

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.01000

· 论 著 ·

过氧化氢对5种唑类药物体外抗耐药白假丝酵母菌的协同作用

张姗姗[△], 王彦[△], 李德东, 曹永兵, 姜远英*

第二军医大学药学院新药研究中心, 上海 200433

[摘要] **目的** 考察过氧化氢(H₂O₂)对5种唑类药物:氟康唑(FLC),伊曲康唑(ICZ),酮康唑(KCZ),咪康唑(MCZ)和硫康唑(SCZ)体外抗耐药白假丝酵母菌作用的影响。**方法** 利用8株对氟康唑耐药,2株对氟康唑敏感的白假丝酵母菌,采用微量液基稀释法测定药物单用时的最低抑菌浓度 MIC₈₀值,采用棋盘式微量液基稀释法测定两药联用时的 MIC₈₀值,在此基础上计算部分抑菌浓度指数(FICI)即协同指数,依据 FICI 值判断 H₂O₂与唑类药物联用是具有协同、无关还是拮抗作用。**结果** 对所有耐药菌株,两药联用的 FICI 值均小于 0.5, H₂O₂与唑类药物联用显现出协同作用;对2株敏感菌株,两药联用的 FICI 值大于 0.5、小于 2,显示为无关作用。**结论** H₂O₂和唑类药物(氟康唑,伊曲康唑,酮康唑,咪康唑,硫康唑)联用有协同抗耐药白假丝酵母菌作用。

[关键词] 过氧化氢;唑类;抗真菌药;药物协同作用**[中图分类号]** R 978.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)09-1000-06

Synergetic antifungal effect of hydrogen peroxide with 5 azoles against drug-resistant *Candida albicans*

ZHANG Shan-shan[△], WANG Yan[△], LI De-dong, CAO Yong-bing, JIANG Yuan-ying*

Research Center of New Drugs, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate the influence of hydrogen peroxide (H₂O₂) on the antifungal effect of 5 azoles (fluconazole, itraconazole, ketoconazole, miconazole, and sulconazole) against drug-resistant *Candida albicans*. **Methods** Eight strains of drug-resistant *Candida albicans* and two strains of drug-susceptible *Candida albicans* were used in this study. The minimal inhibitory concentration for 80% (MIC₈₀) of each individual antifungal drug was determined by broth microdilution antifungal susceptibility testing; the MIC₈₀ of the antifungal drug was also determined when in combination with H₂O₂ by checkerboard microdilution assay. Then the fractional inhibitory concentration index (FICI) was calculated to decide the synergism, indifference, or antagonism of H₂O₂ with azoles. **Results** The FICI values of the 8 drug-resistant strains for combination of H₂O₂ with 5 azoles were less than 0.5, indicating the presence of synergism. The FICI values of the two drug-susceptible strains were between 0.5 and 2, indicating the presence of indifference. **Conclusion** H₂O₂ and the azoles (fluconazole, itraconazole, ketoconazole, miconazole and sulconazole) possess synergism effect against drug-resistant *Candida albicans*.

[Key words] hydrogen peroxide; azoles; antifungal agents; drug synergism

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(9):1000-1005]

白假丝酵母菌(*Candida albicans*)是临床最常见的条件致病性真菌,存在于正常人群的多个解剖部位,如皮肤、口腔、胃肠道、阴道等。近年来,伴随着艾滋病的传播、癌症患者的放化疗、器官移植后免疫抑制剂的使用、广谱抗生素的大量使用,以及导管等生物材料越来越多地应用于人体,白假丝酵母菌深部感染的发病率不断增加,并已成为癌症及免疫缺陷性疾病患者死亡的主要原因之一^[1]。目前临床用于治疗白假丝酵母菌感染的药物屈指可数,主要

有唑类(氟康唑、酮康唑、咪康唑和伊曲康唑等)、两性霉素 B 和氟胞嘧啶等。由于氟康唑的生物利用度高,不良反应小,且价格合理,所以常被作为首选药物。唑类药物公认的抗真菌机制是选择性抑制羊毛甾醇 14 α -去甲基化酶,进而抑制真菌细胞膜上麦角甾醇的生物合成。近年来又有研究表明唑类药物的抗真菌作用与升高真菌细胞内的活性氧水平有密切关系^[2-3]。本课题组前期研究发现白假丝酵母菌线粒体氧化呼吸功能减弱、活性氧水平降低可能是其对唑

[收稿日期] 2011-03-31**[接受日期]** 2011-07-01**[作者简介]** 张姗姗,硕士生. E-mail: ssdora@yahoo.cn; 王彦,副教授. E-mail: wangyansmmu@126.com[△]共同第一作者(Co-first authors).

