

以棋盘法测定汉防己甲素与伊曲康唑的体外联合抗烟曲霉作用

吴 锐¹,刁文琦¹,宋延君¹,李水秀¹,吕霞琳¹,王露霞²,刘维达³,张 宏¹

摘要:目的 探讨汉防己甲素在体外对伊曲康唑抗烟曲霉活性是否有增效作用。**方法** 参照美国临床和实验室标准协会(CLSI)推荐的M38-A2方案,采用棋盘式微量液基稀释法,以21株烟曲霉临床株为研究对象,测定汉防己甲素联合伊曲康唑对其的抗真菌活性,以OD值测定法判读最低抑菌浓度,并以FICI法评价结果,同时以其中的AF46株为代表,用等效线图解法验证结果。**结果** 汉防己甲素与伊曲康唑单独作用于上述烟曲霉临床株的最低抑菌浓度值分别为256~512 μg/mL、0.125~32 μg/mL,联合用药时的最低抑菌浓度值分别降至8~64 μg/mL、0.03~2 μg/mL,且终点清晰,“拖尾现象”消失,FICI值为0.08~0.38,均表现为显著协同作用。AF46株的等效曲线呈凹形,也表明具有协同作用。**结论** 汉防己甲素在体外对伊曲康唑抗烟曲霉活性有显著增效作用。

关键词:汉防己甲素;伊曲康唑;烟曲霉;增效作用;棋盘法

中图分类号:R379 文献标识码:A 文章编号:1002-2694(2013)08-0748-05

In vitro interactions between tetrandrine and itraconazole against *Aspergillus fumigatus* determined by the checkerboard method

WU Rui¹, DIAO Wen-qi¹, SONG Yan-jun¹, LI Shui-xiu¹,
LV Xia-lin¹, WANG Lu-xia², LIU Wei-da³, ZHANG Hong¹

(1. The First Affiliated Hospital / Institute of Mycology, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2. Department of Clinical Laboratory, Guangzhou General Hospital of Guangzhou

Military Command, Guangzhou 510010, China;

3. Institute of Dermatology, Chinese Academy of Medical Science, Nanjing 210042, China)

ABSTRACT: The purpose of this paper is to detect the *in vitro* antifungal interactions between tetrandrine (TET) and itraconazole (ITC) against *Aspergillus fumigatus*. According to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M38-A2 guidelines, we used 21 clinical isolates of *Aspergillus fumigatus* to evaluate the response through the checkerboard microdilution method. We employed the spectrophotometric method to determine the results of the interactions, and the nature of interactions was assessed by the fractional inhibitory concentration index (FICI) model. The result was also verified by isobogram with AF46 as sample. The MICs of TET and ITC alone were 256~512 μg/mL and 0.125~32 μg/mL, respectively. While the MICs of TET and ITC in combination were 8~64 μg/mL and 0.03~2 μg/mL, with the disappearance of the so-called “trailing” phenomenon. The FICI of the drugs in combination ranged from 0.08~0.38, revealing strong synergism between TET and ITC. Synergism was also demonstrated that the corresponding isobole of AF46 was concave. Our findings suggest that when combined with ITC, TET show potent synergism in antifungal activity.

KEY WORDS: tetrandrine; itraconazole; *Aspergillus fumigatus*; synergistic effect; checkerboard microdilution method

Supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 81171542), the Science and Technology

国家自然科学基金(No. 81171542),广东省科技计划项目(No. 2009B030801015),广州市科技支撑项目(No. 2010J-E011)和中央高校基本科研业务费专项资金(No. 21611509)联合资助

通讯作者:张宏,Email: tzhangh@jnu.edu.cn.

作者单位:1.暨南大学附属第一医院、暨南大学真菌病研究所,广州 510632;

2.广州军区广州总医院检验科,广州 510010;

3.中国医学科学院皮肤病研究所,南京 210042

Planning Project of Guangdong Province, China (No. 2009B030801015), the 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,深部曲霉感染率逐年增加,病死率高^[3],主要由烟曲霉引起。伊曲康唑(itraconazole, ITC)曾是治疗烟曲霉感染的首选药物,但随着其临床上的广泛应用,烟曲霉耐药率逐年增高,已严重困扰了临床治疗。尽管新型抗真菌药物的出现使人类对曲霉病的治疗水平不断提高,但新的治疗方案的提出仍是迫切需要解决的问题。

有研究表明,抗真菌药物的联合应用在治疗一些难治性曲霉病时表现为协同作用^[2]。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)对酮康唑或氟康唑抗白念珠菌、联苯苄唑或益康唑抗毛癣菌属活性有增效作用,抑制药物外排泵相关基因的表达为主要机制^[3-7]。

