

基础研究

载异烟肼、利福平白蛋白纳米粒中异烟肼在兔腰椎及其椎旁肌组织分布及药代动力学研究

张惠勇¹, 马 荣¹, 陈 振¹, 张党峰², 刘晓印³, 梁思敏¹, 黑 龙¹, 杨小英⁴, 戈朝晖¹

(1 宁夏医科大学总医院骨科 750004 银川市; 2 西安交通大学医学院第一附属医院骨科 710061 西安市;

3 宁夏医科大学 750004 银川市; 4 宁夏医科大学总医院药剂科 750004 银川市)

【摘要】目的:研究载异烟肼、利福平白蛋白纳米粒(INH-RFP-BSA-NPs)经静脉给药后异烟肼(isoniazid, INH)在兔腰椎及其椎旁肌中的生物分布及药代动力学特性。**方法:**选取 132 只健康成年新西兰大白兔, 平均分为两组, 以普通异烟肼制剂作为对照, 经兔耳缘静脉分别注射 INH-RFP-BSA-NPs 溶液与异烟肼注射液。采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)分析方法, 检测各时间点(1、2、4、8、12、24、36、48、72、96、120h)兔 L6 椎体和椎旁肌组织中异烟肼的药物浓度。使用 DAS 3.2.1 软件计算各组织中异烟肼的药物浓度-时间曲线下面积(AUC)、半衰期($t_{1/2}$)、平均驻留时间(MRT)等主要药代动力学参数。根据纳米制剂与异烟肼普通制剂在各时间点靶器官组织药物浓度及药时曲线下面积的比值, 计算靶向指数(DTI)及相对靶向效率(RTE), 评价 INH-RFP-BSA-NPs 对兔脊柱及椎旁肌的靶向性。**结果:**各时间点实验组兔 L6 椎体及椎旁肌组织中异烟肼浓度均高于对照组。药代动力学结果显示: 实验组兔椎体中 $AUC_{0-\infty}$ 为 $(533.71 \pm 162.44) \mu\text{g/g} \cdot \text{h}$, $t_{1/2}$ 为 $(55.32 \pm 38.38) \text{h}$, MRT 为 $(58.12 \pm 44.26) \text{h}$; 椎旁肌中 $AUC_{0-\infty}$ 为 $(17.40 \pm 4.89) \mu\text{g/g} \cdot \text{h}$, $t_{1/2}$ 为 $(25.78 \pm 6.05) \text{h}$, MRT 为 $(27.77 \pm 8.51) \text{h}$ 。对照组兔椎体中 $AUC_{0-\infty}$ 为 $(278.61 \pm 41.90) \mu\text{g/g} \cdot \text{h}$, $t_{1/2}$ 为 $(14.90 \pm 7.10) \text{h}$, MRT 为 $(18.92 \pm 6.11) \text{h}$; 椎旁肌中 $AUC_{0-\infty}$ 为 $(7.38 \pm 0.93) \mu\text{g/g} \cdot \text{h}$, $t_{1/2}$ 为 $(5.97 \pm 2.68) \text{h}$, MRT 为 $(5.20 \pm 0.8) \text{h}$ 。相对于对照组, 实验组兔椎体和椎旁肌组织中 AUC 值显著增高($P < 0.01$), MRT、 $t_{1/2}$ 延长($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。兔椎体及椎旁肌中的 DTI、RTE 值基本都大于 1。**结论:**与异烟肼普通制剂相比, INH-RFP-BSA-NPs 使异烟肼在兔腰椎及其椎旁肌组织中浓度升高、消除减慢, 具有良好的药代动力学特征, 明显提高了异烟肼在兔腰椎及其椎旁肌的药物分布。

【关键词】 纳米粒; 异烟肼; 脊柱; 椎旁肌; 反相高效液相色谱法; 药代动力学

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2015.09.14

中图分类号: R529.2, R969.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2015)-09-0843-07

Pharmacokinetics and tissue distribution of isoniazid released from albumin nanoparticles loaded with isoniazid and rifampicin in rabbit spine/ZHANG Huiyong, MA Rong, CHEN Zhen, et al/Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2015, 25(9): 843-849

