

## 庆大霉素-壳聚糖纳米涂层钛板的制备及系列研究

李亮亮,王黎明\*,徐燕,唐成,朱成宾<sup>1</sup>

(南京医科大学附属南京第一医院骨科,<sup>1</sup>检验科,江苏 南京 210006)

[摘要] 目的:制备负载庆大霉素-壳聚糖纳米粒的涂层钛板并对其表面形态、体外释药行为及抗金黄色葡萄球菌的性能进行评价。方法:采用溶剂铸膜(solvent casting)法制备庆大霉素-壳聚糖纳米涂层钛板,扫描电镜观察其表面形态,磷酸盐缓冲液中研究其体外释药行为,将庆大霉素-壳聚糖纳米涂层钛板置于均匀涂有 $1 \times 10^8$  CFU/ml金黄色葡萄球菌的Mueller-Hinton(MH)平板上连续培养直至抑菌环消失,以抑菌环直径为主要观察指标评价其在体外对金黄色葡萄球菌的抑制作用。结果:扫描电镜示庆大霉素-壳聚糖纳米粒较均匀地分布于钛板表面;体外释药行为显示庆大霉素-壳聚糖纳米涂层钛板中庆大霉素的释放可达到14 d,维持在52%左右;体外抑制金黄色葡萄球菌作用可维持9 d,抑菌环最大直径为 $(3.82 \pm 0.03)$  cm。结论:制备的庆大霉素-壳聚糖纳米涂层钛板表面形态良好,体外释药稳定,对金黄色葡萄球菌有良好的抑制作用。

[关键词] 硫酸庆大霉素;壳聚糖;聚消旋乳酸;纳米粒;金黄色葡萄球菌

[中图分类号] R318

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2011)11-1690-05

## Preparation and series studies of the gentamicin sulfate/chitosan nanospheres loaded plates

LI Liang-liang, WANG Li-ming\*, XU Yan, TANG Cheng, ZHU Cheng-bin<sup>1</sup>

(Department of Orthopedics, <sup>1</sup>Department of Laboratory Medicine, Nanjing First Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210006, China)

[Abstract] **Objective:** To develop the gentamicin sulfate/chitosan nanospheres loaded plates and evaluate its characteristics such as surface structure and the drug release behavior of the drug *in vitro* and its anti-*Staph aureus* efficacy *in vitro*. **Methods:** The solvent casting technology was adopted to prepare the gentamicin sulfate/chitosan nanospheres loaded plates. The surface appearance of the plates was observed by SEM, the drug release behavior *in vitro* was studied by immerse the plates into PBS. And the gentamicin sulfate/chitosan nanospheres loaded plates were placed in the centre of the Mueller-Hinton(MH) agar which were inoculated with the *Staph aureus* at the concentration of  $1 \times 10^8$  CFU/ml. The bacteria were cultured on MH agar for 48 h and the diameter of the inhibition zone was measured, and this procedure was repeated until there was no inhibition zone. **Result:** The result of the SEM shows the gentamicin sulfate/chitosan nanospheres distributed on the surface of plates uniform, the drug release behavior *in vitro* could continue about 14 days, and the max cumulative release of the drug was about 52%. The anti-*Staph aureus* efficacy *in vitro* could continue about 9 days and the max diameter of the inhibition zone was  $(3.82 \pm 0.03)$  cm. **Conclusion:** The gentamicin sulfate/chitosan nanospheres loaded plates show well surface appearance and the plates have a steady drug release behavior and significant anti-*Staph aureus* efficacy *in vitro*.

[Key words] gentamicins; chitosan; PDLLA; nanospheres; *Staphylococcus aureus*

[Acta Univ Med Nanjing, 2011, 31(11): 1690-1694]

内植物相关性感染是矫形外科及创伤外科比较常见的并发症之一<sup>[1-2]</sup>, 可以导致内植物手术

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划)子课题(2007CB936100)

\*通讯作者, E-mail: Limingwang99@yahoo.com

失败、肢体功能差、慢性骨髓炎甚至死亡<sup>[3]</sup>。患者病情往往迁延不愈, 临床医师不得不改变治疗策略, 比如取出内植物、清创翻修甚至截肢等, 不仅增加了患者及社会负担, 对于主治医师亦是极大的考验<sup>[4]</sup>。

