文章编号:1000-5404(2011)04-0381-04

论著

载万古霉素硅溶胶缓释系统的体外抑菌研究

龚 滨,熊 雁,王子明,王爱民 (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** 制备载万古霉素硅溶胶(vancomycin-sol, VCM-SOL)涂层缓释系统,探讨其体外抑菌性能。**方法** 采用正硅酸乙酯酸化水解法及溶胶-凝胶法制备载万古霉素(VCM)浓度为20 mg/ml的VCM-SOL涂层钛钢片作为实验组,普通钛钢片作为对照组。利用红外光谱分析系统(FT-IR)来分析实验组的表面基团;选用金黄色葡萄球菌(*staphylococcus aureus*,*S. A*)作为实验菌,通过细菌计数进行洗脱液抑菌实验,扫描电镜检测钛钢片表面细菌黏附实验,对比观察实验组和对照组的体外抗菌效果。**结果** 硅溶胶对万古霉素有良好的吸附作用,实验组的洗脱液相对于对照组明显抑制了金黄色葡萄球菌的生长;实验组表面黏附的细菌较为分散,且大部分金黄色葡萄球菌被分解,而对照组表面细菌结构正常,细菌集结成团,易形成生物膜。**结论** 万古霉素以硅溶胶为载体携载到钛合金表面涂层中后,具有良好的体外抗菌活性。

【关键词】 万古霉素;硅溶胶;金黄色葡萄球菌;抑菌
【中图法分类号】 R944.9;R969;R978.16 【文献标志码】 A

Bacteriostasis of vancomycin-sol coating *in vitro*

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

【**Abstract**】 **Objective** To prepare vancomycin-sol coating and investigate its bacteriostasis characteristics *in vitro*. **Methods** VCM20-SOL coating which contains 20 mg/ml vancomycin was prepared by acid-catalyzed tetraethylorthosilane with sol as carrier. Then a titanium alloy sheet was coated with the prepared VCM20-SOL coating with sol-gel technique, and the blank titanium alloy sheet served as the control group. Fourier transform infrared spectrum system (FT-IR) was used to analyze the surface groups of the VCM20-SOL coated titanium alloy sheet, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) was employed as test bacterium. The antibacterial effect of the eluent from the experimental sheet and the control group was observed. Bacterial adhesion of the experiment and control sheets were evaluated. **Results** The silica sol had good properties in adsorption of vancomycin *in vitro*. The eluent of the experimental sheet obviously inhibited the growth of *S. aureus* when compared with that of control group. The bacteria adhered to the surface of experimental sheet was in dispersion, and the most of *S. aureus* were decomposed. However, the structure of the bacteria on the control group surface was normal, and they adhered to agglomerate, and were easy to form biofilm. **Conclusion** Our prepared vancomycin-sol coating has good antibacterial activity *in vitro*.

【**Key words**】 vancomycin; silica sol; *staphylococcus aureus*; bacteriostasis

Corresponding author: Wang Aiming, E-mail: trauma2@163.com

研究显示,硅溶胶是一种多孔的、可吸收的材料,当抗生素、肿瘤生长因子、蛋白质等生物活性物质溶解于其中后,硅溶胶分子对其均能产生有效均匀的吸附,随着时间的延长而缓慢的释放,且保存了其相应的药理特性[1-3],同时具有化学性质稳定、无毒无害的特点,因此被国内外学者广泛应用于生物医学工程领域[4]。万古霉素(vancomycin, VCM)属于糖肽类抗生素,近年来,由于其疗效肯定,与其他抗生素无交叉耐药性;尤其对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)和耐甲氧西林表皮葡萄球菌(MRSE)等耐药革兰阳性球菌及难辨梭菌具高度抗菌活性,已成为治疗耐药葡萄球菌重度感染的理想药物,被大多数医院选择为耐甲氧西林葡萄球菌所致医院内感染的首选药物。因其全身静脉输液后,易产生过敏反应、红人综合征、全身疼痛、中性粒细胞减少、肾功能衰竭等严重并发症[5],因此被认为是较理想的局部应用的抗生素之一。本实验在前期载万古霉素-硅溶胶(vancomycin-sol, VCM-SOL)缓释系统体外缓释及降解特性研究的基础上,探讨载

