

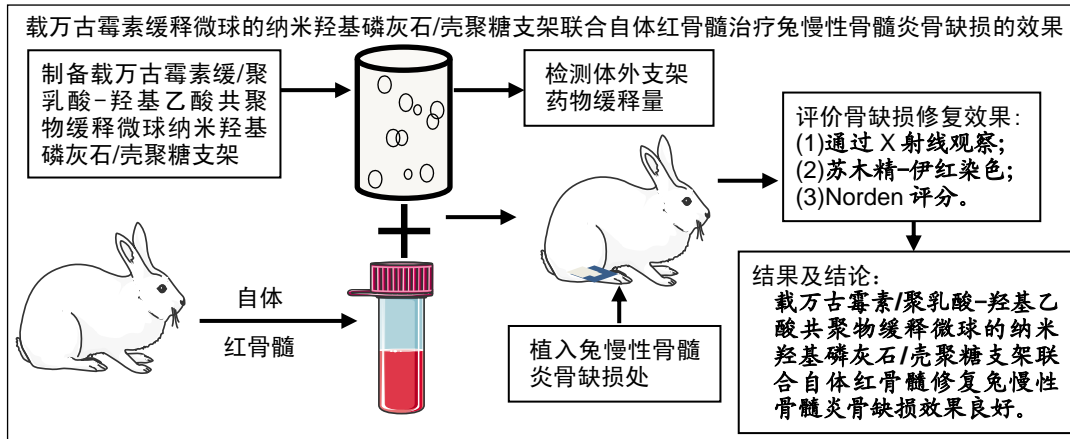
# 载万古霉素缓释微球纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架联合自体红骨髓可修复慢性骨髓炎兔的骨缺损

向柄彦, 李 鹏, 柏 帆, 周思睿(遵义市第一人民医院, 贵州省遵义市 563000)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1568

ORCID: 0000-0001-6130-0224(向柄彦)

文章快速阅读:



向柄彦, 男, 1978年生, 贵州省遵义市人, 汉族, 2017年重庆医科大学毕业, 博士, 副主任医师, 主要从事创伤修复、数字骨科研究。

文献标识码:A

稿件接受: 2018-08-24



## 文题释义:

**载万古霉素/聚乳酸-羟基乙酸共聚物缓释微球:** 万古霉素属于糖肽类抗生素, 已被广泛用于治疗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌和其他革兰阳性菌感染, 其半衰期一般为6-8 h, 因此治疗时需要按时维持药物浓度; 聚乳酸-羟基乙酸共聚物是由乳酸和羟基乙酸按照特定比例聚合生成的高分子材料, 具有理想的生物相容性及可降解性, 已在生物医学领域得到广泛研究, 利用其制备的聚乳酸-羟基乙酸共聚物缓释微球载药量、包封率及释放效率高, 因此采用聚乳酸-羟基乙酸共聚物制备的万古霉素缓释微球具有较高的载药量、包封率及释放效率, 可持续维持药物浓度, 达到更好的治疗效果。

**自体红骨髓:** 自体红骨髓取自实验动物自体, 可避免移植治疗中的免疫排斥及配型等问题, 并且其中含有丰富的基质细胞, 在体内或体外均可被诱导成骨, 可成为骨组织工程的种子细胞。此外, 自体红骨髓具备取材简便、操作容易及极少出现并发症等优点, 有利于临床应用。

## 摘要

**背景:** 前期研究证实, 万古霉素缓释微球对慢性骨髓炎具有良好的治疗效果, 纳米羟基磷灰石/壳聚糖具有良好的生物相容性、降解性及成骨诱导性, 自体红骨髓联合纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架可用于修复兔桡骨骨缺损。因此, 3者联合修复慢性骨髓炎骨缺损的效果有待验证。

**目的:** 探讨载万古霉素/聚乳酸-羟基乙酸共聚物(polyactic-co-glycolic acid, PLGA)缓释微球的纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架, 联合自体红骨髓修复慢性骨髓炎骨缺损的治疗效果及可行性。

**方法:** 采用水-油-水乳相法制备万古霉素/PLGA缓释微球, 将缓释微球与纳米羟基磷灰石/壳聚糖混合液充分混匀, 采用真空冷冻干燥法制备载万古霉素/PLGA缓释微球的纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架, 对支架进行力学性能测试及万古霉素释放量检测。在20只5月龄新西兰大白兔(解放军第三军医大学大坪医院实验动物中心提供)左侧胫骨髓腔内注射金黄色葡萄球菌, 构建慢性骨髓炎骨缺损模型, 随机分4组干预, A组仅作清创处理, B组清创后植入纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架, C组清创后植入载万古霉素/PLGA缓释微球纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架, D组清创后植入载万古霉素/PLGA缓释微球纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架及自体红骨髓。治疗3个月后, 通过X射线、病理苏木精-伊红染色评价骨缺损修复效果。

**结果与结论:** ①载万古霉素/PLGA缓释微球的纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架, 具有良好的生物力学性能及缓慢平稳释放万古霉素的能力; ②治疗3个月后的X射线显示, A、B组胫骨近端仍见明显的缺损区、骨质破坏及骨膜反应; C组可见新生骨形成, 缺损区稍模糊, 但仍有缺损存在; D组可见新骨形成, 缺损区模糊, 密度稍增高, 骨膜反应消失; ③治疗3个月后的病理苏木精-伊红染色显示, A、B组骨小梁紊乱、破坏较多; C、D组骨小梁排列较为整齐, 破坏较少, 且D组骨小梁粗大, 排列有序; ④结果表明, 载万古霉素/PLGA缓释微球的纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架联合自体红骨髓修复慢性骨髓炎骨缺损效果良好。

