

基础研究

载 HRZ 乙酰乙酸涂层的自体髂骨修复
兔脊柱结核骨缺损的病理学观察何进文¹, 岳学锋², 施建党³, 杨宗强³, 吴龙云¹, 王自立³

(1 宁夏医科大学临床医学院 750004 银川市; 2 银川市第一人民医院骨科 750001 银川市;

3 宁夏医科大学总医院脊柱骨科 750004 银川市)

【摘要】目的:观察载异烟肼、利福平、吡嗪酰胺/乙酰乙酸(HRZ/PLGA)涂层的自体髂骨修复兔脊柱结核骨缺损的病理学特点,以及材料对外周脏器的组织毒性。**方法:**将 60 只新西兰兔脊柱结核模型随机分为 3 组,每组 20 只,彻底病灶清除术后,A 组(实验组)植入载 HRZ/PLGA 抗结核药缓释涂层的自体髂骨;B 组(对照组)植入载空白涂层的自体髂骨;C 组(空白对照组)单纯植入自体髂骨。术后第 2、4、8、16 周时各组随机抽取 5 只兔,取术区组织进行解剖大体观察和病理切片显微镜下观察,从组织病理学角度观察植骨界面愈合情况及植骨材料降解情况;术后第 2 周、4 周留取 A 组兔的心、肝、脾、肾脏器制作病理标本观察抗结核缓释涂层材料对外周脏器有无组织毒性;术后第 2、4、8、16 周对 A 组(实验组)兔进行影像学检查(X 线、CT、MRI),观察植骨融合情况。**结果:**解剖大体观察发现,A 组兔观察至术后 16 周时,骨缺损处已由致密而规则的骨组织替代,硬度与周围骨组织相似,植骨界面已达骨性愈合,植骨材料的降解与整合已基本完毕;B、C 组部分兔在观察至术后 16 周时可见椎旁淡黄色脓性物质形成,骨缺损处瘢痕增生明显,病变性骨桥形成,骨桥及邻近椎体可见虫蚀样破坏及缺损。镜下观察发现,A 组兔观察至术后 16 周时骨缺损处板层骨及小梁骨生成增多,骨细胞增殖活跃,骨细胞形态及骨小梁结构完整并趋向成熟,未见炎性细胞及坏死物质形成;B、C 组兔在观察至术后 16 周时有较多不规则的成骨细胞及纤细的骨小梁形成,新生骨小梁间可见炎性细胞聚集,部分有坏死物质形成。通过影像学观察 A 组实验兔的植骨愈合情况,至术后 16 周时,骨-材料界面结合紧密,植骨融合良好。对三组术后各时间点骨-材料界面的病理切片做骨小梁面积定量分析,观察至术后 8 周及 16 周时,A 组骨小梁面积显著高于 B 组及 C 组($P<0.01$)。综上观察指标,A 组兔脊柱结核病灶骨-材料界面愈合过程优于 B 组及 C 组($P<0.05$)。术后 2 周、4 周时镜下观察 A 组兔的心、肝、脾、肾组织,均未见外周脏器损伤。**结论:**在病理学层面观察,载缓释抗结核药 HRZ/PLGA 涂层的自体髂骨植入兔脊柱结核骨缺损后有助于促进局部骨缺损的修复和病灶的治愈,对外周脏器无明显组织毒性,是一种良好的局部抗结核缓释材料。

【关键词】 脊柱结核;缓释抗结核药;自体髂骨;骨修复;病理学

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2018.06.10

中图分类号:R529.2 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2018)-06-0552-10

Pathological observation on the repair of bone defect of spinal tuberculosis in rabbits with HRZ/PLGA coated autogenous iliac bone/HE Jinwen, YUE Xuefeng, SHI Jiandang, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2018, 28(6): 552-561

【Abstract】 Objectives: To observe the pathological characteristics of bone defect of spinal tuberculosis in rabbits with autologous iliac bone coated with sustained-release anti-TB drug HRZ/PLGA and the toxicity to peripheral organs. **Methods:** 60 New Zealand rabbits of spinal tuberculosis models were randomly divided into 3 groups, 20 in each group, all underwent radical debridement. Group A (experimental group) was implanted with autologous iliac bone coated with sustained-release anti-TB drug HRZ/PLGA (isoniazid, rifampicin, pioglitazone/acetyl acetic acid); group B(control group) was implanted with autologous iliac bone

基金项目:国家自然科学基金(81360275);宁夏自然科学基金(NZ13131);宁夏医科大学重点项目(XZ2015015)

第一作者简介:男(1993-),硕士研究生在读,研究方向:脊柱外科

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

并列第一作者:岳学锋 E-mail:yxfxyhello@gmail.com

通讯作者:施建党 E-mail:shi_jiandang@163.com

with blank coating; group C(blank control group) was implanted with autogenous iliac bone. 5 rabbits were randomly selected at 2, 4, 8 and 16 weeks after operation and observed the tissues of bone graft by visual and microscopic view, the healing of implant interface and the degradation of bone graft material were studied by histopathological observation. The pathological specimens of heart, liver, spleen and kidney of group A at 2 weeks and 4 weeks after operation were made to specimen slices to observe the toxicity of peripheral organs. The imaging examinations(X-ray, CT, MRI) were performed at 2, 4, 8 and 16 weeks in experimental group after operation, and the fusion of bone graft was observed. **Results:** Visual observation in group A found that, at 16 weeks after operation, the bone defect was replaced by dense and regular bone tissue, the hardness was similar to the surrounding bone tissue, and the bone defect had reached the standard of bone healing, the degradation and integration of bone graft materials had been basically completed. In group B and group C, at 16 weeks after operation, some rabbits were observed formation of light-yellow purulent material, and scar hyperplasia was observed in bone defect and pathological bone bridge, paravertebral worm erosion damage and defect osteoid bridge could be seen. Microscopic observation in group A found that, at 16 weeks after operation, the production of lamellar bone and trabecular bone increased, the proliferation of bone cell was active, shape of bone cell and structure of trabecular bone were nearly mature, no inflammatory cells and necrotic materials formation. In group B and group C, at 16 weeks after operation, there were more irregular osteoblast and slender trabecular bone, inflammatory cell aggregation between trabecular bones, and necrotic material formed in some area. Imaging features of the bone graft healing of rabbits in group A were observed, and at the end of 16 weeks, the bone-material interface combined closely, bone graft healed good. At 8 weeks and 16 weeks after operation, the bone-material interface was made into pathological slice to quantitative analysis on the area of bone trabecular, and the bone trabecular area in group A was significantly higher than that in group B and group C ($P<0.05$). In group A, no abscess, bone destruction, sequestrum, or caseous necrosis was observed at each time of observation, the healing of bone-material interface in group A was better than that in group B and group C ($P<0.05$). The heart, liver, spleen and kidney tissues of group A were observed at 2 weeks and 4 weeks after operation, no sign of peripheral organ damage was observed. **Conclusions:** The autologous iliac bone coated with sustained-release anti-TB drug HRZ/PLGA which was planted into the bone defect after debridement could promote the repair of bone defect and the healing of the lesion, no peripheral organ damage was observed. It has been proved to be a good sustained anti-tuberculosis material.

