

基础研究

异烟肼聚乳酸缓释体的制备及体内外释药特性

刘江涛¹, 王永清², 夏侃³, 段 祎¹, 夏仁云⁴, 阎学军¹

(1 湖北省襄樊市第一人民医院骨科 440015; 2 天津市第四中心医院骨科 300140;

3 武汉市第一医院骨科 430030; 4 华中科技大学附属同济医院骨科 430030 武汉市)

【摘要】目的:探讨异烟肼聚乳酸微球的制备方法和体内外释药特性。**方法:**用复乳法制备异烟肼聚乳酸微球, 扫描电子显微镜观察微球的特征, 高效液相色谱法测定其包封率、载药率; 用溶出法、高效液相色谱法测定其体外释药特性, 观测第 3、6、9、12、15、18、25、32、39、42、49、56 天的释药情况, 并计算其日均释药率、累计释药率; 将异烟肼聚乳酸微球、异烟肼(INH)分别置入 24 只新西兰大白兔的左右股骨粗隆间髓腔内, 测定微球在体内 3、7、14、28、42、56d 时的释药情况; 实验组将第 42、49、56 天时的异烟肼聚乳酸微球洗涤液(空白组用磷酸缓冲液)与结核菌、钛块一起共同培养 7d, 扫描电子显微镜下观察结核菌生长情况。**结果:**异烟肼聚乳酸微球呈比较完整的球形且分散性好, 无明显聚集现象; 微球平均直径为 $59.4 \pm 2.9 \mu\text{m}$, 包封率为 $(67.51 \pm 0.57)\%$, 载药率为 $(32.82 \pm 0.65)\%$ 。体外释药结果显示, 最初 14d 累计释药达 $3.784 \pm 0.359 \text{mg}$, 约占总量的 30%, 日平均释药 $0.270 \pm 0.024 \text{mg}$; 随后 42d 累计释药 $5.328 \pm 0.203 \text{mg}$, 约占总量的 50%, 日平均释药 $0.126 \pm 0.013 \text{mg}$, 第 56 天时释药 $0.032 \pm 0.009 \text{mg}$ 。体内释药实验显示, 3d 时右侧股骨粗隆间骨质内 INH 浓度明显高于左侧 ($P < 0.01$); 7~56d 右侧 INH 浓度明显降低并低于左侧 ($P < 0.01$); 7~56d 左侧股骨粗隆间骨质内 INH 浓度持续在 $20 \mu\text{g/g}$ 以上。空白组钛块表面有大量结核菌生长, 实验组钛块表面几乎无结核菌生长。**结论:**异烟肼聚乳酸微球具有缓慢释放药物的特性, 可以作为持久抗结核治疗的缓释体置入骨结核病灶清除术后病灶局部。

【关键词】 异烟肼; 聚乳酸; 缓释; 体外; 体内; 骨结核

中图分类号: R529.2, R978.3 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2008)-04-0290-04

Preparation of isoniazid polylactic acid microspheres and characteristics of the drug release in both vitro and vivo/LIU Jiangtao, WANG Yongqing, XIA Kan, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2008, 18(4):290~293

【Abstract】 Objective: To study the preparative method and the characteristics of drug release in both vitro/vivo of the isoniazid polylactic-acid microspheres. **Method:** Isoniazid polylactic-acid microspheres were prepared by the double emulsification solvent evaporation procedure. The appearance of the microspheres was observed by scanning electron microscope (SEM) and their average diameter was measured. Their envelopment rate and drug-carried rate were determined by high efficiency liquid chromatography (HELIC). Their release characteristics were studied in vitro by dissolution method. The release quantity at the 3d, 6d, 9d, 12d, 15d, 18d, 25d, 32d, 39d, 42d, 49d, 56d, was determined, and calculated the mean day release rate, the total release rate. The microspheres and INH were implanted respectively in the femoral trochanter in the 24 rabbits, and their release characteristics in vivo were studied by HELIC on the 3d, 7d, 14d, 28d, 42d, 56d. The eluent of microspheres and the Mycobacterium tuberculosis were co-cultured to determine the effect of anti-tuberculosis by observing the growth of Mycobacterium tuberculosis with SEM. **Result:** Isoniazid polylactic-acid microspheres presented complete globe, good dispersibility and no obviously aggregation. Their average diameter was $59.4 \pm 2.9 \mu\text{m}$, envelopment rate $(67.51 \pm 0.57)\%$ and drug-carried rate $(32.82 \pm 0.65)\%$. In vitro, the released INH added up to $3.784 \pm 0.359 \text{mg}$ (daily mean $0.270 \pm 0.024 \text{mg}$) in the first 14 days that accounted for 30 percent of the total amount. In the following 42 days, the released INH added up to $5.328 \pm 0.203 \text{mg}$ (daily mean $0.126 \pm 0.013 \text{mg}$) that held 50 percent of the total amount. On the 56th day, the released INH was $0.032 \pm 0.009 \text{mg}$. In

