

基础研究

抗结核药缓释涂层在兔脊柱结核模型体内的
抗结核性能及组织相容性观察岳学锋^{1,2}, 唐学峰², 施建党³, 吴龙云²

[1 宁夏医科大学第二附属医院(银川市第一人民医院)骨科 750001 银川市; 2 宁夏医科大学研究生院 750004 银川市;
3 宁夏医科大学总医院脊柱骨科 750004 银川市]

【摘要】目的:观察抗结核药异烟肼(H)、利福平(R)、吡嗪酰胺(Z)缓释涂层在兔脊柱结核模型体内的抗结核性能及组织相容性。**方法:**选取健康新西兰兔构建 L4/5 脊柱结核模型,将建模成功的 60 只模型兔随机分为 A、B、C 三组,每组 20 只,其中 A 组(实验组)病灶清除术后植入包裹 HRZ 缓释涂层的自体髂骨;B 组(对照组)病灶清除术后植入包裹空白涂层的自体髂骨;C 组(空白对照组)病灶清除术后单纯植入自体髂骨。术后观察实验兔一般状况及伤口情况;造模前 1d、病灶清除术前及术后 1d、3d、7d、14d、28d、56d、84d、112d 进行血沉(ESR)、C 反应蛋白(CRP)检测;术前以及术后 14d、28d、56d 进行肝肾功能检测;术后 28d 时 A 组随机处死 5 只兔,取心脏、肝脏、脊髓、脾脏及肾脏组织制作病理切片观察;术后 56d 行脊柱 X 线片检查后,每组随机处死 5 只兔在植骨部位局部取材进行骨-材料界面组织病理学观察。**结果:**术后 B 组 1 只兔切口感染,C 组 1 只兔死亡、1 只兔截瘫,其余兔术后一般状况良好。三组造模前和手术前的 ESR 和 CRP 均无统计学差异($P>0.05$);三组手术前的 ESR 和 CRP 均较造模前显著性升高($P<0.01$)。三组术后 1d 时 ESR 和 CRP 均较术前显著性升高,3d 时 CRP 达到峰值,7d 时 ESR 达到高峰,此后逐渐下降;A 组至术后 56d 时 CRP 降至造模前水平,84d 时 ESR 降至造模前水平;B、C 组至 112d 时 CRP 和 ESR 均仍显著性高于造模前水平 ($P<0.05$)。A 组术后 7d、56d、84d 及 112d 的 ESR 和 CRP 均低于同时点 B、C 组($P<0.05$),B 组与 C 组同时点无显著性差异($P>0.05$)。三组间术前和术后 14d、28d、56d 的肝、肾功能指标比较均无统计学差异($P>0.05$);三组术后 14d、28d、56d 的肝、肾功能指标与术前比较均无统计学差异($P>0.05$)。术后 28d 时 A 组心脏、肝脏、脾脏、脊髓及肾脏组织未见器质性改变及组织损伤征象。术后 56d 时 A 组植骨融合情况优于 B 组及 C 组($P<0.05$),骨-材料界面组织病理切片骨小梁面积显著性高于 B 组及 C 组($P<0.01$)。**结论:**HRZ 缓释涂层在兔体内具有优良的抗结核性能和组织相容性。

【关键词】 脊柱结核;抗结核药缓释涂层;异烟肼;利福平;吡嗪酰胺;骨修复

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2020.06.12

中图分类号: R318.08, R529.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2020)-06-0558-08

Antituberculosis performance and histocompatibility of anti-tuberculosis drug slow-release coating in rabbit spinal tuberculosis model/YUE Xuefeng, TANG Xuefeng, SHI Jiandang, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2020, 30(6): 558-565

【Abstract】Objectives: The anti-tuberculosis drugs isoniazid(H), rifampicin(R) and pyrazinamide(Z) sustained-release coatings were observed in rabbit spinal tuberculosis model for anti-tuberculosis performance and tissue compatibility. **Methods:** Healthy New Zealand rabbits were selected to construct L4/5 spinal tuberculosis models, and 60 successfully constructed rabbits were randomly divided into 3 groups of 20 rabbits. Group A (experimental group), implanted autologous iliac bone with adhesive HRZ coating after removing the lesion; group B(control group), implanted autologous iliac bone with blank coating after lesion removal; group C (blank control group), implanted autologous iliac bone after lesion removal. The general conditions and wounds of experimental rabbits after operation were observed. ESR and CRP were performed 1d before modeling,

基金项目:国家自然科学基金(81360275,81760399);宁夏医科大学校级项目(XM2019154)