【通信作者】 王爱民,E-mail:trauma2@163.com

VCM-SOL缓释系统的体外抑菌效果,期望能为临床上预防以及治疗开放性骨折和假体置换术后细菌感染提供一种途径。

1 材料与方法

1.1 实验菌株及来源

75株金黄色葡萄球菌(编号015~096)分离于本院2009年10月至2010年6月住院患者的临床送检标本,经美国产BBLCRYSTALTM AUTOREADER快速细菌自动鉴定仪鉴定。药敏质控株金黄色葡萄球菌ATCC25923,为本院国家药品临床研究基地保存。

1.2 药物与试剂

万古霉素(稳可信,ELI Lilly Japan K. K,分析纯),硅溶胶(采用正硅酸乙酯酸化水解法自行制备),M-H培养肉汤,胰胨大豆培养基(TSA)和胰胨大豆培养肉汤(TSB)均由本院检验科提供。

1.3 实验材料和仪器

医用钛合金钢板(3.0 cm×2.0 cm×0.5 cm,重庆康盛医疗器械有限公司提供),傅里叶变换红外光谱分析仪红外光谱分析仪(FT-IR Systern,Perkin Elmer,USA),HEPA CLASS100 CO_2培养箱(THERMO,USA),SPX-150-Z型恒温培养箱和振荡器(上海跃进医疗器械厂),电子天平(Sartorius公司,BP221S型),VITEK比浊仪(里埃公司France),SCAN扫描电镜(S-3400NⅡ型,Japan)。

1.4 方法

1.4.1 载VCM-SOL涂层缓释系统的制备 参照Radin等[4]的方法,采用正硅酸乙酯酸化水解法制备载药硅溶胶,本实验的前期研究[6],经过大量试验获得1种四元溶剂组合,其配方为:正硅酸乙酯:1 mol/L盐酸:70%乙醇:水=25:1:12:12(体积分数),并证实了载药浓度为20 mg/ml的VCM-SOL涂层具有良好的体外释放和降解效果,具体制备过程:按比例量取25 ml正硅酸乙酯溶液,先后加入1 mol/L盐酸1 ml及70%乙醇12 ml,充分搅拌后,再加入浓度为20 mg/ml的盐酸万古霉素水溶液12 ml,在磁力搅拌器上充分搅拌直至形成透明的溶液,再采用溶胶-凝胶法将其均匀涂层在高温消毒的医用钛合金钢板上,制作成载VCM_{20}-SOL涂层的钛片,作为实验组,未载药涂层的医用钛片作为对照组。

1.4.2 实验组表面基团的检测 利用傅里叶变换红外光谱分析仪(FT-IR)对实验组(载VCM-SOL钛片)进行表面基团分析[7]。将载VCM-SOL钛片的涂层刮下约1 mg后,加入300 mg溴化钾(KBr)中进行磨制,然后用YP-2压片机在20 MPa的压力下压制成厚约1 mm,直径约为10 mm左右的透明片子进行FT-IR检测。

1.4.3 洗脱液的抑菌试验 将金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)于80 ml TSB中37 ℃水浴培养24 h。用麦氏比浊法分别稀释得到10^3、10^4、10^5 CFU一系列浓度的菌液,同时将实验组(载VCM浓度为20 mg/ml)和对照组分别浸入6 ml TSB中漩涡振荡器振荡1 h后取出,然后分别取1 ml与1 ml 10^3、10^4、10^5CFU的细菌悬液均匀混合,置于37 ℃恒温箱中,静态培养4 h。然后,取100 μl涂布到血琼脂平板上,37 ℃培养箱中培养24 h取出,观察并计数血琼脂平板上的细菌菌落。

