



醋酸卡泊芬净单硬脂酸甘油酯纳米粒抗白色念珠菌感染的增效作用研究

郭灵怡, 刘艳超, 高路, 刘瑞瑶, 吕权真, 俞媛

Study on the synergistic antifungal effects of Caspofungin Acetate loaded glyceryl monostearate nanoparticle on *Candida albicans*

GUO Lingyi, LIU Yanchao, GAO LU, LIU Ruiyao, LV Quanzhen, YU Yuan

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.2097-2024.202310043>

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

正极性驻极体联合5-氟尿嘧啶对瘢痕成纤维细胞生长抑制的协同作用

Synergistic effect of positive electret combined with 5-fluorouracil on growth inhibition of scar fibroblasts

药学实践与服务. 2024, 42(6): 244-247 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202310027

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

山楂酸药理作用的研究进展

Research progress on the pharmacological effects of maslinic acid

药学实践与服务. 2024, 42(5): 185-189 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202307052

肠道菌群参与糖尿病肾病的机制研究进展

Research progress on the mechanism of gut microbiota participating in diabetes nephropathy

药学实践与服务. 2024, 42(5): 181-184, 197 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202312023

消风止痒颗粒通过降低白三烯水平对小鼠特异性皮炎急性瘙痒的治疗作用研究

Therapeutic effect of Xiaofeng Zhiyang granules on acute itching in mice with atopic dermatitis by decreasing leukotriene

药学实践与服务. 2024, 42(5): 211-216 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202306031



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 论著 ·

醋酸卡泊芬净单硬脂酸甘油酯纳米粒抗白色念珠菌感染的增效作用研究

郭灵怡^{1a}, 刘艳超², 高路³, 刘瑞瑶^{1a}, 吕权真^{1a}, 俞媛^{1a,1b} (1. 海军军医大学: a. 药学系, b. 生物安全防御教育部重点实验室, 上海 200433; 2. 生物安全防御教育部重点实验室, 上海 200433; 3. 上海交通大学附属第一人民医院临床药学科, 上海 200080; 4. 同济大学附属第十人民医院药学部, 上海 200072)

[摘要] **目的** 制备醋酸卡泊芬净单硬脂酸甘油酯固体脂质纳米粒(CAS-SLNs)并进行表征, 考察纳米粒的体内外抗白色念珠菌活性。**方法** 建立醋酸卡泊芬净(CAS)高效液相色谱检测的方法。熔融法制备 CAS-SLNs 并进行表征, 测定其最低抑菌浓度(MIC)以及对白色念珠菌生物被膜的抑制效果。建立小鼠白色念珠菌系统性感染模型, 给药后考察动物的体重和肾脏载菌量变化, 评价纳米粒的药效学。**结果** CAS 在 HPLC 保留时间为 6.8 min, 线性关系良好, 精密度、稳定性符合测定要求。透射电镜观察 CAS-SLNs 呈类圆球状, 粒径 135.97 ± 1.73 nm, Zeta 电位 19.33 ± 0.37 mV, 载药量 $7.55 \pm 0.68\%$, 封装率 $67.71 \pm 1.74\%$ 。体外实验表明, CAS-SLNs 具有显著的抑菌效果, MIC 为 9.78×10^{-4} $\mu\text{g/ml}$, 优于 CAS 以及 CAS 与 GMS 的物理混合组, 并具有显著的生物被膜抑制作用($P < 0.001$, $P < 0.001$)。体内研究表明, 在白色念珠菌侵袭性感染模型中, CAS-SLNs 较对照组($P < 0.01$)、CAS 组体重恢复更加显著, 并且 CAS-SLNs 相对 CAS 组显著降低了小鼠肾脏载菌量($P < 0.05$)。**结论** CAS-SLNs 可以显著增强 CAS 的体内外抗白色念珠菌效果, 为 CAS 的剂型改造提供了有益的参考。

[关键词] 白色念珠菌; 醋酸卡泊芬净; 单硬脂酸甘油酯纳米粒; 协同抗菌

[文章编号] 2097-2024(2024)00-0001-08

[DOI] 10.12206/j.issn.2097-2024.202310043

Study on the synergistic antifungal effects of Caspofungin Acetate loaded glyceryl monostearate nanoparticle on *Candida albicans*

GUO Lingyi^{1a}, LIU Yanchao², GAO LU³, LIU Ruiyao^{1a}, LV Quanzhen^{1a}, YU Yuan^{1a,1b} (a. School of Pharmacy, b. Key Laboratory of Biosafety Defense, Naval Medical University, Shanghai 200433 China; 2. Key Laboratory of Biosafety Defense, Shanghai 200433 China; 3. Department of Clinical Pharmacy, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200080 China; 4. Department of Pharmacy, Shanghai Tenth People's Hospital, School of Medicine, Tongji University, Shanghai 200092 China)