第一作者简介:男(1984-),主治医师,研究方向:脊柱外科

电话:(0951)6997128 E-mail:yue.yxf@gmail.com

并列第一作者:唐学峰 E-mail:nyhwannyh@163.com

通讯作者:施建党 E-mail:shi_jiandang@163.com

preoperation and 1d, 3d, 7d, 14d, 28d, 56d, 84d, and 112d after operation. Liver and kidney function tests were performed before and 14d, 28d, and 56d after operation. 5 rabbits in group A were randomly executed at 28d after surgery, and their hearts, livers, spinal cord, spleens, and kidney tissues were excised to make pathological sections for observation. Spinal X-ray examination was performed at 56d after operation, and 5 rabbits were randomly executed in each group to collect material samples from the bone graft site for histopathological observation of the bone-material interface. **Results:** One rabbit in group B was infected with incision, one rabbit in group C died, one rabbit was paraplegic, and the remaining rabbits were generally in good conditions after operation. The ESR and CRP of the three groups before modeling and before surgery were not statistically different ($P>0.05$); the ESR and CRP of the three groups before surgery were significantly higher than before modeling ($P<0.01$). The ESR and CRP of the three groups were significantly higher at 1d after operation, and the CRP peaked at 3d, the ESR peaked at 7d, and then gradually decreased. In group A, the CRP decreased to the pre-model level at 56d after surgery, and the ESR decreased to the pre-model level at 84d; in groups B and C, the CRP and ESR were still significantly higher than the pre-model level at 112d ($P<0.05$). The ESR and CRP in group A at 7d, 56d, 84d, and 112d after operation were lower than those at the same time in groups B and C ($P>0.05$), and there was no significant difference between groups B and C at the same time ($P>0.05$). There was no statistically significant difference in liver and kidney function indexes between the three groups before operation and 14d, 28d, and 56d ($P>0.05$); of all three groups, the liver and kidney function indexes at 14d, 28d, and 56d after operation were with no statistical difference comparing with those before operation. At 28d after surgery, there were no organic changes and signs of tissue damage in the heart, liver, spleen, spinal cord and kidney tissues of group A. At 56d after surgery, the bone graft fusion in group A was better than that in groups B and C ($P<0.05$), and the area of bone-material interface histopathological sections of group A was significantly bigger than that of groups B and C ($P<0.01$).

Conclusions: HRZ slow-release coating had excellent anti-tuberculosis performance and tissue compatibility.

[Key words] Spinal tuberculosis; Anti-tuberculosis drug sustained-release coating; Isoniazid; Rifampicin; Pyrazinamide; Bone repair

[Author's address] Department of Orthopedics, the First People's Hospital of Yinchuan, Yinchuan, 750001, China

近年来, 全球结核病发病率和死亡率呈上升趋势, 耐药结核菌株的产生也使其治疗变得更加复杂。脊柱结核(spinal tuberculosis)作为最常见的肺外结核, 正面临着疗程长、疗效差、耐多药结核(MDR-TB)增多、再手术率高以及患者致残致贫率高的困境^[1]。传统外科治疗脊柱结核的策略是彻底清除病灶、修复重建骨缺损以及贯穿始终的抗结核药物治疗, 其中抗结核药物治疗是基础, 手术是关键。在影响疗效、疗程的诸多因素中, 抗结核药物治疗失败与感染病灶的修复重建不良是最为突出的两个问题^[2-4]。基于此, 本课题组前期利用聚乳酸-羟基乙酸共聚物(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)成功制备出 HRZ 缓释涂层, 其体内释药性能满意^[5,6]。但该材料抗结核性能及组织相容性尚需进一步评估。为此, 本研究构建兔脊柱结核模型观察其抗结核性能及组织相容性。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

PLGA(济南岱罡生物工程有限公司); H、R、Z 标准对照品(中国药品技术监督检验所); 乙腈(美国 Fisher 公司); 兔血清 C 反应蛋白(CRP)ELISA 酶免试剂盒(江苏镇江厚普生物科技有限公司); CR 数字 X 线摄影机(中国东大阿尔派公司); RM2245 型超薄切片机、DFC295 型显微镜(德国 Leica 公司)。

1.2 脊柱结核模型建立

选择体重为 $3.00\pm 0.25\text{kg}$ 的新西兰大白兔, 经皮内注射弗氏完全佐剂 0.1ml 免疫预处理。参照 Geng 等^[7]和 Liu 等^[8]的方法构建新西兰兔 L4/5 脊柱结核模型。饲养 2 个月通过 X 线片观察, 符合椎体骨质破坏、椎间隙变窄、后凸畸形等表现者视为成功的模型, 并通过 CT 观察排除合并内脏器官结核的实验兔。

1.3 HRZ 缓释涂层材料的制备

按体外实验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), 避光准确称取 R 25mg 和 PLGA 500mg 溶于 10ml 二氯甲烷中, 在常温下超声振荡使其完全溶解; 再准确称取 H 25mg 溶于 5ml 超纯水中; 将上述两种溶液在 37℃ 下置于涡旋仪上混合均匀; 将 Z 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。按上述方法制备空白涂层(图 1)。钴 60- γ 射线辐射消毒, 无菌封装, 避光保存备用。

