

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00813

一种三唑醇类化合物的体内外抗真菌活性研究

欧阳小方,曹永兵,孙青葵,王彦,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:观察三唑醇类化合物 SL-130 的体内外抗真菌活性。方法:采用美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)1997年公布的 M27-A 方案,实验用菌株包括白念珠菌及非念珠菌致病真菌,用最低抑菌浓度 MIC₈₀ 表示抗真菌活性。此外利用纸片扩散法、时间-杀菌曲线及小鼠的存活率等方法考察 SL-130 的抗真菌活性。结果:SL-130 具有一定的抗真菌活性,体外明显强于氟康唑,体内与氟康唑基本相当。结论:此三唑醇类化合物结构新颖,体内外的抗真菌活性明显,值得进一步研究。

[关键词] 三唑类;抗真菌药;微生物敏感性试验;SL-130

[中图分类号] R 978.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)07-0813-04

In vitro and *in vivo* antifungal activity of a triadimenol compound

OUYANG Xiao-fang, CAO Yong-bing, SUN Qing-yan, WANG Yan, JIANG Yuan-ying*

Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[ABSTRACT] **Objective:** To observe the *in vitro* and *in vivo* antifungal activity of a triadimenol compound SL-130. **Methods:** The M27-A project recommended by the National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS) in 1997 was used in the present study. The minimum inhibitory concentrations (MIC₈₀) of SL-130 were determined for candidal and non-candidal strains with different susceptibilities to fluconazole. Agar disk diffusion test, time-kill curves test and mouse survival rate were employed to examine the antifungal activity of SL-130. **Results:** The results indicated that SL-130 had stronger *in vitro* antifungal activity than fluconazole, and similar *in vivo* activity to fluconazole. **Conclusion:** The structure of SL-130 is quite unique and it has *in vitro* and *in vivo* antifungal activity; further study is warranted on the compound.

[KEY WORDS] triazoles; antifungal agents; microbial sensitivity tests; SL-130

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(7):813-816]

近年来,随着免疫缺陷宿主的不断增多,抗生素的大量使用,皮质激素、免疫抑制剂广泛应用于人体,器官移植、白血病、艾滋病等严重疾病的发生,使深部真菌感染发病率不断升高^[1],真菌病原菌的种类也在不断发生变化。20世纪90年代后,各种抗真菌药物不断问世,但是对于免疫受损患者和循环系统障碍患者所患的许多真菌病,其治愈率、预防复发和再感染的效果都不令人满意,同时氮唑类药物的耐药现象^[2]日趋严重,所以开发新型抗真菌药迫在眉睫。

本实验对 SL-130 这种新化合物进行了一系列的抗真菌活性研究。

1 材料和方法

1.1 药物和试剂 三唑醇类化合物由第二军医大学药学院药物化学教研室和有机化学教研室合成,化合物 SL-130 的命名为 1-(1H-1,2,4-三唑-1-基)-2-(2,4-二氟苯基)-3-[4-(4-异酰胺基-苯基)哌嗪]-2-丙醇(图1),为人工合成纯品,呈黄色粉末状,纯度为 99.7%;氟康唑注射液由上海信谊金朱药业有限公司提供;伊曲康唑由上海医药工业研究院提供;酮康唑、伏立康唑由第二军医大学药学院有机化学教研室合成,纯度为 99.7%。二甲基亚砜(DMSO)由中国医药集团上海化学试剂公司出品,用前重蒸。

[收稿日期] 2008-03-05 **[接受日期]** 2008-03-17

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(“973”计划,2005CB523105),国家自然科学基金(30300437). Supported by National Key Research Development Foundation(“973” Plan, 2005CB523105) and National Natural Science Foundation of China(30300437).