[Key words] Spinal tuberculosis; Sustained anti-tuberculosis drugs; Autogenous iliac bone; Bone repair; Pathological

[Author's address] School of Clinical Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan, 750004, China

脊柱结核是最常见的骨与关节结核^[1],手术治疗的目的在于治愈病灶,重建脊柱稳定性,恢复脊髓功能,早日康复^[2]。其中彻底病灶清除和抗结核化疗对治愈病灶十分关键,但是仍然有部分病例不愈合或复发^[3,4]。除了用药依从性不足,最主要的原因是局部药物浓度不足,难以有效杀灭病灶部位的结核分枝杆菌^[5-7]。传统口服抗结核药通过肠道吸收入血,骨组织局部渗透性低,难以在病灶局部达到高药物浓度,而且结核病灶周围骨质硬化形成屏障,更加导致抗结核药难以通过^[8]。如果术后局部结核病灶控制欠佳,脓液持续渗出,新骨难以形成,植骨界面不融合,病灶最终迁延不愈。另外,口服抗结核药对肝肾等重要脏器的损

害,进一步增加了用药的难度。局部药物缓释系统(local drug delivery system, LDDS)是脊柱结核局部治疗的趋势^[9,10]。本研究将三联抗结核药异烟肼(H)、利福平(R)和吡嗪酰胺(Z)载于聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA),制成抗结核缓释复合涂层材料HRZ/PLGA,将其包裹于实验兔的自体髂骨表面,植入病灶清除后的骨缺损部位,在病理学层面观察植入材料的降解及骨-材料界面愈合情况,以及植骨材料对外周脏器的毒性。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

抗结核药标准对照品异烟肼、利福平、吡嗪酰

胺(中国药品技术监督管理局)、聚乳酸-羟基乙酸共聚物(济南岱罡生物工程有限公司);二氯甲烷、10%甲醛溶液(重庆川江化学试剂厂);EDTA 脱钙液(武汉博士德生物工程有限公司);结核分枝杆菌 H37Rv(中国生物制品研究所);弗氏完全佐剂、戊巴比妥钠粉剂(美国 Sigma 公司);精密电子天平(北京赛多利思科学仪器有限公司);恒温磁力搅拌器(浙江乐成电器厂);涡旋振荡仪(上海青浦沪西仪器厂);真空冷冻干燥机(上海比朗仪器有限公司);磨钻(西安三才电子有限公司);超薄切片机 RM2245 型、显微镜(德国 Leica 公司);Heal Force 生物安全柜(上海斯高勒生物科技有限公司)。

1.2 HRZ/PLGA 涂层材料的制备

缓释抗结核药 HRZ 涂层的制备按体外实验中筛选的最优配比方案进行^[11],异烟肼(H)、利福平(R)、吡嗪酰胺(Z) 药物比例为 1:1:2;三种药物的总质量与 PLGA 质量之比为 1:5。称取 R 25mg 和 PLGA 500mg,溶于 10ml 二氯甲烷中,在常温下超声振荡完全溶解,此溶液为油相(O);再称取 H 25mg 溶于 5ml 超纯水中,此溶液为水相(W);将上述水相(W)溶液加入油相(O)溶液中,在 37℃条件下,放置于涡旋仪上混合均匀;然后将 Z 50mg 溶于上述混合溶液中,同样于涡旋仪上混合均匀;最后将此混合溶液均匀喷涂于模具内,冷冻干燥,有机溶剂挥发后再次涂层,制备载缓释抗结核药 HRZ 的涂层,消毒,无菌袋封装,保存在低温、避光条件下备用。空白涂层中的制备过程中不加入药物,余制备方法与上述相同(图 1)。

1.3 兔脊柱结核模型的制备

兔脊柱结核模型的制备参照 Geng^[12]、Liu^[13]的

方法进行,实验获宁夏医科大学伦理委员会审批,造模实验在宁夏疾病预防控制中心实验室与宁夏医科大学微生物学实验室完成,术中严格遵守标准预防原则。

实验动物为健康新西兰大白兔,由宁夏医科大学实验动物中心提供,雌雄不限,体重 2.5~3.0kg,实验前进行结核菌素纯蛋白衍生物(5IU)皮试试验检测,皮试阴性者入选。弗氏完全佐剂 0.1ml 注射于颈根部背侧皮内进行免疫佐剂致敏,致敏后 1 个月造模,采取经横突腹侧入路构建新西兰兔脊柱结核模型。全身静脉麻醉后取右侧卧位,手术区域备皮,消毒,铺单。沿左侧第 12 肋末端向下至髂嵴作纵向切口,暴露 L4、L5 椎体和椎间盘前方。L5 椎体上部钻孔,孔内浸注 0.1ml 结核分枝杆菌 H37Rv 混悬液(浓度 5.0mg/ml),骨孔用骨蜡封闭,逐层关闭切口,无菌敷料包扎。造模术后 2 个月,脊柱结核骨破坏模型已趋于完善^[14],通过影像学观察并筛选造模成功兔,观察指标为椎间隙变窄,椎间隙周围骨质破坏、死骨形成,椎旁或椎管内脓肿形成(图 2)。

1.4 实验动物分组

采用脊柱结核造模成功的新西兰兔 60 只,随机分为 3 组,A 组(实验组)、B 组(对照组)、C 组(空白对照组),每组 20 只。彻底病灶清除术后,A 组植入载缓释抗结核药 HRZ/PLGA 涂层的自体髂骨;B 组植入载空白涂层的自体髂骨;C 组植入空白自体髂骨。

1.5 手术方法

所有实验兔术前禁食 12h,禁水 4h。采用全身静脉麻醉(3%戊巴比妥钠;30mg/kg)。麻醉成功后,先在切口同侧髂骨上取三面皮质骨髂骨块备

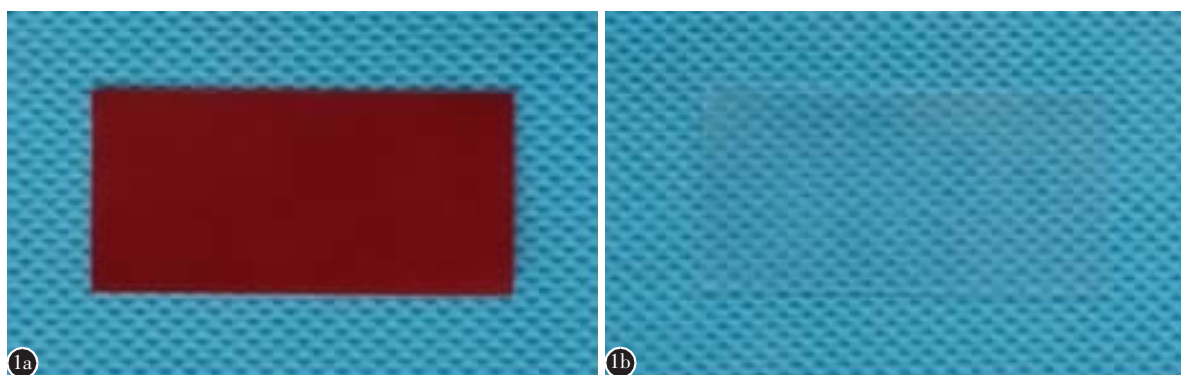


图 1 a 载缓释抗结核药 HRZ 涂层材料 b 空白涂层

Figure 1 a Sustained material with anti-tuberculosis drug HRZ b Sustained material without drugs