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81871357, E-mail: jiangyy@smmu.edu.cn

类药物产生耐药的重要机制之一^[4];抗氧化剂能降低氟康唑的体内外抗真菌作用^[5],而促进细胞内活性氧生成的小檗碱具有明显的协同氟康唑抗真菌作用^[6]。然而活性氧本身对唑类药物抗真菌作用的影响目前尚无报道,因此本研究重点考察了活性氧类物质过氧化氢对唑类药物体外抗真菌作用的影响。

1 材料和方法

1.1 菌株及培养条件 菌株 0511655、0905103、0909379、0909502、0909649、0909782、0909876、0909958 由第二军医大学长海医院真菌室提供,经形态学和生化学鉴定为白假丝酵母菌。菌株 SC5314 和 CAF2-1 由 William A. Fonzi (Department of Microbiology and Immunology, Georgetown University, Washington DC, USA) 惠赠。

1.2 培养基 RPMI1640 培养液: RPMI1640 (Gibco BRL 公司) 10 g、NaHCO₃ 2.0 g、吗啡啉丙磺酸 (MOPS) 34.5 g (0.165 mol/L, Sigma 公司) 加三蒸水 900 ml 溶解,加入 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,三蒸水定容至 1 000 ml,高压灭菌 (121℃, 15 min) 后于 4℃ 保存备用。

1.3 药物 过氧化氢 (H₂O₂)、伊曲康唑 (itraconazole, ICZ)、酮康唑 (ketoconazole, KCZ)、咪康唑 (miconazole, MCZ) 和硫康唑 (sulconazole, SCZ) 购自 Sigma 公司。氟康唑 (fluconazole, FLC) 注射液 (生产批号: 091101) 由上海信谊药业有限公司提供。二甲亚砜 (dimethyl sulphoxide, DMSO) 由中国医药集团上海化学试剂公司出品。

伊曲康唑、酮康唑、咪康唑、硫康唑用 DMSO 溶解为 6.4 mg/ml 的药物母液,置 -20℃ 冰箱贮存备用。氟康唑注射液浓度为 2 mg/ml, H₂O₂ 溶液以灭菌三蒸水稀释至 0.16 mol/L。

1.4 实验方法 实验前,用接种圈从 4℃ 保存的 SDA 平板上挑取少量白假丝酵母菌,接种至 1 ml YEPD 培养液,于 30℃、200 转/min 振荡培养,活化 16 h,使真菌处于指数生长期后期。取该菌液至 1 ml YEPD 培养液中,用上述方法再次活化,16 h 后用血细胞计数板计数,用 RPMI1640 培养液调整菌液浓

度至 1×10³~5×10³ CFU/ml。

1.4.1 各类药物单独用药药敏反应板的制备 取无菌 96 孔板,于每排 1 号孔加 RPMI1640 培养液 100 μl 作空白对照;3~12 号孔各加新鲜配制的菌液 100 μl;2 号孔分别加菌液 180 μl 和受试化合物溶液 20 μl (用 RPMI1640 培养液将药物稀释至需要浓度,氟康唑 1.28 mg/ml、伊曲康唑 160 μg/ml、酮康唑 32 μg/ml、咪康唑 100 μg/ml、硫康唑 1.28 mg/ml、H₂O₂ 160 mmol/L);12 号孔不含药物,只加 100 μl 菌液作阳性生长对照。2~11 号孔进行倍比稀释,使各孔的最终药物浓度分别为氟康唑: 128、64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25 μg/ml;伊曲康唑: 16、8、4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.062 5、0.031 3 μg/ml;酮康唑: 3.2、1.6、0.8、0.4、0.2、0.1、0.05、0.025、0.012 5、0.006 25 μg/ml;咪康唑: 10、5、2.5、1.25、0.625、0.313、0.156、0.078、0.039、0.019 5 μg/ml;硫康唑: 128、64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25 μg/ml; H₂O₂: 1.6×10⁻²、8×10⁻³、4×10⁻³、2×10⁻³、1×10⁻³、5×10⁻⁴、2.5×10⁻⁴、1.25×10⁻⁴、6.25×10⁻⁵、3.13×10⁻⁵ mol/L,各孔中 DMSO 含量均不高于 1%。测定各种药物单用时的最小抑菌浓度 (MIC)。各药敏板于 30℃ 恒温箱培养 24 h 后,用酶标仪 (Multiskan MK3 型, Labsystems 公司) 于 620 nm 处测各孔光密度 (D) 值。

