

· 实验研究 ·

抗真菌药物单用与联合应用他克莫司对镰刀菌体外抑菌作用的比较

陈晓莲 丁辉 刘红山 何宏 吴娇婵 胡献铝 钟兴武

中山大学中山眼科中心海南眼科医院 海南省眼科医院 海南省眼科学重点实验室,海口 570311

通信作者:钟兴武,Email:zhongxwu@mail.sysu.edu.cn

【摘要】 目的 测定临床分离的镰刀菌对抗真菌药物的敏感性,并研究免疫抑制剂他克莫司联合抗真菌药物使用的抗菌效果。方法 以美国临床实验室标准化委员会(CLSI)M27-Ed4及M38-A3方法测定氟康唑、伏立康唑、那他霉素和两性霉素B对24株临床分离致病镰刀菌的最低抑菌浓度(MIC),并采用棋盘法测定他克莫司分别联合4种抗真菌药物对镰刀菌的抗真菌作用。结果 氟康唑、伏立康唑、那他霉素和两性霉素B对镰刀菌(24株)MIC范围分别是64~256 μg/ml、1~8 μg/ml、2~8 μg/ml和1~8 μg/ml。氟康唑与他克莫司对12.5%菌株(3/24)有协同效应,对所有菌株无拮抗效应;伏立康唑与他克莫司对4.2%菌株(1/24)有协同效应,对所有菌株无拮抗效应;那他霉素与他克莫司对16.7%菌株(4/24)有协同效应,对所有菌株无拮抗效应;两性霉素B与他克莫司对29.2%菌株(7/24)有协同效应,对所有菌株无拮抗效应。结论 镰刀菌在体外对他那霉素敏感,对两性霉素B及伏立康唑部分敏感,与他克莫司联合应用时,均对少部分镰刀菌有联合效应,无拮抗效应。

【关键词】 抗真菌药物;真菌性角膜溃疡;微生物敏感性试验;镰刀菌

基金项目: 海南省自然科学基金团队项目(2017CXTD011);海南省卫生计生行业科研项目(1601032037A2002)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20190613-00260

In vitro interactions between antifungals and tacrolimus against *Fusarium solani*

Chen Xiaolian, Ding Hui, Liu Hongshan, He Hong, Wu Jiaochan, Hu Xianlyu, Zhong Xingwu

Hainan Eye Hospital and Key Laboratory of Ophthalmology, Zhongshan Ophthalmic Center, SunYat-sen University, Haikou 570311, China

Corresponding author: Zhong Xingwu, Email: zhongxwu@mail.sysu.edu.cn

[Abstract] **Objective** To investigate the *in vitro* interaction between antifungals and tacrolimus against *Fusarium solani*. **Methods** According to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-Ed4 and M38-A3, 24 strains of *Fusarium solani* isolated from clinic were used to test the minimal inhibitory concentration (MIC) of the four antifungals. Chessboard microdilution method was used to evaluate the interaction of tacrolimus (FK506) combined with four antifungals *in vitro*. The study protocol was approved by the Ethics Committee of Hainan Eye Hospital (No. 2017-006). **Results** The MIC ranges of fluconazole, voriconazole, natamycin and amphotericin B against 24 strains of *Fusarium* were 64–256 μg/ml, 1–8 μg/ml, 2–8 μg/ml and 1–8 μg/ml, respectively. Tacrolimus combined with fluconazole, voriconazole, natamycin and amphotericin B had synergistic effects on 12.5% (3/24), 4.2% (1/24), 16.7% (4/24) and 29.2% (7/24) *Fusarium*, respectively. There were no antagonistic effect in this study. **Conclusions** *Fusarium* is sensitive to natamycin *in vitro* and partly sensitive to amphotericin B and voriconazole. Synergistic effects exist in few strains of *Fusarium* but no antagonistic effect.

[Key words] Antifungal agents; Fungal keratitis; Microbial sensitivity tests; *Fusarium solani*

Fund program: Hainan Provincial Natural Science Foundation Team Project (2017CXTD011); Research

Projects of Hainan Health and Family Planning Commission (1601032037A2002)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20190613-00260

