

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2023.22.006

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20230614.1214.004\(2023-06-15\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20230614.1214.004(2023-06-15))

骨内植入物表面酶响应型涂层改性精准防治术后相关感染研究*

余海平,黄家琦,李哲,肖捷,白欣,汪燕萍,廖鑫[△]

(建德市第一人民医院骨科,浙江建德 311600)

[摘要] **目的** 在骨内植入物表面构建 10 个双层蒙脱土/透明质酸-替考兰宁[(MMT/HA-TEC)₁₀]多层膜抗菌涂层,探索其酶响应性抗菌效果。**方法** 通过原子粒显微镜观察多层膜抗菌涂层表面形貌,光谱椭圆偏振法测试其厚度和全自动接触角测量仪测量其表面接触角。采用抑菌环实验探索抗菌涂层的抗生素在接触酶和细菌的情况下的缓释规律。电导率、细胞外蛋白水平检测和抑菌效果测试,宏观展示抗菌涂层的抗菌效果;采用高压蒸汽灭菌法测试抗菌涂层的抑菌稳定性。采用细菌活死染色实验探索抗菌涂层表面清除死亡细菌的能力。采用 CCK-8 实验法分析抗菌涂层的生物相容性。动物实验检测抗菌涂层的体内抗菌效果。**结果** (MMT/HA-TEC)₁₀ 多层膜抗菌涂层在组装过程中,厚度呈线性增长,从(8.16±1.36)nm 增长至(113.28±4.44)nm。接触角也明显变大,从组装前的 27.1°变为组装后的 65.0°。(MMT/HA-TEC)₁₀ 多层膜抗菌涂层在与金黄色葡萄球菌和透明质酸酶(HAS)溶液孵育后逐渐降解,并显示出良好的浓度依赖性降解特性。抗菌涂层是通过改变细菌细胞膜的通透性来实现高效的杀菌效果,在经过高压蒸汽灭菌处理后其杀菌率依然>99%,并且在一定程度上可以清除材料表面的死亡细菌。CCK-8 实验显示(MMT/HA-TEC)₁₀ 多层膜抗菌涂层具有良好的生物相容性。动物实验表明(MMT/HA-TEC)₁₀ 多层膜抗菌涂层在体内依然具有良好的抗菌作用。**结论** (MMT/HA-TEC)₁₀ 多层膜抗菌涂层具有高效的酶响应性抗菌功能。

[关键词] 抗菌;酶响应性;抑菌环;电导率;活死染色**[中图法分类号]** R318.08 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2023)22-3397-08

Enzyme-responsive coating modification on surface of intrasosseous implants for precise prevention and treatment of postoperative related infection*

YU Haiping, HUANG Jiaqi, LI Zhe, XIAO Jie, BAI Xin, WANG Yanping, LIAO Xin[△]

(Department of Orthopedics, Jiande Municipal First People's Hospital, Jiande, Zhejiang 311600, China)

[Abstract] **Objective** To construct the (MMT/HA-TEC)₁₀ multilayer antibacterial coating on the surface of intrasosseous implants, and to explore its enzyme-responsive antibacterial effect. **Methods** The antibacterial coating structure was observed by the atomic particle microscopy, its thickness was measured by the spectral ellipsometry method and the surface contact angle was measured by the fully automatic contact angle measurement instrument. The inhibition loop experiment was used to investigate the slow release rule of antibiotics with antibacterial coating in contact with enzymes and bacteria. The conductivity rate, extracellular protein level detection and bacteriostatic effect test macroscopically exhibited the bacteriostatic effect of the antibacterial coating, and the antibacterial stability of the coating was tested by the high pressure steam sterilization. The bacterial live-dead staining experiments was used to explore the ability of antibacterial coating surface for clearing the dead bacteria. The CCK-8 assay was used to analyze the biocompatibility of antibacterial coating. The animal experiment was used to emphatically explore the in vivo antibacterial effect of the antibacterial coating. **Results** The (MMT/HA-TEC)₁₀ antibacterial coating thickness showed the linear growth from (8.16±1.36)nm to (113.28±4.44)nm during its assembly process. The contact angle was also significantly enlarged, which was changed from 27.1° before assembly to 65.0° after assembly. The (MMT/HA-TEC)₁₀ antibacterial coating was gradually degraded after the incubation with Staphylococcus aureus and hyaluronidase (HAS) solutions, showing the good concentration dependent degradation properties. The antibacterial coating

* 基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2022RC244);浙江省杭州市医药卫生科技项目(B20220091)。 作者简介:余海平(1974-),主任医师,学士,主要从事创伤、脊柱等疾病的临床、教学和科学研究。 [△] 通信作者, E-mail: LXsunshine2020@163.com。

achieved the efficient bactericidal effect by changing the permeability of bacterial cell membrane. After the high pressure steam sterilization treatment, its bactericidal rate was still greater than 99%, and it could remove the dead bacteria on the material surface to some extent. The CCK-8 test showed that the (MMT/HA-TEC)₁₀ antibacterial coating possessed the good biocompatibility. The animal experiments showed that the antibacterial coating still had a good antibacterial effect in vivo. **Conclusion** The (MMT/HA-TEC)₁₀ antibacterial coating has a highly efficient enzyme-responsive antibacterial function.

