

金黄色葡萄球菌生物膜克氏针置入建立创伤性大鼠骨髓炎模型

https://doi.org/10.12307/2022.114

冯建波^{1,2}, 李陈诚^{1,2}, 刘金月^{1,2}, 王小敏³, 彭笳宸^{1,2}

投稿日期: 2020-10-29

送审日期: 2020-10-30

采用日期: 2020-12-07

在线日期: 2021-05-22

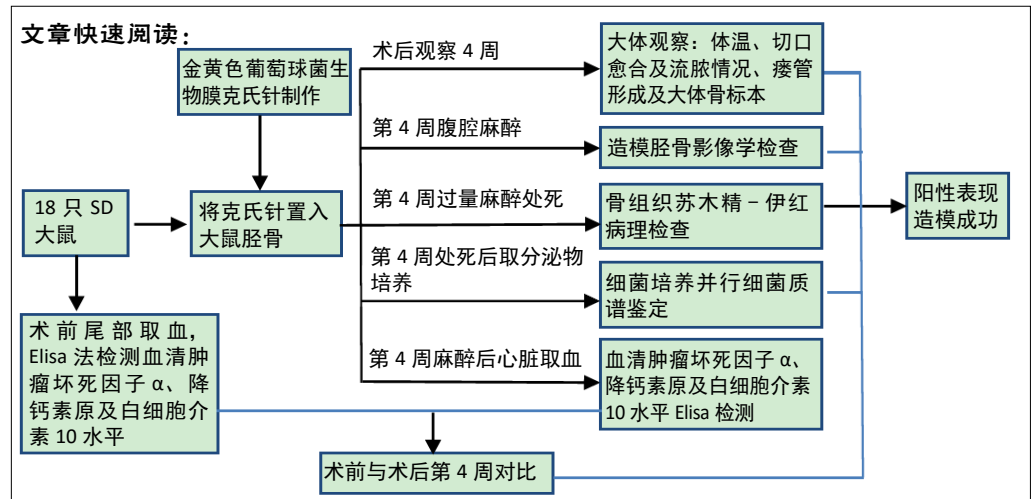
中图分类号:

R496; R378.1; R639

文章编号:

2095-4344(2022)05-00700-06

文献标识码: B



文题释义:

骨髓炎: 为一种骨的感染和破坏, 可由需氧或厌氧菌、分枝杆菌及真菌引起, 骨髓炎好发于长骨、糖尿病患者的足部或由于创伤或手术引起的穿透性骨损伤部位。

生物膜: 也称为生物被膜, 是指附着于有生命或无生命物体表面被细菌胞外大分子包裹的有组织的细菌群体, 生物膜细菌对抗生素和宿主免疫防御机制的抗性很强。

摘要

背景: 建立可靠且接近临床的动物模型是研究骨髓炎治疗方法的基础和关键, 以往均为直接滴加细菌至钻孔内制作骨髓炎模型, 与临床发病因素有明显区别, 且滴入细菌悬液量不易控制, 易导致模型动物死亡, 而在临床中以细菌生物膜导致骨髓炎的情况最多见。

目的: 利用带细菌生物膜克氏针置入骨髓腔来制作大鼠骨髓炎模型。

方法: 用金黄色葡萄球菌制作带细菌生物膜克氏针, 取18只健康SD大鼠, 将带金黄色葡萄球菌生物膜克氏针置入SD大鼠胫骨, 以无菌石蜡封闭钻孔。造模后密切观察动物行动状态及切口愈合情况, 4周后行影像学及病理学检查观察骨感染情况, 无菌取造模部位分泌物作细菌培养, 并行质谱鉴定其是否为制作细菌生物膜时接种的细菌, 并检测造模前后大鼠血清炎症因子, 作为评估骨髓炎模型造模成功的指标。

结果与结论: 18只大鼠均符合骨髓炎特征, 均表现出不同程度的流脓、死骨、死腔以及新生骨形成; 造模后大鼠降钙素原、肿瘤坏死因子α以及白细胞介素10等血清炎症因子增高明显($P < 0.05$); 经过鉴定大鼠分泌物培养后形成的细菌为金黄色葡萄球菌。以上结果证实: 通过金黄色葡萄球菌生物膜克氏针置入大鼠胫骨可以成功制作大鼠骨髓炎模型, 且更接近临床骨髓炎发病情况。

关键词: 骨髓炎; 大鼠; 动物模型; 金黄色葡萄球菌; 细菌生物膜; 克氏针

Implantation of Kirschner wire with *Staphylococcus aureus* biofilm establishes a traumatic osteomyelitis model in rats

Feng Jianbo^{1,2}, Li Chencheng^{1,2}, Liu Jinyue^{1,2}, Wang Xiaomin³, Peng Jiachen^{1,2}

