两种万古霉素藻酸盐微缓释球释放曲线的对比研究

侯天勇,许建中 (第三军医大学西南医院骨科,全军矫形外科中心,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 制备两种不同的万古霉素藻酸盐微球(Vanco-AB),对比其体外缓释性能和抗菌活性,探讨其在骨科抗感染治疗中的可能应用。**方法** 应用滴注法制备万古霉素藻酸盐微球,通过分别改变万古霉素和藻酸盐溶液的浓度,优选万古霉素含量高的微球,然后用不同浓度纤维蛋白凝胶包裹,通过检测各组万古霉素有效的释放时间来筛选适当包裹微球。**结果** 随着万古霉素和藻酸盐溶液浓度的升高,微球中的万古霉素含量增高,16% 藻酸盐和 50 mg/mL 万古霉素等体积混合液制备的微球中万古霉素含量最高,达(27.36 ±0.90)%。在前述微球的基础上,75 mg/mL 纤维蛋白包裹的微球释放万古霉素的浓度可有效杀灭金黄色葡萄球菌 19 d。**结论** 优选后的 FG-Vanco-AB 可达到有效杀菌浓度的释放天数显著延长,增加了临床应用的可能。

[关键词] 抗生素缓释;纤维蛋白凝胶;骨组织感染
[中图分类号] R683 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2014)04-0349-04

Preparation and optimization of fibrin-gel-coated vancomycin alginate beads

HOU Tian-yong, XU Jian-zhong (Department of Orthopedics, Orthopedics Center of PLA, Southwest Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To prepare and optimize fibrin-gel-coated vancomycin alginate beads (FG-Vanco-AB), and to investigate their possible use in treatment for osteomyelitis or preventing infection. **Methods** Vancomycin alginate beads were produced by dropping vancomycin and alginate mixed liquor into calcium chloride solution. Beads including high vancomycin content were prepared and chosen by optimizing different concentration vancomycin solution and alginate solution. These beads were coated with fibrin gel formed by different concentration fibrin and the same concentration thrombin. The optimized beads were longer available release time, during which vancomycin in medium could kill Staphylococcus aureus(ATCC25923). **Results** The content of vancomycin in beads was higher as vancomycin concentration and alginate concentration in mixted liquid were higher. The highest vancomycin content beads were prepared by 16% alginate and 50 mg/mL vancomycin, (27.36 ±0.90)%. Based on this, the further results showed that vancomycin concentrations from beads coated with 75 mg/mL fibrin and 400 IU/mL thrombin remained above the breakpoint sensitivity for 19 d after detecting vancomycin concentration in medium and vancomycin activity for Staphylococcus aureus. **Conclusion** The available release time is prolonged, and the possibility of clinic use is conspicuously increased after vancomycin beads are optimized by adjusting the rate of mixed component and fibrin gel coat.

Keywords: antibiotic controlled release; fibrin gel; osseous tissue infection

抗感染治疗是创伤所致的开放性骨折、骨髓炎以及外科术后处理中必不可少的重要措施。常规抗感染治疗主要通过口服或静脉给药,虽然可以取得一定疗效,但对于严重骨组织感染的患者,感染骨组织周围的血流量减少,容易导致药物在血液中浓度高而局部骨组织中浓度低的现象,降低了治疗效果。目前,应用生物相容性好、可降解的包裹材料制备成药物缓释载体并移植在骨折局部的给药方法,实现了直接给药、增强药物疗效的作用。为此,笔者对纤维蛋白包裹的万古霉素藻酸盐微球(fibrin-gel-coated vancomycin alginate beads, FG-Vanco-AB)进行制备和优化,为其在骨组织抗感染治疗中的可行性提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 万古霉素藻酸盐微球的制备和优化

