

## 长效缓释双药物人工骨的制备及释放特性\*

鲍玉成, 张文龙, 王勇, 张洁

天津市海河医院, 天津市呼吸疾病研究所, 天津市 300350

鲍玉成, 男, 1975年生, 天津市人, 汉族, 1999年天津市医科大学毕业, 主要从事骨科(以骨结核为主的骨病)研究。

通讯作者: 王勇, 正高级工程师, 天津市海河医院, 天津市呼吸疾病研究所, 天津市 300350  
tjs.hyywy@yahoo.com.cn

中图分类号: R318  
文献标识码: B  
文章编号: 2095-4344(2012)38-07126-05

收稿日期: 2012-04-20  
修回日期: 2012-05-30  
(20120306022/GW·W)

文章亮点: 采用聚乳酸-羟基乙醇共聚物降解材料, 包载结核药物利福平、异烟肼制备长效缓释双组分药物人工骨。

关键词: 聚乳酸-羟基乙醇; 微球体; 药物释放; 利福平; 异烟肼

缩略语: 聚乳酸-羟基乙酸共聚物: poly(lactic-co-glycolic acid, PLGA)

### 摘要

背景: 利用可降解缓释生物材料包载利福平或异烟肼制成 50 μm 以下的缓释降解肺靶向微球已多有报道, 主要用于静脉注射肺靶向治疗研究。

目的: 研制长效缓释双组分药物人工骨, 筛选最佳制备工艺并行体外释药特性观察。

方法: 采用乳剂-溶剂挥发法正交设计优化制备工艺, 分别制备利福平聚乳酸-羟基乙醇共聚物微球和异烟肼聚乳酸-羟基乙醇共聚物微球。利用生物黏合剂将两种微球加工成长效缓释双组分药物人工骨。

结果与结论: 按照优化工艺分别制得聚乳酸-羟基乙醇共聚物载利福平 26%、异烟肼 28% 的微球, 并按质量各 50% 制成人工骨, 体外释放 90 d 保持 0.02, 0.03 mg/L 药物浓度。表明该人工骨有望为骨结核治疗提供一种新型的方法。

### Preparation and release features of long-term slow-release two-component drug artificial bone

Bao Yu-cheng, Zhang Wen-long, Wang Yong, Zhang Jie

### Abstract

**BACKGROUND:** Studies have shown that rifampicin or isoniazid covered with biodegradable sustained release materials can be used to prepare pulmonary targeting microspheres with less than 50 μm sustained-release degradation, which are mainly used for lung targeted therapy via the intravenous injection.

**OBJECTIVE:** To develop long-term slow-release two-component drug artificial bone and to select the optimal preparation process of drug release as well as to observe the characteristics of *in vitro* releases.

**METHODS:** Orthogonal design was adopted to optimize the preparation technology using the emulsion-solvent evaporation method of preparation technology. We prepared rifampicin poly(lactic-co-glycolic acid) copolymer microspheres and isoniazid poly(lactic-co-glycolic acid) copolymer microspheres. Biological binder was used to process these two kinds of microspheres into long-term slow-release two-component drug artificial bone.

**RESULTS AND CONCLUSION:** According to the process optimization, two kinds of poly(lactic-co-glycolic acid) copolymer microspheres carrying 26% rifampicin or 28% isoniazid were prepared successfully, which were used to prepare artificial bone at a quality of 50%. The drug concentrations were kept at 0.02 and 0.03 mg/L after 90 days of *in vitro* release. These findings indicate that this kind of artificial bone is expected to provide a new and effective treatment for bone tuberculosis.

Bao YC, Zhang WL, Wang Y, Zhang J. Preparation and release features of long-term slow-release two-component drug artificial bone. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(38): 7126-7130.