全身性应用抗生素是预防内植物相关性感染的常规方法,然而抗生素却很难在病灶部位达到有效的抑菌浓度<sup>[5-6]</sup>,因此全身性应用抗生素联合局部用药治疗内植物相关性感染是必要的。本研究在之前研究的基础上,总结前人的研究方法和经验<sup>[7-9]</sup>,制备了负载硫酸庆大霉素-壳聚糖纳米粒(gentamicin sulfate/chitosan nanospheres,GS/CS NPs)的涂层钛板并对其体外性能进行了评价。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

硫酸庆大霉素(gentamicin sulfate,GS,Amresco公司,美国);壳聚糖(chitosan,CS,上海晶纯试剂有限公司,脱乙酰度 95%);三聚磷酸钠(广东西陇化工股份有限公司,分析纯);聚消旋乳酸(PDLLA,山东岱罡生物技术有限公司,分子量 60 000);其他试剂均为分析纯。金属直型接骨板(苏州海欧斯医疗器械有限公司)。DU-800 紫外-可见分光光度计(Beckman 公司,美国);真空离心浓缩仪(Labconco 公司,美国);3K15 大容量高速冷冻离心机(Sigma 公司,美国);S-4800 扫描电镜(Hitachi 公司,日本)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 GS/CS NPs 涂层钛板的制备

将钛板依次用丙酮、75%酒精和去离子水超声波清洗各 15 min,烘箱中烘干,高压蒸汽灭菌后备用。涂层溶液的配制<sup>[7]</sup>及 GS/CS NPs 涂层钛板的制备:精密称取适量 PDLLA 充分溶解于乙酸乙酯中,称取 60 mg GS/CS NPs<sup>[10]</sup>溶于上述溶液中,磁力搅拌器搅拌 30 min,使之分散均匀。将处理过的钛板浸泡于上述配制好的涂层溶液中,10 min 后取出,自然干燥,为获得均匀致密的涂层,重复此过程 3 次。同样方法制备单纯的 PDLLA 涂层钛板。上述过程均在无菌层流条件下完成。

#### 1.2.2 GS/CS NPs 涂层钛板的表面形态观察

扫描电镜下观察裸钛板、PDLLA 涂层钛板及 GS/CS NPs 涂层钛板的表面形态。

#### 1.2.3 GS/CS NPs 涂层钛板的体外释药研究

##### 1.2.3.1 庆大霉素标准曲线的绘制

配制不同浓度的庆大霉素标准溶液,用紫外-可见分光光度计测定其在 248 nm(庆大霉素在此波长有最大吸收)处的吸光度(A)<sup>[10]</sup>,拟合曲线得回归方程: $A = 0.3271c + 0.0045$ , $R = 0.9980$ 。

##### 1.2.3.2 GS/CS NPs 涂层钛板中 GS 的含量测定

取 10 块 GS/CS NPs 涂层钛板分别置于烧杯

中,倒入适量二氯甲烷,充分溶解后取出钛板,超声振荡 30 min,向烧杯中加入 20 ml 磷酸盐缓冲液(pH=7.4),超声振荡,取出水层,用紫外-可见分光光度计测定其在 248 nm 处的吸光度,由标准曲线算得钛板中 GS 的含量,去掉最大值与最小值,取 8 份样本的平均值。

##### 1.2.3.3 GS/CS NPs 涂层钛板的体外释药

体外 GS 释放率=释放介质中 GS 含量/涂层钛板中 GS 总量。取 10 块 GS/CS NPs 涂层钛板,分别置于含有 50 ml PBS 溶液(pH=7.4)的锥形瓶中,将锥形瓶置于恒温振荡器中,每隔 1 d 自锥形瓶中取出 5 ml 液体,用紫外-可见分光光度计测其在 248 nm 处的吸光度,同时立即向锥形瓶中补加 5 ml 同温度的新鲜介质,由标准曲线计算溶液中庆大霉素的浓度及累计释放率,取 10 份样本的平均值,绘制涂层中庆大霉素的累积释放曲线图。

##### 1.2.4 GS/CS NPs 涂层钛板的体外抑菌研究

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是导致内植物相关性感染最常见的致病菌之一<sup>[11]</sup>,因此本实验选择金黄色葡萄球菌作为研究对象。