将藻酸盐(美国 Sigma 公司,低粘度细胞培养级)溶解于去离子水,制成 4%、8%、12%、16% 和 20% 的溶液,分别与等体积的 10、20 和 50 mg/mL 的万古霉素溶液混合。用注射器抽取后,加压使混合溶液缓慢滴注到搅动的 1.01%(w/v)氯化钙水溶液中。10 min 后,将从氯化钙水溶液中收集的藻酸盐微球用去离子水洗净,-70 ℃冻存 6 h 后再低压冻干 6 ~ 8 h,直至重量不再变化后分装保存。称取相同质量的由不同浓度藻酸盐和万古霉素溶液制备的微球,用 5 mL 的 5%(w/v)柠檬酸三钠溶液裂解微球,收集裂解液,以 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液在高效液相色谱仪上测定万古霉素浓度。万古霉素含量(%) = 微球中万古霉素质量/藻酸盐微球的质量 ×100%。

1.2 FG-Vanco-AB 的优化

16% 藻酸盐溶液与 50 mg/mL 万古霉素的混合溶液制备的

doi:10.11659/jjssx.1672-5042.201404008
[基金项目] 国家自然科学基金项目(81371975);全军后勤科研"十二五"计划重点项目(BWS11C040);军事预研课题(SWH2013JS07)
[通讯作者] 许建中,E-mail:xjzslw@163.com
[收稿日期] 2014-02-22 [修回日期] 2014-03-12

万古霉素藻酸盐微球冻干后,每组分 3 份,分别置入 0、30、60、75 和 90 mg/mL 的纤维蛋白原的磷酸二氢钾(0.05 mol/L)溶液中缓慢搅动。10 min 后浸入到 400 IU/mL 凝血酶中缓慢搅动,促进凝胶在微球表面形成一层膜,即 FG-Vanco-AB,然后将其捞出,室温风干,称量包裹后的微球重量。增重比率(%) = (包裹后微球质量 - 包裹前微球质量)/包裹前微球质量 × 100%。

1.3 FG-Vanco-AB 的体外释放

将上述不同浓度纤维蛋白包裹的微球 15 mg 放置在 10 mL 体积的 DMEM/F-12 培养基(美国 Hyclone 公司)中,于 37 ℃恒温箱中每天更换液体,收集培养基,以 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液在高效液相色谱仪上测定万古霉素浓度。

1.4 毒性试验

抽取体质量为 25 kg 雄性山羊(第三军医大学动物中心提供)髂骨骨髓 10 mL,按照文献[1]方法获取山羊间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSCs)。取第 3 代 MSCs,以 2×10^4/mL 的密度接种到 24 孔板中,每孔加入已收集的经不同浓度纤维蛋白包裹的微球缓释液 1 mL,以普通培养基作为对照,观察 MSCs 的生长情况。在培养后 1、3、5 和 7 d,各组选取 3 孔,用 PBS 溶液洗 3 次,加入 1 mL 普通培养基,加入 100 μl 的 CCK-8 kit(日本 Dojindo Lab 公司)液体,在 37 ℃孵育 2 h,然后取 100 μl 孵育液到 96 孔板,通过酶标仪在 450 nm 测得吸光度(A)值。相对存活系数(%) = (样本的 A 值/对照的 A 值) × 100%。

1.5 万古霉素的浓度与活性测定

分别将收集的样本液进行高效液相(Waters 510 泵,484 紫外检测器)分析,测得其中万古霉素的含量。具体方法为:取上清液 10 ~ 50 μl 进样,流动相为乙腈和 KH_2PO_4 溶液(0.05 mol/L),8 ∶92 混合,磷酸调 pH 值至 3.2,流速 1.0 mL/min,检测波长 236 nm。通过试管稀释法测定万古霉素对金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)最小的抑菌浓度。万古霉素被用含有 0.5 mL 附加阳离子的 M-H 肉汤连续倍加稀释。每一组试管的葡萄球菌接种物是 0.5 mL 过夜的含有 5.0×10^5/mL 菌落单位的培养基。最小抑菌浓度是在 37 ℃孵育 24 h 后能够阻止菌液混浊的最低抗生素浓度。测定最小抑菌浓度后,取每一干净试管中 0.01 mL 液体铺在血液琼脂平皿上。最小杀菌浓度是在 37 ℃孵育 24 h 后,使平皿上菌落数目为 10 个或是以下的抗生素的最低浓度。

