

基础研究

载异烟肼、利福平纳米羟基磷灰石-硫酸钙-壳聚糖人工骨在兔脊柱结核模型中的释药研究

蔡则成¹, 马 荣², 马 赫¹, 梁思敏², 殷 飞¹, 戈朝晖²

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

【摘要】目的:研究载异烟肼(isoniazid, INH)、利福平(rifampicin, RFP)纳米羟基磷灰石(nHA)-硫酸钙(CSH)-壳聚糖(CTS)人工骨在兔脊柱结核模型病灶中的释药特点。**方法:**用结核分枝杆菌 H37Rv 标准株, 采用侧腹入路的手术方法建立兔脊柱结核模型 27 只, 其中雌性 15 只, 雄性 12 只, 3 个月龄, 平均体重为 2.50 ± 0.25 kg, 每只模型兔均在行结核病灶清除术后置入载 INH、RFP 纳米羟基磷灰石-硫酸钙-壳聚糖人工骨, 按照时相点分为 24h、72h 和 1 周、2 周、4 周、6 周、8 周、10 周、12 周共 9 组, 每组 3 只。采用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)测定各时相点动物模型病灶中椎体及椎旁肌肉中的 INH 及 RFP 的药物浓度, 并研究其浓度与时间的关系。**结果:**人工骨中的 INH 在兔脊柱结核模型的病灶椎体中 24h、72h 和 1 周、2 周、4 周、6 周、8 周的药物浓度分别为 $75.66 \pm 1.95 \mu\text{g/g}$ 、 $48.46 \pm 2.34 \mu\text{g/g}$ 、 $30.69 \pm 2.74 \mu\text{g/g}$ 、 $20.34 \pm 1.63 \mu\text{g/g}$ 、 $9.36 \pm 1.17 \mu\text{g/g}$ 、 $5.19 \pm 1.40 \mu\text{g/g}$ 、 $2.73 \pm 1.19 \mu\text{g/g}$, 在第 10 周以后未检测到药物浓度, INH 在病灶椎旁肌肉中的各时相点浓度为 $39.51 \pm 2.25 \mu\text{g/g}$ 、 $23.65 \pm 1.55 \mu\text{g/g}$ 、 $16.39 \pm 2.10 \mu\text{g/g}$ 、 $10.38 \pm 1.44 \mu\text{g/g}$ 、 $3.66 \pm 0.79 \mu\text{g/g}$ 、 $1.89 \pm 0.73 \mu\text{g/g}$ 、 $0.26 \pm 0.10 \mu\text{g/g}$, 在第 10 周以后未检测到药物浓度。对 INH 在同一时间的椎体和椎旁肌两种不同组织中的药物浓度进行两两比较, 均有统计学意义 ($P < 0.05$); RFP 在动物模型的病灶椎体中 24h、72h 和 1 周、2 周、4 周、6 周、8 周、10 周、12 周的药物浓度分别为 $10.85 \pm 2.45 \mu\text{g/g}$ 、 $22.47 \pm 1.94 \mu\text{g/g}$ 、 $38.32 \pm 1.73 \mu\text{g/g}$ 、 $24.22 \pm 1.45 \mu\text{g/g}$ 、 $17.85 \pm 1.50 \mu\text{g/g}$ 、 $9.81 \pm 1.30 \mu\text{g/g}$ 、 $6.35 \pm 1.30 \mu\text{g/g}$ 、 $5.11 \pm 0.53 \mu\text{g/g}$ 、 $1.32 \pm 0.33 \mu\text{g/g}$, RFP 在病灶椎旁肌肉中的药物浓度分别为 $5.39 \pm 1.50 \mu\text{g/g}$ 、 $20.66 \pm 1.29 \mu\text{g/g}$ 、 $48.72 \pm 2.24 \mu\text{g/g}$ 、 $32.27 \pm 1.63 \mu\text{g/g}$ 、 $15.58 \pm 1.88 \mu\text{g/g}$ 、 $8.69 \pm 0.79 \mu\text{g/g}$ 、 $3.43 \pm 0.39 \mu\text{g/g}$, 在第 10 周后未检测到药物浓度。RFP 在椎体和椎旁肌两个部位的药物浓度除 72h、4 周和 6 周外, 其余时间点的差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论:**载 INH、RFP 纳米羟基磷灰石-硫酸钙-壳聚糖人工骨在兔脊柱结核模型病灶中可持续、长效的释放抗结核药物。