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)划线接种于血平板上,37℃恒温箱中孵育 24 h,肉汤洗脱收集细菌并稀释,vitek 比浊仪测细菌密度为  $1 \times 10^8$  CFU/ml,取 0.5 ml 菌液,均匀涂布于 Mueller-Hinton(MH)平板上,将 10 块 GS/CS NPs 涂层钛板分别放置于 MH 平板的中央,37℃恒温箱中培养,48 h 后取出,观察抑菌效果,测量 10 份样本的抑菌环直径(取抑菌环最长径),去除 1 个最大值及最小值,计算剩余 8 份样本的平均值及标准差。再次将 GS/CS NPs 涂层钛板转放于涂有相同浓度金黄色葡萄球菌的 MH 平板上,37℃恒温培养 48 h,测量抑菌环直径。如此重复此过程,直到抑菌环消失。另取裸钛板、PDLLA 涂层钛板置于接种有金黄色葡萄球菌的 MH 平板上,作为对照组。所有参加此抑菌实验的钛板均经过环氧乙烷熏蒸消毒。

## 2 结果

### 2.1 GS/CS NPs 涂层钛板大体观

大体观察见钛板表面形成了一层致密的薄膜状物,较均一规则(图 1)。

### 2.2 GS/CS NPs 涂层钛板表面形态

扫描电镜检查示在钛板表面形成了一层致密的涂层,GS/CS NPs 较均匀地分布于钛板表面(图 2)。

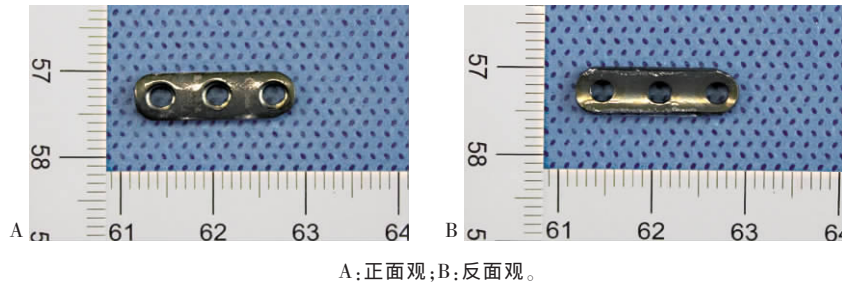


图1 GS/CS NPs 涂层钛板大体观

Fig 1 The appearance of the GS/CS NPs loaded plate

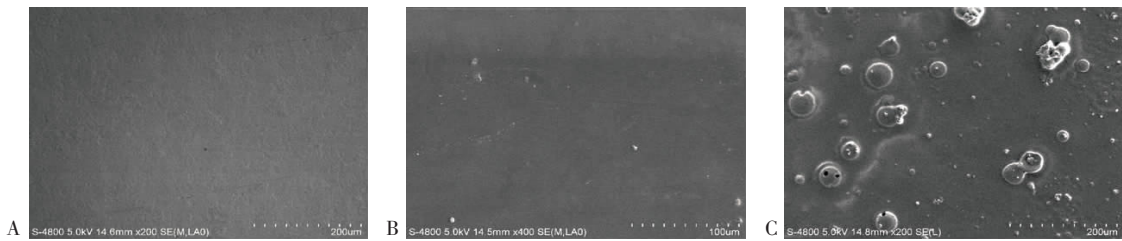


图2 钛板表面扫描电镜观察(×200)

Fig 2 The surface appearance of the plates by SEM(×200)

### 2.3 GS/CS NPs 涂层钛板的体外释药行为

由 1.2.3.2 测得GS/CS NPs 涂层钛板中 GS 含量平均为(441.60 ± 39.81) μg。

GS/CS NPs 涂层钛板放置于 PBS 溶液中 2、4、6、8、10、12 和 14 d,GS 累积释放率分别 15.17%、30.58%、40.63%、45.90%、50.63%、50.95% 和 51.18% (图 3)。由曲线可以看出 GS 在 6 d 之内呈现快速释放的过程,累积释放率达到 40%,此后 GS 的释放较平稳缓慢,维持在 52%左右,并持续约 14 d。

