

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.08.007

载药微球联合 BMP-2 治疗兔慢性骨髓炎的实验研究*

向柄彦,郭 元

(1. 贵州省遵义市第一人民医院骨科 563000;2. 河北省玉田县医院骨科 064100)

[摘要] **目的** 探讨载药纳米羟基磷灰石/壳聚糖(n-HA/CS)新型植入材料治疗慢性骨髓炎的可行性。**方法** 将 60 只健康新西兰大白兔分为 4 组构建骨髓炎模型,按以下方法植入材料,A 组:不做任何处理;B 组:单纯 n-HA/CS 支架材料;C 组:n-HA/CS 载万古霉素脂质体种植体;D 组:n-HA/CS 载万古霉素脂质体种植体与 BMP-2。8 周后通过细菌培养及组织病理学检测,评价其抗感染能力及修复骨缺损的能力。**结果** 载药 n-HA/CS 人工植入材料能够释放高浓度的抗菌药物;植入载药 n-HA/CS 联合 BMP-2 可有效控制骨感染并促进骨组织的修复;治疗效果明显优于单纯载药 n-HA/CS 材料组及单纯 n-HA/CS 材料组。**结论** 载药 n-HA/CS 联合 BMP-2 是治疗兔慢性骨髓炎的较为理想的植入材料。

[关键词] 羟基磷灰石/壳聚糖支架;慢性骨髓炎;BMP-2

[中图分类号] R68 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2015)08-1032-03

Experimental study on the drug loaded microspheres combined with BMP-2 in the treatment of chronic osteomyelitis in rabbits*

Xiang Bingyan,Guo Yuan

(1. Department of Orthopedics, the First People's Hospital of Zunyi, Zunyi, Guizhou 563000, China;
2. Department of Orthopedics, Hospital of Yutian County of Hebei Province 064100, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the anti-infection and bone repair effects of cationic liposome-encapsulated vancomycin combined with the nano-hydroxyapatite/chitosan(n-HA/CS) composite scaffold in vivo. **Methods** Sixty 6-month-old New Zealand white rabbits, weighing 2.5 kg, were selected to prepare chronic infectious tibia bone defect model by using Staphylococcus aureus. After 4 weeks, 60 survival rabbits were randomly divided into 4 groups($n=15$). After debridement, defect was treated with nothing in group A, with n-HA/CS composite scaffold in group B, with vancomycin and n-HA/CS composite scaffold in group C, and with cationic liposome-encapsulated vancomycin and n-HA/CS composite scaffold in group D. After 8 weeks of treatment, general observation, X-ray, HE staining. **Results** At 4 weeks after modeling, 60 rabbits were diagnosed as having osteomyelitis, including periosteal new bone formation, destruction of bone, and soft tissue swelling. At 8 weeks after treatment, sinus healed in group C and D, but sinus was observed in group A and B; the gross bone pathological scores of group D were significantly better than those of group A and B($P<0.05$). Bone defects were repaired completely in group D, the results of the longest diameter of bone defects in group D was significantly better than those in the other 3 groups ($P<0.05$). New bone formation was observed in group C and D, but periosteal reaction and marrow low-density shadow were observed in group A and B; Nordin score in group D was significantly better than those in group A, B, and C($P<0.05$). HE staining showed that there were a large number of trabecular bone formation and fibrosis, with no obvious signs of infection in group C and D, but neutrophil accumulation was observed in group A and B; Smeltzer in group C and D were significantly better than those in group A and B($P<0.05$). Bacteriological results showed higher negative rate in group C and D than in groups A and B($P<0.05$). **Conclusion** Cationic liposome-encapsulated vancomycin and n-HA/CS composite scaffold can be a good treatment for infectious bone defects in rabbits, providing a new strategy for the therapy of bone defects in chronic infection.

