

八角茴香挥发油抗念珠菌活性的体外研究

赵俊丽 骆志成 武三卯 周晓黎 薛晓云 石磊 李文竹

【摘要】 目的 探讨八角茴香挥发油体外抗念珠菌活性及与氟康唑在联合抑菌实验中的相互作用。方法 参照 NCCLS M27-A 方案中的微量液基稀释法检测八角茴香挥发油对 130 株临床分离念珠菌的最小抑菌浓度(MIC)与最小杀菌浓度(MFC),并以氟康唑作为质控药物;同时采用棋盘微量稀释法对 18 株念珠菌进行了八角茴香挥发油与氟康唑的体外联合抑菌实验。结果 八角茴香挥发油对临床分离念珠菌的 MIC 及 MFC 分别为白念珠菌 1 517.16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 与 2 248.55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、光滑念珠菌 1 169.24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 与 2 338.49 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、近平滑念珠菌 1 320.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 与 1 741.79 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、热带念珠菌 1 203.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 与 2 407.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、克柔念珠菌 1 516.32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 与 2 144.40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及季也蒙念珠菌 1 072.64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 与 2 144.40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。八角茴香挥发油与氟康唑联用对氟康唑敏感株及耐药株均表现出较好的协同相加作用,而且未发现拮抗作用,两组间分数抑菌浓度指数(FICI)差异无显著性($P = 0.67$)。结论 八角茴香挥发油对临床常见致病性念珠菌有程度相似的抗菌作用;八角茴香挥发油与氟康唑联用对念珠菌主要表现为协同相加作用。

【关键词】 八角茴香;念珠菌属;氟康唑;微生物敏感性试验

In Vitro Anti-candidal Activity of the Essential Oil of *Illicium verum* ZHAO Jun-li, LUO Zhi-cheng, WU San-mao, ZHOU Xiao-li, XUE Xiao-yun, SHI Lei, LI Wen-zhu. Department of Dermatology, The Second Affiliated Hospital of Lanzhou Medical College, Lanzhou 730030, China

【Abstract】 Objective To investigate the *in vitro* anti-candidal activity of the essential oil of *Illicium verum* (EOIV) alone and in combination with fluconazole. **Methods** The minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum fungicidal concentration (MFC) of EOIV were determined in 130 clinically isolated *Candida* strains by NCCLS-M27-A microdilution method, and fluconazole was used as positive control. Meanwhile the checkerboard microdilution method was applied to assay the combined effect of EOIV and fluconazole in 18 candidal strains. **Results** For the 18 candidal strains the MICs and the MFCs of EOIV were 1 517.16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 2 248.55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for *C. albicans*, 1 169.24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 2 338.49 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for *C. glabrata*, 1 320.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 1 741.79 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for *C. parapsilosis*, 1 203.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 2 407.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for *C. tropicalis*, 1 516.32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 2 144.40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for *C. krusei*, and 1 072.64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 2 144.40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for *C. guilliermondii*, respectively. Significant synergistic and additive effects were observed after the combination of EOIV with fluconazole, and no antagonism was found. There was no significant difference in the mean fractional inhibitory concentration index (FICI) between the fluconazole-susceptible and the fluconazole-resistant candidal strains ($P = 0.671$). **Conclusion** EOIV has antifungal effects on medically important *Candida* spp.. The combination of EOIV with fluconazole presents a synergistic and additive effects.

【Key words】 Essential oil, *Illicium verum*; *Candida*; Fluconazole; Microbial sensitivity tests

随着糖皮质激素、免疫抑制剂及广谱抗生素的广泛使用以及艾滋病的逐渐流行,念珠菌的感染率急剧上升。从药用植物中寻找新型的高效低毒抗真菌药物已成为目前的研究热点之一。初步研究表明,八角茴香挥发油在体外有抑制皮肤癣菌的作用^[1]。我们参照美国国家临床实验室标准化委员会(NCCLS)M27-A 微量稀释法方案^[2],检测了八角茴香挥发油对常见致病性念珠菌的最小抑菌浓度

