重庆维普 http://www.cqvip.com

论著 文章编号:0253-3626(2008)09-1092-04

单用伊曲康唑及联合 γ-干扰素对小鼠白假丝酵母菌感染抗菌作用的实验研究

廖晓容,高永良,周 汛

(重庆医科大学附属第一医院皮肤科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究单用伊曲康唑(Itraconazole)及联合 γ-干扰素(IFN-γ)对小鼠白假丝酵母菌感染的抗菌作用。方法:制备系统性白假丝酵母菌感染小鼠模型,单用不同剂量伊曲康唑及联合 γ-干扰素治疗感染小鼠。取肝、肾组织培养及组织切片,通过计数菌落形成单位(CFU)及组织病理切片情况,判定单用伊曲康唑及联合 γ-干扰素抗白假丝酵母菌感染的作用。结果:伊曲康唑 10mg/kg 与 10^5U γ-干扰素联合应用白假丝酵母菌感染有较好的协同作用,而伊曲康唑 50mg/kg 与 10^5U γ-干扰素联合应用其协同疗效不显著。50mg/kg 伊曲康唑组单用有很好的抗白假丝酵母菌作用。结论:小剂量的伊曲康唑与 γ-干扰素联合应用对小鼠系统性白假丝酵母菌感染有较好的协同作用。大剂量伊曲康唑单用也有很好的抗菌原理。

【关键词】白假丝酵母菌;伊曲康唑;γ-干扰素;菌落形成单位

【中国图书分类法分类号】R751 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-12-19

The single itraconazole and combination with interferon-γ against candida albicans infection

LIAO Xiao-rong, et al

(*Depatment of Dermatology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To study the efficacy of single itraconazole and combination with interferon-γ against Candida albicans infection. ***Methods***: Murine models of systemic candida albicans infection were established, and treated with different concentrations of itraconazol alone and combination with INF-γ. Then the concentrations of colonyforming units(cfu) and histolo gical sections were observed to evaluate the emcacy. ***Results***: The combination of 10^5U INF-γ and itraconazole at the dosage of 10mg/kg showed better effect against Candida albicans than the combination of itraconazole at the dosage of 50mg/kg with 10^5U INF-γ. ***Conclusion***: The combination of itraconazole at a low dose with INF-γ shows a good effect against Candida albicans. The single use of itraconazole at a high dose is also anti-infection.

【Key words】 Candida albicans; Ltraconazol; Interferon-γ; Colony forming units(CFU)

近年来由于免疫抑制剂、糖皮质激素、抗生素的广泛应用,肿瘤的放疗、化疗、爱滋病的迅速蔓延以及微创技术的发展,系统性深部真菌感染的发病率和死亡率明显增加。对于有严重免疫功能低下的白假丝酵母菌感染的患者,单纯的抗真菌治疗难以完全控制,且对机体有一定的毒副作用。如何联合用药以减少白假丝酵母菌感染的发病率及其死亡率,已成为近年研究的热点。细胞因子联合抗真菌药物治疗深部真菌感染是近年来的新观点[1]。γ-干扰素抗真菌的作用国外还处于动物实验阶段,故本研究主要探讨伊曲康唑与 γ-干扰素联合抗白假丝酵母菌的作用,为临床提供理论依据。

作者介绍:廖晓容(1981-),女,硕士,研究方向:真菌感染性疾病

通讯作者:高永良,男,副教授,E-mail:Gao2418@126.com。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 动物和菌株 清洁级昆明小鼠 60 只,体重 20~22g,6~8 周龄,雌性。中国重庆医科大学动物实验中心提供,饲养于临床药理教研室。白假丝酵母菌标准株(ATCC-90028)由第三军医大学真菌实验室提供。

1.1.2 药品与试剂 伊曲康唑注射液(西安杨森制药有限公司);注射用重组人 IFN-γ(上海克隆生物高科技有限公司);

