doi:10.11659/jjssx.08E020071

·基础研究·

抗生素复合骨水泥洗脱特性的实验研究

宋夏楠,周大鹏,刘欣伟,刘 兵,纪振钢,韩天宇 (北部战区总医院骨科,辽宁 沈阳 110016)

[摘 要] **目的** 探讨将2种抗生素混入骨水泥时抗生素释放特性的变化。**方法** 骨水泥样品分为单一万古霉素组(40 g PMMA骨水泥中混入2 g万古霉素)、单一头孢他啶组(40 g PMMA骨水泥中混入2 g头孢他啶)和联合组(40 g PMMA骨水泥中混入2 g万古霉素+2 g头孢他啶),每组6个。抗生素骨水泥载体在体外用PBS缓冲液浸泡,取4 h、8 h、16 h、24 h、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d、7 d、2周、3周、4周、6周样本,并应用高效液相色谱仪测定抗生素洗脱浓度。**结果** 在为期6周的洗脱过程中,联合组万古霉素及头孢他啶在骨水泥载体中的洗脱浓度分别高于单一万古霉素组和单一头孢他啶组($P<0.05$)。**结论** 2种抗生素添加于骨水泥载体中,可更好地发挥其功效。

[关键词] 抗生素;骨水泥;感染;释放特性

[中图分类号] R684 [文献标识码] A [收稿日期] 2020-08-20

Experimental study on elution characteristics of bone cement loaded with antibiotics

SONG Xia-nan, ZHOU Da-peng, LIU Xin-wei, Liu Bing, JI Zhen-gang, HAN Tian-yu (Department of Orthopedics, General Hospital of Northern Theater Command, Shenyang Liaoning 110016, China)

Abstract: Objective To investigate the elution characteristics of the 2 mixed antibiotics loaded into bone cements. **Methods** Bone cements were divided into single vancomycin group (2 g of vancomycin loaded into 40 g of PMMA bone cements), single ceftazidime group (2 g of ceftazidime loaded into 40 g of PMMA bone cements) and combination group (2 g of vancomycin + 2 g of ceftazidime loaded into 40 g of PMMA bone cements), with 6 samples in each group. Bone cements were immersed in phosphate buffered saline in vitro. Samples were taken in the 4th hour, 8th hour, 16th hour, 24th hour, 2nd day, 3rd day, 4th day, 5th day, 6th day, 7th day, 2nd week, 3rd week, 4th week and

[基金项目] 辽宁省自然科学基金(20180551082);辽宁省自然科学基金(20180550361)

[通信作者] 韩天宇,E-mail:fmmuhty@sina.com

[15] 孙宝峰,樊 芳,李忠勇,等. CDKN2B-AS1靶向miR-411-3p调节乳腺癌细胞的生物学行为[J]. 医学分子生物学杂志,2020,17(1):26-32. doi:10.3870/j.issn.1672-8009.2019.01.005.

[16] Suh YE, Raulf N, Gäken J, et al. MicroRNA-196a promotes an oncogenic effect in head and neck cancer cells by suppressing annexin A1 and enhancing radioresistance[J]. Int J Cancer, 2015, 137(5): 1021-1034. doi:10.1002/ijc.29397.

[17] Yang G, Han D, Chen X, et al. MiR-196a exerts its oncogenic effect in glioblastoma multiforme by inhibition of $I_{\kappa}B\alpha$ both in vitro and in vivo [J]. Neuro Oncol, 2014, 16(5): 652-661. doi: 10.1093/neuonc/not307.

[18] Feng C, She J, Chen X, et al. Exosomal miR-196a-1 promotes gastric cancer cell invasion and metastasis by targeting SFRP1 [J]. Nanomedicine (Lond), 2019, 14(19): 2579-2593. doi:10.2217/nnm-2019-0053.

