

改善骨组织工程支架抗菌性的研究进展

郑剑莹 韩 冰

摘要 目的 骨科疾病导致的骨缺损需要骨移植修复,植入物可为骨组织工程支架材料。然而,骨移植常伴有细菌感染。因此,改善支架材料的抗菌性成为研究热点。本文以“骨组织工程,支架,抗菌;bone tissue engineering,scaffolds,antibacterial”为检索词分别查阅 CNKI、Web of Science 核心数据库 2016 年 1 月~2020 年 9 月发表的相关文献,以改善具有良好生物相容性支架的抗菌性且论点、论据可靠为标准筛选文献,对改善骨组织工程支架抗菌性的方法及原理进行综述,为支架材料的抗菌改性提供设计思路。

关键词 骨组织工程 支架 抗菌 研究进展

中图分类号 R459.9;R628;R687

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2021.05.004

骨移植手术常被用来治疗骨创伤、骨肿瘤和遗传异常等骨疾病。然而,大约 10% 的骨科手术患者会受到细菌感染^[1]。大多数植入物相关感染是由葡萄球菌引起的,其中 2/3 的感染来源于金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌,它们是骨科生物材料相关感染的主要致病因子,对骨和周围软组织造成不利影响^[2]。大肠杆菌也可引起与植入材料相关的多种感染^[3]。因此,开发具有抗菌活性和骨再生潜力的骨移植材料已成为一个急需解决的临床问题。本文主要介绍了关于改善骨组织工程支架材料抗菌性的研究进展,以期为未来的基础和临床研究提供可取信息。

一、支架与抗菌材料复合

1. 与氧化石墨烯(graphene oxide,GO)复合:石墨烯能通过破坏大肠杆菌细胞膜的完整性杀灭大肠杆菌^[4]。Wang 等^[5]制备了胶原蛋白/纳米羟基磷灰石/氧化石墨烯复合材料。研究表明,GO 粉末与复合材料均能抑制金黄色葡萄球菌生长,且在一定范围内,材料的抑菌性随 GO 含量的增加而提高。复合材料的抑菌原理可归因于材料阻碍营养物质进入细菌细胞或产生氧化应激。因此,可通过提高材料表面粗糙度以增强材料的抑菌能力。此外,MTT 实验证实该复合材料具有良好的生物相容性。

2. 与过氧化钙复合: Maria 等^[3]采用由 60% 羟基磷灰石和 40% β -磷酸三钙组成的双相磷酸钙粉末

制备生物陶瓷支架,将过氧化钙(calcium peroxide,CPO)作为一种产氧抗菌生物材料与聚己内酯溶液混合,采用浸渍涂覆法将其涂覆在支架上。研究表明,CPO 能有效抑制细菌生长,其反应产物(氢氧化钙、过氧化氢和氧气)起到杀菌剂的作用。此外,涂层中的疏水性聚己内酯降低了 CPO 的释放速率,避免了突释的细胞毒性。然而,由于聚己内酯的降解率较低,CPO 粉末没有足够的时间释放并杀灭细菌。所以,CPO 涂层支架的抗菌活性具有时间依赖性。

3. 与二氧化钛复合:二氧化钛由于其光催化性能具有固有的抗菌活性^[6]。Cijun 等^[7]将纳米二氧化钛(nano titanium dioxide, TiO_2)掺入聚醚醚酮/聚乙二醇酸(polyetheretherketone/polyglycolic acid, PEEK/PGA)共混物构建了 PEEK/PGA - nTiO_2 抗菌支架。研究表明,含 nTiO_2 的支架具有有效的抗菌活性,其抗菌活性随 nTiO_2 含量的增加而升高,当 nTiO_2 含量达 5% 质量分数时,支架的抗菌活性最强,之后下降。 nTiO_2 可能的抗菌机制总结为: nTiO_2 可与水和氧气反应产生活性氧(active oxygen species, ROS),当 ROS 浓度超过细菌抗氧化防御系统的清除活性时,ROS 会使细菌产生氧化应激,进而损害细菌的结构和功能。此外, TiO_2 与细菌细胞壁之间的接触作用会产生机械应力,导致细菌细胞膜变形。然后, nTiO_2 被吸收到细菌中,并从内部破坏细菌。

4. 与抗菌金属离子复合

(1) 银离子(Ag^+): Ag^+ 不仅具有广泛的抗菌活性,而且具有极小的细菌耐药性。既往文献表明,如果浓度合适,银纳米粒子(Ag nanoparticle - les, AgNPs)的细胞毒性较低^[8]。AgNPs 的抗菌机制为 Ag 与细