1.4.4 表面细菌黏附试验 金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)于80 ml TSB(胰蛋白胨大豆肉汤培养基)中37 ℃水浴培养24 h用麦氏比浊法分别稀释得到1×10^7 CFU的菌悬液。同时将实验组钛片及对照组钛片分别完全浸泡于1×10^7 CFU TSB细菌悬液中,37 ℃恒温培养箱中培养2 h。取出用PBS缓冲液洗掉钛片上未黏附或黏附不紧的细菌,洗毕后放入2.5%戊二醛溶液中固定2 h;再次用PBS缓冲液清洗,接着放入乙醇溶液中进行梯度脱水,乙醇浓度分别为40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%,每个梯度10 min;再放入100%乙醇异戊醇溶液中做置换处理20 min后,在CO_2临界点干燥中进行临界点干燥,喷金后在扫描电镜下观察。

1.5 统计学处理

采用SPSS 13.0统计软件,数据以$\bar{x}\pm s$表示,各组间比较行重复测量的方差分析。

2 结果

2.1 FT-IR检测结果

盐酸万古霉素的特征吸收峰在1 650、1 505、1 231 cm^{-1},分别是由-NH_2-、-NH-、-CH_3的弯曲振动引起的[7]。硅溶胶的特征吸收为3 600~3 400 cm^{-1}内的-OH基团吸收,1 120、475 cm^{-1}左右处Si-O-Si的反对称伸缩、弯曲振动和摇摆振动,以及799 cm^{-1}和968 cm^{-1} 1处的Si-OH的伸缩振动吸收和弯曲振动吸收。在载药硅溶胶的FTIR光谱图中,SiO_2和VCM的主要吸收峰都在,Si-O-Si的吸收稍微有些偏移,Si-OH的弯曲振动吸收有较大偏移,1 505 cm^{-1}和1 229 cm^{-1}处出现-NH-、-CH_3的弯曲振动吸收峰。同时还出现了1 589、1 399、992 cm^{-1}等处的吸收峰,这说明硅溶胶通过表面Si-OH已经有效地吸附了一定量的万古霉素。见图1。

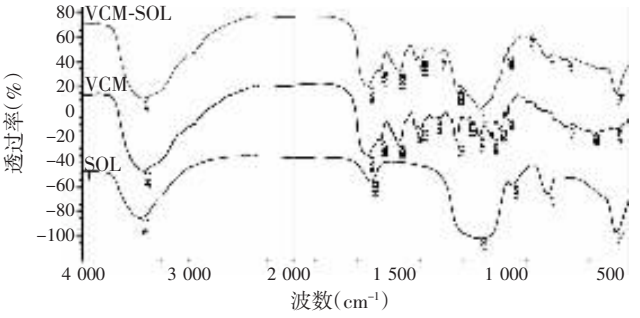
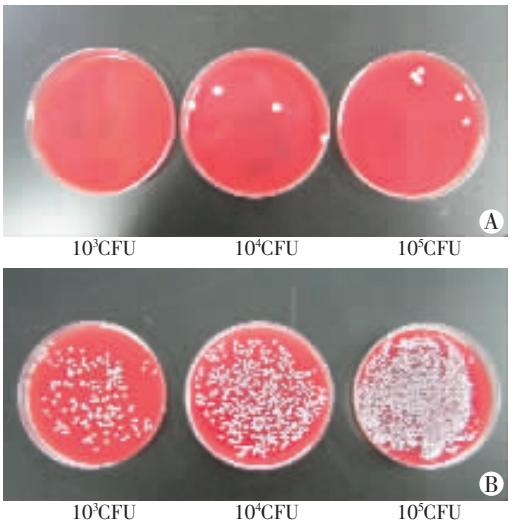


