

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 24520131153497

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

新型载万古霉素纳米纤维膜脱蛋白松质骨 支架修复感染性骨缺损的实验研究

A novel biodegradable vancomycin-eluting nanofiber-loaded
deproteinized bone scaffold for the treatment of infected
bone defect

高建廷

指导教师姓名: 丁真奇 教授

专业名称: 外科学 (骨科)

论文提交日期: 2016 年 4 月

论文答辩日期: 2016 年 5 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2016 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

英文缩写一览表

英文缩写	英文全称	中文全称
BMSCs	bone marrow mesenchymal stem cells	骨髓间充质干细胞
PBS	phosphate buffered saline	磷酸缓冲液
DPB	deproteinized cancellous bone	脱蛋白松质骨
CFU	colony forming unit	集落形成单位
MIC	minimal inhibitory concentration	最小抑菌浓度
PMMA	polymethyl methacrylate	聚甲基丙烯酸甲酯
MRSA	methicillin resistant staphylococcus aureus	耐甲氧西林金黄色葡萄球菌
SEM	scanning electron microscope	扫描电镜
HE	hematoxylin and eosin	苏木素和伊红
HPLC	high performance liquid chromatography	高效液相色谱法
Min	minute	分钟
H	hour	小时
D	day	天
W	week	周

摘要

目的: 1.利用静电纺丝技术制备可局部缓释万古霉素的新型载万古霉素纳米纤维膜脱蛋白松质骨支架,验证抗生素缓释效果、抑菌效果以及细胞相容性。2.通过植入兔感染性骨缺损模型,观察载万古霉素纳米纤维膜脱蛋白松质骨支架对感染性骨缺损的修复效果。

方法: 1.将万古霉素和聚乳酸乙醇酸溶解于六氟异丙醇配制电纺液,利用静电纺丝工艺纺出载万古霉素纳米纤维复合于牛脱蛋白松质骨支架表面。然后通过扫描电镜观察新型载万古霉素纳米纤维膜脱蛋白松质骨支架和牛脱蛋白松质骨支架的表面特征、高效液相色谱法检测新型抗生素缓释支架药物释放速率、抑菌实验观察支架的体外抗菌效果。最后将各组支架与兔间充质干细胞共培养以观察其对细胞增殖的影响。2.构建新西兰大白兔桡骨感染性骨缺损模型,随机分为三组,分别植入相应支架,A组(载万古霉素纳米纤维膜脱蛋白松质骨支架,12只),B组(未载万古霉素纳米纤维膜脱蛋白松质骨支架+静脉注射万古霉素1月,12只),C组(未载万古霉素纳米纤维膜脱蛋白松质骨支架,12只)。8w后进行X线观察及评分后,处死各组实验动物无菌取材进行HE染色观察及评分和细菌定量培养,对感染性骨缺损修复效果进行评估。

结果: 1.静电纺丝纺出载有万古霉素的聚乳酸乙醇酸纳米纤维紧密贴附于脱蛋白松质骨支架表面,其中纳米纤维直径约100~1200nm,表面孔径大小约1~5 μ m。体外释放实验结果显示洗脱液中第1d的万古霉素药物浓度最高,随后逐渐缓慢释放,维持在最小抑菌浓度以上的时间为4w。体外抑菌实验结果证实了经静电纺丝工艺处理后的万古霉素活性仍存在,有效抑菌圈可以维持至4w。载万古霉素纳米纤维膜脱蛋白松质骨支架与兔间充质干细胞共培养实验结果显示细胞增殖速度与其他两组的细胞增殖速度之间无明显统计学差异($P>0.05$)。2.植入支架8w后,放射性和组织学评分A组、B组和C组之间有显著差异($P<0.05$),A组成骨效果良好,骨痂和骨小梁较多,炎症细胞与纤维组织的较其他两组不明显。A组载万古霉素纳米纤维膜脱蛋白松质骨支架可明显降低感染部位的细菌量,与B组、C组相比有显著的统计学差异。

结论: 1.新型载万古霉素纳米纤维膜脱蛋白松质骨支架可缓慢释放活性万古霉素,有效抑菌时间长,且生物相容性好,是理想的局部抗生素缓释系统支架材料。
2.新型载万古霉素纳米纤维膜脱蛋白松质骨支架可有效修复兔感染性骨缺损模型。

关键词: 万古霉素; 支架; 静电纺丝; 纳米纤维膜; 骨缺损; 感染

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Objective: 1. To fabricate a novel biodegradable vancomycin-eluting poly(D,L)-lactide-co-glycolide (PLGA) nanofiber-loaded bovine deproteinized bone scaffold and observe the characteristics of them.

