

• 实验研究 Experimental Research •

# 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

叶向阳<sup>1</sup>, 甄平<sup>2\*</sup>, 李晓飞<sup>1</sup>, 赵东华<sup>1</sup>, 高明暄<sup>3</sup>

(1. 兰州大学第二临床医学院, 兰州 730000; 2. 兰州军区总医院, 兰州 730050  
3. 第四军医大学西京医院, 西安 710000)

**摘要** [目的] 制备一种新型抗结核多孔磷酸钙骨水泥缓释载体, 研究其体内外性能。[方法] 复乳溶剂挥发法制备利福平-聚乳酸-聚羟基乙酸共聚物微球(利福平-PLGA 微球), 测定载药量, 包封率并行体外缓释实验。将微球以 10%、20%、30% (W/W) 的比例分别与磷酸钙骨水泥(CPCs)复合, 制备载有利福平-PLGA 微球的多孔磷酸钙骨水泥, 测定材料的孔隙率及抗压强度, 筛选出合适比例。将材料的浸提液与 Wistar 大鼠骨髓间充质干细胞(hMSCs)共培养, 以 MTT 法测定增殖率, 成骨能力以试剂盒检测碱性磷酸酶的水平。将利福平-PLGA 微球-CPCs (实验组)及利福平-CPCs (对照组)分别制成相同直径的圆柱状试件, 分别植入新西兰大白兔的双侧股骨髓中, 于术后 2、4、8、12 周取植入区旁的髂旁肌, 高效液相色谱法测定局部组织药物浓度。术后 12 周取各组骨标本行组织切片观察, 评价材料降解情况及骨组织生长情况。[结果] 10%、20%、30% 利福平-PLGA 微球-磷酸钙骨水泥试件的总孔隙率, 大孔率和抗压强度分别为 (54.76±1.31)%、(13.67±1.62)%、(11.89±0.96) MPa; (63.76±1.35)%、(23.87±1.67)%、(4.8±0.68) MPa; (72.97±1.10)%、(37.87±2.08)%、(1.03±0.65) MPa。hMSCs 在利福平/PLGA 微球-磷酸钙骨水泥复合材料上生长较好, 细胞增殖及碱性磷酸酶水平与空白对照组有明显差异 ( $P < 0.05$ ), 依据生物材料细胞毒性实验琼脂覆盖法测定材料细胞毒性为 0-I 级。利福平缓释效果优于利福平-CPCs 组 ( $P < 0.05$ ), 且利福平-PLGA 微球-CPCs 能在较长时间内保持在利福平的最低抑菌浓度 (MIC) 10 倍以上。利福平-PLGA 微球-CPCs 试件植入体内 12 周时, 材料降解明显快于利福平-CPCs 试件组, 实验组材料植入区的骨长入率为 (84.56±1.47)%, 明显高于对照组的 (10.56±1.34)% ( $P < 0.05$ )。[结论] 利福平-PLGA 微球可显著提高磷酸钙骨水泥的孔隙率促进其降解, 微球降解形成互相连通的大孔隙 (> 50  $\mu$ m) 显著提高了骨细胞的长入率, 从而加速 CPCs 降解; 同时利福平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抗结核药物浓度, 有望达到有效降低骨结核术后复发率的目的, 可用于结核性骨缺损的修复与骨重建。

**关键词:** 多孔磷酸钙骨水泥, 聚乳酸-聚羟基乙酸微球, 结核性骨缺损, 结核复发, 缓释

**中图分类号:** R687 **文献标志码:** A **文章编号:** 1005-8478 (2010) 23-1981-06

**Study on preparation and properties of novel anti-TB porous calcium phosphate cement//** YE Xiang-yang, ZHEN Ping, LI Xiao-fei et al. Department of Traumatic Orthopedics, Second Clinical College of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

**Abstract** [Objective] To develop a novel anti-TB porous calcium phosphate cements (CPCs) by incorporating the rifampicin-banded poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres (RFP-PLGA Ms) and to evaluated the performance of the composite as a bone substitute in vitro and in vivo. [Methods] RFP-PLGA Ms were prepared using a double-emulsion solvent-extraction [(water-in-oil) - in-water] technique. Drug-carried rate, envelopment rate and the characteristics of drug release in vitro were developed. Porous CPCs were developed using RFP-PLGA Ms with their different weight ratios (10%, 20%, 30%). The porosity and the compression strength of the three composites were measured to determine the proper weight ratio of RFP-PLGA Ms. Wistar rat bone marrow stromal stem cells were also cultured with different leaching liquor of three kinds of materials (20% RFP-PLGA-CPCs, RFP-CPCs, CPCs). Cell viability analysis was performed by MTT as