## 0 引言

骨结核是常见的继发性肺外结核,占全部肺外结核病的5%-10%,其中约半数累及脊柱<sup>[1-2]</sup>,如延误诊治可造成患者终生残疾,甚至死亡。脊柱结核作为骨结核的最常见形式,近年来呈上升趋势<sup>[3-4]</sup>。利福平、异烟肼等药物对结核杆菌敏感,同时给药可以透入细胞内杀灭和抑制细胞内外的结核杆菌。但长期大量口服往往会引起各种不良反应,造成肝肾等器官的损害<sup>[5-6]</sup>。如何解决病灶清除后骨缺损部位的力学支撑、抑制局部结核病灶脓肿复发、提高药物的生物利用度、减低药物的不良反应等问题,使得结核病灶部位保持有效药物浓度,又不损害其他器官是急待解决的问题<sup>[7]</sup>。目前利用可降解缓释生物材料包载利福平或异烟肼制成50 μm以下的缓释降解肺靶向微球已多有报道,主要用于静脉注射肺靶向治疗研究<sup>[8-10]</sup>。而利用聚乳酸-羟基乙酸共聚物(poly (lactic-co-glycolic acid), PLGA)分别包载利福平和异烟肼制成200-400 μm球并将两种微球按一定比例黏结成长效缓释双组分药物人工骨,修复骨缺损同时治疗骨结核在国内外鲜见报道。

本文以生物降解性高分子材料PLGA分别包载利福平和异烟肼制成200-400 μm大球,用生物黏合剂将两种含药微球按一定比例黏合制成一定形状可缓释降解人工骨,放置于骨缺损部位,利用微球降解释药过程保持病灶部位药物有效浓度,起到抑制杀死结核杆菌作用,又利用微球之间的间隙及降解过程中产生的空隙为骨细胞生长提供空间并起支撑作用。通过正交试验优化PLGA包载利福平和异烟肼微球的制备工艺条件,确定载药缓释人工骨制备工艺,观察人工骨体外缓释降解行为,为进一步的临床应用进行探索性研究(体内释药特性及生物相容性、安全性研究另文报道)。

## 1 材料和方法

设计:观察性实验。  
和微球直径是两个重要的参数指标,它涉及到人工骨

时间及地点:于2010-06/2011-10在天津市海河医院完成。

材料:

主要试剂及仪器:

试剂与仪器	来源
利福平批号 201011056,异烟肼批号 T2010226	沈阳红旗制药厂
PLGA(乳酸与羟基乙醇比例 80 20,相对分子量 150 000)	山东岱罡生物科技有限公司
聚乙烯醇	北京化学试剂公司
乙腈、甲醇为色谱纯,二氯甲烷(DCM)分析纯	天津市化学试剂一厂
生物医用黏合剂(a-氰基丙烯酸烷基酯)	广东龙心医疗器械有限公司
恒温振荡培养箱	上海实验仪器厂有限公司
LC-10A 高效液相色谱仪(日本岛津):N-2000 色谱工作站	浙江大学智能工程研究所
恒温磁力搅拌器	荣华仪器制造有限公司
光学显微镜	OLYMPUS IX71 Japan

实验方法:

利福平PLGA微球的制备:采用乳化溶剂挥发法制备利福平PLGA微球<sup>[11-12]</sup>。准确称取利福平和PLGA各700 mg,分别溶解在10 mL二氯甲烷溶剂中。超声振荡下分散均匀。在搅拌下将此乳液注入到2%聚乙烯醇水溶液中,在4 温度下搅拌1.0-2.0 h使溶剂挥发过滤干燥收集微球。

正交试验设计优化利福平PLGA微球制备工艺:选定4个因素,反应温度(A),PLGA与利福平质量之比(B),聚乙烯醇质量分数浓度(C),搅拌速率(D),每种因素选择3个水平,见表1,按L<sub>9</sub>(3)<sup>4</sup>正交试验设计。

表1 正交试验设计因素水平表  
Table 1 Orthogonal experimental design factors and levels table

Level	Factor			
	T A ( )	PLGA/RFP B (ratio)	PVA C (%)	Stirring speed D (r/min)
1	30	1.3:1	0.8	350
2	40	1.5:1	1.2	450
3	50	2.0:1	1.6	550

PLGA: poly(lactic-co-glycolic acid); RFP: rifampicin;  
PVA: polyvinyl alcohol; A: reaction temperature; B: PLGA and RFP quality ratio; C: the concentration of PVA mass fraction; D: mixing rate

根据载药缓释人工骨应用过程中微球载量  
的降解时间和降解过程中病灶部位的药物浓

Tianjin Haihe Hospital, Tianjin Respiratory Disease Research Institute, Tianjin 300350, China

Bao Yu-cheng, Tianjin Haihe Hospital, Tianjin Respiratory Disease Research Institute, Tianjin 300350, China

Corresponding author: Wang Yong, Senior engineer, Tianjin Haihe Hospital, Tianjin Respiratory Disease Research Institute, Tianjin 300350, China  
tj.s.hyywy@yahoo.com.cn