¹Department of Joint Surgery, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China; ²Zunyi Medical University–University of Rochester Joint Orthopedic Research Center, Zunyi 563000, Guizhou Province, China; ³Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China
Feng Jianbo, Physician, Department of Joint Surgery, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China; Zunyi Medical University–University of Rochester Joint Orthopedic Research Center, Zunyi 563000, Guizhou Province, China

Corresponding author: Peng Jiachen, MD, Chief physician, Professor, Department of Joint Surgery, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China; Zunyi Medical University–University of Rochester Joint Orthopedic Research Center, Zunyi 563000, Guizhou Province, China

Co-corresponding author: Wang Xiaomin, MD, Associate professor, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China

¹遵义医科大学附属医院关节外科, 贵州省遵义市 563000; ²遵义医科大学-罗切斯特大学联合骨科研究中心, 贵州省遵义市 563000; ³遵义医科大学, 贵州省遵义市 563000

第一作者: 冯建波, 男, 1992年生, 贵州省遵义市人, 2015年遵义医科大学毕业, 医师, 主要从事骨关节感染研究。

通讯作者: 彭笳宸, 博士, 主任医师/教授, 遵义医科大学附属医院关节外科, 贵州省遵义市 563000; 遵义医科大学-罗切斯特大学联合骨科研究中心, 贵州省遵义市 563000

并列通讯作者: 王小敏, 副教授, 遵义医科大学基础医学院微生物实验室, 贵州省遵义市 563000

https://orcid.org/0000-0003-2126-1325 (冯建波); https://orcid.org/0000-0001-7267-0650 (彭笳宸)

基金资助: 贵州省科技计划项目(黔科合支撑[2018]2760), 项目负责人: 彭笳宸; 国家自然科学基金项目(81760400), 项目负责人: 彭笳宸

引用本文: 冯建波, 李陈诚, 刘金月, 王小敏, 彭笳宸. 金黄色葡萄球菌生物膜克氏针置入建立创伤性大鼠骨髓炎模型[J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(5):700-705.



Abstract

BACKGROUND: To establish an animal osteomyelitis model is the basis and key to explore the treatment of osteomyelitis. In the past, direct addition of bacteria was used to make the osteomyelitis model, which is significantly different from clinical pathogenic factors. Moreover, it is difficult to control the amount of bacterial suspension dripped, which can easily lead to the death of model animals. Osteomyelitis caused by bacterial biofilms is the most common in clinical practice.

OBJECTIVE: To prepare a rat model of osteomyelitis by inserting Kirschner wires with bacterial biofilms into the rat bone marrow cavity.

METHOD: Bacterium-bearing Kirschner wires were prepared using *Staphylococcus aureus*. Eighteen healthy Sprague-Dawley rats were enrolled. Kirschner wires with *Staphylococcus aureus* biofilms were inserted into the rat tibia, and the borehole was sealed with sterile paraffin. Rats' behaviors and incision healing were observed after modeling. Bone infection was observed through imaging and pathological examinations at 4 weeks after modeling. Secretions at the model site were aseptically taken for bacterial culture, and mass spectrometry was used to identify whether they were the bacteria inoculated during the production of bacterial biofilms, and the serum inflammatory factors of rats before and after modeling were detected as indicators for evaluating the success of the osteomyelitis model.

RESULTS AND CONCLUSION: All the 18 rats presented with the characteristics of osteomyelitis. They all showed different degrees of pus, dead bone, dead space and new bone formation. After modeling, the levels of serum inflammatory factors, such as procalcitonin, tumor necrosis factor alpha and interleukin-10, increased significantly ($P < 0.05$). The bacteria that formed after secretion culture were identified as *Staphylococcus aureus*. To conclude, the rat osteomyelitis model can be successfully made by inserting the Kirschner wire into the rat tibia through the *Staphylococcus aureus* biofilm, which is closer to osteomyelitis in clinic.

Key words: osteomyelitis; rats; animal model; *Staphylococcus aureus*; bacterial biofilm; Kirschner wire

Funding: The Science and Technology Plan Project of Guizhou Province, No. [2018]2760 (to PJG); National Natural Science Foundation of China, No. 81760400 (to PJG)

How to cite this article: FENG JB, LI CC, LIU JY, WANG XM, PENG JC. Implantation of Kirschner wire with *Staphylococcus aureus* biofilm establishes a traumatic osteomyelitis model in rats. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2022;26(5):700-705.

