

20 种四氢萘类抗真菌化合物体外抑菌活性测定

梁蓉梅,曹永兵,周有骏,汪涛,卢嘉,姚斌,姜远英*

(第二军医大学药学院药理学教研室,上海 200433)

[摘要] **目的:**考察 20 种四氢萘类化合物体外抗真菌活性。**方法:**采用 NCCLS 的 M27-A 方案,以不同氟康唑敏感性的念珠菌及非念珠菌为供试菌进行体外药敏试验。对化合物 **22-1**、**31-1** 及其盐酸盐 **22**、**31**,还有化合物 **34-1**、**26-1** 及其溴酸盐 **34**、**26** 进行时间生长曲线实验以及与其他结构抗真菌药进行体外联合药敏试验。**结果:**该类化合物均具一定抗真菌活性,尤其是化合物 **31-1** 对氟康唑敏感白念珠菌的抑菌活性明显强于氟康唑,持续抑菌时间超过 54 h;化合物 **22** 和 **22-1** 对氟康唑耐药白念珠菌及近平滑念珠菌和红色毛癣菌作用强大, MIC₅₀ 值均 < 0.125 μg/ml,对于氟康唑耐药的白念珠菌抑菌活性强于酮康唑。此类药物与小檗碱或特比萘芬联用可产生协同作用。**结论:**四氢萘类化合物结构新颖,体外抗真菌活性显著,值得进一步研究开发。

[关键词] 四氢萘类;抗真菌药;微生物敏感性试验**[中图分类号]** R 978.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)03-0286-08Detection of *in vitro* anti-fungal activity of 20 tetralin compounds

LIANG Rong-mei, CAO Yong-bing, ZHOU You-jun, WANG Tao, LU Jia, YAO Bin, JIANG Yuan-ying* (Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the anti-fungal activities of 20 tetralin compounds *in vitro*. **Methods:** We adopted the M27-A project recommended by the National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS). Tetralin compounds were tested and selected with several candidal strains and non-candidal strains with different susceptibilities to fluconazole. After obtaining the susceptibility results, we plotted the time-growth curves of several typical tetralin compounds, including compound **22-1**, **31-1** and their muriate **22**, **31**, as well as compound **34-1**, **26-1** and their bromate **34**, **26**. The combination effects of compound **22**, **26**, **34**, **31-1** with other anti-fungal agents (with different structures) were also determined. **Results:** The 20 tetralin compounds were proven to have different degrees of anti-fungal activities. Compound **31-1** had a stronger anti-fungal activity to FLC-susceptible strains than fluconazole did, and its effect lasted for over 54 h at the concentration of 6 μg/ml. Compounds **22-1** and **22** markedly suppressed the growth of *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, and *Trichophyton rubrum*, with all the MIC₅₀ values less than 0.125 μg/ml. Time-growth curves indicated that the anti-fungal activity of **22-1** on fluconazole-resistant strain was more powerful than that of ketoconazole. Furthermore, tetralin compounds had a synergistic effect with terbinafine and berberine on fluconazole-resistant strains. **Conclusion:** Tetralin compounds have powerful anti-fungal activities and their structures are different from those of other anti-fungal agents currently used, which provide a basis for developing new anti-fungal agents.

[KEY WORDS] tetrahydronaphthalenes; anti-fungal agents; microbial sensitivity tests

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(3): 286-293]

真菌感染是免疫缺陷患者发病和死亡的重要原因,在美国院内感染患者中白念珠菌成为血液系统感染的第四大最常见病原菌。同时随着氮唑类药物广泛应用,白念珠菌耐药现象也快速发展,已出现药物间交叉耐药,因此开发新型抗真菌药物已成为临床彻底治疗真菌感染的迫切要求。近年来许多药物作用新靶点被相继提出,如以真菌细胞壁为靶点成功开发并上市的卡泊芬净;以细胞膜为靶点人工合成的质子泵 ATP 酶非共价抑制剂 BM₂^[1];通过改变细胞膜成分^[2]、改变某些基因^[3]、利用光灭活作用^[4]等方式开发新的抗真菌药。

第二军医大学药学院天然药化教研室经广泛的构效关系研究,针对白念珠菌羊毛甾醇 14 α -去甲基酶三维空间结构^[5],设计和合成出具有新型结构的四氢萘类抗真菌化合物。理论上,该类化合物作用机制主要干扰 CYP51 活性部位的氨基酸残基,而不与血红素铁原子结合,具专一性特点,从而可避免因

[基金项目] 国家自然科学基金(30672626, 30572257). Supported by National Natural Science Foundation of China (30672626, 30572257).