Supported by: the Science and Technology Foundation of Tianjin Health Bureau, No. 2010KY10\*

Received: 2012-04-20  
Accepted: 2012-05-30

度。因而以微球球径分布百分比 $S_1$ 和微球载药率 $S_2$ 之和 $S(S=S_1+S_2)$ 作为评价指标<sup>[13]</sup>。S值愈高, 微球质量愈好。理想微球直径为200-300  $\mu\text{m}$ 。

微球球径分布百分比测定方法: 光学显微镜下计数不少于500个微球, 标尺测定微球大小,  $S_1=(\text{微球个数}/\text{微球总数})\times 100\%$ 。 $S_2=(\text{微球中药物的含量}/\text{微球的总质量})\times 100\%$ 。结果见表2。

表2  $L_9(3)^4$  正交试验设计与结果  
Table 2  $L_9(3)^4$  orthogonal experimental design and results

Test No	Factor				$S_1$	$S_2$	S
	A	B	C	D			
1	1	1	1	1	45.2	25.3	70.5
2	1	2	2	2	50.3	20.1	70.4
3	1	3	3	3	30.4	19.8	50.2
4	2	1	3	3	27.9	15.4	43.3
5	2	2	2	1	60.5	19.3	79.8
6	2	3	1	2	55.4	26.0	81.4
7	3	1	3	2	20.4	20.2	40.6
8	3	2	1	3	32.3	17.3	49.6
9	3	3	2	1	43.2	15.6	58.8
$K_1$	191.1	154.4	201.5	209.1			
$K_2$	201.5	199.8	199.8	192.4			
$K_3$	149.0	190.4	134.1	143.1			
R	52.5	45.4	67.4	66.0			

A: reaction temperature; B: poly(lactic-co-glycolic acid) and rifampicin quality ratio; C: the concentration of polyvinyl alcohol mass fraction; D: mixing rate;  $S_1$ : micro-sphere diameter distribution percentage;  $S_2$ : microspheres drug loading; S= $S_1+S_2$

异烟肼PLGA微球的制备及正交试验设计优化: 同样采用乳化溶剂挥发法制备异烟肼PLGA微球<sup>[11-12]</sup>。正交试验设计优化方案与利福平PLGA微球制备工艺相同。

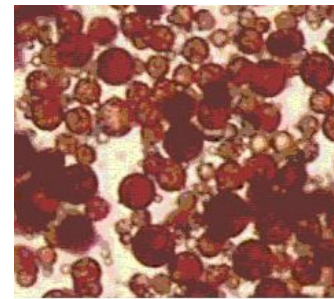
载药缓释人工骨的制备与体外释药研究: 分别取载药率26%的利福平微球和载药率28%的异烟肼微球各100 mg加入30 mg生物医用黏合剂, 混合均匀在模具中压制1h成长方型, 得到的含药缓释降解人工骨, 孔隙率为35%。

准确称取载药人工骨60 mg, 置于一透析袋中, 两端扎紧, 加pH=7.4的PBS 3 mL, 然后分别放入盛有30 mL pH=7.4的PBS广口瓶中, 密封后放入37 的恒温振荡箱中, 定时取样30 mL, 每次取样后须及时将透析袋移入同样的缓冲液30 mL广口瓶中。高效液相色谱法[岛津HPLC LC-10A, 色谱柱 Shim-pack VP-ODS (5  $\mu\text{m}$ , 250 mm $\times$ 4.6 mm)]测定取出液中的利福平和异烟肼浓度, 利福平、异烟肼化学对照品购自中国药品生物制品检定所。

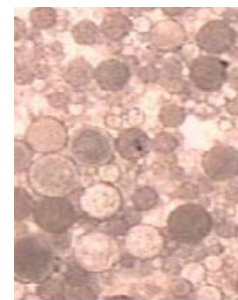
主要观察指标: 载药缓释人工骨及其体外释药性能。

## 2 结果

2.1 利福平PLGA与异烟肼PLGA微球的制备结果  
利福平PLGA微球直径200-300  $\mu\text{m}$ , 载药率为26%, 见图1a。异烟肼PLGA微球直径200-300  $\mu\text{m}$ , 载药率为28%, 见图1b。