0 引言 Introduction

骨髓炎是骨的感染和破坏,可由需氧或厌氧菌、分枝杆菌及真菌等引起,其中最常见病原菌为金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)^[1]。慢性骨髓炎好发于长骨,成人常见于创伤骨折术后感染、糖尿病患者血运较差的足部或由于创伤或手术引起的穿透性骨损伤部位,儿童最常见于血源性骨髓炎,常见部位为血供良好的长骨,如胫骨或股骨的干骺端^[2-3]。临床上骨髓炎常反复发作,经久不愈,严重影响患者的身心健康,加重了家庭的经济负担,并且部分严重患者导致劳动力丧失^[4]。骨髓炎急性发作时可有高热、局部疼痛,转为慢性骨髓炎时会有溃破、流脓、有死骨或空洞形成,重症患者可危及生命,有时不得不进行截肢,致患者残疾^[5]。目前针对骨髓炎最常用的治疗方法是病灶彻底清除、带抗生素植骨^[6],治疗效果往往不理想,常需要多次手术和长期使用抗生素,且复发率很高^[7-8],因此骨髓炎的治疗依然是骨科医生的一大难题。

S. aureus 成为骨髓炎感染的主要病原菌,在骨髓炎感染中 75% 为葡萄球菌,其中 *S. aureus* 占主要地位, *S. aureus* 已成为一种威胁人类的主要病原体,导致各种疾病,从化脓性感染到威胁生命的感染如脓毒血症等^[9]。生物膜是 *S. aureus* 感染的主要途径和难治的原因之一, *S. aureus* 生物膜协助其在骨组织定植感染,是一种对恶劣环境的适应性反应,增加了对抗生素的抗药性,削弱了宿主的免疫力,生物膜还加强了 *S. aureus* 对营养缺乏的耐受性^[10]。防止生物膜形成和破坏生物膜可能成为治疗 *S. aureus* 感染的必要手段,有研究发现,通过槲皮素抑制细菌生物膜防止感染取得了一定成效,其在抑制生物膜的同时还降低了细菌的耐药性,促进了药物对细菌的杀灭作用^[11]。

要探究骨髓炎的治疗方法,有效复制临床的骨髓炎模型是研究的基础和关键,在临床中以细菌生物膜导致骨髓炎

的情况最多见,因此模拟细菌生物膜导致的骨髓炎模型对未来骨髓炎治疗的研究至关重要。以往均为直接滴加细菌进入钻孔内制作骨髓炎模型,与临床发病因素有明显区别,且滴入细菌悬液量不易控制,易导致模型动物死亡,此次研究建立新型 *S. aureus* 生物膜克氏针置入大鼠胫骨导致骨髓炎的模型,与临床内固定生物膜感染更加接近。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 自身前后对照,动物体内实验。

1.2 时间及地点 实验于 2019 年 9 月至 2020 年 6 月在遵义医科大学基础 1 号实验楼 3 楼生物化学实验室完成。

1.3 材料 SPF 级雌性 SD 大鼠 18 只购自长沙市天勤生物科技有限公司,8 周龄,体质量 250 g 左右,每笼饲养 3 只。给动物提供标准食物和水,实验前进行 1 周适应;所有动物的处理均遵照伦理规定进行,并通过遵义医科大学附属医院伦理审查委员会审查批准,批准号: KLLY-2019-074。

1.4 方法

1.4.1 细菌菌株与带菌克氏针制作 将金黄色葡萄球菌 ATCC25923(遵义医科大附属医院检验科提供)标准株接种于血琼脂平板上,37 °C 恒温培养箱中孵育 24 h 后取出,接种环无菌挑取单个菌落至 15 mL 的氯化钠肉汤(青岛海博生物,中国)培养液中,并置于 37 °C 的恒温摇菌箱中孵育 18 h,调整细菌浓度到 1×10^7 CFU/mL,取直径为 1 mm、长度为 5 mm 无菌克氏针放置于细菌悬液中,继续于恒温摇菌箱中孵育 18 h,用结晶紫(索莱宝,中国)染色克氏针证实有细菌生物膜形成^[12],见图 1。

1.4.2 骨髓炎模型制作 腹腔注射 3% 戊巴比妥钠(遵义医科大学附属医院提供)30 mg/kg 以麻醉大鼠。麻醉生效后固定大鼠四肢,右下肢备皮,碘伏消毒术区,铺一次性无菌治疗巾,在膝关节下沿胫骨前嵴内侧切开长约 1 cm 切口,在胫骨前

肌内侧进入达骨膜，显露胫骨上端的前外侧胫骨嵴，小心刮开骨膜，用直径 1.5 mm 钻头的手钻在此处钻骨洞，用小刮匙探查去除松质骨，将制备的带细菌生物膜克氏针头插入胫骨髓腔后用骨蜡将骨窗封闭，生理盐水反复冲洗后逐层缝合伤口，予单笼饲养，造模后观察 4 周，见图 2。

