

羧甲基壳聚糖/环丙沙星植入缓释微球防治局部感染的实验研究

尹承慧¹, 侯春林^{2*}, 徐 皓¹, 郭 澄³, 张 纯³, 蒋丽霞⁴, 顾其胜⁴

(1. 南京军区福州总医院骨一科, 福州 350025; 2. 第二军医大学长征医院骨科, 上海 200003; 3. 第二军医大学长征医院药剂科, 上海 200433; 4. 上海其胜生物材料技术研究所, 上海 201106)

[摘要] **目的:**探索局部植入抗菌药缓释微球防治术后局部感染的可行性及效果。**方法:**以羧甲基壳聚糖为缓释辅料,通过乳化学交联工艺制备负荷盐酸环丙沙星的植入缓释微球;建立模拟体内释放环境的体外释放系统,评价微球体外释放特性和抑菌能力;利用高效液相色谱法检测药物的体内释放特性;利用透射电镜和病理检查检测微球的体内降解和组织相容性。**结果:**羧甲基壳聚糖环丙沙星植入缓释微球在体外的释放达7 d以上;微球植入体内后局部药物浓度维持在金葡菌 MIC₉₀以上约10 d,无明显突释现象;微球植入动物体内后无局部感染和切口愈合不良;透射电镜和病理结果发现微球和组织之间无明显的炎性异物反应。**结论:**羧甲基壳聚糖环丙沙星植入缓释微球在体内具有良好的生物相容性和释药行为,可用于植入体内防治局部感染。

[关键词] 环丙沙星;羧甲基壳聚糖;微球;感染**[中图分类号]** R 978.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2005)01-0072-03

Prevention and treatment of local infection using implantable sustained release ciprofloxacin/carboxmethyl chitosan microspheres

YIN Cheng-hui¹, HOU Chun-lin^{2*}, XU Hao¹, GUO Cheng³, ZHANG Chun³, JIANG Li-xia⁴, GU Qi-sheng⁴ (1. Department of Orthopedics, General Hospital, PLA Nanjing Military Area Command, Fuzhou 350025, China; 2. Department of Orthopedics, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003; 3. Department of Pharmacy, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433; 4. Shanghai Qisheng Bio-Material Technological Institute, Shanghai 201106)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the feasibility of implanting sustained release microspheres loaded with antibiotic in prevention and treatment of local infection after operation. **Methods:** The ciprofloxacin hydrochloride/carboxmethyl chitosan microspheres were prepared through emulsification and cross-linking process. A continuous flow release system was constructed to detect the *in vitro* releasing mechanism and bacteriostasis ability of microspheres. The *in vivo* release was detected using high performance liquid chromatography. The biodegradation and biocompatibility of microspheres were explored through transmission electron microscope and pathological findings. **Results:** The persisting release of ciprofloxacin was detected for 7 d *in vitro* and 10 d *in vivo*, which indicating the minimum inhibitory concentration still existing. No sudden release phenomenon was found during the whole process. **Conclusion:** The microspheres had excellent biocompatibility and releasing behavior and can be implanted for prevention and treatment of local infection after operation.

[KEY WORDS] ciprofloxacin; carboxmethyl chitosan; microspheres; infection

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2005, 26(1): 72-74]

随着高速开放性创伤以及内植物在骨科中应用的增多,内固定术后的局部组织感染问题日益突出,处理比较棘手^[1]。本研究以生物降解性高分子材料羧甲基壳聚糖(carboxmythyl chitosan, CMC)为缓释辅料,以广谱抗菌药盐酸环丙沙星(ciprofloxacin, CPX)为模型药物,制备一种植入缓释微球(CPX/CMC-MS),并对其体外、体内释放性能及其体内的生物学行为进行了深入的研究,以期为临床局部感染的防治提供一种新的思路和方法。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器 羧甲基壳聚糖(批号:0010,动力

