DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.09.036

取得了良好的手术效果。在切除病变后，再次行B超检查，可了解病变的切除程度，判断有无残留，提高了手术全切率。从我们有限的经验来看：颅脑术中B超定位准确，尤其对于皮层下囊性和边界清楚的病变，而且价格便宜，操作方便。对于囟门未闭合的婴儿和有减压窗的患者，还可直接行B超检查，了解颅内状况。

由于B超的图像质量受多种因素影响（如血流、空气、仪器等），它对空间和对比的判断，远远不如CT、MRI的影像，而且随着声波的逐渐衰减，远处病变结构显示困难。由于B超显示的是断面影像，临床医生只有熟练掌握非标准面断层解剖，才能增强对超声影像的认识。Strowitzki等[4]报道：使用5 MHz超声行肿瘤活检时，探头与靶点之间距离超过5 cm，活检成功率降低。我们的一例病变也因位置较深、体积较小（皮层下深度超过6 cm，直径0.7 cm）定位困难。解决这个问题的方法就是超声与影像导航技术的结合[5,6]。

总之，通过术中颅脑B超的定位，可以提高显微手术切除颅内病变的成功率，减少手术损伤。

关键词：术中超声；显微神经外科手术
中图法分类号：R445.1；R651.11 文献标识码：B

参考文献：

[1] 贾译清. 临床超声鉴别诊断学[M]. 南京：江苏科学技术出版社，1996. 17—45.
[2] LeRoux P D, Winter T C, Berger M S. A comparison between preoperative magnetic resonance and intraoperative ultrasound tumor volumes and margins [J]. J Clin Ultrasound, 1994, 22(1): 29—36.
[3] Woydt M, Krone A, Becker G. Correlation of intraoperative ultrasound with histopathological findings after tumour resection in supratentorial gliomas: A method to improve gross total tumour resection[J]. Acta Neurochir, 1996, 138(5): 1391—1398.
[4] Strowitzki M, Moringlane J R, Steudel W. Ultrasound-based navigation during intracranial burr hole procedures: exerience in a series of 100 cases [J]. Surg Neurol, 2000, 54(2): 134—144.
[5] Gronningsaeter A, Kleven A, Ommedal S. SonoWand, an ultrasound-based neuronavigation system[J]. Neurosurgery, 2000, 47(6): 1373—1379.
[6] Hata N, Dohi T, Iseki H. Development of a frameless and armless stereotactic neuronavigation system with ultrasonographic registration[J]. Neurosurgery, 1997, 41(3): 608—613.

（编辑 陈聪连）

文章编号：1000-5404(2003)09-0825-02

技术方法

白念珠菌芽管法药敏试验新方法

A new method for drug-sensitive test based on *C. albicans* germ

唐书谦，廖 军，钟白玉，叶庆佾 （第三军医大学附属西南医院皮肤科，重庆 400038）

提 要：目的 通过药物对白念珠菌芽管抑制试验方法，建立一个对白念珠菌快速药敏试验的新方法。方法 在白念珠菌血清芽管试验方法的基础上，将一定浓度的药物与血清混合，再接种一定菌量的菌液，置37 ℃温箱孵育2～3 h（不超过3 h）观察白念芽管生长情况，最终评估该药对白念芽管的抑制程度。结果 共用5种药物，其中黄连、姜黄、桂皮3种为常用中药，均对白念菌芽管有较明显的抑制作用。另2种为常用广谱抗真菌药物伊曲康唑（ECZ）和二性霉素B。实验证明黄连抑制芽管的最低抑菌浓度（Minimal inhibitory concentration, MIC）为125 μg/ml；姜黄抑制芽管的MIC为62.5 μg/ml；桂皮抑制芽管的MIC为500 μg/ml；二性霉素B抑制芽管的MIC为5 μg/ml；ECZ 2 mg/ml仍有芽管生长，其生长程度、数量与对照组比较无明显差异（$P>0.05$），其原因有待进一步探讨。结论 本实验方法作为对白念珠菌药敏试验的一个新方法探讨，虽然所试药物的抑菌作用MIC浓度与以往的报道相似，但该药敏试验方法简单、快速，并有利于临床即时粗筛白念珠菌抗菌药物，更有利于推广应用。

白念珠菌血清芽管试验法，是目前实验室鉴定白念珠菌的金标准方法之一，方法简单、快速，一般医院均能推广应用。本实验在白念珠菌血清芽管试验方法的基础上，将一定浓度的药物与血清混合，再接种一定菌量的菌液，置37 ℃温箱孵育2～3 h（不超过期3 h）观察白念芽管生长情况，最终评估该药对白念芽管的抑制程度。本研究通过药物对白念珠菌芽管抑制试验的方法，拟建立一个对白念珠菌快速药敏试验的新方法。现将观察方法和实验结果报告如下。