[Key words] nano-hydroxyapatite/chitosan glucosaminoglycan scaffold; cationic liposome vancomycin infected bone defect; BMP-2

随着骨科手术技术的发展及抗菌药物的不断更新换代,骨髓炎的治疗取得了不断进步,但慢性感染性骨缺损是骨科医师致力解决的难题。目前,局部应用聚甲基丙烯酸甲酯庆大霉素珠链不能降解,需二次手术取出,并能为病原菌的生长提供适宜的生长环境,造成感染复发^[1-3]。随着生物组织工程的不断发展,研究发现人工合成的羟基磷灰石(hydroxyapatite, HP)与壳聚糖(chitosan, CS)的理化性质、结构与人体本身的性状基本相同,且无毒副作用。本研究在治疗慢性骨髓炎的前期实验基础上,拟构建纳米羟基磷灰石复合胶原/壳聚糖(nano-

hydroxyapatite/chitosan glucosaminoglycan scaffold, n-HA/CS)复合万古霉素脂质体载药微球并联合 BMP-2,构建新型治疗感染性骨缺损的新型载药缓释系统,最后联合 BMP-2 植入兔慢性骨髓炎模型体内,从组织工程学角度探讨其修复慢性感染性骨缺损的可行性,欲为今后临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料 健康新西兰大白兔 60 只[许可证号: SCXK(渝)2012-0005], 5~6 月龄,雌雄不限,体质量(2.5±

* 基金项目:遵义市科学技术局联合基金资助项目(2013-1)。 作者简介:向柄彦(1978-),副主任医师,硕士,主要从事骨关节创伤外科的研究。

0.2)kg,第三军医大学大坪医院实验动物中心提供。纳米羟基磷灰石、壳聚糖(山东潍坊市海之源生物公司,中国);万古霉素(华北制药有限公司,中国);冷冻干燥机(Thermo 公司,美国);切片机(Leica 公司,德国)。金黄色葡萄球菌 ATCC29210 由遵义市第一人民医院检验科惠赠。BMP-2/PLA 和万古霉素/PLA 缓释微球由前期实验制作。

1.2 实验方法

1.2.1 细菌培养 在无菌操作台上,将金黄色葡萄球菌接种于金黄色葡萄球菌固体培养基,37℃培养箱过夜培养。挑取单个菌落接种于 MH 液体培养基中,振荡培养过夜,并于 530 nm 处测定菌液的吸光度值,计算菌液浓度。将测定的菌液用液体培养基稀释至 1×10^8 cfu/mL,4℃保存。

1.2.2 载药组织支架材料的制备 根据 Ma 等^[4]等方法将壳聚糖溶液、纳米羟基磷灰石适当比例混合,倒入准备好的铸模槽,通过冻干技术与化学交联方法制备成固体材料,并进入含有 BMP-2/PLA 和万古霉素/PLA 缓释微球溶液中,-80℃冷冻 2 h 后放入真空冷冻干燥机内干燥 12 h,用钴-60(⁶⁰CO)辐照消毒备用。采用扫描电子显微镜检测观察空隙形状,用万能材料试验机检测支架材料的抗压能力,观察是否符合实验要求。将制备成功的固体材料置于 4℃冰箱保存。

1.2.3 慢性骨髓炎模型的构建 将新西兰大白兔称重后,予以 1%戊巴比妥经耳缘静脉麻醉,剪除左胫骨上端毛发,固定于操作台上,常规消毒铺巾后,于左侧胫骨近端切口,逐层分离至骨膜,3 mm 克氏针钻孔至髓腔,依次注入 5%甘油酸钠 0.1 mL, 1×10^8 cfu/mL 金黄色葡萄球菌液 0.1 mL 骨蜡封闭缺口。无菌生理盐水冲洗伤口,逐层缝合。术后不应用抗菌药物,肢体不制动,单独饲养,标准进食,4 周后行大体观察及左下肢 X 线片检查以确定造模是否成功。

1.2.4 实验分组及方法 建模成功后分为 4 组,A 组:空白对照组不做任何处理;B 组:单纯 n-HA/CS 支架材料;C 组:n-HA/CS 载万古霉素脂质体种植体;D 组:n-HA/CS 载万古霉素脂质体与 BMP-2 种植体。8 周后行左胫骨 X 线片并进行胫骨病理学检测。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件进行数据分析,所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异显著性检验采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 支架材料的电子显微镜扫描及生物力学测试 支架材料经电子显微镜扫描后呈现出丰富的不规则多孔结构,各孔之间相通性好,孔径大小为 80~270 μm,平均孔径为 146.53 μm;弹性模量为 27.50 MPa,压缩强度为 (0.75 ± 0.04) MPa,见图 1、2。

