

他克莫司和伊曲康唑联合使用体外抗克柔念珠菌作用的研究

宫婷婷, 刘赞蕾, 王中新

摘要 目的 单独应用抗真菌剂伊曲康唑和钙调神经磷酸酶抑制剂他克莫司,以及上述两种药物联合使用后,评估体外实验对克柔念珠菌生长的影响情况。是否联合用药比单独应用抗真菌剂更有效抑制克柔念珠菌的生长。方法 根据美国临床及实验室标准协会指南的方法,将12株克柔念珠菌通过微量稀释法分为空白对照组、伊曲康唑组、他克莫司组以及联合用药组,然后将12株克柔念珠菌孵育24 h后,观察其生长情况。结果 与单独使用伊曲康唑药物相比,联合用药作用下伊曲康唑最低抑菌浓度远小于单独使用伊曲康唑,其最高倍数达32倍,最小倍数达4倍;同样,他克莫司单独使用较联合伊曲康唑使用,最高倍数达32倍,最低倍数达2倍。结论 12株克柔念珠菌在伊曲康唑和他克莫司联合使用下,体外实验表现出强大的协同作用。

关键词 克柔念珠菌;伊曲康唑;他克莫司

中图分类号 R 446.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)07-1114-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.07.026

多年来,实体器官移植已经成为肾脏、肝脏、心脏和肺部等终末期疾病的公认治疗^[1]。随着免疫抑制剂和移植物的广泛应用,如真菌病、病毒感染^[2]和恶性肿瘤已成为主要的实体器官移植的并

发症。尽管诊断、预防和治疗方面最近取得进展,但侵袭性真菌感染仍然是免疫功能低下或危重病患者发病和死亡的主要原因^[3-4]。目前非白色念珠菌如光滑念珠菌、克柔念珠菌等菌株的感染已超过白色念珠菌,所致的侵袭性真菌的发病率和死亡率呈现上升的趋势^[4],这些难以治疗的侵袭性真菌感染的发病率增加,加上目前有限的抗真菌药物使得仍然未完全探索的钙调磷酸酶途径成为抗真菌靶向的有吸引力的新型替代物。其中环孢菌素A和他克莫司就是钙调磷酸酶抑制剂。而抗真菌药如氟康唑、伊曲康唑、伏立康唑、卡泊芬净等的使用,使得难治性的侵袭性真菌的耐药也不断的在升高^[5-6],并且上述两类药物已广泛用于器官移植和真菌感染的治疗。该实验通过体外的微量稀释法,测定12株克柔念珠菌在各种药物下的耐药情况,以及分析单独应用伊曲康唑和他克莫司,与联合使用伊曲康唑和他克莫司对于克柔念珠菌的生长情况的比较。

1 材料与方法

1.1 实验菌株 收集2014年1月~2016年12月安徽医科大学第一附属医院检验科分离的克柔念珠菌共12株,菌株来源于痰、尿、粪便等,菌株编号依次为CK1~12。选取光滑念珠菌ATCC MYA-2950和白色念珠菌ATCC 10231作为质控菌株,使用大肠杆菌ATCC 8739作为仪器的校准菌株。

1.2 试剂和仪器 伊曲康唑、他克莫司、二甲亚砷

2018-03-14 接收

基金项目:安徽省高校省级自然科学基金项目(编号: KJ2015A337)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院检验科,合肥 230022

作者简介:宫婷婷,女,硕士研究生;

王中新,男,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: ay-wzhx87@126.com

months at least. **Results** The incidence of IBD combined with anemia was 62.1% (100/161), among which IDA and ACD hold up to 40.0% (40/100) and 14.0% (14/100) respectively, while the mix of IDA and ACD account for 26.0% (26/100), and 10.0% (10/100) was taken by lack of folic acid and VitB12. The level of sTfR and sTfR/LogSF in IDA group were obviously higher than those in non IDA group, and this difference was statistically significant ($U=655.5$, 306.0 , $P<0.001$). The AUC of sTfR/LogSF (0.937) was higher than the AUC (0.865) of sTfR. High sTfR levels (>4.7 mg/L) had a sensitivity of 77.5% and a specificity of 86.0%, whereas high sTfR/LogSF (>2.8) had a sensitivity of 87.5% and a specificity of 90.9% for the diagnosis of IDA. Both sTfR and sTfR/LogSF index were not correlated with CRP levels ($r=0.042$, 0.958 , $P>0.05$). **Conclusion** The incidence of IBD combined anemia is high, among which IDA is common. By detecting serum sTfR/LogSF and sTfR, the diagnosis of IBD combined IDA may be more accurate.