实验动物造模过程中的相关问题

Table with 2 columns: Question/Category and Answer/Detail. Rows include: 造模目的 (建立可靠且接近临床的大鼠骨髓炎模型), 选择动物的条件 (SPF 级雌性 SD 大鼠, 8 周龄, 体质量 250 g 左右), 动物来源及品系 (SD 大鼠购自长沙市天勤生物科技有限公司), 造模技术描述 (用金黄色葡萄球菌制作带细菌生物膜克氏针, 取 18 只健康 SD 大鼠...), 动物数量及分组方法 (18 只健康 SD 大鼠全部造模, 自身前后对照), 造模成功评价指标 (观察大鼠体温变化、切口愈合及流脓情况...), 造模过程中动物死亡原因 (观察过程中无动物死亡及丢失), 伦理委员会批准 (实验方案通过遵义医科大学附属医院伦理审查委员会审查批准, 批准号: KLLY-2019-074)

1.4.3 骨髓炎检测指标

体温检测: 造模前检测大鼠体温情况, 造模后 1 周连续检测大鼠体温变化, 采用肛温法测量大鼠体温, 将体温计探头置入大鼠肛门内距肛门口 1.5-2.0 cm 深度, 约 20 s 后读数, 对比术前术后大鼠体温变化情况。

切口愈合情况: 造模后观察切口部位愈合情况及有无流脓。

影像学检查: 造模后第 4 周后所有大鼠行 X 射线 (遵义医科大学附属医院影像科) 检测造模部位, 采用正、侧位摄片, 观察骨组织愈合情况。

大体标本情况: 造模后第 4 周过量麻醉处死大鼠, 将大鼠造模胫骨取下去除软组织, 观察骨洞愈合情况, 有无隧道形成及流脓。

骨病理苏木精-伊红染色: 将骨胫骨放入 EDTA 脱钙液 (索莱宝, 中国) 脱钙, 每天更换脱钙液, 用细针试脱钙程度, 待可轻松刺入骨皮质时为宜, 将标本送至遵义医科大学附属医院病理科行石蜡包埋病理切片并行苏木精-伊红染色。

细菌培养及鉴定: 将大鼠处死后无菌取钻孔部位分泌物涂到血琼脂平板进行划线培养, 观察有无细菌菌落生长, 将培养出的细菌利用质谱仪 (全自动快速微生物质谱检测系统, Automated microbial identification system, 法国) 进行质谱鉴定, 鉴定是否为克氏针上所接种细菌导致感染。

炎症因子检测: 造模前后检测炎症因子, 造模前采取大鼠尾部采血法, 造模第 4 周戊巴比妥麻醉大鼠后, 心脏采血

法抽取血液, 用无菌管收集, 室温血液自然凝固 10-20 min, 2-8 °C 条件离心 20 min 左右 (2 000-3 000 r/min), 仔细收集上清, 用大鼠降钙素原、肿瘤坏死因子 α 以及白细胞介素 10 的 Elisa 盒子 (Elabscience, 中国) 进行检测, 使用多功能酶标仪 (SpectraMax M2e, 美国) 检测吸光度并计算浓度, 对比造模前后大鼠炎症因子变化情况。

1.5 主要观察指标 大鼠体温变化、切口愈合及流脓情况、影像学检查、大体骨标本钻孔愈合情况、细菌培养、骨组织苏木精-伊红染色病理学及炎症因子检测。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 23.0 统计软件及作图软件 GraphPad Prism 8.0 进行分析, 术前术后对比采用单因素方差分析, 以 P < 0.05 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 18 只 SD 大鼠骨髓炎造模全部成功, 观察过程中无动物死亡及丢失, 所有结果进入数据分析。

2.2 大鼠体温变化 检测造模前 1 d 至造模后 1 周的体温, 取平均值统计分析后显示术前检测大鼠体温在 37 °C 以下, 造模后第 2 天体温开始升高, 至造模后第 4, 5 天升至最高达到 38.8 °C, 造模后第 7, 8 天时温度逐渐恢复至造模前体温范围, 见图 3。

2.3 切口愈合及瘻管形成以及胫骨大体标本情况 造模后第 2 周所有大鼠出现不同程度的红肿流脓, 切口可见脓性分泌物; 切开皮肤皮下后可见到瘻管形成; 将胫骨取下, 去除软组织, 可以见到钻孔部位有脓性分泌物, 钻孔未愈合, 内有新生骨形成, 见图 4。

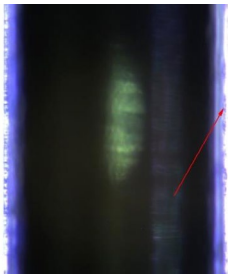
2.4 造模部位 X 射线片检查结果 造模后第 4 周右侧胫骨 X 射线片可观测到克氏针所在位置腔隙增大, 死骨形成, 且有新生骨形成包绕克氏针, 皮质变薄部分出现不连续, 钻孔处骨质愈合不良, 见图 5。