## 关键词:

纳米羟基磷灰石; 壳聚糖; 万古霉素; 缓释微球; 慢性骨髓炎; 自体红骨髓; 骨髓炎骨缺损; 复合支架

## 主题词:

羟基磷灰石类; 壳聚糖; 万古霉素; 微球体; 骨髓炎; 骨髓; 组织工程

中图分类号: R459.9; [R318.06]

## 基金资助:

遵义市联合科技基金项目[2017(42)], 项目负责人: 向柄彦

Xiang Bingyan, MD,  
Associate chief physician,  
the First People's Hospital of  
Zunyi, Zunyi 563000,  
Guizhou Province, China

缩略语:

聚乳酸-羟基乙酸共聚物, polyactic-co-glycolic acid, PLGA

## Repair of bone defects due to chronic osteomyelitis in rabbits using nano-hydroxyapatite/chitosan scaffold carrying vancomycin/polyactic-co-glycolic acid sustained-release microspheres combined with autologous red bone marrow

Xiang Bingyan, Li Peng, Bo Fan, Zhou Sirui (the First People's Hospital of Zunyi, Zunyi 563000, Guizhou Province, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** Preliminary studies have confirmed that vancomycin sustained-release microspheres exert satisfactory therapeutic effect on chronic osteomyelitis in rabbits. Nano-hydroxyapatite/chitosan (nHA/CS) has good biocompatibility, degradability and osteogenic induction. Autologous red bone marrow can be used as a seed cell source combined with nHA/CS scaffold to repair rabbit tibia bone defects. Therefore, the combined effects of the three materials in the repair of rabbit chronic osteomyelitis bone defects need a further investigation.

**OBJECTIVE:** To explore the efficacy and feasibility of nHA/CS scaffold carrying vancomycin/polyactic-co-glycolic acid (PLGA) sustained-release microspheres combined with autologous red bone marrow in the repair of chronic osteomyelitis bone defects in rabbits.

**METHODS:** Vancomycin/PLGA sustained-release microspheres were prepared by water oil and water emulsion method. The nHA/CS scaffolds carrying vancomycin/PLGA sustained-release microspheres were prepared by vacuum freeze drying, and mechanical properties and vancomycin release of the scaffold were determined. Twenty 5-month-old New Zealand white rabbits provided by Laboratory Animal Centre of Daping Hospital of Third Military Medical University were selected for establishing the chronic osteomyelitis bone defect model by intramedullary infection of *Staphylococcus aureus* into the left tibia. The model rabbits were randomly divided into four groups: group A was only given only for debridement treatment; in group B, the nHA/CS scaffold was implanted after debridement; in group C, nHA/CS scaffolds carrying vancomycin/PLGA sustained-release microspheres were implanted after debridement; in group D, nHA/CS scaffolds carrying vancomycin/PLGA microspheres and autologous red bone marrow were implanted after debridement. At 3 months after implantation, the repair effect was observed by X-ray and hematoxylin-eosin staining.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The nHA/CS scaffolds carrying vancomycin/PLGA sustained-release microspheres held good biomechanical properties and drug sustained release. At 3 months after implantation, X-ray revealed that the defect region in the groups A and B had no obvious improvement, and there were still bone destruction and periosteal reaction. The group C showed the formation of the new bone, the defect area was slightly blurred, but the defect still existed. In the group D, new bone formed, the defect area became blurred, the density was slightly high, and the periosteum reaction disappeared. Hematoxylin-eosin staining showed the bone trabecular disorder and more damage in the groups A and B. The bone trabecula was neatly arranged and less damaged in the groups C and D, and especially the group D had thickened bone trabecula arranged regularly. These results indicate that nHA/CS scaffolds carrying vancomycin/PLGA sustained-release microspheres combined with autologous red bone marrow exhibit good outcomes in repairing the bone defect due to chronic osteomyelitis in rabbits.

**Subject headings:** Hydroxyapatites; Chitosan; Vancomycin; Microspheres; Osteomyelitis; Bone Marrow; Tissue Engineering

**Funding:** the United Science and Technology Foundation of Zunyi, No. 2017(42) (to XBY)

## 0 引言 Introduction

慢性骨髓炎表现为持续性的局部骨组织炎症, 可局限于单个部位, 也可波及到邻近组织<sup>[1-2]</sup>, 并且多伴有病灶区的骨质破坏、缺损及血运障碍。近年来对骨髓炎的治疗取得了巨大进步, 然而慢性骨组织感染造成的骨缺损修复问题, 一直是困扰临床医务工作者的难题。目前骨缺损修复的“金标准”是自体骨移植, 但自体骨量一直是限制其推广的问题<sup>[3]</sup>, 而同种异体及异种异体移植多存在免疫排斥和疾病传播的风险<sup>[4]</sup>。此外, 慢性骨髓炎检出率最高的致病菌是金黄色葡萄球菌, 而且多为耐药菌株, 并且多形成细菌生物膜, 是慢性骨髓炎感染迁延不愈的重要因素<sup>[5-8]</sup>。万古霉素适用于耐药革兰阳性菌所致的严重感染<sup>[9]</sup>, 特别是甲氧西林耐药金葡菌或甲氧西林耐药凝固酶阴性葡萄球菌等所致感染<sup>[10]</sup>, 是临床少数能够以游离药状态对生物膜细菌具有抑制作用的抗生素之一<sup>[11-12]</sup>, 但由于慢骨髓炎窦道较深、蔓延较广及迁延不愈, 使得给药途径成为难点。