为研究 TET 对唑类药物抗烟曲霉活性是否也具有增效作用,本实验采用棋盘式微量液基稀释法(简称棋盘法)测定 TET 与 ITC 联合作用于 21 株烟曲霉临床株的体外抗真菌活性,以 OD 值测定法判读最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC),并以分数抑菌浓度指数(fractional inhibitory concentration index, FICI)法及其等效线图解法对药物联合作用效果进行评价,为临床以 TET 作为 ITC 增效剂治疗烟曲霉病提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 21 株烟曲霉临床株(AF5、AF7、AF8、AF9、AF10、AF13、AF18、AF19、AF20、AF21、AF23、AF24、AF26、AF27、AF30、AF31、AF38、AF46、0193、CBS、CMCC 株,前 18 株由广州军区广州总医院检验科王露霞副主任技师惠赠,后 3 株由中国医学科学院皮肤病研究所刘维达教授惠赠),质控菌株选用美国临床和实验室标准协会(CLSI)推荐的近平滑念珠菌 ATCC 22019 株。

1.1.2 培养基 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA, 广东环凯生物科技有限公司), RPMI-1640 培养基(美国 Gibco 公司, pH 7.0)。

1.1.3 主要试剂 ITC(梯希爱化成工业发展有限公司,批号 I0732, 纯度>98%), 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)。

1.1.4 主要仪器 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 菌株的活化与菌悬液的配制 将 21 株烟曲

霉临床株分别于 PDA 中 30 ℃ 活化 5~7 d, 滤除菌丝后用 RPMI-1640 稀释, 经血细胞计数板计数调整菌液浓度, 使终浓度为 $(0.4\sim5.0)\times10^4$ CFU/mL。

1.2.2 药液配制 用 DMSO 将 ITC 溶解成 5~120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的药物储备液; 用灭菌双蒸水和 0.1 mol/L HCl 将 TET 溶解成 10~240 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的药物储备液(其中, 0.1 mol/L HCl 的终浓度<0.005 mol/L, 预实验证实它对烟曲霉无毒性)。各储备液分装后-20 ℃ 贮存备用。

1.2.3 测定 TET 及 ITC 单独作用于烟曲霉的 MIC 参照 CLSI M38-A2 方案^[8], 将药物储备液用 RPMI-1640 稀释为 2 倍工作浓度。取其 100 μL 经倍比稀释后依次加入 96 孔板的第 2~11 列; 除第 12 列外, 其余各孔均加入 100 μL 菌悬液, 不足 200 μL 液体的孔用 RPMI-1640 补足。此时第 1 列为生长对照, 第 12 列为空白对照。上述体系中 DMSO 含量均不超过 1%, 可忽略其对菌体生长的影响。将制备好的 96 孔板 37 ℃ 恒温培养 48 h, 以 OD 值测定法判读结果, 进而确定 MIC 值。

OD 值测定法: 用酶标仪读取各孔在波长 405 nm 处的 OD 值。各孔真菌生长百分数用以下公式计算: 真菌生长百分数 = (各孔中的 OD 值 - 空白对照孔中的 OD 值) / (生长对照孔中的 OD 值 - 空白对照孔中的 OD 值) $\times 100\%$ 。真菌生长抑制百分数的计算方法为: 真菌生长抑制百分数 = 1 - 真菌生长百分数。

取真菌生长抑制百分数在 90% 以上的最低药物浓度为 MIC 值^[9]。实验重复 3 次。

1.2.4 测定 TET 联合 ITC 的抗烟曲霉活性 参照 M38-A2 方案^[8], 将药物储备液用 RPMI-1640 稀释为 4 倍工作浓度(工作浓度范围分别为: ITC 0.015~16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, TET 8~512 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。按照如下方法进行操作: 由低浓度到高浓度的顺序, 取 50 μL 倍比稀释的 ITC 药液, 依次加入 96 孔板的第 2~12 列; 由高浓度到低浓度的顺序, 取 50 μL 倍比稀释的 TET 药液, 依次加入 96 孔板的第 A~G 行。除 A12 孔之外, 向其他各孔加入 100 μL 菌悬液, 并加 RPMI-1640 于少于 200 μL 液体的孔。其中, H1 孔为生长对照孔, A12 孔为空白对照孔。37 ℃ 恒温培养 48 h, 以 OD 值测定法判读结果。实验重复 3 次。