a: PLGA microsphere carrying rifampicin

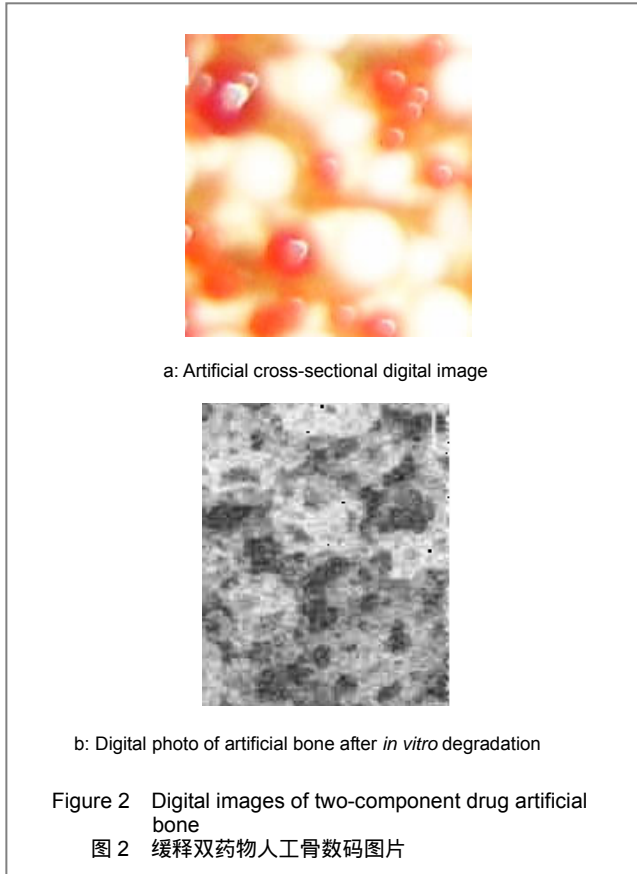


b: PLGA microsphere carrying isoniazid

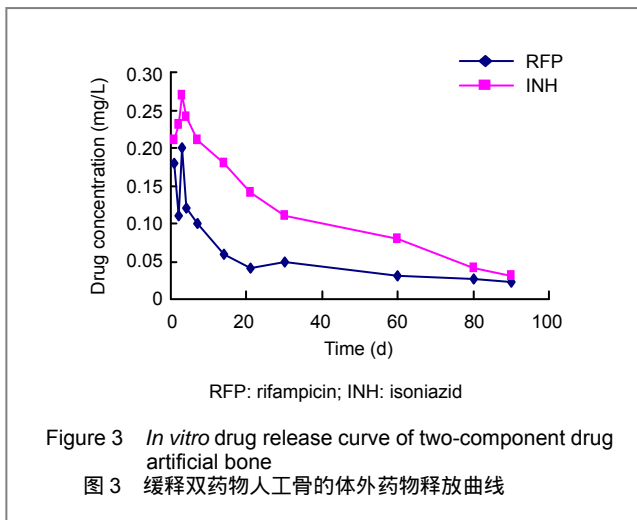
Figure 1 Light microscope images of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) copolymer microspheres carrying rifampicin and isoniazid ( $\times 10$ )

图1 光镜观察利福平聚乳酸-羟基乙醇共聚物与异烟肼聚乳酸-羟基乙醇共聚物微球( $\times 10$ )

2.2 缓释双药物人工骨的制备及释放特性结果 通过正交试验所得结果进行直观分析, 可见4个因素作用大小依次为聚乙烯醇浓度、搅拌速度、反应温度、PLGA与利福平(异烟肼)质量之比。最佳生产工艺为 $A_2B_3C_1D_2$ 。用 $A_2B_3C_1D_2$ 工艺重复试验3次结果均相同, 说明此工艺具有一定的稳定性。正交试验优化了利福平PLGA、异烟肼PLGA微球的制备工艺。获得了PLGA利福平粒径范围(200-300  $\mu\text{m}$ )占60%、载药率为26%微球和PLGA异烟肼粒径范围(200-300  $\mu\text{m}$ )占65%、载药率为28%微球。两种微球各50%比例制成人工骨, 由图2a可以看出颜色深的为利福平微球, 颜色浅的为异烟肼微球, 中间颜色为黏合剂, 两种微球均匀分布在人工骨中, 体外降解释放后成多孔松散状见图2b。



体外释放表明两种药物在第3天左右有个突释现象, 其后药物释放相对较快, 20 d以后药物开始平稳释放, 90 d测得利福平、异烟肼浓度分别为0.02, 0.03 mg/L。药物释放曲线见图3。



