



扫码阅读电子版

伊曲康唑雾化吸入预防侵袭性肺曲霉病药效学研究

卢鑫¹ 朱颖¹ 王丽¹ 施毅² 高海燕¹ 杨健¹ 张秀伟¹

¹南京医科大学附属江宁医院呼吸内科 211100; ²解放军南京总医院呼吸与危重症医学科 210002

通信作者: 张秀伟, Email: zhangxiuweiwy@126.com

【摘要】 目的 通过动物实验对雾化吸入伊曲康唑对侵袭性肺曲霉病 (IPA) 的预防效果做初步探讨。方法 免疫抑制小鼠 IPA 模型, 分别给予雾化吸入伊曲康唑预防、腹腔注射治疗及两种联合用药, 烟曲霉感染前 2 天或感染后开始给药, 持续至感染后第 7 天。比较各组小鼠生存率及肺组织真菌负荷。结果 与伊曲康唑腹腔注射相比, 雾化吸入伊曲康唑作为预防、两种联合用药均能有效提高小鼠生存率, 降低小鼠肺组织真菌负荷。结论 动物实验证明伊曲康唑雾化吸入给药是一种有效的预防 IPA 的给药方式。

【关键词】 侵袭性肺曲霉病; 伊曲康唑; 预防; 治疗; 雾化吸入

基金项目: 南京市医学科技发展项目 (YKK13215)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-436X.2019.07.009

Efficacy of itraconazole inhalations for prevention of invasive pulmonary aspergillosis in mice

Lu Xin¹, Zhu Ying¹, Wang Li¹, Shi Yi², Gao Haiyan¹, Yang Jian¹, Zhang Xiuwei¹

¹Department of Respiratory Medicine, Jiangning Hospital Affiliated of Nanjing Medical University, Nanjing 211100, China; ²Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Nanjing Genral Hospital of Nanjing Military Command, PLA, Nanjing 210002, China

Corresponding author: Zhang Xiuwei, Email: zhangxiuweiwy@126.com

【Abstract】 **Objective** To evaluated the effectiveness of aerosolizing itraconazole as prophylaxis against invasive pulmonary aspergillosis (IPA) caused by *Aspergillus fumigates* in an established model. **Methods** Immunocompromised ICR mice received either itraconazole by intraperitoneal injection or by aerosolization or combination therapy. Dosing began 2 days prior or after pulmonary inoculation with *A. fumigates* and continued until 7 days after pulmonary inoculation. Survival and pulmonary fungal burden were assessed. **Results** The use of aerosolization of itraconazole as a prophylactic agent or combination therapy, was effective in reducing pulmonary fungal burden and mortality of immunosuppressed animals with pulmonary aspergillosis. **Conclusions** Aerosol administration of itraconazole used as prophylactic, can be an additional approach to optimizing treatment of IPA.

【Key words】 Invasive pulmonary aspergillosis; Itraconazole; Prophylaxis; Treatment; Inhaled

Fund program: Nanjing Medical Science and Technology Development Foundation (YKK13215)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-436X.2019.07.009

伊曲康唑是临床应用广泛的三唑类抗真菌药物, 传统用药方式为静脉及口服给药, 主要针对真菌感染的预防性治疗、经验性治疗、针对性治疗和挽救性治疗方面。气道是人体抵御曲霉感染的第一道防线, 雾化吸入应用抗真菌药物可在肺局部形成

较高药物浓度, 发挥抗真菌活性, 抑制曲霉菌丝的侵袭性生长。本研究拟通过动物实验观察伊曲康唑雾化吸入、系统给药及联合给药对侵袭性肺曲霉病 (invasive pulmonary aspergillosis, IPA) 小鼠生存率及肺部真菌负荷的影响, 对雾化吸入伊曲康唑

防治 IPA 的用药策略做初步探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物及菌株 本研究符合《赫尔辛基宣言》的原则。选用 6 周龄雌性清洁级 ICR 小鼠 60 只，分笼饲养，自由进食进水。选用 MF13 烟曲霉菌株。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物分组及处理 随机分配为 4 组，每组 15 只，设置对照组：感染未用药；腹腔注射治疗组：感染后第 2 天开始腹腔注射伊曲康唑至第 7 天；雾化预防组：感染前第 2 天开始雾化伊曲康唑至第 7 天；联合防治组：感染前第 2 天开始雾化伊曲康唑联合感染后第 2 天开始腹腔注射伊曲康唑至第 7 天。如图 1 所示，每组中随机选取 9 只小鼠观察生存情况，时间截止到感染后第 12 天；其余 6 只小鼠在感染后第 7 天脱颈处死取肺组织匀浆化检测肺真菌负荷，死亡的小鼠立即取肺组织匀浆化检测肺真菌负荷。