真菌性角膜溃疡致盲率高,由于抗真菌药物使用的局限性,其治疗一直是临床难点。随着抗真菌药物在临床上的广泛应用,耐药现象不断出现。因此,需要寻找新的抗真菌药物和克服真菌耐药性的方法。然而,新的抗真菌药物的开发通常是昂贵且耗时的,发现非抗真菌药物的抗真菌活性是解决这些问题的途径之一。免疫抑制剂在白念珠菌、新型隐球菌等的抗真菌治疗中的应用取得了一定进展。镰刀菌是真菌性角膜溃疡的主要致病菌^[1-4],其对联合免疫抑制剂治疗的敏感性尚有待探索。本研究测定镰刀菌对他克莫司联合多种抗真菌药物的敏感性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株的培养及鉴定 24 株镰刀菌临床分离株均保存于海南省眼科医院检验科真菌实验室。所有菌株均来自临床确诊真菌性角膜溃疡患者,并根据真菌菌落外观、菌丝、孢子及菌细胞形态以及分子生物学方法进行菌种鉴定。所有菌株在实验前均在马铃薯葡萄糖琼脂培养基斜面 35℃ 培养 48~72 h,然后 28℃ 培养至 7 d。本研究经海南省眼科医院伦理委员会审核批准(批文号:2017-006)。

1.1.2 主要试剂 氟康唑(批号:F8929)、伏立康唑(批号:Y0001395)、那他霉素(批号:P9703)、两性霉素 B(批号:V900919)、他克莫司(批号:F4679)(美国 Sigma 公司)。药物除氟康唑用蒸馏水外,其余均以分析纯级 DMSO 溶解成储存液,氟康唑质量浓度为 5 120 μg/ml,其余 4 个药物均为 1 600 μg/ml。

1.2 方法

1.2.1 微量液体稀释法评价镰刀菌对各药物的敏感性 参考临床实验室标准化委员会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) M27-Ed4 及 M38-A3 方案^[5-6],应用经三氮吗啡啉丙磺酸钠缓冲(pH 7.0)的质量分数 2%葡萄糖 RPMI 1640 液体培养基,过滤灭菌。用无菌生理盐水收集孢子,使用光线路径 1 cm 比色杯,测定 530 nm 处吸光度(A)为 0.15~0.17,悬液后以 RPMI 1640 液体培养基进一步稀释 50 倍,达到终浓度的 2 倍,接种终浓度为 $0.5 \times 10^4 \sim 5.0 \times 10^4$ CFU/ml;药物用储存液进行倍比稀释成 2 倍终浓度的药物稀释液加入 96 孔板中第 1~10 列,每孔 100 μl,每行 1 种药物,各药物终质量浓度为:氟康唑

256.00~0.50 μg/ml,伏立康唑 32.00~0.06 μg/ml,两性霉素 B 32.00~0.06 μg/ml,那他霉素 128.00~0.25 μg/ml;他克莫司终质量浓度为 256.00~0.50 μg/ml;同时设立生长对照(无药物孔)和阴性对照(无菌孔);除阴性对照孔外,其余各孔均加入 100 μl 的 2 倍终浓度菌悬液,分别于 35℃ 孵育 48 h。对镰刀菌的最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)终点判断标准为:肉眼观察到的与生长对照相比 50% 抑制的最低药物浓度为氟康唑 MIC,其余药物为 100% 的生长抑制。所有药物敏感性试验均重复 2 遍。质控菌株为 ATCC22019。药物敏感性 MIC 判断标准由天津市金章科技发展有限公司提供。氟康唑:≤8 μg/ml 为敏感,16~32 μg/ml 为中介,≥64 μg/ml 为耐药;伏立康唑:≤1 μg/ml 为敏感,2~4 μg/ml 为中介,≥8 μg/ml 为耐药;那他霉素:≤8 μg/ml 为敏感,16~32 μg/ml 为中介,≥64 μg/ml 为耐药;两性霉素 B:≤1 μg/ml 为敏感,2~4 μg/ml 为中介,≥8 μg/ml 为耐药。

1.2.2 棋盘法评价镰刀菌对体外联合药物敏感性

在 96 孔板中分别加入不同浓度的 2 种药物。自左向右 1~10 列为联合区,每孔加入 4 倍终浓度的药物倍比稀释液各 50 μl;每板第 1~10 列分别为氟康唑、伏立康唑、那他霉素和两性霉素 B,药物终质量浓度为氟康唑 128.00~0.25 μg/ml,伏立康唑 16.00~0.03 μg/ml,两性霉素 B 16.00~0.03 μg/ml,那他霉素 64.000~0.125 μg/ml;第 H~A 行的 1~10 列分别加入他克莫司至终质量浓度为 4.000~0.032 μg/ml,同时设立生长对照和空白对照。接种时除阴性对照孔外其余各孔均加入 100 μl 的 2 倍终质量浓度菌悬液,35℃ 孵育 48 h 后观察结果。分数抑菌浓度判定:与生长对照孔相比,生长 100% 抑制所对应的最低药物浓度,包括各药物单用和联合时的 MIC 值。计算部分抑菌浓度指数(fractional inhibitory concentration index, FICI)= $MIC_{A联合}/MIC_{A单用} + MIC_{B联合}/MIC_{B单用}$ 。药物相互作用:FICI≤0.5 为协同作用,0.5<FICI≤4 为无相互作用,FICI>4 为拮抗作用^[7]。

