文章编号:1000-5404(2010)19-2085-04

论著

可注射硅溶胶-抗生素假体在感染的兔人工髋关节一期翻修中的作用

韩庚奋,王爱民,熊 雁,龚 滨,王子明 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所骨科)

【摘要】 目的 探讨可注射硅溶胶-抗生素假体在感染的兔人工髋关节一期翻修中的作用。方法 选取28只新西兰大白兔,制作人工关节术后金黄色葡萄球菌感染模型,采用完全随机分组法将其分为对照组($n=14$)和实验组($n=14$)。对照组采用普通型兔人工假体,实验组采用可注射硅溶胶-抗生素假体对感染模型进行一期翻修。术后12周处死动物,激光扫描共聚焦显微镜(CLSM)检测假体周围生物膜,并计算生物膜突破成功率。扫描电镜(SEM)观察假体表面生物膜。取假体周围组织行组织学观察,最后细菌培养检测翻修成功率。结果 CLSM检测生物膜突破成功率:实验组85.7%(12/14),对照组35.7%(5/14),二者差异有统计学意义($P<0.05$)。SEM观察:实验组未见明显的金黄色葡萄球菌,但细菌分泌的基质仍然可见;对照组可见大量金黄色葡萄球菌被其分泌的基质包裹在一起。组织学观察:实验组可见纤维细胞增生,炎性细胞明显比对照组少。细菌培养:实验组翻修成功率85.7%(12/14),对照组翻修成功率42.9%(6/14),二者差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 可注射硅溶胶-抗生素假体能抑制和突破假体周围生物膜,显著提高一期人工髋关节翻修成功率。

【关键词】 可注射硅溶胶-抗生素;人工髋关节;一期翻修;生物膜;感染
【中图法分类号】 R318.08;R318.17;R684 【文献标志码】 A

Role of injectable silica sol-gel/antibiotics prosthesis in phase 1 revision arthroplasty for infected prosthetic hip joints of rabbits

Han Gengfen, Wang Aimin, Xiong Yan, Gong Bin, Wang Ziming (Department of Orthopedics, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

【Abstract】 Objective To study the role of injectable silica sol-gel/antibiotics prosthesis in phase 1 revision arthroplasty for infected prosthetic hip joints of rabbits. Methods Twenty-eight New Zealand white rabbits were used in this study. A *Staphylococcus aureus* infection model was established after arthroplasty. The rabbits were randomly divided into control group and experimental group, 14 in each group. Rabbits in control group underwent arthroplasty using common prosthesis and those in experimental group received arthroplasty using injectable silica sol-gel/antibiotics prosthesis. The animals were killed 12 weeks after operation. Periprosthetic biofilm was detected by confocal laser scanning microscopy (CLSM) and the breakthrough rate was calculated. Prosthetic surface biofilm was determined by scanning electron microscopy (SEM). Periprosthetic tissues were analyzed and *Staphylococcus aureus* was cultured to determine the outcome of two revision arthroplasties. Results The biofilm breakthrough rate was 85.7% and 35.7% in experimental group (12/14) and control group (5/14), respectively ($P<0.05$). SEM showed no *Staphylococcus aureus* but bacterial cellulose in experimental group and massive *Staphylococcus aureus* that were enclosed by their bacterial cellulose in control group. Histology showed the proliferation of fibrocytes and more inflammatory cells in experimental group than in control group. Bacteria culture showed that the success rate of reversion arthroplasty was 85.7% and 42.9% in experimental group (12/14) and control group (6/14), respectively ($P<0.05$). Conclusion Injectable silica sol-gel/antibiotics prothesis can inhibit the formation of periprosthetic biofilm and breakthrough it, thus significantly improving the outcome of phase 1 revision arthroplasty for infected prosthetic hip joints.

【Key words】 injectable silica sol-gel/antibiotics; prosthetic hip joint; phase 1 revision arthroplasty; biofilm; infection

Corresponding author: Wang Aimin, Tel: 86-23-68757936, E-mail: trauma2@163.com

【通信作者】 王爱民,电话:(023)68757936,E-mail:trauma2@163.com

20世纪40年代开始人工关节的研究工作迅速开展,以髋关节为首的人工关节置换术取得辉煌的成就,术后感染率已降至1%以下[1,2]。如今,据估计每年上百万有髋关节疾患的患者能扔掉拐杖,重新恢复行走能力。尽管如此,术后感染的病例仍不断增加。细菌在感染的人工关节表面形成的生物膜可以抵御抗菌药物的杀伤和逃逸宿主免疫[3],治疗十分棘手。本研究改变传统的全身静脉和原有的局部外用的给药方式,采用可注射硅溶胶-抗生素假体对已经建立的人工髋关节术后金黄色葡萄球菌感染模型进行一期翻修,并在术后不更换假体的前提下通过皮下给药系统注射硅溶胶-抗生素,定期补充、更换有效抗生素,让抗生素在假体内部释放,验证其能否突破细菌局部形成的生物膜,达到彻底杀灭细菌和根治感染的目的。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