1.6 统计学处理

数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,运用 SPSS 10.0 软件,采用单因素方差分析及 LSD 法,$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 缓释微球的性状

万古霉素藻酸盐溶液在氯化钙溶液中可形成浅白色的球状物,随着时间延长,微球颜色逐渐加深,变成乳白色,球体的硬度增加。球体的大小主要取决于滴注的藻酸盐液滴的大小。本研究中藻酸盐微球的大小在 5 mm 左右,冻干后藻酸盐微球的体积明显减小,缩减至大约 3 mm。被纤维蛋白凝胶包裹后的藻酸盐万古霉素微球体积无明显变化,经 0、30、60、75 和 90 mg/mL纤维蛋白溶液浸泡,再经凝血酶塑形而形成通透膜包裹的微球的增重比率分别为(-0.27 ± 3.65)%、(3.53 ± 2.03)%、(6.17 ± 2.22)%、(8.34 ± 2.09)%、(8.79 ± 2.00)%,表面变得更光滑。

2.2 藻酸盐微球中万古霉素的含量

在混合液中万古霉素浓度相同的条件下,随着藻酸盐溶液浓度的升高,最后成形的微球中万古霉素的含量逐渐增加。起始藻酸盐溶液达到 16% 时所制备的微球中万古霉素的含量最高,至 20% 时开始减低。在藻酸盐浓度相同的条件下,微球中万古霉素的含量随着制备混合液中万古霉素浓度的增加而显著增加(图 1)。由 50 mg/mL 万古霉素和 16% 藻酸盐的混合液制备的微球,万古霉素的含量最高,达(27.36 ± 0.90)%。

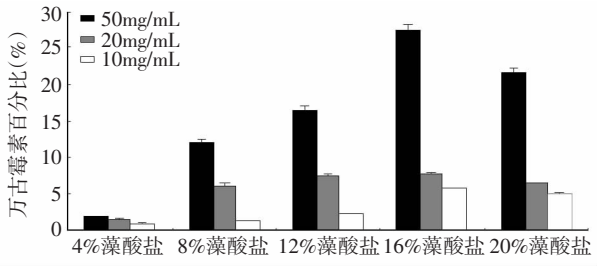


图 1 不同浓度的万古霉素和藻酸盐溶液混合后制备的微球中万古霉素的含量

2.3 FG-Vanco-AB 释放的万古霉素

万古霉素对金黄色葡萄球菌标准株(ATCC 25923)的最小抑菌浓度和杀菌浓度分别为 1.20 mg/L 和 2.10 mg/L,药物敏感的折点值为 5 mg/L。以万古霉素敏感的折点值作为最低浓度标准,放置未包裹的万古霉素藻酸盐微球的溶液中万古霉素的浓度超过此值的连续时间为 11 d,而由 30、60、75 和 90 mg/mL 纤维蛋白溶液形成包裹的 FG-Vanco-AB 溶液中,释放的万古霉素的浓度超过 5 mg/L 的时间分别为 13、17、19 和 19 d(图 2)。

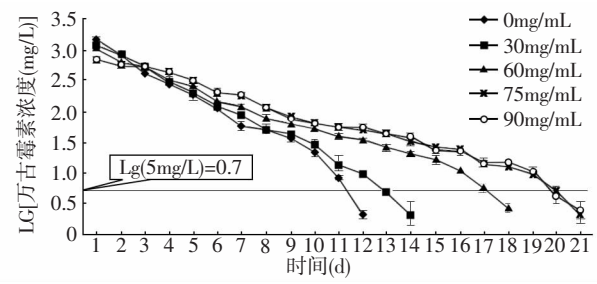


图 2 不同浓度纤维蛋白凝胶包裹的万古霉素藻酸盐微球在体外释放的万古霉素的浓度。图中横线表示对标准菌株(ATCC 25923)具有敏感杀灭作用的折点值的万古霉素的浓度(5 mg/L)