图1 SOL、VCM、VCM20-SOL红外光谱图

2.2 各组洗脱液的抑菌实验结果

由图2可以看出,在10^4 CFU和10^5 CFU细菌浓度下,对照组的培养平板上都长满了金黄色葡萄球菌,菌落数目随金黄色葡萄球菌浓度的增加而明显增加。载VCM_{20}-SOL实验组的培养平板上只出现了几个散落的菌落,提示在相同培养的金黄色葡萄球菌浓度条件下,载VCM_{20}-SOL钛合金钛片的实验组对金黄色葡萄球菌的生长有明确的抑制作用($P<0.01$)。

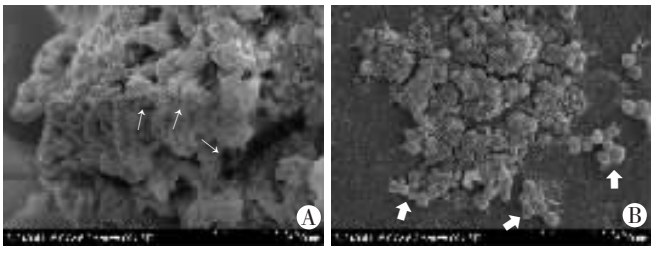


A:实验组;B:对照组

图 2 3 种细菌浓度下实验组及对照组洗脱液的抑菌效果图

2.3 各组表面细菌黏附实验结果

采用 1.4.4 方法,得到的实验组及对照组表面的细菌黏附情况,经过在菌液中相同时间(2 h)的培养后,采用 SEM 观察,对照组出现大量球形结构的细菌黏附,并且细菌之间相互黏连,多数聚集成团状;不同于对照组,实验组表面则可见大量棉花状载药涂层,黏附的细菌较为分散,大部分金黄色葡萄球菌被分解,细菌的球形结构已经被破坏;结果显示载 VCM_{20}-SOL 钛合金钢板的实验组对金黄色葡萄球菌的黏附同样有着明显的抑制作用。见图 3。



↑:被分解的金黄色葡萄球菌;⬆:正常结构的金黄色葡萄球菌

A:实验组 B:对照组

图 3 不同钛片表面细菌黏附 SEM 观察 (×8 000)

3 讨论

随着材料科学和临床医学的发展,内固定术后感染早已成为研究焦点之一。最常见的导致"固定物与感染"的细菌为金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌。其中金黄色葡萄球菌是导致手术或创伤后的主要致病菌(30%),是内植物相关的骨与关节、软组织感染的首要细菌[8-9]。过去的 30 多年中,随着医疗水平的发展,生物相容性好、缓释效果好的各种无机材料和有机高分子材料不断涌现,将抗生素药物与载体缓释系统相结合,从而使内植物局部负载的抗生素得到缓慢持久的释放,达到有效抑菌的目的,在治疗开放性骨折、骨髓炎和感染性骨缺损等方面有着广泛的应用前景[10-12]。

在抗生素的选择方面,细菌生物膜形成能力较强的菌株通常具有更高的大环内酯耐药性,这将使本就不佳的预防效果可能更难以发挥,在植入医疗器械的围手术期采用大环内酯类药物可能难以有效地预防生物膜感染[13]。因此在前期实验研究中,我们选择了糖肽类抗生素万古霉素,并论证了载 VCM_{20}-SOL 涂层在体外具有明显的缓释和降解作用,本实验对载 VCM_{20}-SOL 涂层的体外抑菌效果进行了近一步的对比观察。在不同细菌浓度的培养皿中,对照组中普通钛片随细菌浓度的增高,金黄色葡萄球菌的数目也明显增加;而实验组的洗脱液在不同细菌浓度培养皿中,均明显抑制了金黄色葡萄球菌的生长($P<0.01$),说明了万古霉素依然保持了对金黄色葡萄球菌有效的抗菌活性,并没有因为负载于硅溶胶缓释涂层后而失效。