作者简介: 叶向阳 (1978-), 男, 河南省桐柏县人, 主治医师, 在读硕士, 研究方向: 骨组织工程与修复, (电话) 0931-8995210, 13919884511, (电子信箱) yexiang2008@163.com

\* 通讯作者: (电话) 0931-8995287, (电子信箱) zhenpingok@163.com

(10%, 20%, 30%). The porosity and the compression strength of the three composites were measured to determine the proper weight ratio of RFP-PLGA Ms. Wistar rat bone marrow stromal stem cells were also cultured with different leaching liquor of three kinds of materials (20% RFP-PLGA-CPCs, RFP-CPCs, CPCs). Cell viability analysis was performed by MTT as

say and alkaline phosphatase was measured with alkaline phosphatase kit At 2, 4, 8 and 12 weeks after implanted in the rabbits femoral condyle. The muscles beside the femoral condyle were obtained and RFP in the muscles were measured by high performance liquid chromatography (HPLC). At 12 weeks the samples with the materials were obtained and evaluated by pathological anatomy. [Results] For the 10%, 20%, 30% of RFP-PLGA-CPCs composites, the total porosity, large porosity and compressive strength were  $(54.76 \pm 1.31)\%$ ,  $(13.67 \pm 1.62)\%$  and  $(11.89 \pm 0.96) \text{ MPa}$ ,  $(63.76 \pm 1.35)\%$ ,  $(23.87 \pm 1.67)\%$  and  $(4.8 \pm 0.68) \text{ MPa}$ ,  $(72.97 \pm 1.10)\%$ ,  $(37.87 \pm 2.08)\%$  and  $(1.03 \pm 0.65) \text{ MPa}$ . The material cytotoxicity was 0 - I level by agar overlay test. RFP release in RFP-PLGA-CPCs group was better than in RFP-CPCs group ( $P < 0.05$ ), and the former maintained the RFP level at a minimum inhibitory concentration (MIC) over 10 times for a longer period. At 12 weeks RFP-PLGA-CPCs were implanted and the degradation of RFP-PLGA-CPCs was significantly faster than in the control group. The former of bone ingrowth rate was  $(84.56 \pm 1.47)\%$ , significantly higher than  $(10.56 \pm 1.34)\%$  ( $P < 0.05$ ). [Conclusion] RFP-PLGA Ms can significantly increase CPC porosity and promote its degradation. RFP can release for a long time and maintain an effective local anti-tuberculosis drug concentration, thus reducing the recurrence rate of bone tuberculosis. It can be used to repair tubercular skeletal defect.

**Key words** porous calcium phosphate cements; poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres; tubercular skeletal defect; tuberculosis recurrence; release

骨关节结核是最常见的肺外结核之一。随着全球结核病发病率的上升,骨关节结核呈明显回升趋势。目前骨关节结核的外科治疗通常是病灶清除加自体骨充填,同时局部一次性置入常规剂型抗结核药物。这种方法的缺点是自体骨有限,填充不完全,自体骨短期内被吸收,抗结核药物很快被稀释或被代谢,抗结核作用有限。因此骨结核病灶术后结核复发率很高。如何在病灶清除后充分填充结核性骨缺损空腔,重建骨的连续性,同时在结核病灶局部长期维持足量的抗结核药物浓度,以防结核复发,从而有效降低骨结核术后的复发率,这是外科治疗骨关节结核所追求的理想目标。利用缓释技术结合最新可降解生物材料有望达到这一目标。本实验采用缓释技术制备利福平-聚乳酸-聚羟基乙酸微球,并采用“枣糕相嵌”原理将缓释微球复合磷酸钙骨水泥制备一种新型抗结核多孔磷酸钙骨水泥缓释载体,并对体内外缓释特性和体内降解情况、新骨生长情况进行了系列初步研究,以期为临床寻找一种理想的结核性骨缺损的功能性修复材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要设备及试剂

78HW-1型恒温磁力搅拌器(杭州仪表电机厂); LGJ冷冻干燥机(军事医学科学院实验仪器厂); 医用离心机(北京仪器厂); K70倒置相差显微镜(日本 Olympus公司); 超速离心机(美国 Beckman公司); Malvern激光粒度分析仪(Malvern Mastersizer 2000型,英国); 550型酶联免疫仪(美国 Bio-Rad公司); 万能材料试验机(AG-2000G,日本 Shimadzu公司); 扫描电镜(JSM-5600,日本 Jeol公司), 莱卡硬组织切片机(德国 Leica公司), Agilent 1100高效液相色谱仪

