

3D 打印载 PaMZ/BMP-2 的 nHA 抗结核人工骨体外缓释及抗结核性能研究

朱 禧^{1,2}, 唐学峰³, 施建党¹, 周占文², 谢 磊², 丁惠强¹

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

3 汕尾市人民医院外三科 516600 汕尾市)

【摘要】目的:观察 3D 打印的载普托马尼(Pretomanid, Pa)、莫西沙星(Moxifloxacin, M)、吡嗪酰胺(Pyrazinamide, Z)抗结核药物组合(PaMZ)和骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)的纳米羟基磷灰石(nano-Hydroxyapatite, nHA)抗结核人工骨在体外的缓释情况及抗结核性能。**方法:**取 3D 打印的载 PaMZ/BMP-2 的 nHA 抗结核人工骨和空白人工骨各 5 份, 分别浸泡于磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)中, 采用高效液相色谱法于 1d、3d、5d、7d、14d、28d、42d、56d、70d 和 84d 共 10 个时间点检测二者浸提液中药物浓度。用 84d 的浸提液制备改良罗氏培养基, 实验分为 3 组, 实验组(A 组)为含载 PaMZ 人工骨浸提液培养基, 阳性对照组(B 组)为含利福平培养基, 阴性对照组(C 组)为含空白人工骨浸提液培养基, 分别培养结核分枝杆菌 H37Rv 菌株和临床分离的利福平耐药结核菌株, 每组 20 个样本, 观察培养阳性率。取载 PaMZ 人工骨和空白人工骨各 50mg 分别装入 2 种结核菌液的培养瓶内作为实验组和对照组, 不加材料的含菌试管为空白组, 于 0d、1d、3d、5d、7d、10d 和 14d 共 7 个时间点取菌悬液培养 4 周, 根据菌落计数绘制时间杀菌曲线。**结果:**载 PaMZ 人工骨可有效缓释 84d, Pa 在 84d 时浓度为 $43.92 \pm 1.37 \mu\text{g/ml}$, 累积释放率为 $(71.00 \pm 0.71)\%$; M 在 84d 时浓度为 $180.22 \pm 12.36 \mu\text{g/ml}$, 累积释放率为 $(96.01 \pm 1.54)\%$; Z 在 84d 时浓度为 $472.05 \pm 65.39 \mu\text{g/ml}$, 累积释放率为 $(96.39 \pm 2.22)\%$ 。H37Rv 菌株培养阳性率: A 组 5%, B 组 0%, C 组 100%, C 组与 A、B 组比较有统计学差异($P < 0.05$); 临床分离的利福平耐药结核菌株培养阳性率: A 组 5%, B 组 95%, C 组 100%, A 组与 B、C 组比较有统计学差异($P < 0.05$)。时间杀菌曲线显示实验组 2 种菌株在各时间点的菌落计数均位于对照组和空白组下方, 实验组 3d 开始表现出明显的抑菌性能, 10d 后未培养出结核杆菌。**结论:**3D 打印载 PaMZ/BMP-2 的 nHA 抗结核人工骨在体外可稳定缓释新型抗结核药物组合 PaMZ 达 84d, 在 84d 内可有效抑制敏感型和利福平耐药结核菌的生长, 具有良好的抗结核性能。

【关键词】脊柱结核; 人工骨; PaMZ; 缓释; 抗结核

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2022.08.09

中图分类号: R529.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2022)-08-0735-08

Study on in vitro sustained release and anti-tuberculosis performance of 3D printed PaMZ/BMP-2-loaded nHA artificial bone/ZHU Xi, TANG Xuefeng, SHI Jiandang, et al/Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2022, 32(8): 735-742

【Abstract】 Objectives: To observe the in vitro sustained release and anti-tuberculosis performance of 3D printed nano-Hydroxyapatite(nHA) anti-tuberculosis artificial bone loaded with PaMZ a novel triple anti-tuberculosis drug combination of Pretomanid(Pa), Moxifloxacin(M), Pyrazinamide(Z) and bone morphogenetic protein 2 (BMP-2). **Methods:** 5 copies of the 3D printed PaMZ/BMP-2-loaded nHA artificial bone and blank artificial bone were immersed in phosphate buffer saline(PBS) simulated body fluid, respectively. And drug concentrations of the extracts at 10 time points of 1d, 3d, 5d, 7d, 14d, 28d, 42d, 56d, 70d and 84d were detected by

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81760399, 82060402)