基金项目: 内蒙古科技厅科技合作项目(2004006)

第一作者简介: 男(1973-), 主治医师, 医学博士, 研究方向: 人工关节

电话: (0710)3420053 E-mail: ljt73@sohu.com

vivo, isoniazid polylactic-acid microspheres slowly released INH more than 56 days, the concentration of INH in the femoral trochanter was over 20 μ g/g. The eluent of microspheres on the 42nd, 49th and 56th day could obviously inhibit Mycobacterium tuberculosis. **Conclusion:** Isoniazid polylactic-acid microsphere has the characteristic of slowly INH releasing, it can be implanted in the tuberculous focus after clearance of focal lesion so as to maintain the effect of anti-tuberculosis and reduce the toxic side effect of INH to the whole body.

[Key words] Isoniazid; Polylactic acid; Bone tuberculosis; Delayed release; In vitro; In vivo

[Author's address] Orthopedic Department, Xiangfan First Hospital, Xiangfan, Hubei, 440015, China

由于抗结核药物的毒副作用^[1]、到达靶器官之前药物的降解、低渗透性以及较低的患者耐受性,使其临床治疗效果受到限制,这样就要求开发使用载药释放系统应用于局部,以达到更好的治疗效果。目前,聚乳酸(PLA)已经广泛应用于载药释放系统的实验研究^[2,3],其中外消旋聚乳酸(D, L-poly-lactic-acid, PDLLA)是经 FDA 批准可用作医用手术防粘连膜和注射用微胶囊、微球及埋植剂等缓释制剂的材料。本研究主要探讨载药缓释剂异烟肼聚乳酸微球的制备方法及其体内外释药特性。

1 材料与方法

1.1 动物、试剂与仪器

雄性 6 个月大的新西兰大白兔 24 只, 体重 3.0~3.5kg, 由华中科技大学同济医学院动物中心提供。PDLLA 由武汉理工大学生物中心合成并提供, 重均分子量为 20~70 万; 乙酸乙酯(分析纯, 武汉联碱厂); 异烟肼(INH)粉剂由美国 Sigma 公司提供, 二氯甲烷、磷酸氢二钠和磷酸二氢钾均为市售分析纯。DC-低温恒温槽, S-212 恒速搅拌机, 800 型离心机, DZF-3 型真空干燥箱, HITACHI U-3400 型紫外分光光谱仪, JEOL JSM-5610LV 型扫描电子显微镜, WCT-2A 型微机差热天平。

1.2 异烟肼聚乳酸微球的制备

采用复乳-溶媒挥发法制备异烟肼聚乳酸微球。120mg PDLLA 溶解于 1ml 二氯甲烷中(油相), 120mg INH 溶解于 1ml 磷酸缓冲液(PBS)中(内水相); PDLLA 和 INH 的质量比保持在 50:50(质量/质量, W/W)。内水相冷却至 4℃置于冰块上超声搅拌, 将油相加入迅速搅拌着的内水相中, 超声搅拌乳化; 待均匀的初乳形成后, 将其置入 1ml 20%的聚乙烯醇水溶液(质量/体积, W/V)中, 持续搅拌过夜使其混合均匀、固化, 使二氯甲烷挥发;

将乳液离心分离, 离心得到的固体以 PBS 洗涤, 再次离心分离; 反复洗涤、离心 3 次, 见微球混悬于 PBS 中; 最后将离心得到的固体置于玻璃皿中, 放入真空干燥箱中室温下干燥 15d, 直到固体粉末质量恒定不变。