【Abstract】 Objectives: To study the pharmacokinetics and tissue distribution of isoniazid(INH) released from albumin nanoparticles loaded with isoniazid and rifampicin (INH-RFP-BSA-NPs) in rabbit's spine and paravertebral muscles after intravenous administration. **Methods:** 132 healthy New Zealand white rabbits were averagely divided into 2 groups at random. The regular dosage formed INH preparations as control. Then tissue samples were obtained at certain time points(1, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120h). The pharmacokinetics were tested after injection of INH-RFP-BSA-NPs and INH solution via the rabbit's ear vein. Drug concentration of INH in vertebral and paravertebral muscle tissues was detected by reversed-phase high-performance liquid chromatography(RP-HPLC) method at each time point. The main parameters of pharmacokinetics, including area under concentration-time curve (AUC), half life period ($t_{1/2}$) and the mean residence time (MRT) were calculated by DAS 3.2.1. Drug targeting index(DTI) and relative targeting efficiency (RTE) were

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号:30960391); 宁夏自然科学基金项目(编号:NZ13144)

第一作者简介: 男(1980-), 主治医师, 研究方向: 脊柱结核基础与临床

电话: (0951)6743242 E-mail: zhanghuiyong2012@126.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

applied to assess the targeting ability of INH-RFP-BSA-NPs. **Results:** At each time point, INH concentration in the experimental group was slightly higher than that in control group. Pharmacokinetic results of experimental group were $AUC_{0-\infty}$ as $(533.71 \pm 162.44) \mu\text{g/g} \cdot \text{h}$, $t_{1/2}$ as $(55.32 \pm 38.38) \text{h}$, MRT as $(58.12 \pm 44.26) \text{h}$ in rabbit's spine; $AUC_{0-\infty}$ as $(17.40 \pm 4.89) \mu\text{g/g} \cdot \text{h}$, $t_{1/2}$ as $(25.78 \pm 6.05) \text{h}$, MRT as $(27.77 \pm 8.51) \text{h}$ in rabbit's paravertebral muscles. Those of control group were $AUC_{0-\infty}$ as $(278.61 \pm 41.90) \mu\text{g/g} \cdot \text{h}$, $t_{1/2}$ as $(14.90 \pm 7.10) \text{h}$, MRT as $(18.92 \pm 6.11) \text{h}$ in rabbit's spine. In rabbit's paravertebral muscles, $AUC_{0-\infty}$ was $(7.380.93) \mu\text{g/g} \cdot \text{h}$, $t_{1/2}$ was $(5.97 \pm 2.68) \text{h}$, MRT was $(5.20 \pm 0.8) \text{h}$. Compared with INH solution, its AUC was significantly higher ($P < 0.01$) after intravenous injection of INH-RFP-BSA-NPs, MRT and $t_{1/2}$ were prolonged ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). RTE and DTI were greater than one. **Conclusions:** Comparing to the general formulation of INH, INH-RFP-BSA-NPs can effectively improve the pharmacokinetics behaviour and have more prolonged release effect in rabbit's spine.

[Key words] Nanoparticle; Isoniazid; Spine; Paravertebral muscle; RP-HPLC; Pharmacokinetics

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

研究发现^[1,2],作为最主要的一线抗结核化疗杀菌剂,异烟肼(isoniazid, INH)常规口服剂型,因其肝肾毒副作用,存在部分患者化疗依从性差,无法完成规范疗程,疗效不佳等问题。为此,不少研究^[3,4]尝试通过改变传统药物的剂型,以达到减少给药剂量、降低药物毒性、提高靶器官药物浓度的效果。其中,以纳米粒作为载体,不仅可以避免所载抗结核药物的降解失活,还可以达到缓释、控释、改变药物体内分布和靶向释药的目的^[5,6]。我们前期已采用改良自乳化-溶剂扩散法制备出载异烟肼、利福平白蛋白纳米粒 (INH-RFP-BSA-NPs)^[7],体外研究证实具有良好的缓释性能。为进一步观察其体内释药行为,我们建立了骨及肌肉组织异烟肼浓度的反相高效液相色谱 (RP-HPLC)测定方法,对载双药纳米粒中异烟肼在新西兰大白兔脊柱的药代动力学特性进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 仪器

安捷伦 (Agilent1100) 高效液相色谱仪 (美国安捷伦科技有限公司, 配 VWD 紫外检测器); Agilent1100 色谱工作站; Centrifuge 5804R 型台式高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); 梅特勒十万分之一电子分析天平 (瑞士 Mettler 公司)。

1.2 药品和试剂

异烟肼标准品 (中国食品药品鉴定研究院, 批号 100578-200401); 异烟肼注射液 (安徽城市药业有限责任公司, 国药准字 H34020518); 载异烟

肼、利福平白蛋白纳米粒 (INH-RFP-BSA-NPs, 自制)^[7]; 桂皮醛粉剂 (上海市楷洋生物技术有限公司, 批号 Q0324); 甲醇、乙腈为色谱纯; 磷酸二氢钾、三氯醋酸为分析纯; 试验用水为双蒸水。