[作者简介] 欧阳小方, 硕士, 药师. E-mail: wuaihuaibei@sohu.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-25070371, E-mail: jiangyy@smmu.edu.cn

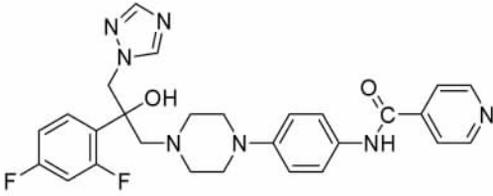


图 1 SL-130 结构式

Fig 1 SL-130 structure

1.2 菌株 白念珠菌 CAF2-1、SC5314 由 William A. Fonzi 惠赠,白念珠菌 Y0109、904、494、100、0604109,新生隐球菌(*Cryptococcus neoformans*) 1 株、近平滑念珠菌(*Candida parapsilosis*) 1 株、烟曲霉菌(*Aspergillus fumigatus*) 1 株、热带念珠菌(*Candida tropicalis*) 1 株均由长海医院真菌室提供。

1.3 培养基 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/L), 加三蒸水 900 ml 溶解, 1 mol/L NaOH 调 pH 至 7.0 (25℃), 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(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 固体培养基: 酵母浸膏 10 g, 蛋白胨 20 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 加三蒸水 900 ml 溶解, 加入 2 mg/ml 氯霉素水溶液 50 ml, 以三蒸水定容至 1 000 ml, 高压灭菌(121℃, 15 min)后于 4℃ 保存备用。

磷酸盐缓冲液(PBS): 氯化钠 8 g, 氯化钾 0.2 g, 以三蒸水定容至 1 000 ml, 调 pH 至 7.4, 高压灭菌(121℃, 15 min)后于 4℃ 保存备用。

1.4 抑菌活性测定

1.4.1 三唑醇类化合物的最小抑菌浓度(MIC)判定 参照 NCCLS 推荐的 M27-A 方案, 采用微量液基稀释法^[3]判定, 测各孔 D 值, 与阳性对照孔比, 以 D 值下降 80% 以上的最低浓度孔中的药物浓度为 MIC₈₀ (真菌生长 80% 被抑制时的药物浓度)。

1.4.2 点种法 将临床白念珠菌敏感株(904、494)和耐药株(100、0604109)以 1 : 100 接种至 1 ml YEPD 培养液, 置 30℃、200 次/min 振摇培养 24 h, 连续活化 2 次, 第 3 次活化 16 h, 使真菌处于指数生长期后期, 用 PBS 缓冲液分别稀释菌液至 10⁷、10⁶、10⁵、10⁴ 和 10³ CFU/ml, 分别吸出 5 μl, 点在加有 2 μg/ml 的氟康唑或 SL-130 YEPD 固体培养基上, 24 h 后观察抑菌状态。

1.4.3 琼脂平皿纸片扩散实验 参照 NCCLS 推荐的纸片扩散法^[4]敏感实验, 将白念珠菌 CAF2-1 以 1 : 100 接种至 1 ml YEPD 培养液, 置 30℃、200 次/min 振摇培养 24 h, 连续活化 2 次, 第 3 次活化 16 h, 使真菌处于指数生长期后期, 用血细胞计数板计数, 以 YEPD 培养液稀释调整菌液浓度至 1 × 10⁶ ~ 5 × 10⁶ CFU/ml。取 100 μl 此浓度菌液, 加 5 ml YEPD 培养液于常规 YEPD 固体培养基上, 置 30℃ 培养箱中孵育 60 min 后, 轻轻倾倒入上层液体, 再放入 30℃ 培养箱, 待琼脂表面液体挥发干后取出, 在其上面放上无菌纸片(直径 6 mm), 上面含有氟康唑和 SL-130 的剂量分别为 20 μg、10 μg 以及只含相应溶剂的 DMSO, 纸片中含 DMSO 的量均不超过 5 μl。将琼脂培养皿倒置于 30℃ 培养箱中孵育, 48 h 后观察抑菌圈内外菌落状态, 并测抑菌圈直径。

1.4.4 时间生长曲线实验 将白念珠菌 CAF2-1 以 1 : 100 接种至 1 ml YEPD 培养液, 于 30℃、200 次/min 振摇培养 24 h, 连续活化 2 次, 第 3 次活化 16 h, 使真菌处于指数生长期后期, 以 YEPD 培养液稀释调整菌液浓度至 D₆₀₀ = 0.1, 分别加入质量浓度为 4 μg/ml 的氟康唑和 SL-130, 及空白对照加入相同体积的 DMSO, 于 30℃ 孵箱中, 200 次/min 振摇培养, 分别于 0、4、8、12、24 和 48 h 用紫外分光光度计 600 nm 测菌液 D 值, 确定菌生长浓度的变化。