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81771041);吉林省财政厅科技项目(jcsz2020304-8)

作者单位:130021 长春,吉林大学口腔医院口腔颌面外科

通讯作者:韩冰,主任医师,教授,博士生导师,电子信箱:hbing@jlu.edu.cn

菌的肽聚糖细胞壁相互作用,导致其结构发生变化,增加膜通透性。AgNPs 与暴露的细菌蛋白巯基相互作用,防止 DNA 复制。AgNPs 可附着在细菌细胞膜上,也可渗透到细菌内部,通过与细菌含磷和含硫化物如 DNA 相互作用而造成损伤,最后导致细菌死亡^[9]。Smita 等^[2]制备了含有原位合成银纳米粒子的丝素蛋白薄膜,研究证明其具有较好的抗菌性能,对固着和浮游的金黄色葡萄球菌的生长和具有抗药性的大肠杆菌生物膜的形成具有抑制作用,且支持 hMSCs 细胞的生长和增殖,不破坏 hMSCs 细胞的成骨分化。然而,最近一项研究表明,最初易受 AgNPs 影响的细菌如果长期暴露于 AgNPs 的亚抑制浓度会产生抗药性,其原因是细菌鞭毛蛋白对 AgNPs 产生聚集作用,从而抑制其对革兰阴性菌的抗菌作用^[10]。聚集的 AgNPs 比分散良好的 AgNPs 具有更低的抗菌活性。Smita 等^[2]制成的丝膜含有分散良好的 AgNPs,这些都是由丝素蛋白所稳定的。此外,由于在薄膜干燥过程中 AgNPs 被物理包裹到丝素结构中,这些 AgNPs 无法聚集,因此革兰阴性菌的抗药机制在这些薄膜中是无效的。所以,制备含有原位合成银纳米粒子的抗菌丝素薄膜是控制细菌生长和解决抗药性更好的方法。

(2) 铜离子: Azeena 等^[11]制备了掺铜的硅灰石颗粒,证实在硅灰石中加入铜增强了材料对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑制作用。金属铜表面与微生物的 DNA 分子结合会导致 DNA 复制受到抑制。此外,铜也可与促进细菌生长的巯基结合。生长抑制也可能是由于细菌细胞呼吸被抑制而发生的,从而使 ROS 的产生上调,导致细菌停止生长。

(3) 锌离子(Zn^{2+})、镁离子(Mg^{2+}): Zn^{2+} 具有抗菌和抗炎作用,对骨形成有刺激作用,支架中锌离子的释放会引起糖酵解、跨膜质子易位和耐酸等多种细菌活性被抑制,从而导致细菌被破坏^[12]。此外,镁离子的释放会改变培养基的碱性,并在细菌细胞中产生高渗透压,导致细菌失活^[13]。Zamani 等^[14]将含有锌和镁的生物活性玻璃颗粒、海藻酸钠与氯化钙复合制成支架。研究表明,含锌和镁的生物活性玻璃在增强支架的抗菌效果中起关键作用,由于复合支架中 Zn^{2+} 和 Mg^{2+} 的释放,大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的生长受到了明显抑制。

(4) 钴离子: 氧化钴纳米粉末通过产生 ROS 有效抑制大肠杆菌的生长^[15]。Lin 等^[16]制备了含有 20% 质量分数钴取代羟基磷灰石粉末的聚己内酯复合膜。

研究表明,钴取代羟基磷灰石粉末的加入使聚己内酯膜对大肠杆菌具有良好的抗菌作用。同时,该复合膜通过持续释放钴离子有效减少自由基的产生,进而减少炎症反应的发生。此外,MTT 实验证明复合膜是无毒的,不会对身体产生负面影响。

(5) 铈离子(Ce^{3+})、锶离子(Sr^{2+}): Sundarabha - rathi 等^[17]研制出 $Ce^{3+} - Sr^{2+}$ 共掺杂纳米羟基磷灰石支架。研究结果显示,其对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌均具有抗菌活性。

5. 与生物活性物质复合

(1) 龙眼籽粗提取物(crude water extract of longan seed, WLS): WLS 中的酚类化合物具有较强的抗菌活性。Pankongadisak 等^[18]制备出含不同质量分数丝素蛋白的壳聚糖/丝素蛋白水凝胶,并负载 WLS 以改变水凝胶的抗菌性。实验结果表明,负载 WLS 的水凝胶相比不含 WLS 的水凝胶对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌具有更好的抗菌活性。

(2) 葫芦巴种子多糖(trigonella foenum graecum seed polysaccharide, TFSP): Zia 等^[19]制备了纳米羟基磷灰石(nano-hydroxyapatite, nHA)、壳聚糖(chitosan, CS)和葫芦巴种子多糖(TFSP)三组分生物活性纳米复合材料。研究表明,TFSP 的加入提高了 nHA-CS 纳米复合材料对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抗菌活性。

