

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2021.01.003

· 基础研究 ·

不同时间点两性霉素B联合氟康唑抗真菌效果研究

朱乘光¹, 叶星辰², 任彪², 周学东¹, 程磊¹

1. 口腔疾病研究国家重点实验室 国家口腔疾病临床医学研究中心 四川大学华西口腔医院牙体牙髓病科, 四川成都(610041); 2. 口腔疾病研究国家重点实验室 国家口腔疾病临床医学研究中心, 四川 成都(610041)

【摘要】 目的 探讨两性霉素B(amphotericin B, AmB)与氟康唑(fluconazole, FLC)不同时间点体外相互作用效果,为临床应用多烯类与唑类联合治疗计划提供参考。方法 采用白色念珠菌标准株SC5314进行研究,以微量肉汤两倍稀释法测定抗真菌药物最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。在观察低浓度AmB对FLC抗真菌效果影响的实验组中,实验组为分别在不同时间点(0、2、4、6 h)向FLC中加入低浓度AmB(0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$),并设置在不同时间点向FLC中加入等量溶媒DMSO为FLC单药对照组;在观察低浓度FLC对AmB抗真菌效果影响的实验组中,实验组为分别在不同时间点(0、2、4、6 h)向AmB中加入低浓度FLC(0.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$),并设置在不同时间点向AmB中加入等量溶媒DMSO为AmB单药对照组;设置溶媒DMSO对照组,分别在不同时间点加入等量溶媒DMSO及低浓度药物。各溶媒对照组、单药对照组及实验组分别观察复苏后菌落生长情况以评价药物浓度与时间的交互作用。结果 FLC抑菌浓度(0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)处理下,加入低浓度AmB不影响FLC抗真菌效果,菌落计数差异倍数无明显变化($P > 0.05$)。AmB处理白色念珠菌后不同时间点加入低浓度FLC,与AmB单药对照组相比,0 h时菌落计数无明显变化($F = 0.27$, $P = 0.775$);2~4 h真菌菌落计数达对照组1.74~1.93倍($P < 0.001$);6 h后,菌落计数较对照组无显著差异($P > 0.05$)。结论 AmB与FLC相互作用具时间依赖性,联合用药早期FLC与AmB无相互作用,2~4 h低浓度FLC可减弱AmB杀菌效果,6 h以后不影响AmB抗真菌性能。

【关键词】 白色念珠菌; 两性霉素B; 氟康唑; 体外抗真菌活性; 最小抑菌浓度; 联合用药; 时间依赖性



【中图分类号】 R78; R96 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2021)01-0020-07 开放科学(资源服务)标识码(OSID)

【引用著录格式】 朱乘光, 叶星辰, 任彪, 等. 不同时间点两性霉素B联合氟康唑抗真菌效果研究[J]. 口腔疾病防治, 2021, 29(1): 20-26. doi: 10.12016/j.issn.2096-1456.2021.01.003.

Study on the antifungal effect of amphotericin B combined with fluconazole at different time points ZHU Chengguang¹, YE Xingchen², REN Biao², ZHOU Xuedong¹, CHENG Lei¹. 1. Department of Operative Dentistry and Endodontics, West China Hospital of Stomatology, State Key Laboratory of Oral Diseases, National Clinical Research Center for Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. State Key Laboratory of Oral Diseases, National Clinical Research Center for Oral Diseases, Chengdu 610041, China

Corresponding author: CHENG Lei, Email: chengleidentist@163.com, Tel: 86-28-85501439

【Abstract】 Objective To investigate the *in vitro* interaction of amphotericin B (AmB) and fluconazole (FLC) at different time points and provide a reference for clinical combined treatment therapy of polyenes and azoles. **Methods** *Candida albicans* ATCC SC5314 was used in the study. The minimum inhibitory concentration (MIC) of antifungal drugs was determined using the double microdilution broth method. The same amount of DMSO and low concentration drugs were added to the DMSO treatment group at different time points (0, 2, 4, 6 h) to determine whether the solvent

【收稿日期】 2020-01-22; **【修回日期】** 2020-08-06

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(81870778)