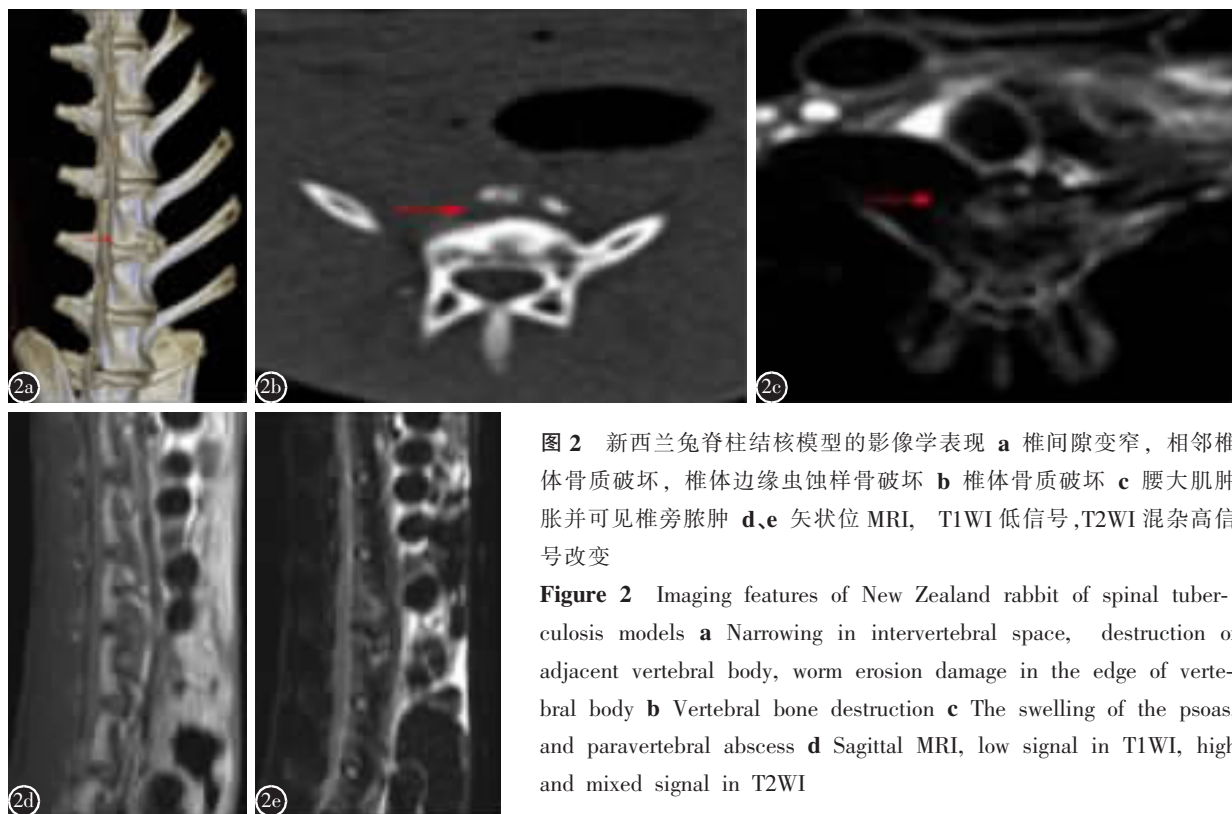


图 2 新西兰兔脊柱结核模型的影像学表现 **a** 椎间隙变窄, 相邻椎体骨质破坏, 椎体边缘虫蚀样骨破坏 **b** 椎体骨质破坏 **c** 腰大肌肿胀并可见椎旁脓肿 **d、e** 矢状位 MRI, T1WI 低信号, T2WI 混杂高信号改变

Figure 2 Imaging features of New Zealand rabbit of spinal tuberculosis models **a** Narrowing in intervertebral space, destruction of adjacent vertebral body, worm erosion damage in the edge of vertebral body **b** Vertebral bone destruction **c** The swelling of the psoas, and paravertebral abscess **d** Sagittal MRI, low signal in T1WI, high and mixed signal in T2WI

用。经左侧横突腹侧入路显露 L4/5 脊柱结核病灶, 根据病灶的范围进行彻底病灶清除术, 如感染范围较大, 应扩大清创范围。术后剔除缺损范围过大的病例, 尽量使病灶清除术后的骨缺损模型相似, 剔除病例予以补充。将病灶上、下正常椎体边缘处打磨平整, 根据骨缺损的范围, 修剪髂骨为合适的大小。A、B 组分别将载药涂层材料和空白涂层材料包裹于自体髂骨后植入骨缺损处, C 组单纯植入大小相似的自体髂骨。术后明胶海绵压迫止血, 逐层关闭切口, 敷料清洁包扎。

1.6 术后一般情况观察

每日观察兔的精神、进食、活动情况。手术切口定期换药, 观察切口有无红肿及渗出, 有无窦道及流脓, 怀疑切口感染及时处理, 必要时剔除予以补充。

1.7 病理学观察

解剖大体观察: 术后 2 周、4 周、8 周、16 周在影像学检查之后各组随机抽取 5 只兔处死, 切取实验兔的完整腰椎组织, 观察载药缓释涂层材料的降解情况、植骨界面愈合情况。

组织学观察: 切取植骨与正常骨交界处的骨痂, 用 10% 中性福尔马林水溶液固定。将骨-材料界面组织制成 2cm×2mm×0.3cm 标本, 进行脱钙、

清洁水冲洗、酒精与二甲苯逐级脱水、浸蜡、蜡片包埋、组织切片、HE 染色。每个蜡块制作 5 张切片, 观察切片标本的病理学特征。显微镜下观察植骨区域炎症细胞的浸润、成骨细胞和破骨细胞的分布、新生骨小梁的结构。采用相同倍数 (HE×200 倍) 与背景光度, 每个切片观察 5 个视野, 采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统测定骨小梁的面积。

外周脏器毒性的观察: 术后 2 周、4 周时留取实验组 (A 组) 兔的心、肝、脾、肾脏器制作病理标本, 观察植骨材料对外周脏器的组织毒性。

1.8 影像学观察

对实验组 (A 组) 兔术后的植骨愈合情况进行影像学观察。分别于术后 2 周、4 周、8 周、16 周在麻醉下行 X 线片、CT 三维重建及 MRI 检查, 观察植骨愈合情况。病灶愈合的指标为植骨材料与周骨组织融合良好^[5], 无椎体骨质破坏、结核脓肿等征象。

1.9 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。计量资料用均数±标准差表示, 采用单因素方差分析比较三组中骨小梁面积差异。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况观察