2 结果

4 种抗真菌药物对质控菌株 ATCC22019 的 MIC 值分别为氟康唑 2 μg/ml、伏立康唑 0.125 μg/ml、两性霉素 B 2 μg/ml、那他霉素 0.25 μg/ml,均在参考范

围内,表明实验操作及结果可信。

4 种抗真菌药物氟康唑、伏立康唑、那他霉素和两性霉素 B 对镰刀菌 MIC 范围分别为 64~256 μg/ml、1~8 μg/ml、2~8 μg/ml 和 1~8 μg/ml。氟康唑与他克莫司对 12.5% 菌株(3/24)有协同效应,对其余菌株无协同效应,无拮抗效应(表 1)。伏立康唑与他克莫司对 4.2% 菌株(1/24)有协同效应,对其余菌株无协同效应,无拮抗效应(表 2)。那他霉素与他克莫司对 16.7% 菌株(4/24)有协同效应,对其余菌株无协同效应,无拮抗效应(表 3)。两性霉素 B 与他克莫司对 29.2% 菌株(7/24)有协同效应,对其余菌株无协同效应,无拮抗效应(表 4)。镰刀菌对 4 种抗真菌药物氟康唑、伏立康唑、两性霉素和那他霉素敏感的比例分别为 0% (0/24)、38% (9/24)、8% (2/24) 和 100% (24/24)(表 5)。

表 1 氟康唑、他克莫司单用和联合使用对镰刀菌体外抗真菌药物的敏感性
Table 1 Antifungal susceptibility results of fluconazole and tacrolimus against *Fusarium solani* strains

| 菌株 | MIC _{单用} (μg/ml) | | MIC _{联合} (μg/ml) | | FICI |
|------|---------------------------|------|---------------------------|------|------|
| | 氟康唑 | 他克莫司 | 氟康唑 | 他克莫司 | |
| FS2 | 256 | 128 | 32 | 1 | 0.13 |
| FS5 | 256 | 256 | 128 | 4 | 0.52 |
| FS6 | 256 | 256 | 128 | 4 | 0.52 |
| FS7 | 256 | 8 | 128 | 4 | 1.00 |
| FS8 | 256 | 16 | 128 | 4 | 0.75 |
| FS9 | 256 | 16 | 128 | 4 | 0.75 |
| FS10 | 256 | 4 | 128 | 4 | 1.50 |
| FS11 | 256 | 256 | 128 | 4 | 0.52 |
| FS12 | 256 | 256 | 128 | 4 | 0.52 |
| FS13 | 256 | 256 | 128 | 4 | 0.52 |
| FS14 | 256 | 256 | 128 | 4 | 0.52 |
| FS16 | 64 | 256 | 128 | 4 | 2.02 |
| FS17 | 256 | 256 | 128 | 4 | 0.52 |
| FS18 | 256 | 256 | 128 | 4 | 0.52 |
| FS19 | 128 | 256 | 128 | 4 | 1.02 |
| FS20 | 256 | 256 | 128 | 4 | 0.52 |
| FS21 | 128 | 256 | 64 | 2 | 0.51 |
| FS22 | 256 | 256 | 128 | 4 | 0.52 |
| FS23 | 256 | 256 | 64 | 2 | 0.26 |
| FS24 | 256 | 256 | 64 | 2 | 0.26 |
| FS25 | 64 | 256 | 128 | 4 | 2.02 |
| FS26 | 256 | 32 | 128 | 4 | 0.63 |
| FS28 | 256 | 256 | 128 | 4 | 0.52 |
| FS29 | 256 | 256 | 128 | 4 | 0.52 |

注:FS:镰刀菌;MIC:最低抑菌浓度;FICI:部分抑菌浓度指数(协同:FICI≤0.5;无关:0.5<FICI≤4.0;拮抗:FICI>4)

Note:FS: *Fusarium solani*; MIC: minimal inhibitory concentrations; FICI: fractional inhibitory concentration index (Synergistic: FICI ≤ 0.5; independent: 0.5 < FICI ≤ 4.0; antagonism: FICI > 4)