[Abstract] **Objective** To prepare and characterize caspofungin acetate-loaded solid lipid nanoparticles using glycerol monostearate (CAS-SLNs), and investigate the antifungal effect of potentiation on *Candida albicans* *in vitro* and *in vivo*. **Methods** A high performance liquid chromatography method was established for the determination of caspofungin acetate (CAS). CAS-SLNs were prepared by the melt-emulsification method and characterized. The minimum inhibitory concentration (MIC) and the inhibitory effect on *Candida albicans* biofilm were determined. A systemic infection model of *Candida albicans* was established in mice, and the growth curve models for body weight and fungal load of kidneys of the animals were investigated after intravenous infection. **Results** The retention time of CAS was 6.8 min. The calibration curve showed good linearity, and the precision and stability met the requirements of the assay. Transmission electron microscopy revealed that CAS-SLNs were spherical, with a particle size of 135.97 ± 1.73 nm. The Zeta potential was 19.33 ± 0.37 mV, drug loading was $7.55 \pm 0.68\%$, and encapsulation efficiency was $67.71 \pm 1.74\%$. CAS-SLNs showed significant *in vitro* antifungal inhibition with a MIC of 9.78×10^{-4} g/ml, which was significantly better than CAS group and the physical mixture group of CAS and GMS, as well as the same biofilm inhibition was observed ($P < 0.001$, $P < 0.001$). Pharmacodynamic studies demonstrated that CAS-SLNs maintained stable body weight gain compared to the control ($P < 0.01$) and CAS groups in *Candida albicans* invasive infection model, and that CAS-SLNs significantly reduced renal fungal burden load relative to the CAS group ($P < 0.05$). *In vivo* study revealed that a stable body weight was

[基金项目] 国家自然科学基金(82273487), 全军医学科技青年培育计划(21QNPY051), 上海市青年科技英才扬帆计划资助(21YF1436300)

[作者简介] 郭灵怡, 硕士研究生, 研究方向: 仿生纳米药物的抗真菌治疗, Email: yukixiaoba@163.com

[通信作者] 吕权真, 副教授, 研究方向: 抗真菌药物药理学, Email: lvquanzhen2011@163.com; 俞媛, 副教授, 研究方向: 仿生纳米系统的靶向策略和中枢神经系统疾病治疗, Email: pharmyuu@163.com

maintained in CAS-SLNs group compared to the control group ($P<0.01$) in *Candida albicans* invasive infection model. CAS-SLNs also significantly reduced renal fungal load compared to the CAS group ($P<0.05$). **Conclusion** CAS-SLNs significantly enhanced the antifungal effects of CAS *in vitro* and *in vivo*, which provided a valuable insight for the research of new formulation of CAS.

[Key words] *Candida albicans*; Caspofungin Acetate; glyceryl monostearate solid lipid nanoparticles; synergistic antifungal

抗真菌感染尤其深部真菌感染是抗微生物感染的重要研究内容,也是全球范围医学研究中面临的严峻挑战。近年来,在免疫力低下和重症监护病房患者中^[1],真菌感染发病率和死亡率逐年增加,其中在侵袭性念珠菌病中,死亡率约为40%^[2]。白色念珠菌是真菌感染中最常见的病原体,可以在正常人体的皮肤、口腔、阴道和肠道等部位定植^[3]。临床上,多烯类、棘白菌素类、唑类和烯丙胺类药物是治疗真菌感染最常用的药物^[4],然而由于白色念珠菌的耐药性、形成生物被膜以及部分药物较大的毒副作用等问题,传统抗真菌药物的应用面临新的挑战^[5]。因此,增加现有抗真菌药物的药效,降低其毒副作用,是抗真菌药物研发的重要方向。利用药物新剂型的研究降低其毒副作用是有效的药物研发途径。例如,成功上市的两性霉素B脂质体即可极大降低两性霉素B的肾脏毒性^[6]。

醋酸卡泊芬净(CAS)是一种棘白菌素半合成类抗真菌药,作用于真菌细胞的细胞壁,能有效抑制细胞壁中 β -1,3-D-葡聚糖的生物合成,是目前白色念珠菌系统性感染治疗中的一线推荐药物。然而,CAS价格昂贵,通过药物合用的方式,维持或增强卡泊芬净的治疗效果,降低其使用剂量,可以显著减少患者的用药成本。与此同时,降低药物剂量可以减少卡泊芬净的毒副作用。有研究显示,患者在接受高于批准剂量三倍的CAS作用下高剂量组中65%的患者会出现肝毒性,包括肝酶升高和肝衰竭^[7]。我们在前期研究中发现单硬脂酸甘油酯(GMS)与CAS联合用药具有良好的协同作用,增强CAS体外抑菌效果,如两者联用体外抑菌MIC由0.0625 μ g/ml降低到0.0313 μ g/ml^[8]。然而,GMS与CAS混合使用,由于溶解性差异和药代动力学不同,可能无法在体内同时达到作用部位,共同杀灭真菌,本研究通过制备醋酸卡泊芬净单硬脂酸甘油酯固体脂质纳米粒为上述问题解决提供思路,并发挥体内协同抗菌的效果。

固体脂质纳米颗粒(SLNs)以固态天然或合成的类脂如卵磷脂、三酰甘油等为载体,将药物包裹或夹嵌于类脂核中制成的纳米给药系统^[9],可以包载亲脂性或者亲水性药物,提高药物的稳定性^[10]。具有毒性低生物相容性好、物理稳定性好、体循环

中药物不易泄露的特点^[11]。通过药物协同增加抑真菌作用,可以减少给药用量与给药次数,提高药物疗效;进而降低抗真菌药物的毒副作用;同时减少真菌耐药性的产生^[12]。基于以上研究基础,本研究以单硬脂酸甘油酯作为载体材料制备卡泊芬净固体脂质纳米粒,考察纳米粒对卡泊芬净的协同增效作用。

1 实验仪器和材料

1.1 菌株

标准菌株白色念珠菌 SC5314 由美国 Georgetown 大学 William A Fonzi 教授赠与。

1.2 实验试剂及仪器

醋酸卡泊芬净(上海源叶)($\geq 98\%$);单硬脂酸甘油酯、蛋白胍、葡萄糖、琼脂(上海生工);乙腈、泊洛沙姆 188、磷酸、甲醇(中国国药);DMEM 高糖培养基、PBS 缓冲液(上海泰坦);酵母提取物、营养肉汤(BD 公司);RPMI 1640(美国 Gibco)。