[Key words] antibacterial; enzyme responsiveness; bacteriostasis ring; conductivity; live and dead staining

随着包括关节假体、钢板、克氏针、螺钉等在内的骨内植入物越来越广泛地应用到临床治疗中,术后带来的骨内植入物感染的问题不容小觑^[1]。骨内植入物一旦植入人体,尤其在开放性骨折中,会明显增加感染的风险^[2]。根据有关报道,人工关节置换术后的相关感染率为 2%,而在骨折切开复位内固定术后,骨内植入物感染的发生率更是高达 5%^[3]。然而临床上常规的静脉输注抗生素的方法并不能较好地解决该问题,所以上述问题引起了越来越多的临床医生和研究人员的重视^[4]。随着材料科学的进步,基于有机和无机材料所研究制备的抗生素缓释系统开始进入大家的视野,并取得了一定的成果。PENG 等^[5]对钛内植入物表面进行壳聚糖季铵盐涂层改性,发现可以高效抑制细菌生长。KAZEMZADEH 等^[6]在钛内植入物表面构建抗菌肽(CaP-Tet123)涂层,表现出对绿脓杆菌和金黄色葡萄球菌强有力的杀灭效果。然而,上述表面涂层作为抗菌药物载体的最大问题是难以局部稳定地释放药物的有效剂量。药物释放早期往往存在一个“暴释”阶段,然而难以保持长期准确的药物释放量,从而不能实现对细菌的精准杀灭。研究人员逐渐将目光聚焦于对某些刺激敏感的给药系统。这些系统可以有效地控制药物的释放,避免药物过度释放或长期低浓度释放引起的弊端。研究显示,细菌感染时周围环境会分泌大量透明质酸酶(HAS)和磷脂酶^[7]。蒙脱土(MMT)是一种土状矿物,拥有独特的一维层状纳米结构,并具有高比表面积的特点,因此可以将抗生素包含在层层组装多层膜结构中,以此来负载高百分比的抗生素并防止其“暴释”^[8]。透明质酸(HA)是一种酸性黏多糖,在生物体内广泛分布,具有良好的生物相容性和保湿性,在关节、眼科等领域有着较为广泛的应用^[9]。替考兰宁(TEC)是一种新糖肽类抗生素,革兰阳性菌(链球菌、葡萄球菌、肠球菌等)对其比较敏感。临床上主要将 TEC 用于由金黄色葡萄球菌等敏感菌所导致的严重感染^[10]。本研究利用上述特点,利用层层组装技术,以 MMT、HA 和 TEC 为原料,制备多层膜抗菌涂层,并通过体内外实验,测试多层膜抗菌涂层的抗菌效果,以期精准防治术后骨内植入物相关感染问题提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

健康清洁级雄性 SD 大鼠,体重 200~220 g,购自 SLAC 实验动物有限公司(中国上海)。MMT、HA、TEC、24 孔板、玻璃细胞爬片均购自上海阿拉丁试剂有限公司,Live/Dead BacLight 试剂盒购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司, LB 肉汤购自大连美伦生物技术有限公司,金黄色葡萄球菌购自北京百欧博伟生物技术有限公司,硅片购自红晶光电科技股份有限公司,克氏针购自上海开为医药科技有限公司, X 光机购自丹东奥龙射线仪器集团, micro CT 影像系统购自美国 PerkinElmer 公司。

1.2 方法

1.2.1 多层膜的制备

将基材(克氏针、细胞爬片等)依次在丙酮、无水乙醇和去离子水中超声处理 10 min,后用氮气吹干,密封保存。制备 MMT 原液(0.5 mg/mL)和 HA 原液(1 mg/mL)。进一步,以 HA 原液为母液,加入 TEC,配置 HA-TEC 溶液(1 mg/mL)。在组装前,上述溶液均通过超声处理 2 h 分散。将基材按顺序浸入 MMT 和 HA-TEC 溶液中各 15 min,并使用氮气进行吹干,以此记录为一双层。重复上述步骤,一共重复 10 次,最终在基材表面构建 10 个双层 MMT/HA-TEC[(MMT/HA-TEC)₁₀]多层膜抗菌涂层。

1.2.2 材料学表征

通过原子粒显微镜检测,观察(MMT/HA-TEC)₁₀ 抗菌涂层的表面形貌。采用光谱椭圆偏振法测量组装过程中抗菌涂层厚度的变化情况。继续使用全自动接触角测量仪测量基材表面组装前、后接触角变化。

1.2.3 抑菌环变化

以硅片(1 cm×1 cm)作为实验基材,按照 1.2.1 中介绍的方法,在硅片表面构建(MMT/HA-TEC)₁₀ 多层膜抗菌涂层。将上述硅片分别浸泡入医用生理盐水、80 U/mL HAS 溶液、150 U/mL HAS 溶液、1×10³ CFU/mL 金黄色葡萄球菌溶液(*S. aureus*)、1×10⁷ CFU/mL 金黄色葡萄球菌溶液(*S. aureus*)中 20 h。待浸泡完规定时间后,从不同溶液中取出所有硅片,氮气吹干备用。采用移液枪吸取 100 μL 金黄色葡萄球菌溶液(1×10⁸ CFU/mL)滴在无菌营养琼脂平板中间,使用涂菌棒将细菌涂覆均匀,将硅片轻轻贴在琼脂平板中央。将所有琼脂平板置入细菌培