第一作者简介:男(1983-), 临床医学博士, 副主任医师, 研究方向:脊柱结核

电话: (0951)6743242 E-mail: zx_830724@163.com

共同第一作者:唐学峰 E-mail: nyhwannyh@163.com

通讯作者:施建党 E-mail: shi_jiandang@163.com

high performance liquid chromatography. The modified Roche medium was prepared with the extract at 84d. The experiment was divided into 3 groups: the experimental group (group A) of the medium containing the PaMZ-loaded artificial bone extract, the positive control group (group B) of the medium containing rifampicin, and the negative control group (group C) of the medium containing blank artificial bone extract. The H37Rv strain and the clinically isolated rifampicin-resistant tuberculosis strain were cultured respectively, with 20 samples in each group, and the positive rate of culture was observed. 50mg of PaMZ-loaded artificial bone and 50mg of blank artificial bone were respectively put into culture flasks containing 2 kinds of tuberculosis liquid as experimental group and control group, and the tuberculosis-containing test tube without material were the blank group. The bacterial suspension was taken at 0d, 1d, 3d, 5d, 7d, 10d, 14d time points to culture for 4 weeks, and the time-kill curve was drawn according to the colony count. **Results:** The PaMZ-loaded artificial bone effectively sustained-released for 84 days. The concentration of Pa at 84 days was $43.92 \pm 1.37 \mu\text{g/ml}$, and the cumulative release rate was $(71.00 \pm 0.71)\%$; the concentration of M at 84 days was $180.22 \pm 12.36 \mu\text{g/ml}$, and the cumulative release rate was $(96.01 \pm 1.54)\%$; the concentration of Z at 84 days was $472.05 \pm 65.39 \mu\text{g/ml}$, and the cumulative release rate was $(96.39 \pm 2.22)\%$. The positive rate of H37Rv strain culture: 5% in group A, 0 in group B, 100% in group C, and group C was statistically significant compared with groups A and B ($P < 0.05$); The positive rate of rifampicin-resistant tuberculosis strains isolated from clinical: 5% in group A, 95% in group B, and 100% in group C, and group A was statistically different compared with groups B and C ($P < 0.05$). The time-kill curve showed that the colony count of two kinds of *Mycobacterium tuberculosis* in experimental group at each time point was lower than that of control group and blank group. Experimental group showed obvious bacteriostatic performance from the 3rd day, and no *Mycobacterium tuberculosis* was cultured after 10 days. **Conclusions:** 3D printed PaMZ/BMP-2-loaded nHA artificial bone provides stable sustained release of the novel anti-tuberculosis drugs combination PaMZ for 84 days in vitro, which can effectively inhibit the growth and multiplication of *Mycobacterium tuberculosis* including sensitive *Mycobacterium tuberculosis* and rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* within 84 days, so it has good anti-tubercular properties.

[Key words] Spinal tuberculosis; Artificial bone; PaMZ; Sustained release; Anti-tuberculosis

[Author's address] Department of Orthopedics, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan, 750004, China; Ningxia Medical University, Yinchuan, 750001, Ningxia, China

如何制备可以长效缓释药物的载体材料是目前脊柱结核治疗研究的热点,在脊柱结核的外科手术治疗中至关重要^[1]。然而传统抗结核药物存在依从性差、不良反应多、容易耐药等缺点^[2],选择新型抗结核药物制备植骨材料对今后治疗脊柱结核意义重大。2019 年于美国上市的普托马尼(Pretomanid, Pa)被认为是最有前途的抗结核新药之一^[3],其与莫西沙星(Moxifloxacin, M)、吡嗪酰胺(Pyrazinamide, Z)的组合 PaMZ 已被证实对敏感性和耐药性结核杆菌均有强效杀菌作用^[4-5]。本课题组构建的 3D 打印载 PaMZ 纳米羟基磷灰石(nano-Hydroxyapatite, nHA)抗结核人工骨在前期已完成了最优配方筛选^[6],载入骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)后实验显示该材料具备良好的生物相容性,能够通过促进骨髓间充质干细胞增殖及分化而实现良好的成骨^[7],但其缓释性能及对敏感和耐药的结核菌效

果仍未获得有效的验证。本研究通过检测载 PaMZ/BMP-2 的 nHA 抗结核人工骨在不同时间点浸提液的药物浓度,观察其缓释性能,并将浸提液制备成含药培养基与结核杆菌共培养,结合时间杀菌实验评价其抗结核性能,为该新材料的进一步研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

Pa(美国 MCE 公司);M、Z(大连美仑生物技术有限公司);聚乳酸-羟基乙酸(poly lactic-co-glycolic acid, PLGA)75:25(济南岱罡生物工程有限公司);BMP-2(美国 Peprotech 公司);nHA 墨水(西安点云生物科技有限公司);利福平(中国食品药品检定研究院);改良罗氏培养基(宁夏传染病医院参比实验室);BacT/ALERT 培养瓶(法国生物梅里埃公司);低温无丝 3D 打印机(西安点

云生物科技有限公司);高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司);CO₂ 恒温培养箱(上海森信实验仪器有限公司);生物安全柜(新加坡 ESCO 公司);菌落计数仪(法国 Interscience 公司)。