1 方法与步骤

1.1 血清准备

正常人血清，来源于本院输血科（血库）。

作者简介：唐书谦（1939－），男，四川省大竹县人，主任技师，主要从事真菌学及免疫病理方面的研究。电话：（023）68754491
收稿日期：2002-01-20；修回日期：2002-07-06

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2 药物准备

伊曲康唑(Etraconazole, ECZ): 10 μg/ml, 日本生化学工业株式会社提供。

二性霉素B: 2 μg/ml, 上海先锋药业公司, 上海第二制药厂生产(2000年)。中药原料黄连、桂皮和姜黄均来源于本院药剂科中药房, 为乙醇粗提取物, 含生药2 g/ml。

1.3 试验方法

将药物分别用生理盐水倍半稀释, 然后再分别取0.5 ml药物分别加0.5 ml血清混均匀。对照管: 为生理盐水0.5 ml加0.5 ml血清混均匀。菌液接种: 每管分别接种白念珠菌菌液(1010)20 μl并混均匀。最后, 置37 ℃孵育3 h观察。

1.4 观察、计数、结果判断

1.4.1 观察 芽管数、芽管生长的长度与对照管比较, 一般超过菌体直径2倍以上, 为正常生长芽管。芽管长度小于或等于菌体直径者, 为受抑制芽管。

1.4.2 计数 按白细胞计数方法, 分别计算出药物不同稀释度出现的正常芽管和受抑制芽管数量。统计学方法采用 χ^2 检验。

1.4.3 判断 无芽管生长者为敏感。有芽管生长者, 若受抑制芽管为100%以上者, 为中度敏感。若受抑制芽管与正常芽管之比仅为50%左右者为轻度敏感。若与对照芽管长度基本一致者为不敏感。

2 结果

2.1 不同药物抑制芽管试验的敏感比较

共用5种试验药物, 其中黄连、姜黄、桂皮3种为常用中药, 均对白念菌芽管有较明显的抑制作用。另二种常用广谱抗真菌药物为伊曲康唑(ECZ)和二性霉素B, 仅有二性霉素B对白念芽管有明显抑制作用, 见表1。黄连抑制芽管的最低浓度为125 μg/ml; 姜黄抑制芽管的最低浓度为62.5 μg/ml; 桂皮抑制芽管的最低浓度为500 μg/ml; 二性霉素B抑制芽管的最低浓度为5 μg/ml; 伊曲康唑(ECZ)2 mg/ml仍有芽管生长, 其芽管的生长程度、数量与对照管比较无显著性差异($P>0.05$)。

2.2 对照试验

芽管生长正常, 一般超过菌体直径2倍以上。将不同药物芽管生长呈阴性的相应培养管, 取样接种于沙氏培养基, 25 ℃孵育培养, 24 h可见菌落发育生长。证明: 此试验的药物浓度仅对白念芽管有抑制生长作用, 无杀菌作用。

表1 白念珠菌血清芽管试验结果

药物	药物浓度(μg/ml)与抑制牙管数												
伊曲康唑(mg/ml)	2.5	$20^6(8^6)$	1.25	$22^6(8^6)$	0.625	$25^6(3^6)$	0.315	$19^6(5^6)$	0.156 25	$22^6(3^6)$	0.078 125	$20^6(3^6)$	0.039 062 5	$24^6(3^6)$
二性霉素B	10	0(0)	5	0(0)	2.5	$0(3^6)$	1.25	$0(5^6)$	0.625	$5^6(18^6)$	0.312 5	$13^6(18^6)$	0.156 25	$14^6(20^6)$
黄莲素	500	0(0)	250	0(0)	125	0(0)	62.5	$0(1^6)$	31.25	$2^6(2^6)$	15.625	$4^6(4^6)$	7.812 5	$13^6(2^6)$
姜黄	500	0(0)	250	0(0)	125	0(0)	62.5	0(0)	31.25	$4^6(7^6)$	15.625	$9^6(8^6)$	7.812 5	$15^6(5^6)$
桂皮	500	0(0)	250	0(0)	125	$5^6(4^6)$	62.5	$8^6(7^6)$	31.25	$18^6(13^6)$	15.625	$14^6(12^6)$	7.812 5	$18^6(14^6)$
对照	500	$24^6(5^6)$	250	$20^6(5^6)$	125	$22^6(5^6)$	62.5	$22^6(5^6)$	31.25	$21^6(3^6)$	15.625	$20^6(4^6)$	7.812 5	$22^6(2^6)$