(美国惠普公司)。CPCs(上海瑞邦公司); MTT、DM-SO(美国 Sigma公司), DMEM培养液(美国 Gibco公司); 胎牛血清(兰州民海生物公司); 四环素(哈尔滨制药厂); 钙黄绿素(日本 Dojindo公司); 碱性磷酸酶检测试剂盒(南京建成公司); 利福平原药(美国 Sigma公司); 利福平标准品(中国药品技术监督管理局); PLGA(50:50聚乳酸-聚羟基乙酸共聚物,山东岱罡生物公司), 二氯甲烷、乙腈、聚乙烯醇等均为色谱纯。

### 1.2 利福平-PLGA微球、利福平-PLGA微球-CPCs及利福平-CPCs的制备

以复乳-溶剂挥发法制备利福平-PLGA微球<sup>[1-2]</sup>: 准确称取利福平原药和 PLGA 各 200 mg 共溶于 2 mL 二氯甲烷中,充分溶解混匀形成油相。置于 4℃ 冰块上高速磁力搅拌,待混匀时将 2% 的聚乙烯醇(PVA)缓慢加入其中。待搅拌均匀后,速度调为 300 r/min,持续搅拌过夜挥发二氯甲烷,固化微球。将乳液离心分离,离心得到的固体以 PBS 液洗涤。再次离心分离,反复洗涤、离心 3 次,见微球混悬于 PBS 液中。最后将离心得到的固体置于玻璃皿中,放入低温冷冻真空干燥机中干燥 24 h,直到固体粉末质量恒定不变。-20℃ 保存备用。以 10%、20%、30% (W/W) 的比例将利福平-PLGA 微球与 CPCs 粉末充分混合,固液比 2.5:1 进行固化,混合物浆体注入直径 4 mm,高 10 mm 的不锈钢圆柱体模具,模具于 37℃ 的生理盐水中浸泡 3 d 脱模,冻干后精确测定材料体积及重量,以下列公式计算材料总孔隙率( $P_{\text{总}}$ )及大孔隙率( $P_{\text{大}}$ ): (1)  $P_{\text{总}} = (D_{\text{HA}} - D_{\text{样品}}) / D_{\text{HA}}$ ; (2)  $P_{\text{大}} = 1 - D_{\text{释}} / D_{\text{CPC}}$ , 其中  $D_{\text{HA}}$  羟磷灰石的密度(3.14

$g/cm^3$ ,  $D_{样品}$  为实验样品的密度,  $D_{CPCs}$  为磷酸钙骨水泥的密度。脱模样品进行生物力学压缩实验, 样品断裂面喷金, 电镜扫描观察其形态结构。根据孔隙率、大孔隙率、抗压强度及最适合骨细胞长入的孔隙率要求, 笔者认为 20% 的比例最佳。

利福平 - CPCs 的制备: 以质量百分含量 6.64% (按照利福平 - PLGA 微球的载药量 33.18% 换算成相同质量百分含量的利福平) 的比例将利福平原药与 CPCs 粉末混合, 固液比 2.5:1 进行固化, 混合物浆体注入直径 4 mm、高 10 mm 的不锈钢圆柱体模具固化, 脱模, 冻干待用。同样制备直径 4 mm、高 10 mm 的 CPCs 圆柱状试件备用。

### 1.3 利福平 - PLGA 微球的形态观察、载药量、包封率及体外缓释实验

光学显微镜下观察 200 粒微球, 采用 Leica QW in 分析软件测量微球的直径, 计算平均粒径及跨距。微球包涂金粉后粘于导电胶带上, 电镜下观察其形态。

采用高效液相色谱仪法测定载药量和包封率。称取利福平 - PLGA 微球 23 mg 置于透析袋 (截留分子量 7000-12000) 中, 加入 1 ml pH 为 7.4 的 PBS, 使其悬浮于 PBS 液中; 将透析袋封口后置入盛有 10 ml PBS 的试管中, 封口, 于 37°C 恒温气浴振荡器中震荡孵育; 并于 1、2、3、7、14、21、28、35、42 d 分别从试管中取出 10 ml 液体 (-20°C 冻存待检), 同时加入 10 ml PBS 于试管内。用高效液相色谱法检测上述样本中利福平含量。并以时间为横坐标, 累积释放浓度为纵坐标绘图。

