

DOI: 10.3969/cjz.j.issn.1002-2694.2012.09.006

# 以棋盘法测定并评价汉防己甲素与酮康唑联合 对白念珠菌的体外抗真菌活性\*

宋廷君, 张宏, 李水秀, 张晓利, 郭慧, 吴锐

**摘要:**目的 探讨汉防己甲素对酮康唑抗白念珠菌有无增效活性。方法 参照美国临床和实验室标准协会(CLSI)推荐的M27-A3方案,采用棋盘式微量液基稀释法测定汉防己甲素和酮康唑联合对16株同一亲本来源的白念珠菌的体外抗真菌活性。以OD值测定法判读最低抑菌浓度,并以FICI法对联合用药结果进行评价。结果 汉防己甲素与酮康唑单独作用于上述16株白念珠菌的最低抑菌浓度分别为64-128  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和1-32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;两药联合时的最低抑菌浓度值分别降至2-16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和0.016-0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,且终点清晰,“拖尾现象”消失,FICI值为0.033-0.133,均表现为显著协同作用。结论 汉防己甲素在体外对酮康唑抗白念珠菌活性有明显的增效作用。

**关键词:**汉防己甲素;酮康唑;白念珠菌;增效作用;棋盘法

中图分类号:R379.4

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2012)09-0890-04

## *In vitro* interactions between tetrandrine and ketoconazole against *Candida albicans* determined by checkerboard method

SONG Yan-jun, ZHANG Hong, LI Shui-xiu, ZHANG Xiao-li, GUO Hui, WU Rui

(The First Affiliated Hospital, Institute of Mycology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**ABSTRACT:** The aim was to investigate the *in vitro* antifungal interactions between tetrandrine (TET) and ketoconazole (KCZ) against *Candida albicans*. According to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-A3 guidelines, the response was evaluated by the checkerboard microdilution method. The results of the interactions were determined by using the spectrophotometric method and the nature of the interactions was assessed by the fractional inhibitory concentration index (FICI) model. The MICs of TET and KCZ alone against 16 different *C. albicans* isolates were 64-128  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 1-32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively. While the MICs of TET and KCZ in combination were 2-16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 0.016-0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , with disappearance of the so-called “trailing” phenomenon. The FICI of the two drugs in combination ranged from 0.033 to 0.133. Strong synergism was observed against all the 16 isolates. Our findings suggest that TET showed potent synergism when combining with KCZ.

**KEY WORDS:** tetrandrine; ketoconazole; *Candida albicans*; synergistic effect; checkerboard microdilution method

Supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 30972660 & 81171542), the Natural Science Foundation of Guangdong Province, China (No. 10151008901000131), Guangzhou Key Technology R&D Program, China (No. 2010J-E011), and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. 21611509)

Corresponding author: Zhang Hong, Email: tzhangh@jnu.edu.cn

近年来,念珠菌感染的发病率和病死率逐年增加,其中以白念珠菌最为常见。唑类药物因其不良反应少、口服生物利用度高、抗菌谱广等优点,被认

为是治疗念珠菌感染的一线药物。但随着唑类药物长期、广泛应用,耐药菌株有明显增多的趋势,已经成为困扰临床的一个重要问题<sup>[1]</sup>。

我们发现,天然药用植物粉防己根的双苄基异喹啉类化合物汉防己甲素(tetrandrine, TET)对氟康唑抗白念珠菌、联苯苄唑或益康唑抗毛癣菌属活性有增效作用,其增效机制与抑制药物外排泵相关基因的表达有关<sup>[2-5]</sup>。

\* 国家自然科学基金(30972660 / 81171542); 广东省自然科学基金(10151008901000131); 广州市科技支撑项目(2010J-E011); 中央高校基本科研业务费专项资金(21611509)