【关键词】脊柱结核; 异烟肼; 利福平; 人工骨; 体内缓释

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2019.02.08

中图分类号: R529.2, R978.3 文献标识码 A 文章编号: 1004-406X(2019)-02-0141-06

Release of isoniazid and rifampicin nano-hydroxyapatite-calcium-sulfate-chitosan artificial bone in rabbit spinal tuberculosis model/CAI Zecheng, MA Rong, MA He, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2019, 29(2): 141-146

【Abstract】Objectives: To study drug release characteristics of isoniazid(INH) and rifampicin(RFP) nano-hydroxyapatite (nHA)-calcium sulfate (CSH)-chitosan (CTS) artificial bone in rabbit spinal tuberculosis model. **Methods:** By using standard strain of Mycobacterium tuberculosis H37Rv, 27 rabbit spinal tuberculosis models were established by lateral ventral approach, 15 females and 12 males, 3 months old, with an average body weight of 2.50 ± 0.25 kg, each model rabbit was implanted with artificial bone materials after spinal tuberculosis debridement. According to the time points, the models were divided into 24h, 72h and 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 weeks, a total of nine groups, with 3 rabbits in each group. High performance liquid chromatography (HPLC) was used to determine the concentration of INH and RFP in focal bone tissue and focal muscle

基金项目: 国家自然科学基金(81460335); 宁夏自然科学基金(NZ17147)

第一作者简介: 男(1992-), 硕士研究生在读, 研究方向: 脊柱结核

电话: (0951)6746129 E-mail: 418751857@qq.com

并列第一作者: 马荣 E-mail: marongtx228@163.com

通讯作者: 戈朝晖 E-mail: myovid@126.com

tissue of animal models at different time points, and the relationship between concentration and time was studied. **Results:** The concentration of INH in focal bone tissue at 24h, 72h and 1 week, 2 weeks, 4 weeks, 6 weeks and 8 weeks was $75.66 \pm 1.95 \mu\text{g/g}$, $48.46 \pm 2.34 \mu\text{g/g}$, $30.69 \pm 2.74 \mu\text{g/g}$, $20.34 \pm 1.63 \mu\text{g/g}$, $9.36 \pm 1.17 \mu\text{g/g}$, $5.19 \pm 1.40 \mu\text{g/g}$ and $2.73 \pm 1.19 \mu\text{g/g}$ respectively, no drug concentration was detected after 10 weeks, the concentration of INH in focal muscle tissue was $39.51 \pm 2.25 \mu\text{g/g}$, $23.65 \pm 1.55 \mu\text{g/g}$, $16.39 \pm 2.10 \mu\text{g/g}$, $10.38 \pm 1.44 \mu\text{g/g}$, $3.66 \pm 0.79 \mu\text{g/g}$, $1.89 \pm 0.73 \mu\text{g/g}$, $0.26 \pm 0.10 \mu\text{g/g}$ respectively, no drug concentration was detected after 10 weeks. Comparison of drug concentrations of INH in two different tissues at the same time showed statistical significance ($P < 0.05$). At 24h, 72h and 1 week, 2 weeks, 4 weeks, 6 weeks, 8 weeks and 10 weeks, the drug concentration of RFP in focal bone tissue was $10.85 \pm 2.45 \mu\text{g/g}$, $22.47 \pm 1.94 \mu\text{g/g}$, $38.32 \pm 1.73 \mu\text{g/g}$, $24.22 \pm 1.45 \mu\text{g/g}$, $17.85 \pm 1.50 \mu\text{g/g}$, $9.81 \pm 1.30 \mu\text{g/g}$, $6.35 \pm 1.30 \mu\text{g/g}$, $5.11 \pm 0.53 \mu\text{g/g}$, $1.32 \pm 0.33 \mu\text{g/g}$ respectively. The drug concentration of RFP in focal muscle tissue was $5.39 \pm 1.50 \mu\text{g/g}$, $20.66 \pm 1.29 \mu\text{g/g}$, $48.72 \pm 2.24 \mu\text{g/g}$, $32.27 \pm 1.63 \mu\text{g/g}$, $15.58 \pm 1.88 \mu\text{g/g}$, $8.69 \pm 0.79 \mu\text{g/g}$, $3.43 \pm 0.39 \mu\text{g/g}$ respectively. No drug concentration was detected after 10 weeks. The concentrations of RFP in two different tissues were significantly different at other time points except 72h, 4 weeks and 6 weeks ($P < 0.05$). **Conclusions:** INH-RFP nano hydroxyapatite-calcium sulfate-chitosan artificial bone can sustainably and effectively release anti-tuberculosis drugs in the focal tissues of rabbit spinal tuberculosis model.