1.2 3D 打印载 PaMZ/BMP-2 的 nHA 抗结核人工骨的制备

按体外实验筛选的最优配方(Pa:1.93mg;M:7.71mg;Z:28.93mg;PLGA:90mg)参考唐学峰等^[6]的方法制备成每份含 128mg PaMz 固体分散体溶液;参考刘昌昊等^[7]的方法精密称取 30μg BMP-2 制备成每份 38mg BMP-2 微球;将这二者与 264mg nHA 墨水混匀后装入低温无丝打印(FFP)生物陶瓷 3D 打印机墨盒,打印机喷嘴直径为 300μm,在 X、Y 轴进行水平打印,每层厚度设为 200μm,在 Z 轴上进行叠加,每层在改变方向形成侧孔之前 Z 轴重复打印 2 次,实际层厚为 400μm,以 10mm/s 的恒定速度打印出孔隙率 60%、孔径 200μm 的载 PaMZ/BMP-2 的 nHA 抗结核人工骨。按照上述方法,单纯用 nHA 墨水打印空白人工骨,均储存于-20℃冰箱中备用。

1.3 高效液相法检测浸提液药物浓度

1.3.1 Pa、M 和 Z 最大吸收波长的测定

色谱条件包括:色谱柱:GL sciences Wondasil TM C18superb (4.6×250mm,5μm);保护柱:Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18(4.6×12.5mm,5μm);有机相 A:甲醇;水相 B:磷酸三乙胺缓冲液(PH=2.5);梯度洗脱程序:0~7.50min,55%B;7.51~10.00min,30%B;10.01~15.00min,20%B;15.01~20.00min,55%B,进样时间为 20min。进样量:20μl,流速:1.0ml/min,柱温:40℃。二极管阵列探测器设定为:0~4.50min,269nm;4.51~7.00min,296nm;7.01~15.01min,330nm;15.01~20.01min,269nm。分别监测 Z、M 和 Pa 的最大吸收波长。

1.3.2 标准曲线的绘制

精密称取 Pa、M 和 Z 的标准品各 10mg,分别以 10ml 甲醇溶解,各取 200μl 混合后加 400μl 甲水配成混合药物浓度为 200μg/ml 的 PaMZ 标液,再依次稀释为 100、50、10、5、2、0.5μg/ml 的系列标液,进样测定,绘制标准曲线。

1.3.3 药物释放浓度时间曲线和药物累积释放百分比曲线的绘制

样品处理及检测:取载 PaMZ/BMP-2 的 nHA 抗结核人工骨和空白人工骨各 5 份分别放于透析袋中,加入 2ml PH 为 7.4 的磷酸

盐缓冲液(phosphate buffer saline,PBS),封口后置入含 8ml 相同条件 PBS 液的离心管中,避光在室温下以 100r/min 震荡孵育。分别于 1d、3d、5d、7d、14d、28d、42d、56d、70d 及 84d 取样 2ml,每次取样后回补相同条件 PBS 2ml。将样品涡旋混匀离心后,取上清液 1ml 用 0.22μm 的微孔滤膜过滤后上机检测。根据标准曲线方程,计算各时间点药物浓度,绘制三种药物释放浓度时间曲线和药物累积释放百分比曲线。

1.4 结核分枝杆菌菌悬液制备

分别采用结核分枝杆菌 H37Rv 株(ATCC 27294)和临床分离的利福平耐药结核分枝杆菌菌株进行实验,菌株由宁夏传染病医院结核病参比实验室提供。将复苏后的 2 种菌株分别接种在改良罗氏培养基上培养,刮取新鲜菌落置于磨菌瓶中,无菌生理盐水稀释、磨菌仪磨匀后,转移菌液至另一无菌试管中,与麦氏 1 号比浊管比浊得到 1mg/ml 的菌液,对应菌落计数为 3×10⁸CFU/ml。用标准接种环取 2 满环(即 0.02ml)菌液平移至 2ml 灭菌生理盐水中,即稀释得 10⁻²mg/ml 菌液,配好即用。

1.5 含药和空白改良罗氏培养基的制备及实验分组

取利福平 200mg 用二甲基甲酰胺溶解,蒸馏水定容至 40ml,配成 5mg/ml 利福平药液;按照结核病诊断细菌学检验规程^[8]制备改良罗氏培养基,并按 100ml/管分装于 120 个试管中,分装前随机分为 3 组,每组 40 管。实验组(A 组)加入载 PaMZ/BMP-2 的 nHA 抗结核人工骨在释药 84d 的浸提液 1ml、阳性对照组(B 组)加入利福平药液 1ml、阴性对照组(C 组)加入空白人工骨 84d 的浸提液 1ml 制成含药和空白改良罗氏培养基。B 组培养基利福平浓度为 50μg/ml。分别取 1 满环 10⁻²mg/ml 的 2 种菌液用划线法接种在 3 组培养基斜面上,每组各 20 管,培养终点时间设为 8 周。