1.4.2 联合用药药敏反应板的制备 取无菌 96 孔板,于每排 1 号孔加 RPMI1640 培养液 100 μl 作空白对照;2~12 号孔各加新鲜配制的菌液 100 μl;第 1 排的 2 号孔分别另加菌液 60 μl 和受试化合物溶液 40 μl,第 2~8 排的 2 号孔分别另加菌液 80 μl 和受试化合物溶液 20 μl (以 RPMI1640 培养液将药物稀释至需要浓度,氟康唑 1.28 mg/ml,伊曲康唑 160 μg/ml、酮康唑 32 μg/ml、咪康唑 100 μg/ml、硫康唑 1.28 mg/ml);12 号孔不含药物,只加菌液 100 μl 作阳性生长对照。横向 (2~11 号) 对唑类药物进行倍比稀释,使各孔的最终药物浓度分别为氟康唑: 128、64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25 μg/ml;伊曲康唑: 16、8、4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.062 5、0.031 3 μg/ml;酮康唑: 3.2、1.6、0.8、0.4、0.2、0.1、0.05、0.025、0.012 5、0.006 25 μg/ml;咪康唑: 10、5、2.5、1.25、0.625、0.313、0.156、0.078、0.039、0.019 5 μg/ml;硫康唑: 128、64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25 μg/ml。第 1 排浓度设为其他每排浓度的 2 倍 (因要进行 H₂O₂ 的倍比稀释,会对第 1 排每孔进行稀释,因此每列第 1 号孔的浓度设为终浓度的 2 倍)。第 1 行 2~11 号孔继续加入 50 μl 菌液和用 RPMI1640 稀释成 32 mmol/L 的 H₂O₂ 溶液 50 μl,在纵向 (A~H) 进行 2 倍的倍比稀释,使得

H₂O₂ 的终浓度为 8 × 10⁻³、4 × 10⁻³、2 × 10⁻³、1 × 10⁻³、5 × 10⁻⁴、2.5 × 10⁻⁴、1.25 × 10⁻⁴、6.25 × 10⁻⁵ mol/L。各孔中 DMSO 含量均不高于 1%，各药敏板于 30℃ 恒温箱培养 24 h 后，用酶标仪于 620 nm 处测各孔光密度(D)值。

敏感菌实验方法与耐药菌类似，只是氟康唑和硫康唑的浓度从 64 μg/ml 开始进行倍比稀释。

1.5 MIC 值判定及联合用药的效果评价 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)。当 MIC 值高于检测最高限时，以最高限浓度的 2 倍值计算部分抑菌浓度指数(FICI)。当 FICI ≤ 0.5 时，判定两药的相互作用为协同作用，且 FICI 越小，协同作用越强；0.5 < FICI ≤ 4 时判定两药的相互作用为无关；当 FICI > 4 时判定两药的相互作用为拮抗作用^[7-8]。

上述实验均平行操作 3 次，MIC₈₀ 值能准确重复至只差一个浓度，取 3 次实验平均值。

1.6 质控菌 根据 NCCLS M27-A 方案^[7] 的建议，我们采用 SC5314 为质控菌，每次配制药敏板的同时均制备一质控菌药敏板，其 MIC 参考值如下：氟康唑 MIC₈₀ 值 0.25~1.0 μg/ml；每次实验以此菌株为参照菌株，只有当其 MIC 值界于上述范围时，方认为实验操作准确可靠。如同时实验菌株生长良好，则可认为实验成功，结果可接受。