A 组 1 只兔术后精神差、进食差,于术后 2 周死亡。B 组 1 只兔术后切口红肿,数天后有波动感,穿刺有脓液,经换药后未愈。C 组 2 只兔术后切口形成窦道,有脓液渗出,影像学检查显示椎旁及软组织大量脓液积聚。死亡及失败实验兔均予以及时补充,保证每组在观察期内病例数一致。其余兔术后精神逐渐恢复,正常进食及饮水,活动量正常,切口愈合良好。

2.2 病理学观察

2.2.1 解剖大体观察 A 组:术后 2 周,植骨材料与骨缺损界面接触良好,但界限尚清楚,材料表面可见少量纤维组织覆盖,均无脱落现象,缓释抗结核药涂层质地略变软;术后 4 周,植骨材料与骨缺损界面稳定接触,不易脱落,接触面界限模糊,缓释抗结核药涂层质地已变软,表面可见溶蚀现象;术后 8 周,骨缺损处连接性骨桥形成,表面可见纤维组织覆盖,植骨材料与骨缺损界面结合紧密,界限无法分辨,缓释抗结核药涂层明显分解;术后 16 周,骨缺损处已由致密而规则的骨组织替代,硬度与周围骨组织相似,骨缺损处已达骨性愈合,表面有少量纤维组织包裹,缓释抗结核药涂层大部分已分解,局部仅残存少量淡红色颗粒状物质,植骨材料的降解已基本完毕。各观察时间点均未见脓肿、死骨、死腔及干酪样坏死物质。

B 组:术后 2 周,骨缺损处可见少量纤维组织包绕,未见材料脱落现象,植骨材料与骨缺损界面接触良好,界限清楚,空白涂层材料质地略软;术后 4 周,骨缺损处表面可见纤维组织覆盖,植骨材料与骨缺损界面稳定接触,界限模糊,空白涂层材料溶蚀明显,质地变软;术后 8 周,骨缺损处少量连接性骨桥形成,表面可见少量纤维组织覆盖,空白涂层材料大部分已分解,仅见少量残留,其中 2 只兔腰 5 椎体旁可见少量淡黄色脓液物质;术后 16 周,骨缺损处表面较多纤维组织覆盖,未见空白涂层材料,其中 1 只兔椎旁可见淡黄色脓性物质形成,骨缺损处病变性骨桥形成,骨桥及邻近椎体可见虫蚀样破坏及缺损。

C 组:术后 2 周,植骨材料与骨缺损界面接触良好,未见脱落,界限稍模糊,植骨处少量纤维组织覆盖;术后 4 周,植骨材料与骨缺损界面稳定接触,界限模糊,植骨处少量骨痂形成,局部增生明

显;术后 8 周,骨缺损处连接性骨桥形成,表面可见少量纤维组织覆盖,其中 1 只兔腰 5 椎旁可见少量淡黄色脓液物质;术后 16 周,骨缺损处瘢痕增生明显,骨缺损处骨桥形成,骨桥及邻近椎体可见虫蚀样破坏及缺损。其中 2 只兔椎旁可见淡黄色脓性物质形成。

2.2.2 镜下观察 A 组:术后 2 周,细胞水肿明显,并可见较多炎性细胞,中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞、巨噬细胞侵入,肉芽组织形成,同时存在大量成纤维细胞,材料少许降解;术后 4 周,植骨材料明显降解,可见新生的毛细血管及较多纤维结缔组织,植骨材料界面发生纤维连接,并有较多不规则成骨细胞及纤细的骨小梁形成,骨样组织形成;术后 8 周,可见少量炎性细胞,植骨材料在新生骨的包绕内降解,成颗粒状或散在岛状,可见哈弗管及新生血管,成骨细胞活跃增生,骨样组织逐渐骨化,新骨形成;术后 16 周,植骨材料几乎完全降解,骨细胞增殖活跃,板层骨生成进一步增多,形成的小梁骨增多,新骨间相互连接成片状,连接骨痂形成。

B 组:术后 2 周,可见大量炎性细胞,细胞水肿明显,可见少量纤维组织;术后 4 周,空白涂层材料已有明显降解,新生骨小梁间可见残留的空白涂层材料,成骨细胞增生不活跃;术后 8 周,椎体内可见肉芽肿性结节,成骨细胞增生欠活跃,骨小梁间可见散在分布的淋巴细胞、中性粒细胞;术后 16 周,形成的小梁骨增多,但骨小梁纤细、结构不规则,有部分坏死物质形成。

C 组:术后 2 周,可见炎性细胞浸润,大量纤维组织以及少量死骨形成;术后 4 周,新生骨小梁间可见大量炎性细胞,成骨细胞增生不活跃;术后 8 周,可见肉芽肿性结节及红染无结构的坏死干酪样物质,成骨细胞增生欠活跃,新生骨小梁不规则、纤细;术后 16 周,较多不规则成骨细胞及纤细的骨小梁形成,新生骨小梁间可见炎性细胞聚集(图 3)。

2.2.3 骨小梁面积比较 对三组各时间点骨-材料界面组织病理切片做骨小梁面积的定量分析:术后 2 周,A、B、C 三组间比较无统计学差异($P>0.05$);术后 4 周,三组骨小梁面积,C 组>A 组>B 组($P<0.05$);术后 8 周及术后 16 周,A 组骨小梁面积显著高于 B 组及 C 组($P<0.05$)(表 1)。