重庆维普 http://www.cqvip.com

环磷酰胺粉针剂(上海华联制药有限公司);革兰染色液(重庆医科大学检验系惠赠);沙氏琼脂培养皿(自备)。

1.1.3 实验仪器 组织研磨器(重庆医药股份有限公司科仪化玻分公司);光学显微镜、光学显微镜照相系统(日本Olympus 公司);RM2135 石蜡切片机(德国 LEICA 公司);BMJ-Ⅲ病理包埋机(常州中威医疗器械有限公司);隔水式电热恒温培养箱(上海市跃进医疗器械一厂);超低温冰箱(美国 Thermo 公司)。

1.2 实验

1.2.1 实验菌株 标准菌株转代于 27℃孵箱培养 48h,用 0.9%的生理盐水将标准白假丝酵母菌调配成 2×10^7CFU/ml 菌悬液以备用。

1.2.2 动物模型制备 60 只清洁级昆明小鼠腹腔注射环磷酰胺 200mg/kg,每天 1 次,连续 3d,造成免疫抑制状态[2]。随机抽取 20 只小鼠,用肝素抗凝管取尾静脉血 20μl 送检,确实小鼠白细胞降至正常以下,以造成免疫抑制模型。经检验小鼠白细胞数波动在(0~4.3)$\times10^9$ 个 /L 之间,而正常小鼠白细胞为(5.1~11.6)$\times10^9$ 个 / L。3d 后给予 2×10^7CFU/ml 的白假丝酵母菌菌悬液 0.5ml 尾静脉注射。

1.2.3 实验分组与处理 将 60 只感染小鼠随机分为 5 组,每组 12 只:其中 A 组为对照组,仅尾静脉注射 2×10^7CFU/ml 的白假丝酵母菌菌悬液 0.5ml 仅 1 次。实验 B 组给予 10.0mg/kg 的伊曲康唑;实验 C 组给与 10.0mg/kg 的伊曲康唑加10^5U γ-干扰素;实验 D 组给与 50.0mg/kg 的伊曲康唑;实验 E 组给与 50.0mg/kg 的伊曲康唑加 10^5U γ-干扰素。从感染白假丝酵母菌后 1h 分别给予上述不同治疗,伊曲康唑尾静脉注射,每日 1 次,连续 7d。γ-干扰素肌肉注射,每日 1 次,连续 3d。观察小鼠在 7d 内存活情况,同时解剖、取材、培养计数及组织涂片及切片观察。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用秩和检验比较 P 值(结果来源于重庆医科大学统计实验室)。

2 结 果

2.1 单用伊曲康唑及联合 γ-干扰素对小鼠白假丝酵母菌感染的抗菌作用

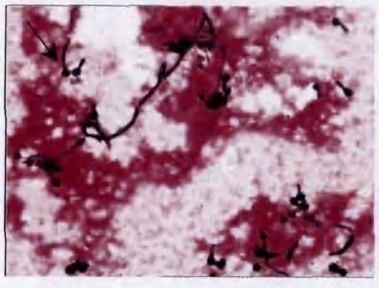
单用伊曲康唑及联合 γ-干扰素对小鼠白假丝酵菌感染的肝、肾组织培养菌落计数($\bar{\chi}\pm s$)显示:10.0mg/kg 的伊曲康唑与 10^5Uγ-干扰素联用组其肝、肾培养菌落计数同单用 10.0mg/kg 的伊曲康唑组相比较 $P<0.05$,有显著性,而同 50.0mg/kg 的伊曲康唑与 10^5Uγ-干扰素联用组相比较 $P>0.05$,差别无显著性。50.0mg/kg 的伊曲康唑单用组与 50.0mg/kg 的伊曲康唑与 10^5Uγ-干扰素联用组相比,肝、肾培养菌落计数 $P<0.05$,有显著性;同单用 10.0mg/kg 的伊曲康唑组相比较,肝、肾培养菌落计数 $P<0.05$,差别有显著性。见表 1。