[Key words] Spinal tuberculosis; Isoniazid; Rifampin; Artificial bone; Slow-release in vivo

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

研究显示, 由于脊柱结核病灶处死骨及硬化骨的形成, 异烟肼 (isoniazid, INH)、利福平 (rifampicin, RFP) 等常规一线抗结核化疗药物难以在脊柱结核病灶实现有效的生物分布, 降低了抗结核化疗的效果^[1]。近年来, 越来越多的研究^[2,3]尝试通过构建局部缓释材料、局部填充给药的方式治疗脊柱结核, 由于材料不一, 效果差别较大。本研究在前期成功构建的载 INH、RFP 纳米羟基磷灰石-硫酸钙-壳聚糖人工骨的体外释药及生物力学研究的基础上^[4], 将人工骨置入兔脊柱结核病灶清除的病椎缺损区, 观察其在兔结核动物模型中的病椎组织的生物分布及释药特点, 为脊柱结核的局部治疗新材料的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

纳米羟基磷灰石 (nHA, 学校自制)、硫酸钙 ($\text{CaSO}_4 \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$, CAS: 10034-76-1, Sigma 公司)、壳聚糖 (CTS, 国药集团)、异烟肼标准品 (INH, 批号 100578-201502, 中国食品药品研究所)、利福平标准品 (RFP, 批号 110757-201502, 中国食品药品研究所)、磷酸二氢钠 (NaH_2PO_4 , 分析纯, 南京试剂)、乙酸 (CH_3COOH , 分析纯, 天津科密欧化学)、甲醇 (Fisher Scientific, HPLC GRADE)、乙腈 (Fisher Scientific, HPLC GRADE)、台式高速冷冻离心机 (Eppendorf, Centrifuge 5810R)、高效液相

色谱仪 (安捷伦 1200 系列)、医用电动钻 (张家港市康康医疗器械有限公司)、新西兰大白兔 (陕西兴平市天瑞实验动物养殖厂提供, 雌性 19 只, 雄性 18 只), 体重 $2.50 \pm 0.25 \text{kg}$, 3 个月龄。

1.2 人工骨的制备

按 nHA:CSH:INH:RFP=2.0:8.0:0.2:0.2 的重量配比。在避光实验室中精确称取 0.2g nHA、0.8g CSH、0.02g INH、0.02g RFP, 将称取好的每种原料加入 5ml 的圆底离心管, 用涡旋混匀器充分混匀 5min 后, 作为人工骨的固相。称取 2g CTS 溶于 100ml 1%浓度的乙酸溶液中作为液相。以 1g 固相加入 0.9g 液相的比例, 将预先配制好的固相加入液相中, 混匀后注入高 12mm, 直径 6mm 的多空圆柱形模具中, 定型 2~3min 后, 从圆形模具中小心取出, 避光、干燥、固化 3d 以上, 获得载 INH、RFP 纳米羟基磷灰石-硫酸钙-壳聚糖人工骨 (图 1)。4℃冰箱避光储存, 备用。

1.3 兔脊柱结核模型的建立

在进行造模的前 1 个月, 依据课题组前期的造模方法^[5], 给每个实验兔 0.1ml 的弗氏佐剂致敏 (颈背根部皮下注射), 1 个月, 颈背根部的注射部位出现直径约 0.8~1.0cm 大小的淡黄色硬结, 无破溃及出血, 即为致敏有效, 无破溃及出血, 即为致敏无效, 未出现上述现象的为致敏无效。致敏的意义在于诱导动物体内产生抗结核杆菌抗体, 在种植 H37Rv 标准株后减少血行播散, 避免

