

氯喹体外抗新生隐球菌的实验研究

In vitro anti-cryptococcus effect of chloroquine

柏涌海, 朱元杰, 温海, 顾菊林 (第二军医大学长征医院皮肤性病科, 上海 200003)

[摘要] **目的:** 研究氯喹体外单独以及与两性霉素 B(AmB)联合应用对新生隐球菌生长的影响。**方法:** (1) 不同浓度氯喹分别与两种新生隐球菌变种的菌悬液共培养, 检测 4、6、8 h 后菌悬液浓度的变化, 并与不含氯喹的菌悬液对照比较; (2) 检测 3 种浓度氯喹与 AmB 联合后对 10 株菌株的敏感性变化。**结果:** (1) 在与隐球菌菌悬液共同孵育 4、6 和 8 h 时, 50 $\mu\text{mol/L}$ 以下浓度的氯喹培养与生长对照之间隐球菌的生长百分率差异不显著; 而在 50~100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时, 氯喹培养与生长对照之间隐球菌的生长百分率差异显著; 氯喹浓度在 500 $\mu\text{mol/L}$ 以上时, 氯喹与隐球菌共孵育后, 隐球菌菌悬液的浓度甚至低于原先浓度。但氯喹对隐球菌两种变种的作用没有差别。(2) 氯喹与 AmB 联合应用可以明显降低 AmB 的 MIC, 而且也随着剂量增长而增强。**结论:** 高浓度氯喹在体外具有抑制隐球菌生长和杀灭隐球菌的作用, 并可增强 AmB 的抗隐球菌能力。

[关键词] 新生隐球菌; 氯喹; 体外研究

[中图分类号] R 978.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2007)11-1272-03

新生隐球菌作为一种重要的病原真菌, 对免疫功能受损或正常的宿主均可致病。目前关于新生隐球菌感染的治疗虽然取得了一定的进展, 但是仍然存在一定的问题, 特别是目前现有的可供选择的药物仍然非常少, 主要药物是两性霉素 B(AmB), 但是其不良反应严重, 阻碍了本病的临床治疗的进一步发展^[1]。

氯喹是一种 4-氨基喹啉类衍生物, 已有 60 多年的临床应用历史, 主要用于控制疟疾症状和治疗自身免疫性疾病。最近研究发现氯喹可以增强机体巨噬细胞系对隐球菌的吞噬和清除作用^[2], 这为寻找新的抗隐球菌药物提示了一个新方向。本研究拟对氯喹体外单独以及 AmB 联合抗新生隐球菌的作用进行观察, 旨在为氯喹能否用于新生隐球菌感染的治疗提供依据。

1 材料和方法

1.1 菌株 新生隐球菌标准株 B3501 和 ATCC32609, 18 株临床分离株(分离自 6 名诊断明确的 HIV 阴性的隐球菌性脑膜炎患者)和 1 株近平滑念珠菌(ATCC90018)均来自中国医学真菌保藏管理中心隐球菌专业实验室。其中 B3501 为新生隐球菌血清 D 型, 新生变种, 具有目前已知所有毒力因子, ATCC32609 为新生隐球菌血清 B 型, 格特变种。近平滑念珠菌 ATCC90018 为质控菌株。

1.2 主要试剂和器材 氯喹标准化学体购自 Sigma 公司, 纯度大于 99.9%。AmB 原粉由上海新先锋药业提供, 纯度大于 99%。沙堡固体培养基(SDA)、YPD 液体和固体培养基、RPMI 1640 液体培养基均购于 Fluka 公司。96 孔细胞培养板、麦氏比浊管、血细胞计数板购于上海求精生化试剂仪器有限公司。0.5~20 μl 、10~100 μl 微量加样器(Dragenmed), 恒温振荡培养箱(江苏太仓实验设备厂), 分析天平(美国 Denver 公司 100A), 光学显微镜(Olympus 公司)。

1.3 菌悬液的配制保存 菌株复温后以改良 SDA 培养基 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养活化 2 次, 每次 48 h。将活化后的菌株转种于 YPD 培养基平皿, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h 后, 挑取单菌落于 RPMI 1640 培

养基, 血细胞计数板调整菌悬液密度至 $(1\sim5)\times 10^3/\text{cm}^3$ 。将调整后的菌悬液再次接种于 YPD 平皿培养基中确证菌悬液浓度。