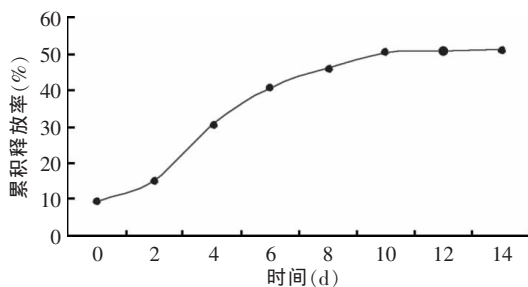


图3 GS/CS NP 涂层钛板中 GS 的累积释放率

Fig 3 The GS cumulative release of the GS/CS NPs loaded plate

### 2.4 体外抑菌结果

裸钛板、PDLLA 涂层钛板置于 MH 平板上培养,未见到明显的抑菌环出现。GS/CS NPs 涂层钛板置于 MH 平板上培养,可见到明显的抑菌环,在第 3 天抑菌环直径达到最大值,为 (3.82 ± 0.03) cm,此后呈缩小趋势,在第 11 天抑菌环消失(表 1,图 4)。

### 3 讨论

随着经济的发展以及医疗器械的改进,骨科内植物比如克氏针、钛板、人工关节假体等越来越多地应用于骨科疾病,而由这些内植物所引起的感染问题也逐渐凸显出来。Vester 等<sup>[3]</sup>认为随着西方社会步入老龄化阶段,人工关节假体及骨折内固定物的应用将会大大增加,这势必会导致内植物相关性感染率的增高。有资料显示到 2030 年,美国每年将进行约 380 万例关节置换手术,而每年发生的术后感染将突破 26 万例<sup>[12]</sup>。因此,内植物相关性感染的防治刻不容缓。

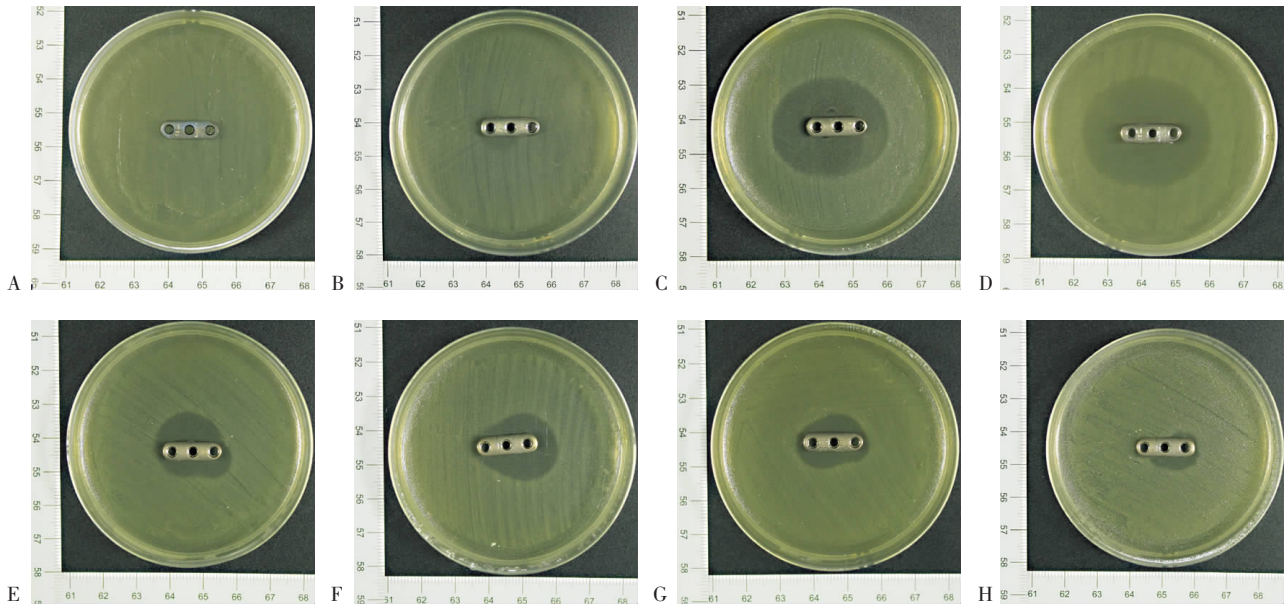
细菌黏附于内植物表面并生长繁殖进而导致了感染的发生<sup>[13]</sup>,细菌在内植物表面及周围组织形成生物膜<sup>[14-15]</sup>,能够阻止其免受抗菌药物及机体免疫系统的侵扰<sup>[15-18]</sup>。一旦生物膜形成,那么感染将会长期存在,治疗起来非常棘手<sup>[19]</sup>。由于上述情况,人们设想能否将抗生素涂布于骨科内植物表面,这样就能够保证病灶部位有效的抗菌素浓度,从而抑制生物膜的生长,杀灭细菌。抗生素涂层概念最早是由 Darouiche 等<sup>[20]</sup>提出并实施的,他将涂有氯己定及氯二甲酚的髓内钉植入兔胫骨开放性骨折模型中,研究其对于金黄色葡萄球菌的抗感染作用。Schmidmaier 等<sup>[21]</sup>于 2006 年称负载庆大霉素-PDLLA 涂层的髓内钉已通过欧洲及加拿大的 CE 认证,并被应用于 8 名胫骨开放性骨折患者的治疗中,在