生物膜是由吸附于物体表面的细菌及其所分泌的多聚物所构成的复杂结构。金黄色葡萄球菌容易黏附在内植物表面,聚集形成生物膜[14]。其基本机制为细菌通过分泌蛋白或糖类物质与宿主细胞竞争在生物材料表面黏附,当内植物置入体内后,内植物表面的纤维蛋白会自然的沉积于表面,其于细菌之间以特殊的受体连接方式加强内植物对金黄色葡萄球菌的吸引特性[15]。可见,金黄色葡萄球菌在内植物表面的黏附是生物膜形成的决定性起始步骤,如何有效的减少内植物表面的细菌黏附是降低细菌感染的重要途径。本研究表明,在 1×10^7 CFU 金黄色葡萄球菌菌液中培养

2 h 后,载 VCM_{20}-SOL 涂层钛钢片的实验组 SEM 照片显示,大部分细菌正常的球形结构被分解破坏,附着的金黄色葡萄球菌比较分散,与对照组中普通钛片相比较,明显减少了金黄色葡萄球菌在其表面的黏附,近而对金黄色葡萄球菌生物膜的形成产生抑制作用。

综上所述,万古霉素以硅溶胶为载体携载到钛合金表面涂层中后,具有良好的体外抗菌活性,但其具体的抑制细菌生物膜形成的机制仍有待进一步研究。

参考文献:

[1] Radin S, Ducheyne P. Nanostructural control of implantable xerogels for the controlled release of biomolecules[M]// Reis R L, Weiner S. Learning from nature how to design new implantable biomaterials. Netherland: Kluwer Academic Publishers, 2004: 59-74.

[2] Nicoll S B, Radin S, Santos E M, *et al*. *In vitro* release kinetics of biologically active transforming growth factor-beta 1 from novel porous glass carrier[J]. Biomaterials, 1997, 18(12): 853-859.

[3] Santos E M, Radin S, Ducheyne P. Sol-gel derived carrier for the controlled release of proteins[J]. Biomaterials, 1999, 20(18): 1695-1700.

[4] 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.
[5] 卢廷胜,袁俊波. 万古霉素不良反应[J]. 中国误诊学杂志,2009,9(34):8560-8561.
[6] 龚滨,熊雁,王子明,等. 载万古霉素硅溶胶涂层的制备及其体外抑菌作用观察[J]. 解放军医学杂志,2010,35(9):1123-1126.
[7] 中西香尔,索罗曼. 红外光谱分析100例[M]. 王绪明,译. 北京:科学出版社,1984:1-73.
[8] Baier R E, Meyer A E, Natiella J R, *et al*. Surface properties determine bioadhesive outcomes: methods and results[J]. J Biomed Mater Res, 1984, 18(4): 327-355.
[9] Ruoslahti E. Integrins as receptors for extracellular matrix[M]//Hay E D. Cell biology of extracellular matrix. 2nd ed. New York: Plenum Press, 1991: 343-363.
[10] 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.
[11] Schmidmaier G, Lucke M, Wildemann B, *et al*. Prophylaxis and treatment of implant-related infections by antibiotic-coated implants: a review[J]. Injury, 2006, 37(Suppl 2): S105-S112.
[12] Radin S, Chen T, Ducheyne P. The controlled release of drugs from emulsified, sol gel processed silica microspheres[J]. Biomaterials, 2009, 30(5): 850-858.
[13] 枉前,孙凤军,夏培元. 临床分离表皮葡萄球菌的大环内酯耐药性与生物膜形成能力、icaA基因型的关系[J]. 第三军医大学学报,2009,31(22):2252-2254.
[14] Harris L G, Richards R G. Staphylococci and implant surfaces: a review[J]. Injury, 2006, 37(Suppl 2): S3-S14.
[15] Anderson D J, Kaye K S. Staphylococcal surgical site infections[J]. Infect Dis Clin North Am, 2009, 23(1): 53-72.