【作者简介】 朱乘光, 博士研究生, Email: 253434077@qq.com

【通信作者】 程磊, 教授, 博士, Email: chengleidentist@163.com, Tel: 86-28-85501439

background environment affected the growth of *Candida albicans*. In the experimental group, to observe the effect of low concentration AmB on the antifungal effect of FLC, the experimental group was administered a low concentration of AmB (0.25 $\mu\text{g/mL}$ or 0.125 $\mu\text{g/mL}$) added to FLC at different time points (0, 2, 4, 6 h), and the same amount of DMSO was added to FLC at different time points in the single drug control group. In the experimental group, to observe the effect of low concentration of FLC on the antifungal effect of AmB, the experimental group was administered a low concentration of FLC (0.06 $\mu\text{g/mL}$ or 0.03 $\mu\text{g/mL}$) in AmB at different time points (0, 2, 4, 6 h), and the same amount of DMSO was used at different time points as the single drug control group. In the solvent group, the same amounts of DMSO and low concentration drugs were added at different time points. After resuscitation, the colony growth of each solvent control group, single-drug control group and experimental group was observed to evaluate the interaction between drug concentration and time. Compared with the AmB single-drug control group, there was no significant change in the experimental group with added low concentrations of FLC at 0 h ($F = 0.27$, $P = 0.775$), which was 1.74-1.93 times that of the control group at 2-4 h ($P < 0.001$), and there was no significant difference in colony count after 6 h ($P > 0.05$). **Results** Under the treatment of FLC at an inhibitory concentration (0.25 $\mu\text{g/mL}$), adding low concentration AmB did not affect the antifungal effect of FLC, and the multiple of colony count differences were not significant ($P > 0.05$). **Conclusion** The interaction between AmB and FLC was time-dependent. At the early stage (0 h), the interaction effect between fluconazole and amphotericin B was not clear. The fungicidal effect of AmB could be weakened when FLC was supplied at 2-4 h, and the effect of FLC on AmB was absent after 6 h.

【Key words】 *Candida albicans*; amphotericin B; fluconazole; *in vitro* antifungal activity; minimal inhibitory concentration; drug combination; time-dependence

J Prev Treat Stomatol Dis, 2021, 29(1): 20-26.

【Competing interests】 The authors declare no competing interests.

This study was supported by the grants from National Natural Science Foundation of China (No. 81870778).

近年来,随着抗生素的广泛使用、免疫缺陷疾病的发病率增高,我国侵袭性念珠菌病发病率呈现增高趋势^[1]。白色念珠菌(*Candida albicans*, *C. albicans*)是人类主要的致病性真菌之一,可导致念珠菌血症及侵袭性念珠菌感染等诸多真菌感染性疾病,是临床上病死率最高的致病真菌,在免疫功能低下的人群中更为严重^[2-3]。在抗真菌治疗应用中,多烯类药物,如两性霉素B(amphotericin B, AmB)和氮唑类药物,如氟康唑(fluconazole, FLC)是目前最为常用的抗真菌药^[4]。临床上常将AmB与氮唑类药物联合应用以达到更好的治疗效果,减少副作用发生^[5-7],但两者联用的作用机制仍存在较多争议^[8-10]。本实验将探讨AmB与FLC在体外的时间依赖性相互作用,为揭示两者不同条件下的相互作用关系提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验菌株、培养条件及药物准备

白色念珠菌标准株SC5314购自美国标准生物制品收藏中心(保藏号:ATCC MYA-2876, American Type Culture Collection)。使用平板划线法于酵母膏胨葡萄糖琼脂培养基(yeast extract peptone dex-

trose medium, YPD)活化菌株,配方:酵母提取物1%,蛋白胨2%,葡萄糖2%,琼脂2%,于35℃,5%CO₂的条件下过夜孵育。于上述培养条件下的白色念珠菌,在RPMI 1640培养基中制备菌悬液,菌液终浓度为(0.5 ~ 2.5) × 10⁴ CFU/mL。将AmB和FLC分别溶于二甲基亚砜(DMSO)中以制备药物储备液,浓度分别为10 mg/mL与2 mg/mL,冷藏待用。
1.2 两倍稀释法测定最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)

根据美国临床与实验室标准协会(CLSI)文件M27,在96孔板中,使用微量肉汤两倍稀释法在RPMI 1640培养基中进行抗真菌活性试验。于上述培养条件下的白色念珠菌,在RPMI 1640培养基中制备菌悬液,菌液终浓度为(0.5 ~ 2.5) × 10⁴ CFU/mL。在96孔板中依次加入80 μL 菌悬液与1 μL 两倍连续稀释后的药物(AmB或FLC)或溶媒对照DMSO,使药物在96孔板各孔终浓度分别为2、1、0.5、0.25、0.12、0.06、0.03、0 $\mu\text{g/mL}$ 。使用空白RPMI 1640培养基作阴性对照,将孔板置于35℃孵育24 h。将各孔菌液吹打均匀,多功能酶标仪检测OD 600 nm条件下浊度值, MIC是在实验条件下观察不到真菌生长的最低浓度。所有实验重复3次。

