

实验研究

治则不同方剂对尿道致病性大肠杆菌的血凝作用和粘附尿道上皮细胞的影响

孙大锡* 蒋俊明** 王道若* 刁憬瑜* 杨学海[△] 程远纶* 张泰怀**

泌尿道感染是一种常见病、多发病,好发于女性、儿童和老年人。病情可呈现急性、慢性或慢性病程急性发作,严重者可并发高血压、肾功能衰竭。致病的原因主要是细菌感染,最常见的细菌是大肠杆菌。感染的途径多呈逆行感染,从尿道、膀胱、输尿管而上达肾盂。

随着微生物分子生物学研究的进展,已经充分肯定,病原微生物粘附于宿主细胞表面是病原微生物引起机体感染的最重要始动因素⁽¹⁾。由于尿道致病性大肠杆菌(Uropathogenic Escherichia Coli,简称 UEC)具有不同于引起肠道内感染的大肠杆菌和普通大肠杆菌的菌毛的特殊菌毛——P菌毛,能特异地凝集人的P型红细胞和识别并结合于人的尿道上皮细胞的特异受体,而实现粘附、定居、繁殖和引起泌尿道感染⁽²⁾,因此,阻止或抑制 UEC 的粘附作用就可以预防和治疗 UEC 所引起的泌尿道感染。

中医认为尿道感染属淋证范畴,急性期辨证多属湿热淋、热淋、血淋等证,祖国医学根据其病机证治和理法方药的系统认识,传统采用清热利湿治则的方药进行治疗。临床实践反复证明,对泌尿系统感染的辨证论治,急性期采用清热利湿的八正散等方化裁加减,疗效颇佳,但其作用机理迄今未能阐明。为探索清热利湿方药的疗效原理,本研究以辛温解表的麻黄汤、淡渗利湿的五苓散、清热利湿的八正散等不同治则的代表方剂,对尿道致病性大肠杆菌在体外的抑菌、杀菌作用,特异性血凝和对尿道上皮细胞粘附作用的影响,在同一条件下进行反复比较研究,借以观察八正散的作用,探索其疗效原理,试图为清热利湿方药作用原理的研究和寻找疗效更为良好的方药,探索一条新的途径。

材料和方法

一、细菌

尿道致病性大肠杆菌(菌株号 84033)取自急性肾

盂肾炎女性患者尿培养,具有 P 菌毛和甘露糖抵抗性凝血(MRHA)⁽³⁾;普通大肠杆菌(菌株号 84006)取自健康妇女粪便培养,具有 I 型菌毛和甘露糖敏感性凝血(MSHA)⁽³⁾。细菌保存于深部琼脂斜面,使用前经两次转种于营养琼脂斜面后,分别接种于营养肉汤,和含有 50%(V/V)中药浓度的肉汤,静置 37℃ 培养 18 小时,离心,取细菌沉淀用 PBS(pH 6.5)洗两次,最后配制成 10⁸/毫升细菌悬液。

二、中药

三种中药复方,分别用双盲法编为 1、2、3 号。

1 号为清热利湿方(八正散),2 号为淡渗利湿方(五苓散),3 号为辛温解表方(麻黄汤)。全部采用标准全方。药材取自于本院中药房,经附属医院中医科认定。加蒸馏水煎煮,合并两次煎剂,按生药重量浓缩成 100%(W/V)浓度。过滤后低速离心,取上清液高压灭菌后,分别用生理盐水和营养肉汤配成 50%(V/V)中药浓度的稀释液。全部实验均按双盲法进行。

三、中药抑菌试验

取三种中药 100%(W/V)煎剂,分别用生理盐水以 1/10 连续稀释,取得从 10% 到 100%(V/V)的 10 个不同稀释度。采用琼脂平板打孔法和牛津小杯法,测定各中药方剂的抑菌杀菌作用,同时用生理盐水和卡那霉素(50 单位/毫升)作阴性和阳性对照。

四、中药对细菌的处理

取三种中药的 100%(W/V)煎剂和 50%(V/V)营养肉汤中药煎剂,每管分别接种 0.2 毫升细菌悬液。另取营养肉汤作阴性对照。37℃ 静置培养 24 小时,低速离心取沉淀,生理盐水洗三次,取最后沉淀用 PBS(pH 6.5)配制成 10⁸/毫升细菌悬液。

五、血凝试验

从一名血型为 O_p 的女性志愿者取全血,另从豚

* 华西医科大学微生物学教研室, ** 华西医科大学温病理论研究室, [△] 华西医科大学附属医院中医科

鼠取全血,分别置3.8%枸橼酸钠中抗凝,用生理盐水洗红细胞三次,最后分别用生理盐水和2% D-甘露糖溶液配制成2%红细胞悬液。血凝试验采用常规玻片血细胞凝集法^[3]。取中药处理后与未经中药处理的细菌悬液,分别和含有或不含有2% D-甘露糖的人OP₁红细胞和豚鼠红细胞作血球凝集试验。