1.2.5 药物联合作用效果的评价: 本实验采用 FICI 法对结果进行评价。该法是以 Loewe additivity (LA) 理论为基础发展出的非参数法模型。其公式为

$\Sigma FIC = FIC_A + FIC_B = C_{A\text{comb}}/\text{MIC}_{A\text{alone}} + C_{B\text{comb}}/\text{MIC}_{B\text{alone}}$, 式中的 $\text{MIC}_{A\text{alone}}$ 和 $\text{MIC}_{B\text{alone}}$ 分别为药物 A 和 B 单用时的最低抑菌浓度, $C_{A\text{comb}}$ 和 $C_{B\text{comb}}$ 为两种药物联用时达到与单独用药相同药效时各自的浓度。对于同一块 96 孔板, 计算数据获得一系列 ΣFIC 值, 当 ΣFIC_{\max} (最大 ΣFIC 值) 小于 4 时, $FICI$ 定义为 ΣFIC_{\min} (最小 ΣFIC 值); 否则 $FICI$ 将定义为 ΣFIC_{\max} 。结果的判断依据采用 Odds 所建议的 $FICI \leq 0.5$ 定义为协同作用, $FICI > 4$ 为拮抗作用, $0.5 < FICI \leq 4$ 为无关作用^[10]。

等效线图解法:以 AF46 株为代表,用等效线图解法绘制其 MIC,若联合用药时两药的 MIC 值降至单独用药时的 1/4 即认为两药有协同作用,此时 $\Sigma FIC \leq 0.5$ 。由等效曲线的形状可以判断协同(凹形)、拮抗(凸形)、无关(直线)^[11]。

2 结 果

2.1 质控标准 每次实验所测得的质控菌株 ATCC 22019 株对 ITC 的 MIC 值为 0.125~0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 均在规定范围内,且生长对照孔生长良好,符合 CLSI 要求。

2.2 TET 与 ITC 单独及联合作用于 21 株烟曲霉的 MIC 值见表 1。根据 ECVs 标准^[12],以 ITC 的 $\text{MIC} \leq 1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 为敏感, $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 为剂量依赖性敏感, $>2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 为耐药。实验所用的 21 株烟曲霉对 ITC 的敏感性如下:AF5、AF8、AF19、AF20、AF26、AF27、AF30、AF46、0193 为 ITC 敏感株, AF10、AF13、AF18、AF21、AF23、AF24、AF38、CBS、CMCC 为 ITC 耐药株, AF7、AF9、AF31 为 ITC 剂量依赖性敏感株。

TET 对 21 株烟曲霉的 MIC 值为 256~512 $\mu\text{g}/\text{mL}$, TET 浓度低于 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时无抑菌作用,且无菌株差异性。

TET 与 ITC 联合作用时, TET 的 MIC 值由 256~512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 降至 8~64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ITC 的 MIC 值由 0.125~32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 降至 0.03~2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 并且终点清晰,“拖尾现象”消失。说明 TET 在体外对 ITC 抗烟曲霉活性有显著增效作用。

2.3 实验结果的评价 用 FICI 法评价的实验结果见表 2。TET 与 ITC 联合作用时, FICI 值为 0.08~0.38, 均小于 0.5, 表明 TET 与 ITC 体外联合表现为协同作用。

图 1 所示为 TET 与 ITC 联合作用于 AF46 株时各孔的真菌生长百分数,计算粗体区域得到一系列 ΣFIC 值,其中 ΣFIC_{\max} 为 0.53<4, 则 FICI 值为

$\Sigma FIC_{\min} = 0.19$ 。其相应的等效曲线如图 2 所示,曲线呈凹形表明 TET 与 ITC 具有协同作用。

表 1 TET 与 ITC 单独及联合作用于 21 株烟曲霉的 MIC 值 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

Strain	Alone		In combination	
	ITC	TET	ITC	TET
AF5	1	512	0.25	32
AF7	1	512	0.25	16
AF8	1	512	0.25	8
AF9	2	512	0.5	8
AF10	4	512	0.5	64
AF13	4	512	1	32
AF18	4	512	1	16
AF19	1	512	0.125	16
AF20	1	512	0.125	64
AF21	4	512	0.25	64
AF23	32	512	2	16
AF24	8	512	2	16
AF26	0.5	512	0.0625	64
AF27	0.125	512	0.03	32
AF30	0.5	256	0.125	16
AF31	2	512	0.25	64
AF38	4	512	0.5	32
AF46	1	512	0.0625	64
0193	0.25	512	0.0625	64
CBS	4	512	1	32
CMCC	4	512	0.5	32

Note: ITC-itraconazole; TET-tetrandrine; MIC-minimal inhibitory concentration.

