

舍曲林抗新生隐球菌的体外及动物实验研究

周南 黄晨 潘炜华 廖万清

(第二军医大学长征医院皮肤病真菌病研究所 上海市医学真菌分子生物学重点实验室 全军真菌病重点实验室, 上海 200003)

【摘要】 目的 评估舍曲林抗新生隐球菌的效果。方法 实验分为 6 组, 分别为空白对照组、10 mg/mL 氟康唑、10 mg/mL 舍曲林、20 mg/mL 舍曲林、10 mg/mL 氟康唑联用 10 mg/mL 舍曲林以及 10 mg/mL 氟康唑联用 20 mg/mL 舍曲林组。通过体外药敏试验及 BALBc 小鼠新生隐球菌动物探讨各组间抗隐球菌效果的差异。结果 体外药敏试验发现舍曲林可有效降低新生隐球菌菌落数, 当与氟康唑联用时抑菌效果更显著。动物实验发现 2 种浓度的舍曲林都可明显降低感染小鼠实验早期脑、肺组织的新生隐球菌菌落数, 但在实验后期, 低浓度的舍曲林对感染小鼠脑组织失去抑菌作用。脑、肺组织中, 舍曲林治疗对新生隐球菌的抗菌效果均不如氟康唑。舍曲林与氟康唑联合用药对新生隐球菌模型小鼠肺组织的抗菌效果强于单用舍曲林或氟康唑。结论 舍曲林具有抗新生隐球菌的作用, 当与氟康唑联合用药时可起到协同作用。

【关键词】 新生隐球菌; 舍曲林; 体外实验; 动物实验

【中图分类号】 R 379.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-3827(2011)05-0267-04

Anti-fungal effect of sertraline on *Cryptococcus neoformans* in vitro and in vivo

ZHOU Nan, HUANG Chen, PAN Wei-hua, LIAO Wan-qing

(Shanghai Key Laboratory of Molecular Medical Mycology, PLA Key Laboratory of Mycosis, Institute of Dermatology and Mycosis of Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003)

【Abstract】 **Objective** To assess the efficacy of sertraline on *Cryptococcus neoformans*. **Methods** Fungal-loaded mice were treated by fluconazole (10 mg/mL), sertraline (10 mg/mL, 20 mg/mL), or fluconazole combined with sertraline (10 mg/mL & 10 mg/mL, 10 mg/mL & 20 mg/mL). Drug-sensitivity tests were performed *in vitro* with different concentrations of sertraline and fluconazole above. **Results** Colony numbers of *Cryptococcus neoformans* decreased *in vitro* in sertraline group, while much more evidently in combination group of sertraline and fluconazole. In the early stage, both concentrations of sertraline could significantly decrease the colony numbers of *Cryptococcus neoformans* in lung and brain tissue. However, in the later stage, 10 mg/mL of sertraline showed no anti-fungal effect in brain tissue. Fluconazole was superior to sertraline in lung and brain tissue, and much more efficient in antifungal therapy when combined with sertraline. **Conclusions** Sertraline is efficient on *Cryptococcus neoformans*, and may have synergistic action to fluconazole.

【Key Words】 *Cryptococcus neoformans*; sertraline; *in vitro*; *in vivo*

[Chin J Mycol, 2011, 6(5):267-270]

新生隐球菌是一种严重危害人类健康的医学真菌,它不仅侵犯免疫缺陷患者,也常感染正常人群。近年来,由于免疫抑制剂、皮质类固醇激素、抗生素的广泛应用、器官移植、静脉插管和体内植入人工物等侵袭性诊疗技术的推广应用以及艾滋病

患者的增多,隐球菌感染率不断增高。据统计,非洲 AIDS 患者中隐球菌病的发生率高达 30%,美国约 6%~10%^[1]。隐球菌可侵犯全身各脏器,但以侵犯中枢神经系统最为常见,临床主要表现为亚急性或慢性脑膜炎、脑膜脑炎,少数可表现为颅内占位性病变。其病情重,治疗困难,病死率高^[2]。

