

小檗碱与氟康唑合用抗白念珠菌耐受菌的研究

宋泽成, 马闪闪, 胡巧灵, 仲华, 王彦

Study on the effect of berberine combined with fluconazole on *Candida albicans* tolerant strains

SONG Zecheng, MA Shanshan, HU Qiaoling, ZHONG Hua, WANG Yan

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.2097-2024.202409047>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

青藏高原肺结核合并念珠菌感染患者的病原菌分布特点及耐药率分析

Distribution characteristics and drug resistance rate of pathogenic bacteria in patients with pulmonary tuberculosis combined with *Candida* infection on the Tibetan plateau

药学实践与服务. 2024, 42(6): 260-262, 272 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202304014

新斯的明与山莨菪碱联合应用对肺型氧中毒的保护作用及其机制的研究

Protective effect and mechanisms of neostigmine in combination with anisodamine against pulmonary oxygen toxicity

药学实践与服务. 2024, 42(10): 433-438, 444 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202310049

铜绿假单胞菌合并按蚊伊丽沙白菌肺部感染的病例分析

Analysis of pulmonary infection of *Pseudomonas aeruginosa* combined with *Elizabethkingia anophelis*

药学实践与服务. 2024, 42(5): 223-226 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202310042

基于真实世界数据的药物利用研究综述

Review of drug utilization research based on real-world data

药学实践与服务. 2024, 42(6): 238-243 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202312010

基于联合库存的公立医院多院区药品采购模式分析

Analysis of drug procurement model of multiple areas based on joint inventory in public hospitals

药学实践与服务. 2024, 42(7): 315-318 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202401002

耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌及大肠埃希菌临床分离株耐药性及耐药基因分析

Analysis of resistance situation and resistance genes of clinical isolates of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*

药学实践与服务. 2024, 42(10): 439-444 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202309059



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 论著 ·

小檗碱与氟康唑合用抗白念珠菌耐受菌的研究

宋泽成¹, 马闪闪¹, 胡巧灵^{1,2}, 仲 华¹, 王 彦^{1,3} (1. 海军军医大学药理学系, 上海 200433; 2. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122; 3. 真菌感染性疾病教育部医药基础研究创新中心, 上海 200433)

[摘要] 目的 研究小檗碱(BBR)与氟康唑(FLC)联合用药的体外抗耐受白念珠菌作用。方法 利用微量液基稀释法测定 FLC 单用对 8 株白念珠菌的最低抑菌浓度(MIC)以确定其对 FLC 的敏感性; 通过琼脂平皿纸片扩散实验从 FLC 敏感菌株中筛选出 FLC 耐受菌株; 利用琼脂平皿纸片扩散实验考察 BBR 与 FLC 联合用药对 FLC 耐受白念珠菌的作用。结果 选取的 8 株白念珠菌皆为 FLC 敏感菌株, 其 MIC₅₀ 值均<0.5 μg/ml; 菌株 Y0109、9821、7879、7654、9296 在恒温培养 48 h 后抑菌圈内出现菌落生长, 表现出对 FLC 的耐受现象; 菌株 Y0109 与 9821 在 BBR 与 FLC 联用时, 恒温培养 48 h 后抑菌圈内的菌落数随 BBR 浓度的升高而逐渐减少, 抑菌圈随 BBR 浓度的升高而逐渐清晰, 随 FLC 载药量的增大而增大, 显示出剂量依赖关系。结论 BBR 与 FLC 联合用药具有良好的抗 FLC 耐受白念珠菌效果。

[关键词] 白念珠菌; 小檗碱; 氟康唑; 联合用药; 药物耐受

[文章编号] 2097-2024(2024)00-0001-05

[DOI] 10.12206/j.issn.2097-2024.202409047

Study on the effect of berberine combined with fluconazole on *Candida albicans* tolerant strains