2.2 慢性骨髓炎动物模型的鉴定 造模 4 周后,左侧胫骨近端皮肤红肿并伴脓肿及窦道形成。X 线片提示不同程度的低密度影,新骨形成及骨膜反应,见图 3、4。

2.3 治疗 8 周后 X 线检测 治疗 8 周后,A 组和 B 组胫骨近端仍见低密度影,骨膜反应;C 组和 D 组可见新骨形成,未见明显的骨膜反应,说明植入本实验制作的植入材料后对慢性骨髓炎有较好的效果,见图 5。

2.4 各治疗组 Norden 评分分析 治疗 8 周拍 X 线片后进行 Norden 评分并进行统计学分析,D 组 Norden 评分明显小于其余 3 组,差异有统计学意义($P < 0.05$);C 组明显小于 A、B 组,差异有统计学意义($P < 0.05$);A 组与 B 组比较差异无统计学

意义($P > 0.05$)。见表 1。

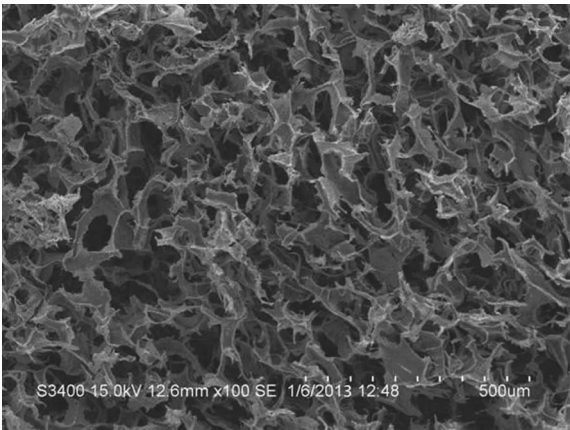


图 1 支架材料电子显微镜扫描

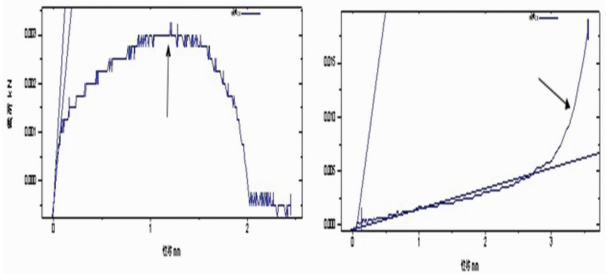


图 2 支架材料生物力学测试

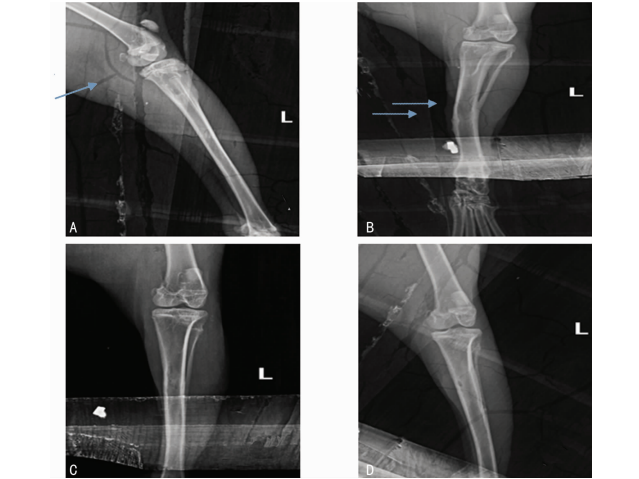


图 3 大体观察



图 4 造模 4 周后 X 线检测

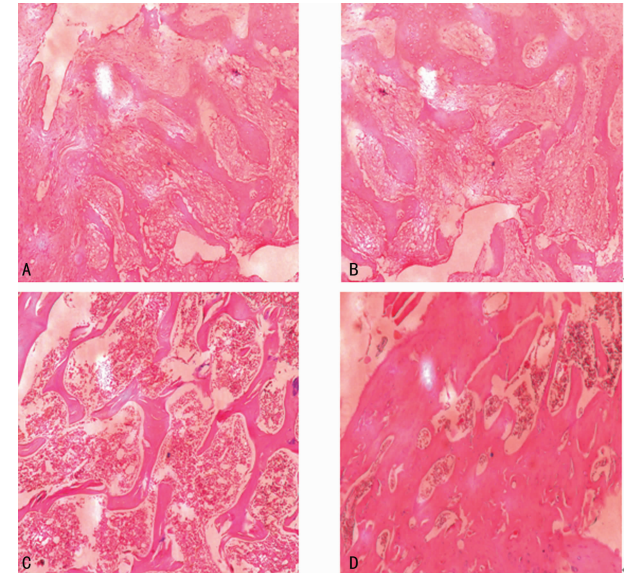
2.5 各组骨组织 HE 染色 治疗 8 周后,提取骨组织进行 HE 染色,见 A 组和 B 组骨组织有明显的中性粒细胞浸润,骨小梁紊乱、破坏;C 组及 D 组未见明显的炎性细胞浸润,骨小梁较为整齐;D 组骨小梁较 C 组粗大。见图 6。



A:不做任何处理;B:单纯 n-HAP/CS 支架材料;C:n-HAP/CS 载万古霉素脂质体种植体;D:n-HAP/CS 载万古霉素脂质体与 BMP-2 种植体。

图 5 治疗 8 周后各组 X 线检测

表 1	各组 Norden 评分结果($\bar{x}\pm s$,分)	
组别	n	Norden 评分
A 组	15	2.64±0.33
B 组	15	2.63±0.36
C 组	15	1.14±0.29