(MIC)及最小杀菌浓度(MFC),并以氟康唑作为质控药物;同时采用棋盘微量稀释法^[3]检测了其于氟康唑的体外联合抗念珠菌活性。

材料与方 法

一、材料

1. 临床菌株:自我院疑似念珠菌感染患者的痰、口腔或阴道分泌物及手、足、肛周等皮损处共分离 130 株念珠菌,所有菌株分离纯化后经芽管试验、厚壁孢子试验及 API 20C AUX 系统进行鉴定,其中白念珠菌 110 株,光滑念珠菌 8 株,近平滑念

作者单位:730030 兰州医学院第二附属医院皮肤科(赵俊丽、骆志成、武三卯、周晓黎、薛晓云、李文竹),检验科(石磊)

通信作者:骆志成

珠菌 5 株,克柔念珠菌 2 株,热带念珠菌 3 株,季也蒙念珠菌 2 株。

2. 标准菌株:由北京大学真菌和真菌病中心提供,分别为白念珠菌 ATCC 90028、近平滑念珠菌 ATCC 90018 与 ATCC 22019(质控菌株)。

3. 抗真菌药物:八角茴香购自某药材市场,经兰州医学院生药教研室马志刚教授鉴定,为八角科植物八角茴香(*Illicium verum* Hook. f.)干燥果实。八角茴香挥发油采用水蒸气蒸馏法提取,出油率 6.50%,比重 0.9720;氟康唑(FCZ)由上海三维药业公司提供(批号 200107005),纯度为 100%,用无菌蒸馏水制成质量浓度为 1 280 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的储存液,置 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

4. 培养基:改良沙氏固体培养基(SDA);RPMI 1640 液基,按 NCCLS 方案^[2]配制。

二、方法

1. 微量稀释法测定 MIC 与 MFC:参照 NCCLS-M27-A 方案^[2],采用微量稀释法检测,但有以下几点说明。①抗真菌药物稀释液制备:将八角茴香挥发油以吐温 80 溶解后,用 RPMI 1640 液基倍比稀释,使其终质量浓度为 97.20 ~ 48 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$,吐温 80 终体积分数为 0.005%(v/v);氟康唑储存液用 RPMI 1640 液基倍比稀释,使其终质量浓度为 0.125 ~ 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。②MIC 终点判定:经 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h 后用视觉法判定终点。与生长对照孔比较,生长完全抑制,培养基清亮所对应的最低药物浓度为八角茴香挥发油的 MIC;与生长对照孔比较 $\geq 80\%$ 生长抑制所对应的最低药物浓度为 FCZ 的 MIC。③MFC 值的判定^[4]:培养 48 h 后,从每个无任何可见生长的孔内分别取 10 μL 接种于 SDA 培养基,再次 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 3 d,观察结果,无可见菌落形成的一孔所对应的最低药物浓度为其 MFC 值。④设置质量控制:对质控菌株进行反复测定,每次实验其 MIC 终点处于挥发油受试浓度范围的中心时,方可认为试验结果有效,连续实验中允许有 2 个稀释度差异。

2. 棋盘微量稀释法评估分数抑菌浓度指数(FICI)^[3]:选氟康唑耐药株 8 株,敏感株 10 株,用于测定八角茴香挥发油与氟康唑的联合抗真菌作用。

①将 FCZ 母液及吐温 80 溶解后的八角茴香挥发油以 RPMI 1640 液基作 7

级倍比稀释,使药物达到 4 倍终浓度,即八角茴香挥发油的终质量浓度为 379.08 ~ 24 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$,FCZ 的终质量浓度为 0.5 ~ 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。②将不同浓度的两种联用药物各 50 μL 按棋盘滴定法加入 96 孔药敏板中。③判定标准同 FCZ,观察结果后计算 FICI。当 $\text{FICI} \leq 0.5$ 时为协同作用; $0.5 < \text{FICI} \leq 1$ 时为相加作用; $1 < \text{FICI} \leq 2$ 时为无关;当 $\text{FICI} > 2$ 时为拮抗作用。

3. 统计分析:应用 SPSS10.0 统计分析软件包进行统计学处理。

结 果

一、八角茴香挥发油及氟康唑对念珠菌的 MIC 及 MFC

八角茴香挥发油对念珠菌的 MIC 范围为 379.08 ~ 3 032.64 $\mu\text{g}/\text{mL}$,MFC 范围为 1 516.32 ~ 6 065.28 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。几何均数($G \pm s$)结果见表 1,八角茴香挥发油对 6 种菌的 MIC 均值经方差分析 $F = 0.76, P = 0.60 > 0.05$, 差异无显著性;MFC 值经方差分析 $F = 0.84, P = 0.52 > 0.05$, 差异无显著性。