2.2 治疗前后肝、肾组织匀浆涂片对照

A 组在镜下可以看见大量的孢子和假菌丝,被染成深蓝色。而单用伊曲康唑 10mg/kg(即 B 组)在镜下也可以看见大量的被革兰染色染成深蓝色的孢子和假菌丝,形状类似 A 组,连续 5 个/HP 显示两组的孢子和假菌丝在数量上无明显差别,均密集分布。见图 1、2。

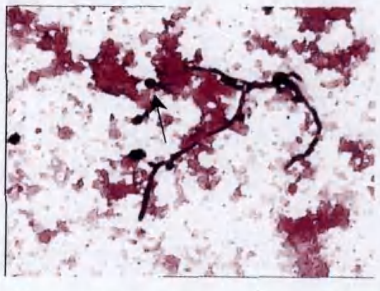
实验 C 及 D 组经治疗后其肝脏组织涂片,连续 5 个/HP 未见孢子和假菌丝,组织均浆被染成紫红色。见图 3、4。

实验 E 组经治疗后,连续 10 个/HP 可以看见极



箭头所指为白念珠菌的假菌丝,端为圆形膨大的孢子

图 1 A 组肝脏组织涂片革兰染色×400



箭头所指为白念珠菌的假菌丝,端为椭圆形膨大为孢子

图 2 B 组肝脏组织涂片革兰染色×400

表 1 治疗结果统计表

器官中的白假丝酵母菌计数(CFU/ml,$\bar{x}\pm s$)	A 组 CFU/ml($\times10^8$)	B 组 CFU/ml($\times10^7$)	C 组 CFU/ml($\times10^5$)	D 组 CFU/ml($\times10^4$)	E 组 CFU/ml($\times10^5$)
肝	1.50 ± 1.27	3.57 ± 1.40	9.45 ± 8.27	7.55 ± 6.30	2.67 ± 2.25
肾	3.51 ± 2.37	2.75 ± 1.32	9.85 ± 6.33	1.61 ± 0.80	5.18 ± 3.300

重庆维普 http://www.cqvip.com

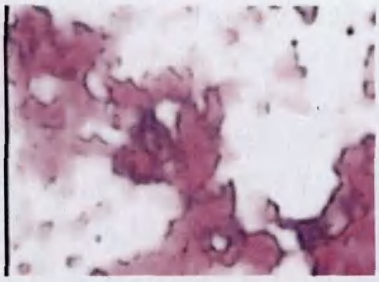


图 3 C 组肝脏组织涂片革兰染色×400

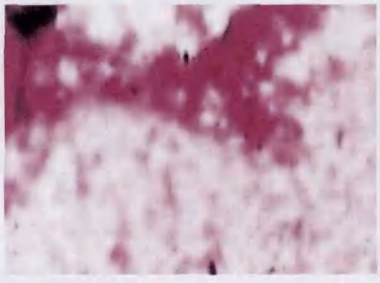
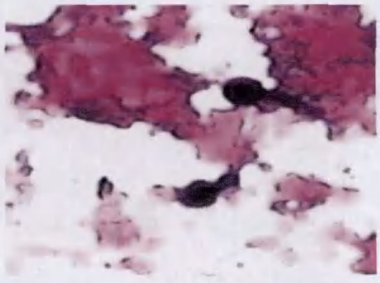
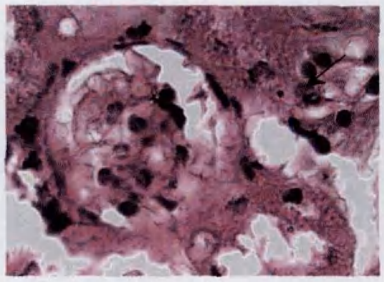


