

抗菌人工骨支架材料研究进展

伍家毅 李巍明 李夏林 杨大志 易伟宏

摘要 严重开放性骨折、骨科术后感染、慢性骨髓炎所导致的感染性骨缺损的修复重建已成为临床医生面临的巨大挑战,抗菌人工骨支架材料有望用于治疗感染性骨缺损。在抗菌骨组织工程中,抗菌成分具有很重要的作用。应用于抗菌人工骨支架材料的抗菌剂包括抗生素类、无机抗菌剂类及天然抗菌剂类等。抗生素类人工骨材料由于其良好的抗菌性能及较低的开发成本得到深入研究;无机抗菌剂类人工骨因不易诱导耐药产生而成为研究热点,主要包括金属离子、纳米金属、光催化抗菌剂;天然抗菌剂类人工骨不易产生免疫排斥反应并具备较好的细胞相容性,其中动物源性抗菌剂包括氨基酸类、抗菌多肽、高分子糖,植物源性抗菌剂包括中成药等。

关键词 感染性骨缺损;骨组织工程;骨修复;骨支架材料;抗菌材料

DOI: 10.3969/j.issn.1673-7083.2021.03.008

感染情况下的骨缺损修复是临床难题。感染性骨缺损的形成通常由开放性骨折、骨科手术后感染以及各类慢性骨髓炎所致,引起骨缺损处感染的因素包括血运缺乏,软组织丢失,骨缺损区、内固定物表面和人工骨替代物表面易介导细菌黏附和生物膜形成等^[1]。

感染性骨缺损通常采用全身或局部应用抗生素控制感染,然后植入骨移植物修复骨缺损。然而,这些治疗方案耗时较长,需要多次手术,且疗效较差。为了解决这些问题,学者们开发了具有抗菌性能的新型人工骨支架材料^[2]。

1 抗生素类人工骨支架

抗生素在骨感染缺损修复中应用广泛。随着骨组织工程中局部缓释系统的发展,各类抗生素已被证实可装载于人工骨支架,向骨感染缺损处缓释药物。

1.1 四环素类支架

四环素类药物为抑菌类抗菌药,它们通过抑制微生物蛋白质的合成发挥抗菌活性,其具有抗胶原酶、抗细菌和促成纤维细胞的特性,因此也用于骨移植手术中。四环素类药物已知的骨诱导特性是通过增加成骨细胞活性上调成骨蛋白(如I型胶原)合成,同时

抑制破骨细胞介导的骨吸收,导致矿化骨基质增加,应用于人工骨支架中可以进一步改善骨再生。

Martin等^[3]的研究证实,添加胶原、米诺环素和柠檬酸盐羟基磷灰石纳米颗粒的3D打印聚乳酸人工骨支架对金黄色葡萄球菌有抗菌作用。同时,他们发现该骨支架还有利于人骨髓源性间充质干细胞的存活、增殖,以及成骨相关基因[Runt相关转录因子(*Runx*)2、骨钙素(*OCN*)和骨桥蛋白(*OPN*)]的表达。Semyari等^[4]采用共沉淀法制备含10%强力霉素的羟基磷灰石纳米颗粒,并将其添加于胶原溶液中,以冷冻浇铸法制备成多孔人工骨支架。体外实验证实,该支架对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌均有抑制作用。在大鼠颅骨缺损模型中使用该支架,进行组织切片检查发现可促进骨形成,骨缺损处完全修复填充。

1.2 万古霉素类支架

万古霉素为治疗耐甲氧西林葡萄球菌(MRSA)的首选药物,且未见其对成骨干细胞分化有不利影响。万古霉素与给药系统结合显示出对革兰氏阳性细菌生长和生物膜形成的抵抗作用^[5]。