[19] Villegas-Ruiz V, Juárez-Méndez S, Pérez-González OA, et al. Heterogeneity of microRNAs expression in cervical cancer cells: over-expression of miR-196a[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(4): 1389-1401.

[20] Benmoshe NB, Avraham R, Kedmi M, et al. Context-specific microRNA analysis: identification of functional microRNAs and their mRNA targets[J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40(21): 10614-10627. doi: 10.1093/nar/gks841.

[21] Mathieu R, Evrard B, Fromont G, et al. Expression screening of cancer/testis genes in prostate cancer identifies NR6A1 as a novel marker of disease progression and aggressiveness[J]. Prostate, 2013, 73(10): 1103-1114. doi:10.1002/pros.22659.

[22] Cheng G, Wang S, Li X, et al. Positive expression of NR6A1/CT150 as a predictor of biochemical recurrence-free survival in prostate cancer patients[J]. Oncotarget, 2016, 8(38): 64427-64439. doi: 10.18632/oncotarget.11749.

[23] 刘 法,郝 静,陈志杰,等. 贝伐单抗对视网膜母细胞瘤荷瘤裸鼠的影响及机制探讨[J]. 局解手术学杂志,2020,29(10):780-784. doi:10.11659/jjssx.11E019108.

[24] 牛 越,王占英,范立娜,等. miR-140-5p靶向ADAM9抑制乳腺癌细胞侵袭和迁移的研究[J]. 医学分子生物学杂志,2020,17(3):181-186. doi:10.3870/j.issn.1672-8009.2020.03.002.

[25] 周 亮,陈其玖,张建勇,等. 浸润性肺腺癌术后组织中跨膜蛋白-1及其受体和基质金属蛋白酶-9表达及关系[J]. 中国老年学杂志,2018,38(8):46-48. doi:10.3969/j.issn.1005-9202.2018.08.018.

(编辑:魏 源)

6th week and elution concentrations of antibiotics were tested at each time points by high-performance liquid chromatography. **Results** In the 6-week elution process, the concentrations of vancomycin and ceftazidime in combination group were higher than those in single vancomycin group and single ceftazidime group ($P<0.05$). **Conclusion** Two kinds of antibiotics loaded into the bone cements can promote their release.

Keywords: antibiotic; bone cement; infection; elution characteristics

随着社会及科技的不断进步,高能量损伤造成的骨缺损、骨感染等不断增加,因其花费高、治疗周期长、疗效不确切等问题,增加了患者及医护工作者的负担。抗生素骨水泥的问世,改善了骨缺损、骨感染的治疗问题。抗生素骨水泥可根据不同需求以不同的形式广泛应用于骨科的各个领域,如预防及治疗假体周围感染、慢性骨髓炎等。虽然骨水泥中可以加入不同种类抗生素,但需要根据细菌培养及药敏结果来选择最佳抗生素。目前开放性损伤、骨髓炎等多不是由单一细菌引起,可能是革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌或者这两者共同作用导致。叶志军等[1]经调查统计得出,创伤骨科常见细菌为铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、鲍曼不动杆菌、肠球菌属。张文明[2]的研究显示,骨科常见细菌除了上述细菌外,还有表皮葡萄球菌、克雷伯菌属,且革兰氏阴性菌的比例高于革兰氏阳性菌。因此,单一抗生素已无法完全满足临床对抗菌的需要,故应考虑将2种或2种以上抗生素引入骨水泥中。目前临床上针对革兰氏阳性菌主要应用万古霉素,但其对抗革兰氏阴性菌的作用有限,故需要再加入针对革兰氏阴性菌的抗生素,如头孢他啶,且万古霉素与头孢他啶均已被证实可在骨水泥中有效释放[3-4]。但加入2种抗生素后是否会影响各自的释放特性,还需进一步研究。故本研究主要探讨万古霉素联合头孢他啶的复合抗生素骨水泥在体外环境下的释放特性,以期为临床上骨感染的预防及治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

