

实验研究

DOI: 10. 13288/j. 11-2166/r. 2024. 22. 010

补中愈淋汤对复发性尿路感染模型小鼠膀胱黏膜屏障及膀胱上皮细胞载菌量的影响

尹浩¹, 薛毅¹, 张彪¹, 金卓卉¹, 朱娇丽¹, 蒋毅¹, 王晓芳¹,
冯晨¹, 金云云², 金庆江¹, 金庆雷¹, 王鑫¹✉

1. 苏州市中西医结合医院, 江苏省苏州市吴中区下沙塘 39 号, 215101; 2. 苏州市吴中区越溪卫生院

[摘要] **目的** 探讨补中愈淋汤防治复发性尿路感染的可能作用机制。**方法** 采用尿路致病性大肠杆菌(UPEC) UTI89 菌株膀胱灌注法建立复发性尿路感染小鼠模型, 造模成功小鼠随机分为模型组、抗生素组及补中愈淋汤低、高剂量组, 每组 6 只。另取 5 只未造模的 C57BL/6 小鼠作为空白组。补中愈淋汤低、高剂量组分别予浓度为 1.3、5.2 g/ml 补中愈淋汤 0.1 ml/10 g 灌胃, 抗生素组予 5 mg/ml 盐酸左氧氟沙星溶液 0.1 ml/10 g 灌胃, 空白组及模型组予蒸馏水 0.1 ml/10 g 灌胃。各组均每天灌胃 1 次, 连续 7 天。采用尿斑实验观察小鼠尿斑总数、中心尿斑数及尿斑总尿量; HE 染色观察小鼠膀胱组织病理学变化; ELISA 法检测血清炎症因子白细胞介素 1 β (IL-1 β)、白细胞介素 6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 含量; 扫描电镜观察膀胱上皮细胞形态; 免疫荧光法检测膀胱组织抗尿路斑块蛋白 3A (UroPlakin 3A) 蛋白水平及 UPEC 载菌量; 涂板法检测尿菌量及膀胱上皮细胞内细菌量; RT-PCR 法检测膀胱组织 Ras 相关蛋白 11A (RAB11A)、Ras 相关蛋白 27B (RAB27B) mRNA 水平; 免疫印迹法检测膀胱组织微管相关轻链蛋白 3 (LC3)、P62 蛋白水平。**结果** 与空白组比较, 模型组小鼠膀胱上皮细胞脱落, 膀胱上皮细胞形态异常; 膀胱上皮平均表面积减小, 膀胱组织 UroPlakin 3A 蛋白及 RAB11A、RAB27B mRNA 水平降低; 小鼠尿斑总数、中心尿斑数, 膀胱组织 UPEC 载菌量, 尿菌量, 膀胱上皮细胞内细菌量, 血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平, 膀胱组织 LC3、P62 蛋白水平均升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较, 补中愈淋汤低、高剂量组小鼠膀胱上皮细胞层完整、上皮细胞形态规则; 膀胱上皮细胞平均表面积增大, 膀胱组织 UroPlakin 3A 蛋白及 RAB11A、RAB27B mRNA 水平升高; 小鼠尿斑总数、中心尿斑数, 膀胱组织 UPEC 载菌量, 尿菌量, 膀胱上皮细胞内细菌量, 血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平, 膀胱组织 P62 蛋白均降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), LC3 蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。抗生素组膀胱上皮细胞部分缺失, 上皮细胞形态异常。与抗生素组比较, 补中愈淋汤低、高剂量组小鼠膀胱上皮细胞平均表面积增大, 膀胱上皮细胞载菌量减少, 膀胱组织 P62 蛋白水平降低 ($P < 0.05$)。补中愈淋汤低、高剂量组组间比较, 各指标比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 补中愈淋汤可能通过修复膀胱黏膜屏障, 提高膀胱组织 RAB11A 及 RAB27B 水平、增强自噬, 促进膀胱上皮细胞内细菌清除, 从而防治复发性尿路感染。

[关键词] 复发性尿路感染; 尿路致病性大肠杆菌; 补中愈淋汤; 膀胱组织; 黏膜屏障; 载菌量; 尿路斑块蛋白

基金项目: 江苏省中医药科技发展计划项目(YB2020059); 苏州市姑苏卫生人才计划人才科研项目(GSWS2022114); 苏州市科技计划项目(SKY2023105, SKJY2021019); 苏州市中西医结合科研基金(SKYD2023243); 苏州市中西医结合医院院级课题立项项目(YJ2019012)

✉ 通讯作者: frogprince417@sina.com

复发性尿路感染 (recurrent urinary tract infection, rUTI) 是指半年内发生 2 次及以上或一年内发生 3 次及以上, 且致病菌为同一种菌株的尿路感染^[1]。抗感染治疗是 rUTI 的主要治疗方案, 但短疗程抗生素治疗后仍有较高的复发率, 长疗程低剂量抑菌治疗则可导致耐药菌的出现^[2-3]。膀胱上皮细胞及其表面的尿路斑块蛋白可形成屏障以抵抗病原体的入侵^[4]。研究表明, 膀胱黏膜屏障异常导致机体对复发性感染敏感^[5]。尿路致病性大肠杆菌 (UPEC) 是尿路感染的主要致病菌^[6], 在感染控制后, 致病菌可以在膀胱上皮细胞内定植数月, 导致尿路感染复发^[7]。