(3) 槲皮素: 槲皮素是一种延缓氧化损伤,使细胞免于死亡的黄酮类化合物,对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌具有很高的抗菌活性。Soraya 等^[20]首次将槲皮素(quercetin, Q)负载的氧化石墨烯纳米颗粒加入到聚己内酯(polycaprolactone, PCL)中,研究表明,槲皮素的加入对 PCL/GO 纳米纤维的抗菌性有很好的改善作用,即使在较低的 GO 浓度下也能显著提高材料整体的抗菌性能,从而避免 GO 产生中毒剂量。此外,PCL/GO/Q 支架具有良好的生物相容性。

(4) 小檗碱: 小檗碱是一种常用的抗菌剂,是从中药黄芪、黄连、三颗针、唐松草等植物中提取的生物碱成分,可以减少细菌表面的菌毛数量,对革兰阳性菌和革兰阴性菌都有抑制作用,有利于防止细菌附着在人体细胞上造成感染。Sun 等^[21]制备了多孔磷酸钙支架,与海藻酸钠交联,并在支架上负载小檗碱,体外研究表明,支架的细胞毒性低,有利于 MC3T-3 细胞的黏附和增殖,具有抗菌和骨再生功能。

(5) 抗菌肽: 抗菌肽(antimicrobial peptides, AMPs)广泛存在于动植物中,具有广泛的抗细菌、抗病

毒和抗真菌活性,与具有耐药性问题的传统抗生素比较,AMPs 具有耐药性小、高效、杀菌速度快、相对分子质量小、热稳定性好、无免疫原性、对水解酶敏感度低等优点,近年来作为传统抗生素的替代品获得了广泛的研究。其抗菌机制是带正电荷的抗菌肽通过吸引细菌表面的负电荷黏附在细菌细胞膜上,并且插入细菌细胞膜,导致细胞膜破裂,从而破坏细菌细胞膜的完整性,最终导致细胞死亡^[22,23]。Lei 等^[24]将 p-nericinG1 (从黄蜂毒液中分离得到的一种抗菌肽)固定在三维聚乳酸-羟基乙酸共聚物[poly(la-co-glycolic acid), PLGA] 支架表面,实验结果显示,ponericinG1 的加入使支架对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌具有抗菌活性。

二、支架载药

Bai 等^[25]制备了聚己内酯/聚乙二醇/罗红霉素复合支架,研究发现,支架具有初始的短期爆裂释放,随后可长期持续释放罗红霉素,有利于预防和治疗骨修复过程中的骨感染,对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌具有有效的抗菌活性。此外,MC63 细胞在支架上表现出良好的生长活力。Milena 等^[26]制备了以羟基磷灰石、壳聚糖和庆大霉素为基体的石墨烯增强复合涂层。研究表明,庆大霉素显著提高了涂层的抗菌活性,且涂层对 MRC-5 和 L929 细胞的毒性较低,具有良好的生物相容性。四环素是一种广谱抗生素,对革兰阳性和革兰阴性菌均具有抗菌性。Dayaghi 等^[27]制备了含不同浓度四环素的 Mg-Zn 支架,研究表明四环素浓度为 1%~5% 的支架对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌具有良好的抗菌活性且生物相容性良好。

环丙沙星(ciprofloxacin, CIP)是一种广泛用于治疗骨和其他组织感染的氟喹诺酮类药物,它在组织中具有很大的渗透性,对包括可能引起骨髓炎的铜绿假单胞菌在内的需氧革兰阴性杆菌有很高的抗菌活性。Luciano 等^[28]采用两种方式将海藻酸钠(sodium alginate, ALG)、羟基磷灰石和环丙沙星复合,一种方式为将预先装载有 CIP 的纳米颗粒添加到海藻酸盐溶液中,制得支架命名为 HA-CIP/ALG;另一种方式为将不含 CIP 的纳米颗粒与含有 2% 海藻酸盐和适当浓度 CIP 的水溶液混合,制得支架命名为 HA/CIP-ALG。实验结果显示,这两种复合材料对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和铜绿假单胞菌均表现出抗菌活性,其中 HA-CIP/ALG 的抗菌活性略高于 HA/CIP-ALG。

三、化学改性

Sedghi 等^[29]研究发现通过铜(I)催化叠氮-炔

环加成[copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition, CuAAC]反应增加壳聚糖游离胺基团的偶极矩可增加复合材料与周围介质的相互作用及结合能力,从而提高其抗菌活性。Wang 等^[30]研究表明,烷基链长的增加提高了壳聚糖的抗菌活性。

