

基础研究

抗结核药缓释涂层在兔脊柱结核模型体内的
释药性能及组织分布研究岳学锋¹, 吴龙云², 焦文勇¹, 施建党²

[1 银川市第一人民医院(宁夏医科大学第二附属医院)骨科 750001 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:观察抗结核药缓释涂层在兔脊柱结核模型体内的释药性能及组织分布特性。**方法:**选取新西兰大白兔(雌雄不限)体重 $3.00\pm 0.25\text{kg}$,通过椎体钻孔、浸注结核杆菌法构建并筛选脊柱结核模型 120 只,按“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,将模型分为 4 组,每组各 30 只:A 组,缓释材料组,病灶局部置入缓释抗结核药缓释涂层(300mg/kg)+自体髂骨;B 组,局部给药组,病灶局部置入 HRZ 药物晶体(H, 12.5mg/kg ;R, 12.5mg/kg ;Z, 25.0mg/kg);C 组,灌喂给药组,每日固定时间灌喂给药(H, 12.5mg/kg/d ;R, 12.5mg/kg/d ;Z, 25.0mg/kg/d);D 组,假手术灌药组,每天固定时间给药(剂量:H, 12.5mg/kg/d ;R, 12.5mg/kg/d ;Z, 25.0mg/kg/d)。四组单次给药剂量相同,其中 A、B 两组单次给药,C、D 两组研究期间连续多次给药。采用高效液相色谱法测定给药后(7d、14d、28d、84d)各组静脉血、腰大肌以及骨组织(病灶椎体)中 H、R 及 Z 的药物浓度,绘制药物浓度-时间曲线,观察其释药性能及组织分布特性。**结果:**4 组单次给药剂量相同,A、B 两组 HRZ 各药的给药总剂量均显著小于 C、D 两组($P<0.01$)。A 组术后(7d、14d、28d、84d)腰大肌及骨组织中 H、R 及 Z 的药物浓度均显著高于 C、D 两组($P<0.01$)。A 组术后(7d、14d、28d、84d)静脉血中 H、R 及 Z 药物浓度均极低或检测不到($P>0.05$)。A 组在腰大肌及骨组织中的药物浓度-时间曲线平缓,无突释现象出现。A 组腰大肌 H($14.22\pm 1.07\mu\text{g/ml}$)、R($12.66\pm 1.12\mu\text{g/ml}$)、Z($28.93\pm 1.30\mu\text{g/ml}$)的浓度和骨组织中 H($12.46\pm 0.29\mu\text{g/ml}$)、R($10.34\pm 0.32\mu\text{g/ml}$)及 Z($26.21\pm 0.82\mu\text{g/ml}$)的浓度在给药后第 7d 时最高,至给药后第 84d 时 H、R 及 Z 的浓度降至最低,此时病灶骨组织中 H($6.69\pm 1.42\mu\text{g/ml}$)、R($6.28\pm 0.77\mu\text{g/ml}$)及 Z($19.88\pm 0.90\mu\text{g/ml}$)的浓度在各检测时间点均 ≥ 10 倍的最低抑菌浓度。B 组术后 7d 时腰大肌 H($8.19\pm 1.98\mu\text{g/ml}$)、R($16.87\pm 3.03\mu\text{g/ml}$)、Z($91.18\pm 11.12\mu\text{g/ml}$)及骨组织 H($5.70\pm 1.25\mu\text{g/ml}$)、R($13.06\pm 1.26\mu\text{g/ml}$)、Z($79.00\pm 8.68\mu\text{g/ml}$)中的药物浓度较高,此后急剧下降,至术后 28d 时腰大肌及骨组织中已检测不到药物(H、R 及 Z)浓度。B 组静脉血中的药物(H、R 及 Z)浓度极低或检测不到。C、D 两组静脉血、腰大肌及骨组织在各检测时间点均可测得药物(H、R 及 Z)浓度。C 组及 D 组骨组织中药物(H、R 及 Z)的浓度均维持在相对平稳的较低水平。**结论:**缓释 HRZ 材料在兔脊柱结核病灶局部释药性能满意,组织分布特征为病灶局部高药物浓度而外周低药物浓度。

【关键词】 脊柱结核;释药性能;组织分布;异烟肼;利福平;吡嗪酰胺

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2021.06.10

中图分类号:R529.2,R978.3 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2021)-06-0549-07