2 结果

体外实验以棋盘式微量液基稀释法检测 H₂O₂ 与氟康唑、酮康唑、咪康唑、伊曲康唑和硫康唑联用对不同来源、不同敏感性的白假丝酵母菌的作用，结果见表 1~表 5。

表 1 棋盘式微量液基稀释法检测氟康唑与 H₂O₂ 联用对耐药白假丝酵母菌的影响
Tab 1 Effects of FLC combined with H₂O₂ on drug-resistant *Candida albicans* as determined by checkerboard microdilution assay

No.	Clinical isolate	MIC ₈₀ alone		MIC ₈₀ in combination		FICI for combination	Mode of interaction
		FLC ρ _B /(μg · ml ⁻¹)	H ₂ O ₂ c _B /(mol · L ⁻¹)	FLC ρ _B /(μg · ml ⁻¹)	H ₂ O ₂ c _B /(mol · L ⁻¹)		
1	SC5314	0.5	2 × 10 ⁻³	0.5	1 × 10 ⁻³	1.5	Indifference
2	CAF2-1	0.25	2 × 10 ⁻³	0.25	1 × 10 ⁻³	1.5	Indifference
3	0511655	128	8 × 10 ⁻³	4	2 × 10 ⁻³	0.253	Synergy
4	0905103	64	4 × 10 ⁻³	1	6.25 × 10 ⁻⁵	0.031 3	Synergy
5	0909379	128	8 × 10 ⁻³	4	2 × 10 ⁻³	0.253	Synergy
6	0909502	128	8 × 10 ⁻³	8	1 × 10 ⁻³	0.187	Synergy
7	0909649	128	8 × 10 ⁻³	4	1 × 10 ⁻³	0.156	Synergy
8	0909782	128	8 × 10 ⁻³	8	1 × 10 ⁻³	0.187	Synergy
9	0909876	128	4 × 10 ⁻³	8	5 × 10 ⁻⁴	0.187	Synergy
10	0909958	128	8 × 10 ⁻³	1	5 × 10 ⁻⁴	0.08	Synergy

FLC: Fluconazole; MIC₈₀: Minimal inhibitory concentration for 80%; FICI: Fractional inhibitory concentration index

表 2 棋盘式微量液基稀释法检测酮康唑与 H₂O₂ 联用对耐药白假丝酵母菌的影响
Tab 2 Effects of KCZ combined with H₂O₂ on drug-resistant *Candida albicans* as determined by checkerboard microdilution assay

No.	Clinical isolate	MIC ₈₀ alone		MIC ₈₀ in combination		FICI for combination	Mode of interaction
		KCZ ρ _B /(μg · ml ⁻¹)	H ₂ O ₂ c _B /(mol · L ⁻¹)	KCZ ρ _B /(μg · ml ⁻¹)	H ₂ O ₂ c _B /(mol · L ⁻¹)		
1	SC5314	0.025	2 × 10 ⁻³	0.025	1 × 10 ⁻³	1.5	Indifference
2	CAF2-1	0.025	2 × 10 ⁻³	0.012 5	1 × 10 ⁻³	1	Indifference
3	0511655	3.2	8 × 10 ⁻³	0.4	2 × 10 ⁻³	0.375	Synergy
4	0905103	1.6	4 × 10 ⁻³	0.05	3.175 × 10 ⁻⁵	0.047	Synergy
5	0909379	1.6	8 × 10 ⁻³	0.2	5 × 10 ⁻⁴	0.187	Synergy
6	0909502	1.6	8 × 10 ⁻³	0.2	3.175 × 10 ⁻⁵	0.129	Synergy
7	0909649	1.6	8 × 10 ⁻³	0.2	2 × 10 ⁻³	0.375	Synergy
8	0909782	3.2	8 × 10 ⁻³	0.4	2 × 10 ⁻³	0.375	Synergy
9	0909876	1.6	4 × 10 ⁻³	0.4	3.175 × 10 ⁻⁵	0.258	Synergy
10	0909958	1.6	8 × 10 ⁻³	0.4	2 × 10 ⁻³	0.5	Synergy

KCZ: Ketoconazole; MIC₈₀: Minimal inhibitory concentration for 80%; FICI: Fractional inhibitory concentration index

