

## 基础研究

## 青霉素及克林霉素在兔椎间盘中的渗透性研究

李青青,倪斌

(第二军医大学附属长征医院骨科 200003 上海市)

**【摘要】目的:**观察青霉素和克林霉素渗透兔椎间盘的情况,分析其渗透性差异的原因。**方法:**雄性成年新西兰大白兔 14 只,随机分成两组,每组 7 只,分别经兔耳缘静脉注射青霉素(A 组)和克林霉素(B 组)。A 组每只每次静脉注射青霉素钠 4.8mg,每隔 0.5h 一次,共给药 5 次;B 组每只每次静脉注射克林霉素磷酸酯 9mg,每隔 2h 一次,共给药 5 次。A、B 组分别于末次给药后 0.5h、2h 抽取血样,1ml/只,随后立即处死,取出 L4/5 髓核。将所有血样和髓核采用高效液相色谱法(HPLC)检测药物浓度,计算药物在髓核中的渗透率(髓核药物浓度/血药浓度 $\times 100\%$ )。**结果:**克林霉素渗透椎间盘髓核的渗透率为 38.7%~49.0%,平均为  $(43.3\pm 3.9)\%$ ;青霉素的渗透率为 0~1.2%,平均  $(0.7\pm 0.5)\%$ ,两者比较有显著性差异( $P<0.0001$ )。**结论:**克林霉素渗透椎间盘髓核的能力比青霉素强。

**【关键词】**椎间盘;髓核;青霉素;克林霉素;兔

中图分类号:R978.1,R681.5 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2008)-07-0530-04

Penetration study of penicillin and clindamycin into rabbit nucleus pulposus/LI Qingqing,NI Bin//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord,2008,18(7):530-533

**【Abstract】 Objective:**To assess the tissue penetration of penicillin and clindamycin into the normal rabbit intervertebral disc, and discuss the reason of different penetration of the two antibiotics. **Method:** Fourteen adult male New Zealand rabbits were divided into two groups, 7 rabbits for each group and then intravenous injections of penicillin (group A) or clindamycin (group B) were given. Penicillin was administered at 4.8mg/dose, 1 dose/30min. Clindamycin was administered at 9mg/dose, 1 dose/2h. Each rabbit was given 5 times of antibiotics. Specimens of serum, 1ml/rabbit, were obtained at one half-life of antibiotic after injection. Then the rabbits were killed immediately and nucleus pulposus of L4/5 were harvested. Concentrations of two antibiotics in the serum and in the intervertebral disc tissue were measured with high-pressure liquid chromatography (HPLC) and penetration rates (drug concentration of nucleus pulposus/drug concentration of serum  $\times 100\%$ ) were counted. **Result:** Clindamycin's penetration rates were 38.7%~49.0%, average penetration rate was  $(43.3\pm 3.9)\%$ . Penicillin's penetration rates were 0~1.2%, average penetration rate was  $(0.7\pm 0.5)\%$ , difference of these two rates were apparently ( $P<0.0001$ ). **Conclusion:** Clindamycin's penetration rate was significantly higher than penicillin's.

**【Key words】** Intervertebral disc; Nucleus pulposus; Penicillin; Clindamycin; Rabbit

**【Author's address】** Department of Orthopaedic Surgery, Changzheng Hospital, Shanghai, 200003, China

随着医疗技术水平的不断提高,各种脊柱外科手术越来越多地被应用于临床,造福患者。术后椎间隙感染是脊柱手术并发症之一,抗生素的应用是预防和治疗该并发症的主要手段<sup>[1]</sup>。然而,椎间盘是人体最大的无血管组织,物质进入椎间盘主要依赖渗透作用。因此,抗生素对椎间盘的渗透

性是决定其治疗效果的关键因素之一。不同的抗生素对椎间盘的渗透性不同是由抗生素的特性和椎间盘自身的特性共同决定的。本实验通过对比青霉素和克林霉素在兔椎间盘中的渗透率,分析其渗透性差异的原因,旨在为临床有效而合理地选择抗生素提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与抗生素