四、展望

对于修复骨缺损所用的支架材料,可通过将支架与抗菌材料复合、载药及化学改性的方法提高支架的抗菌性能。但以上方式也存在如下问题:(1)一些具有抗菌性的材料如金属铜,具有细胞毒性,因此,控制支架中铜释放的剂量水平以将细胞毒性降到最低是至关重要的。(2)长期应用抗生素可使细菌产生耐药性,因此,开发在细菌黏附之前就可促进新骨形成,以规避载药支架快速出现的抗生素耐药问题的生物材料是更佳方案。(3)现有研究中将支架应用于动物模型的实验较少,因此,抗菌性得到改善的支架材料应用于临床还需大量的基础研究和临床试验。

参考文献

- Wang S, Li R, Qing Y, *et al.* Antibacterial activity of Ag-incorporated zincosilicate zeolite scaffolds fabricated by additive manufacturing[J]. *Inorg Chem Commun*, 2019, 105(7): 31-35
- Smita P, Neetu S. Antibacterial silk fibroin scaffolds with green synthesized silver nanoparticles for osteoblast proliferation and human mesenchymal stem cell differentiation[J]. *Colloids Surf B*, 2019, 176(4): 150-155
- Maria T, Fathollah M, Noor A, *et al.* Optimization and biological activities of bioceramic robocast scaffolds provided with an oxygen-releasing coating for bone tissue engineering applications[J]. *Ceram Int*, 2019, 45(1): 805-816
- 赵维康, 张施洋, 阳洪名, 等. 石墨烯及其衍生物纳米复合材料在骨科应用的研究进展[J]. *生物医学工程学杂志*, 2016, 33(3): 604-608
- Wang J, Wang Y, Liu D, *et al.* Preparation and cytological study of collagen/nano-hydroxyapatite/graphene oxide composites[J]. *Acta Bioeng Biomech*, 2018, 20(4): 65-74
- 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
- Cijun S, Chenying S, Pei F, *et al.* Antibacterial capability, physicochemical properties, and biocompatibility of nTiO₂ incorporated polymeric scaffolds[J]. *Polymers*, 2018, 10(3): 328
- Xie C, Lu X, Han L, *et al.* Biomimetic mineralized hierarchical graphene oxide/chitosan scaffolds with adsorbability for immobilization of nanoparticles for biomedical applications[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8(3): 1707-1717
- Pooyan M, Ghareib WA, Francesca DS, *et al.* Hyaluronic acid/corn silk extract based injectable nanocomposite: a biomimetic antibacterial