2. To observe and assess the efficacy of repair infected bone defect with novel biodegradable vancomycin-eluting nanofiber-loaded bovine deproteinized bone scaffold.

Methods: 1. We fabricated a biodegradable vancomycin-eluting poly(D,L)-lactide-co-glycolide (PLGA) nanofiber-loaded deproteinized bone scaffold that provided sustained delivery of vancomycin to repair infected bone defect. To fabricate the biodegradable vancomycin-eluting PLGA nanofiber-loaded deproteinized bone scaffold, PLGA and vancomycin were first dissolved in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propano (HFIP). The solution was then electrospun to produce biodegradable antibiotic-eluting membranes that were deposited on the surface of bovine deproteinized cancellous bone (DPB). We used scanning electron microscopy (SEM) to determine the properties of the scaffold. Both elution and high-performance liquid chromatography (HPLC) assays were used to evaluate the *in vitro* vancomycin release rate from the vancomycin-eluting PLGA nanofiber-loaded deproteinized bone scaffold. Three types of scaffolds were co-cultured with bacteria to confirm the *in vitro* antibacterial activity. 2. The infected bone defect rabbit model was induced by injecting 1.5×10^8 CFU of a staphylococcus aureus strain into the radial defect of rabbits. Animals were then separated into treatment groups and implanted according to the following scheme: vancomycin-eluting PLGA nanofiber-loaded deproteinized bone scaffold in group A, PLGA nanofiber-loaded deproteinized bone scaffold with intravenous vancomycin in group B, and PLGA nanofiber-loaded deproteinized bone scaffold alone in group C. Treatment efficacy was evaluated after eight weeks using radiological, microbiological and histological examinations.

Results: 1. *In vitro* results revealed that biodegradable vancomycin-eluting PLGA nanofiber-loaded deproteinized bone scaffolds released concentrations of vancomycin that were greater than the minimum inhibitory concentration for more than four weeks. Bacterial inhibition tests also confirmed antibacterial efficacy lasted for

approximately four weeks. When the scaffold materials were co-cultured with rabbit mesenchymal stem cells, relative cell survival factor declined slowly to the minimum of about 93.8% on the 6th day, and then increased slowly, which had no significant difference statistically among three groups.

2. Radiological and histological scores obtained *in vivo* revealed significant differences between groups A, B and C. Importantly, group A had significantly lower bacterial load and better bone regeneration when compared to either group B or C.

Conclusions: **1.**The biodegradable vancomycin-eluting PLGA nanofiber-loaded deproteinized bone scaffold possessed sustained release of vancomycin, effective bactericidal activity against staphylococcus aureus and good cytocompatibility. **2.** The biodegradable vancomycin-eluting PLGA nanofiber-loaded deproteinized bone scaffold can effectively repair rabbit infected bone defect.

Keywords: vancomycin; scaffold; electrospinning; nanofiber-membrane; bone defect; infection

目 录

英文缩写一览表	I
中文摘要	II
英文摘要	IV
中文目录	VI
英文目录	VIII
前言	1
第一章 新型载万古霉素纳米纤维膜脱蛋白松质骨支架的制备及性能研究	8
1 材料与方法	9
1.1 主要实验试剂及耗材.....	9
1.2 主要实验仪器.....	9
1.3 主要试剂的配制.....	10
2 主要实验方法	10
2.1 脱蛋白松质骨支架的制备.....	10
2.2 新型载万古霉素纳米纤维膜脱蛋白松质骨支架的制备.....	11
2.3 新型载万古霉素纳米纤维膜脱蛋白松质骨支架的表面特征.....	11
2.4 新型载万古霉素纳米纤维膜脱蛋白松质骨支架体外万古霉素释放试验.....	12
2.5 新型载万古霉素纳米纤维膜脱蛋白松质骨支架体外抗菌试验.....	12
2.6 新型载万古霉素纳米纤维膜脱蛋白松质骨支架细胞相容性试验.....	12
2.7 统计学分析.....	13
3 结果.....	14
4 讨论.....	17