14 只成年雄性新西兰大白兔(由第二军医大

第一作者简介:男(1979-),住院医师,研究方向:脊柱外科,现在江苏省人民医院脊柱中心病区(骨二科) 210029  
电话:(025)83718836-6499 E-mail:liqingqing\_1999@163.com

学海军医学研究所动物实验中心提供), 体重 2.56~3.11kg, 平均 2.79kg, 随机分为 A、B 组, 每组 7 只, 经检验两组动物体重均数间的差别无统计学意义。

A 组动物应用青霉素钠 [山东鲁抗医药股份有限公司生产, 0.48g (80 万单位)/支, 批号为 S060305], B 组动物应用克林霉素磷酸酯 (江苏奥赛康药业有限公司生产, 0.9g/支, 批号为 060802), 两种抗生素标准品购自上海市药品检验所。两种抗生素部分药物代谢动力学数据及相关特性见表 1。

表 1 两种抗生素部分药物代谢动力学数据及相关特性<sup>[2]</sup>

|            | 青霉素钠   | 克林霉素磷酸酯 |
|------------|--------|---------|
| 相对分子质量     | 356.37 | 504.96  |
| 半衰期(h)     | 0.5    | 2~2.5   |
| 血浆蛋白结合率(%) | 46~67  | > 90    |
| 电荷特性       | 负      | 正       |

## 1.2 动物给药和取样

抗生素均采用生理盐水溶解稀释后经兔耳缘静脉缓慢推注, 每隔一个药物半衰期给药 1 次, 共给药 5 次。A 组每次给青霉素钠 0.8 万单位 (4.8mg)/只, 每隔 0.5h 给药 1 次, 共给药 5 次, 总给药量 4 万单位/只; B 组每次给克林霉素磷酸酯 9mg/只, 每隔 2h 给药 1 次, 共给药 5 次, 总给药量 45mg/只。

末次给药后间隔一个药物半衰期经兔耳缘静脉抽取血样, 1ml/只, 随后立即经兔耳缘静脉注入空气 15ml 处死动物, 沿后正中中线显露脊柱腰段, 取下完整的腰段脊柱, 剔除椎旁肌肉等软组织, 剪开纤维环取出 L4/5 髓核。所有标本冷冻保存。

## 1.3 青霉素和克林霉素对兔椎间盘的渗透率检测

采用高效液相色谱法 (HPLC) 测定组织内的药物含量<sup>[3]</sup>。检测仪器为 Agilent 公司生产的 Agilent 1100 series, 包括液相色谱仪、高压泵、紫外检测器、进样器以及色谱工作站。

**1.3.1 色谱条件** (1) 青霉素钠: 色谱柱为 Waters Atlantis C18 不锈钢柱 (5 $\mu$ m, 4.6 $\times$ 250mm), 流动相为甲醇-水-4%醋酸钾溶液-4%醋酸溶液 (50:47:2.5:0.5), 流率为 1ml/min, 柱温为室温, 紫外线检测波长为 268nm, 进样量为 20 $\mu$ l。(2) 克林霉素

磷酸酯: 色谱柱同上, 流动相为乙腈-0.1mol/L 磷酸二氢钠溶液 (31:69), 流率为 1ml/min, 柱温为室温, 紫外线检测波长为 217nm, 进样量为 20 $\mu$ l。

**1.3.2 标准曲线** 配制抗生素标准液, 以药物浓度 X 为横坐标, 测得的药物色谱峰面积 Y 为纵坐标, 绘制曲线, 并进行直线回归。血青霉素钠回归方程为  $Y=8.8641X+0.6308$ ,  $r=0.9998$ ; 髓核青霉素钠回归方程为  $Y=5.0633X+0.3101$ ,  $r=0.9998$ ; 血克林霉素磷酸酯回归方程为  $Y=11.0955X+0.8134$ ,  $r=0.9997$ ; 髓核克林霉素磷酸酯回归方程为  $Y=10.8943X+0.7118$ ,  $r=0.9997$ 。

**1.3.3 样品的测定** 将血样与乙腈 (4:6) 混合, 以 5000r/min 离心 10min, 吸取上清液进样, 测色谱峰面积, 代入相应的回归方程, 求出浓度。将髓核样本放入匀浆器中, 加入水与乙腈 (1:2) 的混合溶液研磨, 以 5000r/min 离心 10min, 吸取上清液进样, 测色谱峰面积, 代入相应的回归方程, 求出浓度。药物对椎间盘髓核的渗透率=(髓核药物浓度/血药浓度) $\times$ 100%。