根据 rUTI 反复发作、遇劳而发的特点, 中医学一般按照“劳淋”辨治^[8]。《医宗必读》载:“劳淋者, 因劳倦而成, 多属脾虚”, 《病机汇论》亦载:“劳倦伤中, 气虚下陷, 令小便淋漓不快”, 均提示正气亏虚是 rUTI 的重要病因。我们结合临床经验, 提出气虚邪伏是 rUTI 的主要病机, 并自拟益气透邪的补中愈淋汤治疗 rUTI^[9]。课题组前期临床研究发现, 补中愈淋汤可改善 rUTI 患者排尿不适症状, 减少复发率^[10], 但其作用机制尚不明确。本研究通过构建 rUTI 小鼠模型, 观察补中愈淋汤对膀胱黏膜屏障及膀胱上皮细胞内细菌量的影响, 探讨补中愈淋汤防治 rUTI 的可能作用机制, 以期为临床用药提供实验依据。本实验由苏州市中西医结合医院伦理委员会批准(伦理审查编号:2024DW009)。

1 材料及方法

1.1 动物

C57BL/6 雌性小鼠 60 只, 6~8 周龄, 体质量 (20±3) g, 购于南京青龙山生物科技有限公司, 实验动物许可证号: SCXK (苏) 2024-0001。于苏州市中西医结合医院中心实验室动物实验中心常规饲养, 动物房干燥、通风, 环境温度控制在 27℃, 湿度 50%, 自由饮水进食, 12 h/12 h 明暗交替, 适应性喂养 1 周。

1.2 菌种

UPEC 的 UTI89 菌株由南京中医药大学中心实验室馈赠, 将 UTI89 菌株接种于溶源性液体培养基中, 37℃ 恒温摇床孵育 18 h, 用紫外分光光度计 (OD₆₀₀) 计算细菌浓度, 根据既往研究结果^[11] 使用无菌 PBS 调整菌液浓度为 10⁸ CFU/30 μl。

1.3 药物

补中愈淋汤组成: 炙黄芪 30 g, 党参 15 g, 升

麻 10 g, 北柴胡 6 g, 麸炒白术 10 g, 陈皮 6 g, 茯苓 10 g, 当归 10 g, 桂枝 10 g, 浮萍 10 g, 鸭跖草 30 g, 车前子 15 g, 六一散 30 g, 紫菀 10 g。药物由苏州市中西医结合医院制剂室提供, 水煎浓缩至含生药量 1.3、5.2 g/ml 溶液, 4℃ 保存备用。盐酸左氧氟沙星 (货号: L407938)、甲氧苄啶 (货号: T168839)、磺胺甲恶唑 (货号: S303754)、庆大霉素 (货号: G302822), 均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.4 主要试剂及仪器

4% 多聚甲醛 (批号: G1101)、二甲苯 (批号: G1128)、苏木精 (批号: G1077)、伊红 (批号: G1001)、2.5% 戊二醛固定液 (批号: G1102)、RIPA 裂解液 (批号: G2002)、FITC 标记的山羊抗兔 IgG (批号: GB22303)、DAPI 染液 (批号: G1012), 武汉赛维尔生物科技有限公司; 逆转录试剂盒 (批号: R423-01)、SYBR 染色法试剂盒 (批号: Q712)、SDS-PAGE 凝胶 (批号: E303-01), 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; HRP-山羊抗兔二抗 (批号: 511203)、抗尿路斑块蛋白 3A (UroPlakin 3A) 抗体 (批号: R382432), 成都正能生物技术有限责任公司; 抗 UPEC 抗体 (批号: ab137967), 艾博抗 (上海) 贸易有限公司; 白细胞介素 6 (IL-6, 批号: EK206)、白细胞介素 1β (IL-1β, 批号: EK201B)、肿瘤坏死因子 α (TNF-α, 批号: EK282) ELISA 试剂盒, 杭州联科生物科技股份有限公司; 钼酸 (批号: 18456), Ted Pell 公司; 醋酸铀 (批号: 02624-AB), SPI 公司; RNA 提取试剂盒 (批号: MR0112), 苏州麦迪蔻生物科技股份有限公司; HRP-山羊抗小鼠二抗 (批号: BF03001)、微管相关轻链蛋白 3 (LC3) 抗体 (批号: BD-PT7936), 苏州博奥龙科技有限公司; P62 蛋白抗体 (批号: 18420-1-AP), 武汉三鹰生物技术有限公司; ECL 发光液 (批号: P0018M), 碧云天生物技术研究所以; BCA 蛋白 (批号: P0009), 海南碧海云天生物科技有限公司。

IX73 型荧光显微镜、PENE-P7 型微单相机, 日本奥林巴斯公司; Regulus 8100 型高分辨冷场发射扫描电镜, 日本 HITACHI 公司; 60 cm×60 cm 型无荧光剂滤纸, 苏州宝威德环保科技有限公司; 90W-365NM 型荧光检测灯, 南京韩炎商贸有限公司; Synergy LX SLXFA 型酶标仪, BioTek 公司。

1.5 造模、分组及给药方法

60 只 C57BL/6 雌性小鼠适应性喂养 1 周后, 采

用随机数字表法挑选 55 只小鼠用于造模：将 10^8 CFU 的 UTI89 菌株分 2 次经尿道灌注小鼠膀胱，间隔 24 h，在 2 次感染后第 1、3、7、10、14、21、28 天行尿菌培养，保留尿菌持续阳性的小鼠。第 28 天时在小鼠饮用水中加入甲氧苄啶和磺胺甲恶唑，使饮用水中甲氧苄啶浓度为 54 mg/ml，磺胺甲恶唑浓度为 270 mg/ml，连续 10 天。在第 10 天行尿菌培养，剔除尿菌阳性小鼠。抗生素开始治疗 4 周后，再次经尿道灌注 10^8 CFU 的 UTI89 菌株构建 rUTI 小鼠模型，尿菌培养阳性提示造模成功^[12]。结果显示，有 24 只小鼠造模成功，采用随机数字表法将造模成功的小鼠分为模型组、抗生素组及补中愈淋汤低、高剂量组，每组 6 只。剩余 5 只未造模小鼠作为空白组。