Study on tissue distribution of HRZ coating material of sustained-release anti-tuberculosis drug in rabbit spinal tuberculosis model/YUE Xuefeng, WU Longyun, JIAO Wenyong, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2021, 31(6): 549-555

【Abstract】 Objectives: To observe the drug release and tissue distribution characteristics of anti-tuberculosis drug's sustained-release coating in rabbit spinal tuberculosis model. **Methods:** New Zealand white rabbits of

基金项目:宁夏自然科学基金项目(2020AAC03490);宁夏医科大学科学研究基金项目(XM2019154);国家自然科学基金项目(81360275;81760399)

第一作者简介:男(1984-)硕士研究生,研究方向:脊柱外科

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

共同第一作者:吴龙云 E-mail:wu_longyun@163.com

通讯作者:施建党 E-mail:shi_jiandang@163.com

either sex weighing $3.00\pm 0.25\text{kg}$ were selected. A total of 120 spinal tuberculosis models were constructed and screened by vertebral body drilling and infusion of *Mycobacterium tuberculosis*. According to different drug delivery dosage forms and ways of the "isoniazid (INH, H), rifampicin (RFP, R), and pyrazinamide (PZA, Z)", the rabbit model of spinal tuberculosis were randomly divided into four groups of 30 rabbits: group A, sustained-release material group, with local implantation of sustained-release of HRZ material (300mg/kg) + autogenous iliac bone; group B, local administration group, with local implantation of HRZ drug crystals (H, 12.5mg/kg ; R, 12.5mg/kg ; Z, 25.0mg/kg); group C, intragastrically fed group, fed intragastrically at fixed time daily (H, 12.5mg/kg/d ; R, 12.5mg/kg/d ; Z, 25.0mg/kg/d); group D, sham operation perfusion group, with daily fixed time perfusion (dose: H, 12.5mg/kg/d ; R, 12.5mg/kg/d ; Z, 25.0mg/kg/d). All groups were given the same dose in a single dose. Group A and B were given single dose, while group C and D were given multiple doses consecutively. Five rabbits were randomly selected from each group at each time point, and drug concentrations of H, R and Z in venous blood, psoas major muscle and bone tissue of each group were determined by high performance liquid chromatography after administration (7d, 14d, 28d and 84d). Drug concentration-time curves were drawn to observe drug release properties and tissue distribution characteristics. **Results:** The single dose of the four groups was the same, and the total dose of HRZ in groups A and B was significantly lower than that in groups C and D ($P<0.01$). The drug concentrations of H, R and Z in psoas major muscle and bone tissue in group A were significantly higher than those in groups C and D ($P<0.01$). In group A, the concentrations of H, R and Z in venous blood were very low or undetected ($P>0.05$). In group A, the drug-time curve in psoas major muscle and bone tissue was smooth without sudden release. In group A, the concentration of H ($14.22\pm 1.07\mu\text{g/ml}$), R ($12.66\pm 1.12\mu\text{g/ml}$), and Z ($28.93\pm 1.30\mu\text{g/ml}$) in psoas major muscle and bone tissue H ($12.46\pm 0.29\mu\text{g/ml}$), R ($10.34\pm 0.32\mu\text{g/ml}$), and Z ($26.21\pm 0.82\mu\text{g/ml}$) reached the highest on the 7th day after administration, and the lowest on the 84th day after administration. At this time, the concentrations of H ($6.69\pm 1.42\mu\text{g/ml}$), R ($6.28\pm 0.77\mu\text{g/ml}$), and Z ($19.88\pm 0.90\mu\text{g/ml}$) in the bone tissue of the lesion were more than 10 times of the minimum inhibitory concentration (MIC) at each detection time point. The drug concentrations in the psoas major muscle of H ($8.19\pm 1.98\mu\text{g/ml}$), R ($16.87\pm 3.03\mu\text{g/ml}$), and Z ($91.18\pm 11.12\mu\text{g/ml}$) and bone tissue of H ($5.70\pm 1.25\mu\text{g/ml}$), R ($13.06\pm 1.26\mu\text{g/ml}$), and Z ($79.00\pm 8.68\mu\text{g/ml}$) in group B were higher at 7d after surgery, and decreased sharply, which were undetectable in both psoas major muscle and bone tissue 28d after surgery. In group B, the concentration of drugs (H, R, and Z) in venous blood was very low or could not be detected. The concentration of drugs (H, R, and Z) in venous blood, psoas major muscle and bone tissue of C and D groups could be measured at each detection time point. The concentrations of drugs (H, R, and Z) in bone tissue of groups C and D were maintained at relatively stable and low levels. **Conclusions:** The sustained-release HRZ material has satisfactory local drug release performance in rabbit spinal tuberculosis lesions, and the tissue distribution characteristics are high local drug concentration and low peripheral drug concentration.