养箱 37 °C 培养 48 h, 最后测量并比较形成的抑菌环大小。

1.2.4 电导率、细胞外蛋白水平检测、抗菌效果测试

细菌细胞膜可以调控细胞外液和细胞内液之间的 K^+ 、 Na^+ 、蛋白和核苷酸等物质的跨膜转运。一旦细胞膜的通透性发生变化, 可以导致细胞外的离子和大分子物质的数量发生变化, 进一步引起细胞外液的电导率发生变化。总之, 通过测试电导率可以评估多层膜结构对细菌细胞膜通透性的影响。细菌细胞膜内存在丰富的蛋白质, 同理, 当细胞膜的结构完整性受到破坏之后, 蛋白质大分子会扩散到细胞外液中。取克氏针作为基材, 在克氏针表面构建 (MMT/HA-TEC)₁₀ 多层膜抗菌涂层。采用高压蒸汽灭菌法对表面构建有 (MMT/HA-TEC)₁₀ 多层膜抗菌涂层的克氏针进行灭菌, 具体如下: 将上述克氏针放入高压蒸汽灭菌锅, 在 103.4 kPa (1.05 kg/cm²) 蒸汽压、121.3 °C 的环境下, 维持 20 min, 待自热冷却后, 放置在专用无菌物品室中, 并保存 14 d。根据文献报道, 遵从固体器械 (不规则形状) 表面积与浸提液的体积按 0.2 g/mL 的比例原则制备实验所需提取液^[11]。

对刚制备好的表面构建有 (MMT/HA-TEC)₁₀ 多层膜抗菌涂层的克氏针和经过高压蒸汽灭菌储存的该型克氏针分别制备提取液。制备过程如下: 采用 LB 液体培养基为提取液介质, 提取过程在恒温摇床 (37 °C, 100 r/min) 内进行, 持续 48 h, 最终获得提取液。取对数生长期的金黄色葡萄球菌悬液, 分别以 LB 液体培养基、(MMT/HA-TEC)₁₀ 多层膜抗菌涂层提取液和高压蒸汽灭菌储存的该型克氏针制备的提取液为母液, 配制浓度为 1×10^8 CFU/mL 的金黄色葡萄球菌悬液。实验分为 3 组, 分别为 LB 组、(MMT/HA-TEC)₁₀ 组和高压蒸汽灭菌组。3 组均在细菌培养箱中依次培养 2、6、10 h, 离心机离心 (6 000 r/min) 10 min 后提取上清液, 分别检测金黄色葡萄球菌混合液电导率值和蛋白在 280 nm 波长处的吸光度 (A) 值。为了宏观展示 (MMT/HA-TEC)₁₀ 多层膜结构的抑菌效果, 上述 3 组金黄色葡萄球菌混合液在细菌培养箱中依次培养 0、5、10 h 后, 每组吸取 100 μ L 滴在无菌营养琼脂平板中间, 进行细菌培养计数。

1.2.5 细菌活死染色

以 24 孔板玻璃细胞爬片作为基材, 在玻璃爬片表面构建 (MMT/HA-TEC)₁₀ 多层膜抗菌涂层, 未修饰的空白玻璃爬片作为对照组。实验采用 Live/Dead BacLight 试剂盒, 细胞膜受损或者已经死亡的细菌会被染成红色, 而细胞膜完好的细菌则是染成绿色。具体地说, 将对照组和 (MMT/HA-TEC)₁₀ 组细胞爬片经紫外杀菌后放置在 24 孔板中, 每孔中加入 1 mL 金黄色葡萄球菌悬液 (1×10^6 CFU/mL), 并放置于 37 °C 恒温孵箱中震荡培养 6 h, 之后进行细菌活死染色^[12]。最后使用荧光显微镜在避光条件下观察,

拍照。

1.2.6 生物相容性实验

采用 CCK-8 实验法分析 (MMT/HA-TEC)₁₀ 多层膜抗菌涂层对大鼠 MC3T3 细胞的生长和增殖影响。使用 96 孔板培养细胞, 每孔接种约 1.0×10^4 个 MC3T3 细胞, 在标准化条件下进行培养。培养 24 h 后, 每孔加入 200 μ L 1.2.4 中获得的提取液, 其余孔加入等量含血清培养液作为空白组。在第 2、4、6 天, 将 CCK-8 试剂加入 96 孔板中并孵育 2 h, 并在 450 nm 波长处测定 A 值^[13]。

1.2.7 动物实验

1.2.7.1 模型大鼠构建

取健康清洁级雄性 SD 大鼠 (体重 200~220 g) 45 只, 造模之前所有大鼠自由饮水, 禁食 8 h, 并进行编号、称体重、分组。共分成 3 组: 空白组、(MMT/HA-TEC)₁₀ 组、假手术组, 每组 15 只。具体造模过程如下: 使用 10% 水合氯醛进行腹腔注射对大鼠进行麻醉, 待麻醉成功后, 大鼠取仰卧位, 四肢固定、备皮、碘伏消毒、铺无菌洞巾。逐层切开皮肤、肌肉, 暴露大鼠胫骨平台, 注意动作轻柔, 最大限度保护血管、神经、韧带, 必要时可以采用钝性分离。将无菌克氏钻头 (0.8 mm) 垂直与大鼠胫骨平台, 摇动手摇转将克氏针缓慢钻入骨髓腔, 构建隧道, 注意不要破坏骨髓腔侧壁, 抽吸少许骨髓。先往空白组大鼠的骨髓腔内注入 5 μ L 金黄色葡萄球菌悬液 (1×10^6 CFU/mL), 然后置入表面未进行修饰的克氏针, 最后使用骨蜡封住胫骨平台的缺口, 逐层缝合。(MMT/HA-TEC)₁₀ 组先在骨髓腔内注入 5 μ L 金黄色葡萄球菌悬液 (1×10^6 CFU/mL), 然后置入表面进行 (MMT/HA-TEC)₁₀ 修饰的克氏针。假手术组不注入金黄色葡萄球菌, 但是放置未进行修饰的克氏针, 其余操作步骤同空白组。缝合结束后, 皮肤伤口再次进行消毒, 最后行麻醉复苏, 在标准环境下 (给予充足饲料和水, 自由饮食, 隔离饲养, 保持饲养环境干燥, 使用灭菌处理的垫料, 3 d 更换一次, 正常光照, 日温差 3 °C 以内, 湿度 40%~60%, 噪音 < 60 dB) 继续饲养 6 周。