Key words inflammatory bowel disease; iron deficiency anemia; serum transferrin receptor

AR(大连美仑生物技术有限公司); RPMI 1640 粉末(美国 GIBCO 公司); MOPS(北京索莱宝技术有限公司); 0.22 μm 纤维过滤膜(上海生工生物公司)。VITEK MS-FA、VITEK MS-CHCA 基质、靶板和 VITEK MS IVD (V2.0) 质谱仪(法国 Biomérieux 公司); 酶标仪 MK-3(美国 ThermoFisher 公司)。

1.3 方法

1.3.1 菌株处理和试剂配制 将菌株从 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出解冻,至少在沙保弱固体培养基上传代 2 次以上进行复苏,每次在 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 48 h 后再次接种,然后用接种环将沙保弱固体培养基生长至对数生长的单个大菌落,在 3 ml 的 PBS 缓冲液中研磨混匀,接着用中国标准比浊管比浊,调整菌液浓度大约在 $5 \times 10^6\text{ cfu/ml}$,用血球计数板验证菌液浓度。将伊曲康唑和他克莫司原料粉末溶于二甲亚砜分别配置为 $6\,400\text{ }\mu\text{g/ml}$ 和 $5\,120\text{ }\mu\text{g/ml}$ 。

1.3.2 药物单用时最低抑菌浓度测定 采用棋盘微量稀释法分别测定伊曲康唑和他克莫司的最低抑菌浓度。使用 RPMI 1640 液体培养基将上述配置的菌体稀释,使得 96 孔板上的菌液浓度大约为 $2.5 \times 10^3\text{ cfu/ml}$,然后将他克莫司和伊曲康唑的母液用 RPMI 1640 液体培养基对倍稀释,使得 96 孔板上伊曲康唑的浓度为 $0.125 \sim 64\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、他克莫司的浓度为 $1 \sim 512\text{ }\mu\text{g/ml}$ 。参考 Sanguinetti et al^[7] 将克柔念珠菌分离株在伊曲康唑的敏感性分布:最低抑菌浓度 $\leq 0.125\text{ }\mu\text{g/ml}$ 为敏感,最低抑菌浓度 $= 0.25 \sim 0.5\text{ }\mu\text{g/ml}$ 为浓度信赖株,最低抑菌浓度 $\geq 1.0\text{ }\mu\text{g/ml}$ 为耐药株。

1.3.3 药物联用时最低抑菌浓度测定 根据 CLSI 方案 M27-A3 微量稀释法测定伊曲康唑和他克莫司联用后对所有克柔念珠菌的最低抑菌浓度。对于他克莫司使用最高浓度为 $64\text{ }\mu\text{g/ml}$,伊曲康唑最高为 $16\text{ }\mu\text{g/ml}$ 。生长对照孔为 $100\text{ }\mu\text{l}$ RPMI 1640 培养液和 $100\text{ }\mu\text{l}$ 菌液,空白对照组为 $200\text{ }\mu\text{l}$ RPMI 1640 培养液,其他每孔 $100\text{ }\mu\text{l}$ 菌液、 $50\text{ }\mu\text{l}$ 伊曲康唑药液 $50\text{ }\mu\text{l}$ 他克莫司药液。96 孔板在 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱培养 24 h 后,用酶标仪在 492 nm 处测光密度(OD)值。最后根据公式计算各组分级抑菌浓度指数(FICI): $\text{FICI} = \text{FICA} + \text{FICB} = \text{CA}/\text{MICA} + \text{CB}/\text{MICB}$,FICA、FICB 分别表示药物 A 和药物 B 的分级抑菌浓度;MICA、MICB 分别表示药物 A 和药物 B 单独应用时的最低抑菌浓度;CA、CB 为药物 A 和药物 B 联用时达到相同药效时各自的浓度。联用作用效果评价根