Zhou等^[6]将含万古霉素的多孔二氧化硅纳米颗粒装载于明胶多孔支架,该结合方式可使复合支架以缓释方式释放,其初始爆发小,可有效抑制随后的金黄色葡萄球菌生长。他们发现,载药复合支架对骨间充质干细胞的增殖和分化明显有利,证实其具有良好的生物相容性。体内研究结果表明,该复合支架可在减少细菌污染的同时促进骨愈合。

基金项目:广东省自然科学基金(2018A030313670)、深圳市南山区科研基金(2018004、2018005)

作者单位:518052, 深圳大学医学部(伍家毅、易伟宏); 518000, 华中科技大学协和深圳医院脊柱外科(李巍明、李夏林); 518052, 深圳大学附属第六医院脊柱外科(易伟宏、杨大志)

通信作者:易伟宏 E-mail: szyiwh@163.com

Cheng 等^[7]研发了载万古霉素的多孔生物玻璃/聚乳酸-羟基乙酸共聚物复合支架。体外实验显示,前 72 h 万古霉素从载药支架迅速释放,然后为缓坡式缓慢释放。其初始释放量较低,58 d 后仅 23% 载量的万古霉素释放,并保持 8 周以上的持续释放性能,累计释放 53% 的万古霉素。将该支架与分离自感染骨缺损中的金黄色葡萄球菌共培养,发现骨支架菌落数仅 0~1 个;共聚焦显微镜观察发现其可明显抑制生物膜形成,但对正常细胞无不良影响。

1.3 喹诺酮类支架

喹诺酮类药物是治疗骨感染的广谱抗生素,它们可渗透至骨小梁和皮质骨中,且耐药风险较低,故被选择用于抗菌骨支架中^[8]。

Sreeja 等^[9]采用表面磷化的苯二甲酸乙二醇酯(P-PET)纤维基质制造一种新型骨组织工程支架,该支架涂覆环丙沙星浸渍的可生物降解的甲基丙烯酸羟乙酯,他们的实验证实该复合支架具有抗菌和成骨诱导的双重活性。他们对该支架进行洗脱处理,对洗脱液进行抗菌圆盘扩散测定实验。结果显示,该支架对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抗菌效能与阳性对照组中的抗菌效能相似。场发射扫描电子显微镜图像显示,该支架可防止金黄色葡萄球菌黏附,而单纯的 P-PET 支架则不能。

Cicuéndez 等^[10]设计了 pH 依赖性和局部控制释放左氧氟沙星的 3D 纳米羟基磷灰石复合支架。该支架在生理 pH 值下显示出持续递送左氧氟沙星的能力,当 pH 降低时(pH 6.7 和 pH 5.5),左氧氟沙星传递明显增加。这种 pH 依赖性的左氧氟沙星释放,能够抑制金黄色葡萄球菌生长并破坏预先形成的生物膜,但对人成骨细胞无毒性作用。

2 无机抗菌剂类人工骨支架

长期使用抗生素类人工骨植入可导致细菌耐药性产生,为此,寻求其他抗菌人工骨支架材料成为研究焦点。无机抗菌剂指利用银、铜、锌、钛、汞、铅等金属及其离子的杀菌或抑菌能力制得的抗菌剂。目前,广泛应用于人工骨支架中的无机抗菌剂包括金属离子类[如银离子(Ag^+)、铜离子(Cu^{2+})、锌离子(Zn^{2+})等]、氧化物光催化类[如二氧化钛(TiO_2)、氧化锌(ZnO)]和纳米级金属抗菌剂。

2.1 金属离子类抗菌剂

金属离子对细菌的影响是多方面的,它们通过改变正常生物膜内外的极化状态形成新的细胞内外离子浓度差,阻碍或破坏维持细胞生理功能的小分

子和大分子物质的运输。一些金属离子也可以进入微生物细胞内,使大多数酶失活,发挥抗菌效能。

Jiang 等^[11]通过原位发泡法制备多孔纳米羟基磷灰石/聚氨酯(n-HA/PU)复合支架,并载入不同含量磷酸银(Ag_3PO_4),载入后支架的孔隙率和力学性能并无明显变化。 Ag^+ 的释放随支架载入 Ag_3PO_4 含量和时间的增加而增加,且可持续释放超过 3 周。抗菌测试和细胞相容性评估显示,载有 3%wt Ag_3PO_4 的 n-HA/PU 支架对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌率分别达到 96.79% 和 97.41%,且未发现明显的细胞毒性。