2.2.4 脏器毒性观察 术后 2 周及 4 周,切取 A

组兔的心、肝、脾、肾组织,并制作病理标本镜下观察,均未见组织损伤征象(图 4)。

2.3 影像学观察

实验组(A)组兔术后不同时间点的影像学检查结果(X 线、CT、MRI),观察至术后 16 周时,结核病灶愈合,植骨融合良好(图 5)。

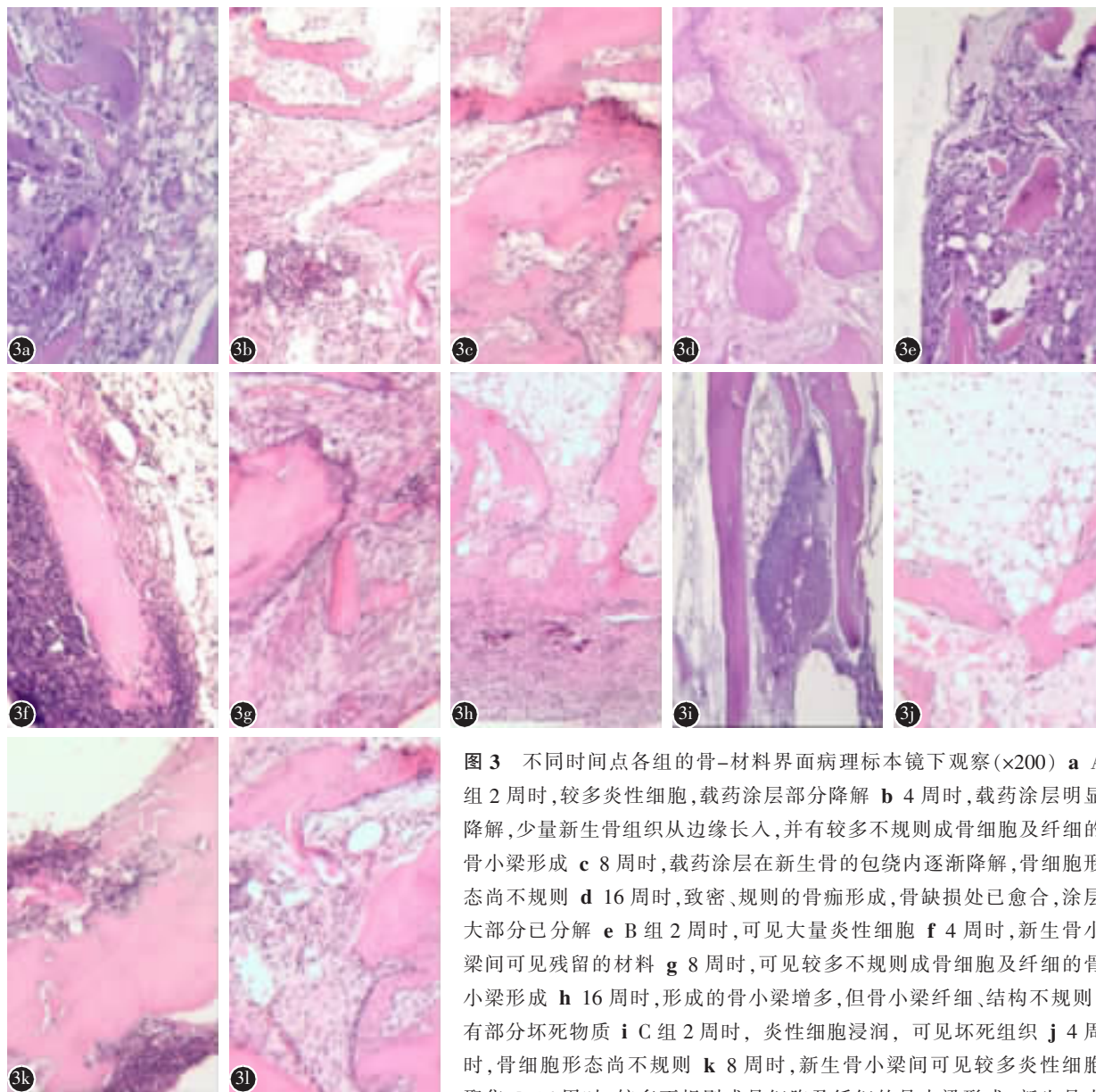


图 3 不同时间点各组的骨-材料界面病理标本镜下观察($\times 200$) **a** A 组 2 周时,较多炎性细胞,载药涂层部分降解 **b** 4 周时,载药涂层明显降解,少量新生骨组织从边缘长入,并有较多不规则成骨细胞及纤细的骨小梁形成 **c** 8 周时,载药涂层在新生骨的包绕内逐渐降解,骨细胞形态尚不规则 **d** 16 周时,致密、规则的骨痂形成,骨缺损处已愈合,涂层大部分已分解 **e** B 组 2 周时,可见大量炎性细胞 **f** 4 周时,新生骨小梁间可见残留的材料 **g** 8 周时,可见较多不规则成骨细胞及纤细的骨小梁形成 **h** 16 周时,形成的骨小梁增多,但骨小梁纤细、结构不规则,有部分坏死物质 **i** C 组 2 周时,炎性细胞浸润,可见坏死组织 **j** 4 周时,骨细胞形态尚不规则 **k** 8 周时,新生骨小梁间可见较多炎性细胞聚集 **l** 16 周时,较多不规则成骨细胞及纤细的骨小梁形成,新生骨小梁间可见炎性细胞聚集

梁间可见炎性细胞聚集

Figure 3 Microscopic observation of pathological specimens of bone-material interface in different groups at different time points($\times 200$) **a** Group A, 2 weeks, more inflammatory cells, partial degradation of drug-loaded coating **b** 4 weeks, obviously degradation of drug-loaded coating, a small amount of new bone grow from the border, formation of the more irregular osteoblasts and slender trabecular **c** 8 weeks, the coating gradually degenerated within the nascent bone wrapping, the bone cells have irregular shape **d** 16 weeks, dense, regular callus formation, bone defects have been healed, most of the coating decomposed **e** Group B, 2 weeks, a large number of inflammatory cells **f** 4 weeks, residues of material visible in new-generated bone trabecular **g** 8 weeks, more irregular osteoblasts and slender trabecular formation **h** 16 weeks, the trabecular bone increased, the trabecular bone is slender, irregular, and there are some necrotic substances **i** Group C, 2 weeks, infiltration of inflammatory cells, necrotic tissue **j** 4 weeks, irregular shape of the bone cells **k** 8 weeks, more inflammatory cell aggregation by the new bone trabecular **l** 16 weeks, formation of more irregular osteoblasts and slender trabecular, inflammatory cells and necrotic cells gathered between the new trabecular bone

表 1 三组各时间点骨-材料界面骨小梁总面积

Table 1 Total trabecular area of bone-material interface in three groups at each time point

	A组 Group A	B组 Group B	C组 Group C
2周 2 weeks	5130.10±565.33	5059.56±302.40	5281.66±459.47
4周 4 weeks	7050.26±125.09	6323.53±174.67	8056.33±252.13
8周 8 weeks	13486.53±907.25	8488.30±587.74	9047.96±1003.59
16周 16 weeks	16299.93±894.61	10317.40±1141.59	12280.23±2787.92

2.3.1 腰椎 X 线片检查 术后 2 周, 骨修复材料无脱落, 骨-材料界限仍清晰, 骨修复材料密度与其他椎体密度相似, 未见植骨融合征象; 术后 4 周, 骨-材料界面开始模糊, 有少量不规则纵向骨痂通过; 术后 8 周, 骨缺损处有大量骨痂包绕, 骨-材料界面新生骨组织桥接形成, 骨-材料界面模糊, 有纵向骨痂通过; 术后 16 周, 植骨区密度进一步增高, 无明显透亮区, 骨-材料界面骨桥形成, 植骨融合良好。

2.3.2 腰椎 CT 三维重建检查 术后 2 周, 植骨

块无脱落, 植骨块大小无明显变化, 无明显植骨融合迹象; 术后 4 周, 骨-材料界面稍模糊, 植骨块变小, 可见连续性骨痂通过, 骨质稍显稀疏, 仍有少许透亮区; 术后 8 周, 骨修复材料周围已有大量新生骨痂包绕, 骨-材料界面可见连续性骨痂及骨桥形成, 植骨界面模糊; 术后 16 周, 骨-材料周围骨痂形成, 新生骨痂致密、规则, 骨-材料结合紧密, 无法分辨界限, 植骨融合良好。

2.3.3 腰椎 MRI 检查 术后 2 周, 可见植骨处条状高信号(长 T1、长 T2 信号), 余信号无明显异常; 术后 4 周, 植骨界面处信号稍高, 骨-材料界面间隙稍模糊; 术后 8 周, 植骨界面处信号稍高, 植骨块与骨缺损界面间隙已消失; 术后 16 周, 植骨处信号略减低, 与邻近椎体骨质信号接近, 植骨块与邻近椎体融合, 界限无法分辨。