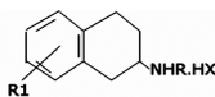
[作者简介] 梁蓉梅,硕士,主管药师。

* Corresponding author. E-mail: Jiangyy@smmu.edu.cn

结合人肝细胞、肾脏组织细胞等细胞色素 P450 酶系的血红素铁原子导致严重副作用。本研究初步考察了四氢萘类化合物药体外抗真菌活性,为新药的进一步研发提供证据。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂 四氢萘类化合物由第二军医大学药学院药物化学教研室及有机化学教研室共同合成,化合物 **22-1**、**26-1**、**34-1**、**31-1** 为单体,其余化合物为盐酸盐或溴酸盐(图 1)。该类化合物均为人工合成纯品,常温下多数为白色粉末,**22-1**、**22**、**31**、**31-1** 为淡黄色油状液体。两性霉素 B 由华北制药集团新药研究开发有限责任公司提供,氟康唑注射液由上海信谊金朱药业有限公司提供,伊曲康唑、特比萘芬由上海医工院提供,酮康唑由第二军医大学药学院有机化学教研室合成,盐酸小檗碱由上海利生制药厂提供。



Compound	R	R1	X	Compound	R	R1	X
21	(CH ₂) ₆ CH ₃	5-OCH ₃	Cl	26	(CH ₂) ₆ CH ₃	6-OH	Br
23	(CH ₂) ₆ CH ₃	7-OCH ₃	Cl	26-1	(CH ₂) ₆ CH ₃	6-OH	
24	(CH ₂) ₆ CH ₃	8-OCH ₃	Cl	22	(CH ₂) ₆ CH ₃	6-OCH ₃	Cl
28	(CH ₂) ₆ CH ₃	8-OH	Br	22-1	(CH ₂) ₆ CH ₃	6-OCH ₃	
29	(CH ₂) ₆ CH ₃	5-OCH ₃	Cl	34	(CH ₂) ₆ CH ₃	6-OH	Br
32	(CH ₂) ₆ CH ₃	8-OCH ₃	Cl	34-1	(CH ₂) ₆ CH ₃	6-OH	
33	(CH ₂) ₆ CH ₃	5-OH	Br	113B ^a	(CH ₂) ₆ CH ₃	7-OCH ₃	Cl
36	(CH ₂) ₆ CH ₃	8-OH	Br	114A ^a	(CH ₂) ₆ CH ₃	7-OCH ₃	Cl
31	(CH ₂) ₆ CH ₃	7-OCH ₃	Cl	115B ^b	(CH ₂) ₆ CH ₃	7-OCH ₃	Cl
31-1	(CH ₂) ₆ CH ₃	7-OCH ₃		116A ^b	(CH ₂) ₆ CH ₃	7-OCH ₃	Cl

图 1 四氢萘类化合物结构式

Fig 1 Tetralins structure

a;113B and 114A are enantiomer. The former configuration is S and the latter is R. Compound **23** is their racemic. b;115B and 116A are enantiomer. The former configuration is S and the latter is R. Compound **31** is their racemic

临床标准白念珠菌 SC5314 由 William A. Fonzi 教授惠赠,白念珠菌 Y0109 由北京医科大学真菌和真菌病研究中心提供,并经形态学和生化学鉴定;临床白念珠菌(*Candida albicans*, Ca)16 株、近平滑念珠菌(*Candida parapsilosis*, Cp)、红色毛癣菌(*Trichophyton rubrum*, Tr)、热带念珠菌(*Candida tropicalis*, Ct)、烟曲霉菌(*Aspergillus fumigatus*, Af)和新生隐球(*Cryptococcus neoformans*, Cn)各 1 株,由第二军医大学长海医院真菌室

提供,分别采自长海医院不同科室临床样本,并经形态学和生化学鉴定。

RPMI 1640 液体培养液: RPMI 1640 (Gibco BRL)10 g, NaHCO₃ 2.0 g, 吗啡啉丙磺酸(MOPS) (Sigma)34.5 g(0.165 mol),加三蒸水 900 ml 溶解。1 mol/L NaOH 调 pH 至 7.0(25℃),加三蒸水定容至 1 000 ml,0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,分装后于 4℃ 保存备用。

沙堡葡萄糖琼脂固体培养基(SDA):蛋白胨 10 g,葡萄糖 40 g,琼脂 18 g,加三蒸水 900 ml 溶解,加入 2 mg/ml 氯霉素水溶液 50 ml,调整 pH 至 7.0,以三蒸水定容至 1 000 ml,高压灭菌(121℃,15 min)后于 4℃ 保存备用。

YEPD 培养液:酵母浸膏 10 g,蛋白胨 20 g,葡萄糖 20 g,加三蒸水 900 ml 溶解,加入 2 mg/ml 氯霉素水溶液 50 ml,三蒸水定容至 1 000 ml,高压灭菌(121℃,15 min)后于 4℃ 保存备用。YEPD 培养液中加入 2% 琼脂即得 YEPD 固体培养基。

1.2 四氢萘类化合物最小抑菌浓度(MIC)测定 采用 NCCLS 推荐 RPMI 1640 液培养基稀释法^[6]测定,计算各药物的 MIC₅₀ 及 MIC₈₀ 值(与阳性对照孔比,以 D 值下降 50% 及 80% 以上的最低浓度孔中的药物浓度为 MIC₅₀ 及 MIC₈₀ 值)。