FITC标记的刀豆蛋白(FITC-ConA,Sigma公司),碘化丙啶(PI,Sigma公司),万古霉素(加拿大BIO BASIC INC公司),硅溶胶(成都市科龙化工试剂厂),皮下给药系统(德国贝朗),微生物分析系统(VITEK Ⅱ,法国梅里埃公司),扫描电镜(美国AMRAY-1000B),冰冻切片机(德国LEICA-CM 3050 S型),激光共聚焦显微镜(CLSM,德国Leica TCS Sp5)。

1.2 实验兔及兔假体

新西兰大白兔28只,体质量2280~3150 g,雌雄不拘,由第三军医大学野战外科研究所实验动物中心提供。兔的髋关节假体由重庆望江工业有限公司制作,头的直径约7.0 mm,柄长15~17 mm,颈长2 mm,颈干角120°。图1A所示为普通型假体。在已设计的抗生素人工髋关节[4]的基础上,设计并制作兔的可注射硅溶胶-抗生素假体(图1B),关节柄部有一直径1.8 mm的空腔用于连接皮下给药系统,周围有10个直径1 mm的微孔与其相通。



A:普通型假体;B:可注射硅溶胶-抗生素假体

图1 兔髋关节假体

1.3 实验方法

1.3.1 硅溶胶-万古霉素缓释溶液的制备 硅溶胶-万古霉素缓释溶液必须满足3个要求:①万古霉素超过金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度1.56~3.12 μg/ml[5]。②不能因为万古霉素的浓度过高而影响骨质愈合。③万古霉素能被缓慢、持续释放。以Radin等[5]的研究为参考经过大量实验得出以下配制方法:2 mg/ml的万古霉素溶液与硅溶胶溶液1:3(体积比),称取10 mg万古霉素加入5 ml的蒸馏水中,配成2 mg/ml的万古霉素溶液,再加入15 ml硅溶胶溶液,充分搅拌,4 ℃冰浴冷却,备用。

1.3.2 细菌培养 金黄色葡萄球菌ATCC25923(由第三军医大学大坪医院野战外科研究所检验科提供)在-20 ℃冰箱中保存,使用前复温,于血琼脂培养皿中37 ℃培养18~24 h,长出细菌菌落后将细菌用生理盐水配制成浓度为1×10^5 CFU/ml金葡菌溶液,2 h以内使用。

1.3.3 兔人工髋关节术后感染模型的制备 20 g/L戊巴比妥钠溶液30 mg/kg耳缘静脉注射麻醉,使用普通型兔股骨头假体按照王子明等[6]的实验方法制作术后感染模型,细菌接种量为1×10^5CFU。4周后对感染模型进行一期翻修。

1.3.4 感染一期翻修 ①清创:彻底清除关节周围感染组织、股骨头假体、缝合线等异物;双氧水和生理盐水反复冲洗创面。②分组翻修:对上述28只兔清创后再植入新的假体,按植入假体的不同分为2组,每组14只。对照组植入新的普通型兔股骨头假体;实验组植入可注射硅溶胶-抗生素兔股骨头假体,并与皮下给药系统相连接,将皮下给药系统埋于兔的背部皮下(图2),术中注入生理盐水冲洗并排出腔内空气,然后注入硅溶胶-万古霉素缓释溶液4 ml,最后注入100 U/ml肝素盐水1.5 ml防止血栓形成。术后每隔5天注射1次,每次先注射硅溶胶-万古霉素缓释溶液4 ml,再注射1.5 ml肝素盐水。皮下给药系统将缓释溶液运送到假体空腔,缓释溶液通过假体周围的微孔扩散到假体周围。翻修术后1周,每只兔肌肉注射青霉素80×10^4 U/d,庆大霉素20×10^4 U/d。翻修术后12周处死动物。



