

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.01386

阿奇霉素体外对赫氏棘阿米巴的抑制作用

朴成钢¹, 刘 斐², 崔春权², 郑善子², 任光旭^{3*}

1. 延边大学福祉医院外科, 延吉 133002
2. 延边大学医学院病原生物学教研室, 延吉 133002
3. 延边医院神经外科, 延吉 133002

[关键词] 赫氏棘阿米巴; 阿奇霉素; 体外

[中图分类号] R 382.1 [文献标志码] B [文章编号] 0258-879X(2012)12-1386-03

In vitro inhibitory effect of azithromycin against *Acanthamoeba healyi*

PIAO Cheng-gang¹, LIU Fei², CUI Chun-quan², ZHENG Shan-zi², REN Guang-xu^{3*}

1. Department of Surgery, Fuzhi Hospital, Yanbian University, Yanji 133002, Jilin, China
2. Department of Pathogen Biology, College of Medicine, Yanbian University, Yanji 133002, Jilin, China
3. Department of Neurosurgery, Yanbian Hospital, Yanbian University, Yanji 133002, Jilin, China

[Key words] *Acanthamoeba healyi*; azithromycin; *in vitro*

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(12):1386-1388]

棘阿米巴是广泛存在于自然环境中、自由生活的致病性阿米巴,可引起人体棘阿米巴性角膜炎(*acanthamoeba keratitis*, AK)^[1],在艾滋病等免疫功能低下的人群中还会引起阿米巴性肉芽肿性脑炎、皮肤感染等^[2-3]。棘阿米巴原虫包括滋养体和包囊两个阶段,当周围环境不利于生长或受到药物作用时,滋养体就转化为包囊而增强对环境和药物的抵抗能力。因此,临床上有关棘阿米巴感染的治疗效果不理想。阿奇霉素为新型半合成大环内酯类抗生素,临床上用于多种细菌、支原体和衣原体感染,但尚未见用于有关棘阿米巴感染的报道。我们通过体外研究观察阿奇霉素对棘阿米巴的杀伤作用。

1 材料和方法

1.1 实验材料 赫氏棘阿米巴由韩国庆北大学郑东一教授提供,由延边大学医学院病原生物学教研室长期实验保虫。阿奇霉素冻干粉针为山东罗欣药业有限公司产品(批号为1104221-2,规格为0.25 g/瓶),甲硝唑注射液为吉林科伦康乃尔药业公司产品(批号为090436-N1,规格为0.5 g/250 ml)。

1.2 实验方法 赫氏棘阿米巴的培养按文献[4]方法,用蛋白胨酵母浸膏葡萄糖(peptone-yeast extract-glucose, PYG)培养液在28℃条件下培养。阿奇霉素冻干粉用生理盐水配成浓度为5、50、100 mg/ml溶液。赫氏棘阿米巴细胞悬液浓度为 2.0×10^4 /ml,24孔细胞培养板中每孔加入1 ml,每孔加入浓度为5、50、100 mg/ml的阿奇霉素各1 ml。阴性对照组

加入生理盐水1 ml,阳性对照组加入2 mg/ml的甲硝唑1 ml,在倒置显微镜下观察用药后4、8、24、48、72 h时赫氏棘阿米巴生长情况。观察10个低倍视野,取平均细胞数。

1.3 统计学处理 计量资料结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 17.0软件统计分析,采用重复测量设计的方差分析比较组间差异。检验水平(α)为0.05。

2 结果

2.1 阿奇霉素对赫氏棘阿米巴生长情况的影响 赫氏棘阿米巴滋养体贴壁生长,呈不规则形,大小差异大,可见有数个棘状伪足和胞质内的数个空泡(图1A)。随着培养时间的延长,生理盐水对照组滋养体细胞生长良好,细胞数明显增多(图1D)。5 mg/ml阿奇霉素作用8 h后细胞略变小,随着药物的浓度的提高和作用时间延长,细胞数减少。100 mg/ml阿奇霉素作用48 h时抑制作用明显,部分滋养体形成包囊,包囊有2层囊壁,外囊皱缩,内囊类圆形(图1B)或类五角形(图1C),胞质内无空泡;细胞数量与阳性对照组(甲硝唑组)相比明显减少(图1E、1F)。

2.2 阿奇霉素对赫氏棘阿米巴的生长抑制作用 由图2可见,5、50 mg/ml阿奇霉素对赫氏棘阿米巴的生长抑制作用与甲硝唑对照组比较差异无统计学意义;作用24 h后100 mg/ml阿奇霉素对赫氏棘阿米巴的生长抑制作用与甲硝唑对照组相比增强,差异有统计学意义($P < 0.05$),但100 mg/ml阿奇霉素作用72 h时仍有41.0%的细胞存活。

