

方剂研究

八正散抑制尿道致病性大肠杆菌的菌毛表达
和对尿道上皮细胞的粘附的影响

微生物学教研室 孙大锡 王道若 刁憬瑜
 华西医科大学 温病理论研究室 蒋俊明 杨学海 张泰怀
 电子显微镜实验室 王远萍 杨果

尿道致病性大肠杆菌(Uropathogenic *Escherichia coli* 简称 UEC) 粘附到尿道上皮细胞上是 UEC 引起尿路感染的重要始动因素⁽¹⁾。UEC 粘附到尿道上皮细胞的物质基础是 P 菌毛⁽²⁾。抑制 P 菌毛的表达, 或使 P 菌毛表达异常均能预防和治疗 UEC 所引起的尿路感染。作者以往工作已证明中药八正散在体外能明显地抑制 UEC 粘附到人尿道上皮细胞上, 推测八正散有抑制 UEC 的菌毛表达作用⁽³⁾。本研究证实了这种推测, 八正散正是通过抑制 UEC 的 P 菌毛的表达, 抑制 UEC 对尿道上皮细胞的粘附作用。

材料和方法

一、实验材料

1. 细菌悬液的制备: UEC(菌株号 84033)自急性肾盂肾炎女性患者尿中分得, 具有 P 菌毛和甘露糖抵抗性凝血, 体外粘附试验证明其能大量地粘附到人的尿道上皮细胞上^(4,5); 普通大肠杆菌(Common *Escherichia coli* 简称 CEC)、菌株号(84006)取自健康女性粪便培养, 具有 I 型菌毛和甘露糖敏感性凝血, 体外粘附试验证明其很少能粘附到人的尿道上皮细胞上^(4,5)。供试菌株经两次转种后, 再转种于肉汤, 37℃静置培养 18 小时, 离心, 取沉淀, 用生理盐水配制成浓度为 10^8 个/毫升细菌悬液。

2. 尿道上皮细胞悬液的制备: 取健康女性晨尿, 离心, 取沉淀, 用生理盐水或离心后上清尿液配制成 10^6 个/毫升细胞悬液。

3. 八正散煎剂稀释液: 取八正散全方, 加蒸馏水煎煮, 合并两次煎液, 按生药重量浓缩成 100%(w/v) 浓度, 过滤后离心, 取其上清液, 用营养肉汤配制成 50%(v/v) 中药浓度的稀释液。

二、实验方法

1. 中药体外试验: 将供试菌悬液 0.1 毫升, 接种

到 3 毫升的八正散煎剂稀释液中, 37℃静置培养 18 小时后作细菌粘附试验。粘附试验方法同作者以前报告^(3,5)。取被八正散处理后的细菌悬液和尿道上皮细胞悬液各 0.2 毫升, 加生理盐水至 1 毫升, 37℃振荡孵育 30 分钟, 然后反复洗涤离心, 除去未粘附在上皮细胞上的细菌, 最后取沉淀, 适当稀释、涂片、干燥、热固定, 稀释复红染色, 计数 20 个上皮细胞粘附的细菌总数, 并以平均数代表每个上皮细胞上粘附的细菌数。

2. 中药体内试验: 志愿受试者为一名男性健康成年人, 既往无肝肾疾患, 近期内未服用过任何中西药物。晚上临睡前, 排完尿后, 口服按生药重量计算的 100%(w/v) 全方八正散煎液一剂, 收集服药后 4 小时的尿和次日晨尿各 20 毫升, 混合后离心, 取上清液, 接种供试菌, 37℃静置培养 18 小时, 离心后, 配成细菌悬液, 与尿道上皮细胞混合, 同上法做粘附试验, 计算每个上皮细胞粘附的细菌平均数。

3. 对照试验: 取志愿者服八正散煎剂前的尿液, 经离心后, 取上清液, 接种供试菌, 培养。同时取细菌肉汤培养液, 分别离心, 收集细菌沉淀, 配制细菌悬液, 与尿道上皮细胞作粘附试验, 计算在每个尿道上皮细胞上粘附的细菌平均数。

4. 电子显微镜检查: 取未经八正散处理的和经八正散在体外与体内处理的细菌悬液一滴, 分别置洁净玻片上, 双蒸水适当稀释, 以已经用 Formavar 镀膜和喷碳的铜网粘取细菌悬液, 1% 磷钨酸(pH 7) 负染, 置 H-600(50 Kv) 透射电镜下观察细菌的形态, 特别注意细菌的菌毛有无和有菌毛的细菌的多少。

结 果

观察结果见附表。附表示, 无论在体外经中药八正散处理后的, 或口服中药在体内经尿液处理后的尿

附表 八正散对两种大肠杆菌粘附
于尿道上皮细胞上的影响

大肠杆菌株	对 照		中药体	中药体
	肉汤培养	正常尿 液培养	外试验	内试验
UEC84033	90±2.10	68±2.71	6±0.25*	18±0.21*
CEC84006	5±0.25	8±1.93	4±0.18	6±0.20