3 讨论

脊柱结核的外科治疗方法已趋成熟, 通过病灶彻底清除、局部植骨融合手术, 临床疗效显著提高^[16,17]。但仍然有部分患者出现结核复发、植骨不愈等问题, 临床及基础研究表明这与病灶局

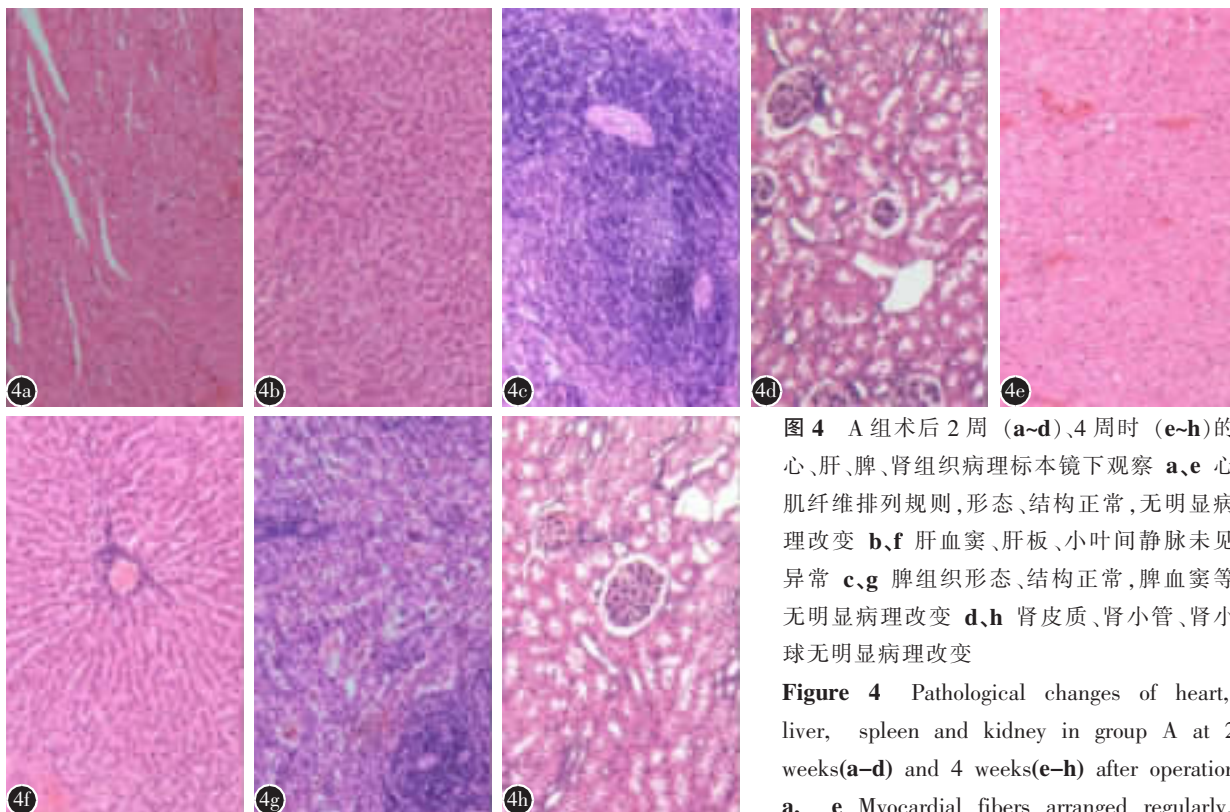


图 4 A 组术后 2 周 (a~d)、4 周时 (e~h) 的心、肝、脾、肾组织病理标本镜下观察 a、e 心肌纤维排列规则, 形态、结构正常, 无明显病理改变 b、f 肝血窦、肝板、小叶间静脉未见异常 c、g 脾组织形态、结构正常, 脾血窦等无明显病理改变 d、h 肾皮质、肾小管、肾小球无明显病理改变

Figure 4 Pathological changes of heart, liver, spleen and kidney in group A at 2 weeks (a~d) and 4 weeks (e~h) after operation a, e Myocardial fibers arranged regularly,

normal shape and structure no significant pathological changes b, f No abnormal in liver sinusoids, hepatic plate, interlobular vein c, g No abnormal in morphology and structure of spleen, no significant pathological changes in spleen and blood sinus d, h No significant pathological changes in renal cortex, tubules and glomerular