粘度:2 000 mPa·s,羧甲基取代度:≥90%,由上海其胜生物制剂实业公司提供);盐酸环丙沙星(批号9904080,药用级,购于上海三维制药公司);液体石蜡、丙酮、石油醚(均为分析纯,购于上海化学试剂采购站);戊二醛(进口分装)、Tween-80(进口分装);叶式搅拌机(上海实验仪器厂)、抽滤砂芯、真空泵、生物显微镜、蠕动泵(BT01-100,国产)、紫外分光光

[基金项目] 国家科技部“技术创新基金”(99C26213100428)。**[作者简介]** 尹承慧(1971-),男(汉族),博士,主治医师。

E-mail:chenghuiyin@hotmail.com,chenghuiyin@citiz.net

* Corresponding author. E-mail:chunlin-hou@sina.com

度计(UV 240,日本)、透射电镜(H 500,Hitachi,日本)、扫描电镜(SEM,S-250,Cambridge,英国)、高效液相色谱分析仪(HPLC,Waters,美国)等。

1.2 CPX/CMC-MS 的制备及其基本质量指标 采用简单稳定的乳化交联工艺^[2],制备的微球光滑圆整,粒度均匀。过标准筛选用平均直径约为 200 μm (粒径范围 175~220 μm)的微球。载药量约为 17.5%,溶胀率约为 44%,CPX 包封率 75%。

1.3 体外释放实验 由于目前缺乏成熟的模拟局部组织植入剂型释放的体外模型,本研究按照文献所述的方法^[3]制备持续流动释放系统。将 CPX/CMC-MS 进行⁶⁰Co 照射消毒后,置于持续流动释放系统中(释放介质:pH 7.45 的磷酸盐缓冲液;蠕动泵控制流速为 6 ml/h;温度:37.5 $^{\circ}\text{C}$),分别在 0.25、0.5、1、2、3、6、12、24 h 和 2、3~15 d 间歇收集释放液,测定其 277 nm 处的紫外光密度值,利用标准曲线法求得药物浓度,计算药物累积释放量及累积释放百分比。

1.4 体外抑菌实验 将释放不同时间的微球分别置于接种金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、大肠杆菌的琼脂培养基中,共培养 12 h,同时与空白微球对照。使用游标卡尺测量每粒微球的抑菌圈,计算其平均值和标准差。然后绘制抑菌面积曲线。

1.5 体内释放实验 取雄性新西兰白兔 20 只(购自第二军医大学实验动物中心),体质量 2~2.5 kg。2%异戊巴比妥钠静脉麻醉后,无菌条件下分别于兔的背部作皮肤切口,于一侧的竖脊肌上纵向剪开肌膜,钝性分离肌肉长 5 cm、深 1.5 cm,植入载药微球(100 mg,含环丙沙星 17.5 mg),分别于术后 1、3、12 h 和 1、3、5、7、9、11、13 d 切取距切口部位 0.5 cm 处分别取肌肉和棘突的骨组织约 1 g,加入 1 ml 生理盐水,剪碎匀浆后离心,吸取上清液,除蛋白后进行 HPLC 检测其中环丙沙星的浓度^[4]。在切取组织块的同时,由兔耳缘静脉取血,利用 HPLC 内标法检测药物浓度。将植入动物体内 5 d 的微球取出后置入接种有金葡萄菌的琼脂培养基中 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h,观察记录抑菌结果。

1.6 微球生物相容性及降解 微球植入后 1 周、1 个月、3 个月分批将动物麻醉后空气栓塞处死,锐刀切取局部肌肉组织,用 0.2% 戊二醛溶液固定后进行病理、透射电镜检测。

2 结果

2.1 微球的体外释放 体外释放实验结果发现微球的累积释放率与时间的相关性可用 Higuchi 方程

拟合($y=6.5283x+5.9036$,其中 y 为累积释放率, x 为时间的平方根, $r=0.9851$),微球释放可维持 7 d,最终释放量约为 85.37%。