2.4 毒性试验

MSCs 在各实验组中均表现较明显的增殖趋势,细胞形态正常。各组相对生存率在培养后 1 d 均有不同程度的降低,3 d 降低较明显,5 d 至最低(各组之间差异无统计学意义);培养后

7 d 各组的相对生存率均出现不同程度的升高(图 3)。

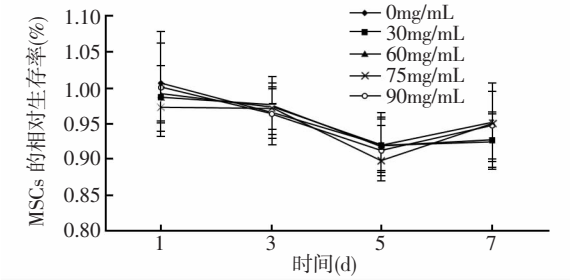


图 3 不同浓度纤维蛋白凝胶包裹的万古霉素藻酸盐微球对共培养的 MSCs 增殖的影响

3 讨论

藻酸盐是天然的可吸收材料,属于多糖类物质,主要从褐藻中提取,其主要成分为 β-D-甘露糖醛酸(M 残基)和 α-L-古洛糖醛酸(G 残基),具有优良的生物相容性和可降解特性,在钙离子溶液中即可形成热稳定凝胶,不需要高温或有机化学试剂交联,有利于其作为可溶性缓释药物的包裹材料[2-3]。目前,利用藻酸盐优良的生物学特性制备的局部抗生素控释微球已经被用于慢性骨髓炎的治疗研究,取得了较好的治疗效果[4]。但是,单纯的万古霉素藻酸盐缓释微球释放的药物达到有效治疗浓度的持续时间还不足够长[5],已有左旋多聚赖氨酸被用于包裹藻酸盐抗生素微球,其药物有效释放时间得到延长[3]。笔者设计了 FG-Vanco-AB 缓释系统,对相应的条件进行优化,万古霉素的有效释放时间较前有所延长。

大量的抗生素可供临床和实验研究使用,但是,针对目前骨组织感染的救治现状,大量的耐药菌株的出现以及藻酸盐的包裹特性,万古霉素是最佳的选择对象。万古霉素是一种糖肽类抗生素,对引起骨感染常见的革兰阳性菌具有很强的杀灭能力,其中包括金黄色葡萄球菌和表皮葡萄菌(包括耐甲氧西林菌株),以及链球菌(包括化脓性链球菌)等[6-7]。同时,万古霉素易溶于水,可同藻酸盐制成混合溶液,通过滴注形成缓释微球。万古霉素无明显的毒副作用,不像青霉素类会引起强烈的变态反应。

用于局部埋置的药物缓释包裹材料的选择应当具有以下特点:生物相容性好,降解成分可被人体吸收;载药量高,可以满足局部用药的需要;所包裹的药物释放平缓,具有较低的突释率,避免瞬间形成可引起副作用的高药物浓度。藻酸盐具有良好的生物相容性和可降解特性,已被广泛用作细胞载体和药物缓释载体[8-9]。而异体和(或)异种纤维蛋白凝胶也因为其良好的生物相容性和黏附特性在临床中得以使用。如果使用患者自身的血浆制备凝胶,则可以完全避免潜在的诱导炎症和免疫反应的危险。