注: 计数: 芽管发生数应乘以稀释倍数(100)×10^4; 括号外示正常芽管数, 括号内示受抑制芽管数

3 讨论

据文献[1]报道, 抗真菌药物敏感试验的方法尚不完全统一, 仅1997年美国国家临床试验室标准委员会(NCCLS), 经多家实验室参与试验后提出了一个对念珠菌和隐球菌液基大量稀释法作出药敏测试标准化的方法(NCCLSM27T文件方案)较为规范化。本实验方法仅是从另一个途径探测抗白念珠菌药敏的新方法, 我们认为该法比较接近于临床, 费时短, 能快速粗筛出抗白念珠菌药敏药物, 可能对白念珠菌感染的病人即时得到治疗有一定的帮助。

与常用抗真菌药物比较, 从实验结果可以看出, 二性霉素B最低抑制芽管浓度为5 μg/ml, 高于一般试管液体稀释法浓度0.02~0.5 μg/ml, 但0.156~2.5 μg/ml仍有很明显的中、轻度敏感, 与一般药敏试验方法的结果相符合。伊曲糠唑是一个广谱抗真菌药物, 一般试管抑菌试验MIC<1 μg/ml。本试验为2 mg/ml仍未发现有抑制芽管的作用, 可能是方法的差异。其次, 一般认为药敏抑菌结果与体内、外用药的效果也可能不完全一致有关, 有待进一步探测。

3种常用中药对白念芽管抑制试验中, 以姜黄效果较好, 其次为黄连和桂皮。曹仁烈等[2]常用试管法黄连水煎剂对白念珠菌抑菌试验MIC为20%~30%。本实验结果: 黄连对白念芽管抑制试验MIC为125 μg/ml, 但15.625~62.5 μg/ml仍有轻度敏感。关于姜黄抗真菌作用的研究, 曹煜等[3] 1988、1994年已先后作了对姜黄的化学成分分析和对抗真菌的药敏试验; 我们以前也作了对姜黄乙醇和水溶液制剂抗真菌的药敏试验[4], 均认为对真菌包括念珠菌等有较强的敏感性。但都主要提到姜黄的挥发油有强抗真菌作用, MIC为0.3~10 μl/ml, 包括抗白念珠菌的作用MIC为2 μl/ml。本实验结果: 姜黄乙醇粗提取物对白念芽管抑制试验, MIC为62.5 μg/ml, 但15.625~31.25 μg/ml有50%的芽管有明显的抑制作用, 证明也与上述结果基本一致。

关于中药桂皮制剂抗真菌的药敏试验, 张永圣[5]作了关于桂皮乙醚抽出物水溶部分抗白念珠菌作用的研究, 30%~15%有较强的抑菌作用, 并用15%~25%将

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

菌体浸渍 2 h 能完全杀菌。本实验所用桂皮制剂仅是酒精提取粗制物, MIC 为 500 μg/ml, 但 31.25 ~ 250 μg/ml 仍有中、轻度敏感。与前者比较同样有较强的抑菌作用, 但对于药物提取方法的影响有待进一步探讨。

综上所述, 本研究目的主要是将该实验方法作为对白珠念药敏试验的一个新方法探讨, 虽然所试药物的抑菌作用 MIC 浓度与以往的报道相似, 但该药敏试验方法简单、快速, 并有利于临床即时粗筛白念珠菌抗菌药物, 更有利于推广应用。

关键词: 血清芽管试验; 黄连; 姜黄; 桂皮; 伊曲康唑; 两性霉素 B

中图法分类号: R379.4; R965.1　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 王文莉, 王端礼, 李若瑜, 等. 酵母菌的 NCCLS 药敏试验方法及应用[J]. 中华医学检验杂志, 1997, 20(2): 119—122.

[2] 曹仁烈. 中药水煎剂在试管内抗皮肤真菌的观察[J]. 中华皮肤科杂志, 1957, 5(4): 286—290.

[3] 曹　煜, 茅　颍, 向俊才, 等. 中药姜黄有效成分抗真菌研究及临床应用研究[J]. 中华皮肤科杂志, 1994, 27(6): 354—356.

[4] 唐书谦, 叶庆佾, 钟白玉. 姜黄油、水浸液对真菌体外抑菌观察[J]. 第三军医大学学报, 1997, 19(6): 569—571.

[5] 张永圣. 桂皮乙醚抽出物的水溶液部分抗真菌的实验研究[J]. 微生物学报, 1958, 6(2): 233—235.