2.5 骨组织苏木精-伊红病理检查结果 将大鼠右侧胫骨取下, 去除软组织, 用 EDTA 脱钙液脱钙 4 周左右, 取出克氏针后进行切片苏木精-伊红染色, 光镜下见大量炎性细胞浸润骨髓腔, 钻孔部位骨皮质未能愈合, 骨髓腔能可见新生骨形成, 见图 6。

2.6 细菌分泌物培养鉴定 消毒无菌切开右侧胫骨造模部位皮肤, 分离软组织, 无菌蘸取大鼠钻孔部位分泌物在血琼脂培养板上进行培养, 培养 24 h 后可见到单个金黄色葡萄球菌菌落形成, 并有溶血环, 见图 7。

2.7 细菌质谱鉴定 将细菌分泌物培养菌落送至遵义医科大学检验科行细菌质谱鉴定, 经过鉴定大鼠分泌物培养后形成的细菌均为金黄色葡萄球菌, 见图 8。

2.8 血清炎症指标检测结果 造模前尾部采血法抽取大鼠血液, 分离血清保存于 -80 °C 冰箱中, 术后第 4 周心脏采血法采血后分离血清并行 Elisa 检测, 可见造模后大鼠降钙素原、肿瘤坏死因子 α 以及白细胞介素 10 等血清炎症因子增高明显 (P < 0.05), 差异有显著性意义, 见图 9。



图注：结晶紫染色后克氏针边缘红色箭头部位有颗粒状蓝色，为细菌生物被膜
图 1 | 克氏针细菌生物被膜

Figure 1 | Kirschner wire with bacterial biofilm

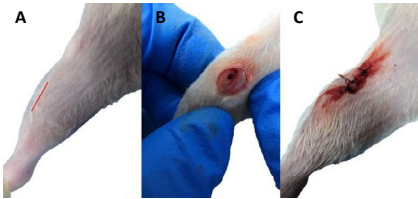


图 2 | 造模手术操作切口部位及钻孔情况

Figure 2 | The location of the incision and the drilling during the model operation

图注：图 A 中红色线条为大鼠右侧胫骨切口位置；B 为钻孔情况；C 为缝合后的伤口

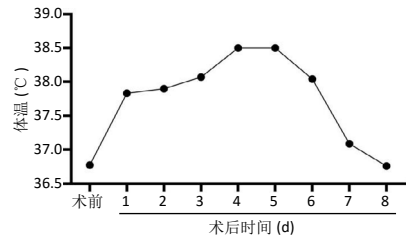


图 3 | 骨髓炎模型大鼠体温变化曲线

Figure 3 | Rat body temperature change curve

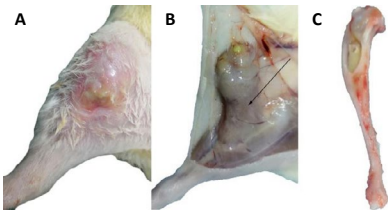


图 4 | 骨髓炎模型大鼠切口愈合 (A)、瘘管形成 (B) 以及胫骨大体标本情况 (C)

Figure 4 | Incision healing (A), fistula formation (B) and general tibia specimen condition (C) of the rat osteomyelitis model

图注：切开皮肤皮下后可见到瘘管形成 (黑色箭头指示部位为瘘管)；钻孔未愈合，内有新生骨形成



图 5 | 骨髓炎模型大鼠造模部位正、侧位 X 射线片

Figure 5 | Anterior and lateral X-ray films of the modeling part in the rat osteomyelitis model

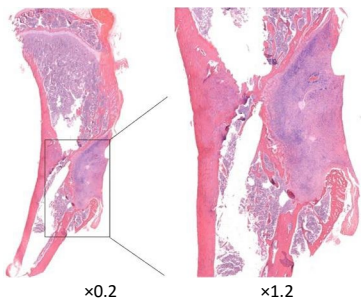


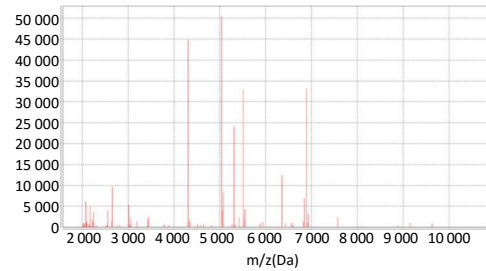
图 6 | 骨髓炎模型大鼠造模部位骨组织病理检查 (苏木精 - 伊红染色)

Figure 6 | Pathological examination of bone tissue at the modeling part in the rat osteomyelitis model (hematoxylin-eosin staining)



图 7 | 骨髓炎模型大鼠造模部位细菌分泌物培养鉴定

Figure 7 | Culture and identification of bacterial secretions at the modeling part in the rat osteomyelitis model



图注：大鼠分泌物培养后形成的细菌鉴定为金黄色葡萄球菌

图 8 | 骨髓炎模型大鼠造模部位分泌物细菌质谱鉴定

Figure 8 | Identification of bacteria by mass spectrometry at the modeling part in the rat osteomyelitis model