1.4 分组及脊柱结核手术方法

选取构建成功的新西兰兔脊柱结核模型 60 只, 随机分为 A、B、C 三组, 每 20 只。耳缘静脉注射给药麻醉(3%戊巴比妥钠; 30mg/kg)后经左侧横突腹侧入路显露 L4/5 结核病灶, 按相同标准予以彻底病灶清除术(切除病灶、亚正常骨及椎间盘), 用磨钻处理骨缺损(7.0×4.0×4.0mm)。同切口同侧髂骨上取皮质骨骼骨块(2.5×2.5×7mm)备用。A 组(实验组)行病灶清除术后植入包裹 HRZ 缓释涂层的自体髂骨(材料剂量: 300mg/kg; 若有剩余则置于病灶旁); B 组(对照组)行病灶清除术后植入包裹空白涂层的自体髂骨; C 组(空白对照组)行病灶清除术后单纯植入自体髂骨。植入骨修复材料后用明胶海绵覆盖压迫止血, 逐层缝合。无菌敷料缝合固定。术后第 1 天进食水。定期换药。

1.5 观察指标

术后观察实验兔一般状况、伤口局部情况及截瘫情况; 造模前 1d, 病灶清除术前及术后 1d、3d、7d、14d、28d、56d、84d、112d 采集所有动物的耳缘静脉血, 测定血沉(ESR)和 C 反应蛋白(CRP); 术后 14d、28d、56d、84d 时进行肝肾功能检测(ALT、AST、Cr 及 BUN 值)。术后 28d 随机抽

取 A 组中 5 只实验兔处死, 切取心脏、肝脏、脊髓、脾脏及肾脏组织制作病理切片, 观察组织损伤情况。术后 56d 在麻醉下行 X 线片检查观察植骨融合情况。参照 Bridwell 骨愈合标准^[9]对植骨愈合进行评价(1 级, 骨块融合重塑完全, 骨小梁存在; 2 级, 骨块完整, 骨块重塑不完全, 无透亮区; 3 级, 骨块完整, 上方或下方有透亮区; 4 级, 骨块塌陷、吸收)。并随机抽取三组中各 5 只实验兔处死, 植骨部位局部取材, 用 10%中性福尔马林水溶液充分固定后, 将骨-材料界面组织制成 15×15×3~5mm 标本, 然后充分浸泡在 EDTA 脱钙液中, 4℃ 条件保存并脱钙。脱钙后常规脱水、浸蜡、包埋、切片、HE 染色等处理, 进行骨-材料界面组织病理学观察植骨愈合情况。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。计量资料结果以均数±标准差表示。两样本计量资料比较采用 *t* 检验; 多组样本均数比较采用单因素方差分析, 多重比较方差齐时采用 SNK 法和 LSD-*t* 检验, 方差不齐时采用 Tamhane's 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物一般状况

B 组 1 只兔切口感染, 换药未愈, 予以补充; C 组 1 只兔死亡、1 只兔截瘫, 予以补充。其余兔术后一般状况良好。

2.2 ESR

三组动物各时间点的 ESR 见表 1。造模前三组组间均无统计学差异(P>0.05); 三组手术前均较造模前显著性升高(P<0.01); 三组手术前比较无统计学差异(P>0.05)。三组术后 1d 时均较术前显著性升高, 各组均在 7d 时达到高峰, 此后逐渐下

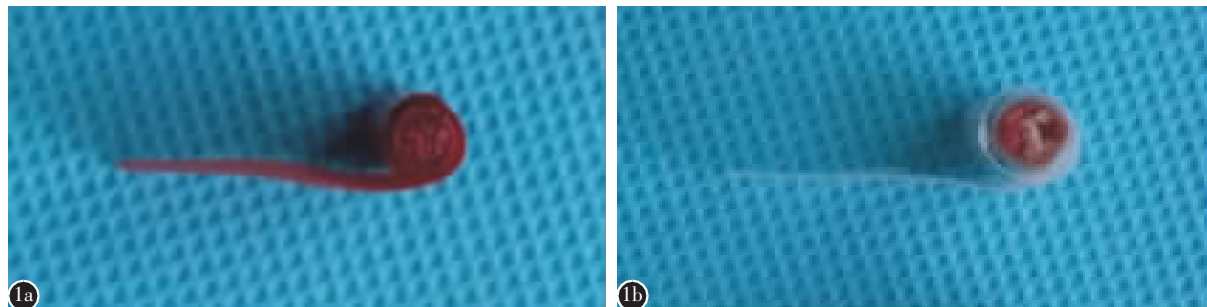


图 1 材料制备 a HRZ 缓释涂层 b 空白涂层

Figure 1 Preparation of materials a HRZ slow release coating b Blank coating

降;A 组至术后 84d 时降至造模前水平 ($P<0.05$), B 组至术后 56d 时降至相对稳定水平 ($P<0.05$), 但术后 56d、84d、112d 时的 ESR 水平高于造模前水平 ($P<0.05$), C 组变化规律与 B 组相似。A 组术后 7d、56d、84d 及 112d 的 ESR 均低于同时间点 B、C 两组的水平 ($P<0.05$)。