1.4.5 时间-杀菌曲线实验^[5] 将白念珠菌 CAF2-1 以 1 : 100 接种至 1 ml YEPD 培养液, 于 30℃、200 次/min 振摇培养 24 h, 连续活化 2 次, 第 3 次活化 16 h, 使真菌处于指数生长期后期, 以 RPMI 1640 液体培养基稀释并调整菌液浓度至 D₆₀₀ = 0.1, 上述菌液各分 3 份, 分别加入质量浓度为 8 μg/ml 的氟康唑和 SL-130, 空白对照加入相同体积的 DMSO, 于 30℃ 孵箱中, 200 次/min 振摇培养, 分别在 0、4、8、12、24 h 这 5 个不同的时间点, 将菌液各取 100 μl, 以 0.9% 生理盐水 10 倍系列稀释之, 从不同稀释倍数的菌液中各取 100 μl 均匀涂于 SDA 平皿表面。平皿置 30℃ 培养 48 h 后计数菌落数目, 以 SDA 平

皿上生长菌落数达 20 个为最低限。

1.5 体内活性测定^[6] 采用小鼠系统性真菌感染模型并分组给药观察存活时间来检测 SL-130 的体内抗真菌活性。50 只 ICR(Institute of Cancer Research)小鼠随机分为 5 组, 每组 10 只。将白念珠菌 CAF2-1 以 1:100 接种至 1 ml YEPD 培养液, 于 30℃、200 次/min 振荡培养 24 h, 连续活化 2 次, 第 3 次活化 16 h, 使真菌处于指数生长期后期, 用 0.9% 生理盐水洗涤 3 次至上清液无色, 去上清液, 以 0.9% 生理盐水调至菌液浓度至 $D_{600}=0.345$, 尾静脉注射真菌溶液 0.2 ml/20 g 造成小鼠系统性真菌感染, 建立 2 h 后, 分别腹腔注射氟康唑、伊曲康

唑、伏立康唑和 SL-130 0.4 ml/20 g, 空白对照组腹腔注射 0.9% 生理盐水, 每天 1 次, 连续给药 7 d, 计算存活率。

1.6 统计学处理 时间生长曲线与杀菌曲线检验方差齐性, 如果齐性才可用 t 检验。小鼠存活时间应用研究非参数检验。

2 结果

2.1 三唑醇类化合物 MIC 判定 SL-130 对于多种敏感菌和非念珠菌的 $MIC_{80} < 0.125 \mu\text{g/ml}$, 表明作为氟康唑的结构类似物, SL-130 有进一步研究的价值。

表 1 三唑醇类化合物 SL-130 的最小抑菌浓度(MIC_{80})

Tab 1 Determination of minimum inhibitory concentration (MIC_{80}) of SL-130 against *C. albicans*

Compound	[$\rho_B/(\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})$]						
	CAF2-1	Y0109	SC5314	Af	Ct	Cn	Cp
SL-130	0.000 24	0.000 97	0.015 6	4	0.015 6	0.062 5	0.015 6
FCZ	0.000 97	4	1	>64	0.25	16	1
ICZ	0.015 6	1	0.062 5	0.25	0.25	0.25	0.062 5
KCZ	0.003 9	0.25	0.25	1	0.015 6	0.062 5	0.062 5
VCZ	0.015 6	0.015 6	4	0.25	0.003 9	0.003 9	0.015 6

FCZ: Fluconazole; ICZ: Itraconazole; KCZ: Ketoconazole; VCZ: Voriconazole; Cp: *Candida parapsilosis*; Af: *Aspergillus fumigatus*; Cn: *Cryptococcus neoformans*; Ct: *Candida tropics*. CAF2-1, Y0109 and SC5314 are FCZ-sensitive strains

2.2 点种法 本实验验证了 SL-130 对临床上各种白念珠菌的抑菌状态, 结果显示 SL-130 对氟康唑耐药株 100 和 0604109 抑菌株效果与氟康唑基本相当, 对氟康唑敏感株 904 和 494 的抑菌效果稍强于氟康唑(图 2)。