虽然目前多种药物已广泛应用于隐球菌感染的临床治疗,但仍各有优缺点,如药物不良反应突

作者简介:周南,女(汉族),硕士研究生在读。E-mail:yanyan4353@yahoo.com.cn

通讯作者:廖万清,E-mail:liaowanqing@sohu.com

出,在脑脊液中的浓度偏低等,因此需要探寻新的、更成熟的抗隐球菌药物^[3]。

舍曲林是最强的选择性 5-羟色胺摄取抑制剂之一^[4],主要用于各种抑郁症及强迫症^[5],是目前广泛使用的治疗严重月经前期综合症的一线用药^[6]。2001 年奥地利学者 Lass-Flörl C 首次发现了舍曲林的抗白念珠菌作用,3 位同时患有月经前期焦虑障碍和复发性阴道念珠菌病的患者接受舍曲林的治疗后,复发性阴道念珠菌病没有再次发生,同时该研究小组对念珠菌属的不同种及曲霉属的不同种进行了体外药敏实验,结果表明舍曲林有快速有效的抗真菌作用^[7-8]。

本研究通过体外药敏实验,观察舍曲林对新生隐球菌的敏感试验;同时构建新生隐球菌感染的小鼠模型,探讨舍曲林对隐球菌感染的治疗效果。

1 材料与方 法

1.1 体外实验

材料 菌株 新生隐球菌标准株 H99 来自中国医学真菌保藏管理中心隐球菌专业实验室。

药物 舍曲林标准化学体购自 SIGMA 公司,纯度大于 99.9%;氟康唑原粉由西安杨森制药有限公司提供,纯度大于 99%。

培养基 酵母浸膏 (YEPD) 液体和固体培养基, RPMI-1640 液体培养基 (Life Technologies Inc, NY. 14072 Osa.)。

主要试剂和器材 96 孔细胞培养板、麦氏比浊管、血细胞计数板均购自上海求精生化试剂仪器有限公司;0.5 ~ 20 μL 、10 ~ 100 μL 微量加样器 (大龙医疗设备有限公司,中国),恒温振荡培养箱 (江苏太仓实验设备厂,中国),分析天平 (DT-100A,天津市精科材料试验机厂,中国),光学显微镜 (OLYMPUS 公司,日本);无菌试管、水、真菌培养皿均购自江苏太仓实验设备厂;涂棒,棉签,生理盐水。

方法 菌株的活化 保存菌株复温后,使用 YEPD 液体培养基振荡培养箱 30 $^{\circ}\text{C}$ 180 r/min 培养 24 h 活化。

菌悬液的配制 将活化后的菌株转种于 YEPD 培养基平皿,30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h 后,挑取单菌落于 RPMI-1640 培养基,血细胞计数板调整菌悬液浓度为 $5 \times 10^3/\text{mL}$,将调整后的菌悬液再次接种 YEPD 平皿培养基并确证菌悬液浓度。

实验分组 共分成 6 组,每组 4 根试管,每根试管加有上述浓度的菌悬液 1 mL。组 1:菌悬液中加入 10 μL 生理盐水作为空白对照组。组 2:菌悬液中加入 10 mg/mL 氟康唑 10 μL 。组 3:菌悬液中加入 10 mg/mL 舍曲林 10 μL 。组 4:菌悬液中加入 20 mg/mL 舍曲林 10 μL 。组 5:菌悬液中加入 10 mg/mL 氟康唑及 10 mg/mL 舍曲林各 10 μL 。组 6:菌悬液中加入 10 mg/mL 氟康唑及 20 mg/mL 舍曲林各 10 μL 。

培养方法 将加入抗菌素的菌悬液分别全部转入 YEPD 固体培养基和液体培养基中,30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 d,观察菌落计数。

1.2 体内实验

材料 菌株及药物 同实验 1.1。

实验动物 选用清洁级 BALBc 小鼠 (复旦大学实验动物中心),体重为 (18 \pm 2) g,雌性。

方法 新生隐球菌菌悬液的制备 保存菌株复温后,使用 YEPD 液体培养基振荡培养箱 30 $^{\circ}\text{C}$ 180 r/min 培养 24 h 活化;将活化后的菌株转种于 YEPD 培养基平皿,30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h 后,挑选单个菌落于 1 mL 生理盐水中,调节菌悬液浓度至 1×10^6 CFU/mL。