D 组	15	0.89±0.42



A:不做任何处理;B:单纯 n-HAP/CS 支架材料;C:n-HAP/CS 载万古霉素脂质体种植体;D:n-HAP/CS 载万古霉素脂质体与 BMP-2 种植体。

图 6 骨组织 HE 染色(×100)

3 讨 论

慢性骨髓炎的治疗是骨科疾病的难题。近年来,随着抗菌药物的不断升级及骨科诊疗技术的不断进步,临床对骨髓炎的

治疗不断进步,但治疗效果仍不满意。目前,慢性骨髓炎的治疗主要包括彻底清创、持续冲洗及抗菌药物的应用^[5]。长期应用抗菌药物存在多种不良反应,如胃肠道反应、耳毒性、肾毒性及骨髓抑制等。研究表明局部应用抗菌药物可达到有效的浓度并可减轻不良反应。最早应用于临床的载药植入材料是一种聚甲基丙烯酸甲酯,其在植入体内后会发热,单体成分对人体具有毒性,组织相容性差,需二次手术取出,患者创伤及经济负担重,限制了其临床应用^[6]。所以,研发新的局部抗菌药物缓释系统为慢性骨髓炎的治疗提供了新的治疗方案。

本实验通过制作符合生物力学要求的生物工程支架材料,并负载万古霉素和 BMP-2,使其在体内缓慢释放,达到有效的局部浓度,为慢性骨髓炎的治疗和骨愈合提供良好的环境。

随着生物工程及骨组织工程的不断发展,研究发现 CS 及 n-HA 均是天然材料,有良好的生物活性和理化特性,作为人体组织工程材料的应用研究已取得了一定的成果^[7]。但在 CS 和 n-HA 分别单独应用的研究中还是暴露出一定缺陷,比如机械性能弱、抗压能力弱及体内不易吸收等问题^[8]。n-HA 作为载药体具有多方面的优势:(1)无毒、生物相容性好、无刺激及免疫原性,对生物组织无损伤。(2)独特的多孔结构,巨大的比表面积及高表面活性,能黏附和传递大分子药物,并可以通过改变孔径及孔隙率来达到药物的稳定缓慢释放。(3)化学性质稳定,与许多药物无化学反应,可以做为多种药物的缓释载体。研究发现 CS 通过溶解后可释放氨基(NH₂⁺),这些氨基通过结合负电子来抑制细菌的生长。这种生物特性是 CS 在治疗慢性骨感染方面显示出了独特的优势。CS 及 n-HA 的联合应用使其各自互补,以改善各自的缺陷。