1.2.7.2 炎症指标测定

待术后饲养 6 周后, 过量麻醉处死所有大鼠, 依次从大鼠心脏抽取血液, 分离血清, 根据试剂盒上操作步骤, 采用 ELISA 法测定各组大鼠血清中白细胞介素 (IL)-6、IL-10、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的水平^[14]。

1.2.7.3 病理学检查

待大鼠处死之后, 使用钢锯将大鼠手术一侧胫骨平台骨组织锯下 (从胫骨平台往下约 3 cm)。使用多聚甲醛溶液将骨组织固定 48 h, 之后用 EDTA 脱钙液进行脱钙, 待完成脱钙之后, 根据操作说明将标本进行冯库萨 (Von kossa) 和苏木素-伊红 (HE) 染色^[15-16]。Von kossa 染色是染色矿化结节的经典实验方法, 原理是利用硝酸银与钙盐的复分解反应形成可被

还原的银盐,在强光或紫外光下或者强还原剂作用下使其还原为黑色的金属银^[15]。在本实验中,可以理解为在镜下的黑染区域越多,证明大鼠的成骨效果越好。

1.3 统计学处理

采用 SPSS18.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用方差分析,计数资料组间比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 材料学表征

图 1A 是(MMT/HA-TEC)₁₀ 多层膜抗菌涂层的原子粒显微镜图,其表面粗糙度为 84.5 nm。进一步通过光谱椭圆偏振法监测多层膜在组装过程中膜厚度的变化情况,总体而言,膜厚度的变化呈线性增长趋势,即随着组装层数的增加,膜的厚度不断增加。具体而言,当组装 2 个双层之后,多层膜的厚度为(20.22±2.53)nm。(MMT/HA-TEC)₆ 多层膜抗菌涂层厚度为(64.38±2.57) nm。当 10 个双层全部组

装结束之后,检测得(MMT/HA-TEC)₁₀ 多层膜抗菌涂层的厚度为(113.28±4.44) nm,见图 1B。接触角从组装前的 27.1°变化为组装结束之后的 65.0°,见图 1C、D。

2.2 抑菌环变化

抑菌环的大小可反映(MMT/HA-TEC)₁₀ 多层膜抗菌涂层在不同环境下(酶和细菌)的抗生素缓释情况。相比在生理盐水中浸泡,多层膜在接触 HAS 和金黄色葡萄球菌后,抑菌环明显变大,且抑菌环随着酶的浓度或者金黄色葡萄球菌的浓度增加而增大,见图 2。具体来看,在生理盐水中浸泡后,抑菌环为(32.01±1.32) mm,80 U/mL HAS 溶液对应(42.61±0.69) mm,150 U/mL HAS 溶液对应(53.51±1.06) mm,1×10³ CFU/mL 金黄色葡萄球菌溶液对应(41.60±1.01) mm,1×10⁷ CFU/mL 金黄色葡萄球菌溶液对应(53.44±1.08) mm,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