依据《中药药理实验方法学》^[13] 小鼠与人药物剂量折算，空白组及模型组予蒸馏水 0.1 ml/10 g 灌胃，补中愈淋汤低、高剂量组分别予浓度为 1.3、5.2 g/ml 补中愈淋汤 0.1 ml/10 g 灌胃，其中低剂量为等效剂量，抗生素组予 5 mg/ml 盐酸左氧氟沙星溶液 0.1 ml/10 g 灌胃。均每天灌胃 1 次，连续 7 天。末次给药后 2 h 无菌留取小鼠膀胱、血清标本。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 尿斑实验观察小鼠排尿频率及排尿量 末次给药结束后 2 h，小鼠在安静环境下单笼饲养，将无荧光剂滤纸放入鼠笼底面铺平，正常供给食物，不提供饮水，4 h 后取出滤纸，晾干。用荧光检测灯照射并留取图片。Image J 1.8.0 软件处理，计数尿斑总数：面积大于 1.7 mm^2 的尿斑数反映排尿的频率；中心尿斑数：滤纸中央 50% 面积的尿斑数反映膀胱过度活动的异常排尿行为；尿斑总尿量：4 h 尿斑实验检测时间内小鼠的排尿量。

1.6.2 HE 染色观察小鼠膀胱组织病理学变化 尿斑实验结束后，各组小鼠予摘除眼球取血，静置 1 h，4℃、3000 r/min 离心 10 min（离心半径 10 cm），后分离血清，-80℃保存。小鼠心尖取血后用脱颈法处死，暴露腹部区域，予 75% 乙醇消毒，取出膀胱。取各组小鼠大小约 $3 \text{ mm} \times 3 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ 膀胱组织，PBS 冲洗后用 4% 多聚甲醛固定，将组织在不同浓度的乙醇中脱水，置于二甲苯中，包埋在蜡中，并切成 $4 \mu\text{m}$ 的薄片。脱蜡后，苏木精染色细胞核 2 min，伊红染色细胞质 1 min，脱水后置于显微镜下观察组织病理学变化。

1.6.3 ELISA 法检测血清 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量 取各组小鼠血清各 10 μl ，根据 ELISA 试剂盒

说明书步骤进行，使用酶标仪在 OD 值 450 处测定吸光度，根据标准品的含量计算出相应样品的含量。

1.6.4 扫描电镜观察膀胱上皮细胞形态 取各组小鼠约 1 mm^3 膀胱组织，固定于 2.5% 戊二醛固定液中。磷酸盐缓冲液冲洗后，锇酸固定 2 h，乙醇梯度脱水，样品浸泡切片，从铜网中取出，醋酸铀染色，洗涤干燥过夜，在扫描电镜下观察并留取图像。用 Image J 1.8.0 软件估算膀胱上皮细胞表面积。

1.6.5 免疫荧光法检测膀胱组织 UroPlakin 3A 蛋白水平及 UPEC 载菌量 取各组小鼠大小约 $3 \text{ mm} \times 3 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ 膀胱组织进行石蜡包埋，切 $4 \mu\text{m}$ 的薄片，烘干箱里 65℃烘 1 h；二甲苯、乙醇脱蜡；标本浸入 1 $\times$ EDTA 修复液，煮沸抗原修复，待自然冷却后用 PBS 洗 3 次。滴加山羊血清，37℃封闭 30 min；吸水纸吸掉血清，加一抗（UroPlakin 3A 抗体 1:100 稀释，UPEC 抗体 1:60 稀释）37℃孵育 1 h；二抗 1:500 稀释，37℃孵育 50 min；加 DAPI 染液室温 10 min；用荧光防淬灭封片液封片后荧光显微镜观察并留取图像，用 Image J 1.8.0 软件对每组图像进行荧光强度分析。

1.6.6 涂板法检测尿菌量及膀胱上皮细胞内细菌量 无菌留取各组小鼠尿液各 100 μl ，取 20 μl 尿液于 LB 琼脂平板上，37℃孵育 18 h 后用相机留取图像。无菌留取各组小鼠膀胱组织各 50 mg，在含 100 $\mu\text{g/ml}$ 庆大霉素的 PBS 中浸泡 90 min 以清除细胞外细菌，在 PBS 中清洗 3 遍后，匀浆于 600 μl PBS 中，稀释 10 倍，取 10 μl 于 LB 琼脂平板上，37℃孵育 18 h 后用相机留取图像，用 Image J 1.8.0 软件对每组图像进行菌落计数。

1.6.7 RT-PCR 法检测膀胱组织 Ras 相关蛋白 11A（RAB11A）、Ras 相关蛋白 27B（RAB27B）mRNA 水平 取小鼠膀胱组织 50 mg，使用组织磁珠法 RNA 提取试剂盒提取总 RNA，使用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录合成 cDNA，根据说明书要求使用 SYBR 染色法试剂盒进行实时荧光定量，根据所得 Ct 值应用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 mRNA 的相对表达水平。引物由生工生物工程（上海）股份有限公司合成，引物序列见表 1。

1.6.8 免疫印迹法检测膀胱组织 LC3、P62 蛋白水平 使用 RIPA 裂解液在低温研磨仪中研磨膀胱组织，冰上裂解 30 min，超声处理后 4℃、12 000 r/min 离心 15 min（离心半径 10 cm），取上清进行 BCA 蛋白定量，加入 Loading buffer 95℃、10 min，上样至 SDS-PAGE 凝胶中进行电泳，转膜至甲醇激活