### 1.4 材料体外细胞相容性实验

利福平 - PLGA 微球 - CPCs 试件, 利福平 - CPCs 试件, CPCs 试件分别浸入含 10% 的 DMEM/F12 培养液中, 浸提 24 h 后离心取上清液, 24 孔板浸提液作为空白对照组, 均保存于 4°C 条件下备用。消化法培养 Wistar 大鼠的骨髓基质干细胞 (rBMSCs), P<sub>1</sub> 代或 P<sub>2</sub> 代用于实验。rBMSCs 以  $1 \times 10^3$  个/ml 接种于材料上, 静置 2 h 后加入培养液浸没材料, 培养 48 h 后取出材料以 2% 戊二醛固定, 酒精梯度脱水, 喷金后电镜扫描观察。以  $1 \times 10^3$  个/ml 接种于 96 孔板, 每孔加入 100  $\mu$ l 在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养 24 h 后, 加入不同试件的浸提液 100  $\mu$ l 2 d 后行 MTT 实验, 加入 MTT 20  $\mu$ l 4 h 后加入 DMSO 150  $\mu$ l 震荡, 酶联免疫法测量在 570 nm 波长测定吸光度 (OD)。将 rBMSCs 以  $1 \times 10^5$  个/ml 接种于 24 孔板, 24 h 后换用不同材料的浸提液 300  $\mu$ l 培养 6 d 后加入  $\beta$ -磷酸甘油 (10 mmol/L), 维生素 C (50  $\mu$ g/ml), 地塞米

松 ( $10^{-5}$  mmol/L) 诱导分化, 继续浸提液培养 1 周, 以试剂盒检测各组的 ALP 水平。

### 1.5 材料体内试验

新西兰大白兔 28 只 (由兰州生物制品研究所动物中心提供, 雌雄各半, 体重 2.0~2.5 kg), 其中 24 只随机分为 4、8、12 周 3 个时间组, 每组 8 只; 另外 4 只随机分为 1、2 周每组 2 只, 用于测定植入区附近药物浓度。3% 戊巴比妥钠耳缘静脉麻醉后, 显露双侧股骨外髁, 用 4.0 mm 钻头由股骨外侧髁沿水平方向向内髁侧钻孔, 深度约 5 mm, 生理盐水冲洗骨缺损孔后分别将利福平 - PLGA - CPCs、利福平 - CPCs 试件填入双侧的骨洞中, 缝合肌膜及皮肤。放回笼内分组饲养。12 周组取材后 10% 甲醛固定, HE 染色, 光镜下观察新骨的形成与材料的降解情况。

取 12 周实验组及对照组 HE 染色切片进行成骨的组织计量学测定, 每组动物有 5 只, 每个标本分别在股骨外髁内、中、外取 3 张矢状位组织切片, 因此每组动物共有 15 张组织切片供形态计量定量分析。低倍镜下采集图像, 包括完整的骨缺损区域, 采用 Leica QW in 图像分析计算机测量系统测出植入物区域及骨长入区域的面积。根据以下公式计算出骨长入率:

骨长入率 (%) = 骨长入区域面积 / 植入物区域面积  $\times$  100%, 然后以 SPSS 17.0 进行单变量非配对 *t* 检验统计比较。取 3 d、1、2、4、8、12 周的实验组和对照组的植入区髁旁肌组织密封低温冻存、匀浆, 以高效液相色谱法测定利福平的含量。

### 1.6 统计分析方法

数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, SPSS 17.0 分析, 单变量配对 *t* 检验统计,  $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 利福平 - PLGA 微球的形态粒径及载药量和包封率

电镜下微球的球形度较好, 均匀圆整, 分散性好, 粒径范围较窄, 85% 微球直径在 60~90  $\mu$ m 之间, 平均粒径为 (80  $\pm$  9.4)  $\mu$ m, 跨距 0.61 (图 1)。利福平 - PLGA 缓释微球的载药量与包封率分别为 (33.18  $\pm$  1.36)%, (54.79  $\pm$  1.13)%。

### 2.2 利福平 - PLGA 微球体外缓释结果

利福平 - PLGA 缓释微球的体外释药试验结果显示: 该微球的体外释药过程较平稳, 其释放曲线较光滑, 无明显的锯齿状改变。突释期内微球释放度为 (14.66  $\pm$  1.88)%, 前 3 d 累计释放度 (18.09  $\pm$  1.75)%, 到 42 d 体外累积释放度达到 (92.17  $\pm$  1.74)%。体外缓释曲线见图 2。降解后的微球形态见图 3。

