

庆大霉素-壳聚糖纳米粒治疗兔慢性骨髓炎的实验研究

李亮亮,王黎明,金成哲,徐燕,唐成

(南京医科大学附属南京第一医院骨科,江苏 南京 210006)

[摘要] **目的:**探讨庆大霉素-壳聚糖纳米粒(gentamicin loaded chitosan nanospheres,GS/CS NPs)对兔慢性胫骨骨髓炎的治疗作用。**方法:**取 48 只兔制作慢性胫骨骨髓炎模型,造模 3 周后行大体观察及患肢 X 线检查。44 只兔造模成功后行不同治疗,A 组:未特殊治疗;B 组:患肢髓腔壳聚糖纳米粒填塞;C 组:患肢髓腔庆大霉素粉末填塞;D 组:患肢髓腔 GS/CS NPs 填塞。治疗 3 周后行患肢 X 线片检查及 Norden 评分、髓腔大体观及髓腔内容物细菌学培养,患肢标本行组织学观察及 Smeltzer 病理评分。**结果:**治疗 3 周后 A、B、C 组均出现明显的慢性骨髓炎 X 线表现,髓腔脓肿形成,髓腔内容物细菌学培养阳性,组织学观察示中性粒细胞浸润、骨小梁破坏,A、B 组尚可见死骨形成,D 组治疗后未见明显阳性表现。Norden 评分 D 组较 A、B、C 组均有统计学意义($P < 0.05$),Smeltzer 病理评分 D 组较 A、B、C 组均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**庆大霉素-壳聚糖纳米粒作为局部释药系统治疗兔慢性骨髓炎具有良好的效果。

[关键词] 庆大霉素;壳聚糖;纳米粒;兔;骨髓炎

[中图分类号] R318.08,R681.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)02-208-04

Study of treatment of chronic osteomyelitis of rabbit with gentamicin loaded chitosan nanospheres

LI Liang-liang, WANG Li-ming, JIN Cheng-zhe, XU Yan, TANG Cheng

(Department of Orthopedics, Nanjing First Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of gentamicin loaded chitosan nanospheres(GS/CS NPs) on the treatment of chronic osteomyelitis of rabbit. **Methods:** Forty-eight rabbits were used to establish the chronic osteomyelitis model, and observation of affected limb and X-ray were done 3 weeks later. Forty-four rabbits had symptoms and signs of chronic osteomyelitis and were divided into 4 groups. Group A has no treatment, group B was treated with chitosan nanospheres, group C was treated with gentamicin sulfate, and group D was treated with GS/CS NPs. The X-Ray, observation of the bone marrow cavity, bacterial culture and the HE staining were done after 3 weeks of treatment. **Results:** After 3 weeks of treatment, the X-Ray of groups A~C showed apparent signs of chronic osteomyelitis, the formation of abscess were observed in bone marrow cavity, and the cultures of the *Staphylococcus aureus* were positive. The HE staining of groups A~C showed neutrophil accumulation, and the formation of dead bone were observed in groups A~B. The Norden and Smeltzer scores showed significant differences between group D and groups A~C (both $P < 0.05$). **Conclusion:** GS/CS NPs has significant effects on the treatment of rabbit chronic osteomyelitis as local drug delivery system.

[Key words] gentamicins; chitosan; nanospheres; rabbit; osteomyelitis

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(2): 208-211]

在过去的 30 年里,虽然慢性骨髓炎的发病机制几乎被完全阐明,众多的抗生素已应用于慢性骨髓炎的治疗中,但骨感染仍然是一个巨大的挑战^[1]。可以预见,随着交通创伤的增加及骨科内植物广泛应用于临床,慢性骨髓炎将继续困扰着患者及骨科医师。局部应用抗生素是治疗慢性骨髓炎的重要手段,本实验在前期成功制备出庆大霉素-壳聚糖纳米粒(gentamicin loaded chitosan nanospheres,GS/CS

NPs)的基础上,评价其在兔慢性骨髓炎模型中的治疗作用,为其应用于临床提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

金黄色葡萄球菌是慢性骨髓炎的主要致病菌种^[2],因此我们选择它用于兔慢性骨髓炎模型的制作。金黄色葡萄球菌(ATCC 29213,由南京医科大

学附属南京第一医院检验科提供)划线接种于血琼脂平板上,37℃恒温培养箱中孵育 24 h 后取出,无菌接种环挑取适量菌落融入营养肉汤中,继续于 37℃恒温培养箱中孵育 18 h,取出后以适量无菌生理盐水稀释,vitek 比浊仪调整菌液浓度为 1×10^8 CFU/ml,菌液配制完成后立即使用。