## 1.4 统计学处理

采用 SAS 8.0 统计软件分析, 两种抗生素对椎间盘髓核的渗透率的比较用  $t$  检验,  $P<0.05$  为有显著性差异。

## 2 结果

见表 2。青霉素钠对椎间盘髓核的渗透率为 0~1.2%, 平均为 (0.7 $\pm$ 0.5)%; 克林霉素磷酸酯对椎间盘髓核的渗透率为 38.7%~49.0%, 平均为 (43.3 $\pm$ 3.9)%, 两者之间有显著性差异 ( $P<0.0001$ )。

## 3 讨论

目前, 多种不同种类的抗生素被应用于临床预防和治疗椎间隙感染。抗生素要发挥抗菌作用必需要达到最小抑菌浓度 (MIC)。由于不同的抗生素对不同细菌的最小抑菌浓度有所不同, 所以它们被传送和运输进入椎间盘的能力就显得尤为重要。抗生素的渗透力越强就越容易在椎间盘髓核内达到最小抑菌浓度, 发挥有效抗菌作用。有关抗生素被传送和运输进入椎间盘方面的情况仍不十分明了。Gibson 等<sup>[4]</sup>研究了氟氯西林和头孢雷定对青少年椎间盘的渗透性。他们发现尽管这两种抗生素有着较高的血清浓度, 但是用生物活性

表 2 青霉素和克林霉素在兔血液与髓核中的浓度及其对兔椎间盘的渗透率

| 每组动物<br>编号            | 血药浓度( $\mu\text{g/ml}$ ) |                  | 髓核药物浓度( $\mu\text{g/g}$ ) |                 | 渗透率(%)        |                             |
|-----------------------|--------------------------|------------------|---------------------------|-----------------|---------------|-----------------------------|
|                       | 青霉素钠                     | 克林霉素磷酸酯          | 青霉素钠                      | 克林霉素磷酸酯         | 青霉素钠          | 克林霉素磷酸酯                     |
| 1                     | 17.82                    | 16.05            | 0.21                      | 6.32            | 1.2           | 39.4                        |
| 2                     | 15.64                    | 12.57            | 0.11                      | 5.26            | 0.7           | 41.8                        |
| 3                     | 13.57                    | 13.42            | 0.00                      | 6.57            | 0             | 49.0                        |
| 4                     | 16.11                    | 15.12            | 0.17                      | 7.15            | 1.1           | 47.3                        |
| 5                     | 12.34                    | 12.63            | 0.00                      | 5.32            | 0             | 42.1                        |
| 6                     | 13.58                    | 15.79            | 0.11                      | 6.11            | 0.8           | 38.7                        |
| 7                     | 15.33                    | 14.13            | 0.12                      | 6.35            | 0.8           | 44.9                        |
| 平均值( $\bar{x}\pm s$ ) | 14.91 $\pm$ 1.86         | 14.24 $\pm$ 1.44 | 0.10 $\pm$ 0.08           | 6.15 $\pm$ 0.67 | 0.7 $\pm$ 0.5 | 43.3 $\pm$ 3.9 <sup>①</sup> |