骨水泥PMMA(Palacos Lv Heraeus,德国)、万古霉素(Eli Lilly,日本)、头孢他啶(齐鲁制药有限公司)、岛津10A高效液相色谱仪、自动计时装置、自制骨水泥模具。

1.2 方法

1.2.1 样本制作 将骨水泥样品分为单一万古霉素组(40 g PMMA骨水泥中混入2 g万古霉素)、联合组(40 g PMMA骨水泥中混入2 g万古霉素+2 g头孢他啶)和单一头孢他啶组(40 g PMMA骨水泥中混入2 g头孢他啶)。利用自制骨水泥模具,每组制作成6个直径(10±1)mm、高(20±1)mm的骨水泥圆柱体。

1.2.2 PBS缓冲液配制 将2.958 g磷酸二氢钾溶于含130 mL甲醇的870 mL纯化水中,经过混匀、超滤、排气泡,制备成pH为7.30的PBS缓冲液。

1.2.3 洗脱实验 将各组骨水泥圆柱体放入无菌玻璃瓶内,分别加入5 mL的PBS缓冲液完全浸泡圆柱体,并置于37 ℃恒温下,每24 h更换PBS缓冲液1次。各组取4 h、8 h、16 h、24 h、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d、7 d、2周、3周、4周、6周试样液2份,应用高效液相色谱仪在236 nm波长下测定2种抗生素洗脱浓度。头孢他啶出现洗脱峰的时间约为5 min,万古霉素出现洗脱峰的时间约为16 min。

1.3 统计学方法

应用SPSS 20.0软件进行统计学分析,以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,应用单因素方差分析法处理数据。以$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2 结果

联合组各时间点万古霉素的洗脱浓度均较单一万古霉素组高($P<0.05$),头孢他啶的洗脱浓度也均较单一头孢他啶组高($P<0.05$),见表1、2。

表1 不同时间点单一万古霉素组和联合组万古霉素洗脱浓度($\bar{x}\pm s$,μg/L)

组别	4 h	8 h	16 h	24 h	2 d	3 d	4 d
单一万古霉素组	136.17±7.24	503.80±26.87	46.31±2.30	20.75±0.76	34.89±1.24	20.88±1.79	11.81±0.43
联合组	167.91±11.87	540.06±17.75	56.82±7.03	28.69±1.23	57.30±2.33	51.66±1.93	31.70±2.13
P	0.000	0.009	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000
组别	5 d	6 d	7 d	2周	3周	4周	6周
单一万古霉素组	5.57±0.11	5.20±0.12	5.10±0.18	3.96±0.07	1.95±0.19	0.83±0.04	0
联合组	27.94±1.83	21.68±1.29	18.49±1.13	12.40±0.90	7.45±0.81	6.39±0.18	4.68±0.33
P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

表 2 不同时间点联合组和单一头孢他啶组头孢他啶洗脱浓度($\bar{x} \pm s$,μg/L)

组别	4 h	8 h	16 h	24 h	2 d	3 d	4 d
联合组	410.37 ±20.72	743.88 ±40.65	177.78 ±8.37	101.01 ±6.39	172.30 ±6.61	44.66 ±1.61	32.99 ±2.24
单一头孢他啶组	353.19 ±2.94	402.86 ±9.89	93.71 ±3.33	40.03 ±2.42	92.91 ±5.03	25.68 ±2.31	18.77 ±1.36
P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
组别	5 d	6 d	7 d	2 周	3 周	4 周	6 周
联合组	26.03 ±1.08	16.74 ±0.77	13.32 ±0.58	10.42 ±0.94	5.87 ±0.42	5.05 ±0.13	4.77 ±0.16
单一头孢他啶组	15.87 ±1.24	13.33 ±1.92	10.77 ±0.67	8.21 ±0.41	4.69 ±0.21	4.48 ±0.22	0.79 ±0.08
P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000