【Key words】 Spinal tuberculosis; Drug release; Tissue distribution; Isoniazid; Rifampicin; Pyrazinamide

【Author's address】 Department of Orthopedics, the First People's Hospital of Yinchuan, Yinchuan, 750001, China

外科治疗脊柱结核的传统策略为：长程联合用药抗结核治疗、彻底病灶清除以及对骨缺损进行修复重建，药物的临床疗效取决于病灶部位的药物浓度。然而，全身给药时，高外周药物浓度也难以确保靶组织的有效浓度和作用时间，且存在患者依从性差以及肝肾毒性的缺点^[1-5]。因此，临床迫切要一种能够实现靶组织给药、局部施治的骨修复材料，同时实现多种药物的持续释放和骨再生修复^[6]。基于以上问题，本研究采用高分子药

用材料聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (poly lactic-co-glycolic acid, 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)，制备出抗结核药缓释涂层材料，将其黏附于自体髂骨表面，使其兼具药物缓释与成骨性能^[7]。本研究观察了抗结核药缓释涂层在兔脊柱结核模型体内静脉血、腰大肌及骨组织（病椎）中的释药性能及组织分布特性，以期为新材料的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 研究材料

1.1.1 主要试剂与仪器 PLGA (分子量:95000 PLGA 90:10, 济南岱罡生物工程有限公司); RFP、INH、PZA 标准品 (中国药品技术监督检验所); PBS 磷酸盐缓冲液 (美国 Sigma 公司); 高效液相色谱仪 D-2000 (日立, 日本); 色谱柱 CN (250×4.6mm, 5μm, Waters 公司, 美国)

1.1.2 抗结核药缓释涂层的制备 按体外实验筛选的配比方案 (H:R:Z:PLGA=1:1:2:20)。按次序避光准确称取 RFP、INH、PZA 并借助二氯甲烷、超纯水等使其与 PLGA 混合分散均匀, 将上述溶液均匀喷涂于模具内冷冻干燥。所得材料 Co60 辐射消毒, 低温、避光保存备用 (图 1)。

1.1.3 兔脊柱结核动物模型的构建 本研究获得宁夏医科大学伦理委员会审批。实验动物为新西兰大白兔 (购自宁夏医科大学实验动物中心), 雌雄不限, 体重 3.00±0.25kg。参照耿广起^[8]的方法构建并筛选新西兰兔 L4/5 脊柱结核模型。

采用 3%戊巴比妥钠 (30mg/kg) 全身静脉麻醉。左侧腰部备皮后右侧卧位置于手术台上, 沿左侧第 12 肋末端向下至髂嵴作纵向切口, 切开皮肤及浅筋膜, 延肌间隙钝性分离显露横突。自横突尖部腹侧运用神经剥离子纵行分开, 显露 L4、L5 椎体和椎间盘前方。于 L5 椎体上部钻孔。骨孔道止血后填入明胶海绵并浸注 5.0mg/ml 结核菌悬液 0.1ml。最后用骨蜡封闭骨孔。丝线逐层间断关闭切口。造模术后 56d, 通过影像学检查筛选造模成功的实验兔备用。

1.2 实验步骤

1.2.1 实验动物的分组 按三联抗结核药 H、R、Z 给药剂型及途径不同, 将兔脊柱结核模型随机分为 4 组, 各 30 只, 其中: A 组 (缓释材料组); B 组 (局部给药组); C 组 (灌喂给药组); D 组 (假手术灌药组)。

通过耳缘静脉注射 3%戊巴比妥钠 (30mg/kg) 静脉麻醉, 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), 形成局部骨缺损, 同切口取自体髂骨置入骨缺损处。4 组分别接受如下处理: A 组, 将抗结核药缓释涂层黏附于自体髂骨表面, 置入病灶局部 (若有剩余则置于椎体旁, 给药剂量: HRZ/PLGA, 300mg/kg); B 组, 病灶局部置入 HRZ 药物晶体 (给药剂量: H, 12.5mg/kg; R, 12.5mg/kg; Z, 25.0mg/kg); C 组, 每日固定时间经口给药 (剂量: H, 12.5mg/kg/d; R, 12.5mg/kg/d; Z, 25.0mg/kg/d); D 组行假手术, 即仅显露病灶并每日固定时间灌喂给药 (剂量同 C 组)。A、B、C、D 四组单次给药剂量均相同, 其中: H 12.5mg/kg; R 12.5mg/kg; Z 25.0mg/kg。A、B 两组为单次给药; C、D 两组实验期间连续多次给药。