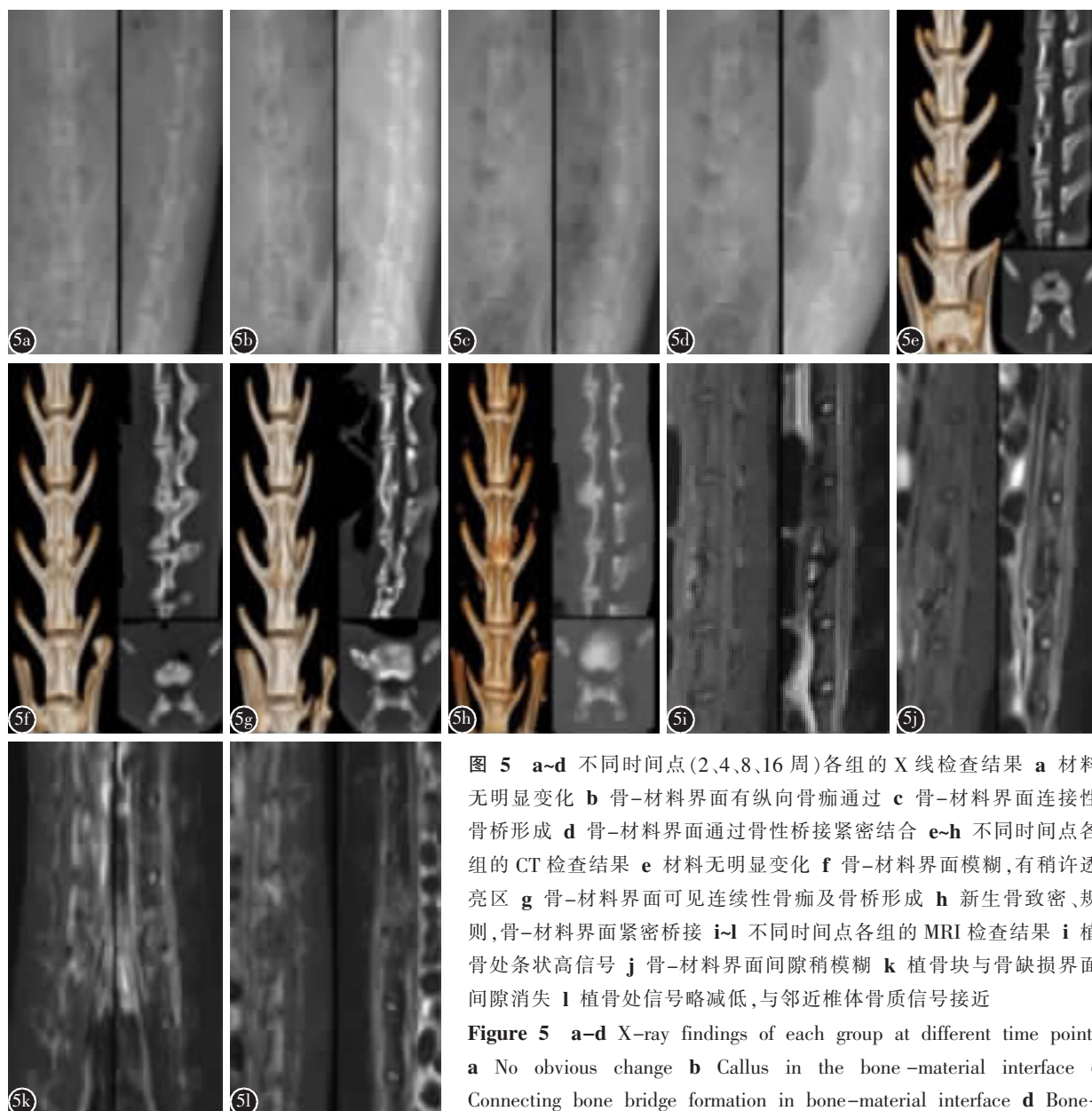


图 5 a~d 不同时间点(2、4、8、16 周)各组的 X 线检查结果 a 材料无明显变化 b 骨-材料界面有纵向骨痂通过 c 骨-材料界面连接性骨桥形成 d 骨-材料界面通过骨性桥接紧密结合 e~h 不同时间点各组的 CT 检查结果 e 材料无明显变化 f 骨-材料界面模糊,有少许透亮区 g 骨-材料界面可见连续性骨痂及骨桥形成 h 新生骨致密、规则,骨-材料界面紧密桥接 i~l 不同时间点各组的 MRI 检查结果 i 植骨处条状高信号 j 骨-材料界面间隙稍模糊 k 植骨块与骨缺损界面间隙消失 l 植骨处信号略减低,与邻近椎体骨质信号接近

Figure 5 a~d X-ray findings of each group at different time points a No obvious change b Callus in the bone-material interface c Connecting bone bridge formation in bone-material interface d Bone-material interface combined closely by bony bridging e~h CT findings at different time points e No obvious change f Bone-material interface is blurred, and there is a small translucent region g Continuous callus and bone bridge formation in the bone-material interface h The new bone is dense and regular, bone-material interface bind closely i~l The results of MRI examination at different time points i The strip-shaped high signal j Gap of Bone-material interface is fuzzy k The interface between the bone graft and bone defect disappeared l The signal of bone graft decreases slightly, which is close to the signal of adjacent vertebral body

部结核药物浓度不足有密切的关系^[5-7]。LDDS 是局部抗结核治疗的新方案^[9],聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)通过美国 FDA 认证,已在 LDDS 的实验研究中广泛应用^[18]。本研究中利用聚乳酸-羟基乙酸(PLGA)作为载体,根据三种抗结核药物 H、R、Z 理化性质的不同,采用复乳溶剂挥发法制备抗结核药物缓释材料。前期对缓释涂层材料的

体外释药规律研究发现^[11],三种药物在前 14d 左右按 Higuchi 方程释放,即药物从高浓度部位向低浓度部位扩散,14d 后按零级曲线规律释放,说明药物释放过程平稳。缓释到 70d 时三种药物浓度均大于 10 倍最低抑菌浓度(MIC),故表明该缓释材料在体外具有较好的载药缓释效果。对该缓释涂层材料在兔脊柱结核病灶的释药规律进行了

研究发现^[19],载缓释涂层材料的自体髂骨植入局部结核病灶清除术后的骨缺损部位后,检测到病灶周围骨组织中三种抗结核药(H、R、Z)的浓度在术后 3d 时都达到最高,此后随时间推移,三种药物的浓度均逐渐下降。至给药后 84 天时达到最低浓度,病灶中三种药物浓度在各检测时间点均 ≥ 10 倍 MIC,证明复合 HRZ/PLGA 缓释抗结核药涂层材料植入后可实现局部三药同时长时、高效、平缓释药。对缓释涂层材料的体外释药规律与体内释药研究为本实验提供了一定的研究基础。

新西兰兔是肺结核、脊柱结核模型研究中常用的理想实验模型^[20,21],采用弗氏完全佐剂致敏可以在局部起到持续刺激作用,椎体局部病变反应加剧,使结核感染后的骨破坏更加明显^[14]。标准结核分枝杆菌 H37Rv 具有较高侵袭性和传染性,用于结核病模型的研究比较理想^[22]。我科研究团队前期通过弗氏佐剂致敏、接种结核分枝杆菌标准菌株的方法制备新西兰兔脊柱结核模型^[14],并通过影像学、组织病理学、病原微生物学等指标综合评价,证实造模成功。本实验采用相同的造模方法,造模术后 2 个月,影像学检查发现椎间隙变窄、椎体虫蚀样破坏、椎旁脓肿等典型的结核破坏表现。随后,在病灶清除术中观察到术区椎旁有脓肿、椎体周围存在干酪样坏死物质,进一步证明该方法可以成功构建具有典型的结核病变特征的兔脊柱结核模型,是本研究成功的关键。

自体髂骨是自体骨移植重建中应用最多的材料,取材方便,无排异反应,含有大量骨生成细胞以及骨生长促进因子,植入骨缺损部位后具有良好的骨诱导、骨传导、骨生成能力^[23,24]。本研究将 HRZ/PLGA 缓释抗结核药涂层包裹于自体髂骨表面,术中植入骨缺损处完成骨修复。术后病理学观察表明,术后 2 周时植骨材料与相邻椎体骨组织接触界面已开始愈合,骨-材料界限已经没有刚植入时明显,大量炎性细胞浸润。观察期间发现成骨细胞增殖,说明该材料在局部不引起排异反应,并可启动骨修复。此时三组间骨小梁面积比较,无显著差异,这与骨修复处于初期有关。术后 4 周时缓释材料逐步降解,为新骨生成提供空间,同时发现残留缓释材料与新骨并存,并未影响骨生成过程,说明该材料生物相容性良好。此时 C 组骨小梁面积大于 A 组与 B 组,这可能是因为缓释涂层材料的存在,A、B 两组植骨材料与正常骨

组织的接触面有限,而涂层材料才开始降解,局部抗结核作用有限。术后 8 周时,缓释抗结核药物涂层材料大量降解,局部结核病灶得到控制,骨缺损修复处于高峰期,而 B 组与 C 组由于局部结核病灶未控制,骨缺损修复能力差,骨小梁面积与 A 组相比有显著差异。术后 16 周时,该材料接近完全降解吸收,骨缺损病灶植骨愈合良好,说明该材料降解产物可被局部组织吸收,不干扰骨缺损修复进程。且降解速度与病灶愈合速度基本保持一致,既不会因为材料先降解导致局部缺损变大,也没有因为降解吸收过慢而影响新骨形成。由于 PLGA 材料逐渐溶蚀,HRZ 抗结核药物可借助溶蚀通道释放到病灶区域。随着 PLGA 材料降解的加速,抗结核药物可在局部逐渐形成较高的药物浓度,逐渐杀灭局部结核杆菌。观察后期,材料中抗结核药物含量逐渐下降,PLGA 趋于完全分解,微孔孔径增大,骨修复达到高峰,新生骨小梁形成,材料降解空隙间形成新骨,并向成熟骨组织方向发展,新骨之间片状相连,生成板层骨,最终实现植骨界面的愈合。