- scaffold for bone tissue regeneration[J]. Mater Sci Eng C, 2020, 107(2): 110195
- 10 Aleš P, Libor K, Monika S, *et al.* Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it[J]. Nat Nanotechnol, 2018, 13(1): 65–71
- 11 Azeena S, Subhpradha N, Selvamurugan N, *et al.* Antibacterial activity of agricultural waste derived wollastonite doped with copper for bone tissue engineering[J]. Mater Sci Eng C, 2017, 71(2): 1156–1165
- 12 Sandra SS, Shruti S, Salinas AJ, *et al.* In vitro antibacterial capacity and cytocompatibility of SiO₂–CaO–P₂O₅ mesoporous glass scaffolds enriched with ZnO[J]. J Mater Chem B, 2014, 2(30): 4836–4847
- 13 Feng H, Wang G, Jin W, *et al.* Systematic study of inherent antibacterial properties of magnesium–based biomaterials[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2016, 8(15): 9662–9673
- 14 Zamani D, Moztarzadeh F, Bizari D. Alginate–bioactive glass containing Zn and Mg composite scaffolds for bone tissue engineering[J]. Int J Biol Macromol, 2019, 138(17): 1256–1267
- 15 Kavitha T, Haider S, Kamal T, *et al.* Thermal decomposition of metal complex precursor as route to the synthesis of Co₃O₄ nanoparticles: antibacterial activity and mechanism[J]. J Alloys Compd, 2017, 704(15): 296–302
- 16 Lin WC, Yao C, Huang TY, *et al.* Long–term in vitro degradation behavior and biocompatibility of polycaprolactone/c–obalt–substituted hydroxyapatite composite for bone tissue engineering[J]. Dent Mater, 2019, 35(5): 751–762
- 17 Sundarabharathi L, Chinnaswamy M, Ponnammma D, *et al.* Investigation of antimicrobial properties and invitro bioactivity of Ce³⁺–Sr²⁺ dual–substituted nano hydroxyapatites[J]. J Am Ceram Soc, 2019, 102(1): 144–157
- 18 Pankongadisak P, Suwantong O. Enhanced properties of injectable chitosan–based thermogelling hydrogels by silk fibroin and longan seed extract for bone tissue engineering[J]. Int J Biol Macromol, 2019, 138(18): 412–424
- 19 Zia I, Mirza S, Jolly R, *et al.* Trigonella foenum graecum seed polysaccharide coupled nano hydroxyapatite–chitosan: ternary nanocomposite for bone tissue engineering[J]. Int J Biol Macromol, 2019, 124(4): 88–101
- 20 Soraya F, Nona N, Amideddin N, *et al.* Electrospun poly–caprolactone/graphene oxide/quercetin nanofibrous scaffold for wound dressing: evaluation of biological and structural properties[J]. Life Sci, 2020, 257(18): 118062
- 21 Sun H, Hu C, Zhou C, *et al.* 3D printing of calcium phosphate scaffolds with controlled release of antibacterial functions for jaw bone repair[J]. Mater Des, 2020, 189(5): 108540
- 22 Rikeshwer PD, Gopal SB, Vijay PS, *et al.* Design and synthesis of cell selective α/β –diastereomeric peptidomimetic with potent in vivo antibacterial activity against methicillin resistant *S. aureus* [J]. Bioorg Chem, 2018, 76(1): 538–547
- 23 Zhao PC, Xue Y, Gao WN, *et al.* Bacillaceae–derived peptides antibiotics since 2000[J]. Peptides, 2018, 101(3): 10–16
- 24 Lei C, Liping S, Fengping W, *et al.* Enhancement in sustained release of antimicrobial peptide and BMP–2 from degradable three dimensional–printed PLGA scaffold for bone regeneration[J]. RSC Adv, 2019, 9(19): 10494–10507
- 25 Bai JF, Wang H, Gao W, *et al.* Melt electrohydrodynamic 3D printed poly(ϵ –caprolactone)/polyethylene glycol/roxithromycin scaffold as a potential anti–infective implant in bone repair[J]. Int J Pharm, 2020, 576(4): 118941
- 26 Milena S, Marija D, Ana J, *et al.* Antibacterial graphene–based hydroxyapatite/chitosan coating with gentamicin for potential applications in bone tissue engineering[J]. J Biomed Mater Res A, 2020, 108(11): 2175–2189
- 27 Dayaghi E, Bakhsheshi–Rad HR, Hamzah E, *et al.* Magnesium–zinc scaffold loaded with tetracycline for tissue engineering application: in vitro cell biology and antibacterial activity assessment[J]. Mater Sci Eng C, 2019, 102(9): 53–65
- 28 Luciano B, Juan L, Graciela S, *et al.* Antibacterial alginate/nano–hydroxyapatite composites for bone tissue engineering: assessment of their bioactivity, biocompatibility, and antibacterial activity[J]. Mater Sci Eng C, 2020, 115(10): 111101
- 29 Sedghi R, Shaabani A, Sayyari N. Electrospun triazole–based chitosan nanofibers as a novel scaffold for bone tissue repair and regeneration[J]. Carbohydr Polym, 2019, 230(4): 115707
- 30 Wang CH, Liu WS, Sun JF, *et al.* Non–toxic O–quaternized chitosan materials with better water solubility and antimicrobial function[J]. Int J Biol Macromol, 2016, 84(3): 418–427

(收稿日期: 2020–10–21)

(修回日期: 2020–10–26)

(上接第 10 页)

- 23 Bozec A, Luo Y, Engdahl C, *et al.* Abatacept blocks anti–citruilinated protein antibody and rheumatoid factor mediated cytokine production in human macrophages in IDO–dependent manner[J]. Arthritis Res Ther, 2018, 20(1): 24
- 24 Mathieu S, Couderc M, Glace B, *et al.* Effects of 6 months of abatacept treatment on aortic stiffness in patients with rheumatoid arthritis[J]. Biologics, 2013, 7(1): 259–264
- 25 Kang EH, Jin Y, Brill G, *et al.* Comparative cardiovascular risk of abatacept and tumor necrosis factor inhibitors in patients with rheumatoid arthritis with and without diabetes mellitus: a multidatabase cohort study[J]. J Am Heart Assoc, 2018, 7(3): e007393
- 26 Benucci M, Bandinelli F, Damiani A, *et al.* Factors correlated with the improvement of endothelial dysfunction during Abatacept therapy in patients with rheumatoid arthritis[J]. J Inflamm Res, 2018, 11: 247–252

(收稿日期: 2020–01–02)

(修回日期: 2020–01–08)