（编辑　刘洪娥）

（上接 821 页）

3　讨论

用高能量的密集光斑造模, 通过减少对视网膜内层的血供, 破坏 Bruch 膜, 诱导眼底新生血管生长, 是一种重现性较好的可靠模型, 可通过光镜、电镜及眼底荧光造影等可靠方法观察。Dobi 等[9] 用病理组织学观察猴的新生血管发生率为 86%, 鼠眼新生血管发生率为 60%, 而兔眼的新生血管发生率较二者略低。本实验通过将散在的光凝改为后极部密集光凝后, 兔眼新生血管发生率为 56%。

迄今发现与血管形成相关的生长因子中, 只有 VEGF 作为一种与缺氧关系密切、能特异促血管内皮细胞分裂可溶性糖蛋白, 在诱导脉络膜新生血管形成中起着突出的作用[10]。近年来, 应用免疫组织化学方法发现参与脉络膜新生血管形成的细胞主要有视网膜色素上皮细胞(RPE)和巨噬细胞[11]。RPE 病变、炎症或 Bruch 膜的破坏造成代谢紊乱, 其代谢产物消化排除障碍而沉积在 RPE 细胞基底膜下, 变成玻璃膜疣, 它的存在则可吸引巨噬细胞由脉络膜穿过 Bruch 膜进入 RPE 下, 巨噬细胞能产生多种促血管新生的细胞因子如 VEGF、bFGF 等, 从而起动了新生血管生长的过程。本实验模型由于光凝减少了对内层视网膜的血液供应, 造成了视网膜组织的缺氧状态。光凝后 1 ~ 3 d, 我们检测到光凝灶周围的节细胞层和内核层 VEGF mRNA表达明显增加, 光凝斑周围的视网膜下侵入的 RPE 样细胞及 RPE 层细胞中也有 VEGF mRNA 表达; 光凝后 3 d, 光凝斑及周围视网膜下有红色薄壁内皮细胞及核组成环形网状结构出现, 与正常组织原有血管的部位、分布和形态相比均不同。Ishibashi 等[12] 已在小鼠模型中用原位杂交和免疫组织化学方法证实, 光凝后 3 d 脉络膜血管内皮细胞通过 Bruch 膜缺损区迁移进入视网膜下, 光凝后 3 ~ 7 d 在堆积的巨噬细胞、迁移的 RPE 和 Muller 细胞中 VEGF mRNA 表达明显增高; 光凝后 7 ~ 14 d 经组织病理学和眼底荧光造影证实视网膜下有新生血管的形成。因兔脉络膜新生血管不具有渗漏荧光素的特征, 故我们未用眼底荧光造影进行观察。

本实验在正常视网膜检测不到 VEGF mRNA 的表达, 而光凝后 VEGFmRNA 的表达明显增高, 这与 Frank 等[13] 的研究结果一致, 且 VEGF mRNA 的表达在时间和部位与视网膜下新生血管化及周围色素上皮反应存在时空对应关系, 提示 VEGF 在激光光凝所致的眼内新生血管形成中起着重要的作用。

关键词: 血管内皮生长因子; 原位杂交; 视网膜; 脉络膜新生血管

中图法分类号: R774.102　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Risau W. Mechanisms of angiogenesis[J]. Nature, 1997, 386(17): 671—674.

[2] Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, *et al*. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors[J]. FASEB J, 1999, 13(1): 9—22.

[3] Pollack A. Ultrastructure of Bruch's membrane after krypton laser photocoagulation II. Repair of Bruch's membrane and the role macrophages[J]. Arch Ophthalmol, 1986, 104(9): 1377—1382.

[4] Bird A C. Choroidal neovascularization in age-related macular disease[J]. Br J Ophalmol, 1993, 77(10): 614—615.

[5] Killingsworth M C, Sarks J P, Sarks S H. Macrophages related to Bruch's membrane in age-related mecular degeneration[J]. Eye, 1990, 4(Pt 4): 613—621.

[7] 金冬雁, 译. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1992. 495—569.

[6] 张承芬. 眼底病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998. 697—698.

[8] 蔡文琴 主编. 免疫组织化学和核酸分子杂交技术[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1994. 408—413.

[9] Dobi E T, Puliafito C A, Destro M, *et al*. A new model of experimental choroidal neovascularization in the rat[J]. Arch Ophthalmol, 1989, 107(2): 264—269.

[10] Aiello L P, Northrup J M, Keyt B A, *et al*. Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor in retinal cells[J]. Arch Ophthalmol, 1995, 113(12): 1538—1544.

[11] Otani A, Takagi H, Oh H, *et al*. Expressions of angiopoietins and Tie 2 in human choroidal neovascular membranes[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999, 40(9): 1912—1920.

[12] Ishibashi T, Hata Y, Yoshikawa H. Expression of vascular endothelial growth factor in experimental choroidal neovascularization[J]. Graefes Arch Clin Txp Ophth-almol, 1997, 235(3): 159—167.

[13] Frank R N. Growth factors in age-related macular degeneration pathogenic and therapeutic implications[J]. Ophthalmic Res, 1997, 29(5): 341—353.

（编辑　张大春）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net