1.3 琼脂平皿纸片扩散实验(agar disk diffusion test) 采用 NCCLS 推荐的纸片扩散法敏感实验。从 SDA 平板上挑选单克隆,加入 YEPD 液体培养基,在摇床上 200 r/min,30℃ 振荡培养 16 h,连续活化 2 次,使其处于指数生长期后期,用 YEPD 培养液调整真菌浓度至(1~5)×10⁶ 个/ml,混匀后取 3 ml 于 SDA 固体培养基平板上涂布均匀,放置 1 h 后将平板上的液体吸净。为测定菌株对药物的敏感性,分别将含不同剂量药物的直径 5 mm 圆形滤纸片以及只含相应溶剂的对照滤纸片放置于 SDA 固体平板上,放置 15 min 后,倒置于 30℃ 培养箱中培养 24 h,观察抑菌圈的大小以评估不同菌株对药物的敏感性。

1.4 时间生长曲线实验(time-growth curve test) 对化合物 **22-1**、**31-1** 及其盐酸盐 **22**、**31**;**34-1**、**26-1** 及其溴酸盐 **34**、**26** 进行时间生长曲线实验。从 SDA 平板上挑选单克隆,加入 YEPD 液体培养基,在摇床上 200 r/min,30℃ 振荡培养 16 h,连续活化 2 次,使其处于指数生长期后期,血细胞计数板镜下计数,YEPD 培养液调整真菌浓度至(1~5)×10⁶ cfu/ml,分别加入不同浓度

的药物,200 r/min,30℃条件下培养,600 nm处分别测定不同时间点各培养液的光密度。

1.5 四氢萘类与特比萘芬或小檗碱联合抑菌作用考察 采用棋盘式微量液基稀释法^[6]、琼脂平皿纸片扩散法^[8]及单药纸片搭桥法测定^[7]。棋盘式微量液基稀释法药物终点浓度均在80%真菌被抑制时的浓度,FIC(联合抑菌分数)值为联合用药时各药的最低抑菌浓度分别除以各药的MIC值的商之和^[7]。联合用药效果评价标准,联合抑菌分数(FIC)被定义为^[7]:FIC≤0.5,协同;0.5<FIC≤4,无关;FIC>4,拮抗。联合抑菌琼脂平皿纸片扩散方法基本同单药纸片扩散法,不同之处为含药纸片置于含16 μg/ml特比萘芬或小檗碱的YEPD平皿上,根据抑菌圈直径大小判断联合抑菌结果;单药纸片搭桥法根据两抑菌圈相互作用显示的不同图形判读。

1.6 统计学处理 时间生长曲线实验重复2次,

结果采用t检验(student test)进行统计分析。

2 结果

2.1 四氢萘类化合物MIC的测定 20种化合物均表现出较明显抑菌活性(表1),尤其化合物**34**、**22**、**26**、**31**、**22-1**、**31-1**活性最强,对于白念珠菌Y0109 MIC₈₀值均<0.125 μg/ml。但该类物质似乎对于氟康唑敏感剂量依赖性白念珠菌(SDD)的活性一般。仅化合物**31-1**、**22**、**22-1**对4株氟康唑耐药白念珠菌表现出强大的抗菌活性(表2)。结果还显示化合物**22**及**22-1**活性对大多数氟康唑耐药白念珠菌均具有显著活性,甚至优于酮康唑(表3)。该类化合物对非白念珠菌也有一定作用(表4),尤其化合物**22-1**及**22**对近平滑念珠菌和红色毛癣菌抑菌活性相当明显。

表1 四氢萘类对于氟康唑敏感及敏感剂量依赖性白念珠菌的MICs值

Tab 1 MICs of tetralins for fluconazole susceptible or susceptible dose-dependent strains

Compound	(ρ _B /μg·ml ⁻¹)							
	Y0109		SC5314		0511479		0512644	
	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀
21	2	4	16	16	1	4	8	16
23	0.5	1.0	2	4	4	8	2	4
24	4	8	16	16	16	16	8	16
28	8	8	16	32	0.5	0.5	16	16
29	2	4	8	8	4	8	16	16
32	4	4	8	8	16	16	8	8
33	4	4	32	32	32	32	32	32
36	4	8	16	16	16	16	16	16
31	0.5	1.0	4	8	2	4	2	8
31-1	<0.125	<0.125	0.25	1	0.5	2	1	2
26	<0.125	<0.125	<0.125	2	<0.125	1	0.5	8
26-1	<0.125	0.25	0.125	2	0.125	1	1	2
22	<0.125	<0.125	<0.125	0.25	0.25	0.5	<0.125	1
22-1	<0.125	<0.125	<0.125	0.125	<0.125	1	<0.125	4
34	<0.125	<0.125	0.5	1.0	0.5	2	0.25	2
34-1	<0.125	0.25	1	4	0.25	2	2	2
114A	0.25	0.5	4	8	2	8	1	2
115B	0.5	1.0	4	8	8	8	2	8
116A	0.25	0.5	1	2	1	2	1	2
113B	1	2	8	16	1	16	8	8
FLC	4	8	0.125	0.5	4	16	8	32
TER	2	8	8	16	>64	>64	8	>64
AMB	<0.125	0.25	0.125	0.25	0.5	0.5	0.25	0.5
ICZ	<0.125	0.25	<0.125	4	0.25	8	0.25	4
BER	50	100	32	32	16	32	16	32
KCZ	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	8	<0.125	0.25

