骨科学

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000591

抗感染生物活性骨组织工程支架研究进展

曹治东[1]，蒋电明[2]

（1. 重庆市第四人民医院/重庆市急救医学研究所骨科，重庆 400014；2. 重庆医科大学附属第一医院骨科，重庆 400016）

【摘 要】通过查阅载抗感染药物骨组织工程支架方面的国内外相关文献，按所载抗骨感染药物分类，从制备工艺、药物释放特点及体内体外抗感染效果等方面进行总结分析。结果发现目前已成功制备载大部分抗骨感染药物的三维骨组织工程支架，体内体外实验证实均能成功释放药物，并具有较好抗感染效果，但为了临床应用仍需要进一步深入研究。

【关键词】骨组织工程；支架；药物释放系统；骨髓炎

【中图分类号】R681.2 【文献标志码】A 【收稿日期】2014-08-25

Research progress on anti-microbial drug loaded bone tissue engineering scaffolds

Cao Zhidong[1], *Jiang Dianming*[2]

(*1. Department of Orthopedics, the Forth People's Hospital of Chongqing/ the Emergency Medical Research Institute of Chongqing; 2. Department of Orthopedics, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University*)

【Abstract】Literatures about anti-microbial drugs loaded bone tissue engineering(TE) scaffold were classified according to loaded drug and were extensively reviewed. Processing techniques, feature of drug delivery and anti-infection effect of bone and joint were analyzed. By doing that, we found most of anti-microbial drug loaded bone TE was fabricated successfully currently as an ideal antibiotics delivery system and repair system of bone defects. Kinematics of drug release were detected and anti-microbial effects were demonstrated by *in vitro* and *in vivo* experiments. It becomes clear that there have been continued advances, particularly in recent years, however, to the further development of the field, more deep-going researches are necessary prior to clinical application.

【Key words】bone tissue engineering; scaffold; drug-delivery system; osteomylitis

局部释放药物可以减少全身用药带来的副作用和中毒反应，其在治疗靶点局部可以达到较高的有效浓度[1]。而且局部药物控释系统还有助于提高药物生物利用率，因为其可以被设计成在需要的部位按特定的速率释放药物分子，并可以按要求设定释放时间[2]。特定药物的释放速率和方式是由其载体材料、药物类别和清除率决定的[3-4]。已有文献报道通过组织工程支架缓释特定抗生素以重建骨缺损同时局部释放抗生素，控制感染，能获得不错的效果[5-6]。本文就抗感染的生物活性固体材料及其三维形态的支架结构研究进展进行综述。

作者介绍：曹治东，Email：czd2445@sina.com，研究方向：创伤骨科、关节外科及骨组织工程。

通信作者：蒋电明，Email：czd2445@sina.com。

基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：81171685）。

优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150403.0924.012.html（2015-04-03）

1 抗生素的控制性释放

感染被定义为宿主组织与微生物局部浓度之间的平衡被打破，一般认为体内微生物超过 10^5 个每克组织或有 β-溶血性链球菌的存在即被认为存在感染[3]。伤口感染处理的宗旨就是降低伤口细菌载荷到不影响伤口愈合的水平。如果药物释放得太快，整个药物在感染被控制之前就被提前释放完了。相反，如果药物释放太慢，则感染会进一步加重，从而影响伤口愈合[7]。细菌感染一直是影响医学内植物和支架材料使用寿命的主要问题所在[8]。器械相关的感染是由于细菌黏附及随后在内植物部位形成生物膜所导致的。抑制细菌黏附通常被认为是防止感染最关键的措施。在内植物表面存在生物材料整合入周围组织与细菌黏附到材料表面的竞争。因此，只有在主要细菌黏附之前材料与周围组织整合完成才能

避免内植物被细菌占领，这样才能确保内植物植入成功[9]。而且某些菌属能附着在内植物表面并形成生物膜，其对宿主的免疫系统和抗生素都有极高的抵抗力，这种生物膜被认为是内植物感染的主要原因[10]。理想的局部抗生素释放应该具有较高的初始释放率，以应对初期打击导致的高感染风险，继而应该具有持续的有效浓度释放能力，以抑制潜在感染[3]。目前在清创祛除死骨后最常用于治疗慢性骨髓炎的抗生素载体是聚甲基丙烯酸甲酯（polymethyl methacrylate，PMMA）珠[11-12]。但是 PMMA 不可吸收，必须二次手术取出[12]。作为第一个多功能可吸收内植物的尝试，Queiroz 等[13]使用羟基磷灰石（hydro apatite，HA）和玻璃增强的 HA 复合体吸收氨比西林钠用于牙周炎治疗，获得成功。磷酸钙水泥（calcium phosphate cement，CPC）—壳聚糖复合体被报道用于释放一种头孢菌素——氟氧头孢，其对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（methicillin-resistant staphylococcus aureus，MRSA）有较强的作用[14]。通过文献分析，目前研究主要集中在将特定抗菌药用于三维生物学骨组织工程支架。