SONG Zecheng¹, MA Shanshan¹, HU Qiaoling^{1,2}, ZHONG Hua¹, WANG Yan^{1,3} (1. School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China; 2. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China; 3. The Center for Fungal Infectious Diseases Basic Research and Innovation of Medicine and Pharmacy, Ministry of Education, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the combined effect of berberine (BBR) and fluconazole (FLC) on FLC-tolerant *Candida albicans* in vitro. **Methods** The sensitivity of 8 strains of *Candida albicans* to FLC was assessed by determining their minimal inhibitory concentration (MIC) using broth microdilution method. FLC-tolerant strains were screened from FLC-sensitive strains by disk diffusion assay. The effect of BBR combined with FLC on FLC-tolerant *Candida albicans* was investigated by disk diffusion assay. **Results** All eight strains of *Candida albicans* exhibited sensitivity to FLC, with minimal inhibitory concentration (MIC₅₀) values below 0.5 μg/ml. Strains Y0109, 9821, 7879, 7654, and 9296 displayed colony growth in the inhibition zone after 48 hours of constant temperature incubation, indicating FLC tolerance. When strains Y0109 and 9821 were subjected to a combination of BBR and FLC, the number of colonies within the inhibition zone decreased progressively with the increase of BBR concentration following a 48-hour constant temperature culture. The inhibition zone became clear with the increasing of BBR concentration and increased with the increase of FLC loading, which showed a dose-dependent relationship. **Conclusion** The interaction between BBR and FLC demonstrated efficacy against FLC-tolerant strains.

[Key words] *Candida albicans*; berberine; fluconazole; drug combination; drug tolerance

全球每年由念珠菌引发的侵袭性真菌感染病例约有 70 万例^[1], 特别是在重症监护室中, 患者往往由于免疫力低下, 更易受到真菌感染所带来的危害。据报道, 成年人感染念珠菌血症的死亡率高

达 40% ~ 70%^[2]。与此同时, 白念珠菌(*Candida albicans*)作为临床最常见的机会致病性念珠菌, 又是全球范围内侵袭性念珠菌的最主要病原体^[1]。因此, 针对白念珠菌感染的药物治疗研究, 一直是人们关注的热点问题。目前, 临床上广泛应用于治疗白念珠菌感染的抗真菌药物主要有唑类(氟康唑、伊曲康唑)、多烯类(两性霉素 B)、棘白菌素类(卡泊芬净)和 5-氟胞嘧啶。然而, 随着临床上抗真菌药物的滥用, 耐药菌株的报道也越来越多, 严重影响了常规抗真菌药的疗效。更加不幸的是, 近年来

[基金项目] 生物安全项目(145AHQ082021000X); 国家自然科学基金(82204470)

[作者简介] 宋泽成, 硕士研究生, 研究方向: 药理学, Email: szc3266402@126.com

[通信作者] 王 彦, 博士生导师, 研究方向: 抗感染与抗炎药物药理学, Email: wangyansmmu@126.com

研究发现,即便是严格使用经体外药敏试验提示敏感的抗真菌药物进行治疗,仍有部分患者表现出迁延不愈和复发的症状,这种临床疗效与菌株低耐药性不一致的现象可能与白念珠菌药物耐受菌株的增加有关^[3]。

耐受性是指药物敏感菌株在最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)以上的高浓度药物中的生长能力,其特征是能够在高剂量抗真菌药物中存活而MIC不变。相反,耐药性则通常是由遗传突变引起的,其特征是测试菌株的MIC升高^[4]。临床菌株的抗真菌药物敏感性实验是在24 h读取的,但耐受菌株生长缓慢,在培养24~48 h后才会显现出高于MIC下生长的能力,因此,在临床检测中,真菌对药物的耐受性在很大程度上被忽视^[3,5]。然而,随着持续性念珠菌死亡率增加,人们对菌株耐受性问题的关注也日益增多^[6]。已有多项研究表明,临床分离株中有20%~60%的菌株表现出对药物的耐受性,进一步解释了临床菌株耐受性和感染治疗失败的关联^[3,5]。由此可见,白念珠菌的耐受问题给目前的临床治疗带来了更加严峻的挑战,积极应对真菌耐受性问题,开发相应的药物和治疗策略迫在眉睫。