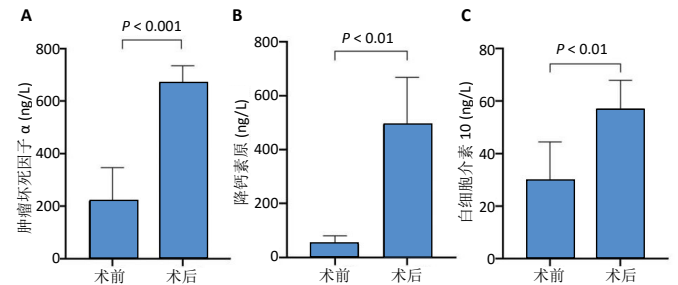


图 9 | 骨髓炎造模前后大鼠血清肿瘤坏死因子 α (A)、降钙素原 (B)、白细胞介素 10 (C) 水平变化

Figure 9 | Detection of serum tumor necrosis factor-α (A), procalcitonin (B), and interleukin-10 (C) before and after the osteomyelitis model was made in rats

3 讨论 Discussion

骨髓炎是指以细菌为主的病原微生物感染骨组织引起的炎症反应，骨髓炎根据病程可以分为急性、亚急性和慢性，当急性骨髓炎未能治愈时，反复发作就会进展为慢性骨髓炎。急性、亚急性骨髓炎一般可以通过全身抗生素治疗使症状得到控制^[13]，但是其复发率很高，骨髓炎常见于严重的开放性骨折，多为高能损伤所致，其骨断端暴露，易被细菌侵袭，导致骨组织感染或局部细菌病灶残留^[14]。此类高能损伤对骨断端周围皮肤软组织、血管造成的创伤严重，血供破坏大，极易形成死骨，进而成为细菌生长、细菌生物膜黏附的“温床”^[15]，最终形成慢性骨髓炎，在骨科内固定置入中也可常见置入支架生物膜的感染，骨髓炎病程长、治疗难度大，截肢率、致残率高。临床上针对骨髓炎的治疗为在充分清创与病灶引流的基础上给予局部及全身敏感抗生素治疗，但由于骨髓炎病灶局部血供差，且多伴有死骨形成，全身应用的敏感抗生素很难在病灶局部形成有效杀菌浓度，治疗效果差、不良反应大^[16]，目前仍然是骨科医生的一大难题，没有较好的治疗方案^[17]。而随着交通事故的增加、创伤骨折患者的增多，骨髓炎的发病率也随之逐年增加。流行病学

调查显示,在发展中国家成人骨髓炎发病率达到 24.4/10 万,且作为主要劳动力的男性发病率高于女性^[18],年轻患者多见,治疗后反复发作,严重影响患者劳动力并增加了家庭的经济负担^[19],在这些骨髓炎患者中,金黄色葡萄球菌感染导致的骨髓炎占主要地位^[20]。慢性骨髓炎反复发作的主要原因是细菌生物膜的形成,当骨感染细菌超过 24 h 时,细菌在局部就开始形成生物膜^[21],生物膜阻挡了药物和常规的手术清创治疗,在局部形成对细菌感染的保护灶,增加了感染治疗难度^[15, 22]。

骨髓炎模型在研究骨髓炎的治疗方法方面提供了基础,在以往动物模型中,通过将长骨骨折后加入细菌悬液制作 *S. aureus* 感染骨髓炎模型,该方法成功感染率较高,但是常常在加入细菌悬液时有因为浓度过高增加动物死亡的风险,且骨折后的固定过程较为复杂,增加了模型制作难度^[23]。在实验对象选择中,兔和猪的成本较高,在饲养方面的成本也相对提高,且大型动物的操作较为复杂,常需多人协同才能完成实验^[24-25]。在大鼠实验模型中通过注射硬化剂硬化血管来减少局部血运,并植入内固定并滴加细菌悬液模拟临床骨髓炎^[26],但细菌浓度过高容易导致动物死亡,而且临床中直接接触大量细菌悬液导致骨感染的病例比较罕见,通常为外伤清创后残留的细菌形成细菌生物膜,或者手术内固定支架上残留的细菌生物膜导致骨的感染而形成骨髓炎^[27]。因此,此次实验选择大鼠胫骨植入带 *S. aureus* 细菌生物膜的克氏针制作骨髓炎模型,与临床发病因素更为相近,模型制作操作更灵活,动物价格经济适中,管理方便,为骨髓炎模型贴近临床提供更佳的模型制作方案。