1.3 实验动物

健康新西兰大白兔 (西安市迪乐普生物资源开发有限公司提供), 体重 3.3~4.7kg/只, 共 136 只, 雌雄各半, 其中 4 只留做空白样本取材用。

1.4 方法

1.4.1 色谱条件 色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C18 柱 (4.6mm×250mm, 5 μm); 预柱: SB-C18 (4.6mm×12.5mm, 5 μm); 流动相: 0.02mol/L 磷酸二氢钾缓冲液 (H_3PO_4 调 pH: 4.0): 乙腈=55:45; 流速: 1.0ml/min; 检测波长: 325nm; 进样量: 20 μl ; 柱温: 35℃。

1.4.2 溶液的配制 精密称取异烟肼标准品 2mg, 置于 10ml 容量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 震荡摇匀, 配成 200 $\mu\text{g/ml}$ 的标准品溶液, 4℃冰箱储藏备用。

1.4.3 生物样品的采集 选取 132 只健康成年新西兰大白兔, 随机分为两组, 每组 66 只, 按异烟肼 11.43mg/kg 剂量, 分别经兔耳缘静脉注射, 实验组滴注 INH-RFP-BSA-NPs 溶液, 对照组滴注异烟肼注射液, 均不禁食, 自由饮水。给药后选取 11 个时间点 (1、2、4、8、12、24、36、48、72、96、120h) 断颈处死动物, 每个时间点处死 6 只, 取 L6 椎体及邻近椎旁肌组织, 剔除脂肪、结缔组织, 用滤纸拭血, -70℃保存。

1.4.4 组织样品处理方法 取兔椎体样本, 避

光-50℃冷冻干燥,于预冷好的研钵内研细。精密称取 100mg 骨粉末,加入 20%三氯醋酸 1000 μ l,使用玻璃匀浆器进行匀浆。将匀浆液移入 5ml 尖底离心管中,涡旋震荡 2min,离心 10min(-4℃, 14000r/min),取上清 100 μ l,加入 1%肉桂醛甲醇溶液 10 μ l,涡旋混匀后在室温下反应 20min, 14000r/min 离心 10min 后取上清液 20 μ l 进样检测异烟肼浓度。另取兔椎旁肌样本,解冻后称取 3000mg,加入 20%三氯醋酸 800 μ l 进行匀浆,同骨组织样品处理方法进样检测异烟肼浓度。

1.4.5 方法专属性考察 取空白兔椎体及椎旁肌样本,按上述组织样品处理方法,制成空白椎体及椎旁肌组织匀浆,涡旋震荡、离心后进样,获得空白骨及肌肉组织色谱图。在空白组织匀浆中加入一定浓度的异烟肼标准品,同法操作,获得相应色谱图,以确定其专属性。

1.4.6 标准曲线的建立 称取兔空白椎体骨粉末,加入异烟肼标准品,制成含异烟肼 0.2、2、5、50、200、500、1000 μ g/g 的骨组织匀浆。称取兔空白椎旁肌,制成含异烟肼 0.0053、0.053、0.133、1.333、5.333、13.333、26.667 μ g/g 的肌肉组织匀浆。每个浓度配制 5 份样品,按“组织样品处理方法”操作。以异烟肼的浓度为 X 轴,峰面积为 Y 轴,绘制标准曲线,求得各自回归方程,根据标准曲线的低浓度点,确定定量下限。

1.4.7 准确度、精密度与回收率 用甲醇配制 0.05、5、80 μ g/ml 的异烟肼质控样本各 5 个,加入适量兔空白骨及肌肉组织匀浆,按照“组织样品处理方法”操作,与标准曲线液同批测定,连续测定 3d。以当日的标准曲线计算质控样本的实测浓度,根据质控样本的结果,求得精密度。另取空白骨及肌肉组织匀浆,加入 20%三氯醋酸沉淀蛋白,1%肉桂醛甲醇溶液衍生化反应后吸取上清液,加入相应量的异烟肼标准品溶液,配制成同体积高、中、低 3 个浓度质控样本进行检测,计算提取回收率,每浓度进行 5 个样本分析。

1.4.8 稳定性试验 配制高、中、低(0.05、5、80 μ g/ml)3 个浓度梯度的含药组织匀浆,每一浓度平行配制 5 个样本。分别将其在室温下放置 4h;4℃冷藏 24h;-70℃环境放置 1 周后室温下融解,反复冻融 3 次,按照“组织样品处理方法”操作,考察其稳定性。

