药物突释,降低峰谷浓度的波动度,给药 84d 内检测时三种药物浓度均 ≥ 10 倍的 MIC,可以维持其局部抗结核的有效浓度,从而提高疗效。本研究中 B 组突释明显,药物浓度衰减较快,说明局部放置未经处理的药物晶体在组织内易出现较大幅度的波动,分析考虑与术中血液稀释流失或经过其他途径损失有关,不宜应用。本研究 C 组及 D 组中 HRZ 通过口服灌胃给药而吸收入血,并最终通过血液循环到达病灶而发挥作用,区别是 D 组仅显露病灶而未行病灶清除及自体髂骨植骨,C、D 两组间同时间点同种药物浓度比较均无统计学差异,表明病灶清除并椎间植骨操作不是造成本研究中各组出现差异的原因。随时间的后移,C 组及 D 组病灶中三种药物浓度各自维持在相对平稳的较低水平,但 C、D 两组中 H、R 及 Z 的浓度数值均为灌胃给药后 120~130min 时检测值,结合 H、R 及 Z 的半衰期及达峰时间,考虑 120~130min 时检测值为 1 个给药周期(1d)内的相对较高值,此时的药时曲线并不能代表真正的体内浓度波动情况,在一个给药周期(1d)内 H、R 及 Z 的浓度会出现波动^[23],随着药物代谢,药物浓度将逐渐下降,因而影响杀菌效果。对 A、C 两组间同时间点病灶骨组织中同一种药物浓度进行组间比较,A 组病灶骨组织中 H、R 及 Z 的浓度均高于同检测点 C 组相应的药物浓度,且 A 组的曲线下面积(AUC)、生物半衰期均高于 B 组及 C 组,说明该材料可使靶组织的药物浓度维持在药物治疗的有效范围,并能维持足够长的时间,可用最小剂量达到最大药效。

3.3 复合 HRZ/PLGA 缓释抗结核药植骨材料的药物缓释机制

PLGA 可通过调整聚合物分子量的大小或载

药量的多少来调节降解速度和时间,从而获得不同的药物释放速度^[24]。本材料通过双乳、喷涂、冷冻干燥溶剂挥发法使 H、R 及 Z 均匀分散在 PLGA 载体中制备骨架分散型局部缓释系统。研究表明,释药系统大多数取决于溶出或扩散,当药物溶解速度起决定作用时,药物的释放近似为恒速释放,呈现出 non-Fickian 扩散的特征^[25-28]。本研究体内释药实验初期,HRZ 的释放因扩散及体液的渗透,位于涂层表面或接近表面的 HRZ 在体液中率先溶解,然后扩散出骨架;随着时间的推移,PLGA 材料的溶蚀,HRZ 通过骨架中的许多弯弯曲曲的孔道扩散释出;释药后期,由于含药量逐渐下降以及 PLGA 的不断降解,使药物扩散的路径长度改变,形成移动界面扩散系统。由于本材料药物分散均匀,加之结核病灶局部骨与软组织缺乏充足的血运,此时,药物的扩散速度远大于体液的渗透速度并起主导作用,因而可以实现缓释。本实验结果表明,该材料在体内可长程、平稳释药,并能三药同时缓释。

本研究证实复合 HRZ/PLGA 缓释抗结核药涂层材料可实现靶组织给药,局部施治,使药物作用更集中,并能长程、高效、平稳释药。当然,本研究样本量较小,采血时间点不够密集,我们将进一步对该材料的组织药物分布特征、生物相容性、抗结核性能及修复病灶性能进行进一步研究。

4 参考文献

1. Tuli SM. Historical aspects of Pott's disease(spinal tuberculosis) management[J]. Eur Spine J, 2013, 22(4): 529-538.
2. Wang Z, Shi JD, Geng G, et al. Ultra-short-course chemotherapy for spinal tuberculosis: five years of observation [J]. Eur Spine J, 2013, 22(2): 274-281.
3. Hirota K, Hasegawa T, Nakajima T, et al. Delivery of rifampicin-PLGA microspheres into alveolar macrophages is promising for treatment of tuberculosis [J]. J Control Release, 2010, 142(3): 339-346.
4. Ge Z, Wang Z, Wei M. Measurement of the concentration of three antituberculosis drugs in the focus of spinal tuberculosis [J]. Eur Spine J, 2008, 17(11): 1482-1487.
5. Coppes MH, Bakker NA, Metzemaekers JDM, et al. Posterior transdural discectomy: a new approach for the removal of a central thoracic disc herniation[J]. Eur Spine J, 2012, 21(4): 623-628.
6. Montazeri N, Jahandideh R, Biazar E. Synthesis of fluorapatite-hydroxyapatite nanoparticles and toxicity investigations[J]. Int J Nanomedicine, 2011, 6(1): 197-201.