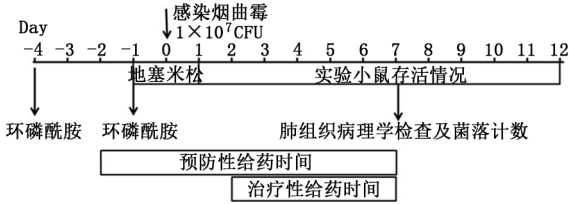


图 1 实验流程示意图

1.2.2 IPA 动物模型制备 实验小鼠采用以下方法造成免疫抑制状态：环磷酰胺 250 mg/kg 腹腔注射（感染前第 4 天及感染前第 1 天各 1 次），地塞米松 50 mg/kg 腹腔注射（感染前第 1 天、感染当天及感染后第 1 天各 1 次）。免疫抑制后采用气管插管气管内滴入法接种 50 μl 浓度为 2×10⁸ 菌落形成单位/毫升（Colony-form Units/ml, CFU/ml）的烟曲霉孢子悬液^[1]。

1.2.3 雾化吸入给药 小鼠腹腔注射 120 μl 2% 戊巴比妥麻醉后头部固定，连接雾化器启动雾化。用药剂量为 30 mg/kg，每天用药一次，雾化时间为 60 min。

1.2.4 腹腔注射给药 固定小鼠并翻转暴露腹部皮肤，选择中下腹部为进针点，缓慢注入药液后快速退针，保持此体位 30 s，伊曲康唑用量为 30 mg/kg。

1.2.5 肺组织真菌菌落负荷检测方法 无菌条件下取小鼠新鲜右肺并匀浆化，电子天平称重后按 1 g 湿肺组织：10 ml 磷酸盐缓冲液（含 0.1% 吐温 80）比例稀释，取 10 μl 稀释液接种于沙保弱培养

基平板上，置于真菌培养箱内培养，24 h 后读取平板菌落数，假设菌落数为 n，按以下公式计算：肺组织的真菌负荷 = n×10³CFU/g 鼠肺组织，换算为 Lg^[1]。

1.2.6 小鼠存活情况 每日观察各组实验小鼠生存状态直至感染后第 12 天，记录小鼠存活情况。绘制生存-时间曲线。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 16.0 软件进行数据处理，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，计数资料以百分数及百分比表示。组间计量资料的比较以单因素方差分析，组间资料采用 χ^2 检验。

2 结果

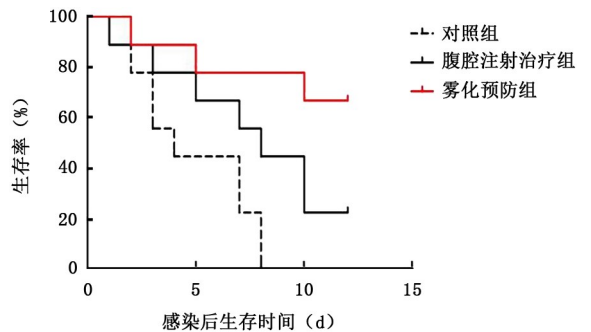
2.1 腹腔注射伊曲康唑治疗对 IPA 小鼠生存率及肺真菌负荷的影响

2.1.1 生存率比较 将腹腔注射治疗组与对照组进行比较，见图 2，腹腔注射伊曲康唑可使 IPA 小鼠生存获益，中位生存时间由 6 d 上升至 8 d (P = 0.039)。

2.1.2 肺真菌负荷比较 见图 3，对照组肺真菌负荷为 5.383±0.196，腹腔注射治疗组为 4.817±0.154，2 组比较差异有统计学意义 (P < 0.05)。腹腔注射伊曲康唑可显著降低实验小鼠肺组织真菌负荷。

2.2 伊曲康唑雾化预防用药对 IPA 小鼠生存率及肺真菌负荷的影响

2.2.1 生存率 见图 2，雾化伊曲康唑预防性用药与对照组（感染未治疗）比较小鼠生存获益，中位生存时间由 6 d 上升至 >12 d (P = 0.002)，但与腹腔注射治疗组比较小鼠生存率无明显提高 (P = 0.080)。