1.5 数据分析及器官靶向性评价

所得异烟肼浓度数据经 DAS 3.2.1 软件分析处理,采用非房室模型统计矩参数,计算药代动力学参数:包括药物浓度-时间曲线下面积(AUC)、半衰期($t_{1/2}$)和平均驻留时间(MRT)。所有实验数据的测定值均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析,两组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。应用靶向指数(drug targeting index, DTI)、相对靶向效率(relative targeting efficiency, RTE)^[8] 评价 INH-RFP-BSA-NPs 的兔脊柱及椎旁肌靶向性,公式如下:DTI=给予靶向制剂后某时刻器官的药量/给予非靶向制剂后某时刻器官的药量;RTE=给予靶向制剂后靶器官的药时曲线下面积/给予非靶向制剂后靶器官的药时曲线下面积。

2 结果

2.1 高效液相色谱结果

2.1.1 方法专属性 在所选用的色谱条件下,样本色谱基线平直,异烟肼峰形良好,出峰时间约为 4.4min,桂皮醛的出峰时间晚于异烟肼,约为 8.5min,药物峰与杂质峰均可完全分离,兔椎体及椎旁肌组织中内源性物质不干扰样品的测定,方法专属性好(色谱图见图 1、2)。

2.1.2 标准曲线及定量下限 见表 1,异烟肼标准曲线的低浓度点分别为,椎体 0.2 μ g/g,椎旁肌 0.0053 μ g/g,在各自的低浓度点平行制备并测定 5 个样品,根据当日的线性方程,求得该浓度的日内间精密度(RSD)均 $<5\%$ 。确定定量下限为,椎体 0.2 μ g/g,椎旁肌 0.0053 μ g/g。

2.1.3 稳定性试验结果 骨及肌肉组织样本中异烟肼的测定浓度与理论浓度平均值的偏差(SD)均在($\pm 5\%$)以内,各种储存条件不影响样本浓度的准确测定。

2.1.4 回收率和精密度 异烟肼低、中、高 3 个浓度在椎体骨组织中相对回收率为 86.38%~102.74%,提取回收率为 90.42%~105.37%,RSD $<5\%$ 。在椎旁肌组织中相对回收率为 79.42%~96.24%,提取回收率为 84.53%~102.57%,RSD $<5\%$ 。表明该方法符合生物样品分析要求。

2.2 兔椎体及椎旁肌组织药代动力学结果

见表 2、图 3。实验组椎体和椎旁肌组织中 AUC 高于对照组($P < 0.01$),MRT、 $t_{1/2}$ 延长($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。实验组 120h 后椎体、椎旁肌中仍能