目前用于骨组织修复的大多数支架是天然高分子聚合物(如胶原蛋白, 壳聚糖和纤维蛋白等)、金属(如钛和硅)和脱细胞及脱细胞外基质的骨组织<sup>[13-15]</sup>。壳聚糖是甲壳素经脱乙酰化而成的产物, 是自然界唯一的碱性多糖, 具有抗菌及调节免疫等活性, 可通过壳聚糖酶和氨基葡萄糖苷

酶降解为葡萄糖<sup>[16]</sup>。此外, 壳聚糖具有良好的生物相容性、快速的生物降解性、低毒性与细胞外基质的相似性, 使其在骨组织工程材料中备受瞩目<sup>[17-18]</sup>。然而, 壳聚糖存在机械性能弱和降解过快的缺点, 因此通常将壳聚糖与纳米羟基磷灰石复合制备支架材料, 以增加其机械性能。纳米羟基磷灰石是一种生物活性陶瓷, 其结构与人体正常骨组织相近, 具有促进骨传导及成骨的作用<sup>[19-21]</sup>。纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架已被证明可支持干细胞的增殖和成骨分化, 在骨缺损动物模型中可增强骨愈合<sup>[15, 22-23]</sup>。自体红骨髓中含丰富的基质细胞, 在体内或体外均可被诱导成骨, 可成为骨组织工程的种子细胞, 并且其具有取材简便、操作容易及极少出现并发症等优点, 有利于临床应用<sup>[24-25]</sup>。

课题组前期研究显示, 万古霉素缓释微球对兔慢性骨髓炎具有良好的治疗效果<sup>[26]</sup>, 纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架具有良好的生物相容性、降解性及成骨诱导性<sup>[27]</sup>, 并且发现自体红骨髓(作为种子细胞来源)联合纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架对兔桡骨骨缺损的修复效果良好<sup>[28]</sup>。但三者联合治疗及修复兔慢性骨髓炎骨缺损的效果是否依然良好呢? 因此, 研究拟在成功制备载万古霉素/聚乳酸-羟基乙酸共聚物(polyactic-co-glycolic acid, PLGA)缓释微球纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架的基础上, 联合兔自体红骨髓, 对新西兰

大白兔慢性骨髓炎骨缺损行修复治疗, 以期为临床治疗慢性骨髓炎骨缺损提供一种新的治疗方法及实验依据。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机分组, 对比观察动物实验。

1.2 时间及地点 实验于2017年1至10月在遵义市第一人民医院完成。

1.3 材料

**实验动物:** 5月龄新西兰大白兔20只, 雌雄不拘, 体重(2.0±0.2) kg, 由解放军第三军医大学大坪医院实验动物中心提供, 许可证号: SCXK(渝)2012-0005。

**实验用试剂与仪器:** 万古霉素(USP级, 效价: ≥ 900 μg/mg, 阿拉丁); 纳米羟基磷灰石(生物医药级, < 0.2 μm, 阿拉丁); 壳聚糖(中黏度200-400 mPa·s, 乙酰化度≤40%, 阿拉丁); PLGA(50:50, 相对分子质量24 000-38 000, Sigma); 金黄色葡萄球菌(ATCC29210, 遵义医学院第三附属医院检验科馈赠); 真空冷冻干燥机(Thermo); 切片(Leica); 苏木精-伊红染色试剂盒(索莱宝); 扫描电子显微镜(S-3400N, 日立)。

1.4 实验方法

1.4.1 细菌培养 从液氮中取出金黄色葡萄球菌, 迅速解冻复苏后接种于LB固体培养基中, 37 °C培养箱培养24 h, 挑取单个菌落接种于液体培养基中37 °C、100 r/min震荡培养, 并利用分光光度计计算菌液浓度。将测定的菌液用培养基稀释至1×10<sup>8</sup> CFU/mL, 4 °C保存备用。

1.4.2 万古霉素/PLGA缓释微球的制备 采用水-油-水(W/O/W)乳相法制造万古霉素/PLGA缓释微球: 将300 mg PLGA和15 mg万古霉素加入到4 mL二氯甲烷中并超声处理30 s; 将所得混合物缓慢滴入20 mL 3%聚乙烯醇溶液中, 4 °C、300 r/min磁力搅拌4 h; 将混合液5 000 r/min离心10 min, 收集缓释微球, 并用超纯水清洗3次, 在-80 °C下冷冻2 h, 并在真空冷冻干燥机中冻干24 h; 收集后取5 mg微球复溶, 采用紫外分光光度法检测其载药率及包封率。使用相同的方法制造空白PLGA微球。