通过病理学可以对骨缺损修复过程进行良好的观察^[25]。本研究中,因为骨修复材料植入脊柱结核病灶后,同时存在骨破坏与骨修复两种病理生理变化,骨修复材料在逐步降解的过程中具备何种空隙结构,植骨界面的融合过程,骨小梁长入的方式以及骨小梁结构的变化,可以进行组织病理学观察^[25,26],因此病理学结论一致被认为是判定植骨愈合的金标准。实验组观察至术后 16 周时,植骨材料与周围椎体已达到骨性融合,局部未发现结核脓肿、干酪样坏死物质等,证明该材料具有一定的抗结核性能,并能促进局部骨缺损的修复。对实验组兔进行影像学观察,X 线及 CT 显示植骨达到骨性愈合,MRI 显示植骨部位与周围正常骨组织界限模糊,进一步证实了骨缺损修复的效果。病理学观察的优势在于可以提供直观的病变特征与骨修复过程,结合影像学观察,最终证明载三联抗结核药 HRZ/PLGA 的复合植骨材料对脊柱结核病灶的局部治疗、术后骨缺损的修复有良好的效果,为局部药物缓释系统的临床研究提供了一定的实验基础和参考价值。

对于外周组织毒性的观察,组织病理学提供了直观的观察标准,植骨材料界面愈合完好,说明局部抗结核药物浓度达到要求,但未见明显外周

脏器组织损伤的征象,说明该植骨材料在体内留存数月后,主要通过局部缓释发挥作用,入血量少。病理学对肝肾脏器有无损伤提供了直观的观察指标,并排除了实验室检查可能存在的干扰因素,结果更为可靠。

本研究的不足在于观察时间短,观察指标有限,该材料对结核病灶的长期控制效果以及远期并发症未知,对于扫描电镜下骨愈合界面超微结构的观察、抗结核药物的组织分布特征、肝肾毒性与传统口服给药的对比还需要进一步研究。

4 参考文献

- Jain AK. Tuberculosis of the spine: a fresh look at an old disease[J]. J Bone Joint Surg Br, 2010, 92(7): 905-913.
- 王自立. 进一步规范脊柱结核的治疗[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2010, 20(10): 793-794.
- Lesic' AR, Pesut DP, Markovic Denic L, et al. The challenge of osteo-articular tuberculosis in the twenty-first century: a 15-year population-based study [J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2010, 14(9): 1181-1186.
- Lei Y, Liu Z. Analysis and therapeutic schedule of the post-operative recurrence of bone tuberculosis [J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2010, 14(9): 1181-1186.
- 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.
- Hirota K, Hasegawa T, Nakajima T, et al. Delivery of rifampicin-PLGA microspheres into alveolar macrophages is promising for treatment of tuberculosis [J]. J Control Release, 2010, 142(3): 339-346.
- 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.
- Tuli SM. Historical aspects of Pott's disease (spinal tuberculosis) management[J]. Eur Spine J, 2013, 22(Suppl 4): S529-S538.
- Dutt M, Khuller GK. Sustained release of isoniazid from a single injectable dose of poly (DL-lactide-co-glycolide) microparticles as a therapeutic approach towards tuberculosis [J]. Int J Antimicrob Agents, 2001, 17(2): 115-122.
- 燕荣帅, 李力韬, 张泽华. 耐利福平脊柱结核的分子药敏检测及药物缓释系统的研究进展[J]. 中国矫形外科杂志, 2011, 19(21): 1807-1809.
- 杨宗强, 吴龙云, 施建党, 等. 不同比例三联抗结核药物复合缓释材料的释药性能观察[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2017, 27(12): 1099-1106.
- Geng G, Wang Q, Shi J, et al. Establishment of a New Zealand rabbit model of spinal tuberculosis[J]. J Spinal Disord Tech, 2015, 28(3): 140-145.
- Liu X, Jia W, Wang H, et al. Establishment of a rabbit model of spinal tuberculosis using mycobacterium tuberculosis H37Rv[J]. Jpn J Infect Dis, 2015, 68(2): 89-97.
- 耿广起, 王骞, 王自立, 等. 构建新西兰兔脊柱结核模型的对比研究[J]. 中华骨科杂志, 2014, 34(2): 216-223.
- Nakashima H, Yukawa Y, Ito K, et al. Extension CT scan: its suitability for assessing fusion after posterior lumbar interbody fusion[J]. Eur Spine J, 2011, 20(9): 1496-1502.
- Tang MX, Zhang HQ, Wang YX, et al. Treatment of Spinal Tuberculosis by Debridement, Interbody Fusion and Internal Fixation via Posterior Approach Only[J]. Orthop Surg, 2016, 8(1): 89-93.
- Shi JD, Wang ZL, Geng GQ, et al. Intervertebral focal surgery for the treatment of non-contiguous multifocal spinal tuberculosis[J]. Int Orthop, 2012, 36(7): 1423-1427.
- Xu Y, Kim CS, Saylor DM, et al. Polymer degradation and drug delivery in PLGA-based drug-polymer applications: A review of experiments and theories [J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2017, 105(6): 1692-1716.
- 岳学锋, 张俊, 施建党, 等. 复合 HRZ/PLGA 缓释抗结核药涂层材料在兔脊柱结核病灶释药研究 [J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2016, 26(6): 537-544.
- Mendez S, Hatem CL, Kesavan AK, et al. Susceptibility to tuberculosis: Composition of tuberculous granulomas in Thorbecke and outbred New Zealand White rabbits [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2008, 122(1-2): 167-174.
- Kamlesh P, Singh JS, Pal SP. Models of Latent Tuberculosis: Their Salient Features, Limitations, and Development[J]. J Lab Physicians, 2011, 3(2): 75-79.
- Whelan AO, Coad M, Cockle PJ, et al. Revisiting host preference in the Mycobacterium tuberculosis complex: experimental infection shows M. tuberculosis H37Rv to be avirulent in cattle[J]. Plos One, 2010, 5(1): e8527.
- Nauth A, Lane J, Watson JT, et al. Bone graft substitution and augmentation[J]. J Orthop Trauma, 2015, 29(Suppl 12): S34-S38.
- France JC, Schuster JM, Moran K, et al. Iliac crest bone graft in lumbar fusion: the effectiveness and safety compared with local bone graft, and graft site morbidity comparing a single-incision midline approach with a two-incision traditional approach[J]. Global Spine J, 2015, 5(3): 195-206.
- Harris JS, Bemenderfer TB, Wessel AR, et al. A review of mouse critical size defect models in weight bearing bones[J]. Bone, 2013, 55(1): 241-247.
- 张卓. 载三联抗痨药硫酸钙/聚氨基酸人工骨植骨愈合的病理学及超微结构观察[D]. 宁夏医科大学, 2013.

(收稿日期:2018-02-23 修回日期:2018-04-20)

(英文编审 郑国权/贾丹彤)

(本文编辑 彭向峰)