2.3 CRP

三组各时间点的 CRP 见表 2。三组造模前无统计学差异 ($P>0.05$);三组手术前均较造模前显著性升高 ($P<0.01$);三组手术前无统计学差异 ($P>0.05$);三组术后 1d 时均较手术前升高,各组均在术后 3d 时达到高峰,此后随时间推移逐渐下降;A 组至术后 56d 时降至正常时水平, B 组至术后

28d 时降至相对稳定水平 ($P<0.05$), 但在术后 28d、56d、84d、112d 时仍高于造模前水平 ($P<0.05$), C 组变化规律与 B 组相似。术后 7d、28d、56d、84d 及 112d 时 A 组均低于同时间点 B、C 两组 ($P<0.05$)。

2.4 肝肾功能

三组各时间点的肝肾功能指标见表 3。三组术前无统计学差异 ($P>0.05$);三组术后 14d、28d、56d 时与术前比较均无统计学差异 ($P>0.05$);三组术后 14d、28d、56d 时比较亦无统计学差异 ($P>0.05$)。

2.5 影像学观察

术后 56d 时 X 线片观察, A 组骨缺损处有大

表 1 三组中各检测时间点的 ESR 值比较 ($\bar{x}\pm s$, mm/h)
Table 1 Comparison of ESR values at each test point in three groups

	A组 Group A	B组 Group B	C组 Group C	P值 P value
造模前 Before molding	1.55±0.51	1.50±0.51	1.60±0.50	0.825
手术前 Preoperation	10.90±1.51 ^①	11.00±2.05 ^①	10.55±1.43 ^①	0.678
手术后 Postoperation				
1d	11.95±1.23 ^①	12.40±1.27 ^{①②}	12.55±1.19 ^{①②}	0.285
3d	13.15±1.13 ^①	14.50±1.87 ^{①②}	14.30±1.30 ^{①②}	0.011
7d	15.05±1.60 ^①	17.5±1.43 ^{①②}	16.1±1.86 ^{①②}	0.000
14d	12.70±2.75 ^①	14.30±1.92 ^{①②}	13.50±1.35 ^{①②}	0.062
28d	8.26±1.57 ^①	11.60±2.94 ^{①②}	10.13±2.67 ^{①②}	0.001
56d	2.20±1.22 ^①	7.60±3.89 ^{①②}	7.40±4.57 ^{①②}	0.003
84d	1.40±0.54	7.20±3.11 ^{①②}	6.40±2.70 ^{①②}	0.005
112d	1.20±0.44	6.20±2.58 ^{①②}	5.60±2.30 ^{①②}	0.004

注:①与造模前比较 $P<0.05$;②与 A 组同时间点比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with before molding, $P<0.05$; ②Compared with group A at the same time, $P<0.05$

表 2 三组中各检测时间点的 CRP 值比较 ($\bar{x}\pm s$, $\mu\text{g/L}$)
Table 2 Comparison of CRP values at each test point in three groups

	A组 Group A	B组 Group B	C组 Group C	P值 P value
造模前 Before molding	520.60±136.88	474.35±112.62	460.20±113.08	0.266
术前 Preoperation	7661.80±966.27 ^①	7807.25±897.31 ^①	7141.05±1329.90 ^①	0.132
术后 Postoperation				
1d	16527.10±1606.26 ^{①②}	17351.60±1326.48 ^{①②③}	16457.20±1346.04 ^{①②}	0.099
3d	21281.20±2573.12 ^{①②}	24633.90±3468.32 ^{①②③}	23434.20±3068.02 ^{①②③}	0.004
7d	12102.60±1953.47 ^{①②}	13565.20±2710.42 ^{①②③}	12262.80±2720.30 ^{①②③}	0.134
14d	5657.00±1407.46 ^①	8903.25±3827.70 ^{①③}	8262.95±3066.81 ^{①③}	0.002
28d	1182.73±421.26 ^{①②}	5481.93±4051.79 ^③	4321.73±3225.15 ^{②③}	0.001
56d	632.20±173.51 ^②	5151.20±3889.43 ^{②③}	4990.20±3783.81 ^{②③}	0.004
84d	501.00±93.08 ^②	4275.60±2102.78 ^{②③}	4038.40±1729.05 ^{②③}	0.005
112d	524.40±117.26 ^②	3292.20±1573.81 ^{②③}	3391.40±1618.20 ^{②③}	0.007

注:①与造模前比较 $P<0.05$;②与 A 组同时间点比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with before molding, $P<0.05$; ②Compared with group A at the same time, $P<0.05$

量骨痂包绕,骨-材料界面新生骨组织桥接形成,骨-材料界面模糊,有纵向骨痂通过;B组及C组骨缺损处部分骨痂包绕,植骨区结构不清,椎间骨桥形成差,透亮区明显(图2)。A组植骨融合率为100%,B组及C组均为10%,与A组比较差异有显著性($P<0.01$)。

