

何宏星,张心恬,章梦涵,等. 抗菌性碳点修饰 PEEK 干预 MRSA 感染环境植入物骨整合性能的体内研究 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(11): 1408-1416.

HE H X, ZHANG X T, ZHANG M H, et al. *In vivo* study of antibacterial carbon dot-modified polyether ether ketone to improve osseointegration of implants for treating MRSA infection environments [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(11): 1408-1416.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.11.005

# 抗菌性碳点修饰 PEEK 干预 MRSA 感染环境植入物骨整合性能的体内研究

何宏星<sup>1</sup>,张心恬<sup>2</sup>,章梦涵<sup>2</sup>,王耀<sup>2</sup>,邓晓琴<sup>2</sup>,翁少煌<sup>2\*</sup>

(1. 福建医科大学实验动物中心,福州 350122;2. 福建医科大学药学院,福州 350122)

**【摘要】** 目的 本研究拟评价抗菌性碳点修饰聚醚醚酮 (polyether ether ketone, PEEK) 在感染性骨缺损环境的骨整合性能。方法 熔融法制备结合透析纯化获得胍基碳点 (guanidine-based carbon dots, G-CDs), 应用聚乙烯醇缩丁醛酯 (polyvinyl butyral, PVB) 通过浸泡-干燥法制备 G-CDs 修饰的 PEEK 植入物 (PEEK/PVB-G-CDs)。将 SD 大鼠分为: PEEK 植入未感染组 (PEEK (-) 组), PEEK/PVB-G-CDs 植入未感染组 (PEEK/PVB-G-CDs (-) 组), PEEK 植入感染组 (PEEK (+) 组), PEEK/PVB-G-CDs 植入感染组 (PEEK/PVB-G-CDs (+) 组)。每组大鼠均于垂直股骨外侧髁处制备一个直径 2 mm、深度 5 mm 的孔洞以模拟骨缺损。将 30  $\mu$ L 生理盐水注入 PEEK (-) 组和 PEEK/PVB-G-CDs (-) 组大鼠骨缺损的骨髓腔内形成未感染组。将 30  $\mu$ L 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA) 菌悬液 ( $1.5 \times 10^4$  CFU/mL) 注入 PEEK (+) 组和 PEEK/PVB-G-CDs (+) 组大鼠骨缺损的骨髓腔内。植入术后 0、2 和 4 周, 应用动物专用 X 射线机照射各组大鼠植入部位。术后 6 周, Micro-CT 评估植入部位的骨组织特征。骨髓细菌培养、苏木精-伊红染色 (HE staining)、甲苯胺蓝染色 (Toluidine blue staining)、戈德纳三色染色 (Goldner trichrome staining) 及免疫组化染色分析各组大鼠的骨植入部位。**结果** (1) X 射线、Micro-CT、骨髓细菌培养和组织病理学分析等结果确定证实了 PEEK (-) 组和 PEEK/PVB-G-CDs (-) 组未出现感染与骨缺损整合; PEEK/PVB-G-CDs (+) 组发挥抗菌性有效控制 MRSA, 菌株形成的骨髓炎实现骨整合, 而 PEEK (+) 组因持续的感染无法骨整合; (2) 免疫组化染色评价明确 PEEK (+) 组显示出比其他 3 组更低的白细胞介素 (interleukin, IL)-4 和 IL-10 等抗炎因子以及更强的 IL-6 和肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)- $\alpha$  等促炎因子表达, 表明 G-CDs 修饰的 PEEK 可抑制 MRSA 感染, 调节局部微环境的炎症水平, 促进骨缺损部位的骨整合。**结论** 抗菌性碳点修饰 PEEK 具备优异的骨整合性能, 为今后的临床治疗提供了一种候选策略。

**【关键词】** 抗菌性碳点; 聚醚醚酮; 植入物改性; 骨整合; MRSA 感染

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 11-1408-09

## *In vivo* study of antibacterial carbon dot-modified polyether ether ketone to improve osseointegration of implants for treating MRSA infection environments

HE Hongxing<sup>1</sup>, ZHANG Xintian<sup>2</sup>, ZHANG Menghan<sup>2</sup>, WANG Yao<sup>2</sup>, DENG Xiaojin<sup>2</sup>, WENG Shaohuang<sup>2\*</sup>

(1. Laboratory Animal Center, Fujian Medical University, Fuzhou 350122, China;

2. School of Pharmacy, Fujian Medical University, Fuzhou 350122, China)

Corresponding author: WENG Shaohuang. E-mail: shweng@fjmu.edu.cn

**【基金项目】** 福建省科技创新联合资金项目 (2021Y9007), 福建省自然科学基金 (2022J01493)。

Funded by the Joint Funds for the Innovation of Science and Technology, Fujian Province (2021Y9007), the National Science Foundation of Fujian Province (2022J01493).