1.4 氯喹母液的配制 将氯喹标准体溶解于药敏实验所用 RPMI 1640 培养基, 氯喹的浓度分别为 10、20、100、200、1 000、2 000 $\mu\text{mol/L}$ 。联合药敏时将氯喹标准体溶解于药敏实验所用 RPMI 1640 培养基, 使浓度分别为 40、400、4 000 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.5 氯喹体外直接抗新生隐球菌的作用 参考 CLSI(原 NCCLS) M-27A 方案^[3]并进行改良。方法如下: 将不同浓度的氯喹溶液 100 μl 加于 96 孔培养板中, 然后将新鲜配制的新生隐球菌菌悬液 100 μl 加于各个培养板中。各个反应孔中对应的氯喹浓度分别为 5、10、50、100、500、1 000 $\mu\text{mol/L}$ 。将含有氯喹的菌悬液置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 分别培养 4、8、16 h 后, 将菌悬液稀释后接种于培养板中计数菌落形成单位, 每一个菌落计为一个菌落形成单位。以不含氯喹的培养液作为阴性对照, 每孔重复 3 次, 取平均值。

1.6 氯喹抑菌作用的计算 将培养后各时间点含有氯喹的各反应孔中的菌悬液浓度除以原先加入的菌悬液浓度后, 乘 100%, 为氯喹对新生隐球菌的生长百分率。

1.7 药敏反应板的制备 将药物母液用 RPMI 1640 液体培养基进行倍比稀释, 使 AmB 的起始浓度为 64 $\mu\text{g/ml}$, 终末浓度为 0.125 $\mu\text{g/ml}$ 。各药物浓度均为 2 倍应测试药物浓度。取 2 块无菌 96 孔微量反应板为一组, 第一块板为单用药物板, 于每排 1~10 孔分别加倍比浓度药液 100 μl , 使每种药物的浓度均为 2 倍应测试药物浓度, 第 11 孔加 100 μl 液体培养基为生长对照; 12 孔加 200 μl 液体培养基为空白对照。联合用药时选择氯喹与 AmB 两组联合应用。联用棋盘

[基金项目] 国家自然科学基金(30471566, 30570097). Supported by National Natural Science Foundation of China(30471566, 30570097).

[作者简介] 柏涌海, 博士, 主治医师、讲师。

E-mail: boyonghai@yahoo.com.cn

药敏板在单用药敏的顺序板的基础上,每孔加入倍比浓度药液 50 μl ,药物重复纵向 6 排;同时按照纵向从上至下 6 排孔的顺序分别加入 40、400、4 000 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的氯喹药液 50 μl 。第 11 孔加 100 μl 液体培养基为生长对照;第 12 孔加 200 μl 液体培养基为空白对照。每个实验重复 3 次,取平均值。采用与生长对照孔比较,生长完全抑制,培养基清亮所对应的最低药物浓度为最小抑菌浓度(MIC)。

1.8 最低杀菌浓度(MFC)的判定 将最小抑菌浓度以上各个浓度的培养孔中的菌悬液 20 ml 接种于 SDA 平皿,30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 72 h,以完全没有菌落形成的培养孔中药物浓度为 MFC。

1.9 联合用药效果评价 分别计算 AmB 在加入氯喹后与不加氯喹的 MIC 与 MFC 值,降低 2 个滴度以上计为可以加强 AmB 的作用,计算 20 株菌株中降低 2 个滴度以上菌株所占的百分率。