表 2 伏立康唑、他克莫司单用和联合使用对镰刀菌体外抗真菌药物的敏感性
Table 2 Antifungal susceptibility results of voriconazole and tacrolimus against *Fusarium solani* strains

| 菌株 | MIC _{单用} (μg/ml) | | MIC _{联合} (μg/ml) | | FICI |
|------|---------------------------|------|---------------------------|------|------|
| | 伏立康唑 | 他克莫司 | 伏立康唑 | 他克莫司 | |
| FS2 | 1 | 128 | 2 | 0.50 | 2.00 |
| FS5 | 1 | 256 | 4 | 1.00 | 4.00 |
| FS6 | 1 | 256 | 4 | 1.00 | 4.00 |
| FS7 | 2 | 8 | 4 | 1.00 | 2.13 |
| FS8 | 4 | 16 | 4 | 1.00 | 1.06 |
| FS9 | 1 | 16 | 2 | 0.50 | 2.03 |
| FS10 | 4 | 4 | 4 | 1.00 | 1.25 |
| FS11 | 2 | 256 | 4 | 1.00 | 2.00 |
| FS12 | 4 | 256 | 4 | 1.00 | 1.00 |
| FS13 | 2 | 256 | 4 | 1.00 | 2.00 |
| FS14 | 1 | 256 | 1 | 0.25 | 1.00 |
| FS16 | 2 | 256 | 4 | 1.00 | 2.00 |
| FS17 | 8 | 256 | 4 | 1.00 | 0.50 |
| FS18 | 4 | 256 | 4 | 1.00 | 1.00 |
| FS19 | 4 | 256 | 4 | 1.00 | 1.00 |
| FS20 | 2 | 256 | 2 | 0.50 | 1.00 |
| FS21 | 1 | 256 | 2 | 0.50 | 2.00 |
| FS22 | 4 | 256 | 4 | 1.00 | 1.00 |
| FS23 | 2 | 256 | 4 | 1.00 | 2.00 |
| FS24 | 1 | 256 | 2 | 0.50 | 2.00 |
| FS25 | 1 | 256 | 2 | 0.50 | 2.00 |
| FS26 | 8 | 32 | 4 | 1.00 | 0.53 |
| FS28 | 2 | 256 | 4 | 1.00 | 2.00 |
| FS29 | 1 | 256 | 2 | 0.50 | 2.00 |

注:FS:镰刀菌;MIC:最低抑菌浓度;FICI:部分抑菌浓度指数(协同:FICI≤0.5;无关:0.5<FICI≤4.0;拮抗:FICI>4)

Note:FS: *Fusarium solani*; MIC: minimal inhibitory concentrations; FICI: fractional inhibitory concentration index (Synergistic: FICI ≤ 0.5; independent: 0.5 < FICI ≤ 4.0; antagonism: FICI > 4)

表 3 那他霉素、他克莫司单用和联合使用对镰刀菌体外抗真菌药物的敏感性
Table 3 Antifungal susceptibility results of natamycin and tacrolimus against *Fusarium solani* strains

| 菌株 | MIC _{单用} (μg/ml) | | MIC _{联合} (μg/ml) | | FICI |
|------|---------------------------|------|---------------------------|-------|------|
| | 那他霉素 | 他克莫司 | 那他霉素 | 他克莫司 | |
| FS2 | 4 | 128 | 4 | 0.250 | 1.00 |
| FS5 | 4 | 256 | 4 | 0.250 | 1.00 |
| FS6 | 8 | 256 | 4 | 0.250 | 0.50 |
| FS7 | 4 | 8 | 4 | 0.250 | 1.03 |
| FS8 | 8 | 16 | 16 | 1.000 | 2.06 |
| FS9 | 4 | 16 | 4 | 0.250 | 1.02 |
| FS10 | 4 | 4 | 4 | 0.250 | 1.06 |
| FS11 | 4 | 256 | 4 | 0.250 | 1.00 |
| FS12 | 8 | 256 | 8 | 0.500 | 1.00 |
| FS13 | 4 | 256 | 4 | 0.250 | 1.00 |
| FS14 | 4 | 256 | 4 | 0.250 | 1.00 |
| FS16 | 4 | 256 | 4 | 0.250 | 1.00 |
| FS17 | 8 | 256 | 4 | 0.250 | 0.50 |
| FS18 | 8 | 256 | 8 | 0.500 | 1.00 |
| FS19 | 2 | 256 | 4 | 0.250 | 2.00 |
| FS20 | 4 | 256 | 4 | 0.250 | 1.00 |
| FS21 | 4 | 256 | 2 | 0.125 | 0.50 |
| FS22 | 4 | 256 | 4 | 0.250 | 1.00 |
| FS23 | 8 | 256 | 4 | 0.250 | 0.50 |
| FS24 | 2 | 256 | 2 | 0.125 | 1.00 |
| FS25 | 4 | 256 | 4 | 0.250 | 1.00 |
| FS26 | 8 | 32 | 8 | 0.500 | 1.02 |
| FS28 | 4 | 256 | 4 | 0.250 | 1.00 |
| FS29 | 4 | 256 | 4 | 0.250 | 1.00 |