黑箭头:皮下给药系统;红箭头:假体;蓝箭头:髋臼

图2 使用可注射硅溶胶-抗生素兔假体对感染模型进行一期翻修

1.4 观测指标

1.4.1 大体观察 观察动物精神状态,进食进水情况。观察伤口愈合情况有无红肿和窦道。

1.4.2 CLSM检测生物膜 取出假体,刮取假体表面附着物,PBS液反复冲洗,-70 ℃冰冻包埋,-20 ℃冰冻切片,切片厚度为10 μm。2.5%戊二醛固定1 h,PBS液漂洗30 min。FITC-ConA加入0.9%生理盐水配成1 mg/ml的溶液,PI加入0.9%生理盐水配成1 mg/ml的溶液,之后将切片用FITC-ConA溶液4 ℃避光染色1 h,再次洗片后用PI溶液于4 ℃避光染色

15 min,PBS 液冲洗后吸干多余水分。最后用 40% 甘油封片,激光扫描共聚焦显微镜观察并采集图片。

1.4.3 SEM 观察生物膜 取假体表面组织 2.5% 戊二醛固定,0.1 mol/L PBS 液反复冲洗,乙醇梯度脱水[30%、50%、70%、80%、90%、100% (2 次)],每次 5 min。叔丁醇梯度置换[50%、70%、90%、95%、100% (2 次)],每次 5 min。粘托,冷冻,离子溅射喷金,SEM 观察。

1.4.4 组织学观察 取假体周围组织,10% 多聚甲醛固定 24 h,石蜡包埋,4 μm 切片,HE 染色,梯度酒精脱水,二甲苯透明,封片。光镜观察。

1.4.5 细菌培养 取假体周围组织 3 块[7]细菌培养,如有 1 块阳性,且经 VITEK Ⅱ 微生物分析系统鉴定为所接种的金黄色葡萄球菌 ATCC25923,即判定为感染。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件,组间比较行 Fisher 精确概率法。

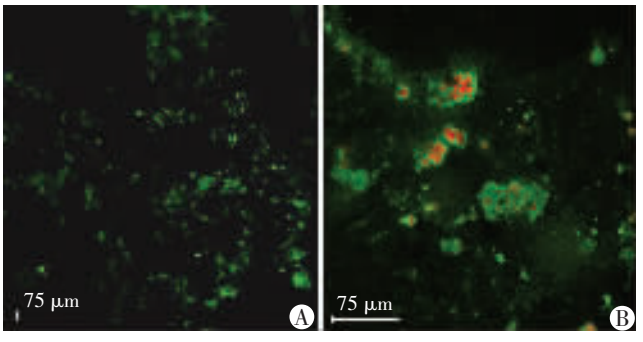
2 结果

2.1 大体观察

术后麻醉苏醒即表现精神萎靡,术后当天即开始进食进水。次日精神状态恢复正常,开始活动。术后 3 周所有兔关节周围形成软组织脓肿,伤口有红肿。翻修术中可见所有兔假体周围有脓液形成。翻修术后 8 周对照组有 3 只兔窦道形成,且有少量分泌物流出。实验组兔伤口无窦道形成。翻修术后 12 周对照组兔关节液混浊、量无明显增加,假体周围多有肉芽组织及假膜形成。实验组兔关节液清亮透明。

2.2 CLSM 检测生物膜

CLSM 检测实验组 2 只阳性,对照组 9 只阳性。生物膜突破成功率实验组 85.7% (12/14),对照组 35.7% (5/14),两者差异有统计学意义($P<0.05$)。实验组只见较分散的多糖,未见发红色荧光的金黄色葡萄球菌(图 3A)。对照组可见发红色荧光的金黄色葡萄球菌镶嵌在发绿色荧光的多糖之中,有些金黄色葡萄球菌聚集成堆,有些较分散(图 3B)。

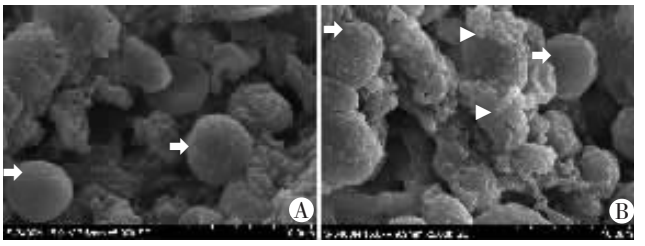


A:实验组 B:对照组

图 3 激光共聚焦显微镜观察 2 组假体周围生物膜 (FITC-ConA/PI)

2.3 SEM 观察生物膜

SEM 观察实验组(图 4A)仅见单核细胞,未见明显的球形物质,但表面粗糙不平,可能为细菌分泌的基质。对照组(图 4B)可见大量球形的金黄色葡萄球菌被其分泌的基质包裹在一起,生物被膜形态大小不一、表面粗糙不平,还有一些单核细胞。