**【作者简介】** 何宏星, 男, 实验师, 研究方向: 实验动物模型。Email: 1311754246@qq.com

**【通信作者】** 翁少煌, 男, 教授, 博士, 研究方向: 骨系统疾病新疗法。Email: shweng@fjmu.edu.cn

**[Abstract] Objective** This study aimed to evaluate the bone integration performance of antibacterial carbon dot (CD)-modified polyether ether ketone (PEEK) in infectious bone defect environments. **Methods** Guanidine-based CDs (G-CDs) prepared by the melting method combined with dialysis purification were used to modify PEEK implants using polyvinyl butyraldehyde (PVB) by the soaking-drying method (PEEK/PVB-G-CDs). SD rats were divided into the following groups: (1) PEEK-implanted uninfected (PEEK(-)), (2) PEEK/PVB-G-CDs-implanted uninfected (PEEK/PVB-G-CDs(-)), (3) PEEK-implanted infected (PEEK(+)), and (4) PEEK/PVB-G-CDs-implanted infected (PEEK/PVB-G-CDs(+)). A hole (diameter 2 mm, depth 5 mm) was drilled at the lateral condyle of the vertical femur in all rats to simulate a bone defect. Rats in the PEEK(-) and PEEK/PVB-G-CDs(-) groups without infection were injected with 30  $\mu$ L physiological saline into the bone marrow cavity, and rats in the PEEK(+) and PEEK/PVB-G-CDs(+) groups with infection were injected with 30  $\mu$ L MRSA bacterial suspension ( $1.5 \times 10^4$  colony-forming units/mL) into the bone marrow cavity. The implantation site was observed using animal-specific X-ray examination at 0, 2, and 4 weeks after implantation, and the bone tissue characteristics of the implantation site were evaluated by micro computed tomography (CT) at 6 weeks after surgery. The bone implantation sites in each group of rats were examined by bacterial culture of bone marrow and hematoxylin and eosin staining, Toluidine blue, Goldner trichrome, and immunohistochemical staining. **Results** X-ray, Micro-CT, bacterial culture of bone marrow, and histopathological analysis confirmed no signs of infection in the PEEK(-) and PEEK/PVB-G-CDs(-) groups and the implants were integrated with the bone defects. Rats in the PEEK/PVB-G-CDs(+) group showed signs of antibacterial activity that effectively controlled the osteomyelitis caused by MRSA and achieved bone integration, while rats in the PEEK(+) group failed to achieve bone integration because of persistent infection. Immunohistochemical staining confirmed lower levels of anti-inflammatory factors such as IL-4 and IL-10 in the PEEK(+) group, and stronger expression of pro-inflammatory factors such as IL-6 and TNF- $\alpha$  compared with the other three groups, indicating that G-CD-modified PEEK inhibited MRSA infection, regulated inflammation levels in the local microenvironment, and promoted bone integration at the site of bone defects. **Conclusions** Antibacterial G-CDs modified PEEK exhibits excellent bone integration performance, providing a candidate strategy for future clinical treatment of infectious bone defects.

**[Keywords]** antibacterial carbon dots; PEEK; implant modification; osseointegration; MRSA infection

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

骨植入物是骨科应对各种原因引起骨缺损的主要手段。但是,由于手术引起微环境改变、血行传播以及患者体质差异等因素,使得细菌性感染成为植入物处理骨缺损的最大挑战<sup>[1]</sup>。一旦植入物发生感染,尤其是耐药菌感染,将造成骨植入物无法整合而松动,对患者造成灾难性后果。因此,在骨科植入性手术领域,改善并提高植入物抗感染能力是提高植入手术成功率、改善骨整合和长期预后的一个重要途径。对应的,近年来,针对骨植入物的抗菌功能改性以降低骨植入感染的研究呈现出快速发展的趋势<sup>[2-4]</sup>。因此,发展设计高效、安全适用于骨植入物抗菌功能改性并适合骨生长要求的新型抗菌药物是其中至关重要的节点。当前,除抗生素改性骨植入物的研究以外,包含纳米材料的非抗生素策略被开发用于骨植入物抗菌功能改性<sup>[5-7]</sup>。将抗菌性纳米材料应用于骨植入物改性有望实现持续有效抗菌以及较高的生物安全性。但目前这方面工作仍处于尝试阶段,对于骨植入物抗菌功能改性所要求的抗菌性优异、生物安全性以及

无耐药诱导性等的抗菌纳米材料研发仍是一个重要挑战。因此,设计建立不诱发细菌耐药且具备良好抗菌活性和生物安全性的新型抗菌药物,用于骨植入物抗菌功能改性,并应用于耐药菌感染的骨缺损治疗的研究,对于解决现有植入物耐药菌感染的困境至关重要。

动物感染模型是抗菌药物开发过程的关键组成部分,它提供了有用的临床前研究数据,从而将抗菌药物的体外和临床评估联系起来,以提供一种方法测试抗菌药物在受控环境下单独或组合针对特定病原体的活性<sup>[8-9]</sup>。基于上述研究背景以及所设计制备的胍基碳点(guanidine-based carbon dots, G-CDs)的前期体外抗菌性能和体内生物安全性的研究基础,本研究建立了耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA)感染的大鼠股骨缺损模型,以 G-CDs 修饰骨植入物干预,从而评估 G-CDs 在细菌感染临床应用中的可行性,为推动抗菌纳米材料在临床细菌感染治疗的应用发挥重要的作用。

# 1 材料与方法

## 1.1 材料

### 1.1.1 实验动物

雄性清洁级 7 周龄 SD 大鼠 (12 只), 体重 ( $270 \pm 10$ ) g, 购自福建医科大学实验动物中心【SCXK(闽)2022-0001】。动物饲养于福建医科大学实验动物中心屏障环境【SYXK(闽)2022-0003】。饲养环境: 昼夜各半循环照明, 相对湿度 40% ~ 70%, 温度控制在 20 ~ 26 °C。本实验按照《动物实验指南》操作, 所有动物实验经福建医科大学实验动物伦理委员会批准(IACUC FJMU 2023-0149)。

### 1.1.2 菌株

标准 MRSA 菌株购自上海鲁微科技有限公司, 批号为 ACTT43300。

### 1.1.3 主要试剂与仪器

盐酸左氧氟沙星 (98%) 购自上海麦克林生化科技有限公司, 小鼠肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)- $\alpha$  和小鼠白细胞介素 (interleukin, IL)-6 ELISA 试剂盒购自 Elabscience 生物技术有限公司, 4% 多聚甲醛通用型组织固定液购自广州硕谱生物科技有限公司, Mueller-Hinton (MH) 肉汤和营养琼脂购自青岛海博生物技术有限公司, 聚醚醚酮 (polyether ether ketone, PEEK) ( $\Phi 2$  mm  $\times$  5 mm) 购

自德国盖尔公司。

立式压力蒸汽灭菌器 (LDZX-50KB, 上海申安医疗器械厂), 生物安全柜 (BSC-1000 II A2, 上海博迅实业有限公司医疗设备厂), 生化培养箱 (SHP-250 型, 上海精宏实验设备有限公司), 酶标仪 (1510-04035C, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司), 全自动血液分析仪 (日本三洋电器股份有限公司), 小动物专用 X 射线机 (Posvet-100HF, 韩国三星集团), Micro-CT (CT-100, 瑞士 SCANCO Medical AG 公司)。

## 1.2 方法

本研究建立 MRSA 感染的大鼠骨缺损模型以评估 G-CDs 在控制感染性骨缺损方面应用的可行性。结合课题组前期关于 G-CDs 的研究基础<sup>[10]</sup>, 采用 PEEK 为骨植入物, PVB 为固定剂, 制备了基于 G-CDs 抗菌涂层改性的骨植入物 (图 1), 并用于 MRSA 感染的骨缺损大鼠的治疗, 从而进一步评估以 G-CDs 作为抗菌剂在骨组织部位的抗菌性能。具体实验流程, 如图 2 所示。