表 3 棋盘式微量液基稀释法检测咪康唑与 H₂O₂ 联用对耐药白假丝酵母菌的影响Tab 3 Effects of MCZ combined with H₂O₂ on drug-resistant *Candida albicans* as determined by FICI through checkerboard microdilution assay

No.	Clinical isolate	MIC ₈₀ alone		MIC ₈₀ in combination		FICI for combination	Mode of interaction
		MCZ $\rho_B/(\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})$	H ₂ O ₂ $c_B/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	MCZ $\rho_B/(\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})$	H ₂ O ₂ $c_B/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$		
1	SC5314	8.9×10^{-2}	2×10^{-3}	4.5×10^{-2}	1×10^{-3}	1	Indifference
2	CAF2-1	8.9×10^{-2}	2×10^{-3}	4.5×10^{-2}	1×10^{-3}	1	indifference
3	0511655	10	8×10^{-3}	0.125	3.175×10^{-5}	0.017	Synergy
4	0905103	10	4×10^{-3}	0.8	1×10^{-3}	0.3	Synergy
5	0909379	10	8×10^{-3}	0.078	3.175×10^{-5}	0.010 2	Synergy
6	0909502	10	8×10^{-3}	0.156	3.175×10^{-5}	0.019 6	Synergy
7	0909649	10	8×10^{-3}	2.5	3.175×10^{-5}	0.254	Synergy
8	0909782	10	8×10^{-3}	1.25	3.175×10^{-5}	0.129	Synergy
9	0909876	10	4×10^{-3}	0.156	3.175×10^{-5}	0.019 6	Synergy
10	0909958	10	8×10^{-3}	2.5	2.5×10^{-4}	0.281	Synergy

MCZ: Miconazole; MIC₈₀: Minimal inhibitory concentration for 80%; FICI: Fractional inhibitory concentration index表 4 棋盘式微量液基稀释法检测伊曲康唑与 H₂O₂ 联用对耐药白假丝酵母菌的影响Tab 4 Effects of ICZ combined with H₂O₂ on drug-resistant *Candida albicans* as determined by checkerboard microdilution assay

No.	Clinical isolate	MIC ₈₀ alone		MIC ₈₀ in combination		FICI for combination	Mode of interaction
		ICZ $\rho_B/(\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})$	H ₂ O ₂ $c_B/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	ICZ $\rho_B/(\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})$	H ₂ O ₂ $c_B/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$		
1	SC5314	0.25	2×10^{-3}	0.125	1×10^{-3}	1	Indifference
2	CAF2-1	0.125	2×10^{-3}	0.031 3	1×10^{-3}	0.75	Indifference
3	0511655	16	8×10^{-3}	2	5×10^{-4}	0.187	Synergy
4	0905103	16	4×10^{-3}	0.8	1×10^{-3}	0.3	Synergy
5	0909379	16	8×10^{-3}	1	2×10^{-3}	0.313	Synergy
6	0909502	4	8×10^{-3}	0.25	1×10^{-3}	0.187	Synergy
7	0909649	16	8×10^{-3}	2	2×10^{-3}	0.375	Synergy
8	0909782	16	8×10^{-3}	1	2×10^{-3}	0.313	Synergy
9	0909876	16	8×10^{-3}	2	1×10^{-3}	0.25	Synergy
10	0909958	16	8×10^{-3}	4	1×10^{-3}	0.375	Synergy

ICZ: Itraconazole; MIC₈₀: Minimal inhibitory concentration for 80%; FICI: Fractional inhibitory concentration index表 5 棋盘式微量液基稀释法检测硫康唑与 H₂O₂ 联用对耐药白假丝酵母菌的影响Tab 5 Effects of SCZ combined with H₂O₂ on drug-resistant *Candida albicans* as determined by checkerboard microdilution assay