7. Khoe S, Rahmatolahzadeh R. Synthesis and characterization of pH-responsive and folated nanoparticles based on self-assembled brush-like PLGA/PEG/AEMA copolymer with targeted cancer therapy properties: a comprehensive kinetic study [J]. *Eur J Med Chem*, 2012, 50(4): 416–427.
8. Geng G, Wang Q, Shi J, et al. Establishment of a new Zealand rabbit model of spinal tuberculosis[J]. *J Spinal Disord Tech*, 2015, 28(3): E140–145.
9. 耿广起, 王骞, 王自立, 等. 构建新西兰兔脊柱结核模型的对比研究[J]. *中华骨科杂志*, 2014, 34(2): 216–223
10. Gao Y, Zuo J, Bou-Chacra N, et al. In vitro release kinetics of antituberculosis drugs from nanoparticles assessed using a modified dissolution apparatus [J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013(6): 1–9.
11. Zhao Y, Xu S, Wang L, et al. National survey of drug-resistant tuberculosis in China[J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(23): 2161–2170.
12. Gumbo T, Louie A, Deziel M R, et al. Concentration-dependent *Mycobacterium tuberculosis* killing and prevention of resistance by rifampin [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(11): 3781–3788.
13. Hirota K, Hasegawa T, Nakajima T, et al. Phagostimulatory effect of uptake of PLGA microspheres loaded with rifampicin on alveolar macrophages[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2011, 87(2): 293–298.
14. Fernandez-Bances I, Perez-Basterrechea M, Perez-Lopez S, et al. Repair of long-bone pseudoarthrosis with autologous bone marrow mononuclear cells combined with allogenic bone graft[J]. *Cytherapy*, 2013, 15(5): 571–577.
15. Feuerriegel S, Oberhauser B, George A G, et al. Sequence analysis for detection of first-line drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains from a high-incidence setting[J]. *BMC Microbiol*, 2012, 12(5): 1–10.
16. Jutte PC, Rutgers SR, Van Altna R, et al. Penetration of isoniazid, rifampicin and pyrazinamide in tuberculous pleural effusion and psoas abscess[J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2004, 8(11): 1368–1372.
17. 戈朝晖, 王自立, 魏敏吉. 脊柱结核病灶中抗痨药物浓度的测定[J]. *中华骨科杂志*, 2005, 25(2): 97–101.
18. Zhu M, Wang H, Liu J, et al. A mesoporous silica nanoparticulate/ β -TCP/BC composite drug delivery system for osteoarticular tuberculosis therapy[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(7): 1986–1995.
19. Zahoor A, Sharma S, Khuller G. Inhalable alginate nanoparticles as antitubercular drug carriers against experimental tuberculosis[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2005, 26(4): 298–303.
20. He F, Li J, Ye J. Improvement of cell response of the poly (lactic-co-glycolic acid)/calcium phosphate cement composite scaffold with unidirectional pore structure by the surface immobilization of collagen via plasma treatment[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2013, 103(3): 209–216.
21. Huang W, Shi X, Ren L, et al. PHBV microspheres-PLGA matrix composite scaffold for bone tissue engineering[J]. *Biomaterials*, 2010, 31(15): 4278–4285.
22. Chakravarthi SS, Robinson DH. Enhanced cellular association of paclitaxel delivered in chitosan-PLGA particles [J]. *Int J Pharm*, 2011, 409(1–2): 111–120.
23. 朱慧, 王彬, 付雷, 等. 吡嗪酰胺每日一次与三次给药在小鼠体内的药代动力学比较及其对异烟肼-利福平的影响 [J]. *中国防痨杂志*, 2013, 35(12): 983–987.
24. Zhao L, Wu C, Lin K, et al. The effect of poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) coating on the mechanical, biodegradable, bioactive properties and drug release of porous calcium silicate scaffolds[J]. *Biomed Mater Eng*, 2012, 22(5): 289–300.
25. 李凌冰, 张娜. 药物从多孔骨架聚合物系统中 Non-Fickian 扩散的动力学模型[J]. *山东大学学报(理学版)*, 2003, 38(3): 61–65.
26. Chandrasekaran S, Paul D. Dissolution - Controlled transport from dispersed matrixes [J]. *J Pharm Sci*, 1982, 71 (12): 1399–1402.
27. Janik H, Marzec M. A review: fabrication of porous polyurethane scaffolds[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2015, 48(3): 586–591.
28. Williams JM, Adewunmi A, Schek RM, et al. Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering[J]. *Biomaterials*, 2005, 26(23): 4817–4827.

(收稿日期:2016-04-06 修回日期:2016-05-28

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 彭向峰)