2.6 病理学观察

术后28d,A组心脏、肝脏、脾脏、脊髓及肾脏

组织病理切片观察未见器质性改变及组织损伤征象(图3)。术后56d,A组植入材料在新生骨的包绕内降解成颗粒状或散在岛状,材料表面可见增生的淋巴细胞以及成骨细胞,线粒体功能活跃,可见哈弗管及新生血管;B组及C组成骨细胞增生欠活跃(图4)。对三组骨-材料界面组织病理切片行骨小梁面积的定量分析,术后56d时,A组骨小梁面积(13486.53 ± 907.25)显著高于B组

表3 三组术前、术后肝肾功能指标比较

($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of indexes of liver and kidney functions before and after operation in three groups

		A组 Group A	B组 Group B	C组 Group C	P值 P value
ALT(IU/L)	术前 Pre-op	43.37±9.28	46.87±7.89	45.25±8.62	0.877
	术后 Post-op 14d	49.50±9.38	48.25±8.98	45.50±8.63	0.546
	28d	41.25±12.79	47.62±8.877	46.00±11.36	0.504
	56d	47.62±9.97	45.00±8.26	43.62±11.73	0.513
AST(IU/L)	术前 Pre-op	46.75±6.20	46.62±6.04	46.87±5.89	0.997
	术后 Post-op 14d	45.25±4.09	46.50±5.20	47.58±6.18	0.694
	28d	46.12±5.40	48.62±5.80	45.00±5.68	0.435
	56d	45.87±4.99	49.87±5.51	44.75±6.04	0.175
BUN(mmol/L)	术前 Pre-op	6.96±1.40	6.15±1.62	7.12±1.43	0.720
	术后 Post-op 14d	7.36±1.64	7.51±1.74	7.70±1.78	0.271
	28d	6.96±1.57	7.07±1.50	6.60±1.67	0.263
	56d	6.93±1.86	6.90±1.62	6.88±1.66	0.990
Cr(μmol/L)	术前 Pre-op	112.50±17.57	119.62±14.38	119.37±15.07	0.412
	术后 Post-op 14d	119.62±17.50	115.25±15.37	119.50±16.10	0.726
	28d	118.00±17.17	116.25±16.87	128.00±17.99	0.291
	56d	114.12±18.17	124.75±16.48	117.75±13.60	0.753

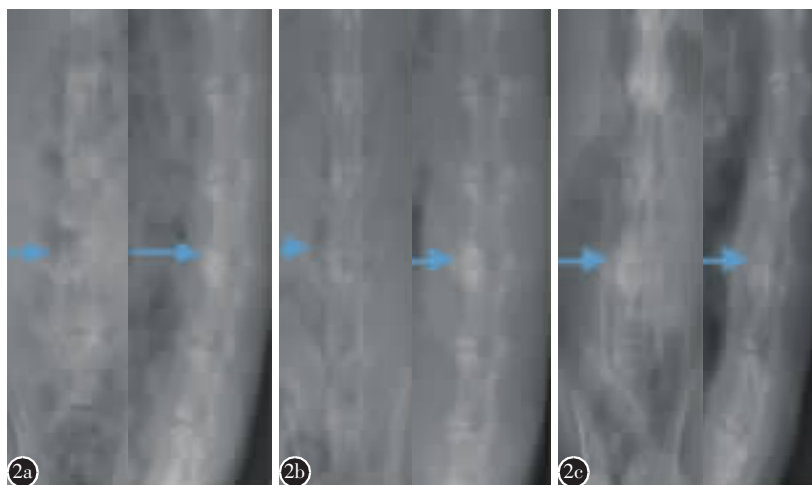


图2 术后56d各组X线检查结果 a A组骨-材料界面模糊,有纵向骨痂通过 b B组椎间骨桥形成差,透亮区明显 c C组椎间骨桥形成差,透亮区明显

Figure 2 X-ray images at 56 days after operation **a** Group A, the bone material interface is fuzzy, with longitudinal callus passing through **b** Group B, the formation of intervertebral bone bridge is poor, and the transparent area is obvious **c** Group C, the formation of intervertebral bone bridge is poor, and the transparent area is obvious

(8488.30±587.74) 及 C 组 (9047.96±1003.59) ($P<0.01$)。

3 讨论

局部药物缓控释系统是为了解决普通剂型给药疗效不高、副作用较大这一缺陷的新型给药途径^[10]。针对脊柱结核病灶清除术后局部药物浓度过低以及病灶修复不良的问题,本研究团队前期按经体外实验优化的参数成功制备出抗结核药物 HRZ 缓释涂层,将其包裹于脊柱结核模型兔自体髂骨表面,植入脊柱结核病灶清除后的骨缺损部位,以期达到局部药物持续高效缓释与植骨快速