1.6 结核分枝杆菌培养结果的判定

每周观察结核分枝杆菌的生长情况,典型的结核分枝杆菌菌落表现为淡黄色、菜花样、粗糙、干燥、不透明。培养至 8 周时,斜面无菌落生长,报结核分枝杆菌培养阴性(-);有菌落生长均报阳性,其中按菌落生长占斜面面积的比例分为:占比不足 1/4,报实际菌落数;占比 1/4,报阳性(1+);占比 1/2,报阳性(2+);占比 3/4,报阳性(3+);菌

落生长布满整个斜面,报阳性(4+)。

1.7 时间杀菌实验

将配好的 2 种结核分枝杆菌菌悬液稀释为 1×10^6 CFU/ml 并各取 2ml 接种于 BacT/ALERT 培养瓶,分别取 50mg 载 PaMZ/BMP-2 的 nHA 人工骨和未载药的空白人工骨装入含菌液的培养瓶内作为实验组和对照组,以不加材料的有菌试管为空白组。在 0d、1d、3d、5d、7d、10d 和 14d 取各组 100 μ l 菌液接种于改良罗氏培养基上,每组每个时间点做 3 个平行样本,培养 4 周后行细菌菌落计数,以菌落数的对数为纵坐标,以取样时间点为横坐标绘制时间杀菌曲线。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 25.00 统计软件行统计学分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示,计数资料采用频数(%)表示,组间比较采用卡方检验,理论频数 $T < 5$ 的格子数超过 20%时,采用 Fisher 确切概率法,多重比较采用 Bonferroni 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用 GraphpadPrism 9.0 软件进行数据分析作图。

2 结果

2.1 载 PaMZ/BMP-2 的 nHA 抗结核人工骨体外缓释药物浓度

空白人工骨中未检测到药物成分,载 PaMZ 人工骨中 Pa、M、Z 在 84d 内均表现出良好的缓释性能,无突释。其中 Pa 在实验终点 84d 时尚未完全释放,累积释放率为 $(71.00 \pm 0.71)\%$,峰浓度出现在 28d,达到 $73.49 \pm 2.33 \mu\text{g/ml}$,随后缓慢下降,至 84d 时浓度为 $43.92 \pm 1.37 \mu\text{g/ml}$;M 和 Z 释放较快,分别在 70d 和 28d 时累积释放率达到了 90%,至 84d 时累积释放率分别为 $(96.01 \pm 1.54)\%$ 和 $(96.39 \pm 2.22)\%$ 。其中 M 的峰浓度出现在 14d,达到 $331.85 \pm 19.56 \mu\text{g/ml}$,至 84d 时浓度为 $180.22 \pm 12.36 \mu\text{g/ml}$;Z 的峰浓度出现在 7d,达到 $1556.17 \pm 68.43 \mu\text{g/ml}$,随后缓慢下降,至 84d 时浓度为 $472.05 \pm 65.39 \mu\text{g/ml}$ (图 1)。

2.2 H37Rv 的培养结果

A 组发生 1 例污染,1 例培养阳性表现为 2+,培养阳性率为 5%;B 组培养阳性率为 0%;C 组 20 例均报培养阳性,其中 3+和 4+分别占 10%和 90%,培养阳性率为 100%(图 2)。A 组和 B 组培养阳性率无统计学差异($P > 0.05$),但均明显低于

C 组($P < 0.05$,表 1)。

2.3 利福平耐药结核分枝杆菌的培养结果

A 组的培养阳性率为 5%,1 例培养阳性表现为 3+;B 组的培养阳性率为 95%,其中 2 例 1+、2 例 2+、12 例 3+、3 例 4+;C 组的培养阳性率为 100%,3 例 3+、17 例 4+。A 组培养阳性率明显低于 B 组和 C 组($P < 0.05$),B 组和 C 组培养阳性率比较无统计学差异($P > 0.05$,表 2)。

2.4 时间杀菌曲线

时间杀菌曲线显示,载 PaMZ/BMP-2 的 nHA 人工骨在置入早期对标准菌株 H37Rv 和临床分离的耐利福平菌株均表现出明确的杀菌效果(图 3)。对照组和空白组的杀菌曲线走势一致,而实验组对 2 种菌株的杀菌曲线在各时间点均位于对照组和空白的下方,表明空白人工骨无杀菌能力,载 PaMZ 人工骨对 2 种菌株均具有明显的杀菌能力。载 PaMZ 人工骨在菌液中释放 3d 后开始表现出明显的抑菌性能,释放 10d 后未培养出结核杆菌,表明此时结核菌已被彻底杀灭,人工骨释放的药物浓度已达到或超越菌株的有效杀菌浓度。