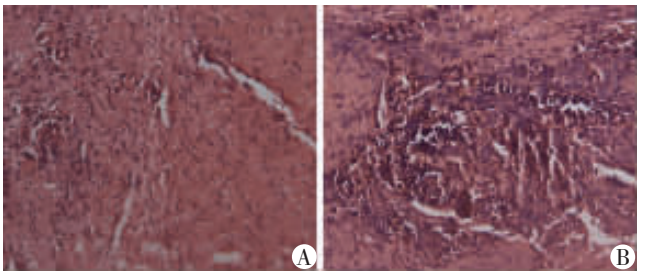


△:细菌;☆:单核细胞 A:实验组 B:对照组

图 4 电镜观察 2 组假体表面生物膜 (×5000)

2.4 组织学观察

取假体周围组织 HE 染色光镜下观察。实验组可见纤维细胞增生,淋巴细胞和单核细胞等炎性细胞较少;对照组有大量淋巴细胞和单核细胞等慢性炎症细胞浸润(图 5)。



A:实验组 B:对照组

图 5 HE 染色观察假体周围组织 (×200)

2.5 细菌培养

实验组 2 只兔细菌培养阳性,其伤口有红肿无窦道。VITEK Ⅱ 微生物分析系统鉴定为所接种的金黄色葡萄球菌 ATCC25923,翻修成功率为 85.7% (12/14);对照组 8 只兔细菌培养阳性,其中 3 只有窦道,其余仅有不同程度的红肿,翻修成功率为 42.9% (6/14),两者差异有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

人工髋关节术后 3 个月内的感染被称为早期感染[2,8],主要由手术污染和伤口感染引起,占 29% ~ 69%[8]。早期感染一般发生在术后 2 ~ 4 周[9],主要由革兰阳性球菌引起,以葡萄球菌为主,金黄色葡萄球菌占 22% ~23.6%,表皮葡萄球菌占 19% ~37.5%[10]。Rohde 等[11]研究发现几乎所有的金黄色葡萄球菌能形成生物膜,而表皮葡萄球菌仅 69.2% 可形成生物膜。生物膜是细菌为适应自然环境、有利于生存而特有的生命现象,是细菌吸附于惰性物体如生物医学材料-人工髋关节表面,然后分泌多糖基质、纤维蛋白、脂蛋白等多糖蛋白复合物,使细菌相互粘连并将其自身缠绕其中形成的膜样物[12]。正是因为生物膜的存在,使得细菌对抗生素的敏感性降低 100 ~ 1000 倍[3],导致临床治疗十分困难。

为治疗人工关节术后感染,我们研究出可注射硅溶胶-万古霉素假体:硅溶胶是一种多孔的、可吸收的材料,生物相容性好,具有极好的降解及控释特性。硅

溶胶-万古霉素适合于多种应用,包括骨感染[13],而且此种材料的降解和控释特性可以通过对其加工参数进行控制而达到临床治疗的需要[5]。使用可注射硅溶胶-抗生素假体治疗人工髋关节术后感染的基本原理是让抗生素在假体局部、内在释放,突破细菌局部形成的生物膜。生物膜主要由细菌及其分泌的基质组成,而多糖是细菌生物膜基质的主要成分[14]。本研究采用免疫荧光标记技术对生物膜中的多糖进行标记,并使用PI对细菌染色。CLSM对样本任意层面观察,只要发现有1个发红色荧光的金黄色葡萄球菌且有发绿色荧光的多糖包围,就判定为阳性。若无发红色荧光的金黄色葡萄球菌,仅有发绿色荧光的多糖则判定为阴性。对照组64.3%(9/14)可见发红色荧光的金黄色葡萄球菌镶嵌在发绿色荧光的多糖之中,有些金黄色葡萄球菌聚集成堆。说明全身用药不能穿透生物膜,根除感染。实验组85.7%(12/14)仅见少量发绿色荧光的多糖。证明使用可注射硅溶胶-抗生素假体已突破生物膜,细菌已经被杀灭,残留多糖有可能是细菌在翻修之前所分泌。SEM观察进一步证明使用可注射硅溶胶-抗生素假体可以杀灭细菌,治疗假体周围感染。人工关节术后感染的诊断还没有统一的标准,但是取假体周围组织细菌培养是目前最可靠的诊断标准[7]。细菌培养结果表明可注射硅溶胶-抗生素假体能显著提高人工髋关节术后感染一期翻修成功率。实验组仅2只动物细菌培养阳性,可能由实验动物个体差异引起,也可能是因为万古霉素的穿透能力有限。今后我们将研究硅溶胶缓释不同的抗生素或同时缓释多种抗生素观察其穿透生物膜的能力。