1.3 异烟肼聚乳酸微球载药形态观察和微球直径测量

在光学显微镜下观察微球形态。用扫描电子显微镜(SEM)观察微球, 放大倍数分别为 200 倍、500 倍、1000 倍、2000 倍, 观察不同放大倍数下微球的形态和表面状况。根据 SEM 照片测量微球直径并计算其平均直径(样本 $n=500$)。

1.4 异烟肼聚乳酸微球的包封率和载药率测定

称取 10mg 载药异烟肼微球, 置入二氯甲烷 10ml 中, 超声搅拌 30min, 使微球中的药物充分释放溶解在其中; 之后离心分离, 取上清液, 用高效液相色谱法检测药物浓度, 计算微球载药率和包封率, 微球载药率=(微球中药物总量/微球总量) $\times$ 100%, 微球包封率=(微球中药物总量/投药量) $\times$ 100%。

1.5 异烟肼聚乳酸微球的体外释药实验

称取异烟肼聚乳酸微球 35mg, 置于透析袋中, 加入 1ml pH 为 7.4 的 PBS, 使微球悬浮于 PBS 液中; 将透析袋封口后置入盛有 5ml PBS 的锥形瓶中, 37℃恒温孵育; 并于 3、6、9、12、15、18、25、32、39、42、49、56d 分别从锥形瓶中取出 5ml 液体(-20℃冻存待检), 同时加入 5ml PBS 于锥形瓶内。用高效液相色谱法检测上述样本中 INH 含量。

1.6 异烟肼聚乳酸微球的体内释药实验

将 24 只新西兰大白兔随机分为 6 组, 每组 4 只。每组每只于左右股骨粗隆间钻直径 5mm 圆孔直至髓腔, 左侧孔内置入异烟肼聚乳酸微球 15mg, 右侧孔内置入 INH 5mg, 骨蜡封闭孔口。于术后 3d 及 1、2、4、6、8 周分批处死一组(4 只)动

物,取双侧股骨粗隆间 0.5cm^3 大小骨块骨质,分别粉碎后加入 5ml PBS 匀浆,400 转/min 离心 15min,留取上清液 -20°C 冻存待检。用高效液相色谱法检测上述样本中 INH 含量。

1.7 异烟肼聚乳酸微球洗涤液抑菌试验

实验组:取体外释药实验第 42、49、56 天的异烟肼聚乳酸微球洗涤液 1ml, $20\mu\text{m}$ 微孔滤器过滤,与结核菌、钛块一起共同培养;空白组:取等量的 PBS 与结核菌、钛块一起共同培养。共同培养 7d 后在扫描电子显微镜下观察结核菌生长情况。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件的成对样本 t 检验分析, $P<0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

经过成球、干燥等工艺后,异烟肼聚乳酸微球呈白色粉末状。在光学显微镜下微球呈比较完整的球形且分散性好,无明显聚集现象。扫描电子显微镜下观察,微球呈球形,表面有微孔、凹陷(图 1,后插页 I)。微球平均直径为 $59.4\pm 2.9\mu\text{m}$,微球包封率为 $(67.51\pm 0.57)\%$,微球载药率为 $(32.82\pm 0.65)\%$ 。

异烟肼聚乳酸微球体外释药结果显示,在最初 14d 累计释药达 $3.784\pm 0.359\text{mg}$, 约占总量的 30%,日平均释药 $0.270\pm 0.024\text{mg}$;在随后 42d 累计释药 $5.328\pm 0.203\text{mg}$,约占总量的 50%,日平均释药 $0.126\pm 0.013\text{mg}$,第 56 天释药 $0.032\pm 0.009\text{mg}$ 。在最初 14d 内载药微球出现药物突释现象,随后 42d 药物缓慢释放,释放量逐渐减少;药物释放周期达 56d 以上(图 2~4,后插页 I)。

异烟肼聚乳酸微球体内释药实验结果显示,3d 时大白兔右侧股骨粗隆间骨质内 INH 浓度明显高于左侧 ($P<0.01$),7~56d 右侧 INH 浓度明显降低并低于左侧 ($P<0.01$);7~56d 左侧股骨粗隆间骨质内 INH 浓度持续在 $20\mu\text{g/g}$ 以上(表 1)。