3 讨论

针对脊柱结核研发的植骨材料主要用于修复结核感染性骨缺损。由于此类骨缺损病灶内存在骨髓-血屏障通透性障碍,口服常规剂型的抗结核药物很难在病灶内维持有效浓度,容易造成脊柱结核迁延不愈和复发^[9,10],因此植骨材料仅仅有促进成骨的性能和支撑性能是不够的,还要求其在局部能够有效地缓释抗结核药物以达到杀灭病灶内结核杆菌的目的。目前报道的大多数抗结核植骨材料所载药物主要集中在利福平、异烟肼等一线药物中,而 2017 年在全球新发结核患者中,仅利福平耐药结核者就超过了 55.8 万例,对多种一线抗结核药耐药的耐多药结核比例更是高达 82%^[11],这是研究者们不得不考虑的问题。本课题组通过前期对世卫组织推荐的抗结核新药进行筛选后发现,PaMZ 组合不仅对敏感性结核有效,治疗耐药结核也效果显著,且预期有缩短疗程的效果^[12-14],但尚未见到将该药物组合载入植骨材料用于修复脊柱结核感染性骨缺损的报道。通过对最优配方的筛选,课题组制备的 3D 打印载 PaMZ/BMP-2 的 nHA 人工骨在前期的实验中达到了松质骨的抗压强度且具备诱导成骨的性能,Pa、M、Z

三药载入人工骨后缓释性能及抗结核性能如何仍需进一步明确。

本实验中三种药物的缓释结果是令人满意的,在 84d 的时间周期内,M 和 Z 接近完全释放,至 84d 时累积释放率分别达到 $(96.01 \pm 1.54)\%$ 和 $(96.39 \pm 2.22)\%$,而 Pa 至 84d 时累积释放率为 $(71.00 \pm 0.71)\%$,表明该药仍有继续缓释的潜力。三种药物释放不同步可能与药物的理化性质有关,Pa 为脂溶性药物,而 M 和 Z 为水溶性药物,

在体外 PBS 中溶解度更高,释放更快。研究发现亲水性越高的药物在人工骨中释放越快,Z 的亲水性最高,释放也是最快的,在 7d 时即出现释药的高峰,而 M 是偏水溶性药物,其释放高峰出现在 14d,脂溶性的 Pa 则在 28d 时出现释放的峰值,此时仅释放了 $(55.38 \pm 1.71)\%$ 。对缓释材料而言,这种不同步释放并不理想,但是对于结核病灶来说,早期更高的药物浓度有利于迅速杀死局部病灶内的结核杆菌,而后期缓慢的释放药物则可