骨缺损处置入骨修复材料后用明胶海绵压迫, 逐层缝合关闭切口。术后伤口无菌敷料固定。术后第 2 天开始进食水。定期换药并观察伤口。

1.2.2 观察指标 (1) 观察实验兔精神、活动等一般状况以及伤口愈合情况。术后第 7d、14d、28d、84d 在灌喂给药后 120~130min 时像点留取兔静脉血标本备检, 随后各时间点各组随机抽取 5 只兔处死, 并切取病椎周围腰大肌 (间隔病椎 3cm) 及骨组织 (病椎) 标本待检。兔血离心后, 吸取

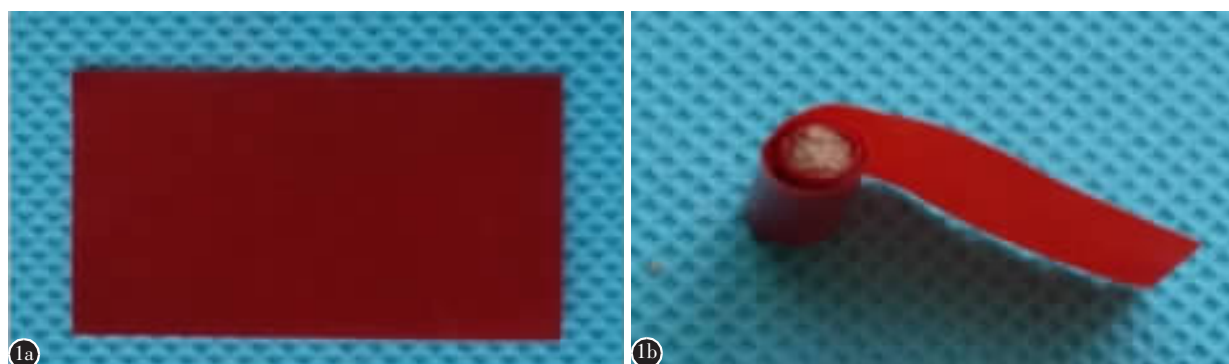


图 1 抗结核药缓释涂层及其黏附于自体髂骨表面状态 a 缓释 HRZ 材料 b 缓释 HRZ 材料与自体髂骨

Figure 1 Sustained release of HRZ material and its adhesion to the surface of autogenous iliac bone a Sustained release of HRZ materials b Sustained release of HRZ material and autogenous iliac bone

200 μ l 血浆,加入 600 μ l 乙腈,涡旋震荡 5min,12000rpm 离心 20min,取上清液 20 μ l 溶液,使用高效液相色谱检测各时间点血浆中 H、R 及 Z 的浓度。病椎及间隔病椎 3cm 腰大肌,拭血后精密称量,加生理盐水后匀浆,吸取 0.5ml 匀浆液,加入 1.5ml 甲醛并使用高速离心机离心,取上清液 20 μ l,使用高效液相色谱对各组织中 H、R 及 Z 的浓度进行检测。色谱条件:色谱 CN(250 $\times$ 4.6mm, 5 μ m);流动相为甲醇:乙腈=55:44,0.01mol/L 庚烷磺酸钠(pH 2.2),流动相流速 270nm;进样体积 20 μ l。

1.3 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 $\pm$ 标准差表示。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 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 实验兔一般状况

所有实验动物麻醉、手术过程均顺利。除 B 组 1 只兔出现切口感染,C 组 1 只兔死亡以及另一只兔截瘫外,其余兔术后一般状况良好,均及时补充。

2.2 各组同时间点的药物浓度

静脉血:A、B 两组术后各时间点(7d、14d、28d、84d)静脉血中 H、R 及 Z 的药物浓度极低或检测不到($P>0.05$)。C、D 两组同种药物同时间点浓度比较均无统计学差异($P>0.05$)。C、D 两组静脉血中药物(H、R 及 Z)浓度显著高于 A、B 两组(表 1, $P<0.01$)。