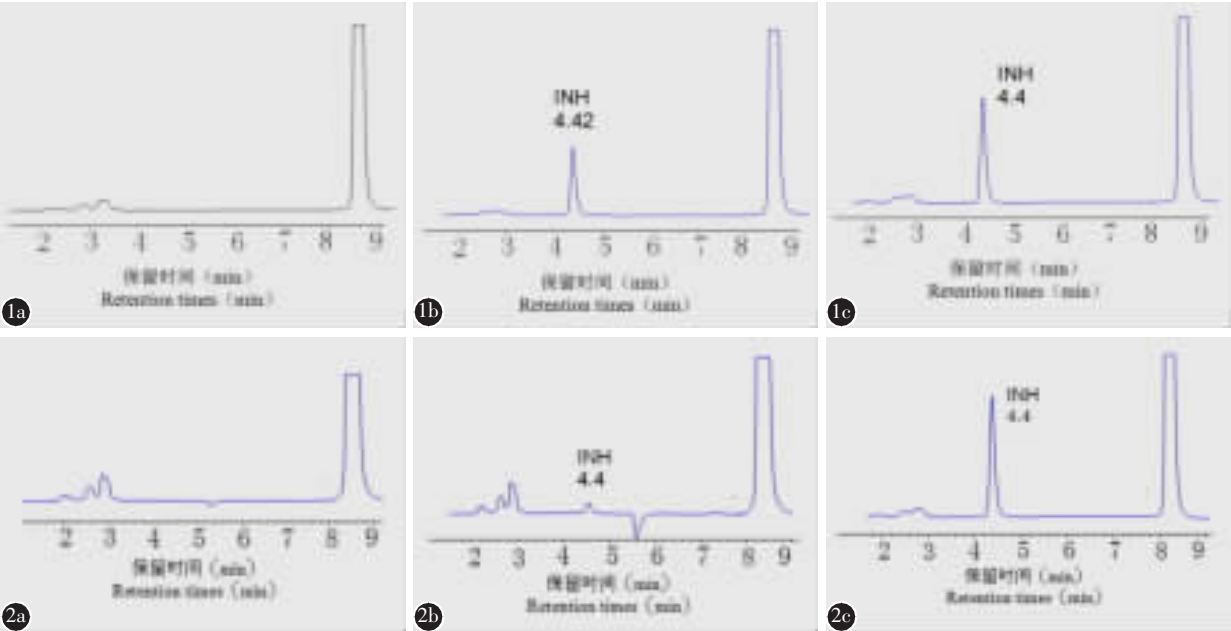


图 1 兔空白椎体骨组织匀浆及标准曲线色谱图 a 兔空白椎体骨组织 b 兔空白椎体骨组织加异烟肼对照品 c 给药 1h 后兔椎体骨组织 图 2 兔空白椎旁肌组织匀浆及标准曲线色谱图 a 兔空白椎旁肌组织 b 兔空白椎旁肌组织加异烟肼对照品 c 给药 1h 后兔椎旁肌组织

Figure 1 HPLC chromatograms of INH in bone tissue of rabbit a Blank bone tissue of rabbit b Blank bone tissue of rabbit spiked with INH c Bone tissue of rabbit obtained 1h after iv administration of INH Figure 2 HPLC chromatogram of INH in muscle tissue of rabbit a Blank muscle tissue of rabbit b Blank muscle tissue of rabbit spiked with INH c Muscle tissue of rabbit obtained 1h after iv administration of INH

表 1 异烟肼在兔椎体及椎旁肌中的标准曲线 (n=5)
Table 1 Standard curves of INH in different tissues of rabbit

	样本 Sample	线性范围(μg/g) Linear range(μg/g)	线性方程 Equation of standard curve	相关系数 r
对照组 Control group	椎体 Bone tissue	0.2~1000	Y=0.74528X-1.63573	0.99873
	椎旁肌 Muscle tissue	0.0053~26.667	Y=0.69357X+0.75354	0.99918
实验组 Experience group	椎体 Bone tissue	0.2~1000	Y=0.96474X-1.74583	0.99931
	椎旁肌 Muscle tissue	0.0053~26.667	Y=0.85405X-1.16848	0.99903

测到高于定量下限的异烟肼浓度，对照组椎体中 48h 后已无法检测到，椎旁肌中则于 36h 后异烟肼浓度已低于定量下限，各时间点实验组兔椎体及椎旁肌组织中异烟肼浓度均高于对照组。结果表明，INH-RFP-BSA-NPs 可提高兔椎体及椎旁肌组织中异烟肼浓度，使达峰浓度增高，消除减慢，增加了异烟肼在脊柱的驻留时间。

2.3 靶向性评价结果

按公式计算，兔椎体、椎旁肌中各时间点的 DTI 均大于 1，两药在兔椎体的 RTE 值为 1.92，椎

旁肌中为 2.36。表明 INH-RFP-BSA-NPs 经兔耳缘静脉注射后 INH 在椎体及椎旁肌组织中有一定浓集(表 3)。

3 讨论

研究^[9,10]表明，药物进入人体内，能否产生药效，很大程度上取决于作用部位即病灶中药物的浓度。本研究选择脊柱及椎旁肌作为药代动力学研究的靶组织，主要基于脊柱是骨结核最易受累及好发的部位，约占全部骨关节结核的 50%^[11]，而

表 2 单剂量给药后异烟肼在兔椎体及椎旁肌组织的主要药代动力学参数 (n=6, $\bar{x}\pm s$)

Table 2 The main pharmacokinetics parameters of INH in different tissues of rabbit after injection of INH-RFP-BSA-NPs and INH solution via the ear vein

药动学参数 Parameter	椎体 Bone tissue		椎旁肌 Muscle tissue	
	对照组 Control group	实验组 Experimental group	对照组 Control group	实验组 Experimental group
达峰浓度 C _{max} (μg/g) Maximum concentration	23.45±7.65	35.05±12.40	1.75±0.51	2.35±0.77
曲线下面积 AUC _{0-∞} (μg/g·h) Area under curve	278.61±41.90	533.71±162.44 ^①	7.38±0.93	17.40±4.89 ^①
生物半衰期 t _{1/2} (h) Half life period	14.90±7.10	55.32±38.38 ^②	5.97±2.68	25.78±6.05 ^①
体内平均驻留时间 MRT _{0-∞} (h) Mean residence time	18.92±6.11	58.12±44.26	5.20±0.81	27.77±8.51 ^①
体内总清除率 CL(L/h/kg) Total body clearance	43.82±6.32	24.47±8.47 ^①	1650.45±233.04	729.08±176.50 ^①