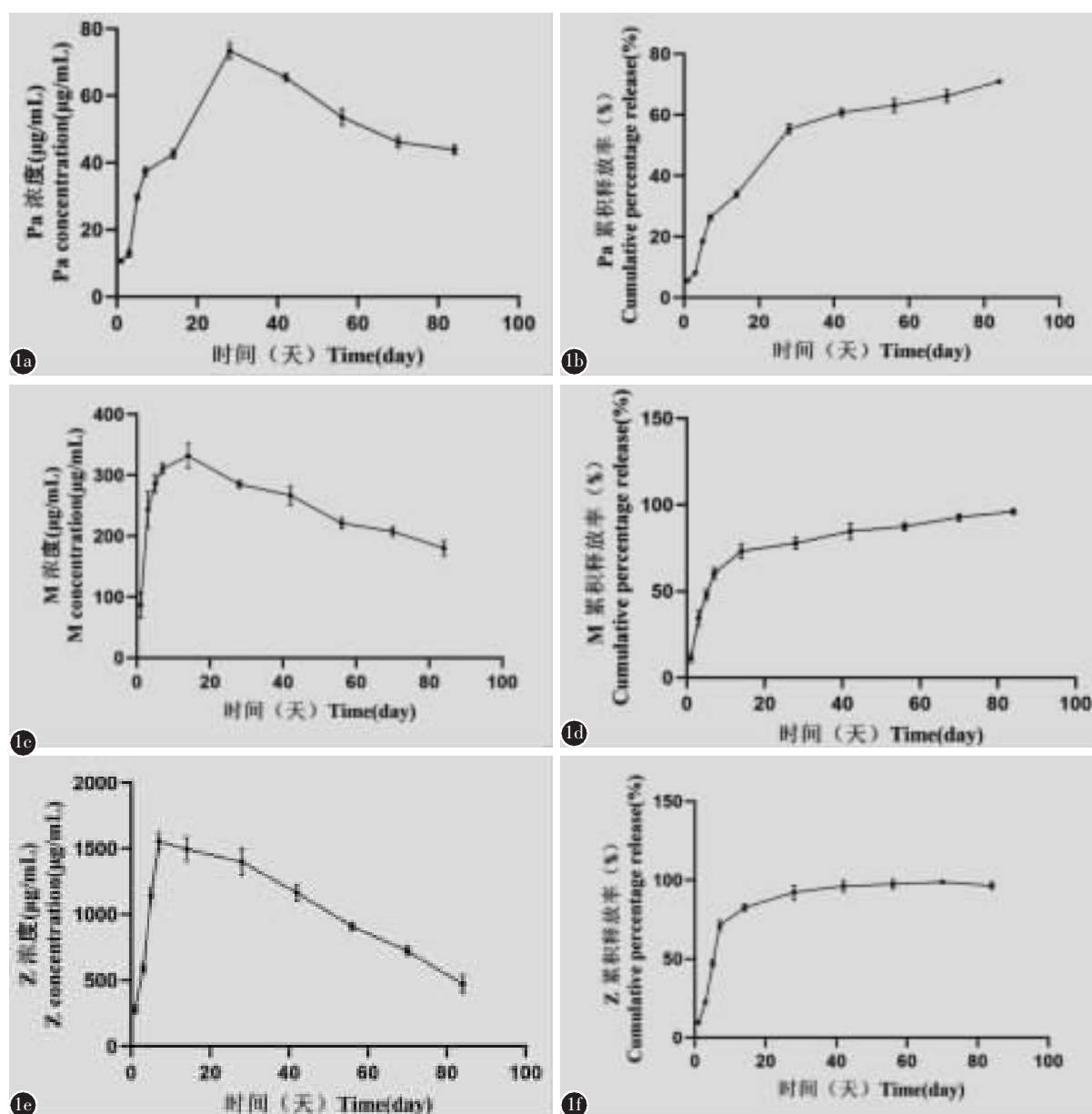


图 1 载 PaMZ/BMP-2 的 nHA 人工骨在 84d 内 Pa、M、Z 各自释放药物浓度时间曲线和累积释药率曲线 a、b 为 Pa c、d 为 M e、f 为 Z

Figure 1 The time curve of drug concentration and cumulative release rate curve of PaMZ/BMP-2-loaded nano-HA artificial bone a, b Pa c, d M e, f Z

有效抑制残存和潜伏在病灶内的结核杆菌生长和繁殖,防止局部复发。已有的研究表明 Pa、M、Z 的体外最低抑菌浓度 (minimal inhibitory concen-

tration, MIC) 分别为是 0.031 ~0.531 μ g/ml^[15]、0.125~0.5 μ g/ml^[16]和 8~64 μ g/ml^[17],而 Pa、M、Z 在释药 84d 时浓度分别为 43.92 $\pm$ 1.37 μ g/ml、180.22 $\pm$



图 2 改良罗氏培养基接种后结核分枝杆菌的生长情况 a 培养阴性 b~e 按照斜面菌落面积分别为 1+、2+、3+、4+,均报培养阳性 f 培养过程中出现 1 例其他细菌污染

Figure 2 Growth of Mycobacterium tuberculosis after inoculation with modified Roche medium a Negative b~e Positive according to the slant areas of colony of 1+, 2+, 3+, 4+ f One case of other bacterial contamination during culture

表 1 H37Rv 菌株的培养结果

Tabel 1 Culture results of H37Rv strains

组别 Groups	阴性 [例(%)] Negative number	阳性 [例(%)] Positive number	Fisher法	
			χ^2	P值 P value
A组(n=20) Group A	18(90)	1(5) ^①	60.89	<0.05
B组(n=20) Group B	20(100)	0 ^①		
C组(n=20) Group C	0	20(100)		

注:①与 C 组比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with group C, $P<0.05$

表 2 临床分离的利福平耐药结核分枝杆菌培养结果

Tabel 2 Culture results of clinically isolated rifampicin-resistant Mycobacterium tuberculosis strain

组别 Groups	阴性 [例(%)] Negative number	阳性 [例(%)] Positive number	Fisher法	
			χ^2	P值 P value
A组(n=20) Group A	19(95)	1(5)	54.40	<0.05
B组(n=20) Group B	1(5)	19(95) ^①		
C组(n=20) Group C	0	20(100) ^①		

注:①与 A 组比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with group A, $P<0.05$

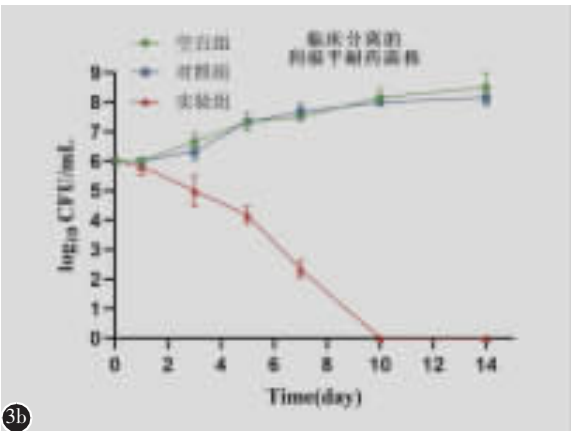
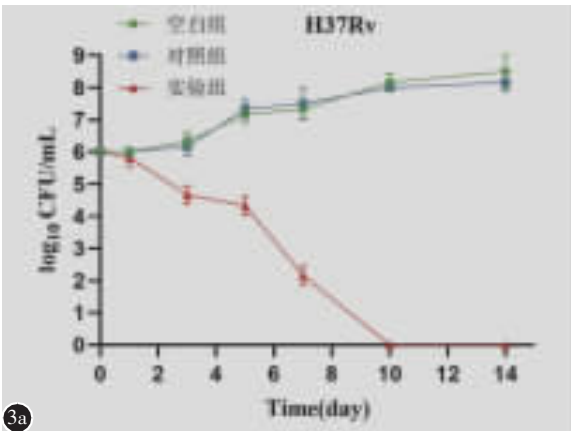