载药率=微球载万古霉素量/微球总量×100%

包封率=微球载万古霉素量/万古霉素投放总量×100%

1.4.3 载缓释微球纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架的制备 使用冷冻干燥法制备支架材料<sup>[29]</sup>: 将0.1 g壳聚糖与0.1 g纳米羟基磷灰石加入10 mL 0.1 mol/L乙酸溶液中, 80 °C、200 r/min磁力搅拌1 h, 至壳聚糖溶解并混匀; 冷却至室温后, 将10 mg万古霉素/PLGA缓释微球加入纳米羟基磷灰石/壳聚糖混合液中, 再次磁力搅拌充分混匀; 然后将纳米羟基磷灰石/壳聚糖混合液转移到塑料模具中, 4 °C预冷后, -80 °C冷冻24 h后真空冷冻干燥24 h, 制得载万古霉素纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架, 4 °C保存备用。使用相同方法制备空白纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架。采用扫描电镜观察支架内部结构及缓释微球形态, 统计分析支架孔径大小; 采用Instron万能材料试验机检测支架材料的抗压能力。

1.4.4 缓释微球及载缓释微球支架体外药物缓释量的检测 将1 mg万古霉素/PLGA缓释微球分散在4 mL PBS中,

在37 °C恒温摇床中100 r/min持续震荡, 每隔3 d收集上清液2 mL, 同时补充2 mL PBS, 用紫外分光光度法测定上清液中万古霉素含量; 同样方法将支架材料浸泡在4 mL PBS中, 收集上清液, 用紫外分光光度法测定上清液中万古霉素的含量。统计万古霉素累积释放百分率, 绘制时间-百分率释放曲线。

1.4.5 慢性骨髓炎骨缺损模型的构建 将新西兰大白兔用1%戊巴比妥钠(1 mL/kg)经耳缘静脉注射麻醉, 将麻醉好的兔固定于兔台上, 备皮、碘伏消毒后, 在左侧胫骨近端做纵向切口, 逐层分离至骨膜, 用细克氏钻钻孔至髓腔, 向髓腔内注入5%甘油酸钠0.1 mL、1×10<sup>8</sup> CFU/mL金黄色葡萄球菌液0.1 mL。骨蜡封闭缺口, 逐层缝合。术后不应用抗生素, 肢体不制动, 单独饲养, 标准进食。4周后行大体观察及左下肢X射线观察, 以确定模型构建成功。

1.4.6 慢性骨髓炎骨缺损模型分组及修复治疗 模型构建成功后, 将20只兔随机分为4组, 每组5只: A组仅作清创处理; B组清创后植入空白纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架; C组清创后植入载万古霉素/PLGA缓释微球的纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架; D组清创后植入载万古霉素/PLGA缓释微球的纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架及自体红骨髓。

1.4.7 自体红骨髓的收集 在慢性骨髓炎骨缺损模型构建前2周, 将D组新西兰大白兔用1%戊巴比妥钠(1 mL/kg)经耳缘静脉注射麻醉后, 备皮, 取侧卧位。将5 mL无菌注射器肝素化, 于双侧股骨处使用16号骨髓穿刺针各抽取骨髓2 mL, -80 °C保存备用。

1.5 主要观察指标 治疗3个月后, 对各组行左胫骨X射线片检查、Norden评分、胫骨病理学检测及骨髓细菌培养, 观察各组治疗效果。

**左胫骨X射线观察:** 将新西兰大白兔用1%戊巴比妥钠(1 mL/kg)经耳缘静脉注射麻醉后, 取俯卧位, 患肢外展, 垂直摄片。

**Norden评分评估<sup>[30]</sup>:** 由放射科诊断医师根据X射线结果进行评分, 评分标准见表1。

表1 骨髓炎 Norden 评分标准

Table 1 Norden's scoring system of osteomyelitis

级别	变量	定义	分值
I	坏死骨形成	+存在	1
		-不存在	0
II	周围新生骨形成	+存在	1
		±介于两者之间	0.5
		-不存在	0
III	骨质破坏	++重度, 涉及多个区域	2
		+中度, 只涉及一个区域	1
		±轻度, 只涉及一个区域	0.5
		-无骨质破坏	0
IV	疾病延伸: 涉及3个领域(近端、中段和远端胫骨)	+存在	1
		±介于两者之间	0.5
		-不存在	0

表注: 总分= I、II、III项加上IV项每个区域的分值, 最高分为7分。

**胫骨苏木精-伊红染色:** 将兔通过1%戊巴比妥钠(1 mL/kg)经耳缘静脉注射麻醉处死, 截取建模区胫骨, 用40 g/L多聚甲醛固定1周, 并用EDTA脱钙液对其进行脱钙

处理, 脱钙完全后进行常规石蜡包埋并切片, 并按照苏木精-伊红染色试剂盒进行脱蜡、水化及染色步骤。

**1.6 统计学分析** 结果数据采用SPSS 18.0软件进行统计分析, 数据结果采用 $\bar{x}\pm s$ 表示。数值资料两组间比较采用独立样本 $t$ 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。等级资料中两独立样本间的比较采用Wilcoxon秩和检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 万古霉素/PLGA缓释微球的载药量和包封率** 以万古霉素含量的标准曲线比对, 测定微球的载药率为 $(5.24\pm 0.35)\%$ , 包封率为 $(48.51\pm 12.14)\%$ 。表明此法所制备缓释微球万古霉素含量较高, 且丢失率较低。