1.3 平板复苏实验及不同时间点药物相互作用观察

1.3.1 DMSO对AmB、FLC作用效果影响 为排除溶媒对照(DMSO)及基础DMSO环境对AmB、FLC的作用效果影响,取3块无菌96孔板,分别加入80 μL 菌悬液及1 μL DMSO,此后在不同的时间点(0、2、4、6 h),分别加入:①1 μL AmB,使AmB终浓度分别为0.25、0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$;②1 μL FLC,使FLC终浓度分别为0.06、0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$;③1 μL DMSO。

1.3.2 低浓度AmB对FLC的作用效果影响 向96孔板中依次加入80 μL 菌悬液与1 μL FLC,使FLC终浓度为2、1、0.50、0.25、0.12、0.06、0.03、0.016、0.008、0.004 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^[3],此后在不同的时间点(0、2、4、6 h)加入1 μL AmB,使AmB终浓度为0.25、0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。同时,另设阴性对照组加入1 μL DMSO。

1.3.3 低浓度FLC对AmB的作用效果影响 向96孔板中依次加入80 μL 菌悬液与1 μL AmB,使AmB终浓度为2、1、0.50、0.25、0.12、0.06、0.03、0.016 $\mu\text{g}/\text{mL}$,此后在不同的时间点(0、2、4、6 h)分别加入1 μL FLC,使FLC终浓度为0.06、0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。同时,另设阴性对照组加入1 μL DMSO。

将以上96孔板于35 $^{\circ}\text{C}$ 孵育,过夜培养。将96孔板各孔菌液吹打混匀,从每孔菌悬液中抽取2 μL ,滴加于新鲜的YPD平板上以复苏菌液。复苏平板于35 $^{\circ}\text{C}$ 孵育,过夜培养,通过比较不同时间点及不同浓度AmB与FLC处理组菌悬液是否可在YPD平板上复苏,及处理组复苏菌落较阴性对照组复苏菌落的大小来初步判断药物之间相互作用。

1.4 菌落计数实验

于上述培养条件下的白色念珠菌,在RPMI 1640培养基中制备菌悬液,菌液终浓度约为 $(0.5 \sim 2.5) \times 10^4$ CFU/mL。本实验分为以下两组,分别观察AmB及FLC相互作用对抗真菌效果的影响。

1.4.1 低浓度AmB对FLC抗真菌效果的影响 向96孔板中依次加入80 μL 菌悬液与1 μL FLC,使各孔FLC均达到抑菌浓度(0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$),分别在在不同的时间点(0、2、4、6 h)各孔加入1 μL AmB,使各孔AmB终浓度为0.125、0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$,加入等体积DMSO设置为单药对照。

1.4.2 低浓度FLC对AmB抗真菌效果的影响 向96孔板中依次加入80 μL 菌悬液与1 μL AmB,使各孔AmB均达到抑菌浓度(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$),分别在在不同

的时间点(0、2、4、6 h)各孔加入1 μL FLC,使各孔FLC终浓度为0.03、0.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$,加入等体积DMSO设置为单药对照。

将以上孔板孵育于35 $^{\circ}\text{C}$ 孵育,过夜培养。将96孔板各孔菌液吹打混匀,从每孔菌悬液中抽取20 μL ,滴加于新鲜的YPD平板上使用无菌推棒涂匀。于35 $^{\circ}\text{C}$ 孵育,过夜培养,于次日进行菌落计数,计算菌落形成单位(colony-forming units, CFU),使用在后续时间点(0、2、4、6 h)未滴加药物的菌液CFU均数作标准化,分别计算各孔CFU的差异倍数^[5],各时间点的CFU差异倍数计算公式如下: Fold Changes by CFU = CFU_{药物处理组}/CFU_{阴性对照组均数}。每组实验进行3次平行重复。

1.5 统计学分析

采用SPSS 19.0统计学软件进行相关数据结果分析,计量资料用均数 \pm 标准差表示。采用单因素方差分析处理所得结果, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 AmB、FLC对白色念珠菌的药敏结果