扫描电子显微镜下($\times 200, \times 3000$)观察,空白组钛块表面有大量结核菌生长,与第 42、49、56 天载药微球洗涤液共培养的钛块表面无结核菌生长

(图 5、6,后插页 I)。

3 讨论

早期、联合、适量、规律和全程使用敏感药物化疗是骨结核手术治疗成功的保障。但在骨结核的治疗中,病灶部位血循环较差,术后周围瘢痕形成,即使全身应用大量抗结核药,病灶区域也很难达到有效杀菌浓度,往往导致结核复燃。因此,有些学者主张局部应用抗结核化疗药物,以提高局部抗结核效果^[2,4,5]。目前,结核病灶清除术后局部应用抗结核化疗药物的价值已得到肯定,但局部用药的形式多为抗结核化疗药物的直接应用或明胶海绵吸附的局部应用等,这些用药方式药物吸收较快,不可能在局部维持较长时间的有效浓度,因而效果不甚理想。选择维持时间长及副反应小的缓释制剂是结核病灶清除术后理想的局部用药方式。

缓释、控释剂所用的载体必须是可生物降解且生物相容性好的聚合物。Yolles 等^[6]提出用 PLA 作为缓释基质来控制生物活性物质的释放,其优点:(1)聚合物载体无毒;(2)按药物的要求,可以通过改变共聚物的组成来控制其降解速度;(3)缓释剂载体可通过溶液或熔体来制作,这样就可以方便地获得缓释设计效果。PLA 在体内能被水解脱脂生成乳酸单体,继而被乳酸脱氢酶氧化为丙酮酸,作为能量物质参加三羧酸循环,最终生成 CO_2 和 H_2O ,经肺、肾、皮肤排泄。目前,聚乳酸微球已经成为可以选择的载药载体^[2,3]。

之前,也有较多学者致力于抗结核缓释系统的研究,主要是吸入剂、注射剂以及皮下埋植剂。Makino 等^[7]将利福平包被在 PLA 中制成载药微球,测定不同载药率的微球在 pH 7.4、6.0 和 4.0 的 PBS 中的释放率,发现在 pH 7.4 的 PBS 中其释放周期达到 20d 以上。Suarez 等^[8]用载有利福平的 PLA 微球喷雾给药治疗肺结核模型荷兰猪,28d 后取组织行细菌学和组织病理学分析,与对照组(未治疗组)、单纯利福平喷雾给药组比较,有活力的结核菌明显减少,肺部组织的炎症和损害

表 1 不同时间点大白兔左右侧股骨粗隆间骨质内的 INH 浓度 ($\mu\text{g/g}$, $n=4$)

	3d	7d	14d	28d	42d	56d
右侧股骨粗隆间骨质内 INH 浓度	819.9 ± 3.2	35.1 ± 1.4	7.2 ± 1.1	1.7 ± 0.5	1.4 ± 0.3	0.9 ± 0.2
左侧股骨粗隆间骨质内 INH 浓度	59.1 ± 1.5^{①}	146.3 ± 0.9^{①}	62.9 ± 2.1^{①}	54.8 ± 2.7^{①}	44.1 ± 1.3^{①}	33.5 ± 1.8^{①}

注:与右侧比较 $P<0.01$

要小。Dutt 等^[9]研究表明,以 PLA 为载体制出的 INH、利福平微球体外释放周期可以达到 6d、49d;体内研究显示 INH 持续释放至血浆和不同组织可以达到 9d 和 27d,而利福平可以达到 12h 和 27d;生化实验显示没有肝脏毒性;PLA 载药微球释放抗结核药物较脂质体载药系统更为持久。

INH 作为一线抗结核药物,对结核杆菌有高度选择性,抗菌作用强,在试管内 0.025~0.05 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度即可抑菌,较高浓度(10 $\mu\text{g/ml}$)对繁殖细菌有杀菌作用;对静止期的结核杆菌,提高药物浓度或延长接触时间也可有杀菌作用;且对细胞内外的结核杆菌具有同等杀灭作用,因此临床应用比较多。是研制抗结核药物缓释剂的常选药物。本实验选择 INH 作为研究对象。