通讯作者: 张宏, Email: tzhangh@jnu.edu.cn

作者单位: 暨南大学附属第一医院、暨南大学真菌病研究所, 广州 510632

为进一步研究 TET 对其他唑类抗真菌药物是否具有增效作用,本实验选择咪唑类抗真菌药物——酮康唑(ketoconazole, KCZ)为对象,采用棋盘式微量液基稀释法(简称棋盘法),测定 TET 与 KCZ 联合对 16 株临床分离的同一亲本来源白念珠菌的体外抗真菌活性,以 OD 值测定法判读结果,并以分数抑菌浓度指数(fractional inhibitory concentration index, FICI)法对联合用药结果进行评价。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 菌株 白念珠菌 CA-1~CA-17(不含 CA-10;美国西雅图生物医学中心 White 教授惠赠),其中 CA-1~CA-9,CA-11 和 CA-12 对氟康唑敏感( $MIC \leq 8.0 \mu\text{g/mL}$ ),CA-13~CA-15 对氟康唑剂量依赖性敏感( $16 \mu\text{g/mL} \leq MIC \leq 32 \mu\text{g/mL}$ ),CA-16 和 CA-17 对氟康唑耐药( $MIC \geq 64.0 \mu\text{g/mL}$ )<sup>[5]</sup>。该系列菌株来自于同一 HIV 感染者,并已证实其来源于同一亲本<sup>[6]</sup>。质控菌株为美国临床和实验室标准协会(CLSI)推荐的克柔念珠菌 ATCC 6258 和近平滑念珠菌 ATCC 22019。

1.1.2 试剂、培养基、主要仪器 KCZ(西安杨森制药有限公司,纯度 $>98.5\%$ ),TET(陕西慧科植物有限公司,批号 20041226,纯度 $98\%$ ),二甲基亚砜(DMSO,美国 Sigma 公司)。

沙堡弱葡萄糖琼脂培养基(SDA,广东环凯微生物科技有限公司),RPMI-1640 液体培养基(美国 Gibco 公司,pH 7.0)。

酶标仪(680 型,美国 BIO-RAD 公司),96 孔板(美国 Costar 公司)。

### 1.2 方 法

1.2.1 菌悬液配制 将受试菌株于 SDA 中 $35\text{ }^\circ\text{C}$ 转种 2 次,挑取单个较大菌落用 $0.9\%$ 生理盐水配制菌悬液,以中国细菌标准浊度管比浊。以 RPMI-1640 液体培养基稀释,用细胞计数板调整菌液浓度,使 96 孔板内菌液工作浓度为 $(0.5 \sim 2.5) \times 10^3$  CFU/mL<sup>[7]</sup>。

1.2.2 药液配制 KCZ 用 DMSO 溶解,配制成 $5120 \mu\text{g/mL}$ 的储备液;TET 用灭菌双蒸水和 $0.1 \text{ mol/L}$  HCl 溶解,配制成浓度为 $5120 \mu\text{g/mL}$ 的储备液(其中, $0.1 \text{ mol/L}$  HCl 的终浓度 $<0.005 \text{ mol/L}$ ,预实验证实它对白念珠菌无毒性)<sup>[2]</sup>。两种药物储备液分别过滤分装后, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

1.2.3 测定 TET、KCZ 单独对白念珠菌的 MIC 根据 CLSI M27-A3 酵母菌液基微量稀释法<sup>[8]</sup>进行

测定。用 RPMI-1640 液体培养基将药物储备液稀释至 2 倍工作浓度。取其 $100 \mu\text{L}$ 倍比稀释后依次加入 96 孔板的第 2~11 列;第 1 列为生长对照,不加药液,而以 $100 \mu\text{L}$  RPMI-1640 液体培养基代替;第 12 列为空白对照,加入 $200 \mu\text{L}$  RPMI-1640 液体培养基。除第 12 列外,其余各孔再分别加入 $100 \mu\text{L}$ 菌悬液至工作浓度。上述体系中 DMSO 含量均不高于 $1\%$ ,对菌体生长的影响忽略不计。将制备好的 96 孔板置 $35\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中培养 48 h,用酶标仪测定 $OD_{490}$ 值,从而确定 MIC 值。

OD 值测定法:用酶标仪在波长 $490 \text{ nm}$ 处读取 96 孔板中各孔的 OD 值。以如下公式计算:真菌生长百分数=(各孔 OD 值-空白对照孔 OD 值)/(生长对照孔 OD 值-空白对照孔 OD 值) $\times 100\%$ <sup>[9-10]</sup>。真菌生长抑制百分数=1-真菌生长百分数。