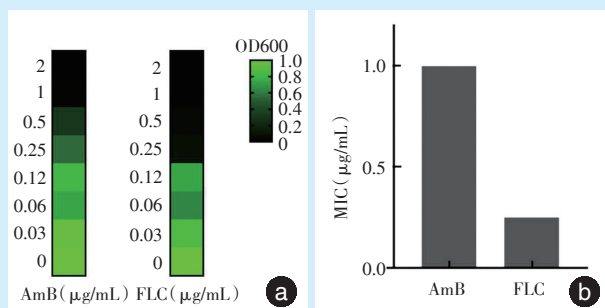
结果显示,随着药物浓度升高,处理后白色念珠菌浊度逐渐降低,提示白色念珠菌真菌浓度逐渐降低,药物的抑菌能力逐渐提高,AmB对白色念珠菌的MIC为1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、FLC的MIC为0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。见图1。

2.2 DMSO与低浓度AmB或FLC无相互作用

结果显示,使用溶媒DMSO处理后,在不同时间点加入DMSO、低浓度AmB(0.25或0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$)或FLC(0.06、0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$),白色念珠菌的生长并不受影响(图2a)。FLC是一种抑菌药物,真菌在高浓度药物处理后依旧可以复苏,而AmB为杀菌药物,只有少量真菌能够在1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 药物处理后存活,当AmB浓度达2 $\mu\text{g}/\text{mL}$,能够完全抑制真菌生长(图2b)。以上溶媒阴性对照组及单药对照组结果说明DMSO不会影响白色念珠菌生长,同时不会影响两种药物对白色念珠菌的作用。

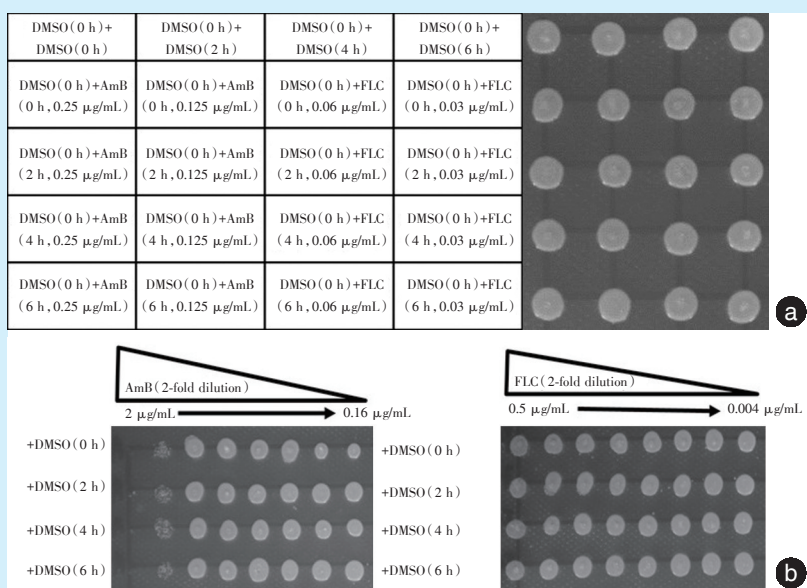
2.3 不同时间点低浓度AmB对FLC抑制白色念珠菌效果无影响

本结果中,在不同时间点加入低浓度AmB(0.25、0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$)均未改变不同浓度FLC(0.004~0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的抑制真菌能力,未能表现出明显的相互作用。进一步通过菌落计数进行定量检测分析加入AmB的不同时间点对FLC抗真菌性



a: growth of *C. albicans* in the presence of different concentrations of AmB or FLC; b: MIC values of AmB and FLC against *C. albicans*; AmB: amphotericin B; FLC: fluconazole; MIC: minimal inhibitory concentration

Figure 1 Antifungal activities of AmB and FLC
图1 AmB与FLC对白色念珠菌的抑菌效果



a: effects of DMSO, low concentrations of AmB (0.25 or 0.125 µg/mL) or FLC (0.06 or 0.03 µg/mL) on *C. albicans* recovery plates at different time points (0, 2, 4, 6 h) with the same DMSO background; the distribution graph corresponds to the recovery plate; b: effects of DMSO on *C. albicans* recovery plates after application of double-diluted concentrations of AmB (2-0.16 µg/mL) or FLC (0.5-0.004 µg/mL) at different time points (0, 2, 4, 6 h); AmB: amphotericin B; FLC: fluconazole

Figure 2 Interactions between DMSO and low concentrations of AmB or FLC
图2 DMSO与低浓度AmB或FLC无相互作用

的影响,发现在加入FLC后的不同时间点(0、2、4、6 h)加入低浓度 AmB 均未显著改变FLC的抑菌作用($P > 0.05$)。分析 AmB 低浓度处理后不同时间点对FLC抗真菌性能的影响,观察不同时间点(0、2、4、6 h)FLC 抑菌效果的变化,结果显示FLC的抑菌作用并未发生改变($P > 0.05$)。见图3。