### 1.2.1 基于 G-CDs 为抗菌涂层改性骨植入物的制备

参考课题组前期的研究<sup>[10]</sup> 制备 G-CDs: 以无水柠檬酸 (citric acid, CA) 为碳源, 二烯丙基二甲基氯化铵 (diallyldimethylammonium chloride, DDA) 和聚

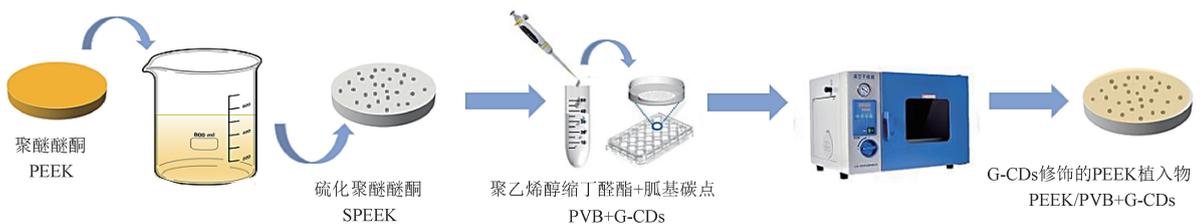


图 1 PEEK/PVB-G-CDs 的制备流程图

Figure 1 Flow chart for the preparation of PEEK/PVB-G-CDs

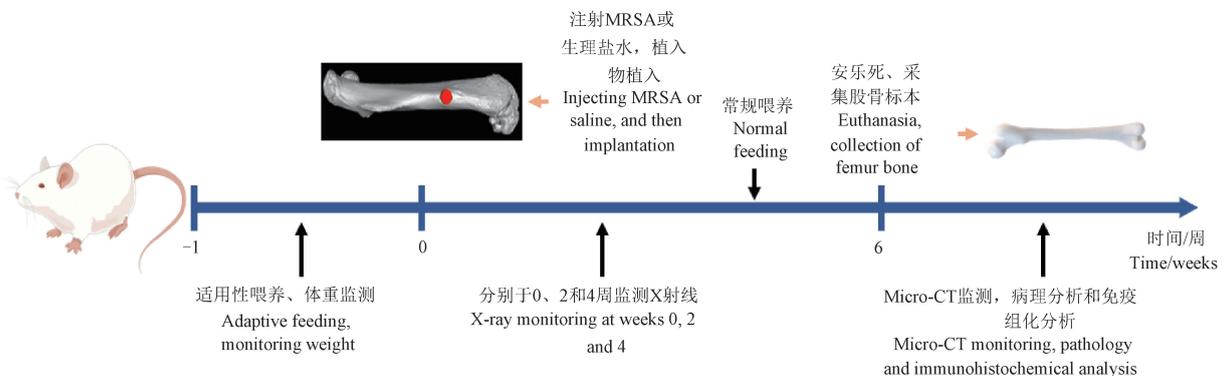


图 2 植入物干预 MRSA 感染的大鼠骨缺损的实验流程图

Figure 2 Experimental flow chart of MRSA infected rat bone defect treated by implants

六亚甲基胍 (polyhexamethylene guanidine, PHMG) 为异原子掺杂来源, 合成得到 G-CDs。具体过程: 精确称量 0.2 g CA 于圆底烧瓶并置于 150 °C 油浴中搅拌加热。待 CA 完全熔融后, 加 2 mL DDA (60% 水溶液), 继续反应 150 min。后加入 1 mL 0.1 g/mL PHMG 水溶液, 于 170 °C 下继续反应 60 min。反应结束后, 将圆底烧瓶置于室温下冷却, 加入 10 mL 超纯水并超声溶解。取上述溶液 0.5 mL 置于纤维素透析袋 (500 ~ 1000 Da) 中, 同时, 在含 1000 mL 去离子水的烧杯中进行透析处理, 每隔 2 h 更换一次去离子水, 透析 48 h。最后, 将透析袋中的液体冷冻干燥得到固体 G-CDs, 置于 4 °C 下保存备用。

G-CDs 为抗菌涂层改性的 PEEK: 将清洗干净的 PEEK 用浓硫酸 (95%) 浸泡 3 min, 超纯水彻底清洗并置于 120 °C 下热处理 4 h, 获得硫化处理的 PEEK (简称为 SPEEK) 样品。将 SPEEK 放置于 24 孔板中, 使用含聚乙烯醇缩丁醛 (polyvinyl butyral, PVB) (5 g/L) 和 G-CDs (0.2 mg/mL) 的 0.20 mL 无水乙醇-乙酸乙酯 (体积比为 9 : 1) 溶液浸泡并置于 60 °C 的烘箱中干燥; 待浸泡液完全干燥后, 换一个孔并置入完成前序操作的植入物, 补充同样的浸泡液; 重复浸泡和干燥操作, 共 3 次, 获得基于 G-CDs 为抗菌涂层改性的骨植入物 (PEEK/PVB-G-CDs)。

### 1.2.2 MRSA 感染大鼠骨缺损模型的建立

(1) MRSA 菌液的配制: 将 MRSA 菌通过平板划线法接种于血琼脂平板上, 并在生化培养箱中 (35 °C) 培养得到单个菌落, 用接种环挑取单个菌落接种于灭菌生理盐水 (0.9% 氯化钠溶液) 中得到细菌悬液, 通过紫外可见分光光度计测定并调节使菌悬液的 OD<sub>600</sub> 值为 0.1, 以得到  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL 的菌悬液, 然后将  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL 的菌悬液稀释至  $1.5 \times 10^4$  CFU/mL 备用。

(2) 大鼠分组建模: 将 12 只大鼠随机分成 PEEK 植入未感染组 (PEEK(-) 组)、PEEK/PVB-G-CDs 植入未感染组 (PEEK/PVB-G-CDs(-) 组)、PEEK 植入感染组 (PEEK(+) 组) 和 PEEK/PVB-G-CDs 植入感染组 (PEEK/PVB-G-CDs(+) 组) 4 组, 每组各 3 只, 依次编号, 称量并记录每只大鼠的体重。在动物中心实验环境下适应性喂养 1 周后, 进行建模。首先分别将各组大鼠麻醉, 清理手术部位的毛发, 用碘伏棉球消毒手术区域并用无菌洞巾覆盖。切开大鼠右下侧后肢上的局部皮肤, 钝性分离肌肉组织, 暴露股骨远端, 用克氏针 ( $\Phi 2$  mm) 于垂直股