表1 小鼠膀胱组织 RAB11A、RAB27B 引物序列
Table 1 Primer sequences of RAB11A and RAB27B

from mouse bladder tissue		
名称	序列 (5'→3')	长度/bp
RAB27B	上游: CGTCAGGAAAAGCGTTTAAGGT	22
	下游: AGAAGCTCTGTTGACTGGTGA	21
RAB11A	上游: TGGGAAAAACAATAAAGGCACAGA	23
	下游: ATGTGAGATGCTTAGCAATGTCA	23
GADPH	上游: AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	21
	下游: TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	23

注: RAB27B, Ras 相关蛋白 27B; RAB11A, Ras 相关蛋白 11A; GADPH, 磷酸甘油酸脱氢酶。

PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 加入 P62 蛋白抗体 (稀释比例为 1 : 5000) 和 LC3 抗体 (稀释比例为 1 : 1000) 4 ℃ 过夜, PBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 加入二抗室温 45 min, PBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 加入 ECL 发光液显影。用 Image J 1. 8. 0 软件对条带进行分析以测定蛋白水平, LC3 蛋白水平以 LC3- II /LC3- I 表示, P62 蛋白水平以目的蛋白/内参表示。

1. 7 统计学方法

采用 SPSS 20. 0 软件进行统计分析。计量资料均符合正态分布且方差齐以均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 多组计量资料比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P<0. 05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2. 1 各组小鼠尿斑实验结果比较

表 2 示, 与空白组比较, 模型组小鼠尿斑总数、中心尿斑数均增多 ($P<0. 05$ 或 $P<0. 01$)。与模型组比较, 抗生素组和补中愈淋汤低、高剂量组小鼠尿斑总数及中心尿斑数均减少 ($P<0. 05$ 或 $P<0. 01$)。抗生素组与补中愈淋汤低、高剂量组尿斑总数、中心尿斑数组间比较差异无统计学意义 ($P>0. 05$)。各组小鼠总尿量组间比较差异均无统计学意义 ($P>0. 05$)。

表2 各组小鼠尿斑总数、中心尿斑数及总尿量比较
Table 2 Comparison of the total number of urine marks, the number of central urine marks and the total urine volume of

mice in each group ($\bar{x}\pm s$)				
组别	鼠数	尿斑总数/个	中心尿斑数/个	总尿量/ μ l
空白组	5	7. 80±1. 79	1. 80±0. 84	425. 20±66. 76
模型组	6	17. 80±2. 28 ^{a)}	5. 00±1. 58 ^{b)}	435. 60±88. 81
抗生素组	6	10. 00±1. 87 ^{c)}	2. 60±1. 14 ^{c)}	444. 00±68. 04
补中愈淋汤低剂量组	6	8. 20±1. 92 ^{c)}	2. 20±0. 84 ^{d)}	393. 60±64. 84
补中愈淋汤高剂量组	6	7. 60±1. 14 ^{c)}	1. 80±0. 84 ^{c)}	434. 00±77. 68

注: a) 与空白组比较, $P<0. 01$; b) 与空白组比较, $P<0. 05$; c) 与模型组比较, $P<0. 01$; d) 与模型组比较, $P<0. 05$ 。

2. 2 各组小鼠血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量比较

表 3 示, 与空白组比较, 模型组小鼠血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量升高 ($P<0. 01$)。与模型组比较, 抗生素组及补中愈淋汤低、高剂量组小鼠血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量降低 ($P<0. 05$ 或 $P<0. 01$)。抗生素组与补中愈淋汤低、高剂量组血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量组间比较差异无统计学意义 ($P>0. 05$)。

表3 各组小鼠血清 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 含量比较
Table 3 Comparison of serum levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in each group of mice

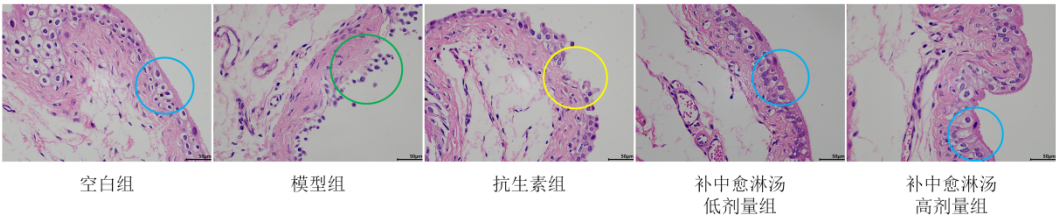
(pg/ml, $\bar{x}\pm s$)				
组别	鼠数	IL-1 β	IL-6	TNF- α
空白组	5	1. 72±0. 56	1. 32±0. 37	0. 98±0. 38
模型组	6	6. 05±1. 96 ^{a)}	4. 49±1. 29 ^{a)}	4. 44±1. 47 ^{a)}
抗生素组	6	2. 36±0. 53 ^{b)}	2. 18±0. 65 ^{c)}	2. 18±0. 52 ^{b)}
补中愈淋汤低剂量组	6	2. 79±0. 22 ^{b)}	2. 60±0. 93 ^{b)}	1. 80±0. 44 ^{b)}
补中愈淋汤高剂量组	6	2. 07±0. 26 ^{b)}	1. 89±0. 39 ^{b)}	1. 54±0. 56 ^{b)}

注: IL-1 β , 白细胞介素 1 β ; IL-6, 白细胞介素 6; TNF- α , 肿瘤坏死因子 α 。

a) 与空白组比较, $P<0. 01$; b) 与模型组比较, $P<0. 05$; c) 与模型组比较, $P<0. 01$ 。

2. 3 各组小鼠膀胱组织病理学变化比较

图 1 示, 空白组膀胱上皮细胞层完整, 无明显



注: 蓝色圆示膀胱上皮细胞层完整; 黄色圆示膀胱上皮细胞部分缺失; 绿色圆示膀胱上皮细胞大量缺失。

图1 各组小鼠膀胱组织病理图 (HE 染色, ×400)