取与生长对照相比较抑制 $80\%$ 以上真菌生长的最低药物浓度为 MIC 值。实验重复进行 3 次。

1.2.4 TET 与 KCZ 联合抗白念珠菌活性测定 参照 CLSI M27-A3 方案<sup>[8]</sup>,以棋盘法测定 TET 与 KCZ 联合对上述 16 株白念珠菌的体外抗真菌活性。

通过上述实验确定 TET 与 KCZ 的适当浓度范围。以 RPMI-1640 液体培养基分别将两种药物储备液稀释至 4 倍工作浓度(终浓度范围分别是:TET $1 \sim 64 \mu\text{g/mL}$ ,KCZ $0.008 \sim 8 \mu\text{g/mL}$ )。按照浓度从低到高的顺序,取倍比稀释的 KCZ 药液 $50 \mu\text{L}$ 分别加入 96 孔板的第 2~12 列;按照浓度从高到低的顺序,取倍比稀释的 TET 药液 $50 \mu\text{L}$ ,分别加入 96 孔板的第 A~G 行。除 A12 孔之外,其余各孔再分别加入菌悬液 $100 \mu\text{L}$ 。不足 $200 \mu\text{L}$ 液体的孔用 RPMI-1640 液体培养基补足。其中,H1 孔为不含药液的生长对照,A12 孔为不含菌液的空白对照<sup>[1,7,9]</sup>。将制备好的 96 孔板置于 $35\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中培养 48 h,以 OD 值测定法判读结果。实验重复进行 3 次。

1.2.5 两种药物联合作用效果的评价方法 在评价药物体外联合作用的结果和强度时,有多种不同的理论模型。在众多的数据处理方法中,Loewe additivity(LA)理论是应用最为普遍的一种数据处理模型<sup>[1,7,9-10]</sup>,该理论的基础是某种药物不可能和它本身发生作用。基于这一理论的模型是将药物单用和联用时产生相同药效的浓度进行比较。

本实验采用的 FICI 法就是以 LA 理论为基础的非参数模型。其公式为 $\sum FIC = FIC_A + FIC_B = MIC_{AB}/MIC_A + MIC_{BA}/MIC_B$ ,式中的 $MIC_A$ 和

MIC<sub>B</sub>分别表示药物 A 和 B 单用时的 MIC 值, MIC<sub>AB</sub>和 MIC<sub>BA</sub>分别表示两种药物联用时各自的 MIC 值。对于同一 96 孔板,通过计算所得的一组  $\Sigma$ FIC 值,当  $\Sigma$ FIC<sub>max</sub> > 4 时,则 FICI 定义为  $\Sigma$ FIC<sub>max</sub>;否则, FICI 定义为  $\Sigma$ FIC<sub>min</sub><sup>[1,7,9-10]</sup>。结果的判断依据是: FICI ≤ 0.5 为协同作用, FICI > 4 为拮抗作用, 0.5 < FICI ≤ 4 为无关作用<sup>[11]</sup>。

## 2 结果

**2.1 质控标准** 本实验测得质控菌株克柔念珠菌 ATCC 6258 和近平滑念珠菌 ATCC 22019 对 KCZ 的 MIC 值分别为 0.25~0.5 μg/mL 和 0.125~0.5 μg/mL,均在规定的参考范围内,且生长对照孔生长良好,说明本实验操作与结果符合 CLSI 要求。

**2.2 TET 与 KCZ 单独或联合用药的 MIC** TET 与 KCZ 单独或联合作用于实验所用 16 株白念珠菌的 MIC 值见表 1。

以 KCZ 的 MIC ≤ 0.125 μg/mL 为敏感(S), ≥ 1 μg/mL 为耐药(R), 0.25~0.5 μg/mL 为剂量依赖性敏感(SDD)的判断标准<sup>[12]</sup>,实验所用 16 株白念珠菌均为 KCZ 耐药株, MIC 值为 1~32 μg/mL。

TET 对这 16 株白念珠菌的作用极弱, MIC 值为 64~128 μg/mL,且无菌株差异性。

TET 与 KCZ 联用时,两药 MIC 值均明显降低,分别为 2~16 μg/mL 和 0.016~0.5 μg/mL,且终点清晰,“拖尾现象”消失,说明 TET 可明显增强 KCZ 的敏感性。