骨外侧髁处制备一个直径 2 mm、深度 5 mm 的孔洞用以模拟骨缺损。

(3) 分组给药: 取 30  $\mu$ L 的 MRSA 菌悬液 ( $1.5 \times 10^4$  CFU/mL), 依据上述分组, 分别注入 PEEK(+) 组和 PEEK/PVB-G-CDs(+) 组大鼠骨缺损部位的骨髓腔内, PEEK(-) 组和 PEEK/PVB-G-CDs(-) 组大鼠未注射菌悬液。然后分别将 PEEK 和 PEEK/PVB-G-CDs 两种植入物根据 4 组分组编号分别植入对应的组别, 缝合皮肤并用碘伏棉球消毒, 整个手术过程均在无菌操作台上完成, 术毕, 待大鼠苏醒后安放于原饲养笼内, 给予正常喂水和饮食, 观察大鼠的活动状态。

### 1.2.3 MRSA 感染大鼠骨缺损模型的术后评价

在植入术后 0、2 和 4 周, 应用动物专用 X 射线机照射各组大鼠植入部位, 评估植入部位的炎症反应及骨整合情况。此外, 术后 6 周, 将大鼠麻醉并实施安乐死后, 分离并收集手术部位股骨, 保存于 4% 多聚甲醛通用型组织固定液中以便进一步分析评价。利用 Micro-CT 评估植入部位的骨组织特征。并对股骨组织标本进行骨髓细菌涂板培养、苏木精-伊红染色 (HE staining)、甲苯胺蓝染色 (Toluidine blue staining)、戈德纳三色染色 (Goldner trichrome staining) 和免疫组化染色, 对各组大鼠的骨植入部位进行残余细菌评价、病理分析和免疫组化分析。

### 1.3 统计学分析

本文中的所有实验均重复 3 次, 数据以平均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。统计学比较采用 Graph Pad Prism 8.0 进行单因素方差分析的 Tukey's 多重比较实验。P < 0.05 为具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 G-CDs 修饰 PEEK 在 MRSA 感染的大鼠骨缺损模型中的 X 射线评价

细菌感染是骨科植入手术失败的重要原因之一。细菌感染的发生, 尤其是耐药菌的感染, 将引起急性/慢性骨髓炎<sup>[11]</sup>, 导致植入物与周围骨组织结构无法整合, 最终导致植入失败<sup>[12]</sup>。首先利用 X 射线评价 G-CDs 修饰的 PEEK 应对 MRSA 感染的大鼠骨缺损模型中的效果。在植入后第 0、2 和 4 周利用 X 射线评估骨植入部位的动态变化。如图 3 所示, 植入部位以红色箭头指明。在未感染组 (PEEK(-) 组和 PEEK/PVB-G-CDs(-) 组) 中, 未观察到植入物周围存在或出现异常低密度阴影, 表明

植入材料后无感染产生,证明植入过程及植入后并未受到因手术操作及环境引起的其他感染。并且,与 PEEK(-)组相比,在第 4 周时 PEEK/PVB-G-CDs(-)组植入部位骨生长良好,表明 PEEK/PVB-G-CDs 在未感染环境下具有一定的促骨整合能力。经 MRSA 感染后,PEEK(+)组和 PEEK/PVB-G-CDs(+)组在初始阶段(0 week)均未观察到细菌感染的征象。但在第 2 周时,PEEK(+)组和 PEEK/PVB-G-CDs(+)组的植入部位周围均表现出异常的低密度阴影,并观察到髓内脓腔的形成,说明植入部位

因存在细菌感染形成了急性骨髓炎。植入第 4 周时,PEEK(+)组植入部位的髓内脓腔进一步扩大,说明单纯 PEEK 本身不具备抗菌性能,无法抑制细菌的生长,从而导致了感染情况的加重及恶化。相反,PEEK/PVB-G-CDs(+)组在第 4 周时,几乎没有观察到异常低密度区域的存在,证实了 PEEK/PVB-G-CDs(+)组虽然感染 MRSA 菌株形成了骨髓炎,但经 G-CDs 改性后的 PEEK/PVB-G-CDs 在骨组织部位依然发挥了良好且稳定的抗菌性能,显著抑制了耐药菌的生长繁殖。