2.2 体外抑菌结果 CPX/CMC-MS 有明显的抑菌圈,抑菌圈随释放时间延长逐渐缩小,其中以大肠杆菌的抑菌圈最大,约维持 5 d,5 d 后单粒微球抑菌圈直径由 2.53 cm 降至 0.14 cm;金葡萄菌从 2.12 cm 降至 0.08 cm;绿脓杆菌从 1.4 cm 降至 0。

2.3 大体观察 20 只新西兰白兔术后均未使用任何抗菌药,饲料同术前。动物切口无红肿、退毛等体征,均 I 期愈合,局部兔毛生长繁茂。

2.4 微球的体内释放 微球植入部位组织液药物浓度变化曲线见图 1。微球植入后 30 min 即可测得环丙沙星的浓度,此后组织中的药物浓度迅速升高,24 h 到达高峰,药物浓度达到 27.6 mg/L。随时间延长药物浓度缓慢下降,第 10 天药物的浓度开始低于 2 mg/L。第 13 天后基本测不出组织中的药物浓度。软组织中的药物浓度明显高于骨组织中的药物浓度。由于血液中的环丙沙星浓度低,未达到此 HPLC 系统的检测范围,血液中未检测出药物。金葡萄菌琼脂接种培养实验证实:微球植入 5 d 后仍有较强的抑菌能力。

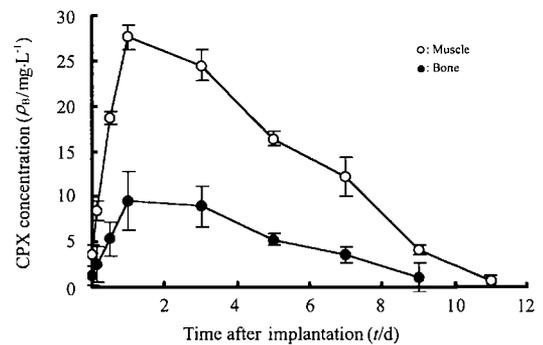


图 1 CPX/CMC-MS 植入体内的释放

Fig 1 Release of CPX/CMC-MS in vivo

2.5 病理和透射电镜检测 术后 1 周病理切片可以发现微球周围轻度的纤维组织增生和巨噬细胞聚集,没有组织坏死和中性粒细胞聚集。1 个月后发现微球周围仍有少量巨噬细胞聚集,3 个月后微球周围巨噬细胞明显减少(图 2)。通过透射电镜可以发现:载药微球和周围组织结合紧密,不存在“裂隙”,微球周围存在许多巨噬细胞,并可见纤维组织,细胞的微球界面存在“微绒毛”,绒毛伸入微球表面的微孔。细胞内靠近微球侧的胞质内具有许多溶酶体。随时间的延长,巨噬细胞的“微绒毛”长度增加,并伸入微球的微孔内(图 3)。



图2 CPX/CMC-MS植入体内1周(A)、1个月(B)、3个月(C)后的病理检查结果

Fig 2 Pathological examination 1 week(A), 1 month(B) and 3 months(C) after CPX/CMC-MS implantation(H-E, ×20)

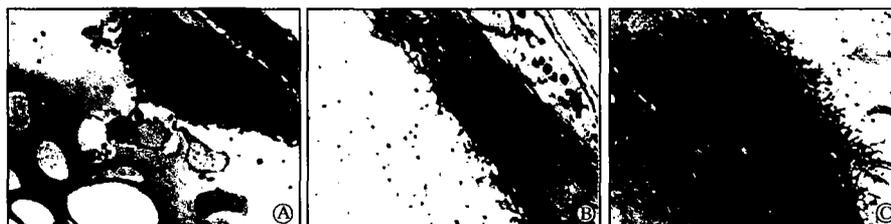


图3 CPX/CMC-MS植入体内1周(A)、1个月(B)、3个月(C)后的TEM检查结果

Fig 3 TEM examination of CPX/CMC-MS 1 week(A), 1 month(B) and 3 months(C) after implantation(×2 000)