6 月龄健康新西兰大白兔 58 只(由南京医科大学附属南京第一医院动物实验中心提供),体重 (2.37 ± 0.16) kg,雌雄不限,单独饲养,标准进食。

1.2 方法

1.2.1 GS/CS NPs 的制备

采用季金苟等^[3]方法制备 GS/CS NPs。精密称取适量的壳聚糖用 1%醋酸溶解,配制成 2.5 mg/ml 的壳聚糖醋酸溶液,称取适量的硫酸庆大霉素溶解于 0.1 mol/L 的 NaOH 配制成 2.0 mg/ml 的溶液。在搅拌条件下将上述庆大霉素溶液滴加到壳聚糖溶液中,搅拌 30 min 至 2 种溶液充分混合,精密 pH 仪测定溶液的 pH 值并调节 pH 为 5.5。再滴加适量的 1.0 mg/ml 的 TPP 溶液,以 2 000 r/min 的速度搅拌 60 min。停止搅拌后静置 30 min,即得乳白色的纳米粒分散体系。将此分散体系高速离心,分离沉淀物,置于真空干燥箱内干燥 24 h,即得 GS/CS NPs。同法制备不含庆大霉素的空白壳聚糖纳米粒。环氧乙烷熏蒸消毒,4℃保存待用。

1.2.2 兔慢性骨髓炎模型的建立

兔称重后肌注安定(1 mg/kg),耳缘静脉注射戊巴比妥钠(30 mg/kg),麻醉成功后左胫骨近端处剪毛,四肢固定于手术台上,常规消毒铺巾,取左胫骨近端外侧纵行切口,逐层分离,暴露左胫骨平台,3 mm 克氏针钻孔,打通骨髓腔,48 只兔作为实验组向骨髓腔内依次注入 5%鱼肝油酸钠 0.1 ml、 1×10^8 CFU/ml 的金黄色葡萄球菌液 0.1 ml;10 只兔作为对照组向骨髓腔内依次注入 5%鱼肝油酸钠 0.1 ml、生理盐水 0.1 ml。无菌生理盐水冲洗伤口,逐层缝合。术后不予应用抗生素,肢体不制动,单独饲养,标准进食,3 周后行大体观察及左下肢 X 线片检查。

1.2.3 骨髓炎的治疗

造模 3 周后,X 线片提示慢性骨髓炎形成即开始实验治疗。实验组 1 只兔在造模过程中因麻醉致死,3 只兔在 3 周内因腹泻致死,余 44 只兔全部进入实验。治疗分为 4 组,每组 11 只,A 组:未特殊治疗;B 组:骨髓腔空白壳聚糖纳米粒填塞(10 mg/kg);C 组:骨髓腔庆大霉素粉末填塞(10 mg/kg);D 组:骨髓腔 GS/CS NPs 填塞(10 mg/kg)。3 周后行以下

检查:①兔左胫骨 X 线片检查,同一位放射科医生采用 Norden^[4]评分进行盲法评估;②摄片后采用空气栓塞法处死兔,无菌条件下纵向剖开左胫骨,观察骨髓腔,无菌拭子采集骨髓组织送细菌培养;③截取胫骨中段骨组织送病理切片,同一位病理科医生采用 Smeltzer 等^[5]的病理评分法进行盲法评估,评价指标包括:急性炎症表现、慢性炎症表现、骨膜炎症表现和骨坏死表现。

1.3 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计软件包进行分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析和 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 兔骨髓炎模型大体观及 X 线检查

实验组兔均可见左下肢局部皮肤红肿、流脓、窦道形成,体毛无明显增长。X 线片示左胫骨骨小梁结构的吸收,髓腔内空洞形成,骨膜反应以及软组织阴影(图 1)。对照组兔左下肢手术切口愈合良好,局部皮肤未见明显红肿、窦道形成,体毛增长旺盛。X 线片未见明显异常。