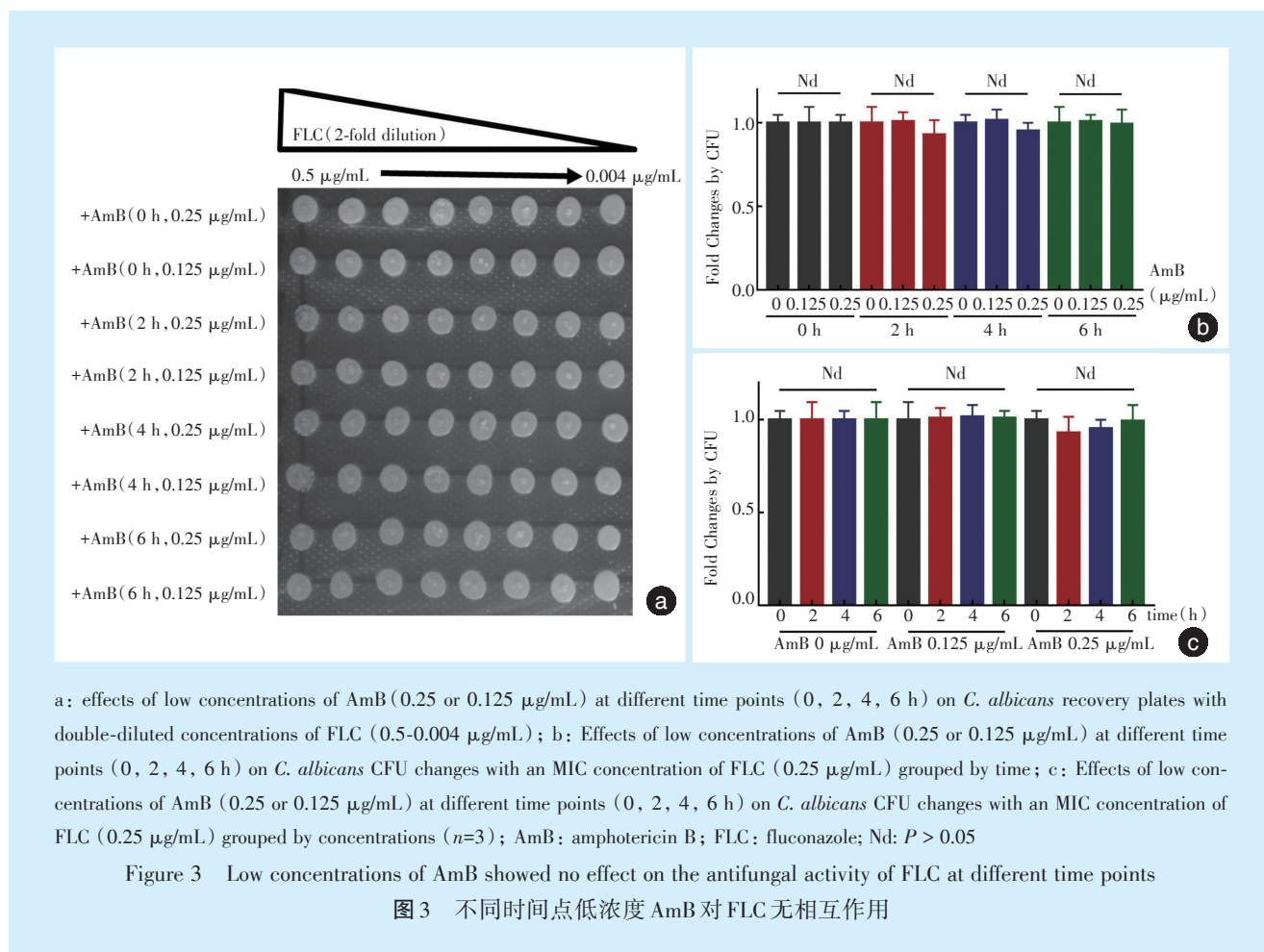
2.4 不同时间点低浓度FLC对AmB抗菌能力具有不同影响

平板复苏结果显示,不同时间点加入低浓度FLC(0.06、0.03 µg/mL)对AmB抗菌能力具有不同影响。使用AmB处理真菌后立即以及6 h后加入低浓度FLC(0.06、0.03 µg/mL),真菌的数量均减少,而在2、4 h加入低浓度FLC,在AmB杀菌浓度(1 µg/mL)下,真菌的数量与单独使用AmB时效果相似。见图4a。