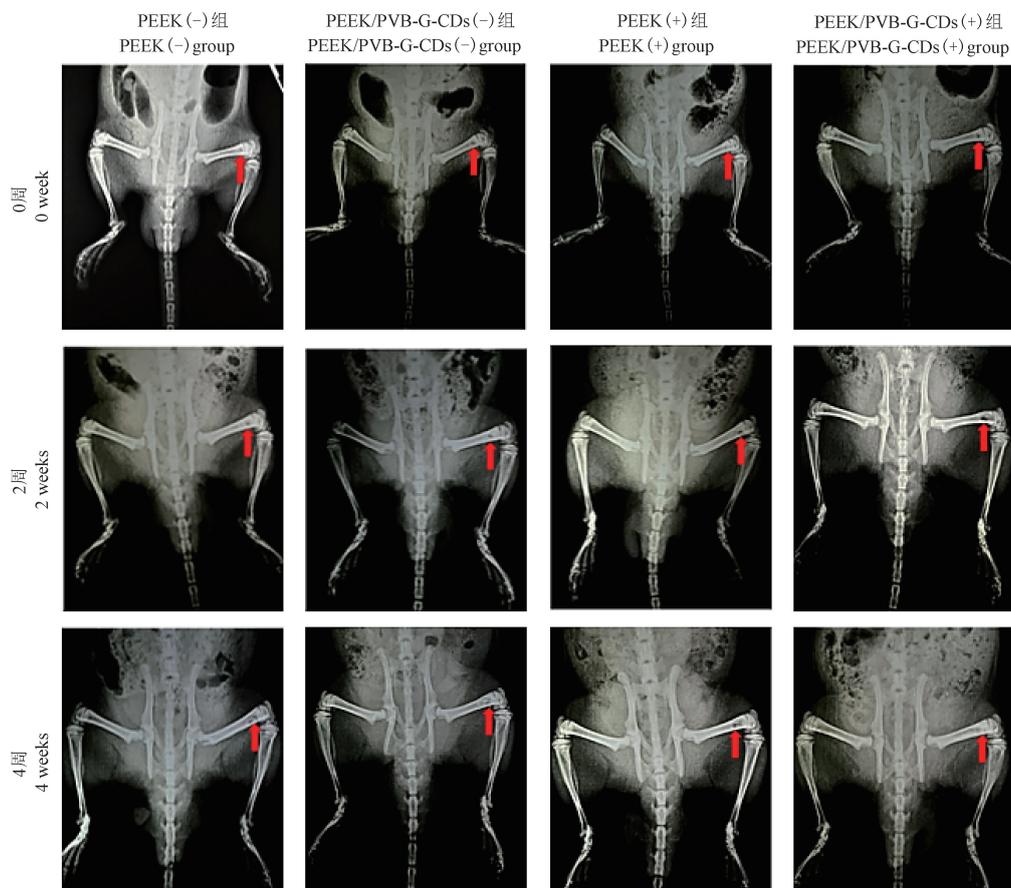


图 3 植入后第 0、2 和 4 周不同分组大鼠的 X 射线图像

Figure 3 X-ray images from different groups of rats at weeks 0, 2 and 4 after implantation

## 2.2 G-CDs 修饰 PEEK 在 MRSA 感染的大鼠骨缺损模型中的形态和 Micro-CT 评价

植入 6 周后,分离并收集不同分组大鼠的股骨进行观察。如图 4 所示,PEEK(-)组和 PEEK/PVB-G-CDs(-)组的股骨植入部位未见细菌感染的迹象,植入物与周围骨组织结合牢固,骨皮质连续性完好,并未遭到破坏。然而,PEEK(+)组的植入部位周围出现明显的腐蚀和骨组织结构破坏,且骨皮质和骨松质均被破坏,造成植入物周围大块皮质

骨缺损,严重改变了股骨应力结构,可见植入单纯 PEEK 完全不具备抗菌能力,一旦发生 MRSA 感染,随着时间的延长,细菌将不断扩散,从而导致了股骨结构的严重破坏。而与此相反,PEEK/PVB-G-CDs(+)组表现出与未感染组(PEEK(-)组和 PEEK/PVB-G-CDs(-)组)相似的现象,再次体现了 G-CDs 显著抗菌性能。同时也进一步说明,经 G-CDs 改性可赋予植入物稳定的抗菌功能。

利用 Micro-CT 评价不同分组大鼠植入部位的

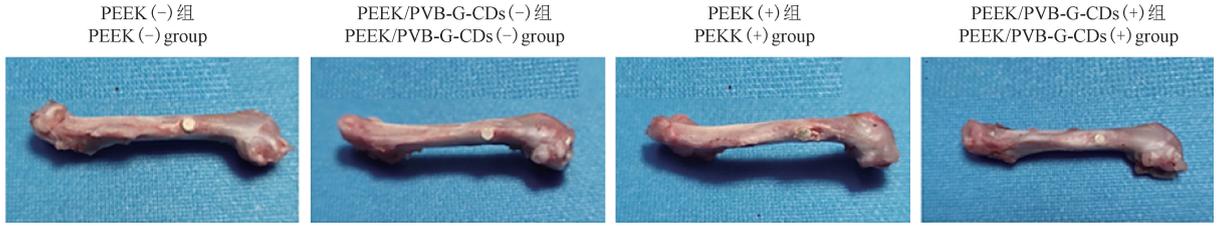


图 4 植入 6 周后不同分组大鼠股骨植入部位图像

Figure 4 Images of the femoral implant site in different groups of rats at 6 weeks after implantation

骨组织特征。如图 5, 植入部位股骨的三维重建和冠状位切面 Micro-CT 图像显示, PEEK (-) 组和 PEEK/PVB-G-CDs (-) 组的植入物与周围骨组织紧密结合。而注射 MRSA 后, PEEK (+) 组存在明显的感染征象, 不论是股骨的整体重建图亦或者冠状位切面图, 均可发现明显的骨破坏痕迹, 原有的圆柱状骨缺损形状被破坏, 严重毁坏了植入部位的皮质骨连续性。而最终 PEEK (+) 组植入材料表面鲜有新生骨附着, 与 PEEK (-) 组形成了鲜明对比, 进一步证明 PEEK (+) 组感染严重, 极度影响了植入物的

骨整合。而与此相反, 同样经 MRSA 感染过的 PEEK/PVB-G-CDs (+) 组丝毫未见骨质破坏的现象, 表现出光滑且规则的植入物轮廓, 植入物与周围骨组织紧密贴合, 进一步证明了改性植入物稳定的抗菌能力。同时, 植入物的三维重建图像模拟同样反映了植入物周围局部新骨生成的程度。如图 5 所示, PEEK (-) 组、PEEK/PVB-G-CDs (-) 组和 PEEK/PVB-G-CDs (+) 组植入物周围均有大量连续的新骨形成, 几乎完全覆盖植入物表面, 骨结合良好。而 PEEK (+) 组的植入物周围仅有部分新骨覆