5 结论.....	19
第二章 新型载万古霉素纳米纤维膜脱蛋白松质骨支架修复兔感染性骨缺损研究	20
1 材料与仪器	21
1.1 实验动物.....	21
1.2 主要试剂及仪器.....	21
2 主要实验方法	21
2.1 动物模型的制备.....	21
2.2 实验分组.....	22
2.3 大体观.....	22
2.4 放射性检查.....	22
2.5 组织学检查.....	23
2.6 细菌学检查.....	24
2.7 统计学分析.....	25
3 结果.....	25
4 讨论.....	29
5 结论.....	30
第三章 全文结论	31
参考文献	32
综述	40
致谢	50

Table of Content

Table of English abbreviation	I
Abstract in Chinese	II
Abstract in English	IV
Table of Content in Chinese	VI
Table of Content in English	VIII
Introduction	1
Chapter 1 Preparation and characteristics of a novel biodegradable vancomycin-eluting nanofiber-loaded deproteinized bone scaffold	8
1 Materials and instruments	9
1.1 Main reagent and supplies	9
1.2 Main experimental instruments	9
1.3 Preparation of main reagent	10
2 Methods	10
2.1 Fabrication of deproteinized cancellous bone scaffold	10
2.2 Fabrication of biodegradable vancomycin-eluting nanofiber-loaded deproteinized bone scaffold	11
2.3 Surface morphology	11
2.4 <i>In vitro</i> vancomycin release	12
2.5 <i>In vitro</i> antibacterial activity	12
2.6 Cell compatibility	12
2.7 Statistical analysis	13
3 Results	14
4 Discussion	17
5 Conclusion	19
Chapter 2 A biodegradable vancomycin-eluting nanofiber-loaded	

deproteinized bone for treatment of infected rabbit bone defect20

1 Materials and instruments	21
1.1 Experimental animals.....	21
1.2 Main reagent and instruments	21
2 Methods	21
2.1 Preparation of animal models	21
2.2 Experimental grouping.....	22
2.3 Gross morphology.....	22
2.4 Radiology.....	22
2.5 Histological observation	23
2.6 Microbiology.....	24
2.7 Statistical analysis	25
3 Results.....	25
4 Discussion.....	29
5 Conclusion	30
Chapter 3 Conclusion	31
References	32
Review	40
Acknowledgements	50

前言

1.1 感染性骨缺损发病情况

随着现代科技的发展和快节奏的生活,工作及交通事故的增多,开放性伤口逐渐增多,尤其是开放性骨折,使污染或感染的骨缺损发生率大幅度增加,而对这类骨缺损的治疗一直是骨科领域的治疗难题。即使对严重开放性骨折处理训练有素的手术医生去处理开放性骨折,其术后感染的发生率平均为 20%,严重的可高达 50%^[1]。考虑到许多创伤骨科病人年轻,开放性骨折相关的并发症导致患者不能返回到生产生活中,势必会对社会构成实质性的财政负担。

1.2 感染性骨缺损感染难以控制的原因

探究感染性骨缺损难以治疗的原因,主要有以下几个方面:①慢性炎症会使局部纤维组织增生,形成瘢痕组织,血管长入的数量相对减少,导致局部血液供应较差,全身应用抗菌药物,药物在感染灶局部的浓度难以达到杀菌效果;②细菌可在寄居的组织部位形成生物膜,生物膜可抵抗免疫物质以及抗菌药物的攻击,大大增强细菌对抗生素的耐药性,据文献报道,产生物膜的细菌的抗药性比不产生物膜的细菌强 100~1000 倍^[2];③感染灶部位的免疫防御机制下降,对细菌的免疫应答反应降低;④细菌增殖速率加快以及大量的病原菌在细胞内产生占位效应^[3]。此种状态下,即使通过大剂量静脉输入抗生素以及应用感染局部的抗生素缓释系统在局部聚集高浓度的抗生素,杀灭局部细菌也很棘手。

1.3 细菌生物膜在内植物感染中的作用

据不完全统计,清洁手术中内置物相关的感染发生率为 2%~5%,开放骨折时感染率可高达 30%,会带来拆除内植物、加重感染、甚至死亡的严重后果^[4]。常见的病原微生物包括 G⁺菌种表皮葡萄球菌,金黄色葡萄球菌以及 G⁻菌种绿脓杆菌等^[5]。对于细菌如何引起以及加重感染的机制进行探讨。细菌黏附、定植以及生物膜的形成是引起内置物感染的主要原因^[6]。细菌生物膜分泌细菌成分如蛋白质、脂质、脂多糖和 DNA,围绕细菌形成一层基质屏障,阻滞抗生素以及免疫物质渗透,从而抵抗抗生素的治疗和免疫防御。细菌的生物膜具有较高的突变率,长期暴露于抗生素,突变增强,从而加速向耐药表型发展^[7,8]。