3 讨 论

ITC 是一种新型、高效、广谱三唑类抗真菌药物,是治疗烟曲霉感染的首选药物,具有疗程短、疗效高、不良反应少等优点。然而,随着其临床上的广泛应用,烟曲霉对 ITC 的耐药率逐年增高,给曲霉病的临床治疗带来严峻的挑战。已有研究表明其耐药机制与 *Cyp51A* 基因的突变、过度表达^[13]以及外排泵作用^[14]有关。

TET 来源于天然药用植物,具有作用温和、不良反应少、来源广、价格低廉等特点,对高血压、心律失常等疾病有明确的疗效。我们前期的研究证实, TET 对氟康唑或酮康唑抗白念珠菌、联苯苄唑或益康唑抗毛癣菌属活性具有增效作用,其机制与抑制药物外排泵基因 *MDR1*、*FLU1*、*CDR1*、*CDR2* 的表达有关^[7]。为探讨 TET 在体外对 ITC 抗烟曲霉活

TET ($\mu\text{g/mL}$)	% Growth at ITC ($\mu\text{g/mL}$)											
	0	0.015	0.03	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16
512	9.1	6.3	5.1	4.1	3.1	3.3	3.1	1	1.3	2.1	1.2	0
256	17.2	8	6.3	3.2	3.2	3.2	3	2.9	1.4	2.7	1.2	2.1
128	32.4	28.1	9.8	4.5	4.3	4.2	3.3	2.6	2.1	1.9	1.1	1.1
64	45.3	26.2	19.2	<u>8.6</u>	7.2	4.6	4.4	3.5	2.5	1.3	2.3	2.2
32	61.2	57.8	40.4	22.4	12.7	4.4	6.2	2.3	2.1	2.1	1.5	1.6
16	70.7	73	51.6	31.3	21	13.6	6.6	3.1	3.1	2.2	1.4	2.1
8	93.5	83.5	68.1	56.2	38.8	22.2	8.1	5.2	2.2	3.3	2.2	2.1
0	100	101.9	79.7	70.5	62.6	40.1	19.2	8.3	3.4	4	2.1	2.2

图 1 TET 与 ITC 联合作用于 AF46 株的生长百分数

Fig. 1 Percentages of growth for the combinations of TET and ITC against AF46

ITC-itraconazole; TET-tetrandrine; Grey area-more than 10% growth; Bold area-the isoeffective combinations; Underlined area-the combination with the lowest FICI.

表 2 FICI 法评价 TET 与 ITC 体外联合抗 21 株烟曲霉活性

Tab. 2 In vitro interactions between TET and ITC against 21 isolates of *Aspergillus fumigatus* as determined by nonparametric methods FICI

Strain	FICI	INT
AF5	0.31	SYN
AF7	0.28	SYN
AF8	0.27	SYN
AF9	0.27	SYN
AF10	0.25	SYN
AF13	0.31	SYN
AF18	0.28	SYN
AF19	0.16	SYN
AF20	0.25	SYN
AF21	0.19	SYN
AF23	0.08	SYN
AF24	0.31	SYN
AF26	0.25	SYN
AF27	0.31	SYN
AF30	0.31	SYN
AF31	0.25	SYN
AF38	0.19	SYN
AF46	0.19	SYN
0193	0.38	SYN
CBS	0.31	SYN
CMCC	0.19	SYN

Note: FICI-fractional inhibitory concentration index;
INT-interactions; SYN-synergism.

性是否具有增效作用,本实验采用棋盘法、FICI 法及其等效线图解法对结果进行了测定和评价。

在 TET 与 ITC 联合作用的实验中,联合用药时 ITC 的 MIC 值较单独应用时降低了 2~4 个梯度,TET 的 MIC 值降低了 3~6 个梯度。以 LA 理论评价结果,FICI 值为 0.08~0.38,均小于 0.5,说