小檗碱(berberine, BBR)又称黄连素,是一种分离自植物黄连根茎的天然季苄基异喹啉生物碱^[7]。BBR临床上广泛运用于治疗胃肠炎,细菌性痢疾等肠道疾病,它的抗菌谱较广,在体外对多种革兰阳性及阴性细菌均具有抑菌作用,且具有安全性高,不良反应少的特点。据报道,BBR在其浓度为10~50 mg/L时具有一定的抗真菌作用^[8]。课题组前期研究显示,BBR与氟康唑(fluconazole, FLC)联合使用具有显著的协同抗耐药真菌作用,通过本课题的进一步研究发现,BBR与FLC联合使用对FLC耐受白念珠菌也具有较好的抑制作用,为抗耐受真菌药物的研发提供了一定的实验基础。

1 实验材料

1.1 实验菌株

白念珠菌实验株SC5314来自美国Georgetown大学。白念珠菌(*C. albicans*)临床株Y0109、9821、7879、7654、9296、9196、7781由海军军医大学第一附属医院及第二附属医院提供。

1.2 实验试剂

BBR购自Macklin公司,CAS号:2086-83-1,货号:B875003-100mg,纯度 $\geq 99\%$;FLC购自Macklin公司,CAS号:86386-73-4,货号:F830935-

5g,纯度:98%;二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)购自国药集团化学试剂有限公司。

1.3 培养基及其配制

YPD液体培养基:酵母浸膏(购自BD公司)10.0 g,蛋白胨(购自BD公司)20.0 g,加入800 ml超纯水,充分搅拌溶解后加入D-葡萄糖20.0 g,溶解后,继续加入超纯水定容至1000 ml,经高压蒸汽灭菌(121 °C, 15 min)后,自然冷却至室温,密封放置于4 °C冰箱保存^[9]。YPD固体培养基:在YPD液体培养基成分的基础上加入20.0 g琼脂,高压蒸汽灭菌后,趁热倒入90 mm平皿中,晾干备用。

PBS缓冲溶液:精密称取NaCl 8.0 g, Na₂HPO₄·12H₂O 3.57 g, KCl 0.2 g, KH₂PO₄ 0.24 g,通过三蒸水充分溶解,并定容至1000 ml,高温高压灭菌(121 °C, 15 min)后置于4 °C冰箱内保存^[9]。

RPMI 1640培养基:RPMI Medium 1640(购自Gibco公司)10.0 g, NaHCO₃ 2.0 g, 吗啉基丙磺酸(morpholinepropanesulfonic acid, MOPS, 购自Amresco公司)34.5 g,加超纯水充分溶解后,定容至1000 ml,加入NaOH(购自Amresco公司)适量,调pH值至7.0,经0.22 μm微孔滤膜过滤除菌,放置于冰箱4 °C保存备用^[9]。

1.4 仪器

生物安全柜(BSC-1004II A2,苏州安泰空气技术有限公司);小型离心机(Hitachi CT15RE);生物显微镜(LW100T,北京测维光电技术有限公司);涡旋仪(Thermo vortex maxi mix II);霉菌培养箱(MJ-150-I,上海一恒科学仪器有限公司);酶标仪(Thermo Multiskan FC,赛默飞世尔上海仪器有限公司)。

2 实验方法

2.1 菌株的活化及菌悬液的配制

菌株于YPD与甘油1:1混合的溶液中保存,冻存于-80 °C冰箱中。菌株活化时,吸取10 μl菌液加入装有1 ml新鲜YPD培养液的15 ml玻璃摇菌管中,在30 °C气浴恒温振荡培养箱中震荡(200 r/min)培养24 h,之后再次从菌悬液中吸取10 μl加入到1 ml新鲜YPD培养液中,继续以30 °C震荡培养16 h后即活化完成,此时真菌处于指数生长的后期,可用于后续实验。

将活化完成的待测菌株转移至1.5 ml离心管中,以3000 rpm离心1 min,吸弃上清液,随后使用1 ml PBS缓冲液反复吹打洗涤菌株,再次离心弃上清液,如此反复3次后再用1 ml PBS缓冲液