1.1 庆大霉素

庆大霉素是广谱抗生素，经常应用于创伤和骨髓炎治疗[15]，大部分引起慢性骨髓炎的细菌都对庆大霉素敏感，其已经被载入几种生物支架里评估材料释药能力。Zhang 等[16]通过热导相分离技术制备了磷酸钙颗粒加强的大孔径的壳聚糖支架，通过浸泡于含药磷酸盐缓冲液里而载入硫酸庆大霉素。体外测试表明，同载硫酸庆大霉素的纯壳聚糖支架相比，加入磷酸钙颗粒可以使其初期突释降低，持续释放超过 3 个星期。电镜扫描显示成骨细胞生长在纯壳聚糖材料上和复合材料上没有明显的形态学差异。细胞可在其上附着和迁移，显示其具有良好的细胞相容性[16,11]。Li 等[17]通过制备载庆大霉素介孔生物玻璃证明介孔结构因为具有更大表面积从而使得其载药量明显增加。动物实验证实其药物有效释放超过 6 天，且能明显抑制金葡菌和表皮葡萄球菌的粘附和生物膜形成。Zhu 等[18]比较了 2 种生物活性硅酸盐玻璃支架[介孔生物玻璃（mesoporous bioactive glass，MBG）和生物玻璃支架（bioactive glasses，BG）]的体外局部药物释放。2 种支架都是通过聚氨酯发泡法制得，但 MBG 支架加入了表面活性剂。支架被浸泡入含庆大霉素的 PBS 溶液里，以使其载入药物。结果表明：介孔结构在载药能力和药物释放方面均发挥了重要作用。MBG 支架的摄药能力是普通 BG 支架的两倍还要多，但 MBG 支架的释放速率要明显低于 BG 支架，MBG 支架具有更长的药物持续释放时间。具有药物释放能力的组织工程支架的最新设计由 Shi 等于 2009 年提出。其用介孔硅酸盐-HA（hexagonal mesoporous silica-hydroxyapatite，HMS-HA）复合体颗粒填充于 PLGA 微球中而制得。HMS-HA 颗粒是用十二烷胺作为模板而制得，载庆大霉素（GS）的 PLGA 微球使用双倍乳剂的溶剂蒸发法而制得。PLGA/HMS-HA-GS 的复合体微球是使用单乳剂的溶剂蒸发法制得。PLGA 或 PLGA/HMS-HA-GS 微球烧结支架是先将 PLGA 或 PLGA/HMS-HA-GS 微球灌注于圆柱形模具中，再 70 ℃烧结 2 h 而制得。结果显示 PLGA/HMS-HA 支架中 HA 的存在能够缓冲由于 PLGA 酸性降解导致的 pH 值降低。而且 HMS-HA 可以提高 PLGA 的细胞相容性和生物活性。PLGA/HMS-HA 支架的压缩强度和弹性模量较纯 PLGA 支架明显提高，其力学特性近似于人类松质骨。PLGA/HMS-HA 支架体外药物释放检测提示 PLGA 可以降低 HMS-HA 颗粒里硫酸庆大霉素的释放速率，其总释放时间可以达到近 1 个月[19]。

1.2 四环素

四环素被加入由聚乙酸内酯（polycaprolactone，PCL）和 HA 粉剂组成的混合涂层里，并通过浸涂和溶剂浇筑法涂层于 HA 多孔骨材料表面[20]。体外于 PBS 液中测得的药物释放提示其药物释放总量由涂层次数、最初的载药量决定，在前 2 h 发生的突释后开始持续释放过程。Domingues 等[21]介绍了由四环素与 β-环糊精按 1:1 摩尔比例组成的包合体，再通过溶胶-凝胶技术制成生物玻璃（BG）。四环素/β-环糊精包合体通过冰冻干燥，分别制备盐酸四环素和四环素/β-环糊精包合体，并加入溶胶-凝胶溶液里制成相应的载药硅酸盐生物玻璃。体外观察到 12%的初始突释率，持续释放 80 d，最终可达到 22%~25%的总释放率。体内实验证实载四环素的 BG 和载四环素/β-环糊精的 BG 均具有明显的抑菌活动。环糊精的存在非常重要，其可减慢四环素的释放从而使其达到持续长时间的释放，并且证实四环素及其包合体并不会影响生物玻璃的生物活性。