抗生素-骨水泥是当前治疗人工髋关节术后感染最常用的方法,是抗生素缓释系统在矫形外科的代表[15]。但是抗生素-骨水泥有很多不足之处[16-18],骨水泥不能定期补充抗生素,所含抗生素量大且释放不稳定,高浓度的抗生素引起了肾功能衰竭,再加之骨水泥不适合年轻骨质较好者更是限制了其发展。而使用可注射硅溶胶-抗生素假体,因其可注射,所以使用抗生素浓度较低,即使产生副作用,也可以停止或更换抗生素,无需再次手术取出。

本研究采用可注射硅溶胶-抗生素假体对感染模型进行一期翻修,使抗生素从假体内部向外缓释,抑制并突破假体周围生物膜。通过皮下给药系统注射硅溶胶-抗生素溶液,改变了原有抗生素的使用方式,在翻修手术时根据不同的细菌,选择敏感抗生素,在术后不更换假体的前提下,定期补充、更换抗生素,达到一期髋关节翻修成功并彻底杀灭细菌和根治感染的目的。提高了抗感染的疗效,明显降低毒性反应,为临床最终有效地治疗人工髋关节置换术后感染提供实验基础和理论依据。

参考文献:

[1] Phillips J E, Crane T P, Noy M, *et al*. The incidence of deep prosthetic infections in a specialist orthopaedic hospital: a 15-year prospective survey[J]. J Bone Joint Surg Br, 2006, 88(7): 943-948.

[2] Teixeira L, Johnson J L. Prosthetic joint infection: when to suspect it, how to manage it[J]. Geriatrics, 2007, 62(12): 18-22.

[3] Samuel J R, Gould F K. Prosthetic joint infections: single versus combination therapy [J]. J Antimicrob Chemother, 2010, 65(1): 18-23.

[4] 王爱民, 唐良华, 杜全印, 等. 抗生素人工髋关节: 中国, CN200910103521.9[P]. 2009-09-02.

[5] Radin S, Ducheyne P. Controlled release of vancomycin from thin sol-gel films on titanium alloy fracture plate material[J]. Biomaterials, 2007, 28(9): 1721-1729.

[6] 王子明, 邢叔星, 唐桂阳, 等. 人工股骨头置换和术后感染模型的建立[J]. 创伤外科杂志, 2007, 9(1): 16-19.

[7] Trampuz A, Zimmerli W. Prosthetic joint infections: update in diagnosis and treatment[J]. Swiss Med Wkly, 2005, 135(17/18): 243-251.

[8] Matthews P C, Berendt A R, McNally M A, *et al*. Diagnosis and management of prosthetic joint infection[J]. BMJ, 2009, 338: b1773.

[9] Turgut H, Okke D. Foreigners in our body[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2008, 6(2): 145-147.

[10] Lentino J R. Prosthetic joint infections: bane of orthopedists, challenge for infectious disease specialists[J]. Clin Infect Dis, 2003, 36(9): 1157-1161.

[11] Rohde H, Burandt E C, Siemssen N, *et al*. Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of Staphylococcus epidermidis and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections [J]. Biomaterials, 2007, 28(9): 1711-1720.

[12] Costerton J W. Introduction to biofilm[J]. Int J Antimicrob Agents, 1999, 11(3/4): 217-221.

[13] Radin S, EL-Bassyouni G, Vresilovic E J, *et al*. *In vivo* tissue response to resorbable silica xerogels as controlled-release materials[J]. Biomaterials, 2005, 26(9): 1043-1052.

[14] Lasa I. Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development[J]. Int Microbiol, 2006, 9(1): 21-28.

[15] Hanssen A D. Local antibiotic delivery vehicles in the treatment of musculoskeletal infection[J]. Clin Orthop Relat Res, 2005, (437): 91-96.

[16] Jung J C, Schmid N V, Kelm J, *et al*. Complications after spacer implantation in the treatment of hip joint infections[J]. Int J Med Sci, 2009, 6(5): 265-273.

[17] Van-Raaij T M, Visser L E, Vulto A G, *et al*. Acute renal failure after local gentamicin treatment in an infected total knee arthroplasty [J]. J Arthroplasty, 2002, 17(7): 948-950.

[18] Wu I M, Marin E P, Kashgarian M, *et al*. A case of an acute kidney injury secondary to an implanted aminoglycoside [J]. Kidney Int, 2009, 75(10): 1109-1112.

(收稿 2010-04-20 修回 2010-06-02)

(编辑 张 维)