此次研究重点为模拟临床中细菌生物膜形成导致的骨髓炎,通过制作带生物膜的克氏针作为细菌载体,其对比直接将细菌悬液滴入动物骨髓腔安全性较高,不易因细菌过量导致动物死亡^[28]。临床中患者常常不会直接接触到高浓度细菌,通常为创伤性骨折清创不彻底,导致细菌残留形成细菌生物膜,在内固定置入术中,置入的支架是生物膜形成的最佳场所,因其无血管供应因此对其免疫减弱^[29],在植入材料和坏死骨上形成的生物膜中 *S. aureus* 生物膜是最常见的一种。*S. aureus* 骨髓炎持续存在骨科感染中,生物膜被认为是导致不治之症和慢性感染的主要原因^[10]。生物膜的形成始于浮游细菌细胞最初附着在底物上,其具有与多种细胞外基质蛋白结合的能力,浮游生物细胞的附着会引发胞外聚合物的合成,包括多糖、蛋白质和核酸。生物膜表型对抗生素的耐药性提高,部分原因是药物从生物膜外扩散到深埋在生物膜内的细菌;此外,由于生物膜中细菌代谢表型的改变,抗生素在生物膜中成功扩散的有效性降低,使它们对药物治疗更具有耐受性^[30]。用带 *S. aureus* 生物膜的克氏针模拟临床发病因素,通过对以上实验结果的评估,证实成功制作骨髓炎大鼠模型。虽然目前对骨髓炎的治疗已经取得了很大的进步,但是骨髓炎仍然得不到根治,因此,制作稳定且接近临床的动物模型是非常必要的,可靠的骨髓炎动物模型为骨髓炎治疗方法研

究提供了实验基础。

此次研究的局限性:以大鼠为骨髓炎模型对象,其植入物装置与人类仍有区别,通常人类克氏针是通过钻孔直接转入骨皮质及骨松质,但是带 *S. aureus* 生物膜的克氏针直接钻孔进入大鼠胫骨体内将会导致表层细菌生物膜的破坏,可能无法成功制作骨髓炎模型,且在大鼠胫骨无法使用与人类相当的骨固定装置,因此在研究骨髓炎病理性骨折受力情况时或者需要较大的与人类相仿的如钢板等装置时需要选择较大体型的动物作为研究对象,以便于手术操作,并达到与人类临床相仿的应用模型。

此次研究的不足:在大鼠影像学检测方面,利用 MicroCT 进行影像学分析对骨髓炎疾病的诊断更加精确,但是由于经费以及该实验平台无此设备,故利用 X 射线片作为影像学检查,X 射线片相对 MicroCT 清晰度较低, MicroCT 可以更清晰显示骨质受到骨髓炎模型的破坏情况。

致谢:感谢彭箭宸教授的指导,感谢贵州省科技计划项目及国家自然科学基金项目的经费支持,感谢遵义医科大学提供实验操作平台。

作者贡献:实验设计为冯建波;实验实施为李陈诚、刘金月;评估为王小敏;彭箭宸审校;冯建波、彭箭宸以及全体作者对文章负责。

经费支持:该文章接受了“贵州省科技计划项目(黔科合支撑[2018]2760)及国家自然科学基金项目(81760400)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突:文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题:该实验通过遵义医科大学附属医院伦理审查委员会审查同意,伦理通过编号:KLLY-2019-074。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

写作指南:该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重:文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审:文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明:该文统计学方法已经遵义医科大学卫生统计学专家审核。

文章版权:文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明:这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] MUTHUKRISHNAN G, MASTERS EA, DAISS JL, et al. Mechanisms of Immune Evasion and Bone Tissue Colonization That Make *Staphylococcus aureus* the Primary Pathogen in Osteomyelitis. *Curr Osteoporos Rep*. 2019;17(6):395-404.
- [2] ALVARES PA, MIMICA MJ. Osteoarticular infections in pediatrics. *J Pediatr (Rio J)*. 2020;96 Suppl 1:58-64.