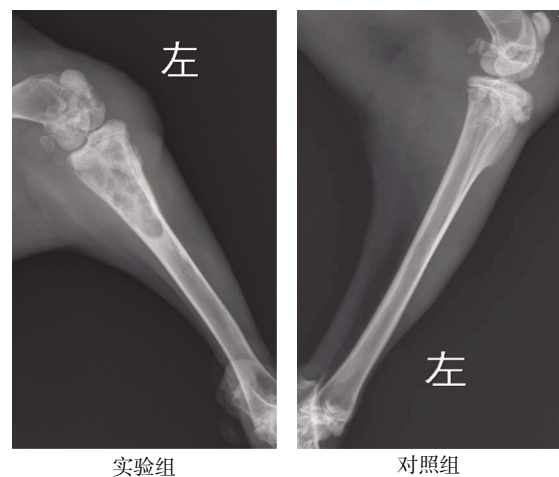


图 1 造模 3 周后左胫骨 X 线表现

Figure 1 The observation of the X-ray film of rabbit chronic osteomyelitis model

2.2 治疗后各组检查指标变化

2.2.1 治疗后 X 线检查及评分

经治疗 3 周后,A、B、C 组 X 线检查结果较前明显加重,可见左胫骨骨小梁结构吸收明显,较重的骨膜反应,骨皮质溶解、死骨形成及软组织阴影;D 组较治疗前有明显好转,仅见髓腔内空洞及软组织阴影(图 2)。各组 Norden 评分为:A 组(2.4 ± 0.3)分、B 组(2.3 ± 0.3)分、C 组(2.3 ± 0.2)分、D 组(0.5 ± 0.1)分。D

组分别与 A、B、C 组比较,均有统计学意义($P < 0.05$)。

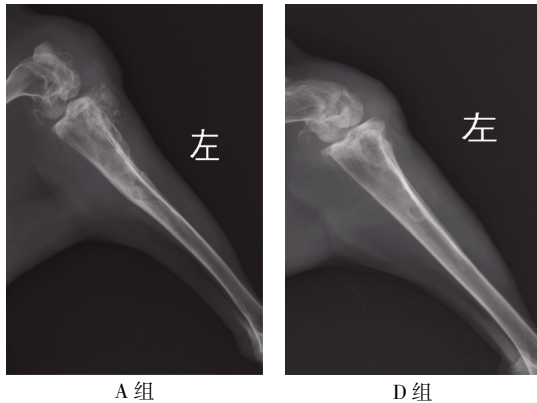


图 2 治疗后 A 组和 D 组兔左胫骨 X 线表现

Figure 2 The X-ray film of left tibia after therapy in different groups

2.2.2 髓腔大体观及细菌学检查

纵向剖开左胫骨后观察, A、B、C 组出现不同程度的骨质破坏,髓腔内较多黄白色脓肿形成,取代原有的鲜红色骨髓组织,髓样组织水肿发白; D 组髓腔内未见明显脓肿形成,髓样组织无水肿,仅颜色稍暗(图 3)。A、B、C 组髓腔内容物细菌培养均见大量金黄色葡萄球菌生长, D 组髓腔内容物培养未见明显金葡萄生长(图 4)。

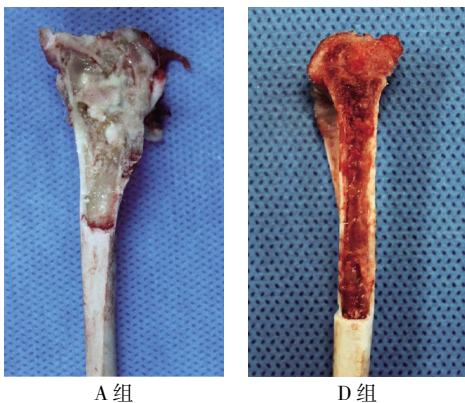


图 3 治疗后 A 组和 D 组髓腔大体观

Figure 3 The appearance of the medullary cavity of the tibia after therapy in different groups

2.2.3 组织学观察及评分

各组标本行 HE 染色见 A、B、C 组均有不同程度的急慢性炎症表现,大量中性粒细胞浸润,纤维组织增生,骨小梁正常结构消失, A、B 组还可见死骨形成; D 组未见明显炎症表现,仅见少量纤维组织增生(图 5)。各组 Smeltzer 病理评分为: A 组(6.7 ± 0.5)分、B 组(6.3 ± 0.6)分、C 组(5.5 ± 0.5)分、D 组(2.1 ± 0.3)分, D 组与 A、B、C 组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