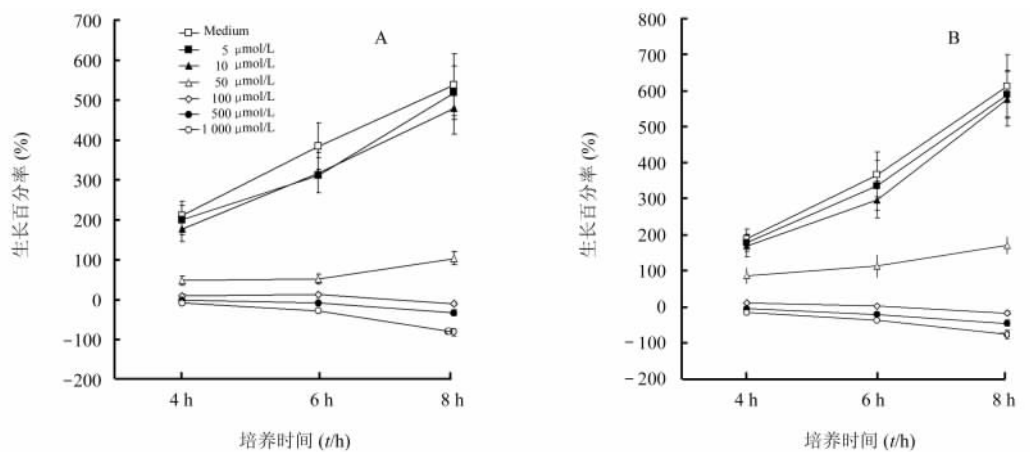


图 1 氯喹对新生隐球菌 B3501(A)和 ATCC32609(B)的体外生长抑制作用

$n=5, \bar{x} \pm s$

2.2 氯喹与 AmB 联合用药效果 根据表 1 显示,与单用 AmB 的 MIC 比较,AmB+10 $\mu\text{mol/L}$ 氯喹组无 2 个滴度以上变化的菌株,AmB+100 $\mu\text{mol/L}$ 氯喹组有 4 株菌株降低,AmB+1 000 $\mu\text{mol/L}$ 氯喹组有 5 株;与单用 AmB 的 MFC 比较,AmB+10 $\mu\text{mol/L}$ 氯喹组有 1 株有 2 个滴度以上降低的菌株,AmB+100 $\mu\text{mol/L}$ 氯喹组有 8 株菌株降低,AmB+1 000 $\mu\text{mol/L}$ 氯喹组有 11 株。

3 讨论

新生隐球菌是一种重要的病原真菌,不仅在免疫抑制患者中可以形成感染,在免疫正常患者中的感染发病率也正在逐渐升高。目前对隐球菌感染的治疗仍然缺乏有效的治疗手段。已经证实可以用于隐球菌感染的药物目前只有 AmB、氟康唑(FCZ)和 5-氟胞嘧啶(5-FC),其中 AmB 的疗效最为确切^[4]。3 种药物都有不同的严重不良反应,常因此而不得不停药。因此,发现新的抗隐球菌药物,或者能够证明一些常用药物具有抗隐球菌作用,将极大促进本病的治疗。

本研究发现,氯喹在体外与新生隐球菌共孵育后,在不同的时间点均可以产生直接的抗隐球菌作用,甚至产生杀灭

1.10 统计学处理 采用 SPSS 12.0 统计软件对各组进行 t 检验和 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为显著性差异。

2 结果

2.1 氯喹对新生隐球菌 B3501 和 ATCC32609 体外生长的抑制 如图 1 所示,氯喹对 B3501 和 ATCC32609 的体外生长抑制需要的浓度均大于 50 $\mu\text{mol/L}$,而且浓度越高,生长抑制作用越明显,在 500 $\mu\text{mol/L}$ 以上时,氯喹与隐球菌共孵育后,隐球菌菌悬液的浓度甚至低于原先浓度,说明在此浓度的氯喹不仅对隐球菌生长具有抑制作用,而且有一定的杀灭作用。同时这种生长抑制作用呈现时间增强性,即随着体外共孵育时间的延长,氯喹对隐球菌 B3501 和 ATCC32609 的生长抑制作用越强。但氯喹对隐球菌新生变种与格特变种两种菌株的抑制作用无明显差异。

隐球菌的作用。氯喹的抗隐球菌作用与其浓度存在明显相关性,体外实验显示其浓度一般需要在 50 $\mu\text{mol/L}$ 以上时才可以发挥抑制隐球菌生长的作用,氯喹浓度越高,其抗隐球菌作用越明显。氯喹对隐球菌的这种抑制作用还存在一定的时间依赖性,随着氯喹与新生隐球菌共孵育时间的延长,氯喹对隐球菌的生长抑制作用变得更加明显。但氯喹对隐球菌新生变种与格特变种两种菌株的抑制作用无明显差异,说明氯喹的作用可能与变种无关。

本研究按照体外微量稀释法对氯喹与 AmB 抗真菌药物进行了体外联合实验,由于目前联合用药药敏结果没有统一方法,且氯喹采用微量稀释法进行结果判定存在一定难度,我们对结果的判读采取了氯喹能够降低抗真菌药物原有的对新生隐球菌的 MIC 和 MFC,根据微量法结果的判定和临床对药敏的解释规则,我们认为只有当药物对隐球菌的 MIC 或 MFC 降低 2 个以上滴度时,是两种药物联合应用的指征。本实验结果显示,氯喹与 AmB 有较好的协同作用,氯喹可以降低 AmB 的 MIC 和 MFC。这种降低作用也与氯喹的浓度相关,在与氯喹 10 $\mu\text{mol/L}$ 联合应用时,这种协同作用均不显著;而在与氯喹 100 $\mu\text{mol/L}$ 以上浓度联合应用时,氯喹则