Sehgal 等^[12]使用可生物降解的结冷胶和黄原胶聚合物与硫酸锌离子交联,开发具备抗菌特性的纳米复合材料支架。与仅含结冷胶和黄原胶聚合物的纳米骨支架相比,锌离子交联骨支架可显著抑制革兰氏阳性枯草芽孢杆菌和革兰氏阴性大肠杆菌的生长。

2.2 光催化类抗菌剂

目前,光催化类抗菌剂主要有 TiO_2 、 ZnO 和三氧化二铁(Fe_2O_3)等 N 型半导体金属氧化物。其中 TiO_2 的氧化活性较高,稳定性也较强,对人体无毒。 TiO_2 在光线照射下产生活性氧,短时间内可完全杀死与其接触的微生物。由于对紫外线辐射的依赖, TiO_2 在抗菌骨组织工程中的应用常受限。然而近期研究发现,在无光情况下,于 TiO_2 表面催化分解过氧化氢(H_2O_2)也能得到活性氧^[13]。

Wiedmer 等^[14]研究无光条件下 H_2O_2 催化分解含 TiO_2 溶胶/凝胶涂层的多孔 TiO_2 支架的抑菌作用。他们将发光菌株 Xen43 与经 H_2O_2 处理的溶胶-凝胶涂层表面的多孔 TiO_2 支架共培养,以相对光单位观察活菌黏附情况。与未暴露于 H_2O_2 的样品相比,经 H_2O_2 催化分解的 TiO_2 支架相对光单位延迟出现且总峰强度较低。此外,他们还采用共培养后 TiO_2 表面洗脱的菌落形成单位来评估抗菌效能,结果显示,经 30% H_2O_2 预处理的涂覆溶胶-凝胶 TiO_2 支架表面脱落的活菌数明显少于对照组。于感染支架后 4 h 和 12 h 进行活/死细胞染色后的扫描电子显微镜和荧光显微镜观察,发现涂布后的 TiO_2 支架细菌数目少,细菌均无细胞活性。

2.3 纳米金属抗菌剂

纳米粒子是介于固体与液体间的亚稳定中间态物质。纳米材料具有表面效应、体积效应、量子尺寸效应和宏观量子隧道效应,可呈现特殊的物理和化学特性,具有许多新功能和广泛的应用前景。将金

属离子制成纳米级别后,由于其比表面积增大,可以更好地吸附微生物,因此具有更好的抗菌能力。其灭菌机制包括活性氧产生、阳离子释放、生物分子破坏、腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)耗竭和膜相互作用等^[15]。

Deng 等^[16]使用银纳米颗粒(AgNPs)锚定于3D打印的聚醚醚酮(PEEK)支架上,将该人工骨支架材料分别与大肠杆菌和金黄色葡萄球菌一起孵育后均出现5 mm抑菌环,而对照组仅采用PEEK支架则孵育后未出现抑菌环。进一步进行细菌生长动力学定量研究发现,该支架浸于金黄色葡萄球菌与大肠埃希菌细胞悬液中使细菌的对数生长期明显延迟。将该支架暴露于细菌悬浮液中7 d,通过结晶紫染色对黏附的生物膜细菌作定量分析显示,未见明显的金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌细菌膜黏附。