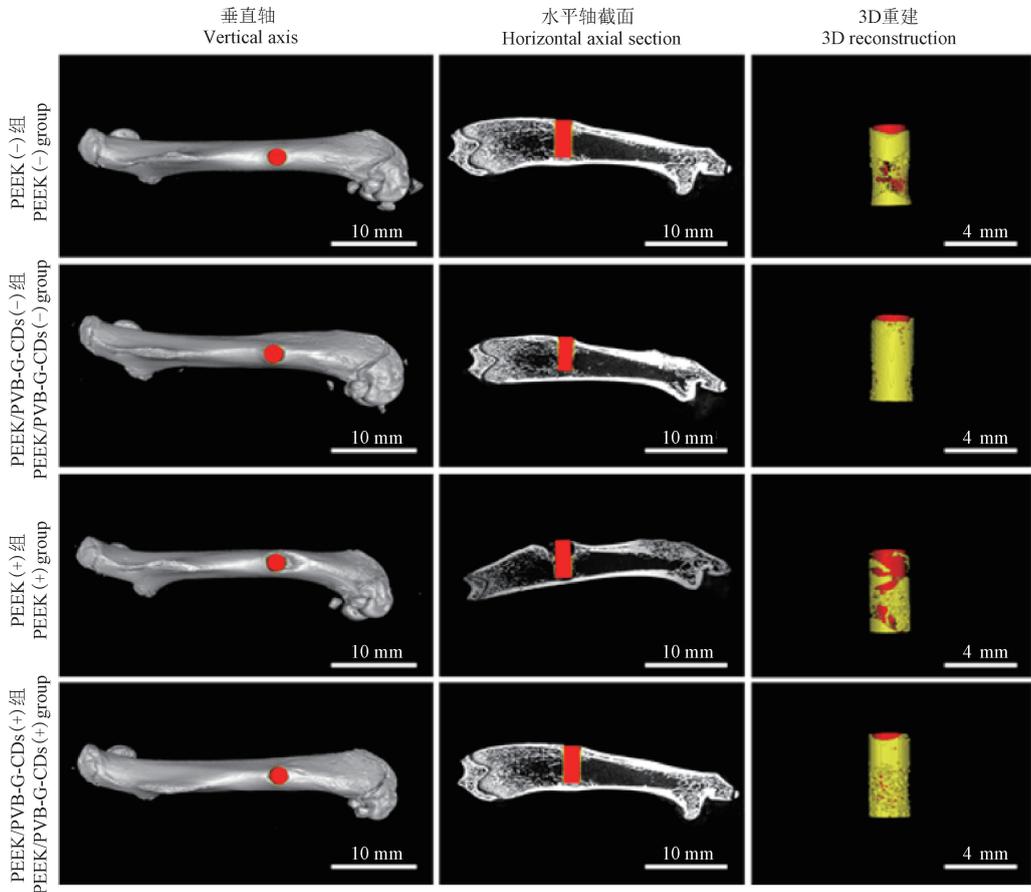


图 5 植入 6 周后不同分组大鼠植入部位股骨的整体三维重建和冠状位切面 Micro-CT 图像及植入物的三维重建图像

Figure 5 Micro-CT images of vertical and horizontal axial sections of the femur and 3D reconstructions of the implants in different groups of rats at 6 weeks after implantation

盖,表明 MRSA 感染后,单纯 PEEK 植入物的骨整合能力较差。综上,已证实 G-CDs 作为抗菌剂改的骨植入物后,不仅可显著抑制耐药菌感染,而且可以促进植入物的骨整合,即便在感染状态下,也依旧可发挥稳定的抗菌促骨整合功能。

### 2.3 G-CDs 修饰 PEEK 在 MRSA 感染的大鼠骨缺损模型中的病理分析

细菌培养结果见图 6,病理学结果见图 7,免疫组化结果见图 8。为进一步证明 PEEK(+) 组存在 MRSA 定植感染,进而导致了慢性骨髓炎的发生,研

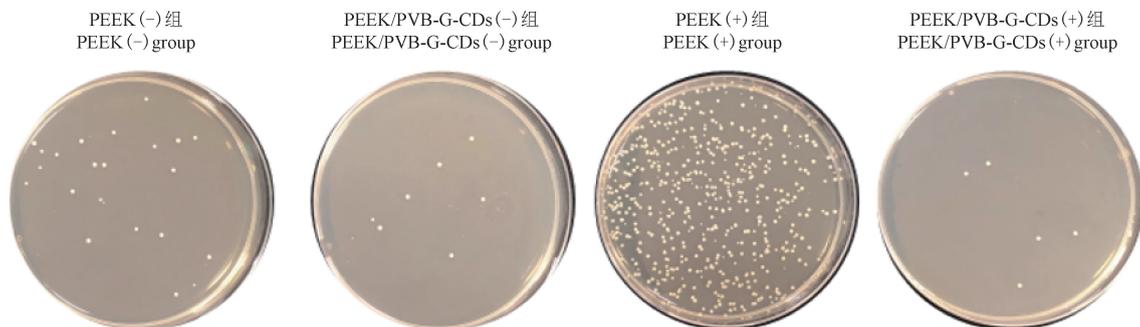


图 6 植入 6 周后不同分组大鼠植入部位骨髓的细菌培养

Figure 6 Bacterial culture of bone marrow of the different groups of rats at 6 weeks after implantation