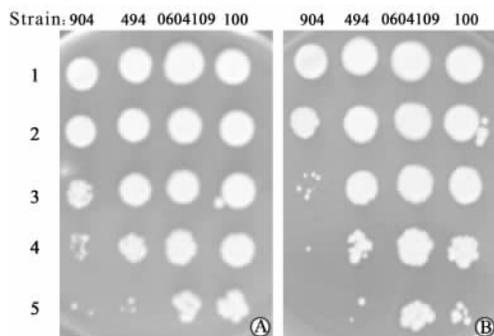


图 2 SL-130 对氟康唑敏感菌株和耐药菌株的活性

Fig 2 Inhibitory effect of SL-130 against

FCZ-sensitive and resistant strains

A is Fluconazole, B is SL-130; 100 and 0604109 are FCZ-resistant strains, 494 and 904 are FCZ-sensitive strains. 1, 2, 3, 4, and 5 represent the concentrations of 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , and 10^3 CFU/ml, respectively

2.3 琼脂平皿纸片扩散实验 见图 3, 氟康唑和 SL-130 的剂量分别是 20 μg 和 10 μg , 结果显示相同剂量时 SL-130 的抑菌圈明显大于氟康唑。

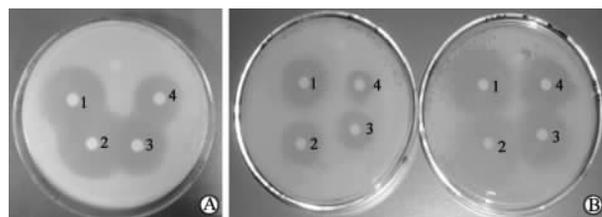


图 3 SL-130 对氟康唑敏感白念珠菌的敏感性

Fig 3 Sensitivity of FCZ-sensitive strains to SL-130

SL-130 inhibition zone was wider than that of FCZ. In Fig 3 A, 1, 2, 3, and 4 represent SL-130 (20 μg), SL-130 (10 μg), FCZ (10 μg), and FCZ (20 μg), respectively. In Fig 3 B, 1, 2, 3, and 4 represent FCZ/SL-130 (20 μg), FCZ/SL-130 (10 μg), FCZ/SL-130 (5 μg), and FCZ/SL-130 (2.5 μg), respectively

2.4 时间生长曲线实验 结果见图 4, SL-130 在每个时间点对敏感菌 CAF2-1 的抑菌能力都明显强于氟康唑 ($P < 0.05$), 显示出较强的抑菌能力。

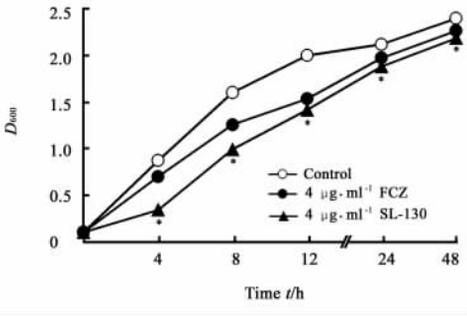


图4 氟康唑敏感菌株CAF2-1对SL-130和氟康唑的时间生长曲线

Fig 4 Time-growth curves of FCZ-sensitive strain

CAF2-1 when SL-130 and FCZ were both at 4 μg · ml⁻¹

FCZ and SL-130 obtained by an initial inoculum of $D_{600} = 0.1$. * $P < 0.05$ vs FCZ group or control group. FCZ: Fluconazole

2.5 时间-杀菌曲线实验 见图5,SL-130有明显的杀菌作用,在12h以后对敏感株CAF2-1的杀菌能力明显强于氟康唑和不给药组($P < 0.05$)。

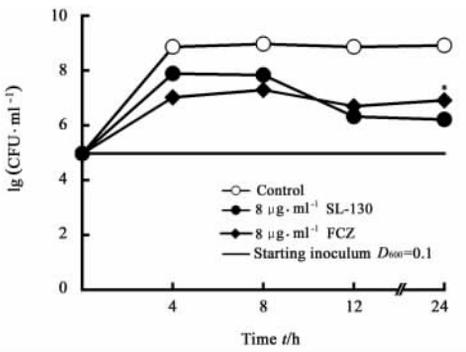


图5 氟康唑敏感菌株CAF2-1对SL-130和氟康唑的杀菌曲线
Fig 5 Time-killing curve of FCZ-sensitive strain CAF2-1 when SL-130 and FCZ were both at 8 μg · ml⁻¹