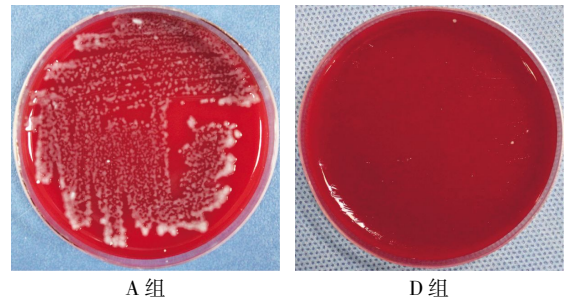
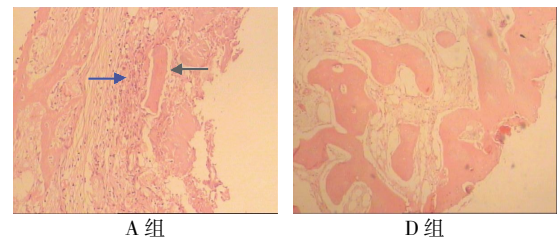


图 4 治疗后 A 组和 D 组骨髓组织细菌培养

Figure 4 Bacteria culture results of marrow after therapy in different groups



黑色箭头示死骨形成,蓝色箭头示炎性细胞聚集。

图 5 治疗后 A 组和 D 组组织学观察(HE, $\times 100$)

Figure 5 Histological observation of each group after therapy (HE, $\times 100$)

3 讨论

虽然在过去的几十年里, 抗生素的广泛应用、手术技术的改进等为慢性骨髓炎的治疗提供了更加积极的作用^[6], 但是至今慢性骨髓炎仍是一个无法完全解决的难题, 资料报道创伤性胫骨骨髓炎的不愈率高达 30%^[7-8], 给患者及医疗机构增加了极大的负担。慢性骨髓炎的重要治疗手段之一是全身性应用抗生素, 然而系统性应用抗生素很难在病灶部位达到有效的抑菌浓度, 局部应用抗生素如庆大霉素珠链(PMMA)已被证实具有较好的治疗效果, 但 PMMA 需要二次手术取出, 因此, 新型局部抗生素释放系统治疗慢性骨髓炎成为研究的热点。本实验的目的是研究 GS/CS NPs 作为局部抗生素释放系统在兔慢性骨髓炎模型中的治疗作用。

本研究在成功制作兔慢性骨髓炎模型的基础上, 将 GS/CS NPs 植入兔胫骨慢性骨髓炎模型骨髓腔内, 从治疗后兔胫骨 X 线片、髓腔大体观、髓腔内容物细菌学培养及组织学方面来评价其效果。经 GS/CS NPs 治疗后, 兔胫骨 X 线片未见明显的炎症反应, 仅见髓腔内空洞及软组织阴影, Norden 评分较其他组均有统计学意义($P < 0.05$); 胫骨髓腔肉眼观见髓样组织无水肿, 无明显脓肿形成; 细菌学检查未见明显金黄色葡萄球菌落生长; 组织学检

查仅见纤维组织增生,未见明显急慢性炎症表现,Smeltzer病理评分也较其他组均有统计学意义($P < 0.05$)。由此,我们初步认为GS/CS NPs在治疗兔慢性骨髓炎方面具有比较明显的作用,作为局部抗生素释放系统具有较大的研究价值。

其他局部抗生素释放系统近年来也被国内外学者广泛研究,李云飞等^[9]制备载万古霉素纳米羟基磷灰石治疗兔慢性骨髓炎骨缺损模型,万古霉素组炎症控制良好,6周后开始恢复正常骨髓结构;唐辉等^[10]研究表明庆大霉素阳离子脂质体同种异体骨治疗兔胫骨慢性骨髓炎具有较好的效果;Vester等^[11]对负载庆大霉素-PDLLA涂层的克氏钉行一系列体内外检测,认为其在预防治疗骨感染疾病方面是一个合适的选择。上述局部抗生素释放系统在动物骨髓炎模型中的良好治疗作用提示局部释药系统在骨髓炎的治疗中具有较大的潜力,这促使我们继续寻找良好的抗生素载体来实现局部给药以治疗慢性骨髓炎。我们认为良好的药物载体必须具备以下几个方面:①良好的生物相容性;②较缓慢的释药时间;③体内可降解性。通过查阅国内外文献我们发现,壳聚糖纳米粒作为药物载体具有低毒性、良好的稳定性、简单的制备工艺及广泛的给药途径等优点^[12],已广泛应用于药物载体的研究^[13-14]。此外,壳聚糖纳米粒本身还具有抑菌作用^[15]。GS/CS NPs可以改变庆大霉素的药代动力学,延长庆大霉素的释放时间,基本符合局部抗生素释放系统的要求^[16],从本实验的结果来分析,也进一步验证了GS/CS NPs作为局部释药系统,在治疗兔慢性骨髓炎方面具有良好的作用。