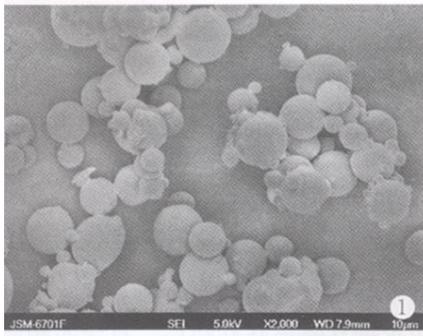


图 1 利福平 - PLGA 微球

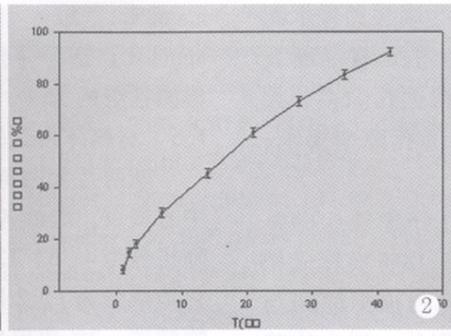


图 2 利福平 - PLGA 微球的体外释放趋势图

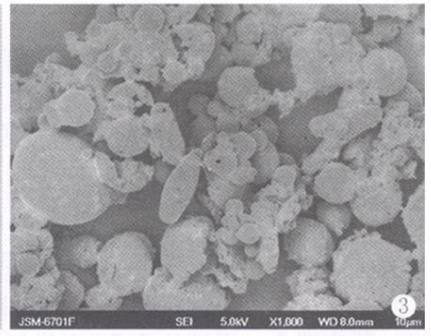


图 3 微球降解 2 周后形态

以累积释放百分率为纵坐标, 以时间为横坐标拟合零级动力学方程、一级动力学方程、Higuchi 方程, 相关系数 R 值分别为 0.990 303、0.975 397、0.999 01, 以 Higuchi 方程最接近 1。故以 Higuchi 方程拟合较好。本微球体外释放更符合 Higuchi 方程的释放规律。Higuchi 方程为:  $Y = 11.393 X - 9.656 9$   $R = 0.998 01$  (Y 表示累计释放百分比, X 表示释放时间的开方值, 即  $X = t^{1/2}$ )。

### 2.3 材料的孔隙率及抗压强度

通常的 CPCs 固化体只有小于 10 μm 的孔隙, 而利福平 - PLGA 微球 - CPCs 固化体试件由于加入的利福平 - PLGA 微球平均粒径在 (80 ± 9.4) μm, 浸泡后随着微球的降解, 可以在固化体中形成较大的孔隙。该材料的平均孔隙率 (63.76 ± 1.35)%, 大孔隙率 (23.87 ± 1.67)%。通常的 CPCs 固化体最终的抗压强度 12 MPa, 利福平 - PLGA - CPCs 试件, 利福平 - CPCs 试件分别为 (4.8 ± 0.68) MPa、(7.3 ± 0.66) MPa ( $P < 0.05$ ), 与 CPCs 比较, 有显著性差异。材料的电镜图见图 4。

### 2.4 材料体外细胞相容性实验

体外细胞相容性实验亦即毒性实验, 最常用的是琼脂覆盖法。它具有简便、快速、廉价、灵敏、易于推广等优点, 已被 ISO 和各国国际组织定为生物材料细胞毒性评价的标准试验方法<sup>[3]</sup>。经测定该材料细胞毒性为 0~I 级。hMSCs 在利福平 - PLGA 微球 - CPCs 试件生长较好, 部分细胞长入孔隙, 与利福平 - CPCs 试件细胞基本相当, 与空白对照组相比差异较大。利福平 - PLGA 微球 - CPCs 组和利福平 - CPCs 组的细胞在材料浸提液中的增殖水平和 ALP 水平低于空白对照组和 CPCs 组 (表 1)。

### 2.5 材料的体内实验

#### 2.5.1 材料的体内降解与新骨生长情况

12 周数字 X 线照片显示利福平 - PLGA - CPCs 组兔股骨髓植入的材料降解较多, 高密度变得模糊不清, 材料失去完整的柱状形态; 利福平 - CPCs 组可见清晰的完整柱状高密度影 (图 5a、b)。HE 切片显示利福平 - PLGA 微球 - CPCs 组降解明显多于利福平 - CPCs 组, 并且有大量骨细胞长入材料, 剩余材料被分割成小片, 材料降解速率与新骨形成速率基本相同。而利福平 - CPCs 组未见明显骨组织长入 (图 6a、b)。12 周时骨组织长入率实验组和对照组分别为 (84.56 ± 1.47)% 和 (10.56 ± 1.34)% ( $P < 0.05$ )。

#### 2.5.2 材料中利福平的体内缓释情况

研究表明 RFP 对多种结核菌的最低抑菌浓度 (MIC) 为 0.005~0.5 μg/ml<sup>[4]</sup>。一般最低杀菌浓度为最低抑菌浓度的 10 倍。本实验在术后各个时间点 3 d、1、2、4、8、12 周植入区股骨髓旁肌利福平浓度见表 2。