注:①与对照组比较 P<0.01;②与对照组比较 P<0.05

Note: ①Compared with control group, P<0.01; ②Compared with control group, P<0.05

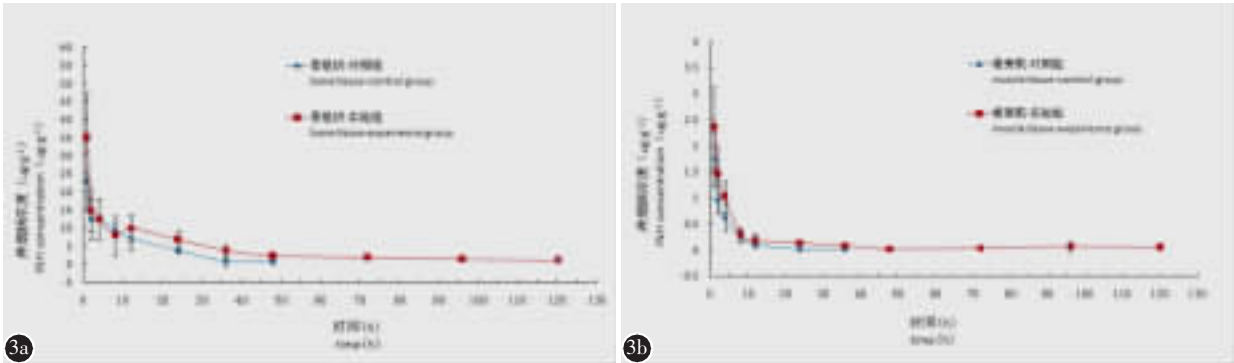


图 3 a 静脉给药后两药在兔椎体骨组织中异烟肼平均药-时曲线图(n=6) b 静脉给药后两药在兔椎旁肌组织中异烟肼平均药-时曲线图(n=6)

Figure 3 a Mean bone tissue INH concentration-time curves in rabbit after injection of INH-RFP-BSA-NPs and INH solution via the ear vein (n=6) b Mean muscle tissue INH concentration-time curves in rabbit after injection of INH-RFP-BSA-NPs and INH solution via the ear vein(n=6)

表 3 经兔耳缘静脉给药后各时间点椎体与椎旁肌组织靶向指数(DTI) (n=6)

Table 3 Drug targeting index (DTI) in bone and muscle tissue of rabbit after injection of INH-RFP-BSA-NPs and INH solution via the ear vein

	1h	2h	4h	8h	12h	24h	36h	48h	72h	96h	120h
骨组织 Bone tissue	1.52	1.2	1	0.84	1.38	1.72	5.04	3	*	*	*
肌肉组织 Muscle tissue	1.34	1.52	1.64	1.2	1.69	10.69	10	*	*	*	*

*未采集到异烟肼数据

*No data

脊柱结核脓肿病灶则主要位于椎旁肌肉。

异烟肼口服吸收后广泛分布于全身液和组织中,可渗入关节腔、胸、腹水以及纤维化或干酪化的结核病灶。但其具有治疗窗窄、吸收不规则、抑制肝药酶活性等特点,普通制剂口服后血药浓度波动大,且半衰期短,因此药物在体内释放不可控,药代动力学存在明显差异^[12],使药物在结核病灶中浓度不高或骨结核硬化椎骨中难以存留并维

持有效的杀菌浓度,导致化疗效果不佳^[13]。

研究^[14]发现,改变药物剂型,可以改变药物在生物体内的分布。异烟肼以脂质体、纳米粒为载体,可显著提高其组织药物浓度。Pandey 等^[15]合成了可持续释放利福平、异烟肼、吡嗪酰胺的口服纳米粒制剂,豚鼠单剂量口服 9d 后,异烟肼仍可在血浆中被检测到,其组织药物浓度可维持 9~11d,而游离药物则在 24h 内即从血浆中清除。张慧卿等^[16]制备的蟾毒灵白蛋白纳米粒与蟾毒灵在大鼠体内进行血浆药代动力学研究显示,尾静脉注射白蛋白纳米粒后 AUC 值是对照制剂的 1.19~1.81 倍, $t_{1/2}$ 延长 2.17~2.94 倍,CL 降低为对照制剂的 55%~81%,表明白蛋白纳米粒相对于原药在血中消除减慢,在较长时间内能保持一定的血药浓度,在体内具有缓释特性。本研究所制备的白蛋白纳米粒,使用高效液相色谱法检测异烟肼的体外释药时间达到 144h,兔血浆药物浓度可持续 96h,而异烟肼普通制剂,在给药后 24h 血浆中即检测不到^[7],而载药纳米粒中异烟肼在组织中滞留时间更长。静滴 INH-RFP-BSA-NPs 溶液 120h 后,兔椎体、椎旁肌中仍能测到高于定量下限的异烟肼浓度,等剂量的普通制剂分别于给药后 48h、36h 已检测不到。药动学结果显示,兔椎体中,实验组的 AUC 值是对照组的 1.9 倍, $t_{1/2}$ 由 14.9h 延长到 55.32h,增加了 2.71 倍;椎旁肌中,AUC 值是对照组的 2.36 倍, $t_{1/2}$ 由 5.97h 延长到 25.78h,增加了 3.32 倍;CL 降低为对照制剂的 50%左右。表明 INH-RFP-BSA-NPs 显著延长了异烟肼在兔脊柱及椎旁肌的循环时间,组织内保持了一定的药物浓度,具有缓释特性。