### 3 讨论

目前骨结核的临床治疗除常规的全身抗结核治疗外, 常采用病灶清除, 清除病灶内病变组织如脓液、

死骨、坏死组织。然后在空腔内放置适量抗结核药物, 容易出现药物吸收快, 难以维持较长时间的有效浓度<sup>[14]</sup>。

叶向阳等<sup>[15]</sup>用(利福平-PLGA)微球按不同比例分别与磷酸钙复合制备载有利福平-PLGA微球的多孔磷酸钙骨水泥。结果显示药物能较长时间缓释, 在结核病灶局部能长时间维持有效的利福平药物浓度, 但释药方式单一。Sachs和伍卫刚等<sup>[16-17]</sup>分别采用三维打印技术制备了包载利福平和异烟肼两种药物多层结构的人工骨, 体外药物释放呈现了异烟肼和利福平逐一交替释放的药物控制释放特性。

目前含药缓释降解人工骨治疗骨结核研究多有报道, 制备方法各异, 真正做到药物能够长期平稳释放且药物浓度满足抑菌杀菌作用、满足骨强度要求及人工骨内部空间结构适合骨细胞生长繁殖的人工骨还需要不断努力。

载药微球法可以制备含有多种抗结核药物PLGA微球人工骨, 可实现多种药物联合、规律局部给药、达到有效抗菌治疗的目的。该人工骨90 d释放利福平和异烟肼能够分别保持0.02, 0.03 mg/L有效治疗浓度<sup>[18]</sup>, 有望为临床治疗骨结核用人工骨提供一种新型有效的制备方法。

致谢: 感谢天津市第三中心医院于美丽教授在材料制备方面给予的帮助和支持。

### 4 参考文献

- [1] Huang JS, Shen M, Sun YL, et al. Zhonghua Jiehe he Huxi Zazhi. 2000;23(10):606-608. 黄建生, 沈梅, 孙亚玲, 等. 上海市肺外结核的流行病学分析[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2000, 23(10):606-608.
- [2] Wang X, Jing X, Cui HC. Zhongguo Jiaoxing Waikexue. 2005; 13(24):1909-1910. 王鑫, 荆鑫, 崔后春. 脊柱结核的外科治疗及康复[J]. 中国矫形外科杂志, 2005, 13(24):1909-1910.
- [3] Xu PY. Yixue Zongshu. 2010;16(19):2982-2984. 许鹏雍. 脊柱结核的外科治疗进展[J]. 医学综述, 2010, 16(19): 2982-2984.
- [4] Zhang H, Jiang SW. Zhongguo Yixue Kexueyuan Xuebao. 2009;31(4):393-395. 张慧, 姜世闻. 王黎霞我国结核病防治工作形势分析[J]. 中国医学科学院学报, 2009, 31(4):393-395.
- [5] Xu XQ. Xibu Yixue. 2011;23(12):2468-2468. 徐孝强. 抗结核药致肝肾衰竭死亡1例[J]. 西部医学, 2011, 23(12): 2468-2468.
- [6] Huang JT, Yaowu Buliang Fanying Zazhi. 2010;12(3):182-187. 黄坚彤. 异烟肼相关多器官功能障碍综合征[J]. 药物不良反应杂志, 2010, 12(3):182-187.