Figure 1 Histopathological photos of the bladder of mice in each group (HE staining, ×400)

炎性细胞浸润。模型组可见大量膀胱上皮细胞脱落。抗生素组膀胱上皮细胞部分缺失。补中愈淋汤低、高剂量组膀胱上皮细胞层完整。

2.4 各组小鼠膀胱上皮细胞形态比较

图 2 示, 扫描电镜可见空白组小鼠膀胱上皮细胞呈规则多边形, 模型组及抗生素组膀胱上皮细胞形态异常, 补中愈淋汤低、高剂量组膀胱上皮形态规则。表 4 示, 与空白组比较, 模型组小鼠膀胱上皮细胞平均表面积减小 ($P<0.05$)。与模型组比较, 补中愈淋汤低、高剂量组小鼠膀胱上皮细胞平均表面积增大, 而抗生素组减小 ($P<0.05$)。与抗生素组比较, 补中愈淋汤低、高剂量组小鼠膀胱上皮细胞平均表面积增大 ($P<0.05$)。补中愈淋汤低、高剂量组膀胱上皮细胞平均表面积组间比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

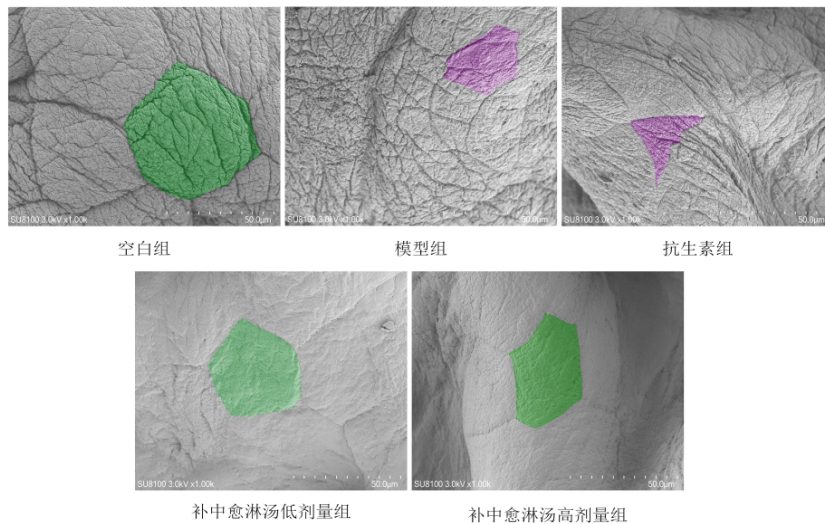
2.5 各组小鼠膀胱组织 UroPlakin 3A 蛋白及 UPEC 载菌量比较

表 4 示, 与空白组比较, 模型组膀胱组织 UroPlakin 3A 蛋白降低, UPEC 载菌量升高 ($P<0.05$)。

与模型组比较, 抗生素及补中愈淋汤低、高剂量组膀胱组织 UroPlakin 3A 蛋白升高, UPEC 载菌量降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与抗生素组比较, 补中愈淋汤低、高剂量组膀胱组织 UroPlakin 3A 蛋白增加, UPEC 载菌量降低 ($P<0.05$); 而补中愈淋汤低、高剂量组组间比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。各组小鼠膀胱组织 UroPlakin 3A 蛋白免疫荧光图见图 3, 膀胱组织 UPEC 载菌量免疫荧光图见图 4。

2.6 各组小鼠尿菌量及膀胱上皮细胞内细菌量比较

表 5 示, 与空白组比较, 模型组小鼠尿菌量及膀胱上皮细胞内细菌量增多 ($P<0.01$)。与模型组比较, 抗生素组及补中愈淋汤低、高剂量组小鼠尿菌量及膀胱上皮细胞内细菌量减少 ($P<0.05$)。抗生素组及补中愈淋汤低、高剂量组尿菌量组间比较差异无统计学意义 ($P>0.05$), 补中愈淋汤低、高剂量组膀胱上皮细胞内细菌量较抗生素组减少 ($P<0.05$)。



注: 图中绿色为正常形态的膀胱上皮细胞, 紫色为异常形态的膀胱上皮细胞。

图 2 各组小鼠膀胱上皮细胞扫描电镜结果 (醋酸铀染色, $\times 1600$)

Figure 2 Scanning electron microscopy results of bladder epithelial cells in each group of mice (uranyl acetate staining, $\times 1600$)

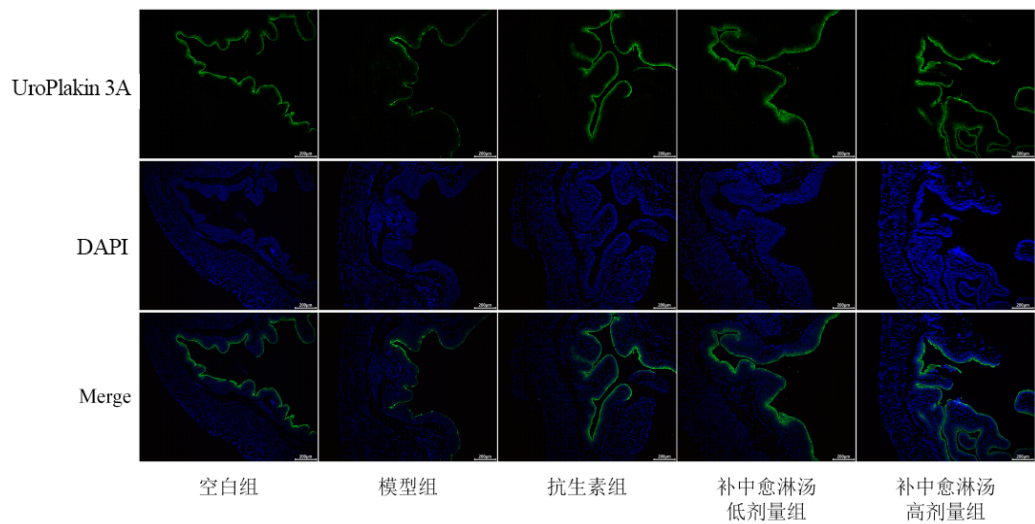
表 4 各组小鼠膀胱上皮细胞平均表面积及膀胱组织 UroPlakin 3A 蛋白、UPEC 载菌量比较