菌落计数实验结果显示,在0 h加入低浓度FLC,各组菌落计数倍数无统计学差异($F = 0.27$,

$P = 0.775$);在2 h加入等量FLC,各组菌落计数FC值差异显著($F = 439.71, P < 0.001$);4 h加入等量FLC结果与2 h一致($FC = 1.74 \sim 1.93, F = 141.58, P < 0.001$);在6 h加入等量FLC,各组菌落计数无明显差异($FC = 1.03 \sim 1.16, F = 1.55, P = 0.286$)。以上结果证明在2 h与4 h低浓度FLC均可降低AmB抗真菌性能。见图4b。

以FLC浓度(0、0.03、0.06 µg/mL)分组评价其作用效果的时间依赖性。各时间点加入0 µg/mL FLC对菌落计数未见显著差异($FC = 0.84 \sim 1.09, F = 1.05, P = 0.422$)。2、4 h加入0.03 µg/mL FLC,菌落计数与0 h加入时显著升高(2 h: $FC = 1.77 \sim 1.84, F = 1354.38, P < 0.001$; 4 h: $FC = 1.74 \sim 1.93, F = 216.10, P < 0.001$),而6 h时与0 h加入相比无显著差异($FC = 1.03 \sim 1.12, F = 7.12, P > 0.05$)。加入0.06 µg/mL FLC结果与加入0.03 µg/mL相似,FLC对AmB的抗真菌性能影响表现出明显的时间



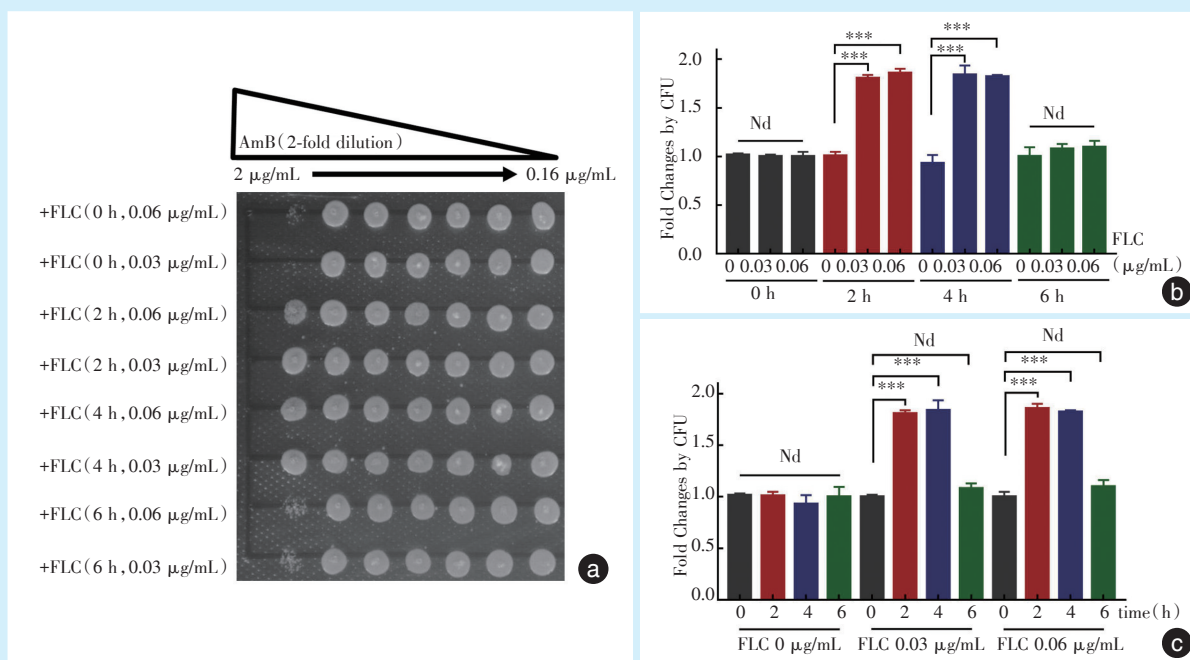
依赖性 ($F = 289.92, P < 0.001$)。见图 4c。

3 讨论

白色念珠菌是人类最主要、致病率最高的机会性致病真菌,可导致念珠菌血症等严重疾病,即便予以抗真菌治疗,其病死率也高达 40%^[11]。白色念珠菌是一种双相菌,酵母相和菌丝相之间自由转换的能力是其最常被研究的毒力因素之一^[12]。Khodavandi 等^[13]检测 FLC 与 AmB 联合应用下白色念珠菌生物膜形成情况,通过 XTT 实验及结晶紫染色发现二者联合应用可抑制白色念珠菌酵母相向菌丝相转化,这一现象在 Khodavandi 等对热带念珠菌的相关实验中也得到了证实^[8],同时在 Kawai 等通过实时成像技术对 AmB 与热带念珠菌的抗菌效果研究中发现,AmB 可在早期(6 h 以内)有效抑制其增殖,而 6 h 后给药仅能抑制生物膜进一步生长而不能杀灭念珠菌^[14],提示 AmB 的作用效果具有时间依赖性,与本实验研究结果一致。