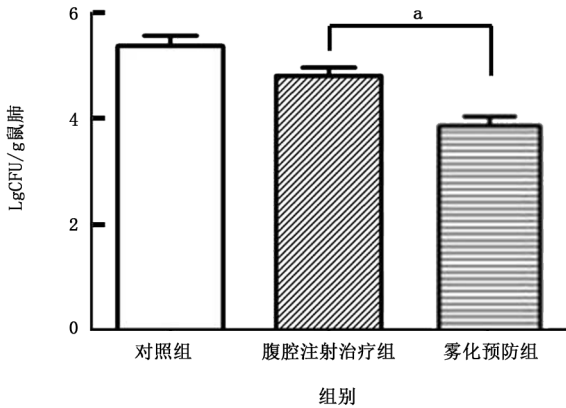


注：IPA 为侵袭性肺曲霉病

图 2 雾化预防组与腹腔注射治疗组及对照组相比对 IPA 小鼠生存时间的影响

2.2.2 肺真菌负荷 见图 3，腹腔注射治疗组肺真菌负荷为 4.817±0.154，雾化预防组肺真菌负荷为 4.233±0.199，2 组比较差异有统计学意义 (P <

0.05), 与腹腔注射治疗组比较, 雾化伊曲康唑预防性用药可显著降低实验小鼠肺组织真菌负荷。

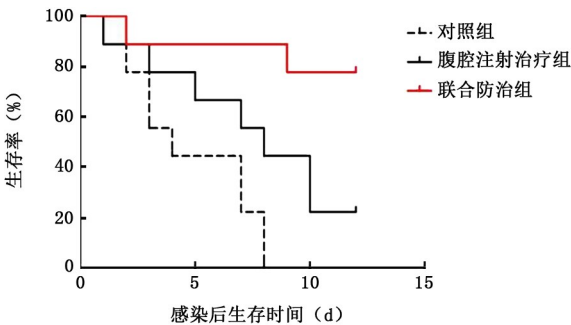


注: IPA 为侵袭性肺曲霉病; 腹腔注射治疗组肺真菌负荷为 4.817 ± 0.154 ; 雾化预防组肺真菌负荷为 4.233 ± 0.199 ; $^a P < 0.05$

图 3 雾化预防组与腹腔注射治疗组相比对 IPA 小鼠肺真菌负荷的影响

2.3 伊曲康唑雾化预防及腹腔注射治疗联合应用对 IPA 小鼠生存率及肺真菌负荷的影响

2.3.1 生存率 见图 4, 联合防治组与腹腔注射治疗组相比较, 小鼠生存率提高 ($P = 0.028$)。



注: IPA 为侵袭性肺曲霉病

图 4 联合防治组与腹腔注射治疗组及对对照组相比对 IPA 小鼠生存时间的影响

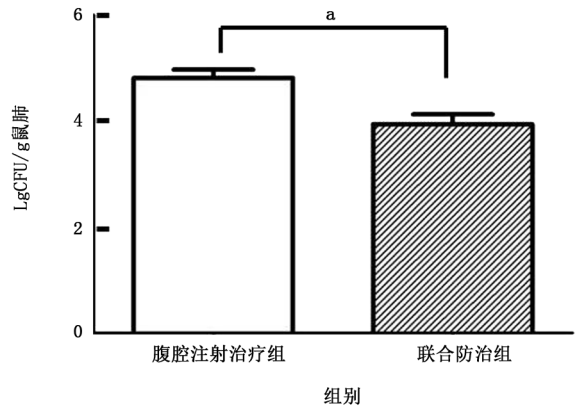
2.3.2 肺真菌负荷 见图 5, 与腹腔注射治疗组 (4.817 ± 0.154) 相比较, 联合防治组 (3.942 ± 0.188) 能有效降低小鼠肺真菌负荷 ($P = 0.005$)。

3 讨论

真菌感染是肿瘤化疗、实体器官及干细胞移植受者等免疫抑制人群较常见的机会性感染之一^[2]。尽管不断有新的抗真菌药物投入临床, 但 IPA 一经诊断往往较难治愈, 病死率高达 50%~80%, 占住院死亡患者总数的 4%^[3]。针对高危人群 IPA 的防治逐步为医师所重视。治疗策略也不断完善, 主要包括: 预防性治疗、经验性治疗、针对性治疗