注: FS: 镰刀菌; MIC: 最低抑菌浓度; FICI: 部分抑菌浓度指数 (协同: FICI ≤ 0.5; 无关: 0.5 < FICI ≤ 4.0; 拮抗: FICI > 4)
Note: FS: *Fusarium solani*; MIC: minimal inhibitory concentrations; FICI: fractional inhibitory concentration index (Synergistic: FICI ≤ 0.5; independent: 0.5 < FICI ≤ 4.0; antagonism: FICI > 4)

表 4 两性霉素 B、他克莫司单用和联合使用对镰刀菌体外抗真菌药物的敏感性
Table 4 Antifungal susceptibility results of amphotericin B and tacrolimus against *Fusarium solani* strains

| 菌株 | MIC _{单用} (μg/ml) | | MIC _{联合} (μg/ml) | | FICI |
|------|---------------------------|------|---------------------------|------|------|
| | 两性霉素 B | 他克莫司 | 两性霉素 B | 他克莫司 | |
| FS2 | 4 | 128 | 4 | 1.00 | 1.01 |
| FS5 | 1 | 256 | 2 | 0.50 | 2.00 |
| FS6 | 1 | 256 | 2 | 0.50 | 2.00 |
| FS7 | 2 | 8 | 4 | 1.00 | 2.13 |
| FS8 | 4 | 16 | 2 | 0.50 | 0.53 |
| FS9 | 2 | 16 | 2 | 0.50 | 1.03 |
| FS10 | 2 | 4 | 2 | 0.50 | 1.13 |
| FS11 | 4 | 256 | 4 | 1.00 | 1.00 |
| FS12 | 2 | 256 | 2 | 0.50 | 1.00 |
| FS13 | 2 | 256 | 2 | 0.50 | 1.00 |
| FS14 | 4 | 256 | 1 | 0.25 | 0.25 |
| FS16 | 2 | 256 | 2 | 0.50 | 1.00 |
| FS17 | 4 | 256 | 2 | 0.50 | 0.50 |
| FS18 | 2 | 256 | 2 | 0.50 | 1.00 |
| FS19 | 2 | 256 | 2 | 0.50 | 1.00 |
| FS20 | 2 | 256 | 2 | 0.50 | 1.00 |
| FS21 | 2 | 256 | 2 | 0.50 | 1.00 |
| FS22 | 4 | 256 | 4 | 1.00 | 1.00 |
| FS23 | 4 | 256 | 2 | 0.50 | 0.50 |
| FS24 | 2 | 256 | 1 | 0.25 | 0.50 |
| FS25 | 2 | 256 | 1 | 0.25 | 0.50 |
| FS26 | 2 | 32 | 2 | 0.50 | 1.02 |
| FS28 | 4 | 256 | 2 | 0.50 | 0.50 |
| FS29 | 8 | 256 | 4 | 1.00 | 0.50 |

注: FS: 镰刀菌; MIC: 最低抑菌浓度; FICI: 部分抑菌浓度指数 (协同: FICI ≤ 0.5; 无关: 0.5 < FICI ≤ 4.0; 拮抗: FICI > 4)
Note: FS: *Fusarium solani*; MIC: minimal inhibitory concentrations; FICI: fractional inhibitory concentration index (Synergistic: FICI ≤ 0.5; independent: 0.5 < FICI ≤ 4.0; antagonism: FICI > 4)

表 5 镰刀菌对 4 种抗真菌药物的敏感性 (株数)
Table 5 Antifungal susceptibility results of four antifungal agents against *Fusarium solani* (strains)

| 真菌菌株 | 氟康唑 | | 伏立康唑 | | 两性霉素 B | | 那他霉素 | | | | | |
|------|-----|----|------|----|--------|----|------|----|---|----|---|---|
| | 敏感 | 中介 | 敏感 | 中介 | 敏感 | 中介 | 敏感 | 中介 | | | | |
| 镰刀菌属 | 0 | 0 | 24 | 9 | 13 | 2 | 2 | 21 | 1 | 24 | 0 | 0 |