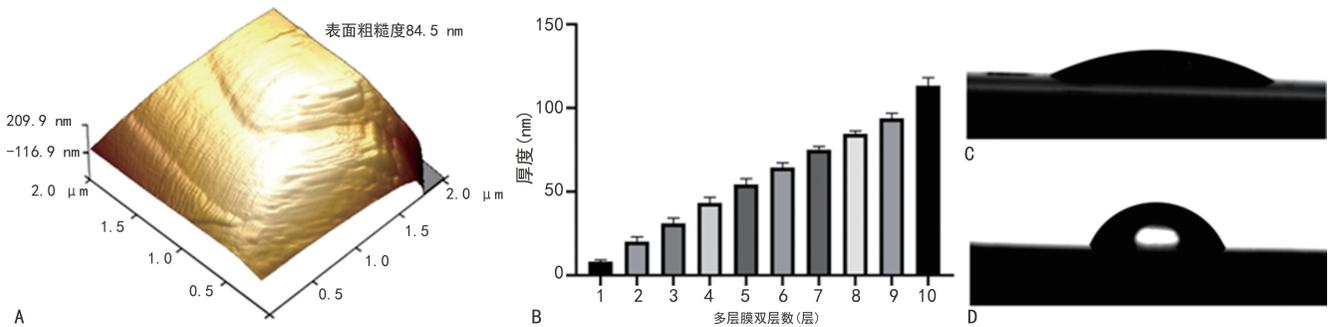


图 1 多层膜材料学表征

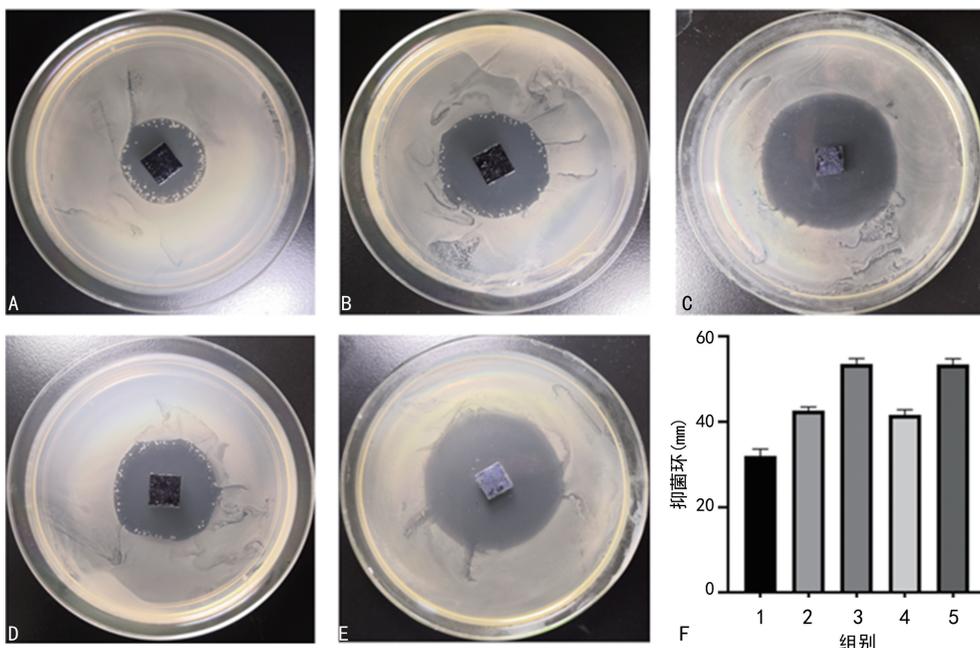
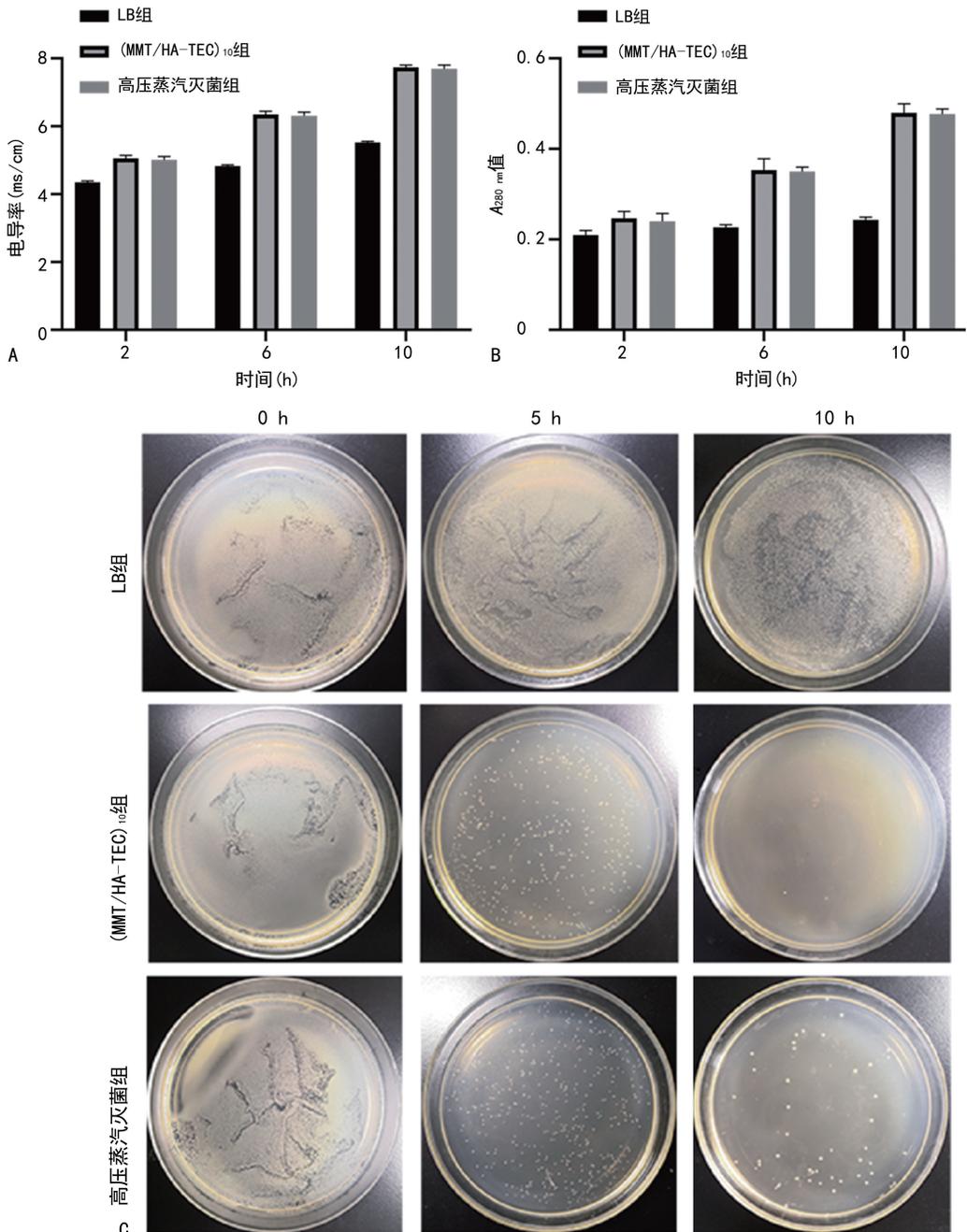


图 2 多层膜接触不同环境后形成的抑菌环结果

2.3 电导率、细胞外蛋白水平检测, 抑菌效果和抑菌稳定性测试

从图 3 可以看出, LB 组, (MMT/HA-TEC)₁₀ 组和高压蒸汽灭菌组细胞外液电导率均随着时间的延长而增加。但是在相同时间点, (MMT/HA-TEC)₁₀ 组细胞外液电导率均明显大于 LB 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而高压蒸汽灭菌组细胞外液电导率和 (MMT/HA-TEC)₁₀ 组类似, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。随着时间的增长, 3 组细胞外液中的蛋白水平都有不同程度的增加。但 (MMT/HA-TEC)₁₀ 组细胞外液中蛋白水平明显大于 LB 组, 差异有统计