据 Odds 的建议:分级抑菌浓度指数 ≤ 0.5 协同,分级抑菌浓度指数 > 4 为拮抗,在其之间为相加或者无关。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 16.0 软件进行分析。计数资料采用中位数表示。

2 结果

2.1 ATB FUNGUS 3 参考抗真菌药敏实验研究克柔念珠菌分离株 由 ATB FUNGUS 3 根据制造商的说明书进行,目视读取最小抑制浓度。有 5 种不同浓度的抗真菌药物:5-氟胞嘧啶($4 \sim 16\text{ }\mu\text{g/ml}$)、两性霉素 B($0.5 \sim 16\text{ }\mu\text{g/ml}$)、氟康唑($1 \sim 128\text{ }\mu\text{g/ml}$)、伊曲康唑($0.125 \sim 4\text{ }\mu\text{g/ml}$)和伏立康唑($0.06 \sim 8\text{ }\mu\text{g/ml}$)。使用 CLSI BMD 方法同时进行 ATB FUNGUS 3 的测试,24 h 后进行视觉读数。通过测试 CLSI 推荐的菌株选取光滑念珠菌 ATCC MYA-2950 和白色念珠菌 ATCC 10231 作为质控菌株来确保质量控制。12 株克柔念珠菌的抗真菌药敏实验见表 1。

2.2 伊曲康唑和他克莫司联合使用抗克柔念珠菌的结果 根据 CLSI 方案 M27-A3 微量稀释法进行他克莫司与伊曲康唑联合应用对抗克柔念珠菌的生长情况,最后根据公式计算各组分级抑菌浓度指数。他克莫司与伊曲康唑联用时 12 株克柔念珠菌的结果见表 2。与单独使用伊曲康唑的克柔念珠菌相比,联合用药作用下伊曲康唑最低抑菌浓度远小于单独使用伊曲康唑的克柔念珠菌,其最高倍数达 32 倍,最小倍数达 4 倍;同样,他克莫司单独使用较联合伊曲康唑使用,最高倍数达 32 倍,最低倍数达 2 倍。

3 讨论

近年来,念珠菌属、隐球菌和曲霉属物种的耐药分离株种群数量不断增加,以及最近新出现的接合线虫种、木霉菌和米根霉的出现^[8],这些都是免疫功能低下患者死亡率高的原因^[9]。临床侵袭性操作如气管插管、导尿以及介入等使用造成了克柔念珠菌的感染呈现逐年上升的趋势。对于常见的三唑类真菌药-伊曲康唑,其耐药的情况也在逐年的升高。He et al^[10]认为 ERG11 和 ABC2 基因的上调与克柔念珠菌的耐药机制相关,但却不能排除 ERG11 基因在此过程中突变引起的耐药。而随着器官移植的增多,免疫抑制剂(他克莫司和环孢素 A)已被广

表 1 12 株克柔念珠菌在下列各药物中的浓度

菌株	最低抑菌浓度($\mu\text{g/ml}$) 敏感值分布				
	氟康唑	伊曲康唑	伏立康唑	5-氟胞嘧啶	两性霉素 B
CK1	32/耐药	1/耐药	0.5/敏感	16/中介	0.5/敏感
CK2	32/耐药	0.5/中介	0.5/敏感	16/中介	0.5/敏感
CK3	16/中介	0.25/中介	0.25/敏感	4/敏感	<0.5/敏感
CK4	32/耐药	1/耐药	0.5/敏感	4/敏感	<0.5/敏感
CK5	32/耐药	1/耐药	0.5/敏感	16/中介	0.5/敏感
CK6	16/中介	1/耐药	0.25/敏感	4/敏感	<0.5/敏感
CK7	32/耐药	0.5/中介	0.5/敏感	16/中介	<0.5/敏感
CK8	16/中介	1/耐药	0.25/敏感	16/中介	<0.5/敏感
CK9	16/中介	0.5/中介	0.25/敏感	4/敏感	<0.5/敏感
CK10	16/中介	0.5/中介	0.25/敏感	4/敏感	<0.5/敏感
CK11	16/中介	0.5/中介	0.25/敏感	4/敏感	<0.5/敏感
CK12	16/中介	0.125/敏感	0.25/敏感	4/敏感	<0.5/敏感