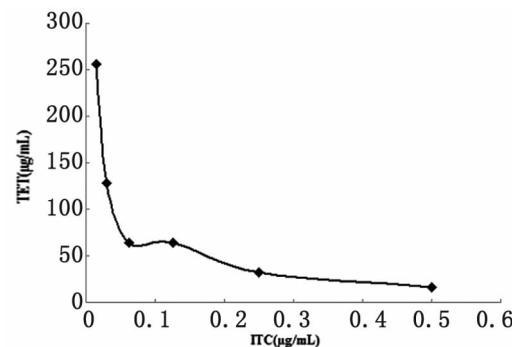


图 2 TET 与 ITC 联合作用于 AF46 株的等效曲线

Fig. 2 The isobole of the combinations of TET and ITC against AF46

明 TET 与 ITC 体外联合抗烟曲霉表现为显著协同作用。同时本实验选用 AF46 株为代表,该协同作用也在其凹形等效曲线上得到了验证。以上均表明 TET 在体外可以显著增强 ITC 的抗烟曲霉活性,逆转耐药菌株的耐药性。这不仅为临床以 TET 作为 ITC 增效剂治疗烟曲霉病提供了科学依据,也为我们将进一步研究 TET 对唑类药物的增效活性及其机制打下了基础。

本实验采用的棋盘法、FICI 法及其等效线图解法是目前国际上测定并评价药物体外联合作用效果时广泛使用的方法,具有操作简便、可行性好、重复性佳等优点。判定结果采用 OD 值测定法,较视觉法更加客观、迅速、简便。

联合用药可以降低药物剂量、减低毒副作用、缩短疗程、增强杀菌效果、防止菌株耐药发生。本实验表明 TET 与 ITC 在体外具有协同抗烟曲霉作用,这为烟曲霉病的临床治疗提供了联合用药的新思路。

参考文献:

- [1] Appel E, Vallon-Eberhard A, Rabinkov A, et al. Therapy of murine pulmonary aspergillosis with antibody-alliinase conju-

- gates and alliin [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54 (2): 898-906. DOI: 10.1128/AAC.01267-09
- [2] Bergeron A, Porcher R, Menotti J, et al. Prospective evaluation of clinical and biological markers to predict the outcome of invasive pulmonary aspergillosis in hematological patients [J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(3): 823-830. DOI: 10.1128/JCM.00750-11
- [3] Zhang H, Wang K, Zhang G, et al. Synergistic anti-candidal activity of tetrandrine on ketoconazole: an experimental study [J]. *Planta Med*, 2010, 76 (1): 53-61. DOI: 10.1055/s-0029-1185973
- [4] 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)
李丰霞, 张宏. 汉防己甲素对氟康唑抗白念珠菌活性的增效作用[J]. 中华皮肤科杂志, 2006, 39(8):454-456. DOI: 10.3760/j.issn:0412-0430. 2006.08.008.
- [5] Zhang D, Zhang HR, Li HR, 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)
张丁, 张宏, 李海瑞, 等. 汉防己甲素对益康唑抗须癣毛癣菌活性增效作用的体内实验研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2010, 26(3): 222-225.
- [6] Liu CH, Zhang H, Xiang SB, 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)
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.
- [7] 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
- [8] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved standard-Second edition. CLSI document M38-A2[S]. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
- [9] Meletiadis J, Pournaras S, Roilides E, et al. Defining fractional inhibitory concentration index cutoffs for additive interactions based on self-drug additive combinations, Monte Carlo simulation analysis, and *in vitro-in vivo* correlation data for antifungal drug combinations against *Aspergillus fumigatus* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54 (2): 602-609. DOI: 10.1128/AAC.00999-09
- [10] Planche V, Ducroz S, Alanio A, et al. *In vitro* combination of anidulafungin and voriconazole against intrinsically azole-susceptible and -resistant *Aspergillus* spp [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56 (8): 4500-4503. DOI: 10.1128/AAC.00045-12
- [11] Haynes MP, Buckley HR, Higgins ML, et al. Synergism between the antifungal agents amphotericin B and alkyl glycerol ethers [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1994, 38(7): 1523-1529. DOI: 10.1128/AAC.38.7.1523
- [12] Espinel-Ingroff A, Diekema DJ, Fothergill A, et al. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for the triazoles and six *Aspergillus* spp. for the CLSI broth microdilution method (M38-A2 document) [J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48 (9): 3251-3257. DOI: 10.1128/JCM.00536-10
- [13] Mellado E, Garcia-Effron G, Alcazar-Fuoli L, et al. Substitutions at methionine 220 in the 14alpha-sterol demethylase (*Cyp51A*) of *Aspergillus fumigatus* are responsible for resistance *in vitro* to azole antifungal drugs [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48 (7): 2747-2750. DOI: 10.1128/AAC.48.7.2747-2750.2004
- [14] Rajendran R, Mowat E, McCulloch E, et al. Azole resistance of *Aspergillus fumigatus* biofilms is partly associated with efflux pump activity [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55 (5): 2092-2097. DOI: 10.1128/AAC.01189-10

收稿日期:2013-04-18;修回日期:2013-05-16