学意义 ($P < 0.05$), 而 (MMT/HA-TEC)₁₀ 组与高压蒸汽灭菌组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。细菌培养实验中, 在共培养 10 h 之后, LB 组金黄色葡萄球菌混合液中依然存在大量细菌, 但是 (MMT/HA-TEC)₁₀ 组金黄色葡萄球菌混合液中的细菌已经几乎被完全杀灭, 计算可得, 该组的杀菌率 $> 99\%$ 。高压蒸汽灭菌组在经过细菌培养之后, 培育出的细菌数目与 (MMT/HA-TEC)₁₀ 组相比稍有增加, 但是相较于起始的金黄色葡萄球菌浓度 (1×10^8 CFU/mL), 其杀菌率依然 $> 99\%$ 。



A: 电导率; B: 细胞外蛋白水平; C: 抑菌效果。

图 3 3 组电导率、细胞外蛋白水平检测和抑菌效果实验

2.4 细菌活死染色

细菌活死染色可以准确区分出材料表面的活细

菌与死细菌。培养结束之后,在对照组表面发现大量活细菌(绿染)和数量可观的死细菌(红染),而

(MMT/HA-TEC)₁₀ 组材料表面活细菌和死细菌的数量均远远少于对照组,见图 4。

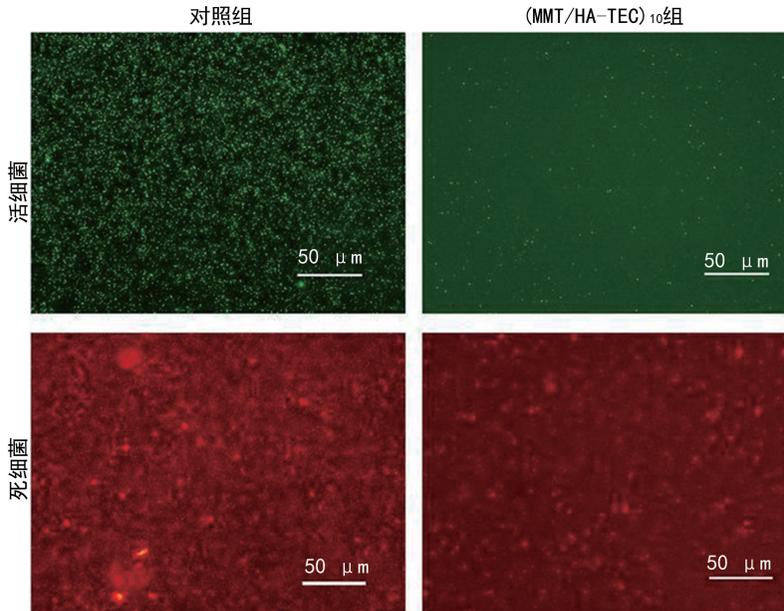


图 4 材料表面活细菌和死细菌染色结果对比(100×)

2.5 生物相容性

CCK-8 实验表明空白组和 (MMT/HA-TEC)₁₀ 组中的细胞数量均随着时间的增长而增加,经过统计学分析,2 组差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 5。

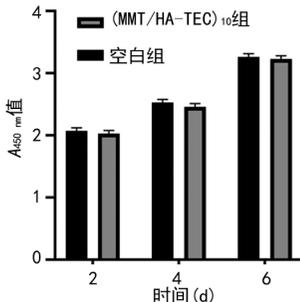


图 5 CCK-8 实验

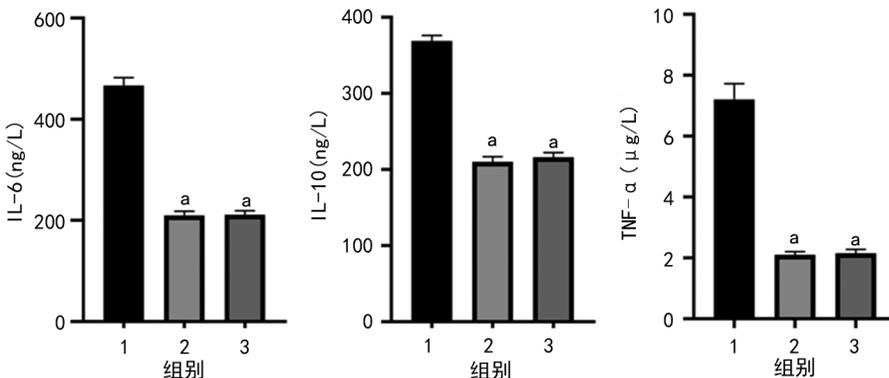
2.6 炎性指标检测

本实验的手术操作及饲养过程符合要求,没有发生手术源性或其他与实验无关的感染。假手术组的

IL-6 水平为 (209.55 ± 8.27) ng/L, IL-10 水平为 (210.06 ± 6.46) ng/L, TNF- α 水平为 (2.10 ± 0.10) μ g/L, 该 3 种炎症指标均处在正常范围之内;空白组的炎症指标均处在较高水平,与假手术组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),证明感染模型构建成功。(MMT/HA-TEC)₁₀ 组炎症指标接近假手术组,差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 6。