实验动物分组及方法 鼠龄 6 ~ 8 周的雌性 BALBc 小鼠 75 只,经尾静脉注射^[9]0.1 mL 上述新生隐球菌菌悬液。实验共分 6 组。组 1 ($n = 15$):新生隐球菌小鼠模型制备后 1 ~ 5 d 予以生理盐水 10 mg/kg 灌胃。组 2 ($n = 10$):新生隐球菌小鼠模型制备后 1 ~ 5 d 予以氟康唑 10 mg/kg 灌胃。组 3 ($n = 15$):新生隐球菌小鼠模型制备前 1 ~ 5 d 以及后 1 ~ 5 d 予以舍曲林 10 mg/kg 灌胃。组 4 ($n = 15$):新生隐球菌小鼠模型制备前 1 ~ 5 d 以及后 1 ~ 5 d 予以舍曲林 20 mg/kg 灌胃。组 5 ($n = 10$):新生隐球菌小鼠模型制备前 1 ~ 5 d 予以舍曲林 10 mg/kg 灌胃,模型制备后 1 ~ 5 d 予以舍曲林 10 mg/kg 和氟康唑 10 mg/kg 灌胃。组 6 ($n = 10$):新生隐球菌小鼠模型制备前 1 ~ 5 d 予以舍曲林 20 mg/kg 灌胃,模型制备后 1 ~ 5 d 予以舍曲林 20 mg/kg 和氟康唑 10 mg/kg 灌胃。于模型制备后第 1 d 组 1、组 3、组 4 各处死 5 只小鼠;于模型制备后第 3、5 d 组 1、组 2、组 3、组 4、组 5、组 6 各处死 5 只小鼠。小鼠处死后取脑组织和肺组织,研磨,稀释,取研磨液涂布于 YEPD 培养基,行菌落计数。

1.3 统计学分析

试验结果均以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件,对各组数据行方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 体外实验

培养 2 d 后对各组培养基进行新生隐球菌计数,结果发现舍曲林与氟康唑联合用药明显抑制新生隐球菌的生长。不同浓度的舍曲林皆可有效抑制新生隐球菌;但 10 mg/mL 舍曲林的抗菌效果较氟康唑差 ($P < 0.01$),20 mg/mL 舍曲林的抑菌效果与氟康唑无统计学差异(见表 1)。

表 1 新生隐球菌菌悬液体外培养 3 d 后菌落数 (CFU)

Tab.1 Colony numbers of *Cryptococcus neoformans* in suspension solution after 3-day culture *in vitro*

	组 1	组 2	组 3	组 4	组 5	组 6
固体培养基	1×10^7	1×10^2	7×10^3	8×10^2	0	0
液体培养基	1×10^7	1×10^2	2.5×10^3	2.5×10^2	0	0

2.2 体内实验

予以 BALBc 小鼠尾静脉注射 0.1 mL 新生隐球菌菌悬液后第 1 d、3 d、5 d,其脑组织及肺组织研磨液培养后新生隐球菌菌落数呈进行性升高,说明新生隐球菌动物模型制备成功。予以灌胃处理 10 mg/kg 或 20 mg/kg 剂量的舍曲林可明显降低新生隐球菌模型小鼠第 1 d 脑组织及肺组织的研磨液培养后的新生隐球菌菌落数 ($P < 0.05$),具有统计学意义;但随着时间的延长,低浓度舍曲林对感染小鼠脑组织研磨液培养后的新生隐球菌菌落数影响无统计学差异 ($P > 0.05$),高浓度舍曲林对菌落计数的影响有统计学差异 ($P < 0.05$),不同浓度的舍曲林都可有效的抑制肺组织新生隐球菌菌落数 ($P < 0.05$)。脑组织及肺组织中,舍曲林治疗对新生隐球菌的抗菌效果均不如氟康唑,具有统计学差异 ($P < 0.05$)。舍曲林与氟康唑联合治疗对新生隐球菌模型小鼠肺组织的抗菌效果较单独药物的效果要强 ($P < 0.05$)。见表 2~4。

3 讨 论

舍曲林是最强的选择性 5-羟色胺摄取抑制剂之一,主要用于各种抑郁症及强迫症,其主要的药

表 2 新生隐球菌模型第 1 天小鼠脑组织和肺组织培养后菌落数 (CFU)

Tab.2 Colony numbers of *Cryptococcus neoformans* in lung and brain tissue culture on day 1 after model establishment

	组 1	组 3	组 4
脑组织菌落数 ($\times 10^3$)	6.73 ± 0.5	$4.0 \pm 0.5^{\bullet}$	$2.12 \pm 0.36^{\bullet\Delta}$
肺组织菌落数	93.6 ± 10.14	$57.4 \pm 19.37^{\bullet\Delta}$	$45.0 \pm 21.77^{\bullet}$