Table 4 Bladder epithelial cell surface area and UroPlakin 3A protein level, UPEC bacterial load in each group of mice ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	膀胱上皮细胞平均表面积/ μm^2	UroPlakin3A 蛋白/DAPI	UPEC 载菌量/DAPI
空白组	5	2186.006 $\pm$ 746.246	0.314 $\pm$ 0.085	0
模型组	6	1164.374 $\pm$ 319.146 ^{a)}	0.136 $\pm$ 0.036 ^{a)}	1.00 $\pm$ 0.29 ^{a)}
抗生素组	6	783.852 $\pm$ 750.545 ^{b)}	0.292 $\pm$ 0.064 ^{c)}	0.45 $\pm$ 0.22 ^{b)}
补中愈淋汤低剂量组	6	1565.478 $\pm$ 267.374 ^{b) d)}	0.317 $\pm$ 0.118 ^{b) d)}	0.25 $\pm$ 0.08 ^{b) d)}
补中愈淋汤高剂量组	6	1829.911 $\pm$ 376.115 ^{b) d)}	0.374 $\pm$ 0.076 ^{c) d)}	0.06 $\pm$ 0.03 ^{b) d)}

注: UroPlakin 3A, 抗尿路斑块蛋白 3A; UPEC, 尿路致病性大肠杆菌。

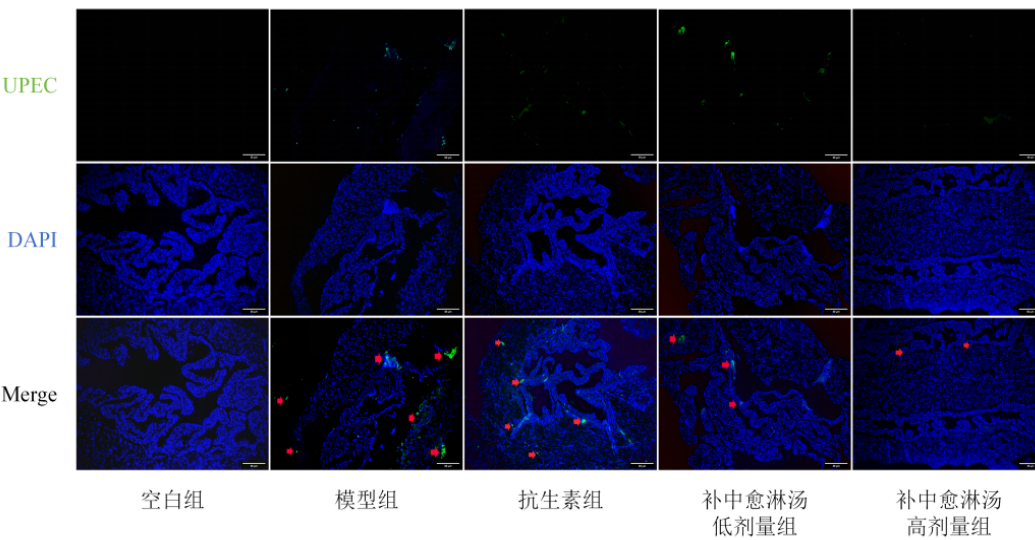
a) 与空白组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与模型组比较, $P<0.01$; d) 与抗生素组比较, $P<0.05$ 。



注：UroPlakin 3A，抗尿路斑块蛋白 3A；图中绿色荧光表示 UroPlakin 3A 蛋白水平。

图 3 各组小鼠膀胱组织 UroPlakin 3A 蛋白免疫荧光图 (×100)

Figure 3 Immunofluorescence of UroPlakin 3A protein in bladder tissues of mice in each group (×100)



注：UPEC，尿路致病性大肠杆菌；图中红色箭头指向的绿色荧光为 UPEC 水平。

图 4 各组小鼠膀胱组织 UPEC 载菌量免疫荧光图 (×100)

Figure 4 Comparison of immunofluorescence results of bladder tissues in each group of mice(×100)

表 5 各组小鼠尿菌量及膀胱上皮细胞内细菌量比较			
Table 5 Comparison of urinary bacterial load and bacterial load of bladder epithelial cells of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)			
组别	鼠数	尿菌量	膀胱上皮细胞内细菌量
空白组	5	0	0
模型组	6	3.54±0.39 ^{a)}	4.34±0.07 ^{a)}
抗生素组	6	0.49±1.11 ^{b)}	2.69±0.06 ^{b)}
补中愈淋汤低剂量组	6	1.66±1.56 ^{b)}	2.34±0.11 ^{b) c)}
补中愈淋汤高剂量组	6	0.49±1.11 ^{b)}	2.01±0.18 ^{b) c)}