内脏器官出现感染,将致敏无效的 2 只剔除。对致敏成功的 35 只实验兔进行脊柱结核模型种植手术,术前禁饮食及术区备皮,采用 3%戊巴比妥钠溶液行耳缘静脉麻醉,麻醉完成后,行右侧卧位固定,常规消毒及铺巾,经横突侧腹部入路,显露 L4~5 椎体,于 L4 椎体下部距 L4/L5 椎间盘 0.5cm 处从左后方向右前方,开路椎钻骨孔,深度约 5mm,直径 3mm,骨孔充分止血后填充明胶海绵并压实,用注射器在明胶海绵上缓慢浸注浓度为 1×10^7 CFU/ml 的结核杆菌混悬液(人型结核分枝杆菌, H37RV 标准菌株) 0.1ml, 1-0 丝线逐层关闭切口。饲养 2 个月后,通过术前与术后的体重变化、CT 扫描及三维重建,符合术后椎体破坏、椎间隙变窄、椎旁脓肿形成等变化即为成功的动物模型(图 2)。

1.4 置入人工骨的手术方法

造模 2 个月后,将脊柱结核模型兔侧卧于手术床,四肢妥善固定,用 3%戊巴比妥钠从兔耳缘静脉注射,全身静脉麻醉。若实验兔出现角膜反应消失、呼吸频率慢而平稳、肌张力下降等生理变化,则视为麻醉完成。常规消毒铺巾,经原手术入

路,显露出已被结核杆菌破坏的骨质及椎间盘,行显性病灶切除术,包括脓肿、结核坏死肉芽及死骨(切除病灶硬化骨及周围 2mm 的亚正常骨,切除病灶周围 2mm 的椎旁肌肉组织),用医疗磨钻将上下相邻的椎体磨出凹陷,与缺损的部位共同构成骨槽,将事先用游标卡尺切割的 6×6mm 的人工骨置入骨槽中,骨蜡封闭椎体窗口,逐层关闭切口(图 3)。将动物放回饲养笼中,待麻醉苏醒后观察实验兔的活动、精神、进食及切口愈合情况。

1.5 术后检测

1.5.1 实验动物的取材与处理 对于置入人工骨材料的实验兔,分别于术后 24h、72h、1 周、2 周、4 周、6 周、8 周、10 周、12 周共 9 个时相点进行手术取材,每个时相点取出实验兔 3 只,空气栓塞处死后,快速从原切口入路并显露置入人工骨的结核病灶,取人工骨上下 2mm 的椎体骨组织及周围 2mm 椎旁肌肉组织, 2g 左右,避光条件下, -50°C 冷冻干燥 24h 后,放入 -80°C 冰箱保存,备用。

1.5.2 标本中 INH、RFP 的浓度测定 色谱条件: INH 色谱柱 $5\mu\text{m}$ 4.6×250mm ZORBAX SB-C18; 预柱 $5\mu\text{m}$ 4.6×12.5mm SB-C18;流动相为磷酸二



图 1 红色圆柱体为载 INH、RFP 纳米羟基磷灰石-硫酸钙-壳聚糖人工骨,白色圆柱体为未载药的人工骨 图 2 兔脊柱结核模型 a~c CT 扫描示 L4/5 椎体大面积溶骨性破坏、碎片征,溶骨边缘硬化壁形成(箭头所示) d 椎旁有脓肿包裹形成(箭头所示)

Figure 1 The red cylinder is an INH, RFP nano-hydroxyapatite-calcium sulfate artificial bone, and the white cylinder is an unloaded artificial bone **Figure 2** Model of spinal tuberculosis in rabbits a~c CT scan showed

large area of osteolytic destruction, combined with debris sign of L4/5 vertebrae, sclerotic wall was formed in the osteolytic border (arrow) d The rabbit model showed vertebral body side abscess (arrow)

氢钠缓冲液(0.02mol/L, pH6.0):甲醇:乙腈=90:5:5;进样量 20 μ l;流速 0.9ml/min;柱温 25 $^{\circ}$ C;波长 264nm。RFP 色谱柱 5 μ m 4.6 $\times$ 150mm ZORBAX XDB-C18;预柱 5 μ m 4.6 $\times$ 12.5mm XDB-C18;流动相为磷酸二氢钠缓冲液(0.02mol/L, pH7.2):甲醇=33:67;进样量 20 μ l;流速 1.0ml/min;柱温 35 $^{\circ}$ C;波长 330nm。