3 讨论

骨感染对于骨科医生而言一直是棘手的问题,反复无法控制的感染最终会导致患者截肢。抗生素骨水泥出现已有几十年,并以不同形式用于骨感染的预防及治疗中。自抗生素载体被引入临床以来,已有大量的科研及临床报道对抗生素骨水泥的各个方面(如释放特性、抗压强度等)进行了研究,因其可局部释放,故抗生素在骨水泥中的用量较传统全身静脉用药少,浓度更低,毒性随之更小。目前,抗生素骨水泥已广泛用于骨科各领域。

抗生素骨水泥是将抗生素混入骨水泥中,目前大多选用 PMMA 骨水泥,抗生素的选择则需根据细菌培养结果确定,但并不是所有敏感抗生素均满足放入骨水泥中的条件。PMMA 骨水泥在其聚合过程中会产生热量,核心温度为 60 ~ 80 ℃[5],目前认为可加入骨水泥的抗生素需满足以下条件:抗菌谱广、天然耐药菌株较少、与蛋白质结合较少、过敏反应轻、耐热、水溶性好等[6]。临床上以万古霉素、庆大霉素、妥布霉素的应用较广泛,其中欧洲主要以万古霉素及庆大霉素为主,美国以万古霉素为主[7-8]。据大量文献报道,其他可用于 PMMA 骨水泥的抗生素还包括头孢菌素、替考拉宁、亚胺培南、哌拉西林、达托霉素、莫西沙星、利福平、氨苄青霉素、美罗培南、厄他培南等[3,9-11]。因抗生素的加入,PMMA 骨水泥的机械强度会有所下降,故加入抗生素的剂量需慎重考虑。通常认为在 PMMA 骨水泥中加入的抗生素越多,其洗脱出来的抗生素就会越多,但 Slane 等[12]将 0 ~ 3 g 妥布霉素和0 ~ 3 g万古霉素按照不同比例混合加入到PMMA骨水泥中进行为期 28 d 的洗脱研究,结果显示 3 g 妥布霉素和 2 g 万古霉素组合累计释放的浓度高于剂量最大的 3 g 妥布霉素和 3 g 万古霉素组合。Paz 等[13]的研究也得出类似结果,并不是 PMMA 骨水泥中抗生素含量越多释放越多。低含量抗生素可能产生与高含量抗生素相同水平的抗菌作用(即高于最小抑菌浓度),同时可以减少成本。本研究考虑到实用性及经济效益,选择 2 g 万古霉素与 2 g 头孢他啶混合。

抗生素从 PMMA 骨水泥中的释放过程其实是一种表面弥散,液体进入骨水泥后将抗生素进行溶解再析出。骨水泥中的抗生素通过孔隙内浓度梯度弥散而释放,抗生素的释放从外部开始,当液体渗入到内部时,深部的药物才得以继续向外扩散。深部的抗生素释放缓慢,一般在几小时内释放较高,达到高峰,几天内释放明显下降。故得出骨水泥中抗生素释放的曲线,抗生素的释放可以分为 3 个阶段:第 1 阶段为初始阶段,也可称为爆发阶段,即抗生素在最初时间里(24 h 内)大量且快速释放,并迅速达到高峰;第 2 阶段为中间阶段,经过了抗生素的爆发式释放,抗生素在此阶段(几天内)的释放逐渐变为缓慢;第 3 阶段,即终末阶段,此阶段抗生素的释放更为平缓,趋于平直。本研究中抗生素的释放规律与李涛等[11]研究中抗生素的释放规律相符,万古霉素、头孢他啶均符合 3 阶段的释放,甚至二者混合之后各自的洗脱浓度亦满足先爆发释放、再降速、再平缓的规律。