和挽救性治疗。

抗真菌药物的雾化吸入给药最早于 1988 年提出, 为使药物抵达肺泡内, 要求雾化器可将药液转化为直径介于 $0.5 \sim 5 \mu\text{m}$ 的药物微滴^[4]。已有多项体外实验研究证明利用现有雾化设备所产生的 AmB 药物微粒中位直径 (mean mass aerodynamic diameter, MMAD) 在 $1.31 \sim 3.7 \mu\text{m}$ ^[5-7], 伊曲康唑 MMAD 在 $2 \sim 3 \mu\text{m}$ ^[8-9], 米卡芬净在 $1.67 \sim 2.2 \mu\text{m}$ ^[10]。国内学者在 AmB、氟康唑等抗真菌药物雾化吸入给药的临床研究中虽未涉及 MMAD 等雾化效率指标, 但良好的临床效果同样显示了应用国产雾化装置的可行性^[11-13]。



注: IPA 为侵袭性肺曲霉病; 腹腔注射治疗组肺真菌负荷为 4.817 ± 0.154 ; 联合防治组肺真菌负荷为 3.942 ± 0.188 ; $^a P < 0.05$

图 5 联合防治组与腹腔注射治疗组相比对 IPA 小鼠肺真菌负荷的影响

对多种抗真菌药物雾化吸入研究均采用注射制剂。药代动力学研究显示, 动物接受 AmB 雾化吸入 6 周后肺组织药物浓度依然高达 $7.7 \sim 14.3 \mu\text{g/g}$ 湿肺组织^[5]; 有学者报道雾化吸入 AmB 后半衰期为 $1.3 \sim 4.5 \text{ d}$, 同时血药浓度维持在 0.2 mg/L 以下^[14]。雾化吸入伊曲康唑 $0.5 \sim 1 \text{ h}$ 后肺组织药物浓度达到峰值, 超过 $11.0 \mu\text{g/g}$ 湿肺组织^[15-18], 药物半衰期为 7 h 。另有研究者报道伏立康唑雾化吸入后血药浓度峰值达到 7.1 mg/L ^[19]。

关于抗真菌药物雾化吸入防治 IPA 疗效研究分为动物实验和临床研究两个方面, AmB 雾化吸入已有 6 项临床研究数据得到报道, 有关 Meta 分析结果显示, 针对高危人群雾化吸入 AmB 能有效预防 IPA 的发生^[20]。其他抗真菌药物雾化吸入研究尚局限于动物实验阶段。在探讨雾化吸入给药有效性时往往将“腹腔注射 AmB 治疗”做为治疗真菌感染的金标准, 相关研究发现预防性雾化吸入伊

曲康唑小鼠生存率明显高于 AmB 腹腔注射治疗组^[17-21]。但目前 AmB 已不作为治疗 IPA 首选用药, 以此标准仅能初步判断抗真菌药物雾化吸入有可行性, 难以对伊曲康唑雾化吸入药效学进行准确评价。本研究将伊曲康唑腹腔注射用药作为标准, 对雾化吸入用药在预防、治疗的药效学进行综合评估, 并对两种给药方式联合应用进行评价。动物实验中往往在感染前第 2 天开始给药定义为预防性用药, 感染后第 2 天开始给药定义为治疗性用药^[22]。从生存率及肺部真菌负荷两个方面加以评价。肺部真菌负荷有两种检测方法: 平板菌落计数和荧光定量 PCR, 其中平板菌落计数是经典方法, 应用也最为广泛。

本研究首先观察了腹腔注射伊曲康唑治疗对 IPA 小鼠病死率及肺真菌负荷的影响, 结果显示可提高小鼠生存率并降低肺真菌负荷, 证明腹腔注射伊曲康唑治疗 IPA 是有效的。

观察伊曲康唑不同给药方式及治疗策略的治疗效果, 研究发现与伊曲康唑腹腔注射治疗相比, 雾化预防组及联合防治组可明显减少实验小鼠死亡并降低肺真菌负荷, 推测在粒细胞缺乏小鼠肺内保持高药物浓度, 可有效抑制进入气道的曲霉孢子萌发, 联合腹腔注射伊曲康唑达到较高血药浓度, 对侵袭生长的曲霉产生持续作用。