重悬菌液。再取 10 μl 真菌原液稀释后使用细胞计数板于生物显微镜下计数, 计算出真菌原液浓度, 用 RPMI 1640 培养液稀释配制实验所需菌液浓度。

2.2 微量液基稀释法测定 MIC

MIC 依据美国临床和实验室标准协会 (CLSI) 出版的微量液基稀释法实验手册 (M27-A3) 所规定的实验方法与试验标准来测定。具体方法如下: 首先将处于指数生长末期的待测菌株用 RPMI 1640 培养基调整菌浓度至 1×10^3 CFU/ml (colony-forming units, 菌落形成单位)。取一块 96 孔板, 在第 1 列加入 RPMI 1640 培养基 100 μl 作为空白对照, 在第 2 列加入菌液 200 μl , 第 3~12 列各加入菌液 100 μl ; 随后于第 2 列各孔中加入提前配置好的 FLC 药液, 吹打混匀后, 吸出 100 μl 含药菌液加入到后一系列各孔中, 如此以 2 倍倍比稀释至第 11 列, 第 12 列作为只含菌液的生长对照; 并且保证每列至少做 3 个复孔, 以减少实验误差。最后, 将 96 孔板放置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中静置培养。培养 24、48 h 后, 用酶标仪测定各孔在 630 nm 波长处的 A 值, 其中 A_{630} 刚好小于生长对照孔 50% 和 80% 所对应的药物浓度即为该菌 FLC 的 MIC₅₀ 和 MIC₈₀。

2.3 琼脂平皿纸片扩散实验

将活化好的待测菌株使用 PBS 缓冲液洗净重悬, 并用 PBS 缓冲液将其稀释成浓度为 1×10^6 CFU/ml 的菌悬液, 吸取 100 μl 菌液均匀涂布于 YPD 固体培养基中 (考察协同作用时, 培养基中应根据需求加入相应浓度的 BBR)。随后, 在培养基中每隔一定距离放置共 7 片灭菌滤纸片, 在纸片上滴加等体积 (5 μl) 提前配制好的 FLC 药液, 使滤纸片的载药量依次为 0、0.78、1.56、3.125、6.25、12.5、25 μg , 待药液吸收完全后将其倒置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中静置培养 72 h, 每 24 h 取出观察真菌生长状况并拍照记录。在筛选耐受菌时, 在培养基正中间放入 1 片灭菌滤纸片, 在纸片上滴加 50 mg/ml 的 FLC 药液 5 μl , 使纸片的载药量为 250 μg , 放置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中静置培养 48 h, 每 24 h 取出观察真菌生长状况并拍照记录^[10]。

3 实验结果

3.1 白念珠菌对 FLC 的 MIC 值

实验选取了 8 株白念珠菌 (含 7 株临床株) 测定其对 FLC 的 MIC 值 (表 1)。如表格中所见, 8 株白念珠菌的 MIC 值均小于 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 该结果表明, 这 8 株白念珠菌皆为 FLC 敏感菌株。

表 1 测定 8 株白念珠菌对 FLC 的 MIC 值

菌株	MIC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	MIC ₈₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
SC5314	0.125	0.25
Y0109	0.25	0.5
9821	0.125	0.125
7879	0.125	0.125
7654	0.125	0.125
9296	0.25	0.25
9161	0.25	0.25
7781	0.125	0.125

3.2 FLC 耐受白念珠菌菌株的筛选

利用琼脂平皿纸片扩散实验, 考察上述 8 株敏感型白念珠菌对 FLC 的耐受性。结果显示 (图 1), 在单用 FLC 的情况下, 恒温培养 24 h 后, 8 株菌株均可观察到明显的抑菌圈, 而培养 48 h 后, 在菌株 Y0109、9821、7879、7654、9296 的抑菌圈中, 可以观察到明显的菌落生长, 而其余菌株的抑菌圈内无菌落生长, 该结果表明, 菌株 Y0109、9821、7879、7654、9296 对 FLC 产生了耐受现象, 可将其归类为 FLC 耐受菌株。