3 天然抗菌剂类人工骨

天然生物抗菌剂来源于自然界,其资源极其丰富,根据来源不同,可将其分为植物源性抗菌剂和动物源性抗菌剂。

动物源性抗菌剂包括氨基酸类、天然肽类、高分子糖类等。壳聚糖因生物相容性好、抗菌性强,成为抗菌人工骨研究的热点。壳聚糖属于高分子糖,是甲壳质的脱乙酰产物,具有许多带正电荷的胺,可以与细菌细胞表面带负电荷的脂质、蛋白质和碳水化合物发生静电作用,抑制细菌生长。但是,壳聚糖在水中溶解性差且机械性能低限制了它们的生物医学应用。为此,近期研究进行了壳聚糖的化学修饰,如季铵化、羧甲基化、阳离子化,以获得理化特性和生物学特性改善的新材料^[17]。Yang 等^[18]把壳聚糖经季铵化形成的羟丙基三甲基氯化铵壳聚糖(HACC)嫁接到由聚丙交酯-乙交酯(PLGA)和羟基磷灰石(HA)组成的3D打印支架。在体外和体内条件下,含有HACC的复合抗菌骨支架可明显减少细菌黏附和生物膜形成。此外,ATP泄漏测定表明,将HACC固定在支架上可以有效破坏细菌生物膜。

我国传统中草药有悠久历史,该类抗菌剂资源开发的潜力巨大,穿心莲、大蒜、金荞麦、苦木、黄连及黄连素、鱼腥草及鱼腥草素等都是常用的植物源性抗菌剂。

Huang 等^[19]将含黄连素的壳聚糖涂布于纳米羟基磷灰石/聚酰胺66(n-HA/PA66)人工骨支架。缓释实验显示,黄连素在磷酸盐缓冲液(PBS)中的

最初3 h呈爆发释放,持续释放可达150 h。杀菌实验证实,递送系统具有很强的抗菌作用,药物的最小抑菌质量浓度为0.02 mg/mL。此外,体外生物学评估表明,涂层支架可作为人骨肉瘤细胞(MG63)黏附、爬行、生长和增殖的良好基质,表明抗菌传递系统无细胞毒性。

丁香酚是从植物中提取的脂类天然化合物,Salerno 等^[20]用超临界发泡成型技术将丁香酚加入聚(ε-己内酯)(PCL)中制备成具有抗菌效能的人工骨支架。丁香酚-PCL骨支架具有细胞相容性和抗菌活性,可阻止革兰氏阳性细菌(金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌)附着,并具有良好的组织整合性。通过浊度测量评估细菌生长的结果表明,在所测试的3种菌株中,丁香酚-PCL支架尚不足以实现完全抑菌作用。然而,在与金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌共同孵育24 h后,丁香酚-PCL支架与PCL支架(阴性对照组)之间的浊度差异明显,丁香酚-PCL支架的浊度更低。该抗菌性能可能与丁香酚缓释后局部质量浓度较高有关。

4 结语

应用人工骨组织工程方法治疗感染性骨缺损,有望解决传统治疗中存在的问题。在抗菌人工骨领域,开发出强大、可控制的局部抗菌系统以及可复制、批量生产的支架生产工艺是研究的关键所在。随着现代骨组织工程、生物材料等技术的发展,具有抗感染、骨传导、骨诱导等多重作用的复合人工骨或替代物在感染性骨缺损的治疗方面将具有良好的前景。

参考文献

- [1] Johnson CT, Garcia AJ. Scaffold-based anti-infection strategies in bone repair[J]. *Ann Biomed Eng*, 2015, 43(3): 515-528.
- [2] Lu H, Liu Y, Guo J, et al. Biomaterials with antibacterial and osteoinductive properties to repair infected bone defects[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(3): 334.
- [3] Martin V, Ribeiro IA, Alves MM, et al. Engineering a multifunctional 3D-printed PLA-collagen-minocycline-nanoHydroxyapatite scaffold with combined antimicrobial and osteogenic effects for bone regeneration[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2019, 101: 15-26.
- [4] Semyari H, Salehi M, Taleghani F, et al. Fabrication and characterization of collagen-hydroxyapatite-based composite scaffolds containing doxycycline via freeze-casting method for bone tissue engineering[J]. *J Biomater Appl*, 2018, 33(4): 501-513.