1.5.3 样品的制备 椎体骨组织处理:取已冷冻、干燥完成的骨组织,放入研钵中仔细研磨约 20min 左右至无骨组织呈细碎状即可,准确称量 100mg 骨粉末,加 1000 μ l 甲醇在玻璃匀浆器进行匀浆、萃取,将匀浆液收集到离心管,置涡旋混合器上涡旋 2min 后于低温离心机中-4 $^{\circ}$ C、1400r/min 离心 10min 后取上清液 200 μ l 滴入色谱样品瓶中,高效液相色谱仪进样检测。肌肉组织样品处理:取兔椎旁肌样品,准确称取 300mg,加入 800 μ l 甲醇于匀浆器中匀浆、萃取,将匀浆液收集到离心管,涡旋 2min 后,置低温离心机-4 $^{\circ}$ C、1400r/min 离心 10min,取上清液 200 μ l 于高效液相色谱仪样品瓶中,使用高效液相色谱对药物浓度进行测定。

1.6 统计分析

所有手术动物的体重、局部测定的药物浓度均以均值 $\pm$ 标准差表示,应用 SPSS 17.0 统计软件分析数据,同一时间的不同部位的药物浓度采用配对样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

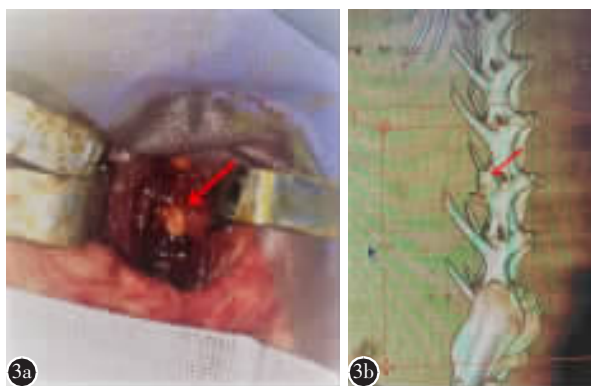


图 3 a、b 病灶清除术后置入人工骨,CT 及三维重建示人工骨在病灶缺损处固定到位

Figure 3 a, b The artificial bone was implanted after spinal tuberculosis debridement, CT and 3d reconstruction showed that the artificial bone was fixed in the defect left by lesion

2.1 术后观察

所有动物麻醉、手术过程顺利。术后第 1 天,1 只兔无明显诱因出现死亡,考虑麻醉药物所致;术后第 1 周,2 只兔因进食及饮水量少死亡;术后第 2 周,1 只兔出现下肢瘫痪,无法进食、水,3d 后死亡,术后第 3 周,2 只兔出现窦道,给予换药后未见好转,于第 4 周出现活动量下降、食欲差,并于 1 周后死亡。共选取 35 只兔进行造模,饲养 2 个月,死亡 6 只,存活率为 82%(29/35)。

2.2 标本中 INH 与 RFP 的浓度测定结果

INH 在病灶椎体及椎旁肌中的释放平缓,无突释现象,在置入后的第 8 周药物浓度均达到最低,并且达到了其最低杀菌浓度(minimal bactericidal concentration, MBC),对 INH 在同一时间点中的不同部位的药物浓度进行比较,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。RFP 在病灶椎体及椎旁肌中的释放存在突释现象,在置入后的 1 周均达到最大,在病灶椎体中的浓度于第 12 周时最低,在椎旁肌中的浓度于第 8 周时最低,病灶组织中的 RFP 的最低浓度均达到了 MBC,对 RFP 在同一时间点中的不同部位的药物浓度进行比较,除 72h、4 周、6 周外,其余时间点均具有统计学意义($P < 0.05$, 表 1)。