马尔文粒度电位仪(英国 Malvern);透射电子显微镜(日本 JEOL);高效液相色谱仪(美国 Thermo);超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物);高速离心机(德国 Hettich);涡旋混合器(日本 LTS);电子天平(瑞士 Mettler Toledo);洁净工作台(上海力申);多功能酶标仪(瑞士 TECAN)。

1.3 实验动物

ICR 小鼠,雌性,体重 20~22 g,由苏州华创信诺医药科技有限公司提供,动物许可证号:SCXK(苏)2020-0009。

2 实验方法

2.1 白色念珠菌培养

将在 SDA 固体培养基上保存的白色念珠菌单克隆菌株转接到 3ml YEPD 培养基,30 $^{\circ}$ C,200 r/min,培养 18 h,使白色念珠菌处于指数生长的平台期。将活化的菌株转移到离心管中,重悬、离心洗涤 3 次后加入 1 ml pH=7.4 PBS(0.01 mol/L)重悬,备用。

2.2 CAS 含量测定

2.2.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil Plus C18 色谱柱(4.6 \times 250 mm,

5 μm); 流动相: 乙腈: 0.1% 磷酸(35: 65); 流速: 1 ml/min; 检测波长: 227 nm; 柱温为 25 °C; 进样量: 20 μl。

2.2.2 方法学验证

专属性考察: 取醋酸卡泊芬净标准液、空白 SLNs 溶液、CAS-SLNs 溶液, 经 0.22 μm 滤膜过滤后, 按“2.2.1”项下色谱方法进行样检测。

线性和范围: 精密称取 CAS 并定量配置质量浓度为 1、5、10、20、40、50 μg/ml 的 CAS 溶液。按“2.2.1”项下色谱方法进行样检测, 横坐标为 CAS 浓度, 纵坐标为峰面积, 绘制标准曲线。

精密度: 日内精密度取 5 μg/ml、20 μg/ml、40 μg/ml 3 个浓度的 CAS 溶液各 3 份, 分别检测 3 次; 日间精密度是取低、中、高 3 个浓度的 CAS 溶液各 3 份, 分别 3 天进行检测。

溶液稳定性: 同一样品在 0、1、2、3、5、8、12 h 分别按“2.2.1”项下色谱方法进行样检测, 计算 RSD 以考察样品溶液的稳定性。

回收率: 取空白 SLNs 溶液分别取 5 μg/ml、20 μg/ml、40 μg/ml 3 个浓度的 CAS 溶液, 超声破乳后, 经 0.22 μm 滤膜过滤后按“2.2.1”项下色谱方法进行样检测, 计算回收率。

2.3 CAS-SLNs 的制备和表征

2.3.1 CAS-SLNs 的制备

采用熔融法制备醋酸卡泊芬净固体脂质纳米粒(CAS-SLNs): 称取处方量的 CAS、GMS、卵磷脂(CAS、GMS、卵磷脂摩尔比为 1: 20: 5) 完全溶解于甲醇中, 加热条件下磁力搅拌混合均匀作为油相。配置 0.2% 泊洛沙姆 188 溶液, 加热至相同温度作为水相。在磁力搅拌条件下(500 r/min), 将水相缓慢滴入油相, 加热条件下持续搅拌 30 min, 得到初乳。取初乳超声 10 min(250 W, 1 S, 1 S), 4 °C 固化过夜, 即得到 CAS-SLNs。

2.3.2 CAS-SLNs 的表征

马尔文粒度仪测定 SLNs 的粒径和 Zeta 电位, 磷钨酸负染后透射电镜观察其表面形态。

2.3.3 CAS-SLNs 包封率测定

使用低温超速离心法, 取所制备的 CAS-SLNs 溶液于离心管内 15000 r/min 下离心 2 h, 取上清 500 μl 于 5 ml 量瓶内并定容至刻度。另取 500 μl 未经离心的 CAS-SLNs 溶液于 5 ml 量瓶内并定容至刻度, 甲醇超声破乳, 分别取以上各组溶液经 0.22 μm 滤膜进样检测并计算载药量和包封率。根据公式(1)计算包封率(EE)、公式(2)计算载药量(DL):

$$EE = \frac{M_{\text{投药量}} - M_{\text{上清含药量}}}{M_{\text{投药量}}} \times 100\% \quad (1)$$

$$DL = \frac{M_{\text{实际包载量}}}{M_{\text{载药纳米粒}}} \times 100\% \quad (2)$$

2.4 体外抗真菌活性的测定

2.4.1 CAS-SLNs 最低抑菌浓度(MIC)的测定

制备药敏实验板: 取 96 孔板。第 1 列配置 100 μl RPMI1640 培养基做空白对照; 第 12 列配置 100 μl 菌液做阳性对照; 第 2 列加 200 μl 菌液, 分组为 CAS、CAS+GMS(CAS 与 GMS 物理混合)、CAS+SLNs(CAS 与空白 SLNs 物理混合)、CAS-SLNs, 每组两行, 每孔 CAS 含量浓度为 0.313 μg/ml。2-11 列进行倍比稀释, 最终使得 CAS 浓度为 3.13×10⁻² μg/ml、1.57×10⁻² μg/ml、7.83×10⁻³ μg/ml、3.91×10⁻³ μg/ml、1.96×10⁻³ μg/ml、9.78×10⁻⁴ μg/ml、4.89×10⁻⁴ μg/ml、2.45×10⁻⁴ μg/ml、1.23×10⁻⁴ μg/ml、6.13×10⁻⁵ μg/ml、3.06×10⁻⁵ μg/ml。30 °C 恒温孵育 24 h, 用酶标仪在 λ=630 nm 处测 OD 值。100 μl RPMI 1640 培养基做空白对照记为 OD_{空白}, 菌液做阳性对照记为 OD_{阳性}, 加入各实验组记为 OD_{实验}, MIC 定义为使白色念珠菌 OD₆₃₀ 降低 80% 以上的最小药物浓度。