- [5] Karakeçili A, Topuz B, Korpayev S, et al. Metal-organic frameworks for on-demand pH controlled delivery of vancomycin from chitosan scaffolds[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2019, 105: 110098.
- [6] Zhou X, Weng W, Chen B, et al. Mesoporous silica nanoparticles/gelatin porous composite scaffolds with localized and sustained release of vancomycin for treatment of infected bone defects[J]. J Mater Chem B, 2018, 6(5): 740-752.
- [7] Cheng T, Qu H, Zhang G, et al. Osteogenic and antibacterial properties of vancomycin-laden mesoporous bioglass/PLGA composite scaffolds for bone regeneration in infected bone defects[J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2018, 46(8): 1935-1947.
- [8] 蒋晓磊, 崔玉彬, 曹胜华. 喹诺酮类抗菌药物研究新进展[J]. 中国抗生素杂志, 2011, 36(4): 255-263.
- [9] Sreeja S, Muraleedharan CV, Varma P, et al. Surface-transformed osteoinductive polyethylene terephthalate scaffold as a dual system for bone tissue regeneration with localized antibiotic delivery[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2020, 109: 110491.
- [10] Cicuéndez M, Doadrio JC, Hernández A, et al. Multifunctional pH sensitive 3D scaffolds for treatment and prevention of bone infection[J]. Acta Biomater, 2018, 65: 450-461.
- [11] Jiang J, Li L, Li K, et al. Antibacterial nanohydroxyapatite/polyurethane composite scaffolds with Silver phosphate particles for bone regeneration[J]. J Biomater Sci Polym Ed, 2016, 27(16): 1584-1598.
- [12] Sehgal RR, Carvalho E, Banerjee R. Mechanically stiff, Zinc Cross-Linked nanocomposite scaffolds with improved osteostimulation and antibacterial properties[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2016, 8(22): 13735-13747.
- [13] Wiedmer D, Sagstuen E, Welch K, et al. Oxidative power of aqueous non-irradiated $\text{TiO}_2\text{-H}_2\text{O}_2$ suspensions: methylene blue degradation and the role of reactive oxygen species[J]. Appl Catal B, 2016, 198: 9-15.
- [14] Wiedmer D, Cui C, Weber F, et al. Antibacterial surface coating for bone scaffolds based on the dark catalytic effect of Titanium dioxide[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2018, 10(42): 35784-35793.
- [15] Slavin YN, Asnis J, Häfeli UO, et al. Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity[J]. J Nanobiotechnology, 2017, 15(1): 65.
- [16] Deng L, Deng Y, Xie K. AgNPs-decorated 3D printed PEEK implant for infection control and bone repair[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2017, 160: 483-492.
- [17] Khattak S, Wahid F, Liu LP, et al. Applications of cellulose and chitin/chitosan derivatives and composites as antibacterial materials: current state and perspectives[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2019, 103(5): 1989-2006.
- [18] Yang Y, Yang S, Wang Y, et al. Anti-infective efficacy, cytocompatibility and biocompatibility of a 3D-printed osteoconductive composite scaffold functionalized with quaternized chitosan[J]. Acta Biomater, 2016, 46: 112-128.
- [19] Huang D, Zuo Y, Zou Q, et al. Antibacterial chitosan coating on nano-hydroxyapatite/polyamide66 porous bone scaffold for drug delivery[J]. J Biomater Sci Polym Ed, 2011, 22(7): 931-944.
- [20] Salerno A, Diéguez S, Diaz-Gomez L, et al. Synthetic scaffolds with full pore interconnectivity for bone regeneration prepared by supercritical foaming using advanced biofunctional plasticizers[J]. Biofabrication, 2017, 9(3): 035002.

(收稿日期:2020-08-03)

(本文编辑:杨晓娟)