图 4 D 组肝脏组织涂片革兰染色×400



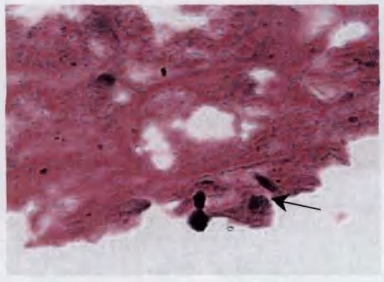
图中两个并排的类似蝌蚪状物为白假丝酵母菌的孢子及假菌丝

图 5 E 组肝脏组织涂片革兰染色×400



肾小球旁见蝌蚪状蓝色深染物，箭头所指为弯状假菌丝，其周围有圆形深染孢子数粒

图 6 A 组肾脏组织切片革兰染色×400(A1 号)



肾血管旁见形似棒捶的深染物如箭头所指为即将出芽的假菌丝

图 7 A 组肾脏组织切片革兰染色×400 (A9 号)

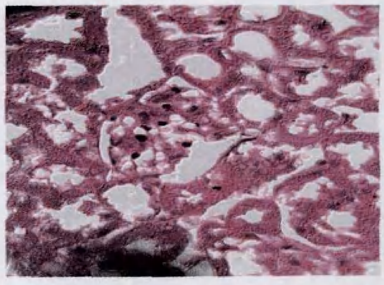


图 8 C 组肾脏组织切片革兰染色×400

少量的孢子和假菌丝，如图 5 所示。

2.3 治疗前后肝、肾组织病理切片对照组图（连续 5/HP）

A 组肾脏组织病理切片观察：肾小球旁见数粒圆形孢子及已形成的弯状假菌丝如图 6 所示。另一张切片也可见在肾血管旁已成形的假菌丝，形似棒捶样。如图 7 所示。

C 组经治疗后肾脏组织未见明显孢子及假菌丝形成。如图 8 所示。

2.4 白假丝酵母菌感染小鼠经治疗后的存活情况

所有各组全部观察期均≥7d。

显效：治疗后第 3d 实验 C、D、E 组较对照 A 组及实验 B 组相比较：其精神状态、进食程度、毛发柔顺度及存活只数均明显高于 A、B 组。A、B 组已达半数致死量，其存活者表现为萎缩、眼充血明显、畏光、流泪、寒战、群集取暖、毛发偏黄及不能进食等临床症状。

有效：治疗后第 7d，实验 C、D 组分别存活 1 只及 2 只。其精神状态佳、活拨、毛发光泽、能自主进食、无畏光流泪等现象。其治愈率用百分率表示分别为：9%及 17%。总治愈率约为 7%(以感染白假丝酵母菌 24h 后的小鼠存活例数为观察总数)。见表 2。

表 2 各组存活情况对照

组别	动物例数(只)	存活数(只)	治愈率(%)
对照 A 组	9	0	0
实验 B 组	10	0	0
实验 C 组	11	1	9%
实验 D 组	12	2	17%
实验 E 组	12	0	0

重庆维普 http://www.cqvip.com

3 讨 论

近年来治疗系统性白假丝酵母菌感染的过程中,耐药菌株的出现及其抗真菌药物的毒性反应均导致治疗上存在困难。研究表明单用一种抗真菌药物能够诱导耐药真菌的发展,目前发现对唑类抗真菌药物耐药的深部真菌以白假丝酵母菌为主[3]。伊曲康唑有较好的抗白假丝酵母菌作用,但目前对其耐药性的报告日益增多,且耐药机制不一[4],故对于治疗严重系统性深部白念珠菌感染疗效欠佳。现已有研究指出[5]:抗真菌药物与免疫调节剂联合应用能提高疗效,且能减少抗真菌药物的治疗剂量从而减少毒副反应,这一观点目前已日益受到重视。