FLC: Fluconazole; TER: Terbinafine; AMB: Amphotericin B; ICZ: Itraconazole; BER: Berbering; KCZ: Ketoconazole; Y0109 and SC5314 were FLC sensitive strains; 0511479 and 0512644 were FLC susceptible dose-dependent strains

表2 四氢萘类化合物对氟康唑耐药白念珠菌的 MICs

Tab 2 MICs of tetralins for fluconazol resistant strains

Compound	$(\rho_B/\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})$							
	01010		0511655		18		25	
	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀
21	8	16	8	16	8	16	8	8
23	1	4	1	4	2	8	2	4
24	16	16	16	16	8	16	8	16
28	16	16	32	32	32	32	32	32
29	4	8	8	8	4	16	16	16
32	8	16	8	8	8	8	8	16
33	16	16	32	32	16	32	32	32
36	16	16	16	16	16	16	16	16
36-1	16	16	4	8	4	8	32	64
31	2	4	2	4	0.25	4	0.5	2
31-1	<0.125	16	<0.125	1.0	<0.125	0.5	1.0	2.0
26	8	64	0.25	4	0.5	4	<0.125	2
26-1	<0.125	2	0.25	2	0.5	1	0.5	1.0
22	<0.125	0.5	<0.125	0.25	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125
22-1	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	0.5
34	0.5	4	0.5	2	0.5	2	<0.125	2
34-1	<0.125	2	<0.125	0.5	0.5	4	0.25	2.0
114A	2	4	1	4	2	8	2	4
115B	2	4	1	8	1	4	1	8
116A	1	4	1	2	1	2	1	2
113B	4	8	2	8	2	8	2	8
FLC	0.25	>64	0.25	>64	0.5	>64	0.5	>64
TER	16	32	0.125	8	8	8	1	4
AMB	0.32	0.64	<0.125	0.25	1	2	0.25	0.5
ICZ	<0.125	>64	<0.125	>64	1	>64	<0.125	>64
BER	>64	>64	16	16	32	64	16	32
KCZ	<0.125	2	<0.125	8	<0.125	4	<0.125	8

FLC; Fluconazole; TER; Terbinafine; AMB; Amphotericin B; ICZ; Itraconazole; BER; Berbering; KCZ; Ketoconazole

表3 化合物 22-1 及 22 对氟康唑耐药白念珠菌 MICs 值

Tab 3 MICs of 22-1 and 22 for fluconazole resistant strains

Strains	$(\rho_B/\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})$									
	22-1		22		FCZ		ICZ		KCZ	
	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀
01010	<0.125	<0.125	<0.125	0.5	0.25	>64	<0.125	>64	<0.125	2
0511655	<0.125	<0.125	<0.125	0.25	0.25	>64	<0.125	>64	<0.125	8
18	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	0.5	>64	1	>64	<0.125	4
25	<0.125	0.5	<0.125	<0.125	0.5	>64	<0.125	>64	<0.125	8
12	<0.125	0.25	<0.125	<0.125	0.25	>64	0.5	2	<0.125	8
8	<0.125	0.125	<0.125	<0.125	0.25	>64	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125
103	0.25	2	<0.125	2	0.25	>64	<0.125	>64	<0.125	<0.125
333	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	0.25	>64	<0.125	>64	<0.125	8
300	<0.125	0.25	<0.125	0.25	0.25	>64	1	>64	0.25	16
255	<0.125	0.5	<0.125	0.5	<0.125	>64	<0.125	>64	<0.125	<0.125
24	<0.125	1	<0.125	0.25	1	>64	<0.125	>64	<0.125	<0.125
050308	1.0	4.0	2.0	2.0	>64	>64	>64	>64	16	32