1.3 万古霉素

最近 Cabañas 等[22]将万古霉素———一种加热易降解的药物通过冻干和 37 ℃干燥 2 种方法复合入 β-磷酸钙（β-TCP）/琼脂糖支架里。发现冻干的样品较 37 ℃干燥的样品具有更高的孔隙率，其纤维结构与人类松质骨结构类似。另外其不同的孔隙结构和复合体的构造都会导致不同的药物释放模式。

1.4 多黏菌素-B

多黏菌素-B 是个多肽类的抗生素，其超过 60 ℃就会失效。正是考虑到这个局限，Kimakhe 等尝试制备多功能的无机物支架作为具有生物活性的药物释放载体。多黏菌素-B 采用高速动态加压法（25 m/s 和 50 m/s）而不加热导入磷酸钙粉末里，这种加压方法不会导致多黏菌素-B 任何结构和生物学功能改变。在体外 25 m/s 组在孵化 2~3 d 后开始释放多黏菌素-B，而 50 m/s 组在 5 d 后才开始释药[23]。

1.5 喹诺酮类

也有报道将喹诺酮用于局部药物释放系统治疗骨感染显示了较好的效果，这些载体包括 HA-阴离子胶原蛋白[24]、生物可降解聚合物及其与磷酸钙复合物[25-26]。通过加压浇铸

及烧结的方法可制得载加替沙星的聚乙酸内酯/β-TCP 陶瓷复合体[27]，其最大的好处是该制作过程中无溶剂，这样加替沙星的杀菌活性得以保留。通过体外实验观察到其释药达 4 周，并对米勒链球菌及脆弱拟杆菌保持至少 1 周的杀菌活性。在兔下颌骨制作米勒链球菌及脆弱拟杆菌感染的骨髓炎模型，通过体内实验证实载加替沙星的聚乙酸内酯/β-TCP 陶瓷复合体对清创后遗留的感染性骨缺损有治疗效果，4 周后在复合材料表面观察到新骨形成。并且 50 周后在聚乙酸内酯与 β-TCP 之间的界面可见骨长入和血管形成。另外检测到加替沙星在血浆和软组织里的浓度非常低，表明这种情况下其具有极低的全身毒性。环丙沙星是使用最广泛的氟代喹诺酮类抗生素，其在治疗骨感染时具有较低的最低抑菌浓度（0.25~2.00 μg/ml）。环丙沙星已被用于与生物陶瓷及其聚合物复合，如：环丙沙星载入由 HA、TCP（tricalcium phosphate，TCP）及消旋聚乳酸（poly lactic acid，PLA）组成的复合物用于治疗骨多重感染，其要求骨局部较长时间保留较高抗生素浓度（40%）[28]，该复合物的制备需先混合各组分，再使用液压单轴加压。体外实验表明其药物释放率与 PLA/磷酸钙比例、载药量及制备时的压力呈正相关。体内实验观察到骨局部药物浓度始终高于最低抑菌浓度，其对大部分引起骨髓炎的致病菌均有效。体内体外实验结果相符。但是最后 20%环丙沙星的释放体内则快于体外，这是因为材料里新形成的血管对其释放有促进作用。

1.6 无机银离子

氧化状态的银离子具有抗菌作用，其已经被用于骨组织工程支架里[29]。尽管银离子的抗菌活性已经被证实[29-30]，但其抗菌机制并未被完全了解。已经知道银离子可以通过多种方式作用于细菌细胞：其可以结合到细菌的 DNA，阻止细菌复制。还可以结合到细菌酶的硫基团上从而抑制细菌的呼吸活动及细菌内外的物质交换。正是由于作用机制复杂使得很少有细菌对银离子产生耐药[30]。银离子的抗菌谱较宽，已证实其对内植物或支架部位可能存在的细菌均有效，包括金黄色葡萄球菌[31]。