表 1 hMSCs 在不同材料浸提液中的增殖和分化情况 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	OD 值	ALP (金氏单位 / 100 ml)
空白对照组	0.45 ± 0.05	14.33 ± 0.14
CPCs 组	0.37 ± 0.03 <sup>△</sup>	11.2 ± 0.28 <sup>△</sup>
利福平 - CPCs 组	0.35 ± 0.02 <sup>△*</sup>	6.37 ± 0.30 <sup>△**</sup>
利福平 - PLGA - CPCs 组	0.35 ± 0.03 <sup>△*</sup>	6.34 ± 0.34 <sup>△**</sup>

与空白对照组比较: <sup>△</sup>  $P < 0.05$  与 CPCs 组比较: <sup>\*</sup>  $P > 0.05$  <sup>\*\*</sup>  $P < 0.05$  利福平 - PLGA - CPCs 组与利福平 - CPCs 组比较:  $P > 0.05$

表 2 各时间点的股骨髓旁肌利福平含量 (μg/ml n = 8 ND: 未检测到)

组别	3 d	1 周	2 周	4 周	8 周	12 周
利福平 - CPCs 组	12.11 ± 1.04	6.32 ± 0.97	4.23 ± 1.13	3.09 ± 1.08	0.21 ± 0.07	ND
利福平 - PLGA - CPCs 组	12.43 ± 1.02	7.67 ± 1.03 <sup>*</sup>	6.72 ± 1.09 <sup>*</sup>	5.13 ± 1.13 <sup>*</sup>	1.35 ± 1.08 <sup>*</sup>	0.31 ± 0.98

与利福平 / CPCs 组比较: <sup>\*</sup>  $P < 0.05$

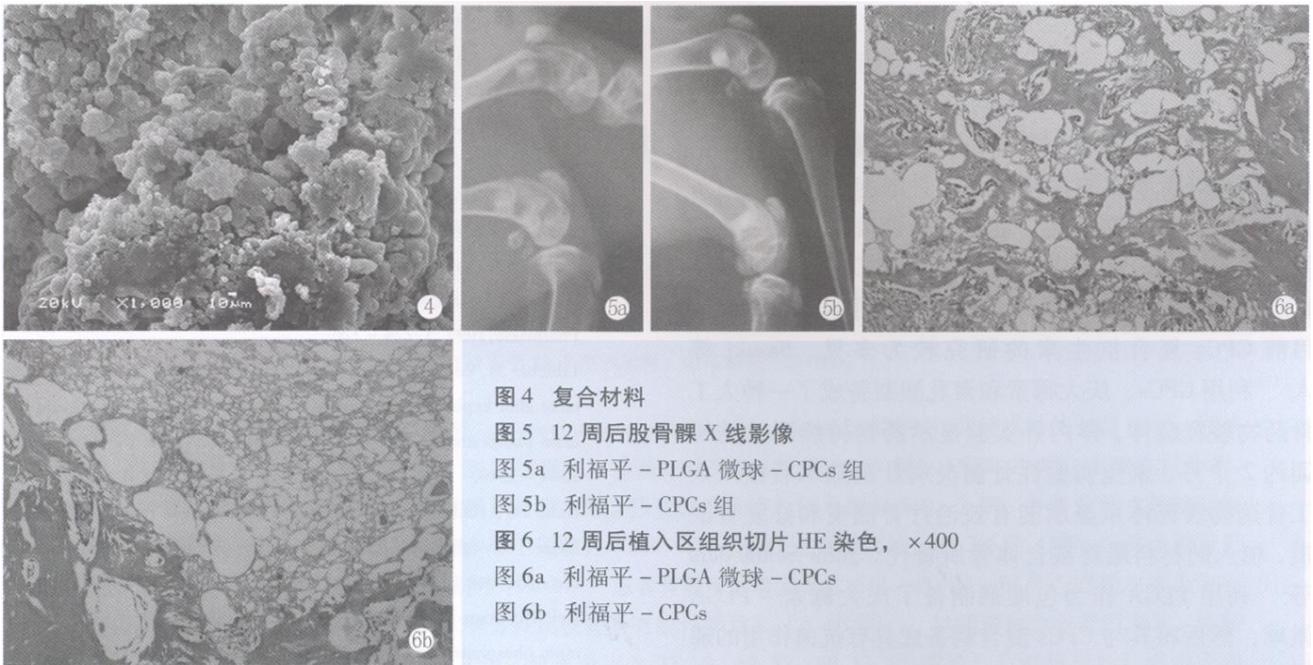


图 4 复合材料

图 5 12 周后股骨髁 X 线影像

图 5a 利福平 - PLGA 微球 - CPCs 组

图 5b 利福平 - CPCs 组

图 6 12 周后植入区组织切片 HE 染色,  $\times 400$

图 6a 利福平 - PLGA 微球 - CPCs

图 6b 利福平 - CPCs

由上表可以看出, 1 周后各个时间点实验组的浓度明显高于对照组。实验组的利福平局部浓度维持在最低抑菌浓度之上长达 8 周, 且维持杀菌浓度时间达 4 周, 对照组维持时间分别为 4 周和 1 周, 故利福平 - PLGA 微球 - CPCs 能长期高浓度的释放利福平, 达到局部化疗的作用, 能有效预防骨结核复发。