[收稿日期] 2012-04-23

[接受日期] 2012-10-29

[作者简介] 朴成钢, 硕士, 主治医师. E-mail: yjpcg0102@hotmail.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0433-2660071, E-mail: renguanxu2008@yahoo.cn

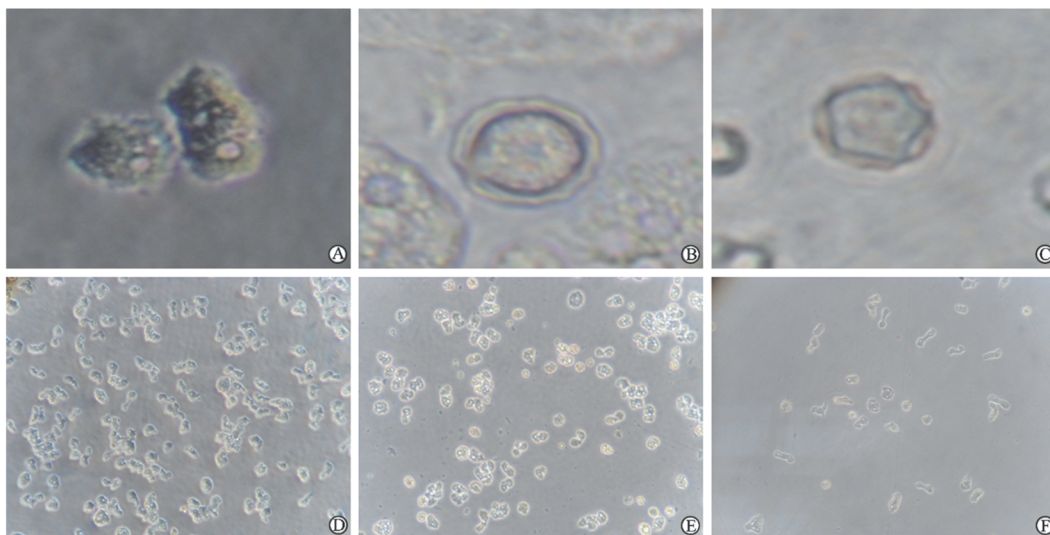


图 1 阿奇霉素体外对赫氏棘阿米巴的抑制作用

A: 赫氏棘阿米巴滋养体; B: 赫氏棘阿米巴包囊, 内囊类圆形; C: 赫氏棘阿米巴包囊, 内囊类五角形; D: 生理盐水对照组 48 h 的赫氏棘阿米巴; E: 甲硝唑对照组 48 h 的赫氏棘阿米巴; F: 阿奇霉素 100 mg/ml 组 48 h 的赫氏棘阿米巴. Original magnification: $\times 400$ (A, B, C); $\times 100$ (D, E, F)

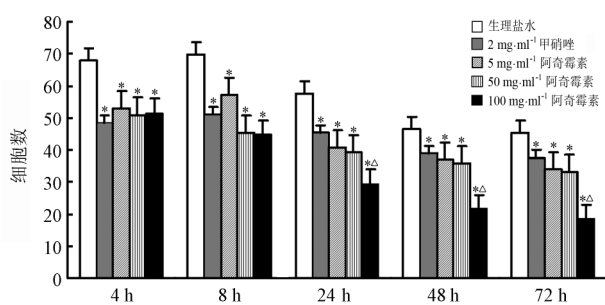


图 2 不同浓度阿奇霉素在体外对赫氏棘阿米巴生长的抑制作用

* $P < 0.05$ 与生理盐水组比较; $\Delta P < 0.05$ 与甲硝唑组比较; $n = 10$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

目前已报道的棘阿米巴有 26 种, 其中致病性棘阿米巴有 12 种, 赫氏棘阿米巴的致病性最强^[5]。赫氏棘阿米巴能以包囊的形式长期存活于病灶, 故治疗棘阿米巴感染非常困难。治疗棘阿米巴感染无特效药物, 目前多应用多种药物联合治疗^[6-8], 常用药物包括双胍类、芳香联胺类、抗真菌药物、抗生素类和类固醇激素类等。双胍类药物聚六甲基双胍 (polyhexamethyl biguanide, PHMB) 和氯己定经体外实验证明对棘阿米巴滋养体和包囊均有杀伤作用, 临床上对其他药物治疗无效的患者亦有效^[9-10]。PHMB 和氯己定对于棘阿米巴产生抑制作用的最小浓度范围分别是 25~100 $\mu\text{g/ml}$ 、1.56~100 $\mu\text{g/ml}$, 最小有效杀灭浓度分别为 50.0 $\mu\text{g/ml}$ 、25.0 $\mu\text{g/ml}$ ^[11]。联胺类药物丙烷脒和己脒啉对棘阿米巴滋养体和包囊均有效, 对包囊的最小杀伤浓度分别为 17~46 $\mu\text{g/ml}$ 和 41 $\mu\text{g/ml}$ ^[9]。联胺类药物临床上常与双胍类药物和咪唑类药物联合用药。van der Bijl 等^[12]报道, 高于 1% 浓