最新的进展是将银离子加入骨组织工程支架里，早期的研究将银离子通过一个获得专利的离子交换过程附着在生物活性的三维陶瓷-玻璃支架表面[32]。材料表面的银离子含量及其通过离子交换层的扩散特性使用离子交换参数测量而获得（温度、时间及熔融池银离子浓度）。结果发现可以通过调节反应过程的参数，从而在保证不改变支架结构及其特性的条件下控制银离子复合到支架材料表层的过程。Marsich 等将纳米银离子复合入纳米复合支架里观察到明显的抗菌活性。其通过冻干、内源乳化获得藻朊酸盐/HA 多孔复合支架，支架通过静电吸收乳糖修饰的壳聚糖纳米银颗粒。银离子的吸收和释放通过等离子体发射光谱及荧光光谱测定法进行定量。微型 CT 分析显示该支架具有均匀的孔隙结构，平均孔径为 341.5 μm，孔隙率达 80%。体外实验证实释放的银离子不会影响支架成骨作用，同时其对革兰阳性和革兰阴性细菌均有极强的抗菌活性[33]。

2 结论与展望

总之，在治疗骨感染领域，骨组织工程及药物缓释系统均取得了重要的进展，但目前这方面的研究和文献还是太少。通过分析文献知道目前尚缺乏关于局部微环境条件下到底需要多大的给药浓度，支架与新生组织之间的相互作用对其有什么影响以及哪些因素可以影响局部血管形成，如何根据实际应用精确控制药物释放的时间及空间和药物释放模式的相关研究。除此之外，关于支架加工及消毒参数如何影响所载药物的均匀性、稳定性及释放动力学的研究也鲜有报道。很明显，通过先进的三维支架的概念可达到局部药物释放和组织工程的完美结合，但其发展尚处于初级阶段，还需要时间才能达到满意的临床效果。因此，可以预见未来几年该领域仍会继续进展，相关的研究会逐渐转向骨相关疾病的临床研究。为了达到这个目的，提高来自于不同领域的科研人员的通力合作非常重要。组织工程的学科交叉特点是骨组织工程治疗学发展必不可少的，应允许不同科学领域、背景对其的影响。

参 考 文 献

[1] Tan HL，Lin WT，Tang TT.The use of antimicrobial-impregnated PMMA to manage periprosthetic infections：controversial issues and the latest developments[J]. Int J Artif Organs，2012，35(10)：832-839.

[2] Babu RJ，Sathigari S，Kumar MT，et al.Formulation of controlled release gellan gum macro beads of amoxicillin[J].Curr Drug Deliv，2010，7(1)：36-43.

[3] Elsner JJ，Egozi D，Ullmann Y，et al.Novel biodegradable composite wound dressings with controlled release of antibiotics：results in a guinea pig burn model[J].Burns，2011，37(5)：896-904.

[4] Baroli B. From natural bone grafts to tissue engineering therapeutics：Brainstorming on pharmaceutical formulative requirements and challenges[J].J Pharm Sci，2009，98(4)：1317-1375.

[5] Dorj B，Won JE，Purevdorj O，et al.A novel therapeutic design of microporous-structured biopolymer scaffolds for drug loading and delivery[J].Acta Biomater，2014，10(3)：1238-1250.

[6] Qi R，Guo R，Zheng F，et al.Controlled release and antibacterial activity of antibiotic-loaded electrospun halloysite/poly(lactic-co-glycolic acid) composite nanofibers[J].Colloids Surf B Biointerfaces，2013(110)：148-155.

[7] 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.

[8] Yin JM,Liu ZT,Zhao SC,et al.Diagnosis,management,and prevention of prosthetic joint infections[J].Front Biosci(Landmark Ed),2013(18):1349-1357.

[9] Gristina AG,Naylor PT,Myrvik QN.Mechanisms of musculoskeletal sepsis[J].Orthop Clin North Am,1991,22(3):363-371.

[10] Osmon DR,Berbari EF,Berendt AR,et al.Infectious Diseases Society of America.Diagnosis and management of prosthetic joint infection:clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America[J]. Clin Infect Dis,2013,56(1):e1-e25.

[11] Snir N,Meron-Sudai S,Deshmukh AJ,et al.Antimicrobial properties and elution kinetics of linezolid from polymethylmethacrylate[J].Orthopedics,2013,36(11):e1412-1427.

[12] Barth RE,Vogely HC,Hoepelman AI,et al.'To bead or not to bead?' Treatment of osteomyelitis and prosthetic joint-associated infections with gentamicin bead chains[J].Int J Antimicrob Agents,2011,38(5):371-375.

[13] Queiroz AC,Santos JD,Monteiro FJ,et al.Adsorption and release studies of sodium ampicillin from hydroxyapatite and glass-reinforced hydroxyapatite composites[J].Biomaterials,2001,22(11):1393-1400.