腰大肌:A 组术后各时间点(7d、14d、28d、84d)腰大肌中 H、R 及 Z 的药物浓度均高于 C、D 两组($P<0.01$)。B 组术后 7d 腰大肌中 H 的药物浓度低于 A 组,但高于 C、D 两组($P<0.01$)。B 组术后 7d 腰大肌中 R、Z 的药物均浓度高于 A、C、D 三组($P<0.01$)。B 组术后 14d 腰大肌中 Z 的药物浓度均高于 A、C、D 三组($P<0.01$)。B 组术后 14d、28d、84d 腰大肌中 H、R 的药物浓度以及术后 28d、84d 腰大肌中 Z 的药物浓度均检测不到,显著低于 A、C、D 三组(表 1, $P<0.01$)。

骨组织:A 组术后各时间点(7d、14d、28d、84d)骨组织中 H、R 及 Z 的药物浓度均高于 C、D

两组($P<0.01$)。B 组术后 7d 骨组织中 H 的药物浓度低于 A 组,但高于 C、D 两组($P<0.01$)。B 组术后 7d 骨组织中 R、Z 的药物浓度均高于 A、C、D 三组($P<0.01$)。B 组术后 14d、28d、84d 骨组织中的药物(H、R 及 Z)浓度均检测不到,显著低于 A、C、D 三组(表 1, $P<0.01$)。

2.3 药物浓度-时间曲线

A 组(缓释材料组):A 组静脉血中的药物浓度极低或检测不到。A 组在腰大肌及骨组织中的药物浓度-时间曲线平缓,无突释。A 组腰大肌及骨组织中药物浓度在给药第 7d 最高,至给药第 84d 时药物浓度降至最低,此时腰大肌及骨组织中的药物浓度在各检测时间点均 ≥ 10 倍的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。给药 84d 时骨组织中检测,A 组中的药物浓度分别为 C 组的 3.02 倍、1.70 倍及 2.97 倍($P<0.05$)。84d 时腰大肌中检测,A 组中 H、R 及 Z 的浓度分别为 C 组的 1.75 倍、1.41 倍及 2.47 倍($P<0.05$)。

B 组(局部给药组):B 组静脉血中的药物浓度极低或检测不到。B 组术后 7d 在腰大肌及骨组织中的药物浓度较高,此后急剧下降。B 组术后 28d 时病灶(骨组织、腰大肌)中已检测不到药物(H、R 及 Z)的浓度。

C 组(灌喂给药组)及 D 组(假手术灌药组):C、D 两组静脉血、腰大肌及骨组织在各检测时间点均可测得药物浓度,均维持在相对平稳但较低水平。其中,静脉血中药物浓度最高,腰大肌中次之,骨组织中最低(图 2)。

3 讨论

病灶局部药物浓度低及植骨材料缺乏是当前脊柱结核治疗的难题,人们迫切地希望能够寻找一种新的给药途径,以满足临床治疗的需要^[8]。本研究前期制备抗结核药缓释涂层,表明其在兔脊柱结核病灶局部释药性能满意,具备病灶高药物浓度而外周低药物浓度的特征,单次使用效果优于口服连续多次给药。

脊柱结核常规治疗方法是在标准化疗方案的基础上进行病灶清除术。然而,病灶清除术后形成的骨缺损是特殊的感染性骨缺损,需要通过植骨来填充缺损,并且长程多药联合抗结核治疗。传统口服给药途径存在生物利用度低、肝肾毒性以及

患者依从性差的缺点。术中局部放置药物很快就会被血液稀释或经过其他途径损失,易出现早期的局部药物高浓度以及快速衰减的现象。本研究将经体外优化参数所制备的抗结核药缓释涂层置入兔脊柱结核病灶局部,模拟局部用药环境,观察体内释药性能^[9]。结果表明,缓释材料组中 INH、

RFP、PZA 在不同组织的药物浓度-时间曲线平缓,表明抗结核药缓释涂层在兔脊柱结核病灶局部可实现 3 种药物浓度维持在一一定的平稳水平,实现局部缓慢持续释放,从而能提高疗效。研究同时发现,同时间点静脉血中 INH、RFP 及 PZA 各检测点极低或不能测到,表明抗结核药缓释涂层