**2.2 载万古霉素缓/PLGA缓释微球支架的表征** 通过扫描电镜观察到纳米羟基磷灰石/壳聚糖植入材料呈疏松多孔结构, 各个空隙之间相通, 孔径大小为在 $80\text{--}270\ \mu\text{m}$ 之间, 平均孔径为 $(146.53\pm 22.43)\ \mu\text{m}$ , 支架表面纳米羟基磷灰石附着明显, 可见均匀分布的缓释微球, 形状规则, 见图1; 生物力学测试结果中平均曲线显示, 载缓释微球支架在位移为 $0.7\ \text{mm}$ 时, 支架压缩载荷为 $13.5\ \text{N}$ ; 位移为 $0.8\ \text{mm}$ 时, 支架压缩载荷为 $47.8\ \text{N}$ , 并且还有上升趋势, 与正常骨组织抗压能力相比仍显不足, 但仅作为植入材料是可行的, 见图2。

**2.3 缓释微球及载缓释微球支架体外药物缓释量的检测** 采用紫外分光光度法测定万古霉素的累积释放曲线, 见图3。万古霉素/PLGA缓释微球早期的释放速率较高,  $9\ \text{d}$ 内释放量达到 $(58.32\pm 4.12)\%$ , 此后, 万古霉素在第 $9\text{--}30\ \text{d}$ 内持续释放,  $30\ \text{d}$ 后万古霉素的释放率为 $(90.15\pm 3.21)\%$ 。从载缓释微球支架上释放的万古霉素与缓释微球相似, 释放速率在前 $6\ \text{d}$ 较高, 释放量达 $(30.52\pm 4.22)\%$ , 随后 $24\ \text{d}$ 的释放速率减慢并趋于平稳, 第 $30\ \text{d}$ 时释放量达 $(80.14\pm 2.06)\%$ 。由图3亦可看出, 与单纯缓释微球释放速率相比, 载缓释微球支架内微球的万古霉素释放速率更为平稳。

**2.4 慢性骨髓炎骨缺损模型的鉴定** 金黄色葡萄球菌注入后 $4\ \text{周}$ , 见模型兔胫骨近端皮肤出现红肿, 出现慢性窦道, 可见黄色脓液渗出, 见图4A。X射线见左胫骨近端出现低密度区, 周围局部硬化及骨膜反应, 见图4B。上述结果表明, 模型兔胫骨近端已出现骨缺损及窦道, 提示模型构建成功。

### 2.5 修复治疗效果

**2.5.1 各组X射线观察** 修复治疗3个月后X射线结果, 见图5, 可观察到A、B组胫骨近端仍见明显的缺损区、骨质破坏及骨膜反应; C组可见新生骨形成, 缺损区稍模糊, 但仍有缺损处存在; D组可见新骨形成, 缺损区模糊, 密度稍增高, 骨膜反应消失, 提示修复效果较好。以上说明载万古霉素/PLGA缓释微球纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架联合自体红骨髓治疗慢性骨髓炎骨缺损有较好的效果。

**2.5.2 各组Norden评分** A-D组Norden评分分别为 $4.00\pm 0.35$ ,  $3.80\pm 0.27$ ,  $2.30\pm 0.27$ ,  $1.00\pm 0.35$ 。C、D组评分低于A、B组( $P < 0.05$ ), D组评分低于C组( $P < 0.05$ ), A、B组评分相比差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。结果表明

载万古霉素/PLGA缓释微球纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架移植后, 对慢性骨髓炎骨缺损的修复治疗有一定效果; 载万古霉素/PLGA缓释微球纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架联合自体红骨髓后, 对慢性骨髓炎骨缺损的修复治疗效果更佳。

**2.5.3 各组缺损处骨组织苏木精-伊红染色** 各组缺损处骨组织苏木精-伊红染色结果, 见图6所示, A、B组骨小梁紊乱、破坏较多; C、D组骨小梁排列较为整齐, 破坏较少, 表明缺损处骨组织处于修复状态; 此外D组骨小梁粗大, 排列有序, 表明缺损处修复效果与C组相比较佳。

## 3 讨论 Discussion

慢性骨髓炎早期的最根本治疗方式是对患处进行彻底的清创<sup>[31-32]</sup>。然而实际上几乎做不到绝对彻底的清创, 只能最大限度地达到伤口内清洁, 不能完全去除致病菌, 需要持续的抗生药的治疗, 但因缺损区局部血运障碍, 导致全身应用抗生药效果不佳。此外, 由于慢性骨髓炎常伴有骨缺损, 因此需要在治疗感染的同时对缺损处进行修复, 使得治疗难度进一步加大。

万古霉素作为第一个问世的糖肽类抗生药, 已被广泛用于治疗甲氧西林耐药金葡菌和其他革兰阳性菌感染<sup>[33]</sup>, 同时也是目前治疗甲氧西林耐药金葡菌感染的敏感抗生药, 在甲氧西林耐药金葡菌引起的慢性骨髓炎治疗中效果明显<sup>[34]</sup>。因此, 将具有万古霉素缓释功能且可促进成骨的纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架, 联合富含基质细胞及多种生长因子的自体红骨髓, 对慢性骨髓炎及局部骨缺损进行治疗及修复, 可能是一种治疗慢性骨髓炎的较理想的方法, 可在治疗感染的同时修复局部骨缺损。经过反复验证, 实验成功制备了出载万古霉素/PLGA缓释微球的纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架, 支架材料具有良好的生物力学性能, 虽然与正常骨组织相比仍显不足, 但作为填充支撑材料已经足够。此外, 支架能持续释放万古霉素, 并且释放速率稳定, 可在病灶局部保持长时间的治疗浓度, 为感染治疗及骨组织的再生修复提供良好条件。