No.	Clinical isolate	MIC ₈₀ alone		MIC ₈₀ in combination		FICI for combination	Mode of interaction
		SCZ $\rho_B/(\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})$	H ₂ O ₂ $c_B/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	SCZ $\rho_B/(\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})$	H ₂ O ₂ $c_B/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$		
1	SC5314	2	2×10^{-3}	0.5	1×10^{-3}	0.75	Indifference
2	CAF2-1	2	2×10^{-3}	1	1×10^{-3}	1	Indifference
3	0511655	128	8×10^{-3}	8	2×10^{-3}	0.313	Synergy
4	0905103	128	4×10^{-3}	16	1×10^{-3}	0.375	Synergy
5	0909379	>128	8×10^{-3}	32	1×10^{-3}	0.375	Synergy
6	0909502	>128	8×10^{-3}	32	1×10^{-3}	0.375	Synergy
7	0909649	128	8×10^{-3}	16	2×10^{-3}	0.375	Synergy
8	0909782	>128	8×10^{-3}	2	2×10^{-3}	0.266	Synergy
9	0909876	>128	8×10^{-3}	4	2×10^{-3}	0.266	Synergy
10	0909958	128	4×10^{-3}	16	1×10^{-3}	0.375	Synergy

SCZ: Sulconazole; MIC₈₀: Minimal inhibitory concentration for 80%; FICI: Fractional inhibitory concentration index

实验结果显示以 MIC₈₀ 值为基础,考察两药对全部 8 株耐药菌(100%)的相互作用皆表现为协同,对 2 株敏感菌株的相互作用为无关作用。单用氟康唑耐药的菌株,联用 H₂O₂ 后,菌株对氟康唑的敏感性增强,由耐药(MIC₈₀ ≥ 64 μg/ml)变得敏感, MIC₈₀ 值降低了 16~64 倍,联用后氟康唑的 MIC₈₀ 在 <1 至 8 μg/ml 之间,同时 H₂O₂ 的 MIC₈₀ 降到 2 mmol/L(含 2 mmol/L)以下。单用酮康唑耐药的菌株,联用 H₂O₂ 后菌株对酮康唑的敏感性增强,由耐药(MIC₈₀ ≥ 1.6 μg/ml)变得敏感, MIC₈₀ 降低了 4~32 倍,联用 H₂O₂ 后酮康唑的 MIC₈₀ 在 <0.05 至 0.4 μg/ml 之间。同样,联用 H₂O₂ 对咪康唑的敏感性增强, MIC₈₀ 值从 10 μg/ml 降低到 0.045~2.5 μg/ml;伊曲康唑的 MIC₈₀ 值从 16 μg/ml 降低

到 0.8~4 μg/ml(菌株 0909502 从 4 μg/ml 降低到 0.25 μg/ml);硫康唑的 MIC₈₀ 值从 128 μg/ml 降低到 2~32 μg/ml。对于实验室常用耐药菌株 0905103,使用氟康唑、酮康唑与 H₂O₂ 联用的效果较好,低于其他各耐药菌株,最佳药物浓度分别为氟康唑 1 μg/ml+H₂O₂ 6.25×10⁻⁵ mol/L 以及酮康唑 0.05 μg/ml+H₂O₂ 3.175×10⁻⁵ mol/L。而使用咪康唑、硫康唑与 H₂O₂ 联用的 FICI 值为各耐药菌株中的最大值。对 FICI 值汇总图 1,联用 H₂O₂ 对咪康唑的影响最大,菌株 0511655、0909379、0909502、0909782、0909876 的 FICI 值均小于同组其他药物的 FICI 值。菌株 0905103、0909649、0909958 则是氟康唑与 H₂O₂ 联用的 FICI 值最小。