表 1 各组同时时间点的药物浓度比较

Table 1 Comparison of drug concentrations in each group at the same time point

			3d	7d	14d	28d	56d	84d
静脉血 Venous blood	INH	A组/Group A	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		B组/Group B	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		C组/Group C	8.57±1.29	8.94±0.88	9.02±1.20	9.32±0.92	8.54±1.19	8.66±1.08
		D组/Group D	8.55±0.97	9.15±1.29	9.09±1.04	9.27±0.85	8.85±1.35	9.05±1.08
	RFP	A组/Group A	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		B组/Group B	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		C组/Group C	9.97±0.98	9.98±1.04	9.88±1.09	10.10±1.20	10.17±0.97	10.06±1.15
		D组/Group D	10.04±1.39	9.72±0.99	10.21±1.21	10.01±1.69	9.69±1.06	10.15±1.01
	PZA	A组/Group A	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		B组/Group B	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		C组/Group C	24.11±1.13	24.78±1.59	24.42±1.41	24.92±1.19	24.69±0.91	25.00±1.81
		D组/Group D	23.74±1.66	24.02±2.00	23.95±1.92	24.56±2.31	23.84±2.00	25.03±1.98
腰大肌 Psoas major	INH	A组/Group A	15.97±1.13 ^{①②}	14.22±1.07 ^{①②}	12.79±0.70 ^{①②}	11.88±1.49 ^{①②}	10.69±1.01 ^{①②}	8.13±1.02 ^{①②}
		B组/Group B	78.90±8.61	8.19±1.98	ND	ND	ND	ND
		C组/Group C	4.55±0.63	4.59±0.79	4.64±0.78	4.56±0.78	4.40±0.64	4.66±0.90
		D组/Group D	4.31±0.61	4.49±0.75	4.31±0.82	4.79±0.71	4.56±0.73	4.52±0.96
	RFP	A组/Group A	13.9±0.99 ^{①②}	12.66±1.12 ^{①②}	10.71±0.47 ^{①②}	9.8±0.82 ^{①②}	8.18±1.94 ^{①②}	7.23±1.03 ^{①②}
		B组/Group B	92.50±6.93	16.87±3.03	ND	ND	ND	ND
		C组/Group C	5.27±0.97	5.20±0.96	5.03±1.00	5.05±0.95	5.03±0.89	5.11±0.80
		D组/Group D	5.13±0.82	5.54±0.83	5.09±1.12	5.34±0.99	4.94±0.61	4.96±0.83
	PZA	A组/Group A	32.69±2.02 ^{①②}	28.93±1.30 ^{①②}	28.37±1.06 ^{①②}	26.33±0.78 ^{①②}	23.17±0.92 ^{①②}	23.38±2.89 ^{①②}
		B组/Group B	201.8±8.16	91.18±11.12	ND	ND	ND	ND
		C组/Group C	9.09±0.88	8.73±0.87	9.11±1.04	8.93±1.19	8.88±1.51	9.45±1.02
		D组/Group D	9.11±1.58	9.28±1.27	10.00±1.66	9.29±1.67	9.56±1.33	9.32±1.59
骨组织 Bone tissue	INH	A组/Group A	14.65±0.64 ^{①③}	12.46±0.29 ^{①③}	11.24±0.45 ^{①③}	9.62±0.23 ^{①③}	8.62±0.37 ^{①③}	6.69±1.42 ^{①③}
		B组/Group B	67.76±0.27 ^{②④}	5.70±1.25	ND	ND	ND	ND
		C组/Group C	3.18±0.14 ^⑤	3.38±0.39 ^⑤	3.32±0.32 ^⑤	3.16±0.19 ^⑤	3.23±0.39 ^⑤	3.21±0.32 ^⑤
		D组/Group D	3.26±0.43	3.31±0.18	3.20±0.31	3.22±0.19	3.26±0.25	3.24±0.33
	RFP	A组/Group A	11.69±0.71 ^{①③}	10.34±0.32 ^{①③}	9.37±0.29 ^{①③}	8.21±0.67 ^{①③}	6.88±0.54 ^{①③}	6.28±0.77 ^{①③}
		B组/Group B	78.86±4.41 ^{②④}	13.06±1.26	ND	ND	ND	ND
		C组/Group C	3.71±0.16 ^⑤	3.73±0.22 ^⑤	3.61±0.40 ^⑤	3.78±0.36 ^⑤	3.65±0.34 ^⑤	3.68±0.42 ^⑤
		D组/Group D	3.71±0.25	3.65±0.33	3.65±0.46	3.73±0.14	3.52±0.38	3.53±0.44
	PZA	A组/Group A	28.91±1.32 ^{①③}	26.21±0.82 ^{①③}	24.42±0.49 ^{①③}	23.06±0.66 ^{①③}	21.55±1.27 ^{①③}	19.88±0.90 ^{①③}
		B组/Group B	183.07±9.57 ^{②④}	79.00±8.68	ND	ND	ND	ND
		C组/Group C	6.51±0.47 ^⑤	6.41±0.27 ^⑤	6.80±0.27 ^⑤	6.66±0.24 ^⑤	7.01±0.40 ^⑤	6.88±0.25 ^⑤
		D组/Group D	5.90±0.37	6.41±0.50	6.50±0.49	6.45±0.48	6.49±0.45	6.39±0.45