本实验用扫描电子显微镜观察,微球呈球形,表面有微孔、凹陷,考虑为二氯甲烷或水挥发过程中形成的。微球直径为 $59.4\pm 2.9\mu\text{m}$,这与 PDLLA 的分子量、搅拌速率以及时间有关,它也影响载药率和包封率;本实验微球包封率为 $(67.51\pm 0.57)\%$,微球载药率为 $(32.82\pm 0.65)\%$ 。体外释药结果说明异烟肼聚乳酸微球可以初步达到缓慢释放药物的目的,释药周期长达 8 周,可以满足局部结核病灶清除术后抗结核药物治疗的需要。体内释药结果说明异烟肼聚乳酸微球可以缓慢释放 INH,释放周期长达 8 周以上;与直接放入 INH 比较,异烟肼聚乳酸微球可以相对控制释放 INH,释放周期较长。一般高分子作为药物载体时,随着载体中药物含量的减少,药物的释放速度变慢,无法保持药物的恒量释放。研究发现用生物降解性高分子作药物载体时,随着高分子在体内的不断降解,药物载体的结构逐渐变得疏松,使里面所含的药物从中溶解和扩散的阻力减小,药物释放速度加快;当药物释放速度的加快正好与含药量的减少所引起的释药速度变慢一致时,就实现了药物的长期恒量释放,直到载体降解完为止^[10]。而 PIA 的降解与其本身分子量大小以及体内微环境(如酸碱度、电解质等)有关^[11]。此外,用生物降解高分子作为载体的长效药物置入体内,在药物释放完后,不需要手术取出,可以减少患者的痛苦。抑菌实验结果表明第 42、49、56 天时的异烟肼聚乳酸微球洗涤液可以明显抑制细菌生长,达到了抗结核目的。第 56 天时的洗涤液浓度($32.4\pm 9.1\mu\text{g/ml}$)远在最小抑菌浓度(MIC)之上,也高于最小杀菌

浓度(10 $\mu\text{g/ml}$),所以可以明显抑制结核菌生长,达到抗结核目的。

本实验研制的异烟肼聚乳酸微球具有缓释特性,释放周期长达 8 周以上,可作为持久抗结核治疗的缓释体置入骨结核病灶清除术后病灶局部。

4 参考文献

1. 刘江涛,王永清,张卫国,等.异烟肼对大鼠成骨细胞影响的观察[J].中国脊柱脊髓杂志,2006,16(12):231-233.
2. 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.
3. Jalon EG,Blanco-Prieto MJ,Ygartua P,et al. PLGA microparticles:possible vehicles for topical drug delivery [J].Int J Pharm,2001,226(1-2):181-184.
4. Tomoda K,Kojima S,Kajimoto M, et al. Effects of pulmonary surfactant system on rifampicin release from rifampicin-loaded PLGA microspheres [J].Colloids Surf B Biointerfaces,2005,45(1):1-6.
5. Pandey R,Sharma A,Zahoor A,et al. Poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticle-based inhalable sustained drug delivery system for experimental tuberculosis[J].J Antimicrob Chemother,2003,52(6):981-986.
6. Yolles S,Leafe TD,Woodland JH,et al. Long acting delivery systems for narcotic antagonists II:release rates of naltrexone from poly(lactic acid) composites[J].J Pharm Sci,1975,64(2):348-349.
7. Makino K,Nakajima T,Shikamura M,et al. Efficient intracellular delivery of rifampicin to alveolar macrophages using rifampicin-loaded PLGA microspheres:effects of molecular weight and composition of PLGA on release of rifampicin[J].Colloids and Surf B Biointerfaces,2004,36(1):35-42.
8. Suarez S,O'Hara P,Kazantseva M, et al. Respirable PLGA microspheres containing rifampicin for the treatment of tuberculosis:screening in an infectious disease model[J].Pharm Res,2001,18(9):1315-1319.
9. 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,2001,18(3):245-252.
10. Spenlehauer G,Vert M,Benoit JP,et al. In vitro and in vivo degradation of poly(D,L-lactide/glycolide) type microspheres made by solvent evaporation method[J].Biomaterials,1989,10(8):557-563.
11. Siegel SJ,Kahn JB,Metzger K,et al. Effect of drug type on the degradation rate of PLGA matrices [J].Eur J Pharm Biopharm,2006,64(3):287-293.

(收稿日期:2007-11-16 修回日期:2008-02-28)

(英文编审 郭万首)

(本文编辑 李伟霞)