注：a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与抗生素组比较， $P<0.05$ 。

2.7 各组小鼠膀胱组织 RAB11A、RAB27B mRNA 水平比较

表 6 示，与空白组比较，模型组膀胱组织 RAB11A、RAB27B mRNA 水平降低 ($P<0.01$)。与模型组比较，抗生素组和补中愈淋汤低、高剂量组膀胱组织 RAB11A、RAB27B mRNA 水平升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与抗生素组比较，补中愈淋汤低、高剂量组膀胱组织 RAB27B mRNA 水平升高 ($P<0.05$)。抗生素组与补中愈淋汤低、高剂量组膀胱组织 RAB11A mRNA 水平组间比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。补中愈淋汤低、高剂量组膀胱组织

RAB27B mRNA 水平组间比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表6 各组小鼠膀胱组织RAB11A、RAB27B mRNA水平比较
Table 6 Comparison of RAB11 and RAB27B mRNA levels in bladder tissues of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	RAB11A mRNA	RAB27B mRNA
空白组	5	1.06±0.09	1.04±0.08
模型组	6	0.55±0.09 ^{a)}	0.46±0.11 ^{a)}
抗生素组	6	1.06±0.16 ^{b)}	0.83±0.17 ^{b)}
补中愈淋汤低剂量组	6	1.28±0.15 ^{c)}	1.02±0.17 ^{c) d)}
补中愈淋汤高剂量组	6	0.94±0.09 ^{c)}	1.45±0.14 ^{c) d)}

注: RAB11A, Ras相关蛋白11A; RAB27B, Ras相关蛋白27B。

a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与模型组比较, $P<0.01$; d) 与抗生素组比较, $P<0.05$ 。

2.8 各组小鼠膀胱组织LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ、P62蛋白水平比较

表7示, 与空白组比较, 其余各组小鼠膀胱组织LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ升高, 模型组及抗生素组P62蛋白水平升高 ($P<0.05$)。与模型组比较, 抗生素组及补中愈淋汤低、高剂量组小鼠膀胱组织LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ差异无统计学意义 ($P>0.05$), 补中愈淋汤低、高剂量组P62蛋白水平降低 ($P<0.05$)。与抗生素组比较, 补中愈淋汤低、高剂量组P62蛋白水平降低 ($P<0.05$)。补中愈淋汤低、高剂量组膀胱组织LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ、P62蛋白水平组间比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表7 各组小鼠膀胱组织LC3、P62蛋白水平比较

Table 7 Levels of LC3 and P62 protein level in bladder tissues of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ	P62/GAPDH
空白组	5	0.489±0.048	0.395±0.073
模型组	6	0.677±0.092 ^{a)}	0.759±0.199 ^{a)}
抗生素组	6	0.700±0.082 ^{a)}	1.078±0.196 ^{a)}
补中愈淋汤低剂量组	6	0.682±0.120 ^{a)}	0.549±0.162 ^{b) c)}
补中愈淋汤高剂量组	6	0.667±0.096 ^{a)}	0.586±0.253 ^{b) c)}

注: LC3, 微管相关轻链蛋白3。

a) 与空白组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与抗生素组比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

本课题组认为, rUTI的病机与中气不足、邪气内伏有关, 如《灵枢·口问》曰: “中气不足, 溲便为之变”。《素问·刺法论篇》云: “脾者, 谏议之官, 知周出焉。”脾气是中气的重要组成部分, 中气不足则“谏议”失职, 湿浊邪气潜伏^[8]。素体中气亏虚之人患尿路感染, 正气祛邪无力, 常致邪气内伏; 过用苦寒之品亦会导致正气损伤, 祛邪不

利, 寒遏太过, 邪气不得透发, 潜伏于里, 伺机而动, 而成伏邪^[14]。因此, 防治rUTI应重视补益中气, 透邪外达。补中愈淋汤中炙黄芪、党参补气为君; 升麻与柴胡益气升提、透邪外达, 白术、陈皮、茯苓健脾化湿, 当归养血扶正, 均为臣药; 桂枝合茯苓、浮萍利膀胱水湿, 鸭跖草、车前子、六一散之滑石清利湿热, 紫菀助膀胱气化, 以上均为佐药; 六一散之甘草为使, 调和诸药^[9]。全方共奏益气透邪之功, 正合rUTI气虚邪伏的病机。临床研究^[10]表明, 补中愈淋汤联合抗生素可更好地改善rUTI患者尿频尿急、腰酸乏力、尿淋漓不尽等症状, 显著降低复发率。

尿斑总数及中心尿斑数反映小鼠排尿频次及异常排尿频次情况。本研究结果表明, 造模成功的小鼠尿斑总数、中心尿斑数均显著升高, 而抗生素组与补中愈淋汤低、高剂量组小鼠尿斑总数及中心尿斑数显著低于模型组, 且3个给药组无差异, 提示抗生素及各剂量补中愈淋汤均可显著改善模型小鼠尿频症状, 且效果相当。小鼠血清炎症因子的升高可预测慢性感染和随后对rUTI的易感性^[5]。同样, 在人类患者中高炎症因子与rUTI相关^[15]。本研究结果发现, 抗生素组与补中愈淋汤低、高剂量组小鼠血清IL-1 β 、IL-6及TNF- α 水平均显著降低, 且各组间炎症因子水平无显著差异, 提示低、高剂量的补中愈淋汤可能通过降低小鼠血清IL-1 β 、IL-6及TNF- α 水平降低感染复发率。膀胱上皮细胞及其表面的尿路斑块蛋白形成黏膜屏障, 研究表明细菌感染可导致小鼠尿路上皮干细胞表观遗传学改变, 引起膀胱上皮细胞形态异常、膀胱上皮细胞表面积减小, 从而导致机体对rUTI易感^[16]。本研究发现, 模型组小鼠膀胱上皮细胞形态异常, 细胞平均表面积减小, UroPlakin 3A蛋白表达降低; 补中愈淋汤低、高剂量组膀胱上皮细胞呈规则的多边形态, 细胞平均表面积增大, UroPlakin 3A蛋白表达升高, 且低、高剂量组间无明显差异, 提示低、高剂量的补中愈淋汤均可通过恢复膀胱上皮细胞形态及面积, 增加UroPlakin 3A蛋白表达从而发挥抗rUTI作用。