3 讨论

脊柱结核不同于肺结核及其他肺外结核,病

表 1 病灶组织中的 INH、RFP 浓度

Table 1 Detection results of INH and RFP in lesions

	异烟肼(μ g/g) Isoniazid		利福平(μ g/g) Rifampicin	
	椎体 Focal bone tissue	椎旁肌 Focal muscle tissue	椎体 Focal bone tissue	椎旁肌 Focal muscle tissue
24h	75.66 $\pm$ 1.95	39.51 $\pm$ 2.25 ^①	10.85 $\pm$ 2.45	5.39 $\pm$ 1.50 ^②
72h	48.46 $\pm$ 2.34	23.65 $\pm$ 1.55 ^①	22.47 $\pm$ 1.94	20.66 $\pm$ 1.29 ^③
1 week	30.69 $\pm$ 2.74	16.39 $\pm$ 2.10 ^①	38.32 $\pm$ 1.73	48.72 $\pm$ 2.24 ^②
2 week	20.34 $\pm$ 1.63	10.38 $\pm$ 1.44 ^①	24.22 $\pm$ 1.45	32.27 $\pm$ 1.63 ^②
4 week	9.36 $\pm$ 1.17	3.66 $\pm$ 0.79 ^①	17.85 $\pm$ 1.50	15.58 $\pm$ 1.88 ^③
6 week	5.19 $\pm$ 1.40	1.89 $\pm$ 0.73 ^①	9.81 $\pm$ 1.30	8.69 $\pm$ 0.79 ^③
8 week	2.73 $\pm$ 1.19	0.26 $\pm$ 0.10 ^①	6.35 $\pm$ 1.30	3.43 $\pm$ 0.39 ^②
10 week	—	—	5.11 $\pm$ 0.53	—
12 week	—	—	1.32 $\pm$ 0.33	—

注:①与异烟肼组比较 $P < 0.05$;②与利福平组比较 $P < 0.05$;③与 RFP 组比较 $P > 0.05$

Note: ①Compared with INH group, $P < 0.05$; ②Compared with RFP group, $P < 0.05$; ③Compared with RFP group, $P > 0.05$

灶往往同时存在着病椎硬化、椎体破坏、组织坏死、脓肿等病理变化,使得抗结核药物难以通过病灶周围的硬化壁而达到有效的杀菌浓度^[9],所以寻找其他途径的给药方式便成了治疗的关键。研究^[7]发现,局部缓释材料有助于局部病灶的治愈,并且由于脊柱结核特殊的骨组织病理变化,在清除无生物活性的死骨后,大多数患者会有体积不等的骨缺损形成,若不进行修复,很难自行愈合。所以局部缓释材料除了可以让药物长效释放外,还需具有抗压及骨组织修复的能力。本研究依据前期体外实验已优化的配比参数^[4],将人工骨置入动物模型中的骨缺损处,拟研究出兼具药物缓释及骨组织支撑的新的复合材料。

3.1 人工骨的应用

目前常用的人工骨材料有羟基磷灰石、磷酸钙、硫酸钙等,此类化合物的化学成分及结构与人体骨骼的成分组成类似,有利于骨的再生^[8,9]。叶向阳等^[10]将磷酸钙负载 RFP 制备出抗结核缓释载体,虽然缓释时间可维持至 12 周,但存在负载药物单一、易致结核杆菌产生耐药性及抗压强度弱等。Kundu 等^[11]将抗感染药物与低孔型的磷酸钙相结合,在置入兔胫骨后获得了较好的支撑性能,但是其药物的释放速率却随着时间的增加而难以控制。与磷酸钙相似的是,nHA 具有高的溶解度及生物活性,并且可与骨骼有更好地融合,但是 nHA 质地较脆,抗压强度较弱^[12,13]。而 nHA 与半水硫酸钙(calcium sulphate hemihydrate,CSH)的复合物可以克服 CSH 及 HA 两种材料的缺点,并以一定的比例形成新的生物材料,在课题组前期体外实验中^[4],人工骨中的 INH 与 RFP 的有效缓释周期分别为 8 周和 12 周。葛亮等^[14]研究证实 nHA-CSH 复合材料对于生物的排斥反应小,骨膜下有促进骨骼生长的作用,而且可以吸附生物因子及化疗药物,本研究借助支撑性能良好的 nHA-CSH 复合材料,搭载抗结核药物进行模型动物的体内释药性能实验。Loi 等^[15]认为在骨组织修复材料体系中,若单用钙、磷材料,易致缓释效果降低、体液 pH 升高等缺点,故需要加用天然高分子材料,如明胶、海藻酸盐、壳聚糖(chitosan,CTS)等物质进行改性。Foxx 等^[16]在研究中发现明胶的高溶胀度会影响羟基磷灰石-明胶复合物的机械强度,需对复合物进行交联处理,而交联剂大多存在不同程度的生物毒性,并且制作工艺复杂,这些因素限制了明胶与羟基磷灰石的结合与应用。