在动物实验中, 首先, 提前抽取并储存新西兰大白兔自体红骨髓, 留待后期植入治疗; 随后采用慢性骨髓炎最常见的致病菌——金黄色葡萄球菌构建兔胫骨近端慢性骨髓炎骨缺损模型; 模型构建成功后, 对模型兔胫骨近端病灶进行相对彻底清创, 尽量减少局部细菌残留, 再将载万古霉素/PLGA缓释微球的纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架联合自体红骨髓植入缺损处。经修复治疗3个月后, 与A组相比, B组慢性骨髓炎未发生明显改善, 伤口处仍有脓液流出, 无明显治疗效果; C组伤口已基本愈合, Norden评分下降明显, 且X射线显示缺损区稍密度增高且有新生骨形成, 但仍有缺损存在, 苏木精-伊红染色显示缺损处骨组织处于修复状态, 表明载万古霉素/PLGA缓释微球的纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架, 对慢性骨髓炎缺损区的金黄色葡萄球菌感染治疗效果良好, 但对骨缺损的修复较为缓慢。与C组相比, D组伤口愈合良好, 且X射线、Norden评分及苏木精-伊红染色结果均优于C组, 说明联合自体红骨髓后, 缺损区局部含有大量基质细胞, 使得修复效果更为明显。

综上, 研究所制备载万古霉素/PLGA缓释微球的纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架联合自体红骨髓, 植入兔胫骨近端慢性骨髓炎骨缺损处后, 万古霉素/PLGA缓释微球的药物缓释功能可较好地治疗并预防局部感染, 可为骨缺损的修复提供良好前提条件; 纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架则作为骨缺损区的填充物, 可诱导并促进缺损区局部及自体红骨髓中的基质细胞向成骨分化, 达到更好的修复效果。万古霉素、纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架及自体红骨髓三者相互协同, 不仅对兔胫骨近端慢性骨髓炎骨缺损的感染治疗及骨组织再生修复具有良好效果, 并且为临床中采用多种措施协同治疗慢性骨髓炎骨缺损提供了一定参考依据。

**作者贡献:** 向柄彦进行实验设计, 实验实施为向柄彦、周思睿, 实验评估为李鹏、柏帆, 资料收集为向柄彦, 向柄彦成文, 向柄彦、李鹏、柏帆、周思睿审核。

**经费支持:** 该文章接受了“遵义市联合科技基金项目[2017(42)]”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**机构伦理问题:** 实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。文章的撰写与编辑修改后文章遵守了《动物实验体内实验研究报告规范指南》(ARRIVE 指南)。

**写作指南:** 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**文章查重:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

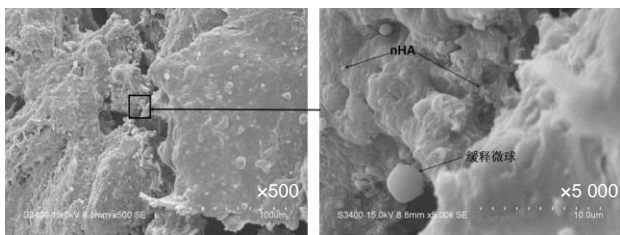
**生物统计学声明:** 该文统计学方法已经遵义医科大学生物统计学专家审核。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