2.4.2 生物被膜抑制效果的测定

制备生物被膜板: 1640 培养基调节白色念珠菌浓度为 3×10⁶ CFU/ml。取 96 孔板, 第 1 列加 100 μl RPMI1640 培养基做空白对照; 第 2 至 12 列加 100 μl 菌液, 37 °C 培养 90min。

制备药敏板: 分组为 CAS、CAS+GMS、CAS+SLNs、CAS-SLNs, 每组两行, 每孔 CAS 含量浓度为 0.313 μg/ml。按“2.4.1”项下倍比稀释得到不同浓度的 CAS。

生物被膜板孵育 90 min 后, 弃上清, 用 PBS 清洗, 将药敏板中的 CAS 按浓度梯度分别加入 2 至 11 列, 37 °C 培养 24 h。倒掉培养基, PBS 清洗生物被膜, 加入 0.4% 结晶紫水溶液染色。倒掉染液并用 PBS 冲洗, 加入酒精脱色后, 取适量上清至 96 孔板, 用酶标仪在 λ=630 nm 处, 测 OD 值。生物被膜板可在显微镜下观察被膜形成情况。

2.5 体内抗真菌活性的测定

2.5.1 白色念珠菌系统性感染

选择 ICR 小鼠雌性, 6~8 周龄, 小鼠尾静脉注射 SC5314。注射剂量为 1×10⁵ CFU/只。1 天后处死小鼠, 收集肾脏组织进行 PAS 染色切片。小鼠体重检测: 将实验动物分为对照组、CAS 组、CAS-SLNs 组, 每组 8 只。注射白色念珠菌后, 分别尾

静脉注射生理盐水、CAS、CAS-SLNs, 200 μl /只 (0.2 mg/kg)。间隔 24 h 给药, 连续给药 3 次。给药后连续观察 20 天, 每天记录小鼠体重(g)。

2.5.2 真菌载菌量测定

实验动物造模后随机分为三组: 对照组、CAS 组、CAS-SLNs 组。模型建立后分别尾静脉注射生理盐水、CAS、CAS-SLNs, 200 μl /只(0.2 mg/kg)。感染 48 h 后处死, 将肾脏组织称重后置入 PBS 中研磨成匀浆, 将组织匀浆稀释到合适的倍数, 接种到 SDA 平板上, 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 48 h 后进行菌落计数。

2.5.3 组织病理学观察

实验动物分为对照组、CAS 组、CAS-SLNs 组, 模型建立后分别尾静脉注射生理盐水、CAS、CAS-SLNs。感染 48h 后处死, 并取其肾组织进行

PAS 染色切片, 观察白色念珠菌在组织中的感染情况。

2.6 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA) 计算。两组间数据的比较采用 Unpaired Student's T-test, 多组间的数据比较采用 One-way ANOVA。 $P > 0.05$ 表示差异不具有统计学意义, $*P < 0.05$ 表示差异显著, $**P < 0.01$ 表示差异非常显著, $***P < 0.001$ 表示差异极其显著。

3 结果

3.1 CAS 含量测定

专属性: 液相色谱图见图 1, CAS 出峰位置处无 SLNs 色谱法干扰, 建立方法专属性良好。CAS 保留时间为 6.8min, 载体对 CAS-SLNs 测定无干扰。

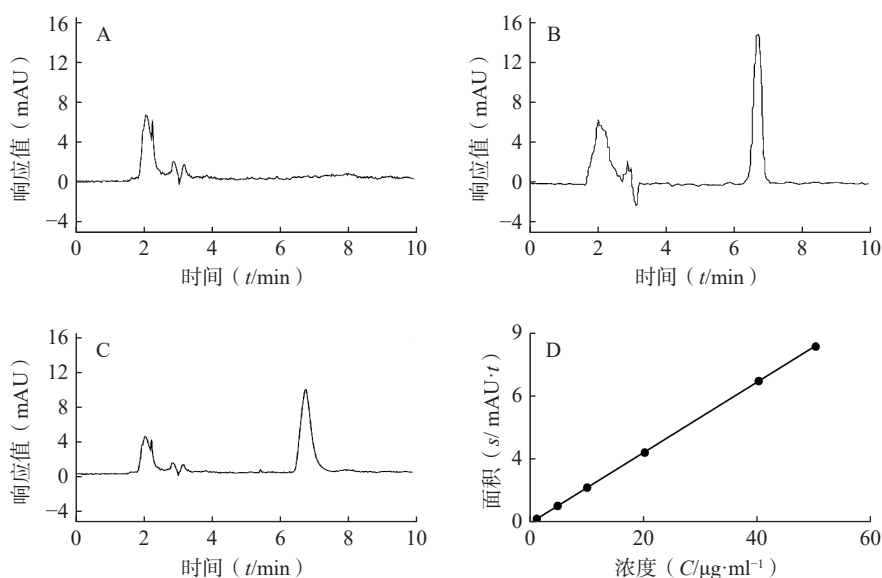


图 1CA CAS-SLNs 中 CAS 含量测定的 HPLC 方法

A. SLNs 色谱图; B. CAS 的色谱图; C. CAS-SLNs 色谱图; D. CAS 的 HPLC 标准曲线

线性和范围: 如图 1 所示, 方法专属性良好, 以 CAS 浓度 (C, $\mu\text{g}/\text{ml}$) 为横坐标, 所测得峰面积 (Area) 为纵坐标绘制标准曲线, 回归方程为 $A = 0.1687C - 0.0381$, $R^2 = 0.9999$, 表明 CAS 在 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~