愈合的作用^[11]。

脊柱结核病灶清除术无法彻底清除结核杆菌,抗结核药物全身给药外周高浓度仍难以确保靶组织的有效药物浓度和作用时间,使得结核病灶局部药物浓度常常达不到有效杀菌浓度和作用时间,同时术后骨缺损的治疗也存在修复重建不良的情况^[12,13]。抗结核组织工程骨不但能修复骨缺损,还能靶向作用于感染灶中残留的致病菌,对导致骨缺损的原发性疾病进行治疗,为解决脊柱结核病灶清除术后骨缺损修复难、易复发的问题提供了新的途径。尽管已有多位学者的相关研究取得了可喜的成果^[14-16],但复杂的制备工艺难以

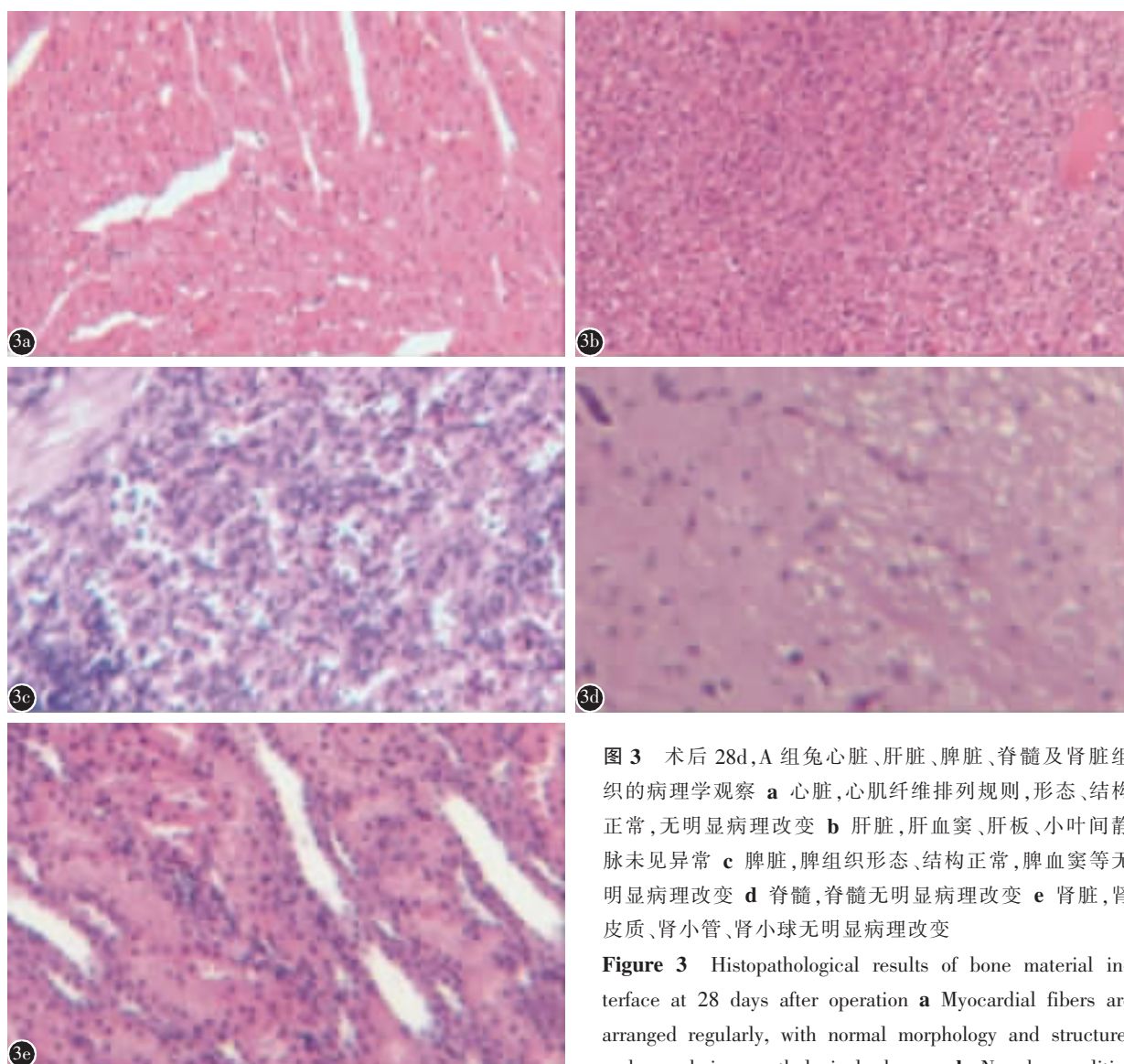


图 3 术后 28d, A 组兔心脏、肝脏、脾脏、脊髓及肾脏组织的病理学观察 a 心脏,心肌纤维排列规则,形态、结构正常,无明显病理改变 b 肝脏,肝血窦、肝板、小叶间静脉未见异常 c 脾脏,脾组织形态、结构正常,脾血窦等无明显病理改变 d 脊髓,脊髓无明显病理改变 e 肾脏,肾皮质、肾小管、肾小球无明显病理改变