不仅可以明显降低抗真菌药物的 MIC,而且可以明显降低抗 真菌药物的 MFC。说明氯喹具有与 AmB 协同的可能。

表 1 氯喹与两性霉素 B 联合应用的体外抗隐球菌作用

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

菌株	MIC				MFC			
	AmB	AmB+C10	AmB+C100	AmB+C1000	AmB	AmB+C10	AmB+C100	AmB+C1000
A1	2	2	1	1	8	8	2	2
A2	2	2	1	1	8	8	4	4
A3	1	1	1	1	8	8	2	2
B1	0.5	1	0.5	0.25	8	4	4	4
B2	0.5	0.5	0.5	0.5	4	4	2	4
C1	1	1	0.5	0.5	8	8	4	4
C2	1	0.5	0.5	0.25	8	8	2	2
D1	0.5	1	0.25	0.25	4	4	2	2
D2	1	2	0.25	0.5	4	2	2	2
D3	0.5	0.5	0.25	0.25	4	8	2	1
D4	0.5	0.5	0.25	0.25	8	2	4	2
E1	2	1	0.5	0.5	4	4	2	4
E2	1	1	0.5	0.5	4	4	2	2
E3	2	2	1	1	8	8	4	1
E4	2	1	0.5	0.5	8	4	1	1
F1	1	1	1	1	4	4	2	2
F2	0.5	0.5	0.25	0.25	8	8	1	2
F3	1	2	0.5	0.5	4	2	1	1
B3501	1	2	0.5	1	8	8	2	1
ATCC90018	0.5	0.5	0.25	0.25	2	2	1	1
ATCC32609	2	1	0.5	0.5	8	4	1	1

A1~3、B1~2、C1~2、D1~4、E1~4、F1~3 为来自 6 例隐球菌性脑膜炎患者(HIV 阴性)的临床分离株;C10、C100、C1000 分别代表 10、100、1 000 $\mu\text{mol/L}$ 氯喹

研究发现,氯喹可以增强小胶质细胞^[5]、单核细胞^[6]和巨噬细胞^[7]的体外抗隐球菌作用,使机体对隐球菌感染的清除率升高。氯喹还可以通过碱化单核细胞吞噬溶酶体而抑制 TNF- α 等炎性因子的释放而发挥抗隐球菌的作用^[8]。目前已经明确,氯喹能够降低真菌内体中的酸度,影响内体的成熟过程以及内体中各种酶尤其是蛋白水解酶的活性^[9]。结合本实验结果,我们认为,氯喹可能以单独用药或与 AmB 联合用药的方式用于隐球菌感染的治疗。

本研究初步证实了氯喹在体外具有抗隐球菌的作用并能够增强 AmB 的抗隐球菌能力。目前氯喹临床常用的方法是约为 0.5~1.0 g/d^[10],虽然具有一定的不良反应,但是都可以检测和预防,而且目前已经有羟基氯喹这一新的剂型,可以明显降低其不良反应的发生。本研究中的体外实验剂量虽然较目前常用剂量稍大,但由于氯喹在体内还能增强巨噬细胞的抗隐球菌作用,因此在体内的应用情况还需要进一步的研究。

[参考文献]

[1] Chayakulkeeree M, Perfect J R. Cryptococcosis[J]. Infect Dis Clin North Am,2006,20:507-544.
 [2] Ma H, Croudace J E, Lammas D A, et al. Expulsion of live pathogenic yeast by macrophages[J]. Curr Biol,2006,16:2156-2160.
 [3] Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; Approved Standard M27-A. The National Committee for Clinical Laboratory Standards. USA, National

Committee for Clinical Laboratory Standards[S]. Pennsylvania, 1997. 1-21.
 [4] Saag M S, Graybill R J, Larsen R A, et al. Practice guideline for the management of cryptococcal disease. Infectious Disease Society of America [J]. Clin Infect Dis,2000,30:710-718.
 [5] Mazzolla R, Barluzzi R, Brozzetti A, et al. Enhanced resistance to *Cryptococcus neoformans* infection induced by chloroquine in a murine model of meningoencephalitis[J]. Antimicrob Agents Chemother,1997,41:802-807.
 [6] Levitz S M, Harrison T S, Tabuni A, et al. Chloroquine induces human mononuclear phagocytes to inhibit and kill *Cryptococcus neoformans* by a mechanism independent of iron deprivation [J]. J Clin Invest,1997,100:640-646.
 [7] Khan M A, Jabeen R, Nasti T H, et al. Enhanced anticryptococcal activity of chloroquine in phosphatidylserine-containing liposomes in a murine model[J]. J Antimicrob Chemother, 2005,55:223-228.
 [8] Weber S M, Levitz S M. Chloroquine antagonizes the proinflammatory cytokine response to opportunistic fungi by alkalinizing the fungal phagolysosome[J]. J Infect Dis, 2001,183:935-942.
 [9] Weber S M, Levitz S M, Harrison T S. Chloroquine and the fungal phagosome[J]. Curr Opin Microbiol,2000,3:349-353.
 [10] 赵 辨. 临床皮肤病学[M]. 南京:江苏科学技术出版社,2001: 583,587.

[收稿日期] 2007-04-05 [修回日期] 2007-09-01
 [本文编辑] 贾泽军