(收稿:2010-10-13 修回:2010-11-23)
(编辑 王小宴)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2011)04-0384-01

连续性血液净化治疗挤压综合征的临床护理

吴 亿,王军霞,彭侃夫,吴雄飞 (400038 重庆,第三军医大学西南医院肾内科)

【关键词】 挤压综合征;连续性血液净化;护理
【中图法分类号】 R473.5 【文献标志码】 B

挤压综合征(crush syndrome, CS)是由于人肢体遭受重物长时间挤压,横纹肌溶解,在挤压解除后出现以肢体肿胀、肌红蛋白尿、高血钾、急性肾衰竭(acute renal failure, ARF)为主要表现的损伤综合征[1],是一种外科严重创伤加内科急症的重危病症,病情严重复杂,并发症多,死亡率高[2-3]。连续性血液净化(continuous blood purification,CBP)是近年来发展迅速的一种治疗技术,在临床重症抢救治疗中显示出越来越多的优势[4]。我科从1998年7月至2010年7月对34例CS患者进行了CBP治疗与护理,取得了较好的效果,现报告如下。

1 临床资料

本组34例患者均符合现代创伤学CS诊断标准,并伴有ARF表现,即少尿、无尿,进行性血尿素氮和血肌酐升高。男性30例,女性4例;年龄19~61(33.0±2.8)岁。16例为车祸压迫肢体6~8 h,13例为酒后、不明原因的昏睡造成肌肉的直接压迫8~10 h,2例为100 m比赛中发生,3例为汶川大地震伤员。既往体健,无肾病史和药物过敏史。采用美国百特Aquarius或德国贝朗连续性血液净化系统、聚砜膜滤过器(HIPS15,贝朗)或瑞典金宝PRISMA机器以及配套的M60管路和滤器AN69(PAN膜)进行连续性静脉-静脉血液滤过治疗(CVVH)。本组34例患者有12例前3次串联血液灌流治疗(珠海健帆公司HA330)。每天床边连续治疗10~24 h,血流量设定为180~250 ml/min。本组24例选择前稀释治疗模式,10例选择前、后稀释(3:1)同时进行。置换液根据医嘱自行配制或使用血液滤过基础液,流量2~3 L/h,碳酸氢钠同步匀速输入。经内外科联合治疗及尽早开展CBP治疗,29例痊愈,出院时实验室检查基本恢复正常。死亡5例,患者发病后72 h才确诊,行CBP治疗时已出现严重肾衰竭、肝衰竭,而且有呼吸衰竭及凝血功能障碍,死亡原因为多器官功能衰竭(multiple organ dysfunction syndrome,MODS)。

2 临床护理

2.1 CBP护理

2.1.1 血管通路的护理 采用Seldinger方法行右侧颈内静脉插管或右侧股静脉插管留置单针双腔导管。本组21例患者选用股静脉插管,13例患者选用颈内静脉插管,得到理想的血流量。严格进行无菌操作,静脉留置导管敷料每天更换。每日治疗结束用20 mg肝素盐水封管。

2.1.2 抗凝剂的选择 根据患者情况选用不同的抗凝方式。7例无出血倾向者用普通肝素抗凝,首剂1 mg/kg,追加肝素8~10 mg/h持续静脉推注。23例有出血倾向者用低分子量肝素,首剂上机前30 min一次性静脉推注2 500~5 000 IU,每4~6 h追加推注1次。4例严重出血倾向者,行无肝素透析。

2.1.3 严密监测各项参数 密切观察各压力参数的变化,如动、静脉端压力、跨膜压、滤器前压力等,及时处理各种报警。动脉、静脉的空气壶内有无凝血块,及时发现及时排除。无肝素透析者每15~30 min予生理盐水冲洗滤过器及管路,3次在治疗过程中出现静脉压及跨膜压急剧增高,发现滤过器凝血,予以更换继续治疗。其余患者使用抗凝剂后均无凝血现象。

2.2 重症监护

2.2.1 严密观察意识、瞳孔、血压等生命体征 持续心电监护,CS患者在CBP过程中低血压发生频繁,每30分钟监测1次血压,根据情况及时调整超滤量和补液量。

2.2.2 根据患者伤情调整舒适体位,截肢患者将患肢置功能位,合并骨折肢体,做好固定。

【通信作者】 吴雄飞,电话:(023)68754188,E-mail:wuxfei@126.com

(下转388页)