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

Note: ①Compared with group C, $P<0.05$; ②Compared with group D, $P<0.01$; ③Compared with group B, $P<0.05$; ④Compared with group A, $P<0.01$; ⑤Compared with group D, $P>0.05$; ND, Not detected

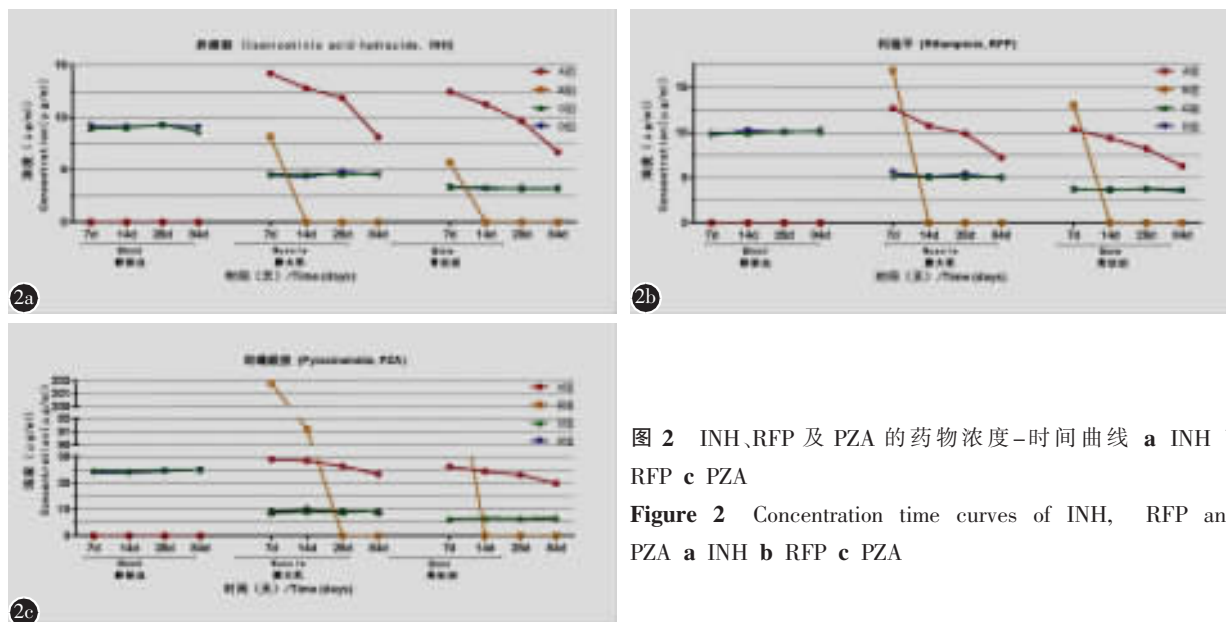


图 2 INH、RFP 及 PZA 的药物浓度-时间曲线 a INH b RFP c PZA

Figure 2 Concentration time curves of INH, RFP and PZA a INH b RFP c PZA

中三种药物被逐渐缓慢吸收并被逐渐排除,无明显体内蓄积,可满足治疗的需要。

抗结核药物治疗是脊柱结核治疗的基石^[10]。INH、RFP、PZA 是 WHO 推荐的抗结核治疗中最常用的一线主药^[11-14]。传统的口服给药方式,靶组织药物浓度不足及患者依从性差是脊柱结核治疗失败的主要原因^[2-5]。研究表明 INH、RFP、PZA 对结核菌的 MIC 分别为 0.05 μ g/ml、0.05 μ g/ml、20 μ g/ml,一般结核分枝杆菌最低杀菌浓度为最低抑菌浓度的 10 倍^[15,16]。本研究表明,抗结核药缓释涂层中 INH、RFP、PZA 在腰大肌及骨组织中均可维持高于 10 倍结核分枝杆菌最低抑菌浓度,直到术后第 8 周。本研究中,缓释材料组中各检测时间点病灶局部(骨组织及腰大肌)三种药物(H、R、Z)浓度均大于相应时间点口服给药组中的药物浓度,说明抗结核药缓释涂层可明显提高脊柱结核病灶的局部药物浓度,并能维持足够长的时间。