**2.3 实验结果的评价** 用 FICI 法评价实验结果,如表 2 所示,16 株白念珠菌的 FICI 值为 0.033~0.133(均小于 0.5),说明 TET 与 KCZ 联合使用时表现为协同作用。

## 3 讨论

KCZ 是治疗白念珠菌病的常用药物,但随着其广泛、长期应用,白念珠菌耐药现象日趋严重,给临床治疗带来严峻的挑战。除了积极探索和开发新型抗真菌药物以外,联合用药不失为有效捷径。抗真菌治疗的联合用药可采用两种以上结构不同的抗真菌药物,或选用本身无抗真菌活性的药物作为抗真菌药物增效剂,以增加真菌的敏感性。

我们前期研究已经证实, TET 在体内、外可增强氟康唑等的抗白念珠菌活性,其增效机制与抑制外排泵基因 *MDR1*、*FLU1*、*CDR1*、*CDR2* 的表达有关<sup>[3]</sup>。为了探讨 TET 在体外对 KCZ 是否有增效作用,本实验使用棋盘法和 FICI 法测定并评价了 TET

**表 1 TET 与 KCZ 单独或联合作用于 16 株白念珠菌的 MIC(范围)**

**Tab. 1 The MICs of TET and KCZ alone and in combination against 16 clinical isolates of *C. albicans***

菌株 Strain	单独用药 Alone		联合用药 In combination		
	KCZ	TET	KCZ	TET	
CA-1	4(2-4)	R	128	0.125(0.125-0.25)	2
CA-2	2(2-4)	R	128	0.031(0.031-0.063)	8
CA-3	2(1-2)	R	128	0.031(0.031-0.063)	8
CA-4	2(2-4)	R	64	0.063(0.031-0.063)	4
CA-5	1(1-2)	R	64	0.031(0.031-0.063)	4
CA-6	2(2)	R	128	0.125(0.125-0.25)	4
CA-7	8(8-16)	R	128	0.031(0.016-0.031)	8
CA-8	8(4-8)	R	128	0.031(0.016-0.031)	4
CA-9	2(2-4)	R	128	0.016(0.016-0.031)	16
CA-11	4(4-8)	R	128	0.016(0.016-0.031)	8
CA-12	2(1-2)	R	128	0.125(0.125-0.25)	4
CA-13	2(2-4)	R	128	0.063(0.063-0.125)	2
CA-14	16(8-16)	R	128	0.25(0.25-0.5)	8
CA-15	16(16-32)	R	64	0.5(0.25-0.5)	4
CA-16	8(8-16)	R	128	0.016(0.016-0.031)	16
CA-17	32(16-32)	R	128	0.063(0.063-0.125)	4

注: R: 耐药; TET: 汉防己甲素; KCZ: 酮康唑; MIC: 最低抑菌浓度。

Note: R: resistant; TET: tetrandrine; KCZ: ketoconazole; MIC: minimum inhibitory concentration.

与 KCZ 在体外联合应用时的抗真菌活性。

本实验采用的棋盘法和 FICI 法是目前国际上测定并评价药物体外联合作用效果时使用最广泛、最能被公认的方法<sup>[1-7]</sup>,操作简便,重复性好,结果明确,已被应用于抗真菌药物体外联合作用的测定评价。

目前液基稀释法中 MIC 值的判读多用视觉法,但其受主观因素影响较大且不能定量地记录结果,使实验结果缺乏准确性和客观性。本实验以酶标仪测定 OD 值的方法对结果进行判读,通过透光率来反映真菌的生长情况,具有客观、定量、迅速、简便及重复性好等优点<sup>[9]</sup>。

TET 来源于天然药用植物,作用温和、来源广泛、价格低廉,已用于抗高血压、抗纤维化等治疗领域。本实验发现, TET 在体外单独使用时抗真菌活性极弱;当其 与 KCZ 联用时, KCZ 对 16 株白念珠菌的 MIC 可降低 4~9 个稀释度;且 TET 自身 MIC 也降低。以 LA 理论评价结果, FICI 值均小于 0.5,说明二者具有协同作用。 TET 与 KCZ 体外联用可以显著增强 KCZ 的抗白念珠菌活性,明显逆转耐药