感染性骨缺损的治疗需要同时满足两个条件:一是植入骨支架材料填补缺

损。二是植入固定物稳定骨缺损的两端。感染情况下植入内固定物被视为禁忌证。而全身性抗生素治疗在感染局部的药物浓度往往不足以杀灭细菌，细菌会在内置物表面形成生物膜，加重感染。大量动物实验及临床研究表明，赋予植入材料持久的局部抗菌活性，缓慢释放有效抗菌浓度的抗生素，可抵制生物膜的形成，促进感染性骨缺损的修复。

1.4 感染性骨缺损临床治疗策略

伤口彻底清创、充分的冲洗，再辅以全身性抗生素的应用，外固定器械固定骨折稳定患肢，以允许软组织条件的改善和恢复。彻底清除所有的坏死组织及异物，从而消除细菌滋生的环境，这是处理严重的开放性骨折最重要的环节。外固定架跨越伤口暂时稳定骨折端，其组件不会接触到伤口。局部临时的抗生素应用如载药的聚甲基丙烯酸甲酯（PMMA）串珠，可放置伤口内，以增加骨缺损处抗菌水平^[9]。第二阶段是手术移除缺损处的聚甲基丙烯酸甲酯珠粒，然后给予坚强的固定和骨移植术。

骨缺损需移植自体骨和骨替代物进行修复。其中自体骨通常从患者的髂嵴取材，是目前公认的最理想骨替代修复材料。它具有骨传导性、骨诱导性以及促进成骨性能，而且无排斥反应，无传播疾病风险，大大减少医疗费用。虽然效果最令人满意，但是病人自身可取的骨源有限，不能充分供给大段骨缺损修复需要，而且取骨增加病人的创伤，产生相关的并发症等。INFUSE 品牌的骨替代物这已被证实可用于大段骨缺损的治疗^[10]，其治疗效果和自体移植相当，甚至超过其治疗效果，而且不需要取材手术^[11]。髓内针作为较传统的固定装置，但是会有增加感染率的风险，进而被环固定器等外固定装置替代^[12]。环固定器的一个显著的优势是提供的稳定同时，不会将装置与创伤污染部位接触，其成本显著高于传统髓内针。

感染或污染部位的处理流程如下：传统的临床治疗要求将坏死的组织和污染物从开放性骨折的创面彻底清除干。经过清创和冲洗过程后，大量的细菌被清除，剩余的较大部分经系统性应用的抗生素杀灭。然而，系统性抗生素治疗会出现潜在的系统性毒副作用，如耳毒性、肾毒性、神经毒性等等，而且很难使抗生素在感染部位的实现高浓度，杀菌效果差，形成耐药性，长期抗生素的治疗，使病人的承受精神和身体的痛苦体验。移植载抗生素的 PMMA 串珠至缺损部位，保持缺损部位不被纤维组织侵占，并在局部释放高浓度的抗生素，临床前研究^[13]、大量

的回顾性临床研究^[14]证实可减少感染的发生,但是前瞻性临床研究^[15]结果并未证实。因为 PMMA 珠粒不能降解吸收,以及 2~6w 后释放的抗生素锐减,需在植入最后的移植材料前手术取出^[16]。相反,硫酸钙小球可以在体内降解,可与抗生素混合,可作为最后的移植材料,也可与最后的移植材料复合移植^[17]。然而,硫酸钙颗粒在某些情况下有血清肿问题^[18],在大的骨缺损的修复,不能满足再生骨的生物学挑战。

具有成骨活性或骨诱导活性的骨移植物可以促进新骨的形成,但是这些支架不能清除残留在伤口的细菌和医院内或血液引入到伤口的细菌。自体骨移植和人重组组织骨形态蛋白可促进骨愈合,但也不是总是奏效,一份研究报告^[19]显示大段开放性骨缺损(平均缺损长度为 4cm)使用以上方法进行修复治疗而无其他干预措施时,仅 70%取得良好的效果。进一步讲,大段开放性骨折伴骨缺损的患者,进行自体骨移植取材时,从髂嵴可取材的自体骨不足以用于移植。此外,胶原蛋白海绵突释人重组组织骨形态蛋白,需要大剂量的人重组组织骨形态蛋白,治疗费用昂贵。下肢评估项目研究还显示骨折不愈合和畸形愈合率高(37%)。因此当前治疗严重开放性骨折的方法需要控制感染和诱导新骨形成,以确保营造组织整合的的界面,否则,将导致严重的开放性骨折的感染发病率高($\geq 20\%$)^[1]。