图 3 载 PaMZ/BMP-2 的 nHA 人工骨对结核分枝杆菌的杀菌曲线 a H37Rv 菌株 b 临床分离的利福平耐药结核分枝杆菌菌株

Figure 3 The time-kill curve of PaMZ/BMP-2-loaded nano-HA artificial bone against Mycobacterium tuberculosis a H37Rv strain b Clinically isolated rifampicin-resistant Mycobacterium tuberculosis strain

12.36 μ g/ml 和 472.05 $\pm$ 65.39 μ g/ml,理论上用此时的人工骨浸提液制备的含药培养基,Pa 和 M 药物浓度在稀释 100 倍后仍大于各自的 10 倍 MIC,而 Z 的浓度略低,但仍高于 MIC。我们制备的含利福平的含药培养基药物浓度为 50 μ g/ml,符合规程^[8]中对药物敏感性测定的最低标准。

结核杆菌培养的结果显示,C 组在培养 8 周内,H37Rv 菌株和临床分离的耐利福平结核杆菌菌株培养的阳性率均为 100%,培养结果中大部分培养基表现为 3+和 4+,说明我们选用的结核分枝杆菌有很强的生长能力。A 组在培养 H37Rv 标准菌株和临床分离的耐利福平结核菌株的阳性率分别为 5%和 15%,而 B 组为 0 和 95%,说明传统抗结核药物利福平浓度在 50 μ g/ml 时对敏感菌株非常有效但是无法抑制临床分离的耐药结核菌株生长,而我们构建的 3D 打印载 PaMZ/BMP-2 的 nHA 人工骨在释药 84d 时仍对敏感结核杆菌表现出与传统抗结核药物利福平一致的抑菌性能,对临床分离的该利福平耐药结核菌株也表现出明显的抑制作用。耐药菌感染是脊柱结核治疗领域中最为棘手的难点^[18],术后易出现复发、窦道形成、内固定失效等,大剂量的联合化疗也会对患者肝肾功能造成巨大的负担^[19]。PaMZ 组合在治疗耐药结核病时的方案与治疗敏感结核基本一样,Pa 100mg 或 200mg,M 400mg,Z 1500mg,与传统标准四联(利福平、异烟肼、吡嗪酰胺和乙胺丁醇)抗结核方案相比,无需加大剂量且不增加出现恶心、呕吐等不良事件的频率,PaMZ 为传统抗结核药物耐药或有严重毒性反应的患者提供了一个有效的替代方案^[20]。将该组合载入植骨材料,有望填补针对耐药脊柱结核感染感染性骨缺损修复材料短缺的空白。

时间杀菌实验的结果显示,我们制备的抗结核人工骨在置入菌液 3d 后开始对敏感结核菌和利福平耐药结核菌都表现出明显的杀菌性能,在置入 10d 后,未能培养出结核杆菌,提示 BacT/ALERT 培养瓶中的结核杆菌已被彻底杀灭。结合 PaMZ 药物浓度时间曲线,此时 Z 已达到释药高峰,但 M 和 Pa 尚未达到释药峰值,由此推断随着置入时间的延长,抗结核人工骨将持续在病灶中发挥良好的抗结核性能。新药 Pa 是药物组合的核心,该药是硝基咪唑类化合物,其杀灭结核杆菌的具体机制尚未完全阐明,目前认为主要有两种方

式:①抑制结核杆菌细胞壁酮-分枝菌酸的合成和蛋白质合成;②代谢过程中可被结核杆菌内的硝基还原酶 Ddn 还原,产生一氧化氮、甲基乙二醛等细菌的呼吸毒素从而抑制结核杆菌的无氧活动^[13,21-23]。实验结果表明,本课题组构建的载 PaMZ/BMP-2 的 nHA 人工骨在体外释放 3d 后即表现出明显的抗结核效果,直至 84d 时仍能有效抑制敏感性和利福平耐药结核菌的生长和繁殖。不足之处是本实验仅对利福平耐药结核菌株进行实验,尽管单耐利福平者容易转变为耐多药结核病^[24],但并不能因此确定支架材料对其他耐多药结核菌的有效性。

综上所述,3D 打印载 PaMZ/BMP-2 的 nHA 抗结核人工骨在体外可稳定缓释新型抗结核药物组合 PaMZ 达 84d,在 84d 内可有效抑制包括敏感结核菌和利福平耐药结核菌的生长和繁殖,具有良好的抗结核性能,理论上该材料在修复脊柱结核尤其是耐药脊柱结核感染性骨缺损时具有很大优势。本研究为进一步开展体内抗结核实验提供了理论基础。