二、八角茴香挥发油与氟康唑联用时的 MIC 值及 FICI 值

FCZ 敏感组 10 株:在单独和联合 FCZ 时的八角茴香挥发油的 MIC 分别为 1536.51 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及 707.39 $\mu\text{g}/\text{mL}$,经配对 t 检验, $t = 8.57, P < 0.0001$, 差异有显著性;在单独和联合八角茴香挥发油时的 FCZ 的 MIC 分别为 3.249 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及 0.813 $\mu\text{g}/\text{mL}$,经配对 t 检验, $t = 6.71, P < 0.0001$, 差异有显著性。

表 1 八角茴香挥发油及氟康唑对念珠菌的 MIC 与 MFC 几何均值($G \pm s$) $\mu\text{g}/\text{mL}$

菌株	菌株数	八角茴香挥发油		氟康唑
		MIC	MFC	MIC
临床菌株				
白念珠菌	110	1 517.16 \pm 734.06	2 248.55 \pm 1 210.80	6.43 \pm 1.33
光滑念珠菌	8	1 169.24 \pm 784.77	2 338.49 \pm 1 569.54	32.54 \pm 7.97
近平滑念珠菌	5	1 320.03 \pm 928.55	1 741.79 \pm 678.12	4.22 \pm 2.18
热带念珠菌	3	1 203.50 \pm 437.72	2 407.01 \pm 875.45	6.82 \pm 1.28
克柔念珠菌	2	1 516.32 \pm 0.00	2 144.40 \pm 1 072.20	36.48 \pm 10.12
季也蒙念珠菌	2	1 072.64 \pm 536.10	2 144.40 \pm 1 072.20	2.23 \pm 0.53
质控菌株				
近平滑念珠菌	1	1 119.98 \pm 388.20	2 338.49 \pm 758.16	3.36 \pm 2.24
参考菌株				
白念珠菌	1	1 444.40 \pm 788.68	2 032.64 \pm 826.24	0.50 \pm 0.29
近平滑念珠菌	1	1 064.35 \pm 655.28	2 264.93 \pm 1 064.35	0.55 \pm 0.26

注:表中 G 为几何均数, s 为标准差。每次药敏实验中均有 1 株质控菌株及 1 株参考菌株

FCZ 耐药组 8 株;在单独和联合用药时的八角茴香挥发油的 MIC 分别为 1 866.81 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 758.16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 经配对 t 检验, $t = 3.87, P = 0.006$, 差异有显著性;FCZ 的 MIC 分别为 64.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 4.76 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 经配对 t 检验 $t = 4.16, P = 0.004$, 差异有显著性。

八角茴香油与 FCZ 联用时对 FCZ 敏感株及 FCZ 耐药株, 大多数表现为协同或相加作用, 仅 1 株氟康唑耐药株的结果为无关作用, 无拮抗作用菌株。FCZ 敏感组 FICI 为 0.750 ± 0.251 , FCZ 耐药组 FICI 为 0.563 ± 0.554 , 经 t 检验, $t = 0.44, P = 0.671$, 差异无显著性。

讨 论

近年来, 氟康唑耐药已成为困扰临床治疗念珠菌病的一个重要问题。尤其在 AIDS 患者中, 据统计合并白念珠菌感染者大约有 33% 对氟康唑耐药^[5]。耐药菌株的出现严重威胁着人类健康, 因此迫切需要寻找安全性好、抗菌谱广且价格低廉的新型抗真菌药物。目前, 有关中草药及其单体抗真菌作用的研究已有较多报道^[6-8]。