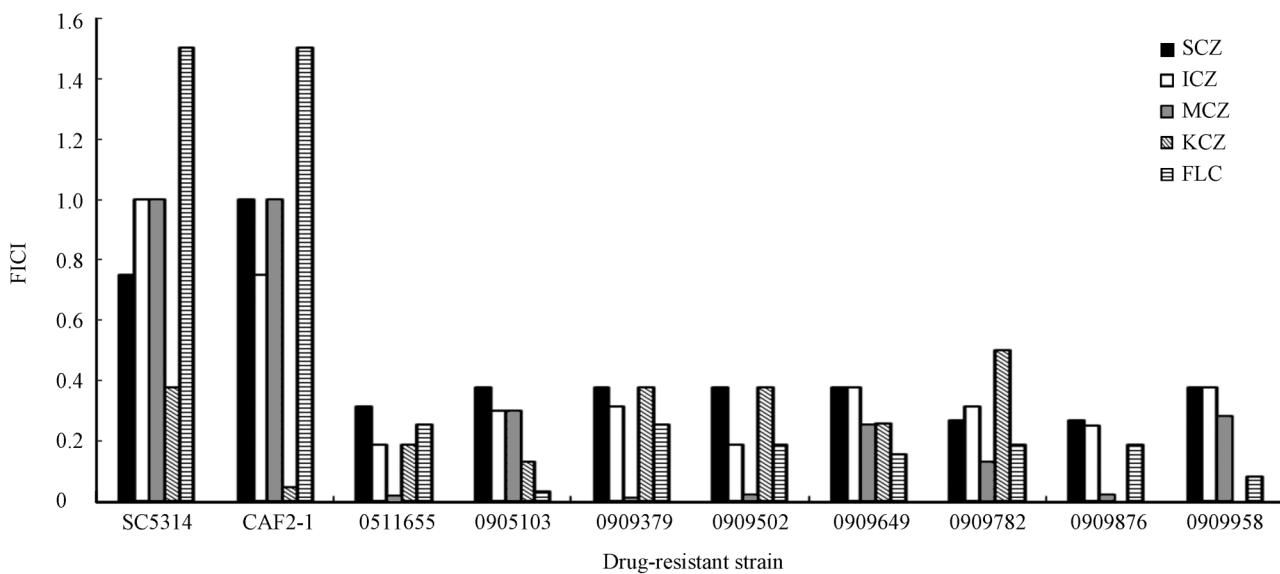


图 1 不同耐药菌的 FICI 值

Fig 1 FICI of different drug-resistant *Candida albicans*

SCZ: Sulconazole; ICZ: Itraconazole; MCZ: Miconazole; KCZ: Ketoconazole; FLC: Fluconazole; FICI: Fractional inhibitory concentration index

3 讨论

近来研究报道内源性活性氧在部分药物的抗菌活性中起了重要作用,在部分抗真菌药物的杀菌作用中也有 ROS 的参与^[9-10]。有文献报道咪康唑能够诱导白假丝酵母菌产生内源性 ROS,而且 ROS 的产生越多咪康唑 MIC 值越低,敏感性越高^[9],所以除了抑制麦角甾醇合成之外,ROS 的产生在抗真菌活性中也起了重要作用^[9,11]。在正常的有氧代谢过程中,白假丝酵母菌的线粒体呼吸链会不可避免地释放出部分活性氧。大量活性氧在细胞内蓄积会

破坏多种成分,包括 DNA、蛋白质和脂质等^[12-13]。本研究发现活性氧类物质 H₂O₂ 能协同唑类药物发挥抗耐药白假丝酵母的作用,通过测定 5 种不同唑类药物与 H₂O₂ 联用对耐药白假丝酵母菌的影响,通过计算 FICI 值,结果显示 8 株不同耐药菌株均表现为协同,而作为对照的敏感菌株 SC314 和 CAF2-1 则表现为无关。

该研究的结果也与本实验室前期的研究^[6]发现相符。本实验室前期研究发现,白假丝酵母对氟康唑的耐药机制部分与细胞内 ROS 相关,白假丝酵母菌交替氧化酶通过减少药物作用时内源性 ROS 的

升高程度,降低菌株对唑类药物的敏感性;氟康唑加压诱导获得的耐药菌线粒体氧化呼吸功能明显减弱,在唑类药物作用下内源性 ROS 升高的程度也明显降低^[6]。增强线粒体呼吸功能,使内源性活性氧增多可能是氟康唑、咪康唑抑菌的机制之一。白假丝酵母菌线粒体氧化呼吸功能减弱有可能是其对唑类药物产生耐药的重要机制之一。本课题研究发现活性氧类物质 H₂O₂ 能协同唑类药物发挥抗耐药真菌作用,进一步确证了前期有关药物作用机制和耐药机制的研究结果。本实验室前期研究还发现,抗氧化剂能降低氟康唑的体内外抗真菌作用^[5],而促进细胞内活性氧生成的小檗碱具有明显的协同氟康唑抗真菌作用^[7]。在本研究中我们发现,活性氧本身能协同唑类药物的抗真菌作用,进一步确证了前期的研究结果。本研究对进一步理解耐药机制和抗真菌药物作用机制有一定意义。此外,本研究也提示我们可以尝试将 H₂O₂ 和唑类抗真菌药物联用于顽固性耐药真菌性皮肤病的治疗。