表 1 三种钛板随时间变化的体外抑菌环直径

Tab 1 The diameter of the inhibition zone of each plate in vitro

(cm,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天	第 9 天	第 11 天
裸钛板	0	0	0	0	0	0
PDLLA 涂层钛板	0	0	0	0	0	0
GS/CS NPs 涂层钛板	3.44 ± 0.13	3.82 ± 0.03	2.31 ± 0.05	1.88 ± 0.05	1.52 ± 0.04	0



A:裸钛板;B:PDLLA 涂层钛板;C:GS/CS NP 涂层钛板(第 1 天);D:GS/CS NP 涂层钛板(第 3 天);E:GS/CS NP 涂层钛板(第 5 天);F:GS/CS NP 涂层钛板(第 7 天);G:GS/CS NP 涂层钛板(第 9 天);H:GS/CS NP 涂层钛板(第 11 天)。

图 4 三种钛板体外抑菌图

Fig 4 The anti-*Staph aureus* efficacy of the plates in vitro

1 年的随访期中,没有患者发生感染。Vester 等<sup>[3]</sup>研究了负载庆大霉素-PDLLA 的钛植入物的体内外释药动力学,显示其在骨组织内可以达到有效的抗生素浓度,并且不会诱导细菌耐药性的产生。以上一系列的研究报道都显示抗生素涂层内植物将会具有相当大的发展空间。

Schmidmaier 等<sup>[21]</sup>认为抗生素缓释涂层必须具备以下几点要求:①缓释系统必须确保药物的较快释放并且局部药物浓度达到某细菌的最低抑菌浓度;②药物的释放必须被限制在一定的时间内以防止细菌耐药性的产生;③应选用杀菌剂而不是抗菌剂;④药物载体必须能够自行降解,以避免二次手术取出。因此我们在前期试验研究的基础上,借鉴前人经验,采用溶剂铸膜(solvent casting)技术,制备了 GS/CS NPs 涂层钛板。庆大霉素具有较宽的抗菌谱、良好的骨组织穿透能力以及较强的杀菌作用,是局部用药的理想选择。GS/CS NPs 不仅可以延长庆大霉素的释放时间,改变庆大霉素的局部药代动力学,壳聚糖纳米粒本身还具有抑菌作用<sup>[22]</sup>。PDL-

LA 涂层在体内通过水解作用,3~6 个月降解完全,其降解产物进入柠檬酸循环而代谢,对人体无明显不良反应<sup>[23]</sup>。因此我们希望以 PDLLA 为媒介的涂层可以将 GS/CS NPs 负载于钛板上,既可以发挥 GS/CS NPs 的缓释作用,又可以发挥庆大霉素的杀菌作用,从而对防治内植物相关性感染起到积极的影响。从 GS/CS NPs 涂层钛板的扫描电镜照片可以看到 GS/CS NPs 比较均匀地分布于钛板上,体外释放试验显示庆大霉素的释放可以持续 14 d,体外抑菌实验表明 GS/CS NPs 涂层钛板对金黄色葡萄球菌有明显的抑制作用,最大抑菌圈直径为 (3.82 ± 0.03) cm,且抑菌时间可达 9 d,因此认为 GS/CS NPs-PDLLA 涂层钛板初步显示出良好的体外性能,比较好地满足了我们对于内植物涂层材料的要求。当然,进一步的评价还有待于更加深入的研究。