有研究报道八角茴香挥发油在体外有较强的抑制皮肤癣菌的作用^[1]。八角茴香挥发油的主要成分为反式茴香醚(E-anethole), 且含量达 80% 以上, De 等^[9]通过研究证实八角茴香抗真菌的主要成分是反式茴香醚。我们参照 M27-A 方案, 采用微量稀释法检测了八角茴香挥发油的体外抗念珠菌活性, 并以氟康唑作为质控药物。结果表明八角茴香挥发油对几种常见致病性念珠菌均较敏感, 各菌种间 MIC 值及 MFC 值差异均无显著性。可见八角茴香挥发油不仅对白念珠菌、热带念珠菌、近平滑念珠菌有抗菌作用, 也同样对唑类不敏感的克柔念珠菌和光滑念珠菌有程度相似的抗菌作用。在联合抑菌实验中两种药物对测试念珠菌大多表现为协同或相加作用, 未发现拮抗作用, 且每一种药物的 MIC 值几何均数均明显减少, 表明八角茴香挥发油与氟康唑联用时不仅对氟康唑敏感株具有较好的协同

和/或相加作用, 而且能明显提高氟康唑耐药株对氟康唑的敏感性。这种协同效应可以使化学合成药物的有效治疗用量大大降低, 从而减低其不良反应, 增强杀菌效果并防止耐药发生。

一般认为两种药物之间发生协同或相加作用表明它们具有不同的抗菌机制。由于氟康唑作用于真菌细胞的靶位是细胞色素 P450 甾醇合成酶, 通过抑制该酶的活性而使真菌麦角固醇的合成受阻, 从而改变真菌细胞膜的化学成分, 使其通透性发生改变, 导致真菌死亡。因此我们认为八角茴香挥发油的抗菌机制可能与氟康唑有不同之处, 但具体抗菌机制尚未明确, 还需通过诸如电镜、动物实验等方法进行深入研究, 从细胞、亚细胞水平研究其抗菌机制并进一步评价其体内的抗菌效果。八角茴香挥发油生产工艺简单, 产品成本低, 毒性小, 具有潜在的应用前景。

参 考 文 献

- 1 李俭, 刘为众, 马淑霞, 等. 混合挥发油抗真菌作用的实验观察. 佳木斯医学院学报, 1989, 12: 103-105.
- 2 Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; Approved Standard M27-A. The National Committee for Clinical Laboratory Standards. USA, National Committee for Clinical Laboratory Standards. Pennsylvania, 1997.1-21.
- 3 Vant Hof W, Reijnders IM, Helmerhorst EJ, et al. Synergistic effects of low doses of histatin 5 and its analogues on amphotericin B antimycotic activity. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2000, 78: 163-169.
- 4 Hammer KA, Carson CF, Riley TV. In-vitro activity of essential oils, in particular *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and tea tree oil products, against *Candida* spp. *J Antimicrob Chemother*, 1998, 42: 591-595.
- 5 White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev*, 1998, 11: 382-402.
- 6 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. *中华皮肤科杂志*, 1999, 32: 316-318.
- 7 方芳, 吕昭萍, 王正文, 等. 山苍子油抗念珠菌的敏感性及其作用机理的电镜研究. *中华皮肤科杂志*, 2002, 35: 349-351.
- 8 付爱华, 张宏贵, 张林, 等. 东北刺人参挥发油抗真菌实验及临床研究. *中华皮肤科杂志*, 1997, 30: 310-311.
- 9 De M, De AK, Sen P, et al. Antimicrobial properties of star anise (*Illicium verum* Hook f). *Phytother Res*, 2002, 16: 94-95.

(收稿日期: 2003-09-05)

性传播疾病规范化诊疗培训班办班消息

中国医学科学院中国协和医科大学皮肤病研究所拟于 2004 年 10 月下旬在南京举办国家级继续医学教育项目—性传播疾病规范化诊疗培训班(项目编号 J15-04-07, I 类学分 14 分, 项目负责人苏晓红)。该项目主要介绍性病诊疗的规范化临床服务、国内外(美国疾病控制中心、欧洲、世界卫生组织)最新性病推荐治疗方案、我国重点防治的 8 种性传播疾病的诊断和治疗、相关皮肤病的鉴别诊断以及性病防治的最新研究动态。本次培训为期 6 天, 学费 650 元(含报名费、资料费)。联系地址: 南京市太平门外蒋王庙街 12 号(邮编 210042), 中国医学科学院皮肤病研究所, 联系人: 葛凤琴, 联系电话: 025-85478011, 传真: 025-85421323, E-mail: nistd@jmail.com.cn