IPA 治疗效果差, 新药研制周期长, 探索已有药物新的用药方式及各种用药方式联合应用可能对治疗疾病带来益处。本研究仅对伊曲康唑雾化吸入给药疗效做初步探讨, 可见伊曲康唑雾化作为高危人群预防性用药及与系统给药联合应用可能具有潜在的应用价值。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] 卢鑫, 孙文逵, 吴晓东, 等. 气管插管法建立免疫抑制小鼠侵袭性肺曲霉病模型[J]. 医学研究生学报, 2012, 25(4): 344-347. DOI: 10.3969/j.issn.1008-8199.2012.04.003.
- [2] Denning DW. Invasive aspergillosis[J]. Clin Infect Dis, 1998, 26(4): 781-803. DOI: 10.1086/513943.
- [3] Groll AH, Shah PM, Mentzel C, et al. Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital[J]. J Infect, 1996, 33(1): 23-32. DOI: 10.1016/S0163-4453(96)92700-0.
- [4] Hagerman JK, Hancock KE, Klepser ME. Aerosolised antibiotics: a critical appraisal of their use[J]. Expert Opin Drug Deliv, 2006, 3(1): 71-86. DOI: 10.1517/17425247.3.1.71.
- [5] Ruijgrok EJ, Fens MH, Bakker-Woudenberg IA, et al. Nebulization of four commercially available amphotericin B formulations in persistently granulocytopenic rats with invasive pulmonary aspergillosis: evidence for long-term biological activity[J]. J Pharm Pharmacol, 2005, 57: 1289-1295. DOI: 10.1211/jpp.57.10.0007.
- [6] Corcoran TE, Venkataramanan R, Mihelc KM, et al. Aerosol deposition of lipid complex amphotericin-B (Abelcet) in lung transplant recipients[J]. Am J Transplant, 2006, 6(11): 2765-2773. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2006.01529.x.
- [7] Lambros MP, Bourne DW, Abbas SA, et al. Disposition of aerosolized liposomal amphotericin B[J]. J Pharm Sci, 1997, 86(9): 1066-1069. DOI: 10.1021/js9604218.
- [8] Yang W, Johnston KP, Williams RO 3rd. Comparison of bioavailability of amorphous versus crystalline itraconazole nanoparticles via pulmonary administration in rats[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2010, 75(1): 33-41. DOI: 10.1016/j.ejpb.2010.01.011.
- [9] Yang W, Tam J, Miller DA, et al. High bioavailability from nebulized itraconazole nanoparticle dispersions with biocompatible stabilizers[J]. Int J Pharm, 2008, 361(1/2): 177-188. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2008.05.003.
- [10] Shi S, Ashley ES, Alexander BD, et al. Initial characterization of micafungin pulmonary delivery via two different nebulizers and multivariate data analysis of aerosol mass distribution profiles[J]. AAPS PharmSciTech, 2009, 10(1): 129-137. DOI: 10.1208/s12249-009-9185-6.
- [11] 张敏, 张莉, 陈树. 两性霉素 B 雾化吸入治疗老年糖尿病患者下呼吸道感染临床观察[J]. 现代临床医学, 2009, 35(6): 414-415. DOI: 10.3969/j.issn.1673-1557.2009.06.005.
- [12] 乔亚红. 氟康唑雾化吸入治疗老年肺部真菌感染的疗效观察[J]. 中国误诊学杂志, 2004, 4(8): 1274-1275. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6647.2004.08.077.
- [13] 张国范. 雾化吸入氟康唑治疗 AIDS 合并系统性真菌感染 67 例分析[J]. 传染病信息, 2004, 17(4): 175-176. DOI: 10.3969/j.issn.1007-8134.2004.04.014.
- [14] Shah SP, Misra A. Liposomal amphotericin B dry powder inhaler: effect of fines on in vitro performance[J]. Pharmazie, 2004, 59(10): 812-813.
- [15] Vaughn JM, McConville JT, Burgess D, et al. Single dose and multiple dose studies of itraconazole nanoparticles[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2006, 63(2): 95-102. DOI: 10.1016/j.ejpb.2006.01.006.
- [16] Duret C, Merlos R, Wauthoz N, et al. Pharmacokinetic evaluation in mice of amorphous itraconazole-based dry powder formulations for inhalation with high bioavailability and extended lung retention[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2014, 86(1): 46-54. DOI: 10.1016/j.ejpb.2013.03.005.
- [17] Hoeben BJ, Burgess DS, McConville JT, et al. In vivo efficacy of aerosolized nanostructured itraconazole formulations for prevention of invasive pulmonary aspergillosis[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(4): 1552-1554. DOI: 10.1128/AAC.50.4.1552-1554.2006.
- [18] Wlaź P, Knaga S, Kasperk K, et al. Activity and Safety of