Figure 3 Histopathological results of bone material interface at 28 days after operation a Myocardial fibers are arranged regularly, with normal morphology and structure, and no obvious pathological changes b No abnormalities

in hepatic sinusoids, liver plate, and interlobular vein c The shape and structure of the spleen are normal, and there are no obvious pathological changes such as splenic blood sinus d No obvious pathological changes in the spinal cord e No obvious pathological changes in renal cortex, renal tubules and glomeruli

保证搭载药物的理想活性和释药特性,降解速度与整合速度难以匹配,且局部药物缓控释系统的药物载体人工骨存在成骨与修复作用较差、支撑强度弱及排斥反应导致不愈合等致命弱点。PLGA 是人工合成的理想高分子药物载体材料,是由聚乳酸和羟基乙酸两种单体随机聚合而成的可降解高分子有机化合物,具有一定的机械强度和成形性能,生物相容性良好^[17,18]。H、R、P 是 WHO 推荐的结核病化疗方案中的一线主药,口服生物利用度仅 30%~50%^[19-22]。本研究应用 HRZ 缓释涂层包裹支撑成骨性能优良的自体髂骨植骨,使其在修复病灶的同时能高效抗结核,从而治愈病灶。

在脊柱结核患者的实验室检查中,ESR 和 CRP 是最常用的检查指标。ESR 反映血浆中纤维蛋白原和免疫球蛋白的水平,其含量越高 ESR 越快,其升高最常见于机体发生炎性改变时,当机体的炎症逐渐好转时,其数值会出现相应的变化,直至正常。CRP 是由肝细胞合成的非特异性急性时相蛋白,能够结合并识别细菌的细胞膜,增强炎症细胞活性,促进其对细菌的反应,其在机体炎性改变时反应非常灵敏,一旦感染或手术源性损伤后 CRP 迅速升高,而当感染得到控制或创伤因素消失后 CRP 又会较快下降。本团队前期在兔脊柱结核模型的构建研究中证实 ESR 及 CRP 可反映结

核模型兔体内结核菌感染情况及病情进展^[23]。在本研究中,我们观察了术后 56d 兔脊柱 X 线片及骨-材料界面组织病理学切片,发现 A 组植骨融合情况优于 B 组及 C 组。我们进一步通过观察 ESR 和 CRP 的变化,间接评估其抗结核性能。研究证实,随着时间推移,A 组的 ESR 及 CRP 逐渐恢复到正常水平,而 B、C 两组的 ESR 及 CRP 仍保持在高于正常的较高水平,说明包裹 HRZ 缓释涂层的自体髂骨可杀灭病灶内残留的结核杆菌,终止其骨破坏进展,抑制其炎症损伤及细胞毒性作用,从而促使机体血液炎性指标下降,间接促进植骨愈合。

PLGA 是人工合成的可降解的高分子药物载体材料,降解产物为乳酸和羟基乙酸,可参与人体的新陈代谢,最终形成二氧化碳和水被排出体外,因此是理想的绿色高分子材料。在本研究中,术前以及术后 14d、28d、56d 进行肝肾功能检测,三组术前和术后 14d、28d、56d 的肝、肾功能指标均无统计学差异,三组术后 14d、28d、56d 的肝、肾功能指标功能指标与术前比较亦无统计学差异;术后 28d,A 组心脏、肝脏、脾脏、脊髓及肾脏组织病理观察未见器质性改变及组织损伤征象。表明包裹 HRZ 缓释涂层的自体髂骨植入兔脊柱结核骨缺损后可促进局部骨缺损的修复和病灶的治愈时,

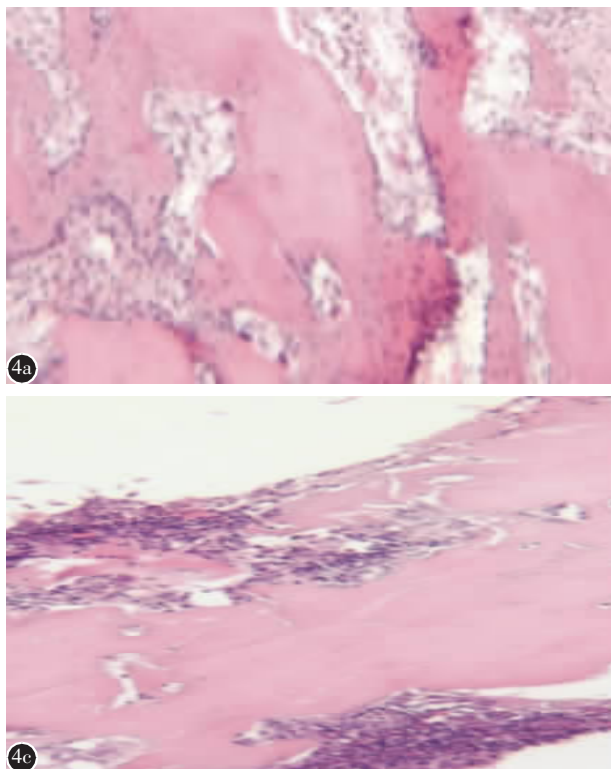


图 4 术后 56d 各组骨-材料界面组织病理学结果 a A 组可见增生的淋巴细胞以及成骨细胞,线粒体功能活跃,可见哈弗管及新生血管 b B 组成骨细胞增生欠活跃 c C 组成骨细胞增生欠活跃