靶向性分布的评价指标通常以 DTI、RTE 来衡量,不同载体,不同动物,INH 在组织及脏器中的分布截然不同^[17,18]。本组资料显示,兔椎体及椎旁肌组织中,实验组各时间点 INH 浓度均高于对照组;计算各时间点的 DTI 均大于 1;两药在兔椎体的 RTE 值为 1.92,椎旁肌中为 2.36。结果表明,相对于普通制剂,INH-RFP-BSA-NPs 经兔耳缘静脉注射后,INH 在兔椎体及椎旁肌组织中浓集,使其具有明显的脊柱靶向性分布优势。而对于载药纳米粒在兔脊柱靶向分布的原因,考虑为白蛋白纳米粒进入动物体内后,主要被肝脏、脾脏和骨髓等处网状内皮系统(RES)的巨噬细胞吞噬^[19],而小于 100nm 的纳米颗粒容易通过这种不连续

内皮结构,聚集于肝、肾、骨髓等组织^[20]。

本研究实际给药剂量按 INH-RFP-BSA-NPs 中异烟肼的载药量 19.8%和包封率 87.8%计算^[7],当利福平为 12mg/kg 时,异烟肼药量为 11.43mg/kg。按照此剂量所得兔血浆异烟肼药动学参数^[21]为 C_{max} : (9.71.38) μ g/g, $AUC_{0-\infty}$: (20.843.09) μ g·h/g, $t_{1/2}$: (1.920.8)h, 与人口服 300mg 异烟肼的血浆药动学参数相近^[22]。健康成人口服异烟肼后 1~2h 血药浓度可达峰值,但根据个体乙酰化快慢不一,药物在血浆中的半衰期也不同,快乙酰化者, $t_{1/2}$ 为 0.5~1.6h,慢乙酰化者为 2~5h。在前期血浆药代动力学实验中发现^[21],静脉给药后兔血浆平均 $t_{1/2}$ 为 1.92h,仅一只兔 $t_{1/2}$ 为 3.74h,其余兔 $t_{1/2}$ 均在 1.2~2h 之间,组织药代动力学研究中也发现类似现象,说明异烟肼在兔体内的消除也与乙酰化代谢酶的个体差异有关。并且,异烟肼在骨组织中的药代动力学参数与血浆中亦有差异。刘鹏等^[23]进行人体内正常骨组织与血浆药代动力学研究也发现,异烟肼在骨的半衰期较血浆有所延长。与异烟肼普通制剂血浆药动结果比较,本研究骨组织中的 $t_{1/2}$ 由 1.92h 增加至 14.9h,MRT 由 2.03h 延长至 18.92h。分析可能与药物在生物体内再分布及骨髓-血屏障导致药物吸收延迟等因素有关。

研究中还发现,实验组给药后兔腰椎及其椎旁肌组织中异烟肼浓度逐步下降,在 12h 与 48h 时间点异烟肼浓度均略有回升,其后浓度继续下降。考虑本研究选用牛血清白蛋白和聚乳酸作为药物载体,而药物从纳米粒中释放主要由扩散和聚合物的生物降解共同控制。释药早期,纳米粒表面吸附的药物快速解吸附入血,但白蛋白、聚乳酸降解速度较慢,需逐步释放其中包裹药物。体外释药实验^[7]也显示,12h 时药物释放达 60%,6d 时可释放 97.02%。并且生物体内存在多种酶类,致使药物吸收、分布存在差异,均可导致组织内浓度出现波动。

由于本研究仅观察了纳米制剂单剂量给药后兔体内药动学过程,随着研究的继续,我们将对 INH-RFP-BSA-NPs 能否穿透骨结核硬化壁,提高病灶内药物浓度,多次给药是否存在体内蓄积,以及对兔肝肾毒性等问题做进一步的考察。