注:①与青霉素钠比较  $P<0.0001$

鉴定法或高压液相色谱法在椎间盘髓核或纤维环中未检测到抗生素。为明确头孢唑啉在预防和治疗医源性椎间盘炎中所起的作用,Fraser 等<sup>[5]</sup>在羊模型中研究了头孢唑啉对椎间盘的渗透性。他们使用一种抗生素生物活性鉴定法,在注射头孢唑啉 30min 后取纤维环和髓核样品检测。结果显示 5 个纤维环中有 4 个达到血液水平的 1%,而 5 个髓核中只有 1 个达到血液水平的 1%,在注射 60~120min 后样品中未检测到头孢唑啉。Currier 等<sup>[6]</sup>采用放射性碘 <sup>125</sup> 标记的庆大霉素来研究其对兔髓核的渗透性,发现庆大霉素能有效地渗入椎间盘,峰浓度在静脉注射 2h 后达到并维持峰水平至少 6h。椎间隙感染的主要病原菌为金黄色葡萄球菌,其次为表皮葡萄球菌、革兰氏阴性杆菌、溶血性链球菌、肺炎球菌、大肠杆菌等也有报道<sup>[1]</sup>。我们选用对这些病原菌敏感的青霉素和克林霉素进行抗生素对椎间盘髓核渗透能力的研究,发现青霉素钠对椎间盘髓核的渗透率为 0~1.2%,平均为 (0.7 $\pm$ 0.5)%;克林霉素磷酸酯对椎间盘髓核的渗透率为 38.7%~49.0%,平均为 (43.3 $\pm$ 3.9)%

椎间盘是人体最大的无血管组织,物质经由血液循环抵达椎体动脉形成的毛细血管网,进而深入到椎体与椎间盘接合部的营养通道,进入营养通道的物质再通过选择性的软骨终板屏障能达到无血管的椎间盘内部<sup>[7]</sup>。物质进入椎间盘绝大多数是通过这条途径实现的,这条途径被称为终板途径。终板途径的重要就在于它几乎可以被看作是抗生素进入椎间盘的唯一途径。由此途径进出椎间盘的物质都受到两种作用的支配,它们分别是扩散作用和对流作用。扩散传输的方向主要是对内的,而对流传输的方向主要是对外的;扩散传输的速度较快,而对流传输的速度则较慢,并

且对于小分子(通常认为分子量<1000)而言,对流传输甚至是可以忽略的;扩散传输对浓度梯度的依赖性高,而对流传输则否。因此,对于抗生素而言,扩散作用是进入椎间盘的主要驱动因素,多数理论和实验均支持这一观点<sup>[8,9]</sup>。本实验采用每隔一个药物半衰期静脉给药一次,连续给药 5 次的给药法;在经历了 5 个药物半衰期后药物在血液中达到稳态浓度,同时经由扩散作用所致的椎间盘髓核药物浓度亦达到稳态。尽管我们并未检测抗生素在血液和髓核内的动态分布,但药物浓度在血液和髓核内的双重稳态基本可以反映抗生素渗透髓核的能力。

透明软骨终板是抗生素进入椎间盘的阻力之一,它的组成类似于人体膝关节或髋关节的透明软骨,只是含水量要少一些,而且更为致密,它扮演着立体通透屏障的角色<sup>[10]</sup>。小分子物质比较容易通过终板,而大分子的立体排阻则随着分子量的增大而增加,对大分子来说线性分子的阻力相对球形分子要大<sup>[11]</sup>。不同的抗生素血浆蛋白结合率不同,与血浆蛋白结合的抗生素分子的立体排阻也是增加的。在本实验中我们注意到青霉素钠的分子量为 356.37,血浆蛋白结合率为 (46~67)%,它对椎间盘的平均渗透率低于 1%;克林霉素磷酸酯的分子量为 504.96,血浆蛋白结合率大于 90%,它对椎间盘的平均渗透率是 43.3%。低分子量低血浆蛋白结合率的青霉素渗透率反较克林霉素低很多,一定有更深层的原因导致了两种抗生素渗透性的差异。

椎间盘基质对于渗透物来说也是一道选择性通透屏障。椎间盘基质主要是由填塞在胶原网中的含大量阴离子的蛋白多糖凝胶所组成,受电荷效应的影响,阴离子是受到一定程度排斥的,而阳

离子的渗透力则得到强化,理论上来说带有正电荷的抗生素必然要比带负电荷的抗生素渗透性强。Urban 等<sup>[12]</sup>曾用狗模型进行一些关于溶质进出椎间盘的体内和体外研究,结果显示,带负电荷的硫酸根离子渗透进入髓核受到限制,而不带电荷的葡萄糖分子进出髓核则较为自由。他们认为溶质所带的电荷是影响溶质进入髓核的主要影响因素。另一些研究发现,髓核蛋白多糖含量较纤维环高,造成了带负电荷的物质在髓核内的含量较纤维环低。Fraser 等<sup>[5]</sup>的研究证实了这一现象。还有一些研究用酶解法去除了基质蛋白多糖,负电荷物质因此对椎间盘的组织扩散系数得到增加<sup>[13]</sup>。我们的实验结果与 Urban 等的发现相互吻合,带正电荷的克林霉素(平均渗透率 43.3%)的确比带负电荷的青霉素(平均渗透率<1%)渗透椎间盘髓核的能力强很多。