50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 内线性关系良好。

精密性: 由表 1 可知, 低、中、高浓度 CAS 日内精密性和日间精密性 RSD 值均小于 5%, 表明所建立方法的精密性满足要求。

表 1 CAS 的 HPLC 方法精密性 (Mean \pm SD, $n=3$)

加样量($\mu\text{g}/\text{ml}$)	日内精密性		日间精密性	
	测得量($\mu\text{g}/\text{ml}$)	RSD(%)	测得量($\mu\text{g}/\text{ml}$)	RSD(%)
5	4.79 \pm 0.05	1.07	4.79 \pm 0.04	0.90
20	19.64 \pm 0.17	0.87	19.90 \pm 0.26	1.32
40	38.48 \pm 0.21	0.55	38.17 \pm 0.57	1.49

稳定性: 同一样品在 12 h 以内的 RSD 为 1.88%, 表明含量测定供试品溶液的稳定性满足要求。

回收率: 由表 2 可知, 样品在低、中、高三个浓度的回收率在 95%-115% 范围内, 且 RSD 值均小

于5%,表明该方法稳定可靠,可用于样品中CAS含量的测定。

表2 CAS的HPLC方法提取回收率 (Mean±SD, n=3)

加样量(μg/ml)	测得量(μg/ml)	平均回收率(%)	RSD(%)
5	5.29±0.12	105.78±2.41	2.28
20	20.95±0.48	104.76±2.40	2.29
40	43.39±0.59	108.48±1.47	1.35

3.2 CAS-SLNs 的表征及包封率

制备CAS-SLNs并对其进行表征。CAS-SLNs的粒径、Zeta电位分别为135.97±1.73 nm, 19.33±0.37 mV。如图2所示,透射电镜照片显示CAS-SLNs为类圆形粒子,粒径约为120 nm。纳米粒包封率为67.71±1.74%,载药量为7.55±0.68%。

3.3 CAS-SLNs 的体外抑菌效果

3.3.1 CAS-SLNs 的最低抑菌浓度(MIC)

前期本课题组研究表明,GMS可以协同CAS抑制白色念珠菌的生长,因此我们比较了CAS-SLNs与CAS单用以及CAS+GMS合用的体外抗真菌活性。

结果如表3所示,与1 μg/ml的GMS合用后,CAS的MIC从 3.13×10^{-2} μg/ml降低到 7.83×10^{-3} μg/ml,白色念珠菌对CAS的敏感性增加了4倍,表明CAS可以协同GMS抑制念珠菌的生长;而本课题制备的CAS-SLNs MIC为 9.78×10^{-4} μg/ml,这

与单用CAS的MIC 3.13×10^{-2} μg/ml相比,活性增强了32倍,这表明CAS-SLNs可以进一步发挥CAS与GMS的协同作用抑制念珠菌的生长,其抑菌活性性优于CAS和GMS物理混合组。

3.3.2 CAS-SLNs 生物被膜活性测定

菌丝态与酵母态混合形成的被膜是白色念珠菌耐药的重要因素,卡泊芬净单用可以显著抑制白色念珠菌被膜的形成,为了探究CAS-SLNs的优效性,我们采用结晶紫染色法定量检测了各组药物处理后白色念珠菌生物被膜的形成情况。结果如图3显示,CAS组在 1.96×10^{-3} mg/ml、 9.78×10^{-4} mg/ml、 4.89×10^{-4} mg/ml浓度下的被膜形成抑制率分别为37.30±4.40%、36.50±5.78%、30.70±8.96%,CAS-SLNs组在同等的 1.96×10^{-3} mg/ml、 9.78×10^{-4} mg/ml、 4.89×10^{-4} mg/ml浓度下,被膜形成的抑制率分别为85.03±1.59%、68.05±7.72%、56.12±2.83%。由此可见CAS-SLNs对生物被膜形成的抑制作用与单用CAS相比显著增强。

3.4 CAS-SLNs 的体内抑菌效果

在小鼠系统性白色念珠菌感染模型中,如图4A所示,白色念珠菌感染可以导致小鼠体重的下降,而药物治疗可以恢复小鼠的体重增长。结果显示,CAS组小鼠平均体重由25.93 g增长至28.73 g,增长10.8%;而CAS-SLNs组体重由25.29 g增长至29.43 g,体重增长16.36%;对照组(对照组第10天