2.7 病理学检查

空白组骨组织在镜下几乎未发现黑染色的区域,说明空白组的成骨效果非常不理想。而 (MMT/HA-TEC)₁₀ 组和假手术组,镜下的黑染区域非常明显,成骨效果良好。HE 染色结果发现空白组中镜下存在大量的炎性细胞(箭头所指),直接证明该组感染严重。而在 (MMT/HA-TEC)₁₀ 组和假手术组基本未发现炎性细胞,说明感染被成功控制或未发生感染,见图 7。



1:空白组;2:假手术组;3:(MMT/HA-TEC)₁₀ 组;^a: $P < 0.05$,与空白组比较。

图 6 各组炎性指标检测

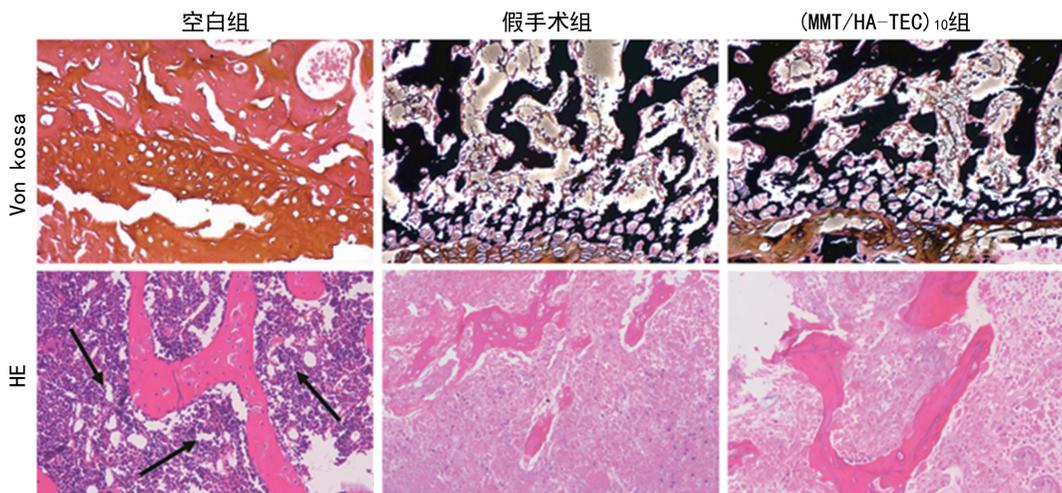


图 7 各组骨组织 Von kossa 和 HE 染色结果(200×)

3 讨 论

骨内植入物相关感染问题是临床工作中遇见的棘手的问题,比如关节置换术后,若是发生假体相关性感染,将会导致灾难性后果^[16]。目前临床上使用的常规预防或者治疗骨内植入物相关感染的方法效果都不是太好。材料表面改性是指在不改变材料原有性能的前提下,赋予其表面新的性能,比如抗菌性、疏水性、生物相容性等^[17]。于是材料表面抗菌涂层应运而生,但是普通的抗菌涂层存在 2 个问题:(1) 抗生素的缓释不可调控,普遍存在“暴释”的现象,即在短时间内大量释放,之后只能缓释出极少量的药物,远远达不到杀菌的有效浓度^[18]。(2) 涂层初期杀菌后,遗留的细菌死尸会残留在材料或涂层表面,影响抗菌效果,有研究表明,死细菌会参与细菌生物膜的构建过程,进一步增加抗感染的难度^[19]。骨内植入物相关感染的主要致病菌主要是金黄色葡萄球菌,感染发生后,会分泌大量 HAS^[20]。

本研究在组装多层膜的过程中,采用光谱椭圆偏振法全程跟踪多层膜的厚度变化,结果显示,厚度的增长呈现出线性增长的趋势,证明该组装方案可以实现多层膜的成功制备。抑菌环的大小在一定程度上可以反映出多层膜的抗生素缓释情况,抗生素缓释的越多,则形成的抑菌环越大。本研究发现随着 HAS 浓度的增加,抑菌环的大小也随之增加。类似的,随着金黄色葡萄球菌浓度的增加,抑菌环的大小同样随之增加。因此可以得出结论,当无细菌感染时,(MMT/HA-TEC)₁₀ 多层膜抗菌涂层可以较好地保存抗生素,避免不必要的缓释,当发生细菌感染后,多层膜可以根据细菌的数量和浓度,按需缓释不同剂量的抗生素。细菌浓度越大,缓释的抗生素越多,可以实现抗生素的精准调控。本研究通过测量电导率和细胞外蛋白水平初步探索(MMT/HA-TEC)₁₀ 多层膜抗菌涂层对细菌细胞膜通透性的影响。结果表明(MMT/HA-TEC)₁₀ 多层膜抗菌涂层提取液对金黄色葡萄球菌细胞膜有明显的损害作用,会增加细胞膜

的通透性。本研究对(MMT/HA-TEC)₁₀ 多层膜进行了抗菌稳定性检测,经过测试,发现在经过高压蒸汽灭菌并存放 14 d 后,其杀菌率依然大于 99%,证明该涂层具备较好的稳定性。实验进一步通过细菌死活染色实验探讨抗菌涂层表面细菌黏附情况:空白细胞爬片的表面会出现大量活细菌和死细菌,活细菌是因为细菌的繁殖不受控制,而死细菌会沉积附着在材料表面。而对于(MMT/HA-TEC)₁₀ 多层膜抗菌涂层,由于 TEC 的杀菌作用,在材料表面几乎找不到绿色的活细菌,而且死细菌的数量也很少,这可能是因为发生细菌感染时,细菌分泌的 HAS 会分解(MMT/HA-TEC)₁₀ 多层膜抗菌涂层中的 HA,从而促使(MMT/HA-TEC)₁₀ 多层膜抗菌涂层表面发生部分崩解,多层膜碎片连同死细菌从材料表面“剥离”,尽可能地避免死细菌继续附着在材料表面。CCK-8 实验反映(MMT/HA-TEC)₁₀ 多层膜抗菌涂层具有良好的生物相容性。动物实验结果显示在大鼠体内,(MMT/HA-TEC)₁₀ 多层膜抗菌涂层依然具有优异的杀菌效果且未发现其影响成骨现象。