4 参考文献

1. 甘艳, 郑春晓, 贾春波, 等. 异烟肼用药剂量与结核病初疗效的相关性研究 [J]. 临床和实验医学杂志, 2013, 12(14): 1111-1112.
2. 林羽, 王自立, 吕国华. 第二届全国骨关节结核病专题研讨会会议纪要[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2008, 18(11): 805-810.
3. Ohashi K, Kabasawa T, Ozeki T, et al. One-step preparation of rifampicin/poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticle-containing mannitol microspheres using a four-fluid nozzle spray drier for inhalation therapy of tuberculosis[J]. J Control Release, 2009, 135(1): 19-24.
4. Booyesen LL, Kalombo L, Brooks E, et al. In vivo/in vitro pharmacokinetic and pharmacodynamic study of spray-dried poly-(dl-lactic-co-glycolic) acid nanoparticles encapsulating rifampicin and isoniazid[J]. Int J Pharm, 2013, 444(1-2): 10-17.
5. 陈军, 易以木. 纳米粒作为肽类和蛋白质类药物的载体[J]. 药学进展, 2002, 26(1): 23-25.
6. 马利敏, 张强, 李玉珍. 载多肽和蛋白质药物的纳米给药系统的研究进展[J]. 中国药学杂志, 2000, 35(7): 437-440.
7. 马荣, 陈振, 张惠勇, 等. 载异烟肼、利福平白蛋白纳米粒的制备及其体外释药研究[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(21): 2236-2239.
8. Peng Y, Zhuang Y, Liao G. Study on bone marrow targeting daunorubicin polybutylcyanoacrylate nanoparticles [J]. J Chin Pharm, 2000, 31(2): 57-60.
9. 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, Ge Z, Jin W, et al. Treatment of spinal tuberculosis with ultrashort-course chemotherapy in conjunction with partial excision of pathologic vertebrae[J]. Spine J, 2007, 7(6): 671-681.
11. 马远征, 胡明, 才晓军, 等. 脊柱结核外科治疗的探讨[J]. 中华骨科杂志, 2005, 25(2): 68-73.
12. Rastogi R, Sultana Y, Ali A, et al. Particulate and vesicular drug carriers in the management of tuberculosis [J]. Curr Drug Deliv, 2006, 3(1): 121-128.
13. 戈朝晖, 王自立, 魏敏吉, 等. 异烟肼在脊柱结核患者不同组织中的分布[J]. 江苏医药, 2009, 35(6): 669-671.
14. Pandey R, Sharma S, Khuller GK. Lung specific stealth liposomes as antitubercular drug carriers in guinea pigs[J]. Indian J Exp Biol, 2004, 42(6): 562-566.
15. Pandey R, Khuller GK. Chemotherapeutic potential of alginate-chitosan microspheres as anti-tubercular drug carriers [J]. J Antimicrob Chemoth, 2004, 53(4): 635-640.
16. 张慧卿, 殷子斐, 盛佳钰, 等. 蟾毒灵白蛋白纳米粒与蟾毒灵在大鼠体内的药代动力学比较研究 [J]. 中西医结合学报, 2012, 10(6): 674-680.
17. Zahoor A, Rajesh P, Sadhna S, et al. Novel chemotherapy for tuberculosis: chemotherapeutic potential of econazole-and moxifloxacin-loaded PLG nanoparticles [J]. Int J Antimicrob Ag, 2008, 31(2): 142-146.
18. Deng X, Xu X, Lai Y, et al. Novel nanoparticles generated by polymeric amphiphiles with $\pi-\pi$ conjugated small molecules for anti-tumor drug delivery [J]. J Biomed Nanotechnol, 2013, 9(8): 1336-1344.
19. Li SD, Huang L. Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles[J]. Mol Pharm, 2008, 5(4): 496-504.
20. 苏华, 胡晋红, 李凤前. 白蛋白纳米粒的制备工艺及其靶向性研究进展[J]. 中国药学杂志, 2005, 40(9): 641-644.
21. 马荣, 陈振, 张惠勇, 等. 兔血浆异烟肼反相高效液相色谱分析及药代动力学研究[J]. 宁夏医科大学学报, 2014, 36(4): 417-421.
22. 曾德贵, 刘玉琴. 异烟肼人体血药浓度测定及药代动力学研究[J]. 中国药业, 2011, 20(3): 6-7.
23. 刘鹏, 江建明, 周枝凤. HPLC 法检测脊柱结核椎内外异烟肼和乙酰异烟肼浓度[J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(2): 364-367.

(收稿日期: 2015-04-13 修回日期: 2015-07-28)

(英文编审 唐翔宇/贾丹彤)

(本文编辑 彭向峰)