六、粘附试验

采用 Svanborg Eden 等^[4]介绍的方法并加以改进。从泌尿道感染史的青年女性取清洁新鲜晨尿,低速离心,取沉淀细胞,经生理盐水洗两次,配制成细胞悬液,血细胞计数池计数,使成 10^8 细胞/毫升。取0.2毫升尿道上皮细胞悬液,分别与0.2毫升经中药处理或未经中药处理的细菌悬液混合,加PBS(pH 6.5)至1毫升,37℃振荡孵育30分钟,另取0.2毫升尿道上皮细胞悬液和0.6毫升100%(W/V)中药煎剂混合后,加0.2毫升未经中药处理的细菌悬液至1毫升,37℃振荡孵育30分钟,然后每管加PBS(pH 6.5)至1毫升,低速离心,反复几次除去未粘附到上皮细胞上的细菌。最后取沉淀液适当稀释,取一滴置载玻片上,加盖玻片后,置光学显微镜下,用高倍镜计数20个上皮细胞上粘附的细菌数,最后以平均数表示每个上皮细胞上粘附的细菌数。同时取一滴沉淀液涂片,自然干燥、热固定、复红染色,油镜下再次计数。

结 果

一、三种中药方剂的抑菌杀菌作用

附表 三种不同方剂对两种大肠杆菌粘附尿道上皮细胞的影响

菌株号码	细胞计数	对 照	1号(八 正 散)		2号(五 苓 散)		3号(麻 黄 汤)	
			直 接	间 接	直 接	间 接	直 接	间 接
84033	20	98±2.40	78±1.99	5±0.26	84±1.87	72±1.74	92±1.83	94±1.78
84006	20	4±0.23	3±0.15	4±0.18	5±0.20	3±0.13	3±0.18	3±0.13

注:表中数据为均值±标准误

(间接法),2、3号中药(五苓散、麻黄汤)对UEC粘附尿道上皮细胞无明显影响,2号中药(五苓散)处理后的UEC粘附尿道上皮细胞轻度减少,抑制率为26.3%,而1号中药(八正散)则明显地抑制UEC对尿道上皮细胞的粘附,抑制率达95.0%($P<0.001$)。

讨 论

大肠杆菌是引起泌尿道感染的首要病原菌,严重地危害着人民的身体健康。研究资料表明,尿道致病

细菌经中药处理24小时后,再转种于营养琼脂斜面,均有大量细菌生长。琼脂平板倾注法和牛津小杯法结果发现均无抑菌圈出现。100%(W/V)浓度中,细菌仍能生长,在50%(V/V)浓度的中药肉汤中生长良好。

二、血凝作用

用不同浓度的中药配制的细菌悬液,和不同红细胞悬液作用,血凝方式未发生改变,即UEC 84033号仍然与人OP₁红细胞凝集,呈现MRHA;人正常粪便中普通大肠杆菌84006号仍然与豚鼠红细胞凝集呈现MSHA。

细菌经中药处理后,84006号的血凝方式未发生改变,仍呈现I型菌毛凝血特征;84033号菌,经2号(五苓散)、3号(麻黄汤)两种中药处理者,血凝类型和方式仍未发生改变,即仍呈现P菌毛的凝血特征;但经1号中药(八正散)处理后血凝作用消失。

细菌经中药处理后,再转种于营养琼脂斜面后的血凝方式和类型,与中药处理前时的血凝方式和类型完全相同。

三、粘附作用

显微镜下见,具有P菌毛的UEC 84033号菌大量粘附于尿道上皮细胞,部分尿道上皮细胞粘附的细菌数量极多,很难精确计数。具有I型菌毛的普通大肠杆菌(84006号)很少粘附于尿道上皮细胞。附表示,细菌预先未经中药处理,只在和尿道上皮细胞作用时加入中药(直接法),细菌粘附尿道上皮细胞的数量稍微减少。但是,细菌经中药处理后,再和上皮细胞作用

性大肠杆菌的菌毛是重要的毒力因子之一^[5]。引起急性和复发性泌尿道感染的大肠杆菌具有P菌毛,能特异地识别和结合于人尿道上皮细胞和P型红细胞表面的受体—— α -D半乳糖吡喃- β -D半乳糖吡喃糖苷,达到粘附、定居、繁殖和致病^[2]。由此可见,菌毛是细菌实现粘附的物质基础。任何物质如果能抑制细菌的菌毛表达或使之表达错误,细菌的粘附将不能实现,就不能寄居、繁殖和致病。

西药治疗急性尿道感染在于首先消除病原,着重

使用强有力的具有抑菌、杀菌作用的抗生素类和磺胺类药物。中医中药的清热利湿方药治疗尿道感染的疗效是否也是通过抑菌、杀菌作用而实现的? 本实验结果表明, 供试的三种中药方剂均未呈现有抑菌、杀菌的作用, 甚至在 100%(W/V) 浓度中细菌还能生长, 证明具有清热利湿作用的八正散治疗急性泌尿系感染, 显然不是通过抑菌或杀菌作用来实现的。