[14] Takechi M,Miyamoto Y,Momota Y,et al.The in vitro antibiotic release from anti-washout apatite cement using chitosan[J].J Mater Sci Mater Med,2002,13(10):973-978.

[15] Chen C,Chen Y,Wu P,et al.Update on new medicinal applications of gentamicin:evidence-based review[J].J Formos Med Assoc,2014,113(2):72-82.

[16] Zhang Y,Zhang M.Calcium phosphate/chitosan composite scaffolds for controlled in vitro antibiotic drug release[J].J Biomed Mater Res,2002,62(3):378-386.

[17] Li Y,Liu YZ,Long T,et al.Mesoporous bioactive glass as a drug delivery system:fabrication,bactericidal properties and biocompatibility [J].J Mater Sci Mater Med,2013,24(8):1951-1961.

[18] Zhu Y,Kaskel S.Comparison of the in vitro bioactivity and drug release property of mesoporous bioactive glasses(MBGs) and bioactive glasses(BGs) scaffolds[J].Microporous Mesoporous Mater,2009,118(6):176 - 182.

[19] Shi X,Wang Y,Ren L,et al.Novel mesoporous silica-based antibiotic releasing scaffold for bone repair[J].Acta Biomater,2009,5(5):1697-1707.

[20] Misra R,Sahoo SK.Antibacterial activity of doxycycline-loaded nanoparticles[J].Methods Enzymol,2012(509):61-85.

[21] Domingues ZR,Cortés ME,Gomes TA,et al.Bioactive glass as a drug delivery system of tetracycline and tetracycline associated with beta-cyclodextrin[J].Biomaterials,2004,25(2):327-333.

[22] Cabañas MV,Peña J,Román J,et al.Tailoring vancomycin release from beta-TCP/agarose scaffolds[J].Eur J Pharm Sci,2009,37(3-4):249-256.

[23] Kimakhe S,Bohic S,Larrose C,et al.Biological activities of sustained polymyxin B release from calcium phosphate biomaterial prepared by dynamic compaction:an in vitro study[J].J Biomed Mater Res,1999,47(1):18-27.

[24] Fürstenberg CH,Wiedenh fer B,Putz C,et al.Collagen hydroxyapatite(Healos) saturated with gentamicin or levofloxacin.In vitro antimicrobial effectiveness-a pilot study[J].Orthopade,2010,39(4):437-443.

[25] Jannesari M,Varshosaz J,Morshed M,et al.Composite poly(vinyl alcohol)/poly(vinyl acetate) electrospun nanofibrous mats as a novel wound dressing matrix for controlled release of drugs[J].Int J Nanomedicine,2011(6):993-1003.

[26] Tamazawa G,Ito A,Miyai T,et al.Gatifloxacine-loaded PLGA and β-tricalcium phosphate composite for treating osteomyelitis[J].Dent Mater J,2011,30(3):264-273.

[27] Soundrapandian C,Datta S,Kundu B,et al.Porous bioactive glass scaffolds for local drug delivery in osteomyelitis:development and in vitro characterization[J].AAPS PharmSciTech,2010,11(4):1675-1683.

[28] Ahola N,Männistö N,Veiranto M,et al.An in vitro study of composites of poly(L-lactide-co-ε-caprolactone),β-tricalcium phosphate and ciprofloxacinintended for local treatment of osteomyelitis[J].Biomatter,2013,3(2):e23162.

[29] Balagna C,Vitale-Brovarone C,Miola M,et al.Biocompatibility and antibacterial effect of silver doped 3D-glass-ceramic scaffolds for bone grafting[J].J Biomater Appl,2011,25(6):595-617.

[30] Chernousova S,Epple M.Silver as antibacterial agent:ion,nanoparticle,and metal[J].Angew Chem Int Ed Engl,2013,52(6):1636-1653.

[31] You C,Han C,Wang X,et al.The progress of silver nanoparticles in the antibacterial mechanism,clinical application and cytotoxicity[J].Mol Biol Rep,2012,39(9):9193-9201.

[32] Verné E,Miola M,Vitale Brovarone C,et al.Surface silver-doping of biocompatible glass to induce antibacterial properties.Part I:Massive glass[J].J Mater Sci Mater Med,2009,20(3):733-740.

[33] Marsich E,Bellomo F,Turco G,et al.Nano-composite scaffolds for bone tissue engineering containing silver nanoparticles:preparation,characterization and biological properties[J].J Mater Sci Mater Med,2013,24(7):1799-1807.

（责任编辑：唐宗顺）