随着研究的不断深入,发现创口、感染处所培养出的细菌并不只有 1 种,可能是 2 种及 2 种以上的混合细菌,单一抗生素无法覆盖所有细菌,故可在骨水泥中加入 2 种甚至多种抗生素。但在 PMMA 骨水泥中加入 2 种抗生素,因抗生素释放特性的不同可能相互影响。目前针对 2 种抗生素的释放研究较多为万古霉素和妥布霉素、万古霉素和庆大霉素[4,14]。Penner 等[4]将 2.4 g 妥布霉素和 1 g 万古霉素混合加入到骨水泥中进行洗脱实验,得出混合组中妥布霉素累计释放量较对照组(仅含妥布霉素)增加了 68%,万古霉素的释放量则增加了 103%,其认为在骨水泥中加入 2 种抗生素可改善抗生素在体外的洗脱,呈协同作用。本研究将万古霉素与头孢他啶混入骨水泥中,结果提示联合组抗生素释放浓度较单一组增加,这可能是由于联合组将 2 种抗生素以粉末状形式混入骨水泥中,因单位骨水泥中的粉末状抗生素较单一组多,第 2 种作为可溶性的添加剂,而添加剂的溶解会在骨水泥中留下更多的空隙,进一步增加骨水泥中的孔隙率[4],使抗

生素能进一步析出,2 种抗生素互相作为可溶性的添加剂,故析出均增加。然而,并不是抗生素混合后均能产生协同效果,Li 等[15]将庆大霉素与万古霉素混合进行洗脱实验,结果发现,与单一万古霉素相比,联合庆大霉素后万古霉素的释放量大大减少,而对庆大霉素的释放影响则不大。Bertazzoni 等[16]的研究也得到了类似的结果,他们研究 2.5% 庆大霉素和 5% 万古霉素在 Cemex 骨水泥的洗脱浓度,结果显示,万古霉素对庆大霉素洗脱的影响不大,但庆大霉素负载后万古霉素的洗脱浓度降低。Boelch 等[17]在 Palacos 骨水泥中分别手工混合加入0.5 g庆大霉素、0.5 g 庆大霉素 + 2 g万古霉素,结果表明,万古霉素的加入对于庆大霉素的洗脱没有明显影响。不同抗生素之间的释放可能仍有不同,包括抗生素的添加方式也会引起释放的不同,手工混合比预混合抗生素释放量更高[5]。还有一些其他方法,如添加木糖醇、使用超声波等均可促进抗生素释放[18-19]。

综上,万古霉素和头孢他啶联合混入骨水泥中可相互促进释放,效果较单独使用更好。临床中可根据不同抗生素在骨水泥中的洗脱特性以及抗菌谱的需要,选择 2 种抗生素添加于适当的骨水泥载体中,以增加抗生素的释放量,更好地发挥其预防及治疗骨缺损、骨感染等疾病的作用。

[参考文献]

[1] 叶志军,王文秋,张小娟. 创伤骨科病原菌分布及耐药谱分析[J]. 中华医院感染学杂志,2011,21(6):1256 - 1258.

[2] 张文明. 骨科感染的细菌种类及细菌对抗菌药物敏感性的检测[J]. 中国实用医刊,2011,38(13):93 - 94. doi:10.3760/cma.j.issn.1674 - 4756.2011.13.045.

[3] Chang Y,Tai CL,Hsieh PH,et al. Gentamicin in bone cement: a potentially more effective prophylactic measure of infectionin joint arthroplasty [J]. Bone Joint Res,2013,2(10):220 - 226. doi:10.1302/2046 - 3758.210.2000188.

[4] Penner MJ,Masri BA,Duncan CP. Elution characteristics of vancomycin and tobramycin combined in acrylic bone-cement[J]. J Arthroplasty,1996,11(8):939 - 944. doi:10.1016/s0883 - 5403(96)80135 - 5.

[5] Anagnostakos K,Kelm J. Enhancement of antibiotic elution from acrylic bone cement[J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater,2009,90(1):467 - 475. doi:10.1002/jbm.b.31281.