本实验结果证明了 AmB 与 FLC 的相互作用具

时间依赖性。当这两种药物联合使用时存在以下情况,AmB 处理 2 h 内,低浓度 FLC 对 AmB 作用无显著影响,但有降低趋势;但 2 h 到 4 h 过程中,低浓度 FLC 会显著降低 AmB 杀菌效果;然而,在 6 h 后,低浓度 FLC 对 AmB 的抗真菌活性无影响。然而,低浓度 AmB 对 FLC 的作用效果并没有影响。这一差异可能是由于两种药物作用的时效关系引起。Mansfield 等^[15]通过 H³ 标记标记 FLC 以检测 FLC 的药物分布与时间之间的关系,发现 FLC 可在 3 h 内呈线性快速实现广泛的分布,作用迅速,因此证明 FLC 可快速实现对白色念珠菌的麦角甾醇合成的抑制^[9]。同样,Khan 等^[16]通过检测 AmB 对白色念珠菌杀菌曲线,发现其在 2~4 h 菌落计数下降最为明显,提示在 2~4 h 这一时间段系 AmB 与靶点结合率达到稳定,是主要发挥作用的时间段。此外,Oliveira 等^[17]通过制作杀菌曲线,发现 AmB 可在 6 h 内快速实现对部分隐球菌的杀灭,这一作用时间在热带念珠菌的研究过程中也得到证实,而 6 h 后给药仅能抑制生物膜形成,却无法进



a: effects of low concentrations of FLC (0.06 or 0.03 $\mu\text{g/mL}$) on *C. albicans* recovery plates with double-diluted concentrations of AmB (2-0.16 $\mu\text{g/mL}$) at different time points (0, 2, 4, 6 h); b: effects of low concentrations of FLC (0.06 or 0.03 $\mu\text{g/mL}$) at different time points (0, 2, 4, 6 h) on *C. albicans* CFU changes with an MIC concentration of AmB (1 $\mu\text{g/mL}$) grouped by time; c: effects of low concentrations of FLC (0.06 or 0.03 $\mu\text{g/mL}$) at different time points (0, 2, 4, 6 h) on *C. albicans* CFU changes with MIC concentration of AmB (1 $\mu\text{g/mL}$) grouped by concentrations, FLC showed a time-dependent effect on antifungal activity of AmB ($n = 3$); AmB: amphotericin B; FLC: fluconazole; Nd: $P > 0.05$; ***: $P < 0.001$

Figure 4 Low concentrations of FLC had different effects on the antifungal activity of AmB at different timepoints

图4 不同时间点低浓度FLC对AmB抗真菌能力具不同影响

步一杀灭残留念珠菌^[14],以上提示 AmB 系快速杀菌类抗真菌药物,其可在 6 h 内快速发挥抗真菌效果,而 6 h 后可能由于作用靶点麦角甾醇与 AmB 的结合达到饱和,多数麦角甾醇已被破坏,因此,靶点的缺失导致 AmB 无法继续发挥效果。因此,在不同时间点,加入低剂量 FLC 可表现出对 AmB 抗真菌效能不同的影响。在临床抗真菌治疗应用过程中,若两种药物到达感染部位的时间出现差异,尤其是在 2~4 h 这一时间窗口,可能会导致该两种抗真菌药物存在拮抗效应,导致药物抗真菌能力降低。

综上所述,AmB 与 FLC 联用具有时间依赖性,早期联用无相互作用,在 2~4 h 低浓度的 FLC 可减弱 AmB 的杀菌效果,该相互作用在 6 h 后消失。在治疗念珠菌感染过程中,需谨慎考虑不同抗真菌药物作用窗口时间,避免药物拮抗作用,对进一步促进多烯类与氮唑类药物相互作用的理解及其各自对真菌的关键作用机制具有重要意义。

【Author contributions】 Zhu CG and Ye XC performed the experiments, analyzed the data, and wrote and revised the article. Ren B, Zhou XD and Cheng L designed the study, wrote and revised the article. All authors read and approved the final manuscript as submitted.