- [7] Zhang WL,Wang Y,Bao YC.Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(3):503-506.  
张文龙,王勇,鲍玉成.组织工程及缓释体系中聚乳酸类医用材料的应用[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(3):503-506.
- [8] Yang YN,Lou L,Liang QZ,et al.Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao. 2004;125(1):62-165.  
杨亚楠,娄玲,梁奇志,等.生物降解聚酯包埋利福平缓释微球的制备及释放行为[J].高等学校化学学报,2004,125(1):62-165.
- [9] Luo PP,Zuo Y,Sun B,et al.Gongneng Cailiao. 2011;2(8):1410-1414.  
罗培培,左奕,孙斌,等.载异烟肼聚己内酯微球的制备及其性质研究[J].功能材料,2011,2(8):1410-1414.
- [10] Zhang S,Gao X,Shen K,et al.Evaluation of poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres for the lung-targeting of yuanhuacine, a novel DNA topoisomerase I inhibitor.J Drug Target.2009;17(4):286-293.
- [11] Ye XY,Sun X,Jia HW,et al.Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(51):9608-9612.  
叶向阳,孙湘,贾会文,等.利福平/聚乳酸-聚羟基乙酸缓释微球的制备及特性[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(51):9608-9612.
- [12] Xie HJ,Li M,Deng Y,et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu.2009;13(51):10039-10044.  
谢红炬,李明,邓颖,等.碱性成纤维细胞生长因子-聚乳酸-聚羟基乙酸共聚物微球的体外释药规律:具有促进兔静脉皮瓣成活的作用[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,13(51):10039-10044.
- [13] Jin H,Wu C,Mei XG.Zhongguo Yaoxue Zazhi. 2006;5(22):1723-1725.  
靳浩,吴诚,梅兴国.多指标综合评价法优选阿霉素微球的制备工艺及体内的初步考察[J].中国药理学杂志,2006,5(22):1723-1725.
- [14] Liu RZ,Huang JF,Liang JH.Guangxi Zhongyi Xueyuan Xuebao. 2010;3(3):69-70.  
刘汝专,黄军锋,梁锦辉.脊柱结核的外科治疗进展[J].广西中医学院学报,2010,3(3):69-70.
- [15] Ye XY,Zhen P,Li XF. Zhongguo Jiaoxing Waikexue Zazhi. 2010;18(23):1981-1986.  
叶向阳,甄平,李晓飞.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.
- [16] Sachs E,Cima M,Williams P,et al.Three-dimensional printing: Rapid tooling and prototypes directly from a CAD model.J Eng Ind.1992;114(4):481-488.
- [17] Wu WG,Zheng QX,Guo XD.Zhongguo Shengwu Yixue Gongcheng Xuebao. 2010;29(1):137-142.  
伍卫刚,郑启新,郭晓东.利福平-异烟肼-控释型载药人工骨的实验研究[J].中国生物医学工程学报,2010,29(1):137-142.
- [18] Jiang NX.Beijing:Renmin Weisheng Chubanshe. 1989:353-354.  
江明性.药理学[M].3版.北京:人民卫生出版社,1989:353-354.

来自本文课题的更多信息--

**基金声明:** 天津市卫生局科技基金项目(2010KY10)。

**作者贡献:** 第二作者进行实验设计,实验实施为第一、四作者,实验评估及资料收集为第三作者,第一作者成文,第二作者审校,第一作者对文章负责。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主直接或间接的经济或利益的赞助。

**文章概要:**

**文章要点:** 目前含药缓释降解人工骨治疗骨结核研究多有报道,制备方法各异,真正做到药物能够长期平稳释放且药物浓度满足抑菌杀菌作用、满足骨强度要求及人工骨内部空间结构适合骨细胞生长繁殖的人工骨还需要不断努力。采用 PLGA 降解材料,包载结核药物利福平、异烟肼制成含药微球,用生物黏合剂粘年结成缓释降解人工骨,体外观察药物释放和降解情况。

**关键信息:** 载药微球法可以制备含有多种抗结核药物 PLGA 微球人工骨,可实现多种药物联合、规律局部给药、达到有效抗菌治疗的目的。体外释放 90 d,利福平、异烟肼能够分别保持 0.02, 0.03 mg/L 药物浓度。

**研究的创新之处与不足:** 以生物降解性高分子材料 PLGA 分别包载利福平和异烟肼制成 200-400 μm 大球,用生物黏合剂将两种含药微球按一定比例黏合制成一定形状可缓释降解人工骨,放置于骨缺损部位,利用微球降解释药过程保持病灶部位药物有效浓度,起到抑制杀死结核杆菌作用,又利用微球之间的间隙及降解过程中产生的空隙为骨细胞生长提供空间并起支撑作用。通过正交试验优化 PLGA 包载利福平和异烟肼微球的制备工艺条件,确定载药缓释人工骨制备工艺,观察人工骨体外缓释降解行为,为进一步的临床应用进行探索性研究。制成含多药降解缓释人工骨,能够保持病灶部位药物治疗有效浓度并减少肝肾损伤。在骨生长过程中材料降解排出体外。进一步应测量骨的力学性能、孔隙率并观察骨细胞生长情况。

**作者声明:** 文章为原创作品,数据准确,内容不涉及泄密,无一稿两投,无抄袭,无内容剽窃,无作者署名争议,无与他人课题以及专利技术的争执,内容真实,文责自负。