## 4 参考文献 References

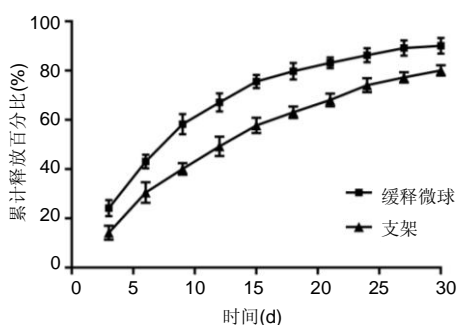
- [1] Dhanireddy S, Neme S. 44—Acute and Chronic Osteomyelitis. *Infect Dis*. 2017;1:388-398.
- [2] Winkler H, Haiden P. Treatment of Chronic Bone Infection. *Oper Tech Orthop*. 2016;26(1):2-11.
- [3] Ning L, Malmstrom H, Ren YF. Porous Collagen-Hydroxyapatite Scaffolds With Mesenchymal Stem Cells for Bone Regeneration. *J Oral Implantol*. 2015;41(1):45-49.
- [4] David F, Levingstone TJ, Schneeweiss W, et al. Enhanced bone healing using collagen-hydroxyapatite scaffold implantation in the treatment of a large multiloculated mandibular aneurysmal bone cyst in a thoroughbred filly. *J Tissue Eng Regen Med*. 2015;9(10):1193-1199.
- [5] Gomes D, Pereira M, Bettencourt AF. Osteomyelitis: an overview of antimicrobial therapy. *Braz J Pharm Sci*. 2013;49(1):13-27.
- [6] Inzana JA, Schwarz EM, Kates SL, et al. Biomaterials approaches to treating implant-associated osteomyelitis. *Biomaterials*. 2016;81:58-71.
- [7] Kaplan SL. Staphylococcus aureus Infections in Children: The Implications of Changing Trends. *Pediatrics*. 2016;137(4):e20160101.
- [8] Yang D, Wijenayaka AR, Solomon LB, et al. Novel Insights into Staphylococcus aureus Deep Bone Infections: the Involvement of Osteocytes. *MBio*. 2018;9(2). pii: e00415-18. doi:10.1128/mBio.00415-18.
- [9] Duszynska W, Taccone FS, Hurkacz M, et al. Continuous vs. intermittent vancomycin therapy for Gram-positive infections not caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Minerva Anesthesiol*. 2016;82(3):284-293.
- [10] Cao G, Liang X, Zhang J, et al. Vancomycin serum trough concentration vs. clinical outcome in patients with gram-positive infection: a retrospective analysis. *J Clin Pharm Ther*. 2016;40(6):640-644.
- [11] Kadry AA, Al-Suwayeh SA, Abd-Allah AR, et al. Treatment of experimental osteomyelitis by liposomal antibiotics. *J Antimicrob Chemother*. 2004;54(6):1103-1108.
- [12] Broussou DC, Lacroix MZ, Toutain PL, et al. Differential Activity of the Combination of Vancomycin and Amikacin on Planktonic vs. Biofilm-Growing Staphylococcus aureus Bacteria in a Hollow Fiber Infection Model. *Front Microbiol*. 2018;9:572.
- [13] Marrelli M, Tatullo M. Influence of PRF in the healing of bone and gingival tissues. Clinical and histological evaluations. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2013;17(14):1958-1962.
- [14] Marrelli M, Falisi G, Apicella A, et al. Behaviour of dental pulp stem cells on different types of innovative mesoporous and nanoporous silicon scaffolds with different functionalizations of the surfaces. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2015;29(4):991-997.
- [15] Paduano F, Marrelli M, Alom N, et al. Decellularized bone extracellular matrix and human dental pulp stem cells as a construct for bone regeneration. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2017;28(8):730-748.
- [16] 胡荣康, 吴林秀, 陈明军, 等. 不同分子量壳聚糖的制备及其应用研究进展[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(15):324-328.
- [17] Boukari Y, Qutachi O, Scurr DJ, et al. A dual-application poly (dl-lactic-co-glycolic) acid (PLGA)-chitosan composite scaffold for potential use in bone tissue engineering. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2017;28(16):1966-1983.
- [18] Shamekhi MA, Rabiee A, Mirzadeh H, et al. Fabrication and characterization of hydrothermal cross-linked chitosan porous scaffolds for cartilage tissue engineering applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017;80:532-542.
- [19] Uswatta SP, Okeke IU, Jayasuriya AC. Injectable porous nano-hydroxyapatite/chitosan/tripolyphosphate scaffolds with improved compressive strength for bone regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016;69:505-512.
- [20] Wang XF, Lu PJ, Song Y, et al. Nano hydroxyapatite particles promote osteogenesis in a three-dimensional bio-printing construct consisting of alginate/gelatin/hASCs. *Rsc Adv*. 2016;6(8):6832-6842.
- [21] Medeiros JS, Oliveira AM, de Carvalho JO, et al. Nanohydroxyapatite/Graphene Nanoribbons Nanocomposites Induce in Vitro Osteogenesis and Promote in Vivo Bone Neof ormation. *ACS Biomater Sci Eng*. 2018;4(5). DOI: 10.1021/acsbomaterials.7b01032
- [22] Ge S, Zhao N, Wang L, et al. Bone repair by periodontal ligament stem cellseeded nanohydroxyapatite-chitosan scaffold. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:5405-5414.
- [23] Biazar E, Heidari KS, Tavirani MR, et al. Bone reconstruction in rat calvarial defects by chitosan/hydroxyapatite nanoparticles scaffold loaded with unrestricted somatic stem cells. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2015;43(2):112-116.
- [24] 杨新明, 孟宪勇, 张琰, 等. 带蒂筋膜瓣包裹自体红骨髓复合修复骨缺损的疗效[J]. *中华创伤骨科杂志*, 2012, 14(9):741-747.
- [25] 邵攀东, 李宇飞, 许天明, 等. 自体红骨髓移植治疗鼠胫骨骨不连[J]. *中华实验外科杂志*, 2015, 32(6):1375-1377.
- [26] 向柄彦, 郭元. 载药微球联合BMP-2治疗兔慢性骨髓炎的实验研究[J]. *重庆医学*, 2015, 44(8):1032-1034.
- [27] 向柄彦, 郭元. 载药组织工程支架的构建及其性能研究[J]. *现代医药卫生*, 2015, 31(9):1281-1282.
- [28] 向柄彦, 韩小松, 陈炎城, 等. 不同浓度富血小板血浆复合自体红骨髓及纳米骨治疗兔桡骨骨缺损的实验研究[J]. *现代预防医学*, 2012, 39(19):5126-5131.
- [29] Li Y, Zhang Z, Zhang Z. Porous Chitosan/Nano-Hydroxyapatite Composite Scaffolds Incorporating Simvastatin-Loaded PLGA Microspheres for Bone Repair. *Cells Tissues Organs*. 2018;205(1):20-31.
- [30] Norden CW, Myerowitz RL, Keleti E. Experimental osteomyelitis due to Staphylococcus aureus or Pseudomonas aeruginosa: a radiographic-pathological correlative analysis. *Br J Exp Pathol*. 1980;61(4):451-460.
- [31] Hatzenbuehler J, Pulling TJ. Diagnosis and management of osteomyelitis. *Am Fam Physician*. 2011;84(9):1027-1033.
- [32] Bibbo C, Stough JD. Reduction calcaneoplasty and local muscle rotation flap as a salvage option for calcaneal osteomyelitis with soft tissue defect. *J Foot Ankle Surg*. 2012;51(3):375-378.
- [33] 万古霉素临床应用剂量专家组. 万古霉素临床应用剂量中国专家共识[J]. *中华传染病杂志*, 2012, 30(11):641-646.
- [34] 龙亚周, 朱泽兴, 于燕, 等. 万古霉素不同给药途径治疗慢性骨髓炎的研究进展[J]. *中华外科杂志*, 2016, 54(9):716-720.