3 讨论

他克莫司是从非致病真菌中提取的大环内酯类免疫抑制剂,是钙调蛋白磷酸酶的特异性抑制剂,能够抑制多种蛋白的去磷酸化过程,在眼科广泛应用于角膜移植术后抗排斥反应及变应性结膜炎的治疗^[8-9]。钙调磷酸酶是钙依赖性信号传导通路的关键酶,对多种真菌胞壁的完整性、菌丝生长、毒力及真菌药物耐受均具有重要作用,随着真菌对氟康唑等耐药性的不断增加,为临床真菌性角膜溃疡的治疗带来巨大的挑战。临床上在不断寻找联合用药方案以期增加抗真菌药物的敏感性、扩大药物的抗菌谱、减少药物的不良反应、避免耐药性的发生。对于联合用药的选择范围已经不再局限于抗真菌药物之间,免疫抑制剂与抗真菌药物的联合应用也受到广泛关注。他克莫司及其类似物与抗真菌药物联合对曲霉菌、念珠菌、皮肤癣菌、毛霉菌等多种致病性真菌具有协同效应^[10],他克莫司参与的抗真菌机制与抑制钙调神经磷酸酶信号通路,抑制 PI3K-AKT-TOR 信号通路下游靶点并同时抑制药物外流有关。镰刀菌是角膜溃疡常见的致病真菌,他克莫司联合抗真菌药物对其抑制性作用鲜见报道。

眼科常用的抗真菌药物主要为唑类及多烯类抗真菌药物,其中唑类抗真菌药物通过抑制真菌麦角固醇合成而起作用,临床常用药物包括氟康唑及伏立康唑。多烯类抗真菌药物通过与真菌细胞膜中的麦角固醇结合,增加细胞膜通透、干扰代谢,导致细胞死亡,临床常用药物包括两性霉素 B 及那他霉素。本研究中通过微量液体稀释法观察到镰刀菌对那他霉素的敏感性最高,伏立康唑次之,对氟康唑及两性霉素 B 均表现为耐药,与黎黎等^[11]、张阳等^[2,12]对眼部真菌感染的及药物敏感性分析结果一致。这表明对镰刀菌感染所致的真菌性角膜溃疡,其治疗在用药选择上受到极大限制。因此,抗真菌药物的联合使用一直是被关注的热点。Cruz 等^[13]研究表明,伏立康唑与他克莫司联合使用后能够逆转对伏立康唑耐药白念珠菌株的药物敏感性。Sun 等^[14]研究表明,他克莫司与氟康唑联合使用能够在唑类耐药白念珠菌的抗菌实验中发挥协同作用。Steinbach 等^[15]研究表明,他克莫司与多烯类代表药物两性霉素 B 联合使用对烟曲霉菌有明确的协同抗真菌作用。他克莫司与抗真菌药物协同发挥作用依赖于钙离子依赖的信号传导途径,使钙调磷酸酶失活,从而抑制依赖活化 T 细胞核因子的细胞因子基因的转录,而钙调磷酸酶对于真菌胞壁的完整性、毒力及真菌对抗真菌药物耐受均具有重要作用。