[参考文献]

- [1] Nemunaitis J. Use of macrophage colony stimulating factor in the treatment of fungal infections[J]. Clin Infect Dis, 1998, 26: 1279-1281.
- [2] Giacometti R, Kronberg F, Biondi R M, Passeron S. Catalytic isoforms Tpk1 and Tpk2 of *Candida albicans* PKA have non-redundant roles in stress response and glycogen storage[J]. Yeast, 2009, 26: 273-285.
- [3] Shirtliff M E, Krom B P, Meijering R A, Peters B M, Zhu J, Scheper M A, et al. Farnesol-induced apoptosis in *Candida albicans*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53: 2392-2401.
- [4] Yan L, Zhang J D, Cao Y B, Gao P H, Jiang Y Y. Proteomic analysis reveals a metabolism shift a laboratory fluconazole-resistant *Candida albicans* strain[J]. J Proteome Res, 2007, 6,

- 2248-2256.
- [5] Wang Y, Jia X M, Jia J H, Li M B, Cao Y B, Gao P H, et al. Ascorbic acid decreases the antifungal effect of fluconazole in the treatment of candidacies [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2009, 36: e40-e46.
- [6] Xu Y, Wang Y, Yan L, Liang R M, Dai B D, Tang R J. Proteomic analysis reveals a synergistic mechanism of fluconazole and berberine against fluconazole-resistant *Candida albicans*: endogenous ROS augmentation[J]. J Proteome Res, 2009, 8: 5296-5304.
- [7] National Committee for Clinical and Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A[S]. Pennsylvania: NCCLS, 1997. 1-21.
- [8] Pfaller M A, Barry A L. Evaluation of a novel colorimetric broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of yeast isolates[J]. J Clin Microbiol, 1994, 32: 1992-1996.
- [9] Kobayashi D, Kondo K, Uehara N, Otokozaawa S, Tsuji N, Yagihashi A, et al. Endogenous reactive oxygen species is an important mediator of miconazole antifungal effect[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46: 3113-3117.
- [10] Lupetti A, Paulusma-Annema A, Senesi S, Campa M, Van Disel J T, Nibbering P H. Internal thiols and reactive oxygen species in candidacidal activity exerted by an N-terminal peptide of human lactoferrin [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46: 1634-1639.
- [11] Beggs W H. Development of phenotypic resistance to direct lethal miconazole action by *Candida albicans* entering stationary phase[J]. Mycopathologia, 2004, 10: 201-206.
- [12] Dawes I W, Richardson J R, Schweizer M, Eds. Yeast stress responses. In: The metabolism and molecular physiology of saccharomyces cerevisiae[M]. Boca Raton: CRC Press, 2004: 376-438.
- [13] Ikner A, Shiozaki K. Yeast signaling pathways in the oxidative stress response[J]. Mutat Res, 2005, 569(1-2): 13-27.

[本文编辑] 尹茶

• 书 讯 •

《现代血液病药物治疗学》已出版

该书由王健民主编,第二军医大学出版社出版,ISBN 978-7-81060-807-7,16开,定价80.00元。

该书在阐述血液病的病因、发病机制、临床表现、诊断及鉴别诊断的基础上,重点对各种血液病的常规治疗原则及药物治疗原则作了详细叙述,并探讨了治疗药物的作用机制、各种药物的临床选用和常见药物的不良反应。同时,对血液病各种特殊状态下的用药作了专题介绍,以及综述了血液病在基因治疗等领域的发展新趋势。

该书是一本以药物治疗为主线的理论与临床实践紧密结合的治疗学专著,既较全面地论述了各种血液病的传统治疗和新技术,也融入了编者的临床用药经验,并系统地介绍了造血系统和药物之间的关系、造血系统疾病的药效学和药动学、药物生化代谢学等基础知识,可作为临床血液病医师、药师及有关研究人员参考用书。

该书由第二军医大学出版社发行科发行,全国各大书店均有销售。

通信地址:上海市翔殷路800号,邮编:200433

邮购电话:021-65344595,65493093

<http://www.smmup.com>