本实验制备了 GS/CS NPs 涂层钛板,并对其体外性能进行了一系列评价,初步表明 GS/CS NPs-PDLLA 涂层钛板具有比较好的性能指标。下一步的研究将更加深入地探讨 GS/CS NPs-PDLLA 涂层钛

板的体外性能以及其在动物感染模型治疗方面的作用。

[参考文献]

- [1] Berend KR, Sporer SM, Sierra RJ, et al. Achieving stability and lower limb length in total hip arthroplasty[J]. *Instr Course Lect*, 2011, 60:229-246
- [2] Ercan B, Kummer KM, Tarquinio KM, et al. Decreased *Staphylococcus aureus* biofilm growth on anodized nanotubular titanium and the effect of electrical stimulation [J]. *Acta Biomater*, 2011, 7(7):3003-3012
- [3] Vester H, Wildemann B, Schmidmaier G, et al. Gentamicin 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
- [4] Darouiche RO. Treatment of infections associated with surgical implants [J]. *N Engl J Med*, 2004, 350(14):1422-1429
- [5] Naraharsetti PK, Lew MD, Fu YC, et al. Gentamicin-loaded discs and microspheres and their modifications: characterization and in vitro release [J]. *J Control Release*, 2005, 102(2):345-359
- [6] Viguier E, Bignon A, Laurent F, et al. A new concept of gentamicin loaded HAP/TCP bone substitute for prophylactic action: in vivo pharmacokinetic study [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2011, 22(4):879-886
- [7] Gollwitzer H, Ibrahim K, Meyer H, et al. Antibacterial poly (D,L-lactic acid) coating of medical implants using a biodegradable drug delivery technology [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2003, 51(3):585-591
- [8] Lucke M, Schmidmaier G, Sadoni S, et al. Gentamicin coating of metallic implants reduces implant-related osteomyelitis in rats [J]. *Bone*, 2003, 32(5):521-531
- [9] Schmidmaier G, Wildemann B, Stemberger A, et al. Biodegradable poly (D,L-lactide) coating of implants for continuous release of growth factors [J]. *J Biomed Mater Res*, 2001, 58(4):449-455
- [10] 季金苟, 李红, 董瑾等. 硫酸庆大霉素/壳聚糖纳米球的制备及其释药性能 [J]. *中国抗生素杂志*, 2010, 35(10):767-770
- [11] Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, et al. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection [J]. *N Engl J Med*, 2007, 357(7):654-663
- [12] Bernthal NM, Stavrakis AI, Billi F, et al. A mouse model of post-arthroplasty *Staphylococcus aureus* joint infection to evaluate in vivo the efficacy of antimicrobial implant coatings [J]. *PLoS One*, 2010, 5(9):e12580
- [13] Gao G, Lange D, Hilpert K, et al. The biocompatibility and biofilm resistance of implant coatings based on hydrophilic polymer brushes conjugated with antimicrobial peptides [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(16):3899-3909
- [14] 毛彦杰, 沈灏, 蒋垚. 生物膜与人工关节假体感染关系研究进展 [J]. *中国修复重建外科杂志*, 2010, 24(12):1463-1468
- [15] Del P JL, Patel R. Clinical practice. Infection associated with prosthetic joints [J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(8):787-794
- [16] Aslam S. Effect of antibacterials on biofilms [J]. *Am J Infect Control*, 2008, 36(10):e9-11
- [17] Campoccia D, Montanaro L, Arciola CR. The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance [J]. *Biomaterials*, 2006, 27(11):2331-2339
- [18] Rodrigues LR. Inhibition of bacterial adhesion on medical devices [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2011, 715:351-367
- [19] Patel R. Biofilms and antimicrobial resistance [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2005, 437:41-47
- [20] Darouiche RO, Farmer J, Chaput C, et al. Anti-infective efficacy of antiseptic-coated intramedullary nails [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 1998, 80(9):1336-1340
- [21] Schmidmaier G, Lucke M, Wildemann B, et al. Prophylaxis and treatment of implant-related infections by antibiotic-coated implants: a review [J]. *Injury*, 2006, 37(Suppl 2):S105-112
- [22] 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
- [23] Schmidmaier G, Wildemann B, Bail H, et al. Local application of growth factors (insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1) from a biodegradable poly (D,L-lactide) coating of osteosynthetic implants accelerates fracture healing in rats [J]. *Bone*, 2001, 28(4):341-350

[收稿日期] 2011-07-13