FCZ; Fluconazole; ICZ; Itraconazole; KCZ; Ketoconazole

表 4 四氢萘类对非白念珠菌的 MICs 值

Tab 4 MICs of tetralin compounds for other strains except for *Candida albicans*

Compound	(μg/ml)									
	Cp 0406392		Ct		Cn		Tr 0501124		Af 0504565	
	MIC ₅₀	MIC ₈₀								
21	8	8	16	16	16	32	8	8	4	16
23	4	16	16	16	4	4	4	16	8	16
24	8	8	16	16	16	>64	4	4	4	16
28	8	16	16	16	4	8	0.5	2	16	16
29	8	8	16	16	0.25	0.5	0.25	0.25	16	32
32	0.5	2.0	16	16	<0.125	0.25	0.25	2	4	8
33	4.0	8.0	32	64	8	8	4	8	8	16
36	32	64	16	16	8	8	0.25	4	8	16
36-1	4	16	32	32	8	8	8	8	32	32
31	2.0	4.0	8	8	0.5	1	0.25	1	8	16
31-1	1.0	2.0	16	16	1	2	<0.125	0.25	8	16
26	0.5	2.0	8	16	2	2	0.25	0.5	64	64
26-1	<0.125	0.5	4	16	1	4	0.5	0.5	8	16
22	<0.125	<0.125	8	16	2	4	<0.125	<0.125	4	32
22-1	<0.125	<0.125	1.0	16	4	8	<0.125	0.25	4	16
34	0.25	2.0	4	8	0.5	0.25	0.5	0.5	8	16
34-1	0.125	2	4	8	1	1	0.25	1	16	32
114A	2.0	4.0	16	16	8	8	1	2	8	16
115B	4	8	4	8	0.25	0.25	<0.125	<0.125	4	16
116A	05	1.0	4	8	2	4	2	8	0.5	4
113B	8	16	16	32	8	8	1	4	16	32
FLC	0.5	1.0	1.0	1.0	0.5	4	2	2	16	>64
TER	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125
AMB	<0.125	0.125	0.5	1	1	1	4	4	<0.125	0.5
ICZ	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	0.5	<0.125	0.5
BER	16	32	64	>64	64	64	64	>64	>64	>64
KCZ	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	0.25	0.5

CP;*Candida parapsilosis*; Ct;*Candida tropicalis*; Cn;*Cryptococcus neoformans*; Tr;*Trichophyton rubrum*; Af;*Aspergillus fumigatus*.
 FLC; Fluconazole; TER; Terbinafine; AMB; Amphotericin B; ICZ; Itraconazole; BER; Berbering; KCZ; Ketoconazole

2.2 琼脂平皿纸片扩散实验 (agar disk diffusion test) 以氟康唑敏感的临床标准白念珠菌 Y0109 作为主要研究菌株,进行了琼脂平板纸片扩散实验。

实验结果显示四氢萘类化合物 22、22-1、31、31-1、26、26-1、34、34-1 均具有比氟康唑更强的抑菌活性,相同剂量时其抑菌圈直径明显大于氟康唑(图 2)。

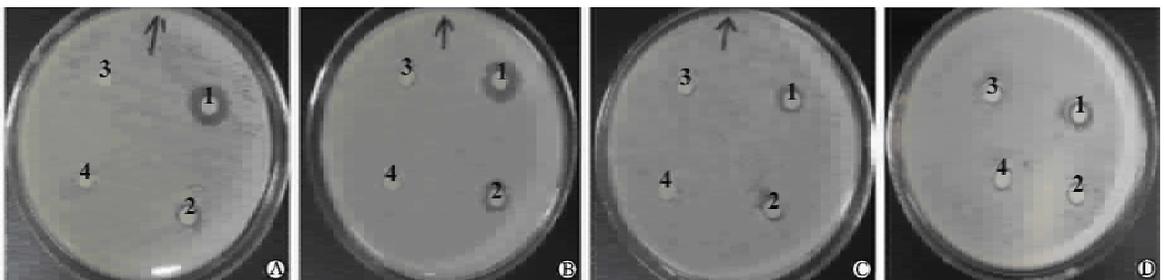


图 2 琼脂扩散实验测定四氢萘类化合物 22、31-1、34、26 对氟康唑敏感白念珠菌的敏感性

Fig 2 Agar disk diffusion assay in testing the sensitivity of FLC sensitive strains to compound 22,31-1,34 and 26

Disks impregnated with tetralin compounds, FLC, and the corresponding solvents(4) were inoculated on SDA agar plates, namely, 0.08 μg (1), 0.02 μg (2) of compounds and 0.08 μg FLC(3). A, B, C, and D represent compound 22, 31-1, 34, and 26, respectively

2.3 时间生长曲线实验(time-growth curve) 见图 3、4。

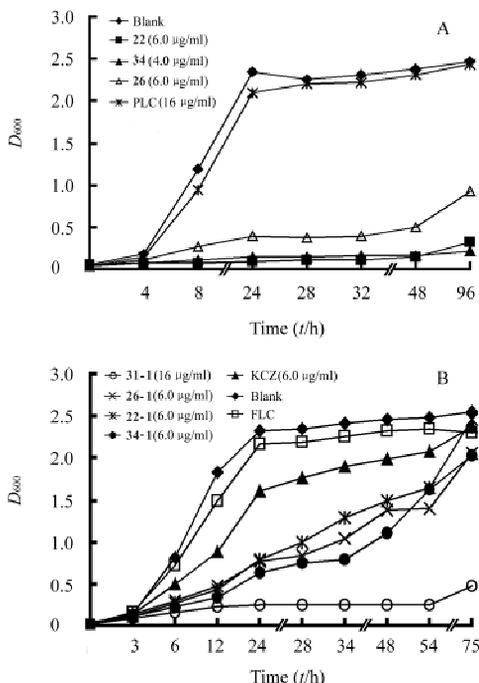


图 3 氟康唑敏感菌 Y0109 在四氢萘类化合物与酮康唑浓度均为 6 µg/ml, 氟康唑浓度 16 µg/ml 时的时间-生长曲线图, Y0109 接种浓度为 (1~5) × 10⁶ cfu/ml
Fig 3 Time-growth curves of Tetralins, FLCs and KCZ obtained by an initial inoculum of (1-5) × 10⁶ cfu/ml