3 讨论

手术后使用一定时间的抗菌药来预防患者手术切口的感染已经得到绝大多数临床医生的认可,尤其是内植物、假体植入手术和开放性创伤手术。由于全身用药具有局部药物浓度不足、全身不良反应等缺点,近年来,抗菌药的局部植入剂型日益受到临床医生的关注。另外,实验证实:抗菌药物必须与细菌即时接触才能达到预防感染的目的,至少也要于3 h内与之接触,现在一般称之为“预防抗菌药物的有效期”^[5],局部植入抗菌药物完全能够达到这项要求。目前,国外已有许多相关剂型应用于临床,并取得良好的临床效果,如庆大霉素珠链^[6]、抗生素骨水泥等,但均需二次手术取出。随着生物材料和高新技术的发展,为解除二次手术取出之虞,人们将可降解缓释辅料引入这一领域。壳聚糖是一种具有良好组织相容性和生物可降解性的生物高分子材料,可用作药物缓释载体^[7]。CMC是壳聚糖的衍生物,与壳聚糖相比,它对药物缓释时间短,生物相容性好,更易降解。由于具备良好的水溶性,不需酸液溶解,因此不损伤pH敏感药物的抗菌活性。环丙沙星是第3代喹诺酮类广谱抗菌药,对骨和软组织中的致病菌有强大和持久的杀菌作用。本研究动物实验中,虽然局部植入药物很少(约17.5 mg),但植入30 min后即可从组织液中测出明显高于金葡菌MIC₉₀(2 mg/L)的药物浓度,而且药物浓度维持在MIC₉₀以上约10 d。药物浓度随时间缓慢下降,没有明显的“突释现象”。整个实验

期间血液中的药物浓度低于本检测系统的最低检测限,因此药物不会产生全身性不良反应。然而,单纯的环丙沙星原料药植入能造成局部高渗,易发生组织坏死。载药微球植入后药物缓慢释出,并迅速扩散到周围组织,不会造成局部高渗状态,病理和透射电镜检测未发现明显的局部组织坏死迹象。微球剂型的体积小,局部植入后相对分散,而且由于表面积大,降解速度较快,不会对组织的修复造成阻挡,在此方面明显优于体积较大的明胶海绵及其他剂型。

[参考文献]

[1] Eijer H, Hauke C, Arens S, *et al.* PC-Fix and local infection resistance—influence of implant design on postoperative infection development, clinical and experimental results [J]. *Injury*, 2001, 32(Suppl 2):38-43.

[2] Shu XZ, Zhu KJ. A novel approach to prepare tripolyphosphate/chitosan complex beads for controlled release drug delivery[J]. *Int J Pharm*, 2000, 201(1):51-58.

[3] 陆彬主编. 药物新剂型与新技术[M]. 北京:人民卫生出版社, 1998. 522-526.

[4] 孙效东, 曲芬. 胎儿软骨中环丙沙星药物浓度RP-HPLC测定法[J]. *药物分析杂志*, 1998, 18(6):380-383.

[5] Burke JF. Preventing bacterial infection by coordinating antibiotic and host activity; a time-dependent relationship[J]. *South Med J*, 1977, 70(Suppl 1):24-26.

[6] Klemm K. The use of antibiotic-containing bead chains in the treatment of chronic bone infections[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2001, 7(1):28-31.

[7] 尹承慧, 侯春林, 蒋丽霞, 等. 环丙沙星/壳聚糖植入微球的制备及其体外释放研究[J]. *第二军医大学学报*, 2002, 23(5):563-539.

[收稿日期] 2004-05-10 [修回日期] 2004-09-10
[本文编辑] 孙岩