注: \bullet . 与组 1 比较 $P < 0.01$, Δ . 与组 3 比较 $P < 0.01$; $n = 5$

理作用机制是通过选择性抑制中枢神经元对 5-羟色胺 (5-HT) 的再摄取,增加突触部位有效 5-HT 的浓度,从而增强 5-HT 能神经兴奋传导效力。舍曲林的药代动力学研究表明,其在正常人体内吸收缓慢,血药浓度达峰时间 (T_{max}) 为 6 ~ 8 h,生物利用度为 88%,半衰期约为 24 h^[10],生物利用度不受食物和给药时间的影响,血浆蛋白结合率高,舍曲林主要在肝脏代谢,不足 0.2% 以原形随尿排出。舍曲林具有线性的药代动力学特征^[11-13],在临床相应的 50 ~ 200 mg/d 剂量内的固定治疗剂量研究表明,50 mg/d 舍曲林治疗是最佳治疗方案^[14]。与其他抗真菌药物比较,舍曲林在脑脊液中的浓度更高,远远超过同期血浆中的浓度 (约大于 40 倍),而且更高的浓度也利于其抗真菌作用的发挥^[10],由于舍曲林在血液达到有效抑菌浓度的时间较氟康唑长,因此本研究在新生隐球菌模型制备前即开始给予舍曲林治疗。我们研究发现在制备新生隐球菌模型之前预先给予舍曲林预防治疗,可明显减少第 1 d 脑组织及肺组织的新生隐球菌菌落数,且在脑组织中,增加舍曲林的剂量其抑菌效果增强。

本研究体外实验结果发现舍曲林可有效抑制新生隐球菌菌落数量,具有较强的抗新生隐球菌作用。2003 年该研究小组又报道了舍曲林可以显著影响白念珠菌的菌丝延长、磷脂酶活性、分泌性天冬氨酸蛋白水解酶的产生以及真菌的活性等,而且巨噬细胞在舍曲林的作用下可以更好地降低孢子萌发率,从而推测舍曲林可以降低白念珠菌等真菌病原体在体内的毒性^[15]。本研究的体内试验证实,在肺组织中低剂量或高剂量舍曲林治疗均可有效抑制新生隐球菌模型制备后 1 ~ 5 d 的隐球菌生长,低剂量组与高剂量组之间无明显统计学差异,但其抑菌效果不如氟康唑治疗组;在脑组织中,给予高剂量舍曲林可有效抑制隐球菌的生长,但其抑

表 3 新生隐球菌模型第 3 天小鼠脑组织和肺组织培养后菌落数 (CFU)

Tab. 3 Colony numbers of *Cryptococcus neoformans* in lung and brain tissue culture on day 3 after model establishment

	组 1	组 2	组 3	组 4	组 5	组 6
脑组织菌落数 (10 ⁴)	238.0 ± 26.0	99.8 ± 33.5 [●]	176.4 ± 13.0 [▲]	170.2 ± 31.8 ^{●▲}	94.0 ± 42.6 ^{●◆■}	92.6 ± 33.7 ^{●◆■*}
肺组织菌落数 (10 ²)	77.2 ± 22.1	16.0 ± 4.8 [●]	43.0 ± 9.3 ^{●▲}	20.6 ± 4.9 ^{●▲◆}	11.2 ± 3.46 ^{●▲◆■}	9.4 ± 2.2 ^{●▲◆■*}

注: ●. 与组 1 比较 P < 0.05, ▲. 与组 2 比较 P < 0.05, ◆. 与组 3 比较 P < 0.05, ■. 与组 4 比较 P < 0.05, *. 与组 5 比较 P > 0.05; n = 5

表 4 新生隐球菌模型第 5 天小鼠脑组织和肺组织培养后菌落数 (CFU)

Tab. 4 Colony numbers of *Cryptococcus neoformans* in lung and brain tissue culture on day 5 after model establishment