* $P < 0.05$ vs FCZ group or control group. FCZ: Fluconazole

2.6 小鼠存活时间 见图6,SL-130对真菌感染小鼠有保护作用,小鼠存活时间明显长于模型组和伏立康唑组,SL-130的体内保护作用稍强于伊曲康唑,稍弱于氟康唑($P < 0.05$)。

3 讨论

目前,白念珠菌仍然是临床最常见的条件致病性真菌,随着氟康唑长期、大量应用于真菌感染的预防及治疗,导致白念珠菌耐药性产生。本实验采用的是1997年美国国家临床试验标准化委员会(NCCLS)提出的M27-A方案,通过微量液基稀释法和系统性真菌感染小鼠模型对三唑醇类化合物进行了体外和体内的活性筛选。

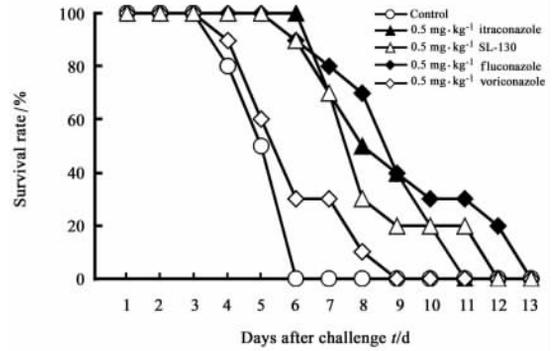


图6 小鼠存活率与时间的关系

Fig 6 Survival periods of mice in each group

通过测定MIC确定SL-130对氟康唑敏感菌具有抗真菌活性,又通过纸片扩散法,时间-杀菌曲线及小鼠的存活率等实验进一步证实这个化合物的抗真菌活性强于氟康唑,它对临床敏感菌和非念珠菌活性均强于氟康唑、伊曲康唑及伏立康唑, MIC_{80} 值 $< 0.125 \mu\text{g/ml}$ 。点种法结果显示药效均强于临床各种敏感菌和耐药菌。纸片扩散法,时间生长曲线及时间-杀菌曲线都进一步证实了SL-130的活性强于氟康唑。体内小鼠的存活时间明显强于空白对照组和伏立康唑,稍强于伊曲康唑,稍弱于氟康唑。本实验显示SL-130具有很强的体外效果和较好的体内效果。

[参考文献]

- [1] Pankova L Iu, Osipenko M F, Kholin S I. [The efficacy of anti-fungal therapy in treatment of gastric ulcer] [J]. Klin Med (Mosk), 2007, 85: 45-47.
- [2] Jacobsen M D, Whyte J A, Odds F C. *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* respond differently to echinocandin anti-fungal agents *in vitro* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51: 1882-1884.
- [3] Morace G, Drago M, Scaltrito M M, Conti S, Fanti F, Polonelli L, et al. *In vitro* activity (MIC and MFC) of voriconazole, amphotericin B, and itraconazole against 192 filamentous fungi: the GISIA-2 study [J]. J Chemother, 2007, 19: 508-513.
- [4] Ercis S, Sancak B, Hascelik G. A comparison of PCR detection of *mecA* with oxacillin disk susceptibility testing in different media and seceptor automated system for both *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolates [J]. Indian J Med Microbiol, 2008, 26: 21-24.
- [5] De Vecchi E, Nicola L, Larosa M, Drago L. *In vitro* activity of telithromycin against *Haemophilus influenzae* at epithelial lining fluid concentrations [J]. BMC Microbiol, 2008, 8: 23-25.
- [6] Zhao J X, Cao Y Y, Quan H, Liu C M, He Q Q, Wu Q Y, et al. *In vitro* and *in vivo* activities of HQQ-3, a new triazole antifungal agent [J]. Biol Pharm Bull, 2006, 29: 2031-2034.

[本文编辑] 尹 茶