BMP-2 是经实验证实的最重要的骨诱导因子,是控制骨缺损修复的信号通路的必需成分,是目前骨组织工程研究最多和应用最广泛的生长因子^[9]。

聚乳酸具有良好的生物相容性及可降解性,最终代谢产物为水(H₂O)和二氧化碳(CO₂),是美国食品药品监督管理局(FDA)批准应用的医疗高分子可降解材料^[10]。目前,应用聚乳酸作为缓释载体制备化疗药物、激素、胰岛素、抗菌素等缓释药物取得良好的疗效,部分已应用于临床^[11-12]。鉴于上述优点,本课题选用聚乳酸作为 BMP-2 和万古霉素的缓释载体。

通过构建慢性骨髓炎模型并植入不同的植入材料,经过 8 周后,行 X 线片 A 组和 B 组胫骨近端仍见低密度影,骨膜反应;C 组和 D 组可见新骨形成,未见明显的骨膜反应;行 Norden 评分并进行统计学分析,D 组 Norden 评分明显小于其余 3 组,差异有统计学意义($P<0.05$);C 组明显小于 A、B 组,差异有统计学意义($P<0.05$);A 组与 B 组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。并进行各组骨组织的 HE 染色,A 组和 B 组骨组织有明显的中性粒细胞浸润,骨小梁紊乱、破坏;C 组及 D 组未见明显的炎性细胞浸润,骨小梁较为整齐;D 组骨小梁较 C 组粗大。

参考文献

[1] Huang HK,Chiang CC,Su YP,et al. Rote of autologous bone graft in the surgical treatment of atrophic nonunion midshaft clavicular fractures[J]. Orthopedics, 2012, 35 (2):e197-201.

[2] Sharifi D,Khoushkerdar HR,Abedi G,et al. Mechanical propeties of radial bone defects treated with autogenous graft covered with hydroxyapatite in rabbit[J]. Acta Cir Bras,2012,27(3):256-259.

(下转第 1038 页)

总之,本研究发现,细胞衰老过程中 DNA 甲基化通过调节 p21^{Waf1/Cip1} 的表达调控细胞衰老进程,p21^{Waf1/Cip1} 启动子在中年细胞中高甲基化并抑制其表达,从而发挥延缓细胞衰老的作用,而 p21^{Waf1/Cip1} 启动子去甲基化增加其表达,迅速启动细胞衰老的发生。该研究结果为认识表观遗传学对细胞衰老的调控提供了新的线索。

参考文献

- [1] Evan GI, d'Adda di Fagnana F. Cellular senescence: hot or what? [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2009, 19(1): 25-31.
- [2] D'Aquila P, Rose G, Bellizzi D, et al. Epigenetics and aging[J]. *Maturitas*, 2013, 74(2): 130-136.
- [3] 尹献辉, 刘佳, 李雪芹, 等. 衰老的表观遗传机制研究进展[J]. *细胞生物学报*, 2013, 35(7): 1027-1034.
- [4] Capparelli C, Chiavarina B, Whitaker-Menezes D, et al. CDK inhibitors(p16/p19/p21) induce senescence and autophagy in cancer-associated fibroblasts, "fueling" tumor growth via paracrine interactions, without an increase in neo-angiogenesis[J]. *Cell Cycle*, 2012, 11(19): 3599-3610.
- [5] 张宗玉, 范新青, 童坦君. 人胚肺二倍体成纤维细胞端区长度的代龄变化[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 1997, 13(1): 43-45.
- [6] Berdasco M, Esteller M. Hot topics in epigenetic mechanisms of aging: 2011[J]. *Aging Cell*, 2012, 11(2): 181-186.
- [7] Takeuchi S, Takahashi A, Motoi N, et al. Intrinsic cooperation between p16INK4a and p21^{Waf1/Cip1} in the onset of cellular senescence and tumor suppression in vivo[J]. *Cancer Res*, 2010, 22(5): 9381-9390.
- [8] Ioachim E. Expression patterns of cyclins D1, E and cyc-

lin-dependent kinase inhibitors p21^{Waf1/Cip1}, p27kip1 in colorectal carcinoma; correlation with other cell cycle regulators(pRb, p53 and Ki-67 and PCNA) and clinicopathological features[J]. *Int J Clin Pract*, 2008, 62(11): 1736-1743.