表 2 12 株克柔念珠菌联合使用伊曲康唑和他克莫司的结果

菌株	单独药物最低抑菌浓度 ^a ($\mu\text{g/ml}$)		联合药物最低抑菌浓度 ^a ($\mu\text{g/ml}$)		分级抑菌浓度指数	
	伊曲康唑	他克莫司	联合伊曲康唑	联合他克莫司	分级抑菌浓度指数 ^a	作用结果
CK1	1.000	256	0.060	32	0.185	协同
CK2	0.500	512	0.125	64	0.375	协同
CK3	0.250	512	0.060	16	0.271	协同
CK4	1.000	256	0.030	64	0.155	协同
CK5	1.000	512	0.060	128	0.310	协同
CK6	1.000	512	0.030	16	0.061	协同
CK7	0.500	512	0.060	16	0.151	协同
CK8	1.000	256	0.060	16	0.122	协同
CK9	0.500	512	0.125	64	0.375	协同
CK10	0.500	512	0.060	64	0.245	协同
CK11	0.500	512	0.060	64	0.245	协同
CK12	0.125	512	0.030	16	0.271	协同

注: a 代表 3 次实验的中位数

泛的使用,他克莫司是钙调神经磷酸酶抑制剂,钙调神经磷酸酶是由 Ca^{2+} 和钙调蛋白调节的真菌中唯一认识的磷酸酶。它是一种多功能调节剂,具有调节真菌应激反应、生理和细胞周期进程、生物膜的形成和抗真菌抗性、毒力以及发病机制的功能。

在基于上述情况下,研究新的抗真菌药一直在进行,如嗜铬粒蛋白 A-N46 对克柔念珠菌表现出最大的敏感性,嗜铬粒蛋白 A-N46 可以被认为是用于治疗克柔念珠菌感染的抗真菌化合物^[11]。银纳米颗粒、羧甲基壳聚糖等都能够抑制念珠菌细胞的代谢活性。但上述药物都未进行临床人体试验。Lamoth et al^[12]证实了各种唑类和钙调磷酸酶抑制剂抗真菌活性,如耐棘白菌素类的烟曲霉临床分离株。最近一项研究^[13]显示他克莫司或环孢素 A 和氟康唑的组合靶向钙调磷酸酶信号传导可能是用于白色念珠菌感染后产生生物膜预防和治疗抗真菌的有效策略。钙调神经磷酸酶抑制剂增强白色念珠菌对最常见的抗真菌剂敏感性的基础机制。在此之前

Li et al^[14]研究发现他克莫司和氟康唑联合抗光滑念珠菌和克柔念珠菌具有协调作用。

基于上述研究和氟康唑对克柔念珠菌是天然耐药以及他克莫司作为临床上常用的器官移植后的免疫抑制药,笔者选用了较为廉价的伊曲康唑联合他克莫司抗克柔念珠菌。通过本研究发现体外单独使用抗真菌剂(伊曲康唑)或钙调神经磷酸酶抑制剂(他克莫司)对克柔念珠菌的作用与伊曲康唑和他克莫司相结合的抗克柔念珠菌的活性相比较,后者在抗克柔念珠菌时,无论是敏感的还是耐药的伊曲康唑,都明显降低了克柔念珠菌的生长情况。因此,在治疗器官移植后克柔念珠菌的感染时,应用他克莫司和伊曲康唑联合治疗,在临床上是有一定的应用前景。

参考文献

- [1] Green M. Introduction: infections in solid organ transplantation [J]. Am J Transplant 2013, 13 Suppl 4: 3-8.