国外已有学者提出:γ-干扰素应答不全可导致念珠菌病的发生[6]。γ-干扰素(IFN-γ)是由活化的 Th1 细胞、自然杀伤(NK)细胞和细胞毒 T 细胞(CrL)产生的致炎因子。已有实验表明 γ-干扰素抗念珠菌感染的作用。其主要过程[7]一方面通过与其特异受、体结合能激活单核细胞中性粒细胞、自然杀伤细胞及其血管内皮细胞等的活性以增强其杀白假丝酵母菌的能力。另一方面通过调节 Th1/Th2 平衡及通过减少宿主细胞内游离铁及总铁含量来抑制细胞内微生物的生长和繁殖而杀白假丝酵母菌,而游离铁是念珠菌芽生繁殖和芽管形成所必需的。

本研究结果显示,环磷酰胺作用后,小鼠外周血降低,已造成免疫抑制。伊曲康唑单独及伊曲康唑加 γ-干扰素联合治疗后显示:小剂量的伊曲康唑(即 10mg/kg)同 γ-干扰素联合应用能有效减少白假丝酵母菌的菌落形成单位,比单用小剂量的伊曲康唑组及大剂量伊曲康唑加 γ-干扰素联用组治疗效果好,其 7d 治愈率约为 9%,治疗前后组织涂片及切片对比亦说明其小剂量的伊曲康唑(即 10mg/kg)同 γ-干扰素联合治疗的有效性。而大剂量的伊曲康唑(即 50mg/kg)单用则疗效显著,亦能有效减少白假丝酵母菌的菌落形成单位。

本研究提示,伊曲康唑及 IFN-γ 联合使用可以直接拮抗真菌感染,而适量伊曲康唑仍是治疗系统性白假丝酵母菌感染的有效方法。另有研究证明:伊曲康唑及 IFN-γ 联合使用还可提高小鼠的免疫功能[8],从而增强其杀菌能力。伊曲康唑目前仍是抗真菌治疗的理想药物。免疫调节治疗播散性念珠菌病在多种动物模型中证实是有效的,因而本试验免疫调节剂与抗真菌剂的联合应用为临床治疗系统性白假丝酵母菌感染提供了一种新的手段,但其系统性用药及其治疗过程中的副反应还待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Kuhara T, Uc hida K, Yamaguchi H. Therapeutic efficacy of human macrophage colony-stimulating factor, used alone and in combination with antifungal agents, in mice with systemic candida albicans infection[J]. Antimicrob Aqents Chemother, 2000; 44(1): 19-23.

[2] 杨 琼, 宋祥福, 王桂云. 系统性白色念珠菌感染小鼠动物模型的研究[J]. 东北师大学报自然科学版, 2005; 37(2): 86-89

[3] Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, et al. In vitro susceptibilities of rare candida bloodstream isolates to ravuconazole and three comparative antifungal agents[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2004; 48(2): 101-105.

[4] 王建钊, 王 英, 顾 军. 深部真菌耐药性研究进展[J]. 世界临床药学, 2003; 24(12): 714-724.

[5] Stevens DA, Kullberg BJ, Brummer E, et al. Combined treatment antifungal drugs with antibodies, cytokines or drugs [J]. Med Mycol, 2000; 38(1): s305-s315.

[6] Szakaradkiewicz A, Szponar E, Krzeminska-JaSkowiak E, et al. Serum interferon-gamma(IFN-gmma)in chronic ora candidosis[J]. Med Myeol, 1998; 36(5): 269.

[7] 李 晶, 陈兴平. γ- 干扰素抗系统性白色念珠菌感染的机制及应用[J]. 华中医学杂志, 2003; 27(5): 282-283.

[8] 王志东, 廖万清, 徐 红, 等. 裸小鼠、昆明种小鼠感染白念珠菌或新生隐球菌脾脏自然杀伤细胞活性研究[J]. 上海医学, 2007; 30(2): 118-120.

(责任编辑:冉明会)

欢迎投稿,欢迎订阅