CTS 为天然的亲水性多糖,无毒可降解,具有良好的生物相容性,因其自身的黏性特点,可以增加骨修复材料的稳定性与缓释性能^[17]。梁卫寰等^[18]已证实 CTS 可以使含有 HA 复合物的吸水率升高,在体液环境下可以增加物质的交换效率,Shi 等^[19]将 nHA-CS-乙基纤维素搭载庆大霉素,通过各组对照研究,发现加入 CTS 的复合材料可以将药物在兔骨髓炎模型中的药物浓度维持至 45d。这也是 INH 与 RFP 两种药物均在椎体与肌肉中能够有较高浓度的原因之一。

3.2 人工骨的释药特点

在 WHO 推荐的抗结核化疗方案中,推荐的抗结核一线药物有 INH、RFP、链霉素(streptomycin,SM)、吡嗪酰胺(pyrazinamide,PZA)^[20]。虽然 SM 为广谱抗生素,但是因其不易进入干酪样组织及细胞膜,对有脓肿、死骨形成的结核疗效欠佳,导致其应用受限^[21],PZA 对细胞内或静止状态下的结核杆菌有特殊杀灭作用,但是其在 pH≤5.6 时才具有抗菌活性^[22]。INH 作为水溶性抗结核药物,对于病灶中代谢活跃的结核分枝杆菌的杀伤能力极强,其体外最低抑菌浓度 MIC 为 0.005~0.5μg/ml。同样 RFP 作为脂溶性的抗结核药物,属于广谱抗生素,其最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration,MIC)为 0.025~0.05μg/ml,两种药物的 MBC 为其 MIC 的 10 倍^[23]。本研究选择了 INH 与 RFP 两种杀菌作用较强的药物作为人工骨负载的药物,在模型兔中释药结果显示,INH 在病灶椎体及椎旁肌肉中的药物浓度可以维持至第 8 周,并且在两种组织中的药物浓度均达到了 INH 的 MIC 与 MBC。RFP 在病灶椎体及肌肉中的药物浓度在 1 周时达到了最高,并且在椎体中的 12 周时药物浓度仍达到了 RFP 的 MBC,INH 在 4 周前的突释现象较为明显,考虑 CTS 为亲水性物质,而 INH 同样为水溶性药物,故其对 INH 的缓释作用要略弱一些。但是从另一方面来说,对于脊柱结核这种感染性疾病,药物早期大量、快速地释放对于控制感染、改善预后有重要的作用^[24]。人工骨中的 RFP 在 1 周之前的释放都是逐步递增的,其原因可能为 RFP 是脂溶性药物,与 CTS 的溶解性相反,故 CTS 对于 RFP 前期的缓释作用较强。而在 1 周后,RFP 呈现出平稳、持续的释药特性,考虑复合材料随着时间的增加、体液的浸润、CTS 浓度的降低导致人工骨结构逐渐松散、降解。总体来看,材料中的 INH 表现出 2 周

前为快速释药相,后期为缓释相,这种双相释药特点可以将其早期杀菌的优点最大程度地发挥出来,而 RFP 在 1 周前的药物浓度呈现逐渐增高,后平稳释放的特点,加之其对于生长缓慢和间歇生长的结核菌有较强的抗菌活性,这种释药曲线可将 RFP 更好地应用于抗结核治疗中。

本研究的不足之处在于材料只负载了两种一线的抗结核药物,存在药物耐药及结核控制不佳的风险、实验动物的样本量过小、由于兔椎体体积小,取材时难以获得足够量的病椎不同组织(如硬化骨、亚正常骨)进行各自组织药物浓度分析,因此,只能获得病椎总体的药物平均浓度,反映抗结核骨在病椎中的总体释药情况,以上为其不足之处。我们将在后续实验中尝试加入 PZA,以及测定病灶周围组织中的 pH 值,取材时将病灶椎体按不同的病理变化进行药物浓度的测定,以获得更准确、更好的抗结核效果。