1.5 感染性骨缺损治疗的研究现状

组织工程和药物释放用于治疗多种疾病,解决当今临床难题,有广阔的前景,其中最活跃的两个方面主要是预防感染和促进骨愈合,用于高能量创伤导致的四肢的开放性骨折的治疗。这类开放性骨折感染严重,可伴大段的骨缺失,且软组织条件破坏严重。

组织工程的提出,为骨缺损的治疗带来了广阔的临床前景。近年来应用组织工程技术和生物工程技术的不断成熟和发展,在体外构建的组织工程化骨已经成功应用于修复股骨和牙槽骨的骨缺损。以患者自体骨髓间充质干细胞作为种子细胞构建组织工程化骨修复牙槽骨、颅骨、四肢骨等部位的骨缺损以及修整颅面部骨凹陷所致的畸形,均取得了令人满意的治疗效果。骨组织工程由三种基本生理因素构成:①种子细胞,可以由前体细胞如干细胞诱导而来,研究比较多的是骨髓间充质干细胞;也可以是在类似的微环境中生长产生的骨细胞。②促进细胞分化和生长活动的生物因子,可以由体外提供;也可以由转化细胞产生;也可以从宿主的基质或分泌细胞获得。③支架,是细胞赖以生长的材料,它可以吸附生

物活性物质，如促进粘附、分化和生长的因子等，可逐渐降解并被种子细胞产生的基质取代^[19]。理想的骨组织工程支架材料应具备可在体内降解、良好的生物相容性、合理的多孔隙连接的三维结构，可塑性和一定的抗压强度以及良好的细胞接触界面等特点。在新渗透的成骨细胞未完全充填支架之前，骨折部位从明胶海绵快速释放的骨形态蛋白已扩散到支架内部，增强新骨的形成。INFUSE 品牌的骨移植材料，可释放有效的骨形态蛋白，被 FDA 批准用于脊柱手术中^[20]。但是也有并发症的报道，如异位成骨、瘫痪、脑脊液眼瘘和呼吸衰竭，在前颈椎移植手术尤为普遍。

用于固定开放性骨折装置的污染是一个常见的临床问题，减少其感染率的策略目前也在研究中。溶胶-凝胶技术制备的含万古霉素钙磷膜涂覆于 Ti-6Al-4V 固定装置表面，可减少金黄色葡萄球菌数，在大鼠骨髓炎模型研究中表明有减少感染和骨吸收的效果^[21]。溶胶-凝胶膜的降解是调节药物释放主要的机制，通过控制溶胶-凝胶的工艺参数，释放的万古霉素的浓度可超过金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度（MIC）^[22]。植骨之前，开放性骨折需植入含抗生素材料处理（例如聚甲基丙烯酸甲酯珠），以减少感染的几率。许多方法用以延长局部药物递送系统抗生素释放周期也已在研究中，如可降解壳聚糖海绵^[23]，可注射粒子和水凝胶，以及由可降解聚合物制备的支架。据报道硅溶胶-凝胶（干凝胶）具有可调的释放动力学特性，可实现了长达 6w 的万古霉素的缓释^[24, 25]。由二氧化硅干凝胶和壳聚糖组成的复合材料，具有增加移植材料的屈服强度、屈服应变力和工作断裂的临界点，并且材料的中空的结构可增大万古霉素的有效加载量^[26]。在最近的研究中，麻醉药（利多卡因）和抗生素（莫匹罗星）被嵌在静电纺丝的聚乳酸的纳米纤维支架内，实验结果显示可释放 3 天有效活性的药物，并且两种药物以不同比例的存在于相同的聚合物基质中，其释放动力学特点也会有相应的变化^[27]。然而，先将亲水抗生素强力霉素封装到 PLGA 的纳米球内，然后再嵌入静电纺丝的聚乳酸纳米纤维支架内，可实现超过 6w 的抗生素的持续释放^[28]。通过调节 PLGA 纳米球的组成和分子量大小，可实现药物释放周期从数天至数周的变化。

1.6 骨缺损修复材料

1.6.1 异体骨

包括同种异体骨和异种异体骨。同种异体骨来源于尸体以及截肢的肢体，临床上进行异体植骨后，受体排斥反应并不明显，似乎不像其他组织移植那样会成

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.