注：表中数据为每个上皮细胞粘附细菌的平均值±标准误。

* 与对照试验相比， $P < 0.001$ 。

道致病性大肠杆菌 84033 号，其粘附在尿道上皮细胞上的细菌数量均较未经中药处理，在体外粘附到尿道上皮细胞上的数量明显减少($P < 0.001$)，前者每个上皮细胞上粘附的细菌量下降 93.3%；后者下降 80%，与体外尿液处理后其粘附到上皮细胞的数量相比，下降 73.5%。而具有 I 型菌毛的普通大肠杆菌 84006 号，无论经中药处理后的体内或体外试验，其粘附到尿道上皮细胞上的细菌数量，与未经中药处理的体外对照试验者相比，均无明显变化($P > 0.05$)。

电镜观察到，两株不同的大肠杆菌都有丰富的菌毛。经药物在体内和体外处理后，普通大肠杆菌 84006 号的形态学无明显的改变。但是，具有 P 菌毛的 UEC 84033 大部分细菌表面未见有菌毛，少数细菌虽有菌毛，但菌毛的数量明显地减少(20 根以下)。将药物处理后的 UEC 84033 转种肉汤，37℃ 培养 18 小时，再置电镜下观察，则又可见到大量菌毛在菌体周围。

讨 论

引起尿路感染的细菌必需牢固地粘附在尿道上皮细胞表面，才能防止由于尿流的冲洗和尿道的蠕动而被排除。细菌粘附在尿道上皮细胞表面是细菌实现定居、繁殖，是尿路感染的先决条件之一⁽¹⁾。阻断细菌对尿道上皮细胞的粘附，就可以预防和治疗细菌引起的尿路感染。

中医临床实践已证明，八正散和由八正散化裁的方剂是治疗急性泌尿系统感染的常用效方之一。体外抑菌试验已经表明，八正散对 UEC 无抑菌作用⁽³⁾。本研究用 UEC 在体外和体内经八正散煎剂处理后，在电镜下观察，可见到许多细菌正处于不同分裂期中，再次证明了八正散对 UEC 无抑菌作用。显然，八正散治疗急性尿路感染不是通过抑菌和杀菌作用实现的。

UEC 经八正散在体外直接处理后，粘附到尿道上

皮细胞的能力降低。但是，药物经口服后，再经体内代谢，是否还具有抑制 UEC 对尿道上皮细胞的粘附的药理作用呢？本研究初步证实，八正散煎剂经体内代谢后，在尿中保留有效药理成分，发挥去除 UEC 对尿道上皮细胞的粘附作用。众所周知，八正散由八种不同中药组成，各种中药的化学成分及其在体内的代谢情况十分复杂，至于八正散中到底是什么有效成分在发挥去 UEC 的粘附作用，以及八正散煎剂在体内的药物代谢动力学还有待于更深入地研究。

已经证实，UEC 粘附到尿道上皮细胞的物质基础是 P 菌毛^(1,2)。该 P 菌毛能特异地识别和结合尿道上皮细胞表面的 α -D-半乳糖吡喃- β -D-半乳糖吡喃糖苷受体。八正散抑制 UEC 的粘附作用是通过抑制 P 菌毛的表达，或者是通过其他机理实现的呢？通过电镜观察证实，八正散在体外和体内均有抑制 P 菌毛的表达作用，提示八正散去除 UEC 对尿道上皮细胞的粘附是通过抑制 P 菌毛的表达而实现的。Väisänen 等⁽⁷⁾报告，使用亚致死量磺胺类药物能干扰 UEC 的 P 菌毛的表达和粘附作用，但细菌的外膜蛋白质无明显改变。八正散除了能抑制 P 菌毛的表达外，是否对细菌其它超微结构有影响，还有待于继续研究。

研究发现 UEC 的 P 菌毛的蛋白质合成和表达受菌体染色体基因调控和编码⁽⁸⁾。象其他大肠杆菌一样，在环境因素影响下，UEC 也可以发生基因突变，或出现表型变异。前者可以遗传，后者则不能。UEC 经八正散处理后，P 菌毛表达受抑制，但转种后的子代，菌毛表达又恢复正常，表明 UEC 经八正散处理后，编码 P 菌毛的基因未发生突变，只是表型发生了改变。结合临床实践，提示使用八正散治疗急性尿路感染必须达到足够的疗程，或同时使用有效的抗生素类药物，才能彻底治愈。否则，在短程单独使用八正散后，当尿中无八正散有效药理成分存在时，尿道内残留的 UEC 的 P 菌毛又会充分表达，粘附到尿道上皮细胞表面，细菌繁殖，引起新的复发性感染。

本校微生物学教研室张再蓉、赵宗蓉、唐建明等同志参加部分实验，特此致谢。

参 考 文 献

- (1) Korhonen TK et al; Infect Immun 37:286, 1982.
- (2) Kallénius G et al; Infection 13 (suppl 2):202, 1985.
- (3) 孙大锡等；中医杂志 26(8):57, 1985.
- (4) 孙大锡等；四川医学院学报 16(3):208, 1985.
- (5) 孙大锡等；尿道致病性大肠杆菌和奇异变形杆菌粘附到人的尿道上皮细胞，华西医科大学学报，待发表，1985.
- (6) Väisänen-Rhen V et al; Infect Immun 43:149, 1984.
- (7) Väisänen-Rhen V et al; Antimicrob Agents Chemother 22:120, 1982.
- (8) Hagberg L et al; Infect Immun 40:265, 1983.