- [3] CLHOUN JH, MANRING MM. Adult osteomyelitis. *Infect Dis Clin North Am*. 2005;19(4):765-786.
- [4] GEURTS J, HOHNEN A, VRANKEN T, et al. Treatment strategies for chronic osteomyelitis in low- and middle-income countries: systematic review. *Trop Med Int Health*. 2017;22(9):1054-1062.
- [5] GERAGHTY T, LAPORTA G. Current health and economic burden of chronic diabetic osteomyelitis. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res*. 2019;19(3):279-286.
- [6] HOGAN A, HEPPELT VG, SUDA AJ. Osteomyelitis. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2013;133(9):1183-1196.
- [7] PINCHER B, FENTON C, JEYAPALAN R, et al. A systematic review of the single-stage treatment of chronic osteomyelitis. *J Orthop Surg Res*. 2019;14(1):393.
- [8] PANEMANGALORE M, CHERIAN MG. Metabolism of parenterally administered zinc and cadmium in livers of newborn rats. *Chem Biol Interact*. 1983;45(3):327-339.
- [9] KAVANAGH N, RYAN EJ, WIDAA A, et al. Staphylococcal Osteomyelitis: Disease Progression, Treatment Challenges, and Future Directions. *Clin Microbiol Rev*. 2018;31(2):e00084-17.
- [10] SCHERR TD, HEIM CE, MORRISON JM, et al. Hiding in Plain Sight: Interplay between Staphylococcal Biofilms and Host Immunity. *Front Immunol*. 2014;5:37.
- [11] MEMARIANI H, MEMARIANI M, GHASEMIAN A. An overview on anti-biofilm properties of quercetin against bacterial pathogens. *World J Microbiol Biotechnol*. 2019;35(9):143.
- [12] XU Z, LIANG Y, LIN S, et al. Crystal Violet and XTT Assays on Staphylococcus aureus Biofilm Quantification. *Curr Microbiol*. 2016; 73(4):474-482.
- [13] DYM H, ZEIDAN J. Microbiology of Acute and Chronic Osteomyelitis and Antibiotic Treatment. *Dent Clin North Am*. 2017;61(2):271-282.
- [14] BECK-BROICHSITTER BE, SMEETS R, HEILAND M. Current concepts in pathogenesis of acute and chronic osteomyelitis. *Curr Opin Infect Dis*. 2015;28(3):240-245.
- [15] ZIMMERLI W, SENDI P. Orthopaedic biofilm infections. *APMIS*. 2017; 125(4):353-364.
- [16] NOWAK MA, WINNER JS, BEILKE MA. Prolonged oral antibiotic suppression in osteomyelitis and associated outcomes in a Veterans population. *Am J Health Syst Pharm*. 2015;72(23 Suppl 3):S150-5.
- [17] RIVAS FELICE J, GONZÁLEZ HERRANZ P, MEJÍA CASADO A, et al. Chronic recurrent osteomyelitis: A diagnostic and therapeutic challenge. *Rev Esp Cir Ortop Traumatol*. 2017;61(1):35-42.
- [18] KREMERS HM, NWOJO ME, RANSOM JE, et al. Trends in the epidemiology of osteomyelitis: a population-based study, 1969 to 2009. *J Bone Joint Surg Am*. 2015;97(10):837-845.
- [19] MAFFULLI N, PAPALIA R, ZAMPOGNA B, et al. The management of osteomyelitis in the adult. *Surgeon*. 2016;14(6):345-360.
- [20] CALVO C, NÚÑEZ E, CAMACHO M, et al. Epidemiology and Management of Acute, Uncomplicated Septic Arthritis and Osteomyelitis: Spanish Multicenter Study. *Pediatr Infect Dis J*. 2016;35(12):1288-1293.
- [21] SWEENEY E, LOVERING AM, BOWKER KE, et al. An in vitro biofilm model of Staphylococcus aureus infection of bone. *Lett Appl Microbiol*. 2019;68(4):294-302.
- [22] ZABOROWSKA M, TILLANDER J, BRÅNEMARK R, et al. Biofilm formation and antimicrobial susceptibility of staphylococci and enterococci from osteomyelitis associated with percutaneous orthopaedic implants. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2017;105(8):2630-2640.
- [23] ROBINSON DA, BECHTOLD JE, CARLSON CS, et al. Development of a fracture osteomyelitis model in the rat femur. *J Orthop Res*. 2011;29(1): 131-137.
- [24] YIN LY, MANRING MM, CALHOUN JH. A rabbit osteomyelitis model to simulate multibacterial war wound infections. *Mil Med*. 2013;178(6): 696-700.
- [25] JENSEN LK, KOCH J, DICH-JORGENSEN K, et al. Novel porcine model of implant-associated osteomyelitis: A comprehensive analysis of local, regional, and systemic response. *J Orthop Res*. 2017;35(10):2211-2221.
- [26] REIZNER W, HUNTER JG, O'MALLEY NT, et al. A systematic review of animal models for Staphylococcus aureus osteomyelitis. *Eur Cell Mater*. 2014;27:196-212.
- [27] HOWELL WR, GOULSTON C. Osteomyelitis: an update for hospitalists. *Hosp Pract (1995)*. 2011;39(1): 153-160.
- [28] ARENS D, WILKE M, CALABRO L, et al. A rabbit humerus model of plating and nailing osteosynthesis with and without Staphylococcus aureus osteomyelitis. *Eur Cell Mater*. 2015; 30:148-161; discussion 161-162.
- [29] YU JA, GAO XX. Bacterial biofilm and chronic wound infection. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi*. 2019;35(12):842-847.
- [30] DAVIDSON DJ, SPRATT D, LIDDLE AD. Implant materials and prosthetic joint infection: the battle with the biofilm. *EFORT Open Rev*. 2019; 4(11):633-639.

(责任编辑: ZN, SX)