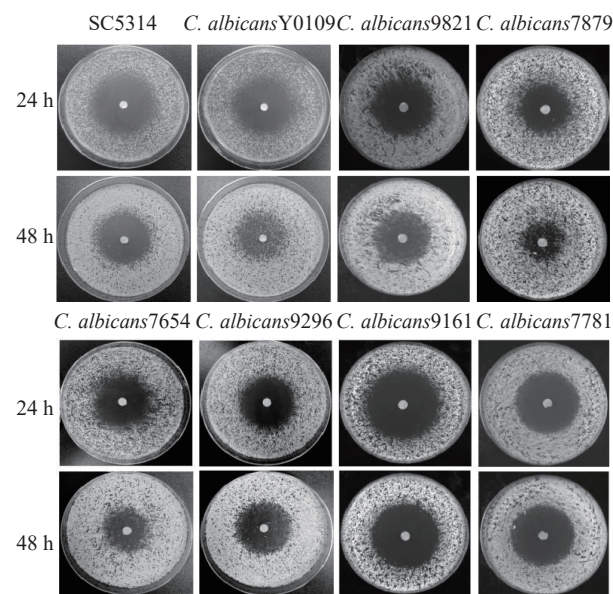


图 1 纸片扩散实验测定 8 株白念珠菌对 FLC 的耐受性

3.3 BBR 与 FLC 联用抗耐受白念珠菌的作用

从考察菌株耐受性的抑菌圈实验中可以看出, 5 株氟康唑耐受菌株根据耐受强度可大致分为两类: 高度耐受菌株 Y0109、7879、7654; 低度耐受菌株 9821、9296。课题组从这两类中分别选择了 Y0109 及 9821 作为研究对象, 利用琼脂平皿纸片扩散实验考察 BBR 与 FLC 联用是否具有抗 FLC 耐受白念珠菌作用。结果显示 (图 2), 耐受菌

Y0109 和 9821 在培养 48 h 后, 与不含 BBR 的对照培养皿相比, 含不同浓度(2 ~ 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$) BBR 平皿上的 FLC 载药滤纸片周围形成了明显的抑菌圈, 抑菌圈内的菌落数随着 BBR 浓度的升高而逐

渐减少, 抑菌圈随 BBR 浓度的增加而逐渐清晰, 随 FLC 载药量的增大而增大, 显示出剂量依赖关系。上述结果表明, BBR 与 FLC 联合用药具有良好的抗 FLC 耐受白念珠菌的作用。