4 参考文献

- 杨海青,段洪. 脊柱结核病理及影像学形态多样性特征[J]. 实用骨科杂志, 2015, 21(5): 473-476.
- Liu P, Jiang H, Li S, et al. Determination of anti-tuberculosis drug concentration and distribution from sustained release microspheres in the vertebrae of a spinal tuberculosis rabbit model[J]. J Orthop Res, 2017, 35(1): 200-208.
- Huang D, Li D, Wang T, et al. Isoniazid conjugated poly(lactide-co-glycolide): Long-term controlled drug release and tissue regeneration for bone tuberculosis therapy[J]. Biomaterials, 2015, 52(1): 417-425.
- 马赫,蔡则成,梁思敏,等. 载异烟肼、利福平纳米羟基磷灰石-硫酸钙人工骨体外降解及释药研究[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2018, 28(7): 641-647.
- 陈振,吴鹏,马荣,等. 构建新西兰兔脊柱结核模型的实验研究[J]. 宁夏医科大学学报, 2015, 37(10): 216-223.
- 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.
- Dong J, Zhang S, Liu H, et al. Novel alternative therapy for spinal tuberculosis during surgery: reconstructing with anti-tuberculosis bioactivity implants[J]. Expert Opin Drug Deliv, 2014, 11(3): 299-305.
- Liu Y, Luo D, Wang T. Hierarchical structures of bone and bioinspired bone tissue engineering[J]. Small, 2016, 12(34): 4611-4632.
- 邱耿韬,史占军,赵亮. 磷酸钙骨水泥在骨组织再生修复应用中的研究进展[J]. 中国矫形外科杂志, 2013, 21(14): 1406-1409.
- 叶向阳,甄平,李晓飞,等. 新型抗结核多孔磷酸钙骨水泥缓释载体的制备与性能研究[J]. 中国矫形外科杂志, 2010, 18(23): 1981-1986.
- Kundu B, Soundrapandian C, Nandi SK, et al. Development of new localized drug delivery system based on ceftriaxone-sulbactam composite drug impregnated porous hydroxyapatite: a systematic approach for in vitro and in vivo animal trial[J]. Pharm Res, 2010, 27(8): 1659-1676.
- Chaudhry AA, Yan H, Gong K, et al. High-strength nanograined and translucent hydroxyapatite monoliths via continuous hydrothermal synthesis and optimized spark plasma sintering[J]. Acta Biomaterialia, 2011, 7(2): 791-799.
- 廖建国,李艳群,段星泽,等. 纳米羟基磷灰石/聚合物复合骨修复材料[J]. 化学进展, 2015, 27(Z1): 220-228.
- 葛亮. 可注射式硫酸钙/纳米羟基磷灰石人工骨的研制及其生物学性能的初步研究[D]. 第二军医大学, 2007.
- Loi F, Córdova LA, Pajarinen J, et al. Inflammation, fracture and bone repair[J]. Bone, 2016, 86: 119-130. doi: 10.1016/j.bone.2016.02.020.
- Foxx M, Zilberman M. Drug delivery from gelatin-based systems[J]. Expert Opin Drug Deliv, 2015, 12(9): 1547-1563.
- Sun Y, Li X, Liang X, et al. Calcium phosphate/octadecyl-quaternized carboxymethyl chitosan nanoparticles: an efficient and promising carrier for gene transfection[J]. J Nanosci Nanotechnol, 2013, 13(8): 5260-5266.
- 梁卫寰,谭竹钧,区硕俊,等. 羟基磷灰石/壳聚糖-柚皮苷缓释材料的制备及性能初探[J]. 功能材料, 2015, 46(19): 19131-19135.
- Shi P, Zuo Y, Li X, et al. Gentamicin-impregnated chitosan/nanohydroxyapatite/ethyl cellulose microspheres granules for chronic osteomyelitis therapy[J]. J Biomed Mater Res A, 2010, 93A(3): 1020-1031.
- Kurz SG, Furin JJ, Bark CM. Drug-resistant tuberculosis: challenges and progress[J]. Infect Dis Clin North Am, 2016, 30(2): 509-522.
- Duan Q, Chen Z, Chen C, et al. The prevalence of drug-resistant tuberculosis in mainland China: an updated systematic review and meta-analysis[J]. Plos One, 2016, 11(2): e0148041. doi: 10.1371/journal.pone.0148041.
- Gao Y, Zuo J, Nadia BC, et al. In vitro release kinetics of antituberculosis drugs from nanoparticles assessed using a modified dissolution apparatus[J]. Biomed Res Int, 2013, 7: 527-531.
- Jutte PC, Rutgers SR, Van AR, 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.
- Fan SW, Hu ZA. Emphasis on the importance of chemical drug treatment for spinal tuberculosis[J]. China J Orthop Trauma, 2017, 30(9): 783-786.

(收稿日期:2018-06-04 末次修回日期:2018-11-27)

(英文编审 庄乾宇/贾丹彤)

(本文编辑 姜雅浩)