- [2] Umeshita K ,Inomata Y ,Furukawa H ,et al. Liver transplantation in Japan: registry by the Japanese liver transplantation society [J]. *Hepatol Res* 2016 46(12) : 1171 – 86.
- [3] Corzo-León D E ,Satlin M J ,Soave R ,et al. Epidemiology and outcomes of invasive fungal infections in allogeneic haematopoietic stem cell transplant recipients in the era of antifungal prophylaxis: a single-centre study with focus on emerging pathogens [J]. *Mycoses* 2015 58(6) : 325 – 36.
- [4] Silva S ,Negri M ,Henriques M ,et al. *Candida glabrata* , *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology , epidemiology , pathogenicity and antifungal resistance [J]. *FEMS Microbiol Rev* 2012 , 36(2) : 288 – 305.
- [5] Vallabhaneni S ,Cleveland A A ,Farley M M ,et al. Epidemiology and risk factors for Echinocandin Nonsusceptible *Candida glabrata* bloodstream infections: data from a large multisite population-based Candidemia surveillance program , 2008 – 2014 [J]. *Open Forum Infect Dis* 2015 2(4) : ofv163.
- [6] Zhou Z L ,Lin C C ,Chu W L ,et al. The distribution and drug susceptibilities of clinical *Candida* species in TSARY 2014 [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2016 86(4) : 399 – 404.
- [7] Shirazi F ,Kontoyiannis D P. The calcineurin pathway inhibitor tacrolimus enhances the in vitro activity of azoles against *Mucorales* via apoptosis [J]. *Eukaryot Cell* 2013 12(9) : 1225 – 34.
- [8] Sanguinetti M ,Posteraro B ,Fiori B ,et al. Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance [J]. *Antimicrob Agents Chemother* 2005 49(2) : 668 – 79.
- [9] Juvvadi P R ,Lamoth F ,Steinbach W J. Calcineurin as a multifunctional regulator: unraveling novel functions in fungal stress responses , hyphal growth , drug resistance , and pathogenesis [J]. *Fungal Biol Rev* 2014 28(2 – 3) : 56 – 69.
- [10] He X ,Zhao M ,Chen J ,et al. Overexpression of both ERG11 and ABC2 genes might be responsible for itraconazole resistance in clinical isolates of *Candida krusei* [J]. *PLoS One* 2015 10(8) : e0136185.
- [11] Li R F ,Yan X H ,Lu Y B ,et al. Anti-candidal activity of a novel peptide derived from human chromogranin A and its mechanism of action against *Candida krusei* [J]. *Exp Ther Med* 2015 10(5) : 1768 – 76.
- [12] Lamoth F ,Juvvadi P R ,Gehrke C. *In vitro* activity of calcineurin and heat shock protein 90 inhibitors against *Aspergillus fumigatus* azole- and echinocandin-resistant strains [J]. *Antimicrob Agents Chemother* 2013 57(2) : 1035 – 9.
- [13] Jia W ,Zhang H ,Li C ,et al. The calcineurin inhibitor cyclosporine synergistically enhances the susceptibility of *Candida albicans* biofilms to fluconazole by multiple mechanisms [J]. *BMC Microbiol* 2016 16(1) : 113.
- [14] Li H ,Chen Z ,Zhang C ,et al. Resistance reversal induced by a combination of fluconazole and tacrolimus (FK506) in *Candida glabrata* [J]. *J Med Microbiol* 2015 64(Pt 1) : 44 – 52.

Study on the anti-*Candida krusei* in vitro combined with tacrolimus and itraconazole

Gong Tingting , Liu Yunlei , Wang Zhongxin

(Dept of Clinical Laboratory ,The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University ,Hefei 230022)

Abstract *Objective* The use of the antifungal agent itraconazole and the calcineurin inhibitor tacrolimus alone , together with the above two drugs , was evaluated in vitro for growth of *Candida krusei*. Whether or not the combination is more effective than the antifungal alone can inhibit the growth of *Candida krusei*. *Methods* According to the guidelines of the American Institute of Clinical and Laboratory Standards , 12 *Candida krusei* strains were divided into blank control group , itraconazole group , tacrolimus group , and combination group by microdilution method , and then 12 the *Candida krusei* strain was incubated for 24 h and its growth was observed. *Results* In comparison with the alone use of itraconazole in *Candida krusei* , the combined use of itraconazole its minimal inhibitory concentration was much less than that of alone , with a maximum multiple of 32 fold , a minimum multiple up to 4 times; the same , In comparison with the alone use of tacrolimus in *Candida krusei* , the combined use of tacrolimus , its maximum multiple of 32 times , the lowest multiple of 2 times. *Conclusion* The combined use of itraconazole and tacrolimus in 12 strains of *Candida krusei* displayed a powerful synergistic effect in vitro.

Key words *Candida krusei*; itraconazole; tacrolimus