局部应用抗生素由于病灶部位药物浓度高,血清浓度低,不良反应小等众多优点,已被认为是治疗慢性骨髓炎的有效方法之一,然而我们认为慢性骨髓炎的治疗,仍应以常规治疗方法为基础,在病灶彻底清创的同时配合局部抗生素治疗,这样才能提高治愈率。总之,本研究对GS/CS NPs治疗兔慢性骨髓炎进行了探讨,初步认为其是治疗慢性骨髓炎有效实用的局部给药方法。

[参考文献]

[1] Jorge LS, Chueire AG, Rossit AR. Osteomyelitis: a current challenge[J]. Braz J Infect Dis, 2010, 14(3): 310-315
[2] Howell WR, Goulston C. Osteomyelitis: an update for hospitalists[J]. Hosp Pract (Minneap), 2011, 39(1): 153-160
[3] 季金苟,李红,董瑾,等. 硫酸庆大霉素/壳聚糖纳

球的制备及其释药性能[J]. 中国抗生素杂志, 2010, 35(10): 767-770
[4] Norden CW, Shimmers E, Niederriter K. Clindamycin treatment of experimental chronic osteomyelitis due to Staphylococcus aureus[J]. J Infect Dis, 1986, 153(5): 956-959
[5] Smeltzer MS, Thomas JR, Hickmon SG, et al. Characterization of a rabbit model of staphylococcal osteomyelitis[J]. J Orthop Res, 1997, 15(3): 414-421
[6] Calhoun JH, Manring MM, Shirliff M. Osteomyelitis of the long bones[J]. Semin Plast Surg, 2009, 23(2): 59-72
[7] Fodor L, Horesh Z, Lerner A, et al. The distally based sural musculoneurocutaneous flap for treatment of distal tibial osteomyelitis[J]. Plast Reconstr Surg, 2007, 119(7): 2127-2136
[8] Tu YK, Yen CY. Role of vascularized bone grafts in lower extremity osteomyelitis[J]. Orthop Clin North Am, 2007, 38(1): 37-49
[9] 李云飞,方涛林,董健. 载万古霉素纳米羟基磷灰石对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌慢性骨髓炎免骨缺损的修复[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(23): 4422-4426
[10] 唐辉,徐永清,李刚,等. 庆大霉素阳离子脂质体同种异体骨治疗兔慢性骨髓炎的实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2010, 24(4): 482-486
[11] Vester H, Wildemann B, Schmidmaier G, et al. Gentamycin delivered from a PDLLA coating of metallic implants: In vivo and in vitro characterisation for local prophylaxis of implant-related osteomyelitis[J]. Injury, 2010, 41(10): 1053-1059
[12] Nagpal K, Singh SK, Mishra DN. Chitosan nanoparticles: a promising system in novel drug delivery[J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2010, 58(11): 1423-1430
[13] Motwani SK, Chopra S, Talegaonkar S, et al. Chitosan-sodium alginate nanoparticles as submicroscopic reservoirs for ocular delivery: formulation, optimisation and in vitro characterisation[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2008, 68(3): 513-525
[14] Mei D, Mao S, Sun W, et al. Effect of chitosan structure properties and molecular weight on the intranasal absorption of tetramethylpyrazine phosphate in rats[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2008, 70(3): 874-881
[15] Bozkir A, Saka OM. Chitosan-DNA nanoparticles: effect on DNA integrity, bacterial transformation and transfection efficiency[J]. J Drug Target, 2004, 12(5): 281-288
[16] 李亮亮,王黎明,徐燕. 硫酸庆大霉素-壳聚糖纳米粒的制备及性能评价[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(42): 7847-7850

[收稿日期] 2011-08-14