本研究结果显示,针对临床分离的镰刀菌,他克莫司与氟康唑及伏立康唑的协同效应较弱,并未明显提高菌株对唑类药物的敏感性。他克莫司与两性霉素 B 和那他霉素联合使用在部分菌株表现出了协同效应,但与敏感性较好的那他霉素联合后则并未出现强协同效应。分析其原因可能为:(1)体外实验不能完全发挥抑制活化 T 细胞所产生的免疫相关机制。Lee 等^[16]在对降低了免疫抑制活性的他克莫司类似物抗新型隐球菌、烟曲霉菌及白念珠菌的研究中发现,免疫抑制活性的降低会导致其与唑类抗真菌药物的协同作用下降。Vemuganti 等^[17]研究发现,真菌性角膜炎的病理过程是病原菌和宿主反应共同作用的结果,免疫反应一旦开始,即使去除抗原成分,反应也仍会继续进行;在病程发展过程中,真菌并非持续存在,在疾病早期病原体通过侵袭力、毒力、多种酶类及黏附机制致病,感染后的进一步损伤则是由宿主免疫反应及过强的炎症反应所致,而非病原菌。因此,在体外抗真菌研究中免疫反应与炎症反应的参与情况可能产生巨大影响,他克莫司与抗真菌药物联合应用的协同作用可能因此受到限制,有待进一步的在体研究进行验证。(2)真菌的抗药性与其生物膜的形成有关。生物膜不是由单个细胞产生的,而是由一类细胞群体构成,外面由其自身产生的能供养整个群体生存的营养物质等组成的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)紧紧包裹,使整个群体紧密连接而不易遭到破坏。研究表明,真菌的生物膜形成可增加对抗真菌药物的耐药性,避免遭受宿主的攻击,并且成为在体内持续存在的感染源^[18]。Córdova-Alcántara 等^[19]研究发现,镰刀菌在体外培养 12 h 后即可产生生物膜前体,培养 24~48 h 即可进入成熟期,并随着成熟度的增加,抗药性明显增加。本研究中所使用的菌种为镰刀菌,不同于其他研究中的白念珠菌或烟曲霉菌等,因此在抗真菌效应上可能存在一定的差异。联合使用他克莫司对两性霉素 B 和那他霉素抗镰刀菌有一定的协同作用,对氟康唑及伏立康唑的协同作用甚微,本研究结果进一步丰富了致病真菌菌株的药物敏感性以及联合免疫抑制剂的效应作用研究。

综上所述,镰刀菌在体外对那他霉素敏感,对两性霉素 B 及伏立康唑部分敏感。各抗真菌药物与他克莫司联合应用均对部分镰刀菌有协同效应,无拮抗效应。本研究为他克莫司联合使用抗真菌药物在眼科真菌感染性疾病治疗的临床应用提供了参考,但体外药物敏感性研究结果与临床药物治疗效果之间存在转化的空间,有待进一步的动物实验和临床研究进行证实。

利益冲突 所有作者均声明不存在任何利益冲突

参考文献

- [1] 陈晓莲,刘红山,何宏,等.中国热带地区真菌性角膜溃疡致病菌种类及药物敏感性分析[J].中华实验眼科杂志,2017,35(2):156-160. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.02.013. Chen XL, Liu HS, He H, et al. Analysis of causative genus of keratomycosis and antifungal susceptibility in tropical area of China [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2017, 35(2): 156-160. DOI: 10. 3760/ cma. j. issn. 2095-0160. 2017. 02. 013.
- [2] 张阳,王智群,孙旭光.2007至2016年我国北方地区真菌性角膜炎病原学及药物敏感性分析[J].中华眼科杂志,2018,54(6):432-436. DOI:10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2018.06.009. Zhang Y, Wang ZQ, Sun XG. Analysis of etiology and *in vitro* drug susceptibility of fungal keratitis in northern China [J]. Chin J Ophthalmol, 2018, 54(6): 432-436. DOI: 10. 3760/ cma. j. issn. 0412-4081. 2018. 06. 009.
- [3] 蔡霞.眼部真菌感染的病原学分析[J].检验医学与临床,2017,14(z2):312-314. DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.26.162.
- [4] 吴伟,何梅凤,马淑媚,等.广州地区某眼科医院2004-2008年眼部真菌感染病原学分析[J].中山大学学报:医学科学版,2010,31(6):852-855,861. Wu W, He MF, Ma SM, et al. Etiological analysis on ocular fungal infection of ophthalmologic hospital in Guangzhou [J]. J Sun Yat-Sen Univer (Med Sci), 2010, 31(6): 852-855, 861.
- [5] CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, 4th edition. CLSI standard M27 [M]. 4th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017.
- [6] CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. 3rd ed. CLSI standard M38 [M]. 3rd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017.
- [7] Mukherjee PK, Sheehan DJ, Hitchcock CA, et al. Combination treatment of invasive fungal infections [J]. Clin Microbiol Rev, 2005, 18(1): 163-194. DOI: 10. 1128/CMR. 18. 1. 163-194. 2005.
- [8] Sacchetti M, Abicca I, Bruscolini A, et al. Allergic conjunctivitis: current concepts on pathogenesis and management [J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2018, 32(1 Suppl. 1): 49-60.
- [9] Abud TB, Di ZA, Kheirkhah A, et al. Systemic immunomodulatory strategies in high-risk corneal transplantation [J]. J Ophthalmic Vis Res, 2017, 12(1): 81-92. DOI: 10. 4103/2008-322X. 200156.
- [10] Zhang M, Yang X, Wang D, et al. Antifungal activity of immunosuppressants used alone or in combination with fluconazole [J]. J Appl Microbiol, 2019, 126(5): 1304-1317. DOI: 10. 1111/jam. 14126.
- [11] 黎黎,王智群,李然,等.2005~2006年眼部真菌感染的病原学及药物敏感性分析[J].眼科,2008,17(1):44-47. Li L, Wang ZQ, Li R, et al. Etiological analysis and *in vitro* drug resistance on the ocular fungal infection in the period of 2005-2006 [J]. Ophthalmol CHN, 2008, 17(1): 44-47.
- [12] 张阳,王智群,孙旭光.2009至2010年眼部真菌感染的病原学及药物敏感性分析[J].中华眼科杂志,2013,49(4):345-349. DOI:10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2013.04.011. Zhang Y, Wang ZQ, Sun XG. Analysis of etiology and *in vitro* drug resistance of ocular fungal infection in period of 2009-2010 [J]. Chin J Ophthalmol, 2013, 49(4): 345-349. DOI: 10. 3760/ cma. j. issn. 0412-4081. 2013. 04. 011.
- [13] Cruz MC, Goldstein AL, Blankenship JR, et al. Calcineurin is essential for survival during membrane stress in *Candida albicans* [J]. EMBO J, 2002, 21(4): 546-559. DOI: 10. 1093/emboj/21. 4. 546.
- [14] 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.
- [15] Steinbach WJ, Singh N, Miller JL, et al. *In vitro* interactions between antifungals and immunosuppressants against *Aspergillus fumigatus* isolates from transplant and nontransplant patients [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(12): 4922-4925. DOI: 10. 1128/ AAC. 48. 12. 4922-4925. 2004.
- [16] Lee Y, Lee KT, Lee SJ, et al. *In vitro* and *in vivo* assessment of FK506 analogs as novel antifungal drug candidates [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2018, 62(11) DOI: 10. 1128/ AAC. 01627-18.
- [17] Vemuganti GK, Garg P, Gopinathan U, et al. Evaluation of agent and host factors in progression of mycotic keratitis: A histologic and microbiologic study of 167 corneal buttons [J]. Ophthalmology, 2002, 109(8): 1538-1546. DOI: 10. 1016/s0161-6420(02)01088-6.
- [18] Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, et al. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance [J]. J Bacteriol, 2001, 183(18): 5385-5394. DOI: 10. 1128/jb. 183. 18. 5385-5394. 2001.
- [19] Córdova-Alcántara IM, Venegas-Cortés DL, Martínez-Rivera MÁ, et al. Biofilm characterization of *Fusarium solani* keratitis isolate: increased resistance to antifungals and UV light [J]. J Microbiol, 2019, 57(6): 485-497. DOI: 10. 1007/s12275-019-8637-2.