度的甲硝唑可以用于棘阿米巴性角膜炎的临床局部用药。甲硝唑为常用和首选的抗阿米巴类药物, 目前临床用药浓度为 2 mg/ml。本研究小组在预实验中研究甲硝唑体外对赫氏棘阿米巴的作用时, 发现其浓度低于 2 mg/ml 时抑制赫氏棘阿米巴的作用不理想。因此, 本实验以 2 mg/ml 的甲硝唑为阳性对照药物。

本研究中发现 5、10、100 mg/ml 阿奇霉素在体外对赫氏棘阿米巴均有一定的抑制作用; 5、50 mg/ml 阿奇霉素对棘阿米巴的生长抑制作用与甲硝唑对照组比较差异无统计学意义; 100 mg/ml 阿奇霉素对棘阿米巴的生长抑制作用与甲硝唑组相比增强, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 但 100 mg/ml 作用 72 h 时仍有 41.0% 的细胞存活。

赫氏棘阿米巴对外界和多种药物的抵抗力强, 本研究虽经体外实验证明阿奇霉素对棘阿米巴有抑制作用且其抑制作用强于常用药物甲硝唑, 但其作用效果仍不够理想。因此, 建议临床上用阿奇霉素治疗棘阿米巴感染时, 浓度和时间要充分, 并且应与其他抗阿米巴药物联合用药以提高疗效。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

【参考文献】

- [1] Panjwani N. Pathogenesis of acanthamoeba keratitis[J]. Ocul Surf, 2010, 8: 70-79.
- [2] Lackner P, Beer R, Broessner G, Helbok R, Pfausler B, Brenneis C, et al. Acute granulomatous acanthamoeba encephalitis in an immunocompetent patient[J]. Neurocrit Care, 2010, 12: 91-94.
- [3] Steinberg J P, Galindo R L, Kraus E S, Ghanem K G. Disseminated acanthamebiasis in a renal transplant recipient with osteo-

- myelitis and cutaneous lesions. case report and literature review [J]. Clin Infect Dis, 2002, 35: e43-e49.
- [4] 郑善子, 申成华, 王 铁, 玄英花, 崔春权, 崔万善. 棘阿米巴的分离及实验室培养[J]. 延边大学医学学报, 2003, 26: 164-166.
- [5] Narasimhan S, Madhavan H N, K L T. Development and application of an *in vitro* susceptibility test for Acanthamoeba species isolated from keratitis to polyhexamethylene biguanide and chlorhexidine[J]. Cornea, 2002, 21: 203-205.
- [6] Dart J K, Saw V P, Kilvington S. Acanthamoeba keratitis: diagnosis and treatment update 2009[J]. Am J Ophthalmol, 2009, 148: 487-499.
- [7] Maritschnegg P, Sovinz P, Lackner H, Benesch M, Nebl A, Schwinger W, et al. Granulomatous amebic encephalitis in a child with acute lymphoblastic leukemia successfully treated with multimodal antimicrobial therapy and hyperbaric oxygen [J]. J Clin Microbiol, 2011, 49: 446-448.
- [8] Sheng W H, Hung C C, Huang H H, Liang S Y, Cheng Y J, Ji D D, et al. First case of granulomatous amebic encephalitis caused by *Acanthamoeba castellanii* in Taiwan [J]. Am J Trop Med Hyg, 2009, 81: 277-279.
- [9] Elder M J, Kilvington S, Dart J K. A clinicopathologic study of *in vitro* sensitivity testing and Acanthamoeba keratitis [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1994, 35: 1059-1064.
- [10] Hay J, Kirkness C M, Seal D V, Wright P. Drug resistance and Acanthamoeba keratitis; the quest for alternative antiprotozoal chemotherapy [J]. Eye (Lond), 1994, 8(Pt 5): 555-563.
- [11] 朴 杰, 玄英花, 郑善子. 棘阿米巴分类与虫种鉴定方法的研究进展[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2011, 29: 229-232.
- [12] van der Bijl P, van Eyk A D, Seifart H I, Meyer D. *In vitro* transcorneal penetration of metronidazole and its potential use as adjunct therapy in Acanthamoeba keratitis [J]. Cornea, 2004, 23: 386-389.

[本文编辑] 孙 岩