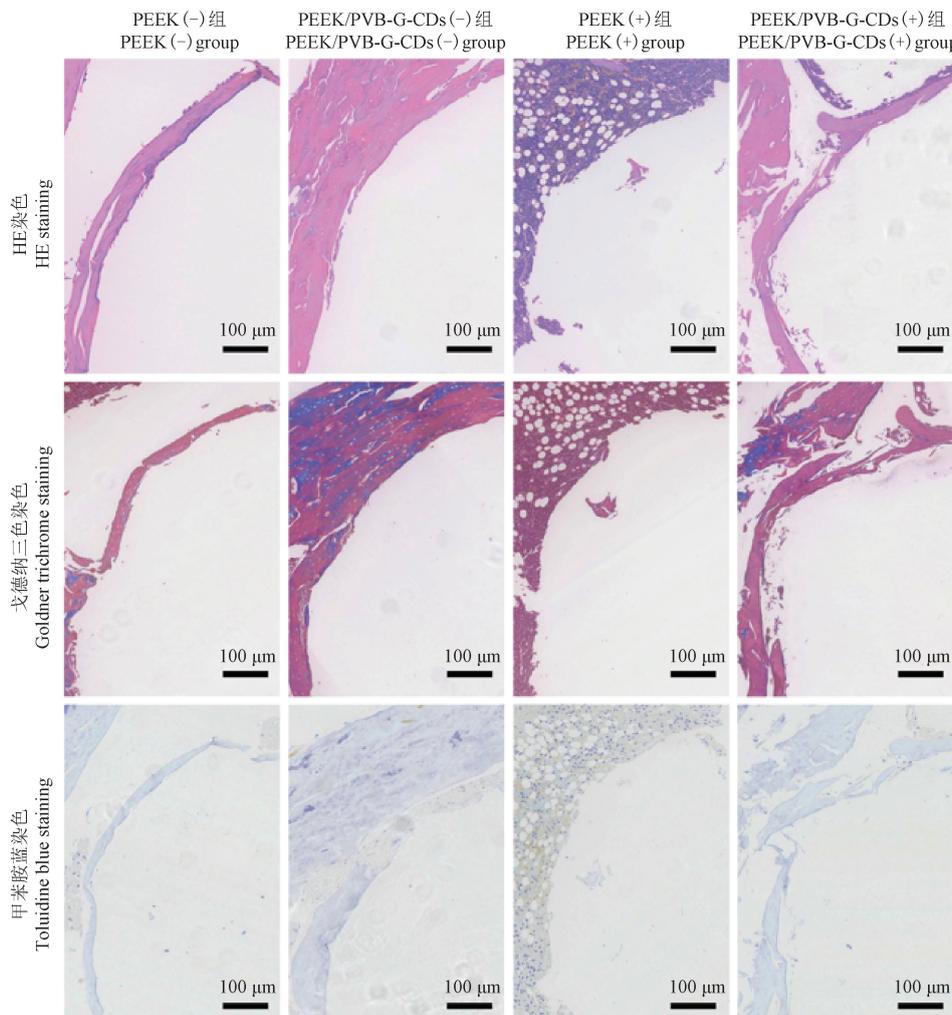
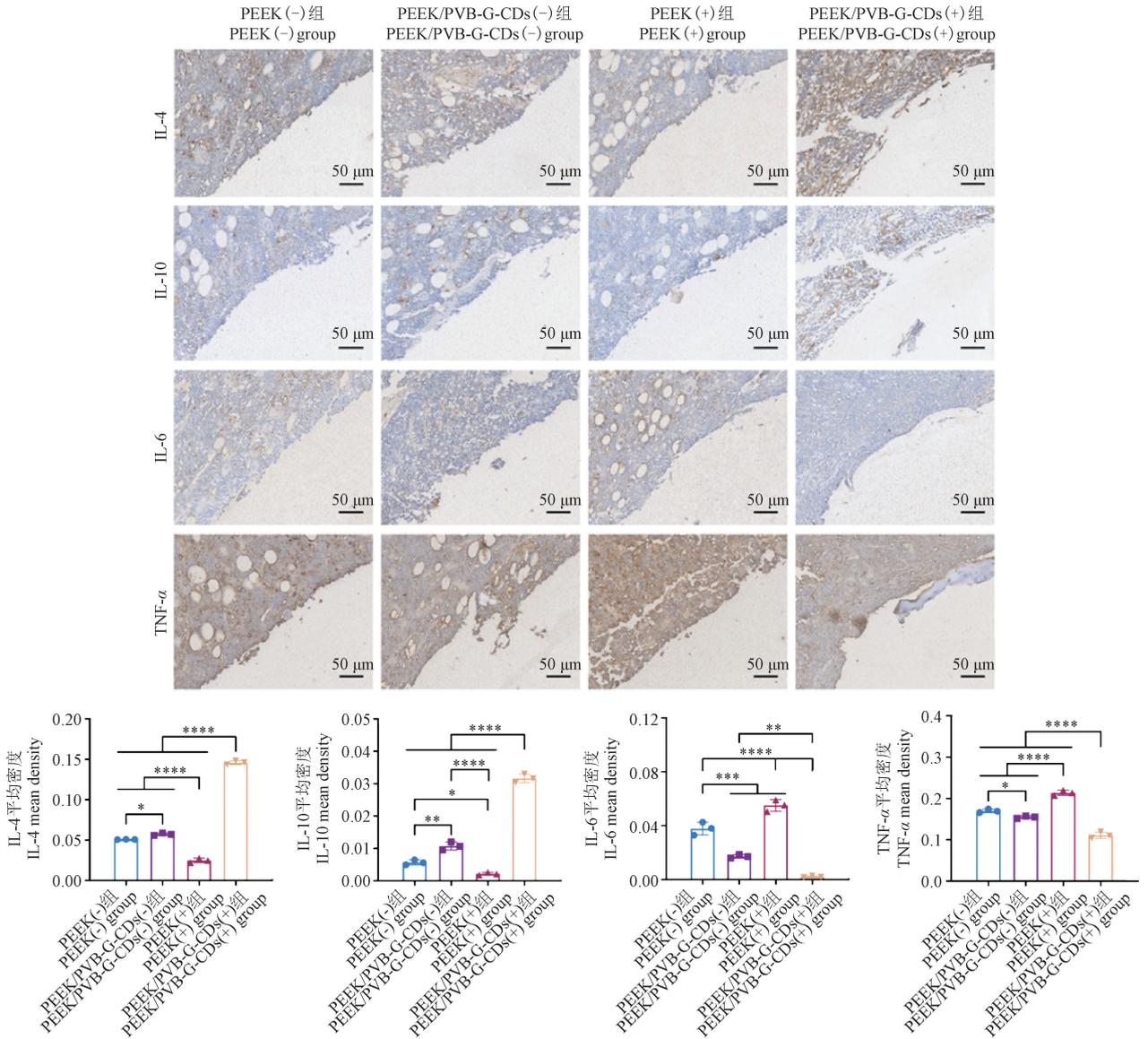


图 7 植入 6 周后不同分组大鼠植入部位的 HE 染色、戈德纳三色染色和甲苯胺蓝染色切片

Figure 7 HE staining, Goldner trichrome staining and Toluidine blue staining sections of the implant sites in different groups of rats at 6 weeks after implantation



注: 各组间相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ 。

图 8 植入 6 周后不同分组大鼠植入部位的免疫组化染色切片及其根据图像定量结果

Note. Comparison between groups, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ .

Figure 8 Immunohistochemical staining of sections and quantitative analysis of inflammatory factor levels at the implantation site in different groups of rats at 6 weeks after implantation

究人员在 6 周时分别取不同分组的股骨骨髓腔内容物进行体外细菌培养, 以进一步进行验证, 结果如图 6 所示, 在 PEEK(-) 组、PEEK/PVB-G-CDs(-) 组几乎无细菌菌落生成, 此结果与 X 射线结果相一致, 证明植入过程及植入后并未受到因手术操作及环境引起的其他感染。与此同时, PEEK(+) 组骨髓细菌培养后琼脂板长满细菌, 而 PEEK/PVB-G-CDs(+) 组中几乎没有细菌生长。这些结果与 Micro-CT 结果相一致, 进一步证明植入单纯 PEEK 后, 无法发挥有效的抗 MRSA 作用, 最终导致 PEEK(+) 组感染