PLGA 是由聚乳酸和羟基乙酸 2 种单体聚合而成,为目前药物缓释系统的研究中最活跃的载体^[9,17-19]。自体髂骨是骨缺损修复移植材料的“金标准”,亦是目前临床上使用最多的植骨材料^[13]。目前利用 PLGA 搭载抗结核药物的研究主要以制备药物微囊并通过吸入、皮下埋植和注射给药等方式发挥作用,而通过成膜黏附研究相对较少。研究表明,局部缓释系统药物的释放与溶出或扩散机制密切相关,位于涂层表面的药物首先接触体液而被溶出,此后位于材料深层的药物逐渐释出,从而实现药物高效平缓释出^[20,21]。本材料利用

PLGA 搭载三联抗结核药 INH、RFP 以及 PZA,通过双乳、喷涂、冷冻干燥溶剂挥发法制备涂层,随着 PLGA 材料逐渐溶蚀,不断释放出药物。本研究结果表明,A 组腰大肌及骨组织中的药物浓度-时间曲线平缓,无突释现象。而 B 组存在明显突释,衰减较快。C 组及 D 组骨组织中药物(H、R 及 Z)浓度均维持在相对平稳但相对较低的水平。84d 检测时 A 组骨组织中的 H、R 及 Z 的浓度分别为 C 组的 3.02、1.70 及 2.97 倍。表明抗结核药缓释涂层释药性能满意。

综上所述,抗结核药缓释涂层在兔脊柱结核模型体内释药性能满意,可实现局部施治,具备病灶局部(骨组织、腰大肌)高药物浓度而外周低药物浓度的分布特征。

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: 197–201.
 7. 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.
 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. Khoei S, Rahmatollahzadeh 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: 416–427.
 10. 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.
 11. 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.
 12. 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.
 13. 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.
 14. 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: 90.
 15. Jutte PC, Rutgers SR, Van Altena 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.
 16. 陆宇, 王彬, 郑梅琴, 等. 应用 Alamar Blue 和 MTT 测定抗结核药物最低抑菌浓度的研究[J]. *中国防痨杂志*, 2007, 29(6): 499–501.
 17. 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: 209–216.
 18. 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.
 19. Chakravarthi SS, Robinson DH. Enhanced cellular association of paclitaxel delivered in chitosan-PLGA particles [J]. *Int J Pharm*, 2011, 409(1–2): 111–120.
 20. Janik H, Marzec M. A review: fabrication of porous polyurethane scaffolds[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2015, 48: 586–591.
 21. 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:2020-09-25 修回日期:2021-03-31)
(英文编审 庄乾宇/谭 啸)
(本文编辑 姜雅浩)

(上接第 548 页)

28. Salunke P, Sharma M, Sodhi HB, et al. Congenital atlantoaxial dislocation: a dynamic process and role of facets in irreducibility[J]. *J Neurosurg Spine*, 2011, 15(6): 678–685.
 29. Mick TJ. Congenital laxity of the transverse atlantal ligament producing atlanto-axial subluxation: a case report[J]. *J Can Chiropr Assoc*, 1988, 32(4): 187–190.
 30. 余新光, 尹一恒, 周定标, 等. 颅颈交界畸形寰枢侧方关节与寰枢稳定性的关系[J]. *中华神经外科杂志*, 2011, 27(10): 1029–1033.
 31. Salunke P, Sahoo SK, Futane S, et al. ‘Atlas shrugged’: congenital lateral angular irreducible atlantoaxial dislocation: a case series of complex variant and its management[J]. *Eur Spine J*, 2016, 25(4): 1098–1108.
 32. Menezes AH, Traynelis VC. Anatomy and biomechanics of normal craniovertebral junction(a) and biomechanics of stabilization (b)[J]. *Childs Nerv Syst*, 2008, 24(10): 1091–1100.
 33. Wang C, Yan M, Zhou HT, et al. Open reduction of irreducible atlantoaxial dislocation by transoral anterior atlantoaxial release and posterior internal fixation [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2006, 31(11): E306–313.
- (收稿日期:2020-12-16 末次修回日期:2021-04-08)
(英文编审 谭 啸)
(本文编辑 李伟霞)