供试的三种中药方剂的各种稀释度所配制的细菌悬液, 和红细胞悬液混合作用后, 其血凝类型和方式不发生改变。细菌预先未经中药处理, 只在和尿道上皮细胞作用时加入中药, 细菌粘附尿道上皮细胞的数量只是稍微减少, 表明供试中药不含有供试细菌菌毛受体类似物。所以不能出现竞争性地抑制血细胞凝集和粘附尿道上皮细胞, 提示供试中药不是通过竞争方式去消除 UEC 对尿道上皮细胞的粘附。

具有 I 型菌毛的普通大肠杆菌, 在中药处理后和处理前的血凝类型和方式, 以及粘附尿道上皮细胞的数量均未发生显著改变, 表明供试中药不影响普通大肠杆菌的 I 型菌毛的表达。具有 P 菌毛的尿道致病性大肠杆菌, 经五苓散、麻黄汤处理后, 血凝类型和方式也未发生改变, 粘附到尿道上皮细胞的数量不同程度地稍有减少, 提示这二种中药对尿道致病性大肠杆菌粘附尿道上皮细胞的作用无明显影响。但是, 具有 P 菌毛的 UEC 经八正散处理后, 血凝现象消失, 粘附到尿道上皮细胞的数量显著地减少, 与对照相比, 减少了 95%($P < 0.001$), 表明八正散能抑制 UEC 的 P 菌毛的表达, 使其血凝作用消失, 粘附尿道上皮细胞的能力被抑制。

泌尿道感染属下焦湿热病中的淋证, 其病因病机可概述为“肾虚膀胱湿热”, 根据急性发作期的临床表现, 辨证多为热淋、血淋、湿热淋等证候。宋《太平惠民和剂局方》首载, 八正散治热淋、血淋等证, 近代中医学者屡有报道, 八正散化裁加减也是我院治疗泌尿系感染的常用效方, 但该方对致病性大肠杆菌的作用及其疗效原理迄今未能阐明。本实验采用三种不同治则的代表方剂进行比较研究, 是基于祖国医学对泌尿

道感染的病机证治和理法方药的系统认识, 经临床实践反复证明, 清热利湿方药的作用原理, 仅从利尿、体外抑菌、解毒, 或对机体免疫功能的某些影响进行过一些研究, 其结果似不能令人信服地解释八正散等方药, 何以能较快地使临床症状缓解和尿菌转阴。麻黄汤辛温解表不用于下焦湿热的淋证, 五苓散淡渗利湿, 虽能利湿但无清热作用, 不单独用于湿热淋证, 而八正散既能清热又能祛湿, 体外虽无明显地抑菌、杀菌作用, 但能明显地抑制尿道致病性大肠杆菌凝集人的 P 型红细胞, 和粘附尿道上皮细胞的作用。推测在尿道中只要有足够的药物浓度和足够的作用时间, 尿道致病性大肠杆菌就不能实现粘附, 已经粘附到尿道上皮细胞的细菌, 由于尿道上皮细胞很快地更新, 会随着上皮细胞的脱落而脱落, 不能再粘附到其它新生的上皮细胞, 随着尿流的清洗和尿道的蠕动而被排除到体外, 这可能正是八正散治疗急性尿道感染的一个重要疗效原理。当然, 八正散复方的药理作用是多方面的, 众所周知, 尿道致病性大肠杆菌引起泌尿道感染的发病机理是复杂的, 粘附作用只是引起感染的始动因素, 不能粘附也就不能引起感染, 但粘附以后, 必然还会产生致病物质等等。故中医临床辨证论治中, 对该病不仅使用清热利湿方药而获效, 更不是仅只使用八正散。但通过八正散去除尿道致病性大肠杆菌的粘附作用的发现, 揭示了清热利湿法方药的这一重要疗效原理, 从而为该类药物研究以及筛选更为有效的新方药, 探索了一条可行的新途径。

微生物学教研室赵宗蓉、唐建民协助参加部分实验, 林志靖教授指导, 特此致谢。

参 考 文 献

- (1) Beachey EH, et al: J Infect Dis 143:325 1981.
- (2) Korhonen TK, et al: Infect Immun 37:286, 1982.
- (3) 孙大锡等: 肠道外感染的大肠杆菌的 P 菌毛出现频率, 产溶血素能力和感染部位关系的研究。四川医学院学报, 待发表。
- (4) Svanborg-Eden, et al: Infect Immun 18:767, 1977.
- (5) Välsäneli-Rhen V, et al: Infect Immun 43:149, 1984.

《实用中医文献学》函授班继续招生

本班由天津中医学院中医系主办, 面向全国招生。现有学员一千二百余人, 尚有一定名额, 仍可继续报名, 额满为止。《实用中医文献学》是研究如何有效地使用中医文献的科学, 通过学习可以使学员较为便捷地掌握利用古今中医文献的必要方法。学制一年, 1985

年 4 月 30 日~1986 年 4 月 30 日。教学计划: 拟分五次邮寄学习资料。教材《实用中医文献学》是主要学习材料, 分两次邮寄。《实用中医文献学函授通讯》为辅助学习材料, 拟分三次邮寄。最后实行开卷考试, 成绩及格者发给单科结业证书。