在本研究中,通过调整制备微球的藻酸盐和万古霉素的起始浓度,优化筛选万古霉素含量最高的缓释微球,提高单位质量微球的载药量,可以减少局部用药时缓释载体的放置量,避免过多的外源性物质对局部组织成骨可能造成的影响。同时,通过低压冻干和表面包裹纤维蛋白凝胶,使微球的储存更为方便,并延长了万古霉素的释放时间[10]。实验结果还表明,用于包裹藻酸盐微球的纤维蛋白凝胶的两种成分纤维蛋白原和凝血酶的浓度越高,微球中万古霉素的突释越少,其释放时间越长,这同 Jeon 等[11]的研究相一致。具体原因在于形成纤维蛋白凝胶的主体是纤维蛋白原,凝血酶只是促进纤维蛋白原 3 条链当中的 2 条链 αA 和 βB 断裂,释放多肽 A 和 B,使其转化为纤维蛋白单体,相互间自发聚集形成多聚体;同时凝血酶激活 Ⅹ Ⅲ 因子,激活的Ⅹ Ⅲ 因子在 Ca^{2+} 的作用下催化各纤维蛋白单体间的第三条链 γ 的谷氨酰胺残基和赖氨酸的 ε-氨基形成共价键,最终形成网状的纤维蛋白多聚体[12]。纤维蛋白凝胶的包裹就像一层膜,纤维蛋白原的浓度越高,形成的膜越致密,孔径越小,限制了水分进入到藻酸盐微球,因而减少了万古霉素的洗脱。同时,高浓度成分形成的包裹外膜强度也高,限制了微球吸水后的膨胀,因而减慢了微球的崩解,延长了药物释放时间。凝血酶的浓度选定为 400 IU/mL,而并未进行浓度优化,主要是基于以下考虑:形成的纤维凝胶蛋白膜的致密程度和强度主要是由纤维蛋白原的浓度决定的,凝血酶只是触发反应的酶;高浓度的凝血酶(如 400 IU/mL)才可以保证在短时间内微球表面形成均匀一致的膜;缩短酶促反应时间,减少微球在溶液中浸泡的时间,避免微球中包含的药量因为浸泡而丢失。

药物缓释载体的安全性以及是否能够满足治疗需要也是本研究观察的重点。通过将不同方式处理的微球同 MSCs 共培养,观察细胞形态和活力的变化来评价其安全性,我们发现细胞的形态良好,活力轻度受抑制,体现了较好的安全性。对于缓释微球疗效的评价,主要是定时收集微球缓释的溶液并以高效液相色谱仪测定其中万古霉素浓度,以标准的 ATCC 25923 金黄色葡萄球菌株作为参照,通过测定万古霉素对其具有敏感杀灭作用的折点值,观察微球释放的万古霉素浓度可以满足杀灭金黄色葡萄球菌的时间长短。研究显示,有效的释放天数最长可达 19 d,较其他包裹方式有

Ki67、CyclinD1 和 E-cad 在皮肤鳞状细胞癌中的表达及意义

余 琦,杨江辉,李 宁 (解放军第 309 医院病理科,北京 100091)

[摘 要] **目的** 探讨 ki67、CyclinD1 和 E-cad 在皮肤鳞状细胞癌中的作用。**方法** 采用免疫组化 SP 法检测 ki67、CyclinD1 和 E-cad 在 35 例皮肤鳞状细胞癌组织的表达,并以 10 例正常皮肤组织作为对照。**结果** ki67、CyclinD1 在皮肤鳞状细胞癌组织中表达显著高于正常对照组($P<0.05$),且与肿瘤分级相关($P<0.05$);E-cad 在皮肤鳞状细胞癌组织中表达明显低于正常对照组($P<0.05$),与肿瘤分级相关($P<0.05$);ki67 与 CyclinD1 在皮肤鳞状细胞癌中表达呈正相关($r=0.551$, $P<0.05$);ki67 与 E-cad 在皮肤鳞状细胞癌中表达不相关($P>0.05$);CyclinD1 与 E-cad 在皮肤鳞状细胞癌中表达不相关($P>0.05$)。**结论** ki67 和 CyclinD1 在皮肤鳞状细胞癌中阳性表达上调;ki67、CyclinD1 和 E-cad 均与肿瘤分级相关,可以作为判断皮肤肿瘤恶性程度的指标。

[关键词] ki67;CyclinD1;E-cad;皮肤鳞状细胞癌;免疫组织化学
[中图分类号] R739.5 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2014)04-0352-03

Expression and clinical significance of Ki67, CyclinD1 and E-cad in cutaneous squamous cell carcinoma

YU Qi, YANG Jiang-hui, LI Ning (Department of Pathology, The 309th Hospital of PLA, Beijing 100091, China)