- [9] Shi X, Tian B, Liu L, et al. Rb protein is essential to the senescence-associated heterochromatic foci formation induced by HMGA2 in primary WI38 cells[J]. *J Genet Genomics*, 2013, 40(8): 391-398.
- [10] Mason K, Liu Z, Aguirre-Lavin T, et al. Chromatin and epigenetic modifications during early mammalian development. [J]. *Anim Reprod Sci*, 2012, 134(1-2): 45-55.
- [11] Koch CM, Wagner W. Epigenetic-aging-signature to determine age in different tissues[J]. *Aging (Albany NY)*, 2011, 3(10): 1018-1027.
- [12] Zhang Q, Wang HY, Marzec M, et al. STAT3- and DNA-methyltransferase 1-mediated epigenetic silencing of SHP-1 tyrosine phosphatase tumor suppressor gene in malignant T lymphocytes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(19): 6948-6953.
- [13] Fatemi M, Hermann A, Gowher H, et al. Dnmt3a and Dnmt1 functionally cooperate during de novo methylation of DNA[J]. *Eur J Biochem*, 2002, 269(20): 4981-4984.
- [14] Brenner C, Deplus R, Didelot C, et al. Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor[J]. *EMBO J*, 2005, 24(2): 336-346.
- [15] Zhang W, Ji W, Yang J, et al. Comparison of global DNA methylation profiles in replicative versus premature senescence[J]. *Life Sci*, 2008, 83(13-14): 475-480.

(收稿日期: 2014-10-14 修回日期: 2014-12-19)

(上接第 1034 页)

- [3] Ateshrang A, Ochs BG, Ludemann M, et al. Fibula and tibial fusion with cancellous allograft vitalised with autologous bone marrow; first result for infected tibial non-union[J]. *Arch Ortho Trauma Surg*, 2009, 129(1): 97-104.
- [4] Ma T, Shang BC, Tang H, et al. Nano-hydroxyapatite/chitosan/kojac glucomannan scaffolds loaded with cationic liposomal vancomycin: preparation, in vitro release and activity against *Staphylococcus aureus* biofilms[J]. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2011, 22(12): 1669-1681.
- [5] Hatzenbuehler J, Pulling TJ. Diagnosis and management of osteomyelitis[J]. *Am Fam Physician*, 2011, 84(9): 1027-1033.
- [6] Shinto Y, Uchida A, Korkusuz F, et al. Calcium hydroxyapatite ceramic used as a delivery system for antibiotics[J]. *J Bone Jt Surg Br*, 1992, 74(4): 600-607.
- [7] 赵欣, 王德平. 纳米羟基磷灰石作为药物载体材料的研究进展[J]. *材料导报*, 2010, 24(12): 116-120.

- [8] Lahiji A, Sohrabi A, Hungerford DS, et al. Chitosan supports the expression of extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes[J]. *Biomed Mater Res*, 2000, 51(4): 586-595.
- [9] Rey-Rico A, Silva M, Couceiro J, et al. Osteogenic efficiency of in situ gelling poloxamine systems with and without bone morphogenetic protein-2[J]. *Eur Cell Mater*, 2011, 21: 317-340.
- [10] Anusha A, Menon D, Nair S, et al. A molecular receptor targeted, hydroxyapatite nanocrystal based multimodal contrast agent[J]. *Biomaterials*, 2013, 31(9): 2606-2616.
- [11] 樊国栋, 张春梅. 聚乳酸在医学领域应用研究进展[J]. *科技导报*, 2010, 31(19): 103-107.
- [12] 许锋, 詹玉林, 宋兴华. 骨形态发生蛋白 2 基因治疗骨缺损研究进展[J]. *医学综述*, 2012, 32(11): 1612-1614.

(收稿日期: 2014-10-26 修回日期: 2014-12-10)