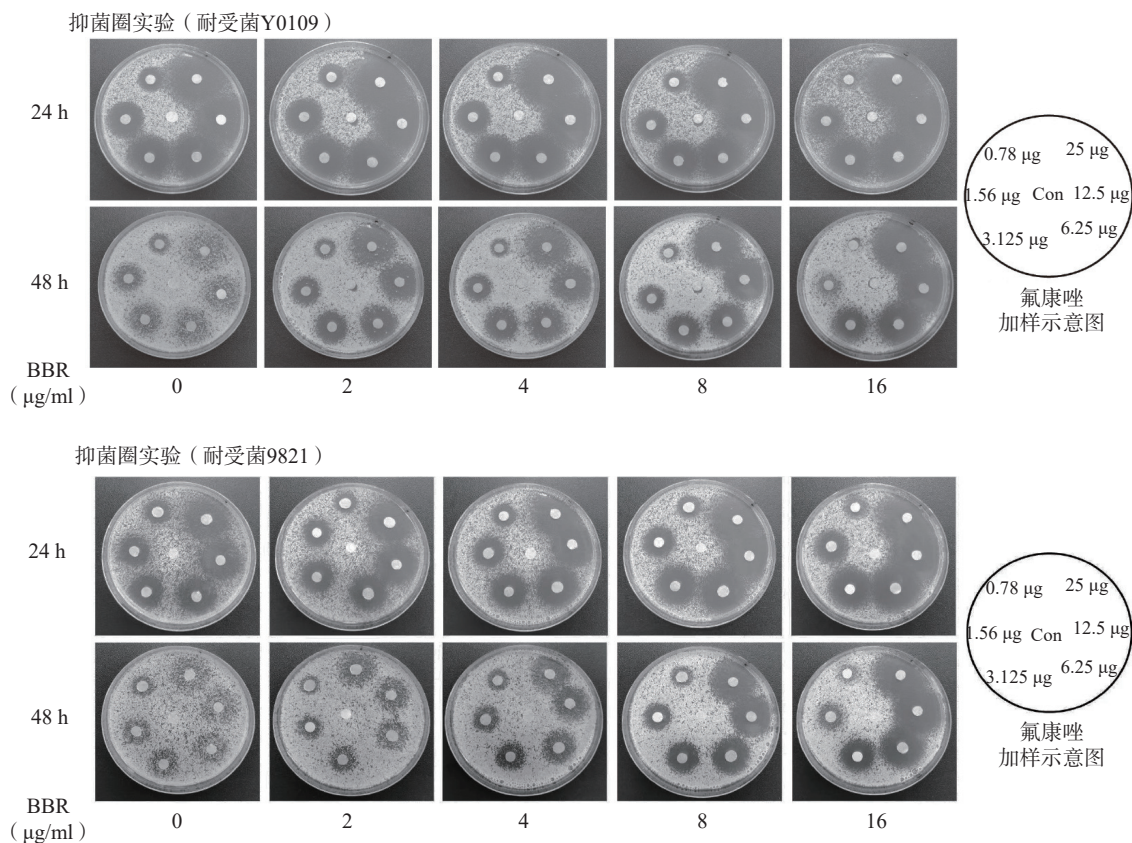


图 2 BBR 与 FLC 联用对 FLC 耐受菌 Y0109、9821 的抑制作用

4 讨论

白念珠菌对抗真菌药物的耐药问题一直是临床抗真菌感染研究的热点, 而针对其耐受相关问题的研究却往往被人们忽视。多项研究表明, 耐受是耐药的重要前提和基础, 耐药突变更有可能源自于真菌的耐受亚群^[3, 11, 12]。因此, 研究白念珠菌对抗真菌药物的耐受机制和相应的治疗策略具有重大的临床意义。

BBR 作为一味历史悠久的抗菌药, 在我国作为 OTC 药物用于防治腹泻性疾病已超过 60 年, 其疗效和安全性均得到了普遍认可。本课题组前期研究发现, BBR 与 FLC 在体外具有较好的协同抗耐药白念珠菌的作用, 这种协同作用与菌株对 FLC 的抗性有关, 且两药的协同作用取决于 BBR 的浓度, 而不是 FLC 的浓度^[13]。进一步研究发现, FLC 能够对细胞膜造成损伤, 从而促进 BBR 对白念珠菌的侵袭, 随后, BBR 通过引起白念珠菌的细胞周期阻滞和 DNA 损伤发挥抗菌作用^[14]。

目前, 越来越多的研究表明, 耐受和耐药的产生机制不同, 而压力应答调控被认为是白念珠菌产生药物耐受的最重要方式之一。压力应答调控是真菌的一种应激策略, 这一机制的产生对药物的靶点没有直接的影响^[15]。它主要通过包括热休克蛋白 90(Hsp 90)、蛋白激酶 C、钙调磷酸酶以及雷帕霉素靶蛋白(target of rapamycin, TOR)等在内的关键因子与其相应的 Ca^{2+} -钙调磷酸酶、PKC-MAPK、Rim 途径和 HOG 信号通路来调节白念珠菌对压力环境的应答, 从而对唑类、多烯类和棘白菌素类等抗真菌药物产生耐受作用^[16]。此外, 白念珠菌还可以通过压力应答调控来影响其对药物的摄取和外排, 从而间接地促进白念珠菌对药物的耐受能力^[3]。在本研究中, 我们发现 BBR 与 FLC 的联合用药对于耐受白念珠菌具有很好的疗效, 其作用机制是否与抑制白念珠菌的压力应答调控有关有待进一步探究。