Abstract: Objective To explore the function of Ki67, CyclinD1 and E-cad in the squamous cell carcinoma(SCC). **Methods** The expression of Ki67, CyclinD1 and E-cad in 35 cases of SCC and 10 cases of normal skin tissues were detected by immunohistochemistry SP technique. **Results** The expression rates of Ki67 and CyclinD1 in SCC were higher than those in control group ($P<0.05$), and related to

doi:10.11659/jjssx.1672-5042.201404009
[收稿日期] 2014-03-12 [修回日期] 2014-03-22

所延长[3]。同时,高效液相色谱仪的应用,一方面可以提高溶液中万古霉素浓度检测的灵敏度,另一方面,根据待测物质出现峰形的时间,还可以判断是否为万古霉素而非其他物质。

总之,通过优化万古霉素和藻酸盐混合溶液的不同比例,筛选高含量的万古霉素藻酸盐微球。再通过调整包裹万古霉素藻酸盐微球的纤维蛋白凝胶的构成成分纤维蛋白原的浓度,筛选万古霉素缓释时间长的微球,在此基础上进一步检测其对共培养细胞的毒性和对标准菌株的活性。结果显示 FG-Vanco-AB 释放的万古霉素浓度体外达到可杀灭标准菌株的时间为 19 d,对共培养细胞增殖影响微弱,提示其在骨科抗感染治疗中具有潜在的应用价值。

[参考文献]

[1] 侯天勇,罗 飞,许建中. 山羊骨髓间充质干细胞的分离培养及鉴定[J]. 局解手术学杂志,2008,17(6):376 - 378.
[2] Keshaw H, Forbes A, Day RM. Release of angiogenic growth factors from cells encapsulated in alginate beads with bioactive glass[J]. Biomaterials, 2005, 26(19): 4171 - 4179.
[3] Ueng SW, Lee SS, Lin SS, et al. Biodegradable alginate antibiotic beads [J]. Clin Orthop Relat Res, 2000, (380): 250 - 259.
[4] Xing J, Hou T, Luobu B, et al. Anti-Infection Tissue Engineering Construct Treating Osteomyelitis in Rabbit Tibia[J]. Tissue Eng Part A, 2013, 19(1 - 2): 255 - 263.
[5] Chun KH, Kwon IC, Kim YH, et al. Preparation of sodium alginate microperes containing hydrophilic β-lactam antibiotics[J]. Arch Pharm Res, 1996, 19(1): 106 - 111.
[6] Mckee MD, Wild LM, Schemitsch EH, et al. The use of an antibiotic-impregnated, osteoconductive, bioabsorbable bone substitute in the treatment of infected long bone defects: early results of a prospective trial [J]. J Orthop Trauma, 2002, 16(9): 622 - 627.
[7] Calhoun JH, Mader JT. Treatment of osteomylitis with a biodegradable antibiotic implant[J]. Clin Orthop Relat Res, 1997, (341): 206 - 214.
[8] Mehlhorn AT, Schmal H, Kaiser S, et al. Mesenchymal stem cells maintain TGF-beta mediated chondrogenic phenotype in alginate bead culture [J]. Tissue Eng, 2006, 12(6): 1393 - 1403.
[9] Mierisch CM, Cohen SB, Jordan LC, et al. Transforming growth factor-beta in calcium alginate beads for the treatment of articular cartilage defects in the rabbit[J]. Arthroscopy, 2002, 18(8): 892 - 900.
[10] Esquisabel A, Hernández RM, Igartua M, et al. Production of BCG alginate-PLL microcapsules by emulsification/internal gelation[J]. J Microencapsul, 1997, 14(5): 627 - 638.
[11] Jeon O, Ryu SH, Chung JH, et al. Control of basic fibroblast growth factor release from fibrin gel with heparin and concentrations of fibrinpgen and thrombin[J]. J Control Release, 2005, 105(3): 249 - 259.
[12] Sakiyama-Elbert SE, Hubbell JA. Development of fibrin derivatives for controlled release of heparin-binding growth factors[J]. J Control Release, 2000, 65(3): 389 - 402.

(编辑:雷 艳)