4 参考文献

- 李辉,陈良龙.植骨材料在脊柱结核治疗中的应用与特征[J].中国组织工程研究,2022,26(4):626-630.
- Peloquin CA, Davies GR. The treatment of tuberculosis[J]. Clin Pharmacol Ther, 2021, 110(6): 1455-1466.
- Gils T, Lynen L, de Jong BC, et al. Pretomanid for tuberculosis: a systematic review[J]. Clin Microbiol Infect, 2022, 28 (1): 31-42.
- Tweed CD, Dawson R, Burger DA, et al. Bedaquiline, moxifloxacin, pretomanid, and pyrazinamide during the first 8 weeks of treatment of patients with drug-susceptible or drug-resistant pulmonary tuberculosis: a multicentre, open-label, partially randomised, phase 2b trial [J]. Lancet Respir Med, 2019, 7(12): 1048-1058.
- Tweed CD, Wills GH, Crook AM, et al. A partially randomised trial of pretomanid, moxifloxacin and pyrazinamide for pulmonary TB[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2021, 25(4): 305-314.
- 唐学峰,刘昌昊,于树印,等.载 PaMZ/nHA 抗结核人工骨的最优配方筛选[J].宁夏医科大学学报,2020,42(6):565-572.
- 刘昌昊,郑建平,施建党,等.负载抗结核药物与骨形态发生蛋白 2 缓释微球的 3D 打印人工骨能促进骨髓间充质干细胞成骨[J].中国组织工程研究,2021,25(28):4447-4453.
- 中国防痨协会.结核病诊断细菌学检验规程[J].中国防痨杂志,1996,18(1):30-33.
- 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.
10. Wang Z, Shi J, Geng G, et al. Ultra-short-course chemotherapy for spinal tuberculosis: five years of observation[J]. *Eur Spine J*, 2013, 22(2): 274–281.
11. World Health Organization. Global tuberculosis report 2020. Geneva: World Health Organization, 2020.
12. Srivastava S, Deshpande D, Magombedze G, et al. Duration of pretomanid/moxifloxacin/pyrazinamide therapy compared with standard therapy based on time-to-extinction mathematics[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2020, 75(2): 392–399.
13. Black TA, Buchwald UK. The pipeline of new molecules and regimens against drug-resistant tuberculosis[J]. *J Clin Tuberc Other Mycobact Dis*, 2021, 25: 100285.
14. Mirzayev F, Viney K, Linh NN, et al. World Health Organization recommendations on the treatment of drug-resistant tuberculosis, 2020 update[J]. *Eur Respir J*, 2021, 57(6): 2003300.
15. Lenaerts AJ, Gruppo V, Marietta KS, et al. Preclinical testing of the nitroimidazopyran PA-824 for activity against mycobacterium tuberculosis in a series of in vitro and in vivo models[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(6): 2294–2301.
16. Gao F, Chen Z, Ma L, et al. Synthesis and biological evaluation of moxifloxacin-acetyl-1,2,3-1H-triazole-methylene-isatin hybrids as potential anti-tubercular agents against both drug-susceptible and drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains[J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 180: 648–655.
17. Werngren J, Sturegård E, Juréen P, et al. Reevaluation of the critical concentration for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* against pyrazinamide using wild-type MIC distributions and *pncA* gene sequencing [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56(3): 1253–1257.
18. 编写组耐药脊柱结核临床诊疗专家共识. 耐药脊柱结核临床诊疗专家共识[J]. *中国防痨杂志*, 2019, 41(4): 377–382.
19. 宋向伟, 梁强, 马文鑫, 等. 影响脊柱结核术后超短程化疗方案的因素分析[J]. *中国矫形外科杂志*, 2018, 26(2): 144–149.
20. Dawson R, Diacon AH, Everitt D, et al. Efficiency and safety of the combination of moxifloxacin, pretomanid (PA-824), and pyrazinamide during the first 8 weeks of antituberculosis treatment: a phase 2b, open-label, partly randomised trial in patients with drug-susceptible or drug-resistant pulmonary tuberculosis[J]. *Lancet*, 2015, 385(9979): 1738–1747.
21. 杜乐, 蒋欣, 小红, 等. 抗结核药物研究进展[J]. *中国抗生素杂志*, 2020, 45(1): 1–8.
22. 韦媛媛, 杨帆, 汤杰, 等. 抗结核药物的研究进展[J]. *中国药科大学学报*, 2020, 51(2): 231–239.
23. Baptista R, Fazakerley DM, Beckmann M, et al. Untargeted metabolomics reveals a new mode of action of pretomanid (PA-824)[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 5084.
24. 中华医学会结核病学分会. 中国耐多药和利福平耐药结核病治疗专家共识(2019年版)[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2019, 42(10): 733–749.
- (收稿日期:2022-04-03 末次修回日期:2022-08-14)
(英文编审 谭 啸)
(本文编辑 李伟霞)