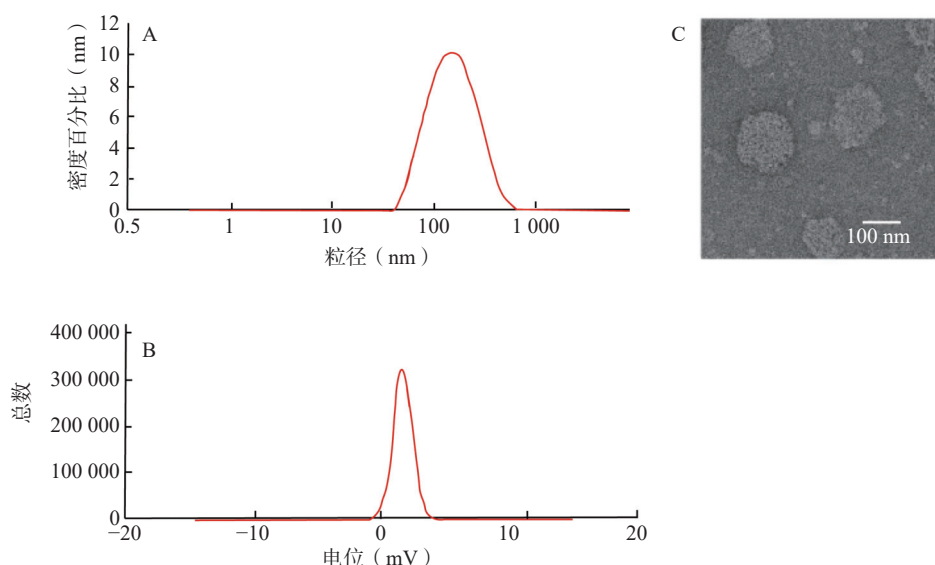


图2 CAS-SLNs的粒径、Zeta电位和透射电镜图片

A. CAS-SLNs的粒径图; B. CAS-SLNs的Zeta电位图; C. CAS-SLNs的透射电镜照片

表3 微量稀释法检测CAS、CAS+GMS、CAS+SLNs、CAS-SLNs抑制白色念珠菌生长的MIC

菌株名称	CAS	CAS+GMS	CAS+SLNs	CAS-SLNs
<i>C.albicans</i> SC5314	3.13×10^{-2} μg/ml	7.83×10^{-3} μg/ml	3.13×10^{-2} μg/ml	9.78×10^{-4} μg/ml

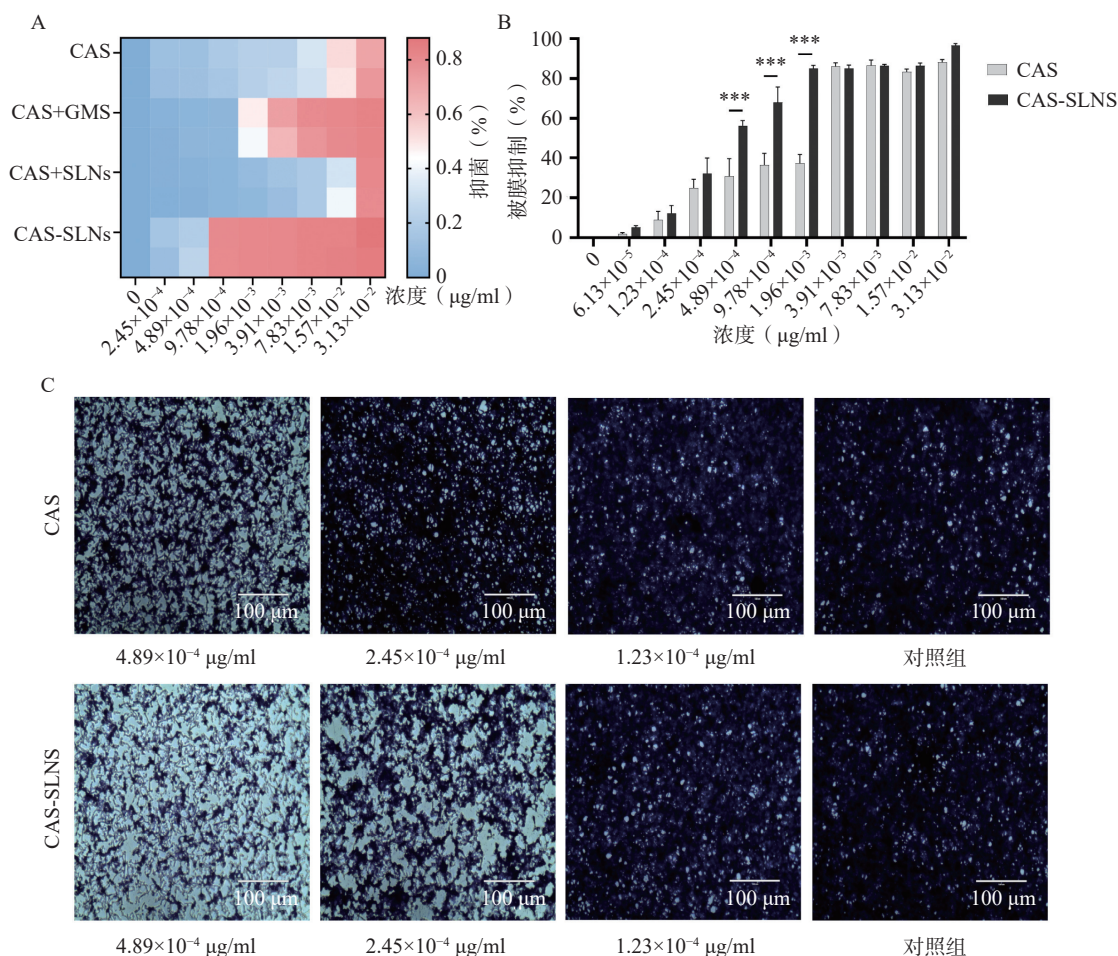


图3 CAS-SLNs体外抑菌活性测定

A. CAS、CAS+GMS、CAS+SLNs、CAS-SLNs抑制白色念珠菌生长的MIC值; B. CAS与CAS-SLNs对生物被膜活性测定(n=3); C. CAS与CAS-SLNs对白色念珠菌生物被膜结晶紫染色观察形态
***P<0.001,与CAS组比较。