总之,克林霉素对椎间盘髓核的渗透率比青霉素高,电荷效应可以用来解释青霉素和克林霉素对椎间盘髓核的不同渗透率。

#### 4 参考文献

1. Lindholm TS, Pylkkänen P. Discitis following removal of intervertebral disc[J].Spine,1982,7(6):618-622.
2. 金有豫.药理学[M].北京:人民卫生出版社,2001.317-332.
3. Verdon E, Couedor P. Multiresidue analytical method for the determination of eight penicillin antibiotics in muscle tissue by ion-pair reversed-phase HPLC after operculum derivatization [J]. J AOAC Int,1999,82(5):1083-1095.
4. Gibson MJ, Karpinski MRK, Slack RCB, et al. The penetration of antibiotics into the normal intervertebral disc [J].J Bone Joint Surg Br,1987,69(5):784-786.
5. Fraser RD, Osti OL, Vernon-Roberts B. Iatrogenic discitis; the role of intravenous antibiotics in prevention and treatment; an experimental study[J].Spine,1989,14(9):1025-1032.
6. Currier LC, Banovac K, Eismont FJ. Gentamicin penetration into normal rabbit nucleus pulposus [J].Spine,1994,19(23):2614-2618.
7. Bashir A, Gray ML, Hartke J, et al. Nondestructive imaging of human cartilage glycosaminoglycan concentration by MRI [J]. Magn Reson Med,1999,41(5):857-865.
8. Ferguson SJ, Ito K, Nolte LP. Fluid flow and convective transport of solutes within the intervertebral disc [J].J Biomech, 2004,37(2):213-221.
9. Boos N, Wallin A, Gbedegbegnon T, et al. Quantitative MR imaging of lumbar intervertebral disks and vertebral bodies: influence of diurnal water content variations [J].Radiology, 1993,188(2):351-354.
10. Roberts S, Urban JPG, Evans H, et al. Transport properties of the human cartilage endplate in relation to its composition and calcification[J].Spine,1996,21(4):415-420.
11. Perlewitz TJ, Haughton VM, Riley LH III, et al. Effect of molecular weight on the diffusion of contrast media into cartilage[J].Spine,1997,22(23):2707-2710.
12. Urban JP, Holm S, Maroudas A. Diffusion of small solutes into the intervertebral disc: as in vivo study [J].Biorheology,1978, 15(3-4):203-221.
13. Boubriak OA, Urban JP, Akhtar S, et al. The effect of hydration and matrix composition on solute diffusion in rabbit sclera[J].Exp Eye Res,2000,71(5):503-514.

(收稿日期:2007-09-24 修回日期:2007-12-04)

(英文编审 郭万首)

(本文编辑 李伟霞)

#### 消息

### 第三届全国微创脊柱外科学术会议 暨 2008(重庆)国际微创脊柱外科前沿论坛延期举办通知

原定于 2008 年 6 月 12~15 日在重庆市举办的“第三届全国微创脊柱外科学术会议暨 2008(重庆)国际微创脊柱外科前沿论坛”因突发四川汶川特大地震延期举办。经中国康复医学会脊柱脊髓损伤专业委员会微创脊柱外科学组研究决定,会议延期至 2008 年 9 月 11~14 日在重庆市召开,学术活动安排及其他有关事宜与原定内容一致,日程安排如下。

9 月 11 日上午 9:00~晚 10:00 报到,在重庆江北机场安排专车接机;9 月 12 日全天和 13 日上午学术活动,下午撤离。

地点:重庆市江北区金源大酒店。

由于本次会议的延期举办给您的工作及行程安排造成诸多不便,我们深表歉意,并请求您的谅解和支持!

第三届全国微创脊柱外科学术会议筹备委员会