严重, 而经 G-CDs 改性后, 改性植入物 PEEK/PVB-G-CDs 具有稳定的抗菌性能, 在抗耐药菌促进植入物骨整合极具价值。

进一步通过组织病理学检查, 分析植入部位的病理变化情况及植入物与周围骨组织的结合情况。如图 7 所示, HE 染色显示, PEEK(-) 组和 PEEK/PVB-G-CDs(-) 组中, 几乎观察不到中性粒细胞, 植入部位周围的骨组织呈现正常的组织结构。在 PEEK(+) 组的植入部位, 周围骨组织中可见大量中性粒细胞浸润, 在病理切片染色中仅可见大量的炎

症细胞及炎症性细胞凋亡而引起的空泡,无任何新骨形成征象,证明单纯 PEEK 并无抗感染性能,无法抑制 MRSA 的生长繁殖。而骨组织长期处于感染环境进而导致了慢性骨髓炎的产生<sup>[11]</sup>,但在 PEEK/PVB-G-CDs(+)组中,植入部位周围骨组织仅有极少量的中性粒细胞存在,表明 G-CDs 通过抑制 MRSA 感染,改善了骨组织感染部位的炎症反应。此外,戈德纳三色染色和甲苯胺蓝染色显示,PEEK(-)组和 PEEK/PVB-G-CDs(-)组植入部位周围可见连续性的新骨形成,尤其在戈德纳三色染色结果中,PEEK/PVB-G-CDs(-)组周围除大量红色新生骨外,还显示大量的蓝色矿化骨,并且 PEEK/PVB-G-CDs(-)组周围的新生骨覆盖总面积较 PEEK(-)组明显增多,可见在未感染情况下,G-CDs 改性后的 PEEK/PVB-G-CDs 具有良好的促骨形成能力。然而,PEEK(+)组植入部位周围几乎没有新骨形成,说明长期的细菌感染不利于新骨形成。相比之下,PEEK/PVB-G-CDs(+)组植入部位周围明显可见新骨形成,再次证实了在耐药菌感染情况下,以 G-CDs 为抗菌剂改性的骨植入物具备较强的抗耐药菌性能以及骨整合能力,具有良好的临床应用前景。

此外,利用免疫组化染色评价两种抗炎因子(IL-4、IL-10)和两种促炎因子(IL-6、TNF- $\alpha$ )表达的变化情况,并利用 Image J1.53K 对 4 种炎症因子的阳性表达水平进行定量分析。如图 8 所示,PEEK(+)组显示出比其他 3 组更低的 IL-4 和 IL-10 表达以及更强的 IL-6 和 TNF- $\alpha$  表达,表明 MRSA 感染使得植入部位股骨的炎症水平升高。PEEK(-)组中 IL-4 和 IL-10 的表达略低于 PEEK/PVB-G-CDs(-)组,IL-6 和 TNF- $\alpha$  的表达略高于 PEEK/PVB-G-CDs(-)组,表明 G-CDs 可能具有调节局部微环境的能力,从而增强抗炎效果。此外,与其他 3 组相比,PEEK/PVB-G-CDs(+)组中 IL-4 和 IL-10 的表达显著升高,IL-6 和 TNF- $\alpha$  的表达显著降低,表明 G-CDs 能够通过抑制 MRSA 感染,调节局部微环境,降低局部炎症水平,促进骨缺损部位的骨整合。

### 3 讨论

本研究建立了 MRSA 感染的大鼠骨缺损模型,利用多种评价手段评估 G-CDs 的体内抗菌性能。结果表明,G-CDs 对 MRSA 感染的骨缺损大鼠表现出优异的治疗效果,明显改善了感染部位的炎症反

应。以 G-CDs 为抗菌剂改性的骨植入物在耐药菌感染模型中的抗菌功效证实了 G-CDs 具备在细菌感染临床应用中的可行性,为今后的临床治疗提供了一种新的选择。

#### 参 考 文 献(References)

- [1] CAPLIN J D, GARCÍA A J. Implantable antimicrobial biomaterials for local drug delivery in bone infection models [J]. Acta Biomater, 2019, 93: 2-11.
- [2] HE M, HUANG Y, XU H, et al. Modification of polyetheretherketone implants; from enhancing bone integration to enabling multi-modal therapeutics [J]. Acta Biomater, 2021, 129: 18-32.
- [3] LU X, WU Z, XU K, et al. Multifunctional coatings of titanium implants toward promoting osseointegration and preventing infection; recent developments [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2021, 9: 783816.
- [4] ZHENG Z, LIU P, ZHANG X, et al. Strategies to improve bioactive and antibacterial properties of polyetheretherketone (PEEK) for use as orthopedic implants [J]. Mater Today Bio, 2022, 16: 100402.
- [5] HUANG J, LIN S, BAI X, et al. Decorated polyetheretherketone implants with antibacterial and antioxidative effects through layer-by-layer nanoarchitectonics facilitate diabetic bone integration with infection [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2022, 14(47): 52579-52598.
- [6] LIU J, LIU J, ATTARILAR S, et al. Nano-modified titanium implant materials; a way toward improved antibacterial properties [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2020, 8: 576969.
- [7] BAI X, ZHANG X, ZHANG R, et al. Immobilizing enoxacin on implant by polyvinyl butyral coating to promote osseointegration in osteoporosis with infection [J]. Mater Des, 2023, 227: 111749.
- [8] WAACK U, WEINSTEIN E A, FARLEY J J. Assessing animal models of bacterial pneumonia used in investigational new drug applications for the treatment of bacterial pneumonia [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2020, 64(5): e02242-e02319.
- [9] ZHAO M, LEPAK A J, ANDES D R. Animal models in the pharmacokinetic/pharmacodynamic evaluation of antimicrobial agents [J]. Bioorg Med Chem, 2016, 24(24): 6390-6400.
- [10] ZHANG X, BAI X, DENG X, et al. Long-term antibacterial activity of guanidinium carbon dots without detectable resistance for the effective treatment of pneumonia caused by gram-negative bacteria [J]. Carbon, 2023, 213: 118229.
- [11] YU Y J, YAN J H, CHEN Q W, et al. Polymeric nano-system for macrophage reprogramming and intracellular MRSA eradication [J]. J Control Release, 2023, 353: 591-610.
- [12] CROES M, VAN DER WAL B C H, VOGELY H C. Impact of bacterial infections on osteogenesis; evidence from in vivo studies [J]. J Orthop Res, 2019, 37(10): 2067-2076.