Figure 4 Histopathological results of bone material interface at 56 days after operation a The proliferation of lymphocytes, osteoblasts, mitochondria, Haversian and neovascularization can be seen in group A b The proliferation of osteoblasts is not active in group B c The proliferation of osteoblasts is not active in group C

对外周脏器无明显组织毒性, 是一种良好的局部抗结核缓释材料。

综上所述, HRZ 缓释涂层具有优良的抗结核性能和组织相容性。但本研究实验动物的样本量较少, 观察时间短, 观察指标有限, 该材料对结核病灶的长期控制效果以及远期并发症未知。我们将在后续的实验增加样本量, 对相关参数进行进一步研究。

4 参考文献

- Johansen IS, Nielsen SL, Hove M, et al. Characteristics and clinical outcome of bone and joint tuberculosis from 1994 to 2011: a retrospective register-based study in denmark[J]. Clin Infect Dis, 2015, 61(4): 554-562.
- Wang ZL, Shi JD, Geng GQ, et al. Ultra-short-course chemotherapy for spinal tuberculosis: five years of observation [J]. Eur Spine J, 2013, 22(2): 274-281.
- 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.
- Ferguson J, Dudareva M, Riley N, et al. The use of a biodegradable antibiotic-loaded calcium sulphate carrier containing tobramycin for the treatment of chronic osteomyelitis a series of 195 cases[J]. Bone Joint J, 2014, 96(6): 829-836.
- 杨宗强, 吴龙云, 施建党, 等. 不同比例三联抗结核药物复合缓释材料的释药性能观察[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2017, 27(12): 1099-1106.
- 岳学锋, 张俊, 施建党, 等. 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 [J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2016, 26(6): 537-544.
- 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.
- Liu X, Jia W, Wang H, et al. Establishment of a rabbit model of spinal tuberculosis using Mycobacterium tuberculosis strain H37Rv[J]. Jpn J Infect Dis, 2015, 68(2): 89-97.
- Bridwell KH, Lenke LG, Mcenery KW, et al. Anterior fresh frozen structural allografts in the thoracic and lumbar spine: do they work if combined with posterior fusion and instrumentation in adult patients with kyphosis or anterior column defects[J]. Spine(Phila Pa 1976), 1995, 20(12): 1410-1418.
- Montazeri N, Jahandideh R, Biazar E. Synthesis of fluorapatite-hydroxyapatite nanoparticles and toxicity investigations [J]. Int J Nanomedicine, 2011, 6(1): 197-201.
- 何进文, 岳学锋, 施建党, 等. 载 HRZ 乙酞乙酸涂层的自体髂骨修复兔脊柱结核骨缺损的病理学观察[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2018, 28(6): 552-561.
- 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.
- 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.
- Zhu M, Wang HX, Liu JY, et al. A mesoporous silica nanoparticle/ β -TCP/BG composite drug delivery system for osteoarticular tuberculosis therapy[J]. Biomaterials, 2011, 32(7): 1986-1995.
- Yun HS, Kim SE, Hyun YT, et al. Three-dimensional mesoporous giantporous inorganic/organic composite scaffolds for tissue engineering[J]. Chem Mater, 2007, 19(26): 6363-6366.
- Dadsetan M, Guda T, Runge MB, et al. Effect of calcium phosphate coating and rhBMP-2 on bone regeneration in rabbit calvaria using poly (propylene fumarate) scaffolds [J]. Acta Biomater, 2015, 18(5): 9-20.
- 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 Surf B Biointerfaces, 2013, 103: 209-216.
- 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.
- Gumbo T, Louie A, Deziel MR, et al. Concentration-dependent Mycobacterium tuberculosis killing and prevention of resistance by rifampin [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(11): 3781-3788.
- 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.
- 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]. Cytotherapy, 2013, 15(5): 571-577.
- Feuerriegel S, Oberhauser B, George AG, 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(1): 1-10.
- 岳学锋, 王鹏, 施建党, 等. ESR 及 CRP 在兔脊柱结核模型构建中的变化规律研究[J]. 安徽医科大学学报, 2017, 52(6): 833-839.

(收稿日期: 2019-10-24 末次修回日期: 2020-04-25)

(英文编审 谭 啸)

(本文编辑 卢庆霞)