存活率为0)与CAS-SLNs有非常显著的差异($P < 0.01$), CAS-SLNs组体重恢复更加显著。此外, CAS-SLNs治疗也可以显著降低小鼠肾脏的载菌量。如图4B所示,对照组、CAS组、CAS-SLNs组的载菌量分别为 5.84 ± 0.05 CFU/g、 5.18 ± 0.03 CFU/g、 5.10 ± 0.06 CFU/g,与对照组有肾脏载菌量极其显著差异($P < 0.001$), CAS-SLNs组与CAS组也有显著性差异($P < 0.05$)。通过PAS染色,考察小鼠肾脏的白色念珠菌感染情况,如图4C所示,在SC5314感染小鼠48h后,对照组肾部病理切片经过PAS染色出现大量白色念珠菌。在感染小鼠经过CAS治疗后,白色念珠菌的数量明显下降。而经过同等剂量的CAS-SLNs治疗的感染小鼠肾部组织切片很少发现白色念珠菌的存在。综上所述, CAS-SLNs作为以GMS为主要材料的载体包载药物CAS,其抗菌效果优于单用CAS,可以在体内发挥CAS与GMS的协同作用,体内抗菌效果显著增强。

4 讨论

侵袭性真菌感染每年导致超过150万人死亡^[13]。由于抗真菌药物耐药性的不断增多,我们迫切需要新的策略来对抗危及生命的真菌疾病。白色念珠菌是念珠菌病的主要病原体,针对念珠菌血症的初始抗真菌治疗,美国传染病学会(IDSA)指南推荐使用棘白菌素^[14]。然而,抗真菌药物可能在毒性、感染复发、高成本和出现抗真菌耐药性方面存在局限性,可以采用联合用药的方式克服上述问题^[15]。研究结果显示,在替代疗法中同时使用尼可霉素Z和CAS或米卡芬净^[16]、以及CAS和氟康唑或伏立康唑的联用可以更好的治疗念珠菌感染^[17];此外,宿主防御肽模拟物brilacidin(BRI)也可以作为CAS的增效剂,增强CAS对烟曲霉,白色念珠菌,耳念珠菌和固有抗性的新型隐球菌的抗菌活性^[18]。我们在前期研究发现CAS与GMS具有较强的协同抗念珠菌活性^[8], GMS作为一种惰性的药用辅

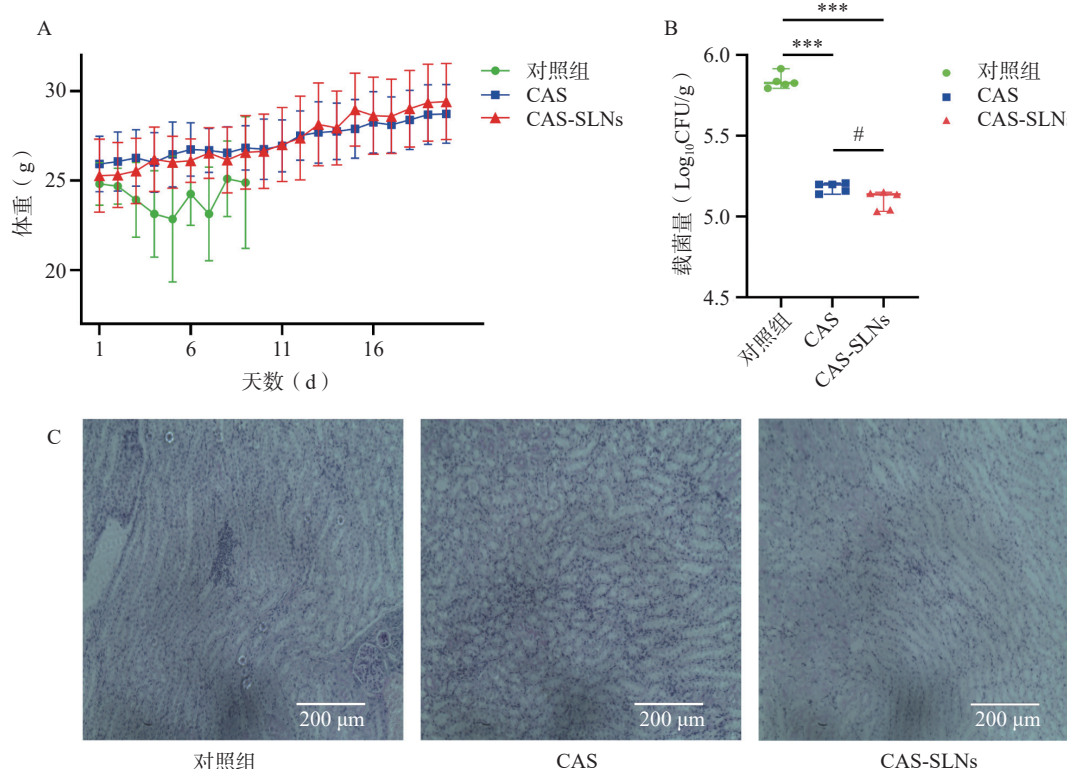


图4 CAS-SLN抑制小鼠深部白色念珠菌感染结果

A. 药物治疗后20天体重分析($n=8$)(对照组第10天存活率为0); B. 药物治疗48h后小鼠肾部载菌量($n=5$); C. 药物治疗48h后肾组织切片PAS染色

$P<0.05$,与CAS组比较;*** $P<0.001$,与对照组比较。

料,之前已报道过其作为脂质基质制备SLNs发挥协同抗金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的活性^[19],但抗真菌活性未有报道。因此,本文构建了以GMS为主要材料的固体脂质纳米粒作为纳米载体包载CAS。一方面,SLNs骨架材料GMS可以协同CAS发挥抗真菌增效作用,另一方面,本课题所制备的纳米粒为水分散系统,无须有机溶剂,符合临床使用的需要。我们的研究表明CAS-SLN相对于CAS与GMS物理混合物,MIC从 $7.83 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$ 降低到 $9.78 \times 10^{-4} \mu\text{g/ml}$,发挥了很好的增效作用,这可能与CAS-SLN的粒径为纳米级,具有极大的比表面积容易被真菌摄取有关。在局部微环境中,随着载体基质的降解,药物逐步释放,在局部形成了较长时间的协同抑菌环境,从而增加了药物的抑菌活性。在可能的机制方面,有研究显示,硬脂酸可以激活三酰基甘油合成代谢途径,影响真菌的脂质代谢^[20]。而棘白菌素类药物作用于白色念珠菌后,白色念珠菌脂质代谢的相关基因会发生改变,提示脂质代谢可能在白色念珠菌抵御CAS杀伤过程中十分重要^[21]。因此,我们推测CAS-SLN可能通过改变脂质代谢的途径,提高了CAS的敏感性,具体的信号通路和作用机制需要进一步的通过转录组