The effects of FLC 16 µg/ml, tetralins 6 µg/ml against FLC susceptible *C. albicans* Y0109 were tested

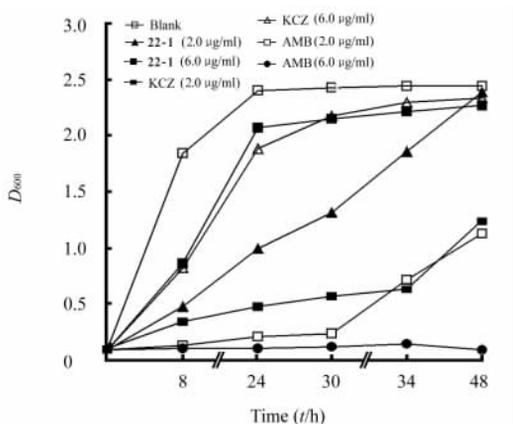


图 4 氟康唑耐药白念珠菌 01010 在 22-1、酮康唑、两性霉素 B 浓度分别为 2 µg/ml, 6 µg/ml 时的时间-生长曲线, 01010 的接种浓度为 (1~5) × 10⁶ cfu/ml
Fig 4 Time-growth curves of KCZ, AMB, and 22-1 obtained by an initial inoculum of (1-5) × 10⁶ cfu/ml

The effects of KCZ, AMB and 22-1 2 µg/ml, 6 µg/ml against FLC resistant *C. albicans* 01010 were tested

结果显示四氢萘类化合物 **22、34、26、26-1、34-1、22-1** 及 **31-1** 对氟康唑敏感白念珠菌 Y0109 抑菌能力均强于氟康 ($P < 0.05$), 并且化合物 **31-1** 的抑菌时间长达 54 h 以上; 化合物 **22-1** 对氟康唑耐药白念珠菌也表现出强大活性, 并强于酮康唑 ($P < 0.05$), 但弱于两性霉素 ($P < 0.05$)。

2.4 联合抑菌作用考察

2.4.1 棋盘式微量液基稀释法 对 2 株氟康唑耐药白念珠菌 01010 及 0511655 采用棋盘式微量液基稀释法考察四氢萘类与不同作用机制的抗真菌药联合后的效应, 结果显示 (表 5) 该类药物与小檗碱或特比萘芬联合可产生协同作用。其中化合物 **26** 与特比萘芬联用, **26** 的 MIC₈₀ 值可从 4 µg/ml 下降至 0.062 5 µg/ml, 特比萘芬 MIC₈₀ 值可从 8 µg/ml 下降至 0.5 µg/ml, FIC 为 0.078; **26** 与小檗碱联用时 **26** 的 MIC₈₀ 值可从 0.5 µg/ml 下降至 0.031 25 µg/ml, 小檗碱 MIC₈₀ 值可从 32 µg/ml 下降至 2 µg/ml, FIC 为 0.046 88, 具有很强的协同效应。但是, 四氢萘类与 AMB 或氟康唑联用显示无关效应。

2.4.2 琼脂平皿纸片扩散实验 本实验以氟康唑耐药菌 01010 为供试菌, 菌浓度为 (1~5) × 10⁶ cfu/ml 将含药纸片置于含 16 µg/ml 特比萘芬或小檗碱的 YEPD 固体培养基 (YEPD 液中含 2% 琼脂) 平板上。培养 48 h 后发现: 与小檗碱联用时, 四氢萘类药物抑菌圈直径与空白比稍微增加, 但无明显差异 (图未附); 与特比萘芬联用, 四氢萘类抑菌圈直径与空白比均有显著增加 (图 5), 其中 **26** 及 **26-1** 抑菌圈直径最大, 协同作用最明显。

2.4.3 单药纸片搭桥法 以氟康唑耐药临床白念珠菌 0511655 作为主要研究菌株, 采用单药纸片搭桥法实验进一步考察四氢萘类化合物与特比萘芬联合抑菌效应 (图 6)。结果更加直观地显示出四氢萘类化合物 **26、34、22、31-1** 与特比萘芬联用后表现明显协同作用。**26、34** 与特比萘芬联用时抑菌圈相交处呈现大约 90° 直角形状, **22、31-1** 与特比萘芬联用时抑菌圈相交 (靠近特比萘芬) 处呈现扇形膨大形状, 均表明存在协同作用。