### 3 讨论

本实验通过在 CPCs 中加入大粒径利福平 - PLGA 微球, 利用 PLGA 在生物体内可自然降解的特性, 在复合材料中形成大于  $50 \mu\text{m}$  的微孔结构, 成功地制备成一种新型抗结核多孔自固化磷酸钙骨水泥。大粒径载药微球的加入, 一方面微球降解过程中利福平缓慢有效释放, 另一方面提高了材料的孔隙率和大孔率, 材料的骨细胞引导作用增强, 提高了微血管长入概率, 从而加速材料的降解, 利于新骨生成与重建。磷酸钙骨水泥材料优良, 但植入体内降解率极低, 三维 CT 显示 12 个月仅降解 2%, 缓慢的降解率严重制约了进一步骨替代的进行, 这是制约临床广泛应用的最大障碍之一<sup>[5]</sup>。磷酸钙骨水泥的降解主要通过自身溶解和细胞的吞噬作用 (如破骨细胞和多核细胞)。细胞的吞噬作用发生于材料与细胞的接触面, 是最主要的吸收方式, 所以通过增加材料的孔隙率, 可以提高接触面积, 从而明显加速材料的降解<sup>[6-7]</sup>。常规 CPCs 固化后的孔隙率仅有 38% 左右, 几乎无  $10 \mu\text{m}$  以上的大孔, 细胞很难长入孔隙, 降解仅发生于材料的表面。通过添加致孔剂可以提高孔隙率, 研究表明孔隙率为 75%, 大孔率为 49% 的改良 CPCs 植入体内 12

周降解约 65%, 同时可见大量的骨细胞及微血管长入孔隙<sup>[7]</sup>。另外, 材料的大小和孔隙的连通性对材料的降解也产生不可忽视的影响, 细胞在大于  $50 \mu\text{m}$  的孔隙中才能生长, 小的孔隙虽然细胞不能长入, 但能加强孔隙之间的联系, 故也是必不可少的<sup>[8]</sup>。笔者利用可降解的 PLGA 作为包埋利福平的载体, 同时又作为磷酸钙骨水泥的致孔剂与 CPCs 复合, 通过混合比例调整制备出具有较高孔隙率的利福平 - PLGA - 磷酸钙骨水泥缓释载体。本实验中利福平 PLGA 微球的平均直径为  $80 \mu\text{m}$ , 微球与 CPCs 混合比例 20%, 这样制备的材料随着 PLGA 的逐渐降解, 孔隙率最终可达 63.76% 左右。这样就增加了细胞与材料的接触面积, 利于细胞长入, 从而加速材料降解。体内实验表明 12 周后利福平 - PLGA - CPCs 组材料大部分降解, 对照组利福平 - CPCs 组材料降解仅发生于表面。

磷酸钙骨水泥的孔隙率和抗压强度是一对矛盾, 二者成反比关系。所以制备既具有较高抗压强度同时具有很高孔隙率的复合型 CPCs 难度较大。这是制约临床广泛应用的另一大障碍。通常用的致孔剂有蔗糖、甘露醇、碳酸氢钠等, 但这些方法有致孔不易控制、强度极低等缺点<sup>[7,9-10]</sup>。近年来多用添加可降解物质, 特别是加入可降解的高分子微球 (如 PLGA、明胶等), 通过微球的逐渐降解来致孔, 明胶、PLGA 生物相容性好, 还可携带因子或药物起到长期缓释作用。由于明胶正常体温下很快溶解, 缓释效果差<sup>[11]</sup>, 故选用 PLGA 作为致孔剂较为合理。本实验发现该材料的抗压强度为  $(4.8 \pm 0.68) \text{MPa}$ , 低于常规 CPCs