	组 1	组 2	组 3	组 4	组 5	组 6
脑组织菌落数 (10 ⁴)	804.2 ± 287.7	229.4 ± 56.0 [●]	423.6 ± 97.3 [▲]	369.6 ± 140.7 ^{●▲}	183.0 ± 36.6 ^{●◆■}	178.0 ± 85.7 ^{●◆■}
肺组织菌落数 (10 ²)	95.8 ± 18.6	38.2 ± 13.0 [●]	64.0 ± 15.6 ^{●▲}	64.6 ± 15.9 ^{●▲}	22.8 ± 5.6 ^{●▲◆}	7 ± 6.2 ^{●▲◆■*}

注: ●. 与组 1 比较 P < 0.05, ▲. 与组 2 比较 P < 0.05, ◆. 与组 3 比较 P < 0.05, ■. 与组 4 比较 P < 0.05, *. 与组 5 比较 P < 0.05; n = 5

菌效果较氟康唑差。

唑类药物与细胞色素 P450 类固醇合成酶结合,抑制该酶的催化活性,从而抑制麦角类固醇的生成,有研究表明,舍曲林和伊曲康唑或两性霉素 B 的联合用药可以对某些曲霉起到协同作用^[16]。本研究发现舍曲林与氟康唑联合应用与单药治疗比较抑制新生隐球菌的生长效果更显著。

综上所述,舍曲林具有抗新生隐球菌作用,尤其是与氟康唑联合治疗时可起到协同作用,但舍曲林抗真菌的作用机制目前尚不清楚,有待进一步研究。

参考文献

[1] Wu G, Vilchez RA, Eidelman B, et al. Cryptococcal meningitis: an analysis among 5521 consecutive organ transplant recipients [J]. *Transpl Infect Dis*, 2002, 4(4):183-188.

[2] Subramanian S, Mathai D. Clinical manifestations and management of cryptococcal infection [J]. *J Postgrad Med*, 2005, 51 (Suppl 1):S21-S26.

[3] Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of America [J]. *Clin Infect Dis*, 2010, 50 (3):291-322.

[4] Hyttel J. Comparative pharmacology of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) [J]. *Nord J Psychiatry*, 1993, 47 (Suppl 30):5-12.

[5] 车宁,梁晓丽. 舍曲林的药理和临床应用 [J]. *药学实践杂志*, 1997, 15(6):336-337.

[6] Dimmock PW, Wyatt KM, Jones PW, et al. Efficacy of selective serotonin-reuptake inhibitors in premenstrual syndrome: a systematic review [J]. *Lancet*, 2000, 356 (9236):1131-1136.

[7] Lass-Flörl C, Dierich MP, Fuchs D, et al. Antifungal activity

against *Candida* species of the selective serotonin reuptake inhibitor sertraline [J]. *Clin Inf Dis*, 2001, 33: e135-e136.

[8] Lass-Flörl C, Dierich MP, Fuchs D, et al. Antifungal properties of selective serotonin reuptake inhibitors against *Aspergillus* species *in vitro* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2001, 48 (6): 775-779.

[9] 王溪涛,温海,徐赤宇,等. C57BL/6 小鼠感染新生隐球菌对大脑皮质 BDNF 和 bFGF 表达的影响 [J]. *中国麻风皮肤病杂志*, 2007, 23(7):579-582.

[10] Preskorn SH. Pharmacokinetics of antidepressants: why and how they are relevant to treatment [J]. *J Clin Psychiatry*, 1993, 54 (Suppl):14.

[11] De Vane CL. Pharmacokinetics of the selective serotonin reuptake inhibitors [J]. *J Clin Psychiat*, 1992, 53 (Suppl):13-20.

[12] Preskorn SH. Clinically relevant pharmacology of selective serotonin reuptake inhibitors [J]. *Clin Pharmacokinet*, 1997, 32 (suppl):11-21.

[13] Hienke C, Härtter S. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors [J]. *Pharmacol Ther*, 2000, 85(1):11-28.

[14] Warrington SJ, Ronfeld RA, Wilner KD, et al. Human pharmacokinetics of sertraline [J]. *Clin Neuropharmacol*, 1992, 15 (suppl. 1):54.

[15] Lass-Flörl C, Ledochowski M, Fuchs D, et al. Interaction of sertraline with *Candida* species selectively attenuates fungal virulence *in vitro* [J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2003, 35 (1):11-15.

[16] Heller I, Leitner S, Dierich MP, et al. Serotonin (5-HT) enhances the activity of amphotericin B against *Aspergillus fumigatus in vitro* [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2004, 24 (4):401-404.

[收稿日期] 2011-05-24
[本文编辑] 卫凤莲