3 讨论

目前, 体外评价真菌对药物敏感性最基本的方法就是测定药物的最低抑菌浓度 (MIC), MIC 的测定方法很多, 主要有常量液基稀释法、半固体琼脂稀

表 5 四氢萘类与特比萘芬、小檗碱、两性霉素 B 或氟康唑体外联和抑菌效应

Tab 5 *In vitro* interaction between Tetralins and TER, BER, AMB or FLC against FLC resistant strains

($\rho_B/\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)

Strain	Comp A	MIC ₈₀ ^A	Comp B	MIC ₈₀ ^B	MIC ₈₀ ^{A+B}	FIC	Interpretation
0511655	TER	8	26	4	0.5, 0.0625	0.078	Synergy
0511655	TER	16	22	0.125	0.5, 0.078	0.094	Synergy
0511655	TER	16	34	1	2, 0.125	0.25	Synergy
01010	TER	16	34	4	0.5, 0.25	0.094	Synergy
01010	TER	8	22	2	0.5, 0.25	0.187 5	Synergy
0511655	AMB	0.64	26	4	0.32, 2	1.5	Indifferent
0511655	AMB	0.64	34	4	0.02, 2	0.53	Indifferent
0511655	FLC	64	34	2	2, 2	1.03	Indifferent
0511655	BER	32	34	0.5	1, 0.031 25	0.094	Synergy
0511655	BER	32	26	2	1, 0.031 25	0.046 88	Synergy
0511655	BER	16	22	1	1, 0.031 25	0.093 75	Synergy
0511655	BER	32	31-1	2	1, 0.5	0.281 3	Synergy

MIC₈₀^A and MIC₈₀^B, were the MIC₈₀ values when using A and B, respectively. MIC₈₀^{A+B} values were the MIC₈₀ values when A and B were used jointly

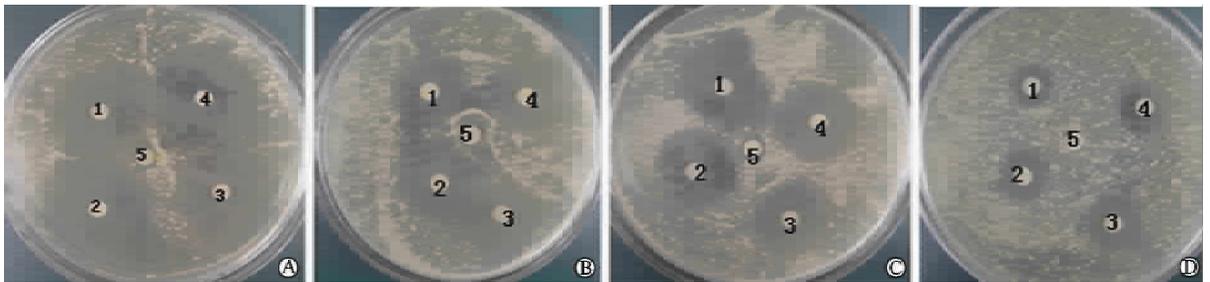


图 5 以氟康唑耐药菌 01010 为供试菌,琼脂扩散实验测定四氢萘类化合物 22、31-1、34、26 与特比萘芬联合对氟康唑耐药白念珠菌的抑菌效果

Fig 5 Agar disk diffusion assay testing of interaction between tetralins and TER against FLC resistant strain 01010

Disk impregnated with tetralins and the corresponding solvents(5) were placed onto the inoculated YEPD agar plates, namely, 8 μg (1,3), 16 μg (2,4) of compound 26(A1, A2), 26-1(A3, A4), 34(B1, B2), 34-1(B3, B4), 22(C1, C2), 22-1(C3, C4), 31(D1, D2), 31-1(D3, D4)

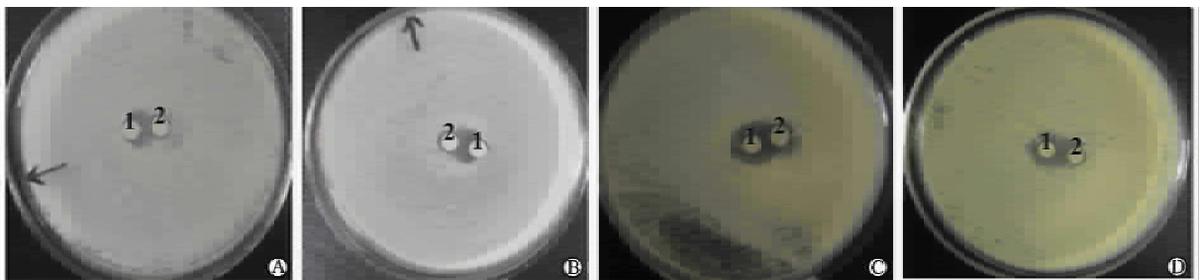


图 6 单药纸片搭桥法测定四氢萘类化合物与特比萘芬联合对于氟康唑耐药菌 0511655 抑菌效果

Fig 6 Agar disk diffusion assay testing interaction between tetralins and TER against FLC resistant strains 0511655