Inhaled Itraconazole Nanosuspension in a Model Pulmonary Aspergillus fumigatus Infection in Inoculated Young Quails [J]. Mycopathologia, 2015, 180 (1/2): 35-42.

[19] Tolman JA, Nelson NA, Bosselmann S, et al. Dose tolerability of chronically inhaled voriconazole solution in rodents [J]. Int J Pharm, 2009, 379 (1): 25-31. DOI: 10. 1016/j. ijpharm. 2009. 06. 003.

[20] 卢鑫, 孙文逵, 施毅, 等. 雾化吸入两性霉素 B 对侵袭性肺曲霉病预防效果的 Meta 分析 [J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2012, 11 (1): 28-36. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6205. 2012.

01.006.

[21] Alvarez CA, Wiederhold NP, McConville JT, et al. Aerosolized nanostructured itraconazole as prophylaxis against invasive pulmonary aspergillosis [J]. J Infect, 2007, 55 (1): 68-74. DOI: 10. 1016/j. jinf. 2007. 01. 014.

[22] Ho KM, Duff O, Chambers D, et al. Meta-analysis of nebulized amphotericin B to prevent or treat pulmonary aspergillosis in immunosuppressed animals [J]. Transpl Infect Dis, 2008, 10 (3): 168-176.

(收稿日期: 2018-05-15)

· 简讯 ·

新书速览: 介入呼吸内镜并发症及处理 (2018 年最新出版)



书名: 介入呼吸内镜并发症及处理

作者: 王洪武 主编

出版社: 人民卫生出版社

定价: 148.00 元

内容简介

由煤炭总医院王洪武教授联合国内外多位介入肺脏医学领域的专家撰写的《介入呼吸内镜并发症及处理》一书,最近由人民卫生出版社出版发行。该书由中华医学会呼吸病学会主任委员陈荣昌教授亲自做序,并给予高度评价。这是国内外首部关注呼吸介入并发症的书。

全书共分五篇,前两篇重点介绍支气管镜诊治过程中发生的并发症及防治措施;第三篇重点介绍呼吸内镜介入过程中对内镜设备的损伤情况及如何维护;第四篇重点介绍因呼吸内镜清洗消毒不规范造成交叉感染的预防及处理;第五篇则重点介绍介入呼吸内镜医护人员发生职业损伤的情况及防治。

本书认真总结了各种呼吸内镜介入操作可能发生的并发症及其防治策略,同时涵盖了呼吸内镜介入操作过程中对内镜的损伤以及对医护人员的职业危害等临床实践中需要关注的问题,无论是对临床一线工作的医务人员还是专注于呼吸介入治疗研究探索的专家学者,都是非常有益的参考书。

作者简介

王洪武,主任医师,现任煤炭总医院副院长,学术委员会主任委员,首席专家,兼呼吸内科主任、肿瘤内科主任及职业病科主任。硕士研究生导师,2002 年享受国务院政府特贴。北京健康促进会呼吸及肿瘤介入诊疗联盟主席、中国抗癌协会光动力治疗分会主任委员、国家卫健委呼吸内镜专家委员会委员、亚洲冷冻学会副主席、中国研究型医院学会常务理事、中华医学会呼吸分会介入治疗学组常委等。

从事呼吸系统疾病及肿瘤研究 30 余年,特别擅长肺结节病、肺癌、肝癌、食管癌、前列腺癌等方面的诊治;在国内率先开展了多项肿瘤微创靶向治疗技术,特别是在呼吸内镜的应用和影像引导下的介入治疗方面有很深的造诣。

在国内外发表论文 200 余篇,参编专著近 20 部,主编专著 15 部,其中《肿瘤微创治疗技术》《电子支气管的临床应用》《肿瘤超低温冷冻治疗》《癌性疼痛的综合治疗》《支气管镜介入治疗》等已成为相关领域的重要参考工具书。