参考文献

- [1] Chen M, Xu Y, Hong N, et al. Epidemiology of fungal infections in China[J]. Front Med, 2018, 12(1): 58-75. doi: 10.1007/s11684-017-0601-0.
- [2] Bays DJ, Thompson GR 3rd. Fungal infections of the stem cell transplant recipient and hematologic malignancy patients[J]. Infect Dis Clin North Am, 2019, 33(2): 545-566. doi: 10.1016/j.idc.2019.02.006.
- [3] Wang H, Xu YC, Hsueh PR. Epidemiology of candidemia and antifungal susceptibility in invasive *Candida* species in the Asia-Pacific region[J]. Future Microbiol, 2016, 11: 1461-1477. doi: 10.2217/fmb-2016-0099.
- [4] Kathiravan MK, Salake AB, Chothe AS, et al. The biology and chemistry of antifungal agents: a review[J]. Bioorg Med Chem, 2012, 20(19): 5678-5698. doi: 10.1016/j.bmc.2012.04.045.
- [5] Li SS, Tang XY, Zhang SG, et al. Voriconazole combined with low-

- dose amphotericin B liposome for treatment of cryptococcal meningitis[J]. *Infect Dis (Lond)*, 2016, 48(7):563 - 565. doi: 10.3109/23744235.2016.1157897.
- [6] Santos JRA, Ribeiro NQ, Bastos RW, et al. High-dose fluconazole in combination with amphotericin B is more efficient than monotherapy in murine model of *cryptococcosis*[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 4661. doi: 10.1038/s41598-017-04588-7.
- [7] Khan AA, Alanazi AM, Jabeen M, et al. Additive potential of combination therapy against *cryptococcosis* employing a novel amphotericin B and fluconazole loaded dual delivery system[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2018, 119: 171-178. doi: 10.1016/j.ejps.2018.04.015.
- [8] Khodavandi A, Alizadeh F, Jafarzadeh M. Synergistic interaction of fluconazole/amphotericin B on inhibition of enzymes contributes to the pathogenesis of *Candida tropicalis*[J]. *Pharm Sci*, 2018, 24(4): 280-290. doi: 10.15171/PS.2018.41.
- [9] Prasad R, Shah AH, Rawal MK. Antifungals: mechanism of action and drug resistance[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 892: 327-349. doi: 10.1007/978-3-319-25304-6_14.
- [10] Paterson PJ, McWhinney PH, Potter M, et al. The combination of oral amphotericin B with azoles prevents the emergence of resistant *Candida* species in neutropenic patients[J]. *Br J Haematol*, 2001, 112(1): 175-180. doi: 10.1046/j.1365-2141.2001.02486.x.
- [11] Clancy CJ, Nguyen MH. Diagnosing invasive Candidiasis[J]. *J Clin Microbiol*, 2018, 56(5): e01909 - e01917. doi: 10.1128/JCM.01909-17.
- [12] Lu Y, Su C, Liu H. *Candida albicans* hyphal initiation and elongation[J]. *Trends Microbiol*, 2014, 22(12):707 - 714. doi: 10.1016/j.tim.2014.09.001.
- [13] Khodavandi A, Alizadeh F, Khezrian F. Inhibition of *Candida albicans* yeast-hyphal transition by combination of fluconazole with amphotericin B[J]. *Physiology and Pharmacology*, 2018, 22(3): 195-204.
- [14] Kawai A, Yamagishi Y, Mikamo H. Time-lapse tracking of *Candida tropicalis* biofilm formation and the antifungal efficacy of liposomal amphotericin B[J]. *Jpn J Infect Dis*, 2017, 70(5): 559-564. doi: 10.7883/yoken.JJID.2016.574.
- [15] Mansfield BE, Oltean HN, Oliver BG, et al. Azole drugs are imported by facilitated diffusion in *Candida albicans* and other pathogenic fungi[J]. *PLoS Pathog*, 2010, 6(9): e1001126. doi: 10.1371/journal.ppat.1001126.
- [16] Khan SN, Khan S, Misba L, et al. Synergistic fungicidal activity with low doses of eugenol and amphotericin B against *Candida albicans*[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 518(3): 459-464. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.08.053.
- [17] Oliveira LD, Santos DCS, Martins MDA, et al. Time-kill curves studies with amphotericin B against *Cryptococcus neoformans/C. gattii* species complex clinical isolates[J]. *Curr Fungal Infect Rep*, 2017, 11(4): 158-162. doi: 10.1007/s12281-017-0296-3.

(编辑 周春华, 曾曙光)



官网



公众号