Disk impregnated with tetralins(2) and TER (1) were placed onto the inoculated SDA agar plates, namely; 0.4 μg TER, 0.2 μg 26(A), 34(B), 22(C) and 31-1(D)

释法、E 测定法、流式细胞仪测定法等。但这些方法受各种因素影响,重现性差,不便推广。本实验参照美国国家临床实验标准化委员会(NCCLS)制定的

针对酵母菌的药敏实验方案并结合其他检测方法,选择具有代表性的 16 株白念珠菌以及 5 株非白念珠菌作为筛选新化合物体外抗真菌活性的工具菌,

对20多种新化合物做了体外抗真菌活性筛选并进一步考察了此类化合物与特比萘芬或小檗碱联合抑菌效果。

最初的MIC测定发现,游离单体**22-1**、**34-1**、**26-1**、**31-1**及其盐酸盐**22**、**34**、**26**、**31**对氟康唑敏感菌具有较强的抑真菌活性,通过纸片扩散法及时间生长曲线实验进一步证实这几个化合物的抑菌活性强于氟康唑,尤其**31-1**抑菌活性最强,持续抑菌时间超过54 h。13株对氟康唑及伊曲康唑均呈现高度耐药(MIC₈₀值均>64 μg/ml)白念珠菌,酮康唑的抑菌活性也一般,但**22-1**及**22**却表现具备强大抑菌作用, MIC₈₀值(<0.125 μg/ml)远低于上述药物,对氟康唑耐药白念珠菌0511655的时间生长曲线显示其抑菌活性也强于酮康唑。

本实验还考察了四氢萘类化合物与特比萘芬或小檗碱联合使用对于氟康唑耐药白念珠菌抗菌效果,三种测定方法所得到的结果均表明特比萘芬与四氢萘类联用协同作用明显,尤其与**26**联用效果最显著。虽然棋盘式液基微量稀释法显示四氢萘类与小檗碱联合协同作用强大, FIC最低可达到0.046 88,但其他两种方法并未得一致结果,可能与小檗碱剂量太低有关。这些结果为氮唑类耐药白念珠菌的治疗带来巨大希望,并且四氢萘类化合物结构不同于氮唑类,不易产生交叉耐药性,值得进一步开发研究。

[参考文献]

- [1] Monk B C, Niimi K, Lin S, et al. Surface-active fungicidal D-peptide inhibitors of the plasma membrane proton pump that block azole resistance [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49: 57-70.
 - [2] Mukhopadhyay K, Prasad T, Saini P, et al. Membrane sphingolipid-ergosterol interactions are important determinants of multidrug resistance in *Candida albicans* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48: 1778-1787.
 - [3] MacPherson S, Akache B, Weber S, et al. *Candida albicans* zinc cluster protein Upc2 confers resistance to antifungal drugs and is an activator of ergosterol biosynthetic genes [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49: 1745-1752.
 - [4] Lambrechts S, Aalders M, Van Marle J. Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a cationic porphyrin [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49: 2026-2034.
 - [5] Fukuoka T, Johnston DA, Winslow CA, et al. Genetic basis for differential activities of fluconazole and voriconazole against *Candida krusei* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47: 1213-1219.
 - [6] Perea S, Gonzalez G, Annette W, et al. *In vitro* activities of terbinafine in combination with fluconazole, itraconazole, voriconazole, and posaconazole against clinical isolates of *Candida glabrata* with decreased susceptibility to azole [J]. *J Clin Microbiol*, 2002, 40: 1831-1833.
 - [7] 唐珊熙, 刘锡光. 人微生物学及微生物学检验 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 464-476.
- [收稿日期] 2006-08-28 [修回日期] 2007-01-17
[本文编辑] 尹 茶

• 书 讯 •

《普通外科手术并发症预防与处理》已出版

武正炎主编, 2006年12月由人民军医出版社出版, 16开, 精装, 551页, 82.5万字。本书由普通外科学专家集体编著, 在第1版的基础上修订而成, 作者以总结自己的临床经验为主, 参考国内外最新文献, 系统阐述了普通外科手术常见并发症的发生原因、临床表现、诊断检查、处理方法和预防措施。全书共20章, 包括外科手术后一般并发症及基本治疗, 甲状腺、甲状旁腺、乳房、胃、肠、肝、胆、脾、胰、阑尾等各器官手术并发症, 疝修补、血管外科手术并发症, 以及腹部脏器移植和腹腔镜手术并发症等。内容丰富、新颖, 紧密结合临床, 对普通外科医师积极预防和妥善处理手术并发症、提高手术成功率具有重要参考价值, 亦可供基层外科医师和医学院校师生阅读参考。定价: 89.00元。

本书由人民军医出版社市场部发行。

通讯地址: 北京市100036信箱188分箱, 邮编: 100036

电话: 010-51927252; 010-51927300-8168。E-mail: wanglan@pmmpp.com.cn