综上所述,本研究结果表明,(MMT/HA-TEC)₁₀ 多层膜抗菌涂层具有优异的抗菌性能,而且可以根据细菌感染情况,精准缓释抗生素,做到“智能”缓释,并具有良好的生物相容性。值得注意的是,抗感染的长效性是抗菌涂层的一个重要指标,将来需要考虑进一步改良该抗菌涂层,使其具备更长效的抗菌活性。而且本研究只在大鼠体内进行抗菌试验,下一步需要采用更高级的哺乳动物进行验证,以期为骨内植入物术后相关感染的精准防治提供更可靠的理论依据。

参考文献

- [1] VAQUETTE C,BOCK N,TRAN P,et al. Layered antimicrobial selenium nanoparticle-calcium phosphate coating on 3D printed scaffolds enhanced bone formation in critical size defects

- [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2020, 12(50): 55638-55648.
- [2] LIU F, CHENG X, XIAO L, et al. Inside-outside Ag nanoparticles-loaded polylactic acid electrospun fiber for long-term antibacterial and bone regeneration[J]. Int J Biol Macromol, 2021, 167: 1338-1348.
- [3] DAROUICHE R. Treatment of infections associated with surgical implants [J]. N Engl J Med, 2004, 350(14): 1422-1429.
- [4] GRAINGER D, VAN DER M, JUNE P, et al. Critical factors in the translation of improved antimicrobial strategies for medical implants and devices [J]. Biomaterials, 2013, 34(37): 9237-9243.
- [5] PENG Z, TU B, SHEN Y, et al. Quaternized chitosan inhibits icaA transcription and biofilm formation by staphylococcus on a titanium surface[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(2): 860-866.
- [6] KAZEMZADEH M, KINDRACHUK J, DUAN K, et al. Antimicrobial peptides on Calcium phosphate-coated Titanium for the prevention of implant-associated infections[J]. Biomaterials, 2010, 31(36): 9519-9526.
- [7] LIU Y, CHEN D, ZHANG A, et al. Composite inclusion complexes containing hyaluronic acid/chitosan nanosystems for dual responsive enrofloxacin release [J]. Carbohydr Polym, 2021, 252: 117162.
- [8] REBITSKI E, ALCANTARA A, DARDER M, et al. Functional carboxymethylcellulose/zein bio-nanocomposite films based on neomycin supported on sepiolite or montmorillonite clays [J]. ACS Omega, 2018, 3(10): 13538-13550.
- [9] 凌沛学, 贺艳丽, 张青. 透明质酸对骨关节炎的治疗作用[J]. 食品与药品, 2005, 7(1A): 13.
- [10] 李渊源, 柴栋, 王瑾. 替考拉宁在特殊人群中药动学研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2019, 44(6): 654-660.
- [11] WANG G, MOYA S, LU Z, et al. Enhancing orthopedic implant bioactivity: refining the nanotopography [J]. Nanomedicine (Lond), 2015, 10(8): 1327-1341.
- [12] ZENG C, WILSON J, MEDGIL M, et al. Anti-bacterial efficacy of an endodontic sonic-powered irrigation system: an in vitro study [J]. J Dent, 2018, 75: 105-112.
- [13] SUN T, SUN Y, ZHANG H. Phospholipid-coated mesoporous silica nanoparticles acting as lubricating drug nanocarriers [J]. Polymers, 2018, 10(5): 503-513.
- [14] CHU S, ZHU X, YOU N, et al. The fab fragment of a human anti-siglec-9 monoclonal antibody suppresses lps-induced inflammatory responses in human macrophages [J]. Front Immunol, 2016, 7: 649.
- [15] LI L, YU M, MA P, et al. Electroactive degradable copolymers enhancing osteogenic differentiation from bone marrow derived mesenchymal stem cells [J]. J Mater Chem B, 2016, 4(3): 471-481.
- [16] DONG Y, LIU W, LEI Y, et al. Effect of gelatin sponge with colloid silver on bone healing in infected cranial defects [J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2017, 70(Pt 1): 371-377.
- [17] CIERNY G, DIPASQUALE D. Periprosthetic total joint infections: staging, treatment, and outcomes [J]. Clin Orthop Relat Res, 2002(403): 23-28.
- [18] ZHAO L, HU Y, XU D, et al. Surface functionalization of titanium substrates with chitosan-lauric acid conjugate to enhance osteoblasts functions and inhibit bacteria adhesion [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2014, 119: 115-125.
- [19] MURAKAMI A, ARIMOTO T, SUZUKI D, et al. Antimicrobial and osteogenic properties of a hydrophilic-modified nanoscale hydroxyapatite coating on titanium [J]. Nanomedicine, 2012, 8(3): 374-382.
- [20] ROCHA N, GOMES N, BATAGLIOLI R, et al. Engineering the surface of prostate tumor cells and hyaluronan/chitosan multilayer films to modulate cell-substrate adhesion properties [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 158: 197-207.

(收稿日期: 2023-02-18 修回日期: 2023-07-22)

(编辑: 姚雪)