(收稿日期:2020-03-23 修回日期:2020-07-01)

(本文编辑:刘艳)

读者·作者·编者

本刊对来稿中计量单位的使用要求

本刊计量单位的使用执行 GB 3100/3101/3102-1993《国际单位制及其应用/有关量、单位和符号的一般原则/(所有部分)量和单位》的有关规定,具体执行可参照中华医学会杂志社编写的《法定计量单位在医学上的应用》第3版(人民军医出版社2001年出版)。作者在撰写论文时应注意单位名称与单位符号不可混用。组合单位符号中表示相除的斜线为2条时本刊采用 ng/(kg·min) 的形式,而不用 ng/kg/min 的形式。应尽可能使用单位符号,也可以与非物理单位(如:人、次、台等)的汉字构成组合形式的单位,如:次/min。在叙述中请先列出法定计量单位数值,括号内写旧制单位数值;如果同一计量单位反复出现,可在首次出现时注明法定计量单位与旧制单位的换算系数,然后只列出法定计量单位数值。参量及其公差均需附单位,当参量与其公差的单位相同时,单位可只写1次,即加圆括号将数值组合,置共同单位符号于全部数值之后。例如:“75.4 ng/L±18.2 ng/L”可以表示为“(75.4±18.2)ng/L”。量的符号一律用斜体字,如吸光度(旧称光密度)的符号为*A*。

根据国家质量监督局和卫生部联合发出的质技监局量函[1998]126号文件《关于血压计量单位使用规定的补充通知》,凡是涉及人体及动物体内的压力测定,可以使用毫米汞柱(mmHg)或厘米水柱(cmH₂O)为计量单位,但首次使用时应注明 mmHg 或 cmH₂O 与 kPa 的换算系数(1 mmHg=0.133 kPa, 1 cmH₂O=0.098 kPa)。

(本刊编辑部)