的抗压强度 13 MPa, 故仅能用于非负重部位的修复。

磷酸钙骨水泥和 PLGA 两者都是药物的良好缓释载体, 将他们复合起来使用可能达到 3 个目的: (1) 骨缺损填充, 起临时支撑作用; (2) 骨传导作用, 材料逐渐降解所形成的大孔隙利于骨细胞长入替代与重建; (3) 药物缓释作用, 能达到长期高浓度抗结核作用。目前很多研究集中在单独利用 PLGA 或者磷酸钙骨水泥作为药物缓释载体, 已经取得了很好的效果。目前 CPCs 复合抗生素的研究较为多见。Sasaki 等人<sup>[12]</sup>利用 CPCs、庆大霉素和聚乳酸制备成了一种人工骨药物缓释载体, 体内外实验显示药物持续释放的时间约 2 个月, 家兔实验性骨髓炎病灶刮除术后植入人工骨药物缓释体系显示能有效治疗骨髓炎和修复骨缺损, 植入的材料最终被自体骨所替代。Julia Schnieders 等<sup>[13]</sup>利用 PLGA 作为包埋剂制备了庆大霉素-PLGA 微球, 然后将其与 CPCs 混合制备成具有抗菌作用的磷酸钙骨水泥修复材料。微球含量在 0% ~ 30% (w/w) 时, 抗生素的释放量随着微球载药量的增加而增加。在微球中庆大霉素无突释现象, 在复合体中的释放接近 0 级动力学。可降解微球复合 CPCs 是一种有效的药物缓释体系, 这种缓释体系在药物载量在 10% ~ 30% (w/w) 范围内不影响材料的机械性能。本实验的体内实验显示利福平-PLGA 微球-CPCs 具有良好的缓释作用, 效果明显好于利福平-CPCs 组。

本实验中较大粒径利福平-PLGA 微球可显著提高磷酸钙骨水泥的孔隙率促进其降解, 与 CPCs 复合后利福平药物能较长时间缓释, 且能达到有效的抗结核药物浓度, 有望达到有效降低骨结核术后复发的目的, 可用于结核性骨缺损的修复。不足之处是材料的抗压强度较低。故在此方面仍需深入研究。

参考文献:

[1] Dutt M, Khuller GK. Liposomes and PLG microparticles as sustained

release antitubercular drug carriers— an in vitro— in vivo study [J]. Int J Antimicrob Agents, 2001, 3: 245-252

- [2] 费正奇, 胡蕴玉, 吴道澄, 等. 携载 rhBMP-2 微球的新型可注射自凝固复合人工骨的制备及特性研究 [J]. 中国矫形外科杂志, 2006, 2: 124-127.
- [3] 贺亚敏, 黄培林. 几种医用材料的细胞生物相容性评价的实验研究 [J]. 东南大学学报 (医学版), 2003, 2: 75-79.
- [4] Nakhare S, Vyas SP. Multiple emulsion based systems for prolonged delivery of rifampicin: in vitro and in vivo characterization [J]. Pharmazie, 1997, 3: 224-226.
- [5] Libicher M, Vetter M, Wolf I, et al. CT volumetry of intravertebral cement after kyphoplasty. Comparison of polymethylmethacrylate and calcium phosphate in a 12-month follow-up [J]. Eur Radiol, 2005, 8: 1544-1549.
- [6] Ruhe PQ, Hedberg-Dirk EL, Padron NT, et al. Porous poly(DL-lactide-co-glycolic acid)/calcium phosphate cement composite for reconstruction of bone defects [J]. Tissue Eng, 2006, 4: 789-800.
- [7] Del RR, Ooms E, Wolke JG, et al. In vivo bone response to porous calcium phosphate cement [J]. J Biomed Mater Res A, 2003, 1: 30-36.
- [8] 厉孟, 刘旭东, 刘兴炎, 等. 多孔明胶微球磷酸钙骨水泥的制备及其性能研究 [J]. 中国矫形外科杂志, 2009, 7: 526-529.
- [9] Hesaraki S, Moztarzadeh F, Sharifi D. Formation of interconnected macropores in apatitic calcium phosphate bone cement with the use of an effervescent additive [J]. J Biomed Mater Res A, 2007, 1: 80-87.
- [10] Takagi S, Chow LC. Formation of macropores in calcium phosphate cement implants [J]. J Mater Sci Mater Med, 2001, 2: 135-139.
- [11] Habraken W J, Wolke JG, Minkos AG, et al. Porcine gelatin microsphere/calcium phosphate cement composites: an in vitro degradation study [J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2009, 2: 555-561.
- [12] Sasaki S, Ishii Y. Apatite cement containing antibiotics: efficacy in treating experimental osteomyelitis [J]. J Orthop Sci, 1999, 5: 361-369.
- [13] Schnieders J, Gbureck U, Thull R, et al. Controlled release of gentamicin from calcium phosphate-poly(lactic acid-co-glycolic acid) composite bone cement [J]. Biomaterials, 2006, 17: 3555-3566.

(收稿: 2010-09-02)