[6] Kuehn KD,Ege W,Gopp U,et al. Acrylic bone cements: composition and properties[J]. Orthop Clin North Am,2005,36(1):17 - 28. doi:10.1016/j.ocl.2004.06.010.

[7] Chen AF,Parvizi J. Antibiotic-loaded bone cement and periprosthetic joint infection[J]. J Long Term Eff Med Implants,2014,24(2 - 3):89 - 97. doi:10.1615/jlongtermeffmedimplants.2013010238.

[8] van Vugt TAG,Arts JJ,Geurts JAP. Antibiotic-loaded polymethylmethacrylate beads and spacers in treatment of orthopedic infections and the role of biofilm formation[J]. Front Microbiol,2019,10:1626. doi:10.3389/fmicb.2019.01626.

[9] 陈 曦,范卫民,王黎明,等. 四种抗生素骨水泥的洗提特性[J]. 江苏医药,2005,31(11):863 - 864. doi:10.3969/j.issn.0253 - 3685.2005.11.027.

[10] Gálvezlópez R,Peñamonje A,Antelolorenzo R,et al. Elution kinetics, antimicrobial activity,and mechanical properties of 11 different antibiotic loaded acrylic bone cement[J]. Diagn Microbiol Infect Dis,2014,78(1):70 - 74. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2013.09.014.

[11] 李 涛,史占军,王 健,等. 两种抗生素复合骨水泥的材料学性能及抗菌活性研究[J]. 中华关节外科杂志(电子版),2016,10(4):407 - 412. doi:10.3877/cma.j.issn.1674 - 134X.2016.04.009.

[12] Slane J,Gietman B,Squire M. Antibiotic elution from acrylic bone cement loaded with high doses of tobramycin and vancomycin[J]. J Orthop Res,2018,36(4):1078 - 1085. doi:10.1002/jor.23722.

[13] Paz E,Sanz-Ruiz P,Abenojar J,et al. Evaluation of elution and mechanical properties of high-dose antibiotic-loaded bone cement: comparative "in vitro" study of the influence of vancomycin and cefazolin[J]. J Arthroplasty,2015,30(8):1423 - 1429. doi:10.1016/j.arth.2015.02.040.

[14] Boelch SP,Rueckl K,Fuchs C,et al. Comparison of elution characteristics and compressive strength of biantibiotic-loaded PMMA bone cement for spacers: Copal® spacem with gentamicin and vancomycin versus Palacos® R + G with vancomycin[J]. Biomed Res Int,2018,2018:4323518. doi:10.1155/2018/4323518.

[15] Li T,Fu LL,Wang J,et al. High dose of vancomycin plus gentamicin incorporated acrylic bone cement decreased the elution of vancomycin [J]. Infect Drug Resist,2019,12:2191 - 2199. doi:10.2147/IDR.S203740.

[16] Bertazzoni Minelli E,Caveiari C,Benini A. Release of antibiotics from polymethylmethacrylate cement[J]. J Chemother,2002,14(5):492 - 500. doi:10.1179/joc.2002.14.5.492.

[17] Boelch SP,Jordan MC,Arnholdt J,et al. Loading with vancomycin does not decrease gentamicin elution in gentamicin premixed bone cement [J]. J Mater Sci Mater Med,2017,28(7):104. doi:10.1007/s10856 - 017 - 5915 - 6.

[18] Shi MM,Chen L,Wang YX,et al. Effect of low-frequency pulsed ultrasound on drug delivery,antibacterial efficacy,and bone cement degradation in vancomycin-loaded calcium phosphate cement[J]. Med Sci Monit,2018,24:797 - 802. doi:10.12659/msm.908776.

[19] Chang YH,Tai CL,Hsu HY,et al. Liquid antibiotics in bone cement: an effective way to improve the efficiency of antibiotic release in antibiotic loaded bone cement[J]. Bone Joint Res,2014,3(8):246 - 251. doi:10.1302/2046 - 3758.38.2000305.

(编辑:龙小芬)