联合用药一直以来都是临床抗真菌治疗的重要发展方向, 该治疗策略不仅可以克服真菌的耐受

与耐药难题,还可以增强原有药物的抗真菌作用,极大缓解新药研发的压力。本课题组研究发现,BBR与FLC联用不仅具有显著的协同抗耐药白念珠菌作用,对FLC耐受白念珠菌也具有较强的抑制作用,为寻找新的抗耐药和耐受白念珠菌药物和治疗方法提供了新思路,值得我们进一步深入探索。

【参考文献】

- [1] LOGAN C, MARTIN-LOECHES I, BICANIC T. Invasive candidiasis in critical care: challenges and future directions[J]. *In-tensive Care Med*, 2020, 46(11): 2001-2014.
- [2] LASS-FLÖRL C, KANJ S S, GOVENDER N P, et al. Invasive candidiasis[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2024, 10(1): 20.
- [3] ROSENBERG A, ENE I V, BIBI M, et al. Antifungal tolerance is a subpopulation effect distinct from resistance and is associated with persistent candidemia[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 2470.
- [4] KE W X, XIE Y Y, CHEN Y Y, et al. Fungicide-tolerant persister formation during cryptococcal pulmonary infection[J]. *Cell Host Microbe*, 2024, 32(2): 276-289. e7.
- [5] DRUSEIKIS M, MOTTOLA A, BERMAN J. The metabolism of susceptibility: clearing the FoG between tolerance and resistance in *Candida albicans*[J]. *Curr Clin Microbiol Rep*, 2023, 10(2): 36-46.
- [6] FENG Y R, LU H, WHITEWAY M, et al. Understanding fluconazole tolerance in *Candida albicans*: implications for effective treatment of candidiasis and combating invasive fungal infections[J]. *J Glob Antimicrob Resist*, 2023, 35: 314-321.
- [7] RAUF A, ABU-IZNEID T, KHALIL A A, et al. Berberine as a potential anticancer agent: a comprehensive review[J]. *Molecules*, 2021, 26(23): 7368.
- [8] 江涛, 曹煜, 赵秀华, 等. 22种中草药有效成分抗真菌研究及新剂型应用[J]. *中华皮肤科杂志*, 1999, 32(5): 316-318.
- [9] LEE J S, JUNG W K, JEONG M H, et al. Sanguinarine induces apoptosis of HT-29 human colon cancer cells via the regulation of Bax/Bcl-2 ratio and caspase-9-dependent pathway[J]. *Int J Toxicol*, 2012, 31(1): 70-77.
- [10] AHSAN H, REAGAN-SHAW S, BREUR J, et al. Sanguinarine induces apoptosis of human pancreatic carcinoma AsPC-1 and BxPC-3 cells via modulations in Bcl-2 family proteins[J]. *Cancer Lett*, 2007, 249(2): 198-208.
- [11] COWEN L E, SINGH S D, KÖHLER J R, et al. Harnessing Hsp90 function as a powerful, broadly effective therapeutic strategy for fungal infectious disease[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(8): 2818-2823.
- [12] LEVIN-REISMAN I, RONIN I, GEFEN O, et al. Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance[J]. *Science*, 2017, 355(6327): 826-830.
- [13] QUAN H, CAO Y Y, XU Z, et al. Potent *in vitro* synergism of fluconazole and berberine chloride against clinical isolates of *Candida albicans* resistant to fluconazole[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50(3): 1096-1099.
- [14] LI D D, XU Y, ZHANG D Z, et al. Fluconazole assists berberine to kill fluconazole-resistant *Candida albicans*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(12): 6016-6027.
- [15] BERMAN J, KRYSAN D J. Drug resistance and tolerance in fungi[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2020, 18(6): 319-331.
- [16] IYER K R, ROBBINS N, COWEN L E. The role of *Candida albicans* stress response pathways in antifungal tolerance and resistance[J]. *iScience*, 2022, 25(3): 103953.

【收稿日期】 2024-09-23 【修回日期】 2024-11-23

【本文编辑】 李睿旻