图注: 纳米羟基磷灰石(nHA)/壳聚糖植入材料呈疏松多孔结构, 各个空隙之间相通, 孔径大小在 80-270  $\mu\text{m}$  之间, 支架表面纳米羟基磷灰石附着明显, 可见均匀分布的缓释微球, 形状规则。

图 1 扫描电镜下观察载万古霉素缓/聚乳酸-羟基乙酸共聚物缓释微球纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架

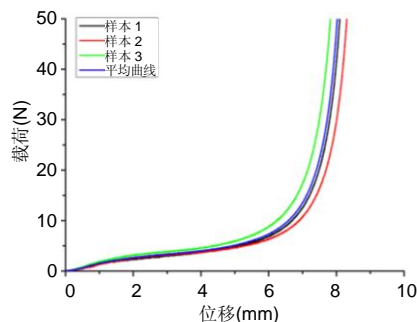
Figure 1 Observation of nano-hydroxyapatite/chitosan scaffold carrying vancomycin/polyactic-co-glycolic acid sustained-release microspheres under scanning electron microscope



图注: 与单纯缓释微球释放速率相比, 载缓释微球支架内微球的万古霉素释放速率更为平稳。

图 3 缓释微球和载缓释微球纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架中万古霉素的累积体外释放曲线

Figure 3 Cumulative release profiles of vancomycin in nano-hydroxyapatite/chitosan scaffold carrying vancomycin/polyactic-co-glycolic acid sustained-release microspheres



图注: 载缓释微球支架在位移为 0.7 mm 时, 支架压缩载荷为 13.5 N; 位移为 0.8 mm 时, 支架压缩载荷为 47.8 N, 并且还有上升趋势, 与正常骨组织抗压能力相比仍显不足, 但仅作为植入材料是可行的。

图 2 载万古霉素缓/聚乳酸-羟基乙酸共聚物缓释微球纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架的应力-应变曲线

Figure 2 Stress-strain curve of nano-hydroxyapatite/chitosan scaffolds carrying vancomycin/polyactic-co-glycolic acid sustained-release microspheres



图注: A 为大体观察, 可见兔胫骨近端皮肤出现红肿, 出现慢性窦道, 可见黄色脓液渗出; B 为 X 射线观察, 左胫骨近端出现低密度区, 周围局部硬化及骨膜反应。

图 4 兔慢性骨髓炎骨缺损模型构建 4 周后大体及 X 射线观察

Figure 4 Gross and X-ray observations in rabbits at 4 weeks after establishment of chronic osteomyelitis-induced bone defect models



图注: A 组仅作清创处理, B 组清创后植入纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架, C 组清创后植入载万古霉素/聚乳酸-羟基乙酸共聚物缓释微球纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架, D 组清创后植入载万古霉素/聚乳酸-羟基乙酸共聚物缓释微球纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架及自体红骨髓。A、B 组胫骨近端仍见明显的缺损区、骨质破坏及骨膜反应; C 组可见新生骨形成, 缺损区稍模糊, 但仍有缺损处存在; D 组可见新骨形成, 缺损区模糊, 密度稍增高, 骨膜反应消失。

图 5 修复治疗 3 个月后各组 X 射线观察

Figure 5 X-ray observations of each group at 3 months after treatment

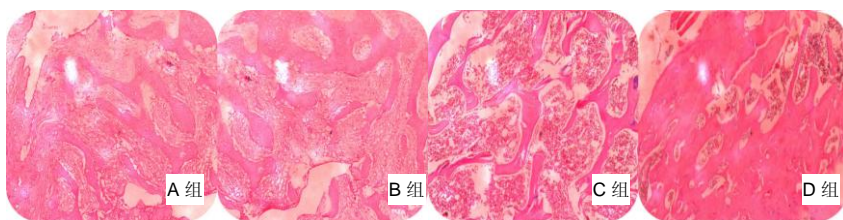


图 6 治疗 3 个月后各组胫骨缺损处骨组织苏木精-伊红染色观察(x100)

Figure 6 Hematoxylin-eosin staining results of the tibial defect region in each group at 3 months after treatment (x100)

图注: A 组仅作清创处理, B 组清创后植入纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架, C 组清创后植入载万古霉素/聚乳酸-羟基乙酸共聚物缓释微球纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架, D 组清创后植入载万古霉素/聚乳酸-羟基乙酸共聚物缓释微球纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架及自体红骨髓。A、B 组骨小梁紊乱、破坏较多; C、D 组骨小梁排列较为整齐, 破坏较少, 且 D 组骨小梁粗大, 排列有序。