表 2 FICI 法评价 TET 与 KCZ 体外联合抗白念珠菌活性

Tab. 2 *In vitro* interactions between TET and KCZ against *C. albicans* as determined by nonparametric methods FICI

菌株	FICI 值	评价结果
Strain	FICI	INT
CA-1	0.047	SYN
CA-2	0.078	SYN
CA-3	0.078	SYN
CA-4	0.094	SYN
CA-5	0.094	SYN
CA-6	0.094	SYN
CA-7	0.066	SYN
CA-8	0.035	SYN
CA-9	0.133	SYN
CA-11	0.067	SYN
CA-12	0.094	SYN
CA-13	0.047	SYN
CA-14	0.078	SYN
CA-15	0.094	SYN
CA-16	0.127	SYN
CA-17	0.033	SYN

注:SYN:协同作用;FICI:分数抑菌浓度指数。

Note:SYN: synergism; FICI: fractional inhibitory concentration index.

株的耐药性,这为我们进一步研究 TET 对唑类药物的增效活性及其机制打下基础。

### 参考文献:

- [1] Sun S, Li Y, Guo Q, et al. *In vitro* interactions between tacrolimus and azoles against *Candida albicans* determined by different methods[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52(2): 409-417. DOI: 10.1128/AAC.01070-07
- [2] Li F, Zhang H. *In vitro* study of the synergistic effect of tetrandrine and fluconazole against *Candida albicans*[J]. Chin J Dermatol, 2006, 39(8): 454-456. DOI:10.3760/j.issn:0412-0430.2006.08.008 (in Chinese)
- [3] Zhang D, Zhang H, Li H, et al. An *in vivo* study on tetrandrine as a synergist to econazole against *Trichophyton mentagrophytes* [J]. Chin J Zoonoses, 2010, 26(3): 222-225. (in Chinese)
- [4] Liu C, Zhang H, Xiang S, et al. Experiment on tetrandrine as a synergist to bifonazole against *Trichophyton mentagrophytes in vivo*[J]. Chin J Derm Venereol, 2010, 24(3): 207-210. (in Chinese)
- [5] 刘朝红, 张宏, 向守宝, 等. 汉防己甲素对联苯苄唑抗须癣毛癣菌活性增效作用的体内实验研究[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2010, 24(3): 207-210.
- [5] Zhang H, Gao A, Li F, et al. Mechanism of action of tetrandrine, a natural inhibitor of *Candida albicans* drug efflux pumps [J]. Yakugaku Zasshi, 2009, 129(5): 623-630. DOI: 10.1248/yakushi.129.623
- [6] White TC, Pfaller MA, Rinaldi MG, et al. Stable azole drug resistance associated with a substrain of *Candida albicans* from an HIV-infected patient [J]. Oral Dis, 1997, 3 (Suppl 1): S102-109.
- [7] Li Y, Sun S, Guo Q, et al. *In vitro* interaction between azoles and cyclosporin A against clinical isolates of *Candida albicans* determined by the checkerboard method and time kill curves[J]. J Antimicrob Chemother, 2008, 61: 577-585. DOI: 10.1093/jac/dkm493
- [8] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: Approved standard-Third edition [S]. CLSI document M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne PA, 2008.
- [9] Sun L, Sun S, Cheng A, et al. *In vitro* activities of Retigeric Acid B alone and in combination with azole antifungal agents against *Candida albicans* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(4): 1586-1591. DOI: 10.1128/AAC.00940-08
- [10] Chaturvedi V, Ramani R, Andes D, et al. Multilaboratory testing of two-drug combinations of antifungals against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida parapsilosis* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(4): 1543-1548. DOI: 10.1128/AAC.01510-09
- [11] Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them[J]. J Antimicrob Chemother, 2003, 52: 1. DOI: 10.1093/jac/dkg301
- [12] Milan EP, Burattini MN, Kallas EG, et al. Azole resistance among oral *Candida* species isolates from AIDS patients under ketoconazole exposure[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 1998, 32: 211-216. DOI: 10.1016/S0732-8893(98)00107-2.

收稿日期:2012-05-10;修回日期:2012-05-27