学、代谢组学等方式深入研究。本研究为后续卡泊芬净的剂型改造提供了新的思路,有望为解决临床卡泊芬净药物治疗成本高的问题提供新的研究方向。

【参考文献】

- [1] VOLTAN A R, QUINDÓS G, MEDINA ALARCÓN K P, et al. Fungal diseases: could nanostructured drug delivery systems be a novel paradigm for therapy?[J]. *Int J Nanomedicine*, 2016, 11: 3715-3730.
- [2] PERFECT J R. The antifungal pipeline: a reality check[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(9): 603-616.
- [3] KASHEM S W, KAPLAN D H. Skin immunity to *Candida albicans*[J]. *Trends Immunol*, 2016, 37(7): 440-450.
- [4] BEN-AMI R. Treatment of invasive candidiasis: a narrative review[J]. *J Fungi(Basel)*, 2018, 4(3): 97.
- [5] PRISTOV K E, GHANNOUM M A. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2019, 25(7): 792-798.
- [6] MEIRELLES G C, PIPPI B, HATWIG C, et al. Synergistic antifungal activity of the lipophilic fraction of *Hypericum carinatum* and fluconazole[J]. *Rev Bras De Farmacogn*, 2017, 27(1): 118-123.
- [7] CORNELLY O A, VEHRSCCHILD J J, VEHRSCCHILD M J G T, et al. Phase II dose escalation study of caspofungin for inva-

- sive Aspergillosis[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(12): 5798-5803.
- [8] 邱丽娟, 巢雯, 石安喆, 等. 硬脂酸单甘油酯协同卡泊芬净的体外抗念珠菌活性研究 [J]. *中国真菌学杂志*, 2021, 16(3): 145-149,165.
- [9] MIRCHANDANI Y, PATRAVALE V B, BRIJESH S. Solid lipid nanoparticles for hydrophilic drugs[J]. *J Control Release*, 2021, 335: 457-464.
- [10] GANESAN P, NARAYANASAMY D. Lipid nanoparticles: Different preparation techniques, characterization, hurdles, and strategies for the production of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for oral drug delivery[J]. *Sustain Chem Pharm*, 2017, 6: 37-56.
- [11] XU W T, BAE E J, LEE M K. Enhanced anticancer activity and intracellular uptake of paclitaxel-containing solid lipid nanoparticles in multidrug-resistant breast cancer cells[J]. *Int J Nanomedicine*, 2018, 13: 7549-7563.
- [12] TENG F F, DENG P Z, SONG Z M, et al. Enhanced effect in combination of curcumin- and ketoconazole-loaded methoxy poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone)micelles[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 88: 43-51.
- [13] BONGOMIN F, GAGO S, OLADELE R O, et al. Global and multi-national prevalence of fungal diseases-estimate precision[J]. *J Fungi(Basel)*, 2017, 3(4): 57.
- [14] PAPPAS P G, KAUFFMAN C A, ANDES D R, et al. Executive summary: clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the infectious diseases society of America[J]. *Clin Infect Dis*, 2016, 62(4): 409-417.
- [15] CARMO P H F D, GARCIA M T, FIGUEIREDO-GODOI L M A, et al. Metal nanoparticles to combat *Candida albicans* infections: an update[J]. *Microorganisms*, 2023, 11(1): 138.
- [16] KOVÁCS R, NAGY F, TÓTH Z, et al. Synergistic effect of nikkomycin Z with caspofungin and micafungin against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms[J]. *Lett Appl Microbiol*, 2019, 69(4): 271-278.
- [17] YANG Q T, LIU Z Y, WANG Y, et al. *In vitro* synergistic antifungal activities of caspofungin in combination with fluconazole or voriconazole against *Candida* species determined by the Etest method[J]. *Int J Infect Dis*, 2022, 122: 982-990.
- [18] DOS REIS T F, DE CASTRO P A, BASTOS R W, et al. A host defense peptide mimetic, brilacidin, potentiates caspofungin antifungal activity against human pathogenic fungi[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 2052.
- [19] HE J B, HUANG S S, SUN X T, et al. Carvacrol loaded solid lipid nanoparticles of propylene glycol monopalmitate and glyceryl monostearate: preparation, characterization, and synergistic antimicrobial activity[J]. *Nanomaterials(Basel)*, 2019, 9(8): 1162.
- [20] ZHANG W T, YI P, ZHOU Y, et al. Effect of fatty acids on intracellular pneumocandin B₀ storage in the fermentation of *Glarealozoyensis*[J]. *Bioresour Bioprocess*, 2023, 10(1): 63.
- [21] LI P, SENEVIRATNE C J, LUAN Q X, et al. Proteomic analysis of caspofungin-induced responses in planktonic cells and biofilms of *Candida albicans*[J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 639123.
- [收稿日期] 2023-10-22 [修回日期] 2024-05-30
[本文编辑] 费永和