现代研究^[17]显示, UPEC可侵入膀胱上皮细胞, 在细胞内生长、繁殖, 膀胱上皮细胞启动防御机制清除胞内菌以减轻感染: 启动RAB11A、RAB27B介导的运输途径, 将内化的UPEC排出细胞; 启动自噬相关途径以清除UPEC。针对膀胱上皮细胞内启动的自噬, UPEC可阻断自噬流导致P62蛋白蓄积, 并利用自噬相关囊泡在细胞内长期存活, 成为rUTI的潜在致病源^[18]。本研究发现, 与模型组相

比, 抗生素组与补中愈淋汤低、高剂量组尿菌量、膀胱上皮细胞内细菌量及膀胱组织载菌量均显著减少, RAB11A 及 RAB27B mRNA 表达水平显著升高; 且与抗生素组相比, 补中愈淋汤低、高剂量组膀胱上皮细胞内细菌量及膀胱组织载菌量进一步减少, RAB27B mRNA 水平升高。补中愈淋汤低、高剂量组间在尿菌量、膀胱上皮细胞内细菌量、膀胱组织载菌量、RAB11A 及 RAB27B mRNA 水平方面无显著差异。LC3 是典型的自噬标记物, 它存在两种形式即 LC3- I 和 LC3- II, LC3- II/LC3- I 可反映自噬活性; P62 蛋白在自噬中也发挥重要作用, 其可以与泛素化的蛋白质结合, 并通过与 LC3 相互作用, 将这些蛋白质靶向到自噬体中进行降解, P62 的蓄积提示自噬流阻断^[19]。模型组、抗生素组与补中愈淋汤低、高剂量组膀胱 LC3- II/LC3- I 均显著高于空白组, 各组组间 LC3- II/LC3- I 无明显差异, 提示 UPEC 感染促进自噬发生, 抗生素与低、高剂量的补中愈淋汤对 LC3 水平无影响。模型组与抗生素组膀胱组织 P62 蛋白水平显著高于空白组, 补中愈淋汤低、高剂量组膀胱组织 P62 蛋白水平显著低于模型组及抗生素组, 且补中愈淋汤低、高剂量组膀胱组织 P62 蛋白水平无显著差异, 提示低、高剂量的补中愈淋汤均可能通过降低 P62 蛋白表达, 增强自噬流, 从而减少 UPEC 在膀胱上皮细胞内驻留, 发挥抗 rUTI 的作用。

综上所述, 补中愈淋汤可通过恢复膀胱黏膜屏障, 促进膀胱上皮细胞内细菌清除而发挥抗 rUTI 的作用, 其促进胞内菌清除可能与促进 RAB11A 及 RAB27B mRNA 水平、增强自噬流相关。rUTI 的发病机制复杂, 补中愈淋汤是否通过影响尿路上皮干细胞表观遗传学改变恢复膀胱上皮细胞形态, 是否通过促进自噬体与溶酶体结合或增强溶酶体酸化从而发挥增强自噬流的作用仍不明确。后续课题组拟进行小鼠膀胱转录组测序及蛋白质组学检测, 并构建细胞感染模型, 进一步明确补中愈淋汤对自噬过程的影响, 为临床治疗提供更充分的实验证据。

参考文献

- [1] ASLAM S, ALBO M, BRUBAKER L. Recurrent urinary tract infections in adult women[J]. JAMA, 2020, 323(7): 658-659.
- [2] TAN-KIM J, SHAH NM, DO D, et al. Efficacy of vaginal estrogen for recurrent urinary tract infection prevention in hypoestrogenic women[J]. Am J Obstet Gynecol, 2023, 229(2): 143.
- [3] FISHER H, OLUBOYEDE Y, CHADWICK T, et al. Continuous low-dose antibiotic prophylaxis for adults with repeated urinary tract infections (AnTIC): a randomised, open-label trial[J]. Lancet Infect Dis, 2018, 18(9): 957-968.
- [4] BOWYER GS, LOUDON KW, SUCHANEK O, et al. Tissue immunity in the bladder[J]. Annu Rev Immunol, 2022, 40: 499-523. doi: 10.1146/annurev-immunol-101220-032117.
- [5] O'BRIEN VP, HANNAN TJ, YU L, et al. A mucosal imprint left by prior Escherichia coli bladder infection sensitizes to recurrent disease[J]. Nat Microbiol, 2016, 2: 16196. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.196.
- [6] ALGHORAIBI H, ASIDAN A, ALJAWAIED R, et al. Recurrent urinary tract infection in adult patients, risk factors, and efficacy of low dose prophylactic antibiotics therapy[J]. J Epidemiol Glob Health, 2023, 13(2): 200-211.
- [7] WANG C, BAUCKMAN KA, ROSS ASB, et al. A non-canonical autophagy-dependent role of the ATG16L1T300A variant in urothelial vesicular trafficking and uropathogenic Escherichia coli persistence[J]. Autophagy, 2019, 15(3): 527-542.
- [8] 高梦琦, 张传龙, 庞博, 等. 基于“中气不足, 溲便为之变”探讨再发性尿路感染辨治思路[J]. 北京中医药大学学报, 2023, 46(8): 1161-1165.
- [9] 金庆江. 金庆江效方治验: 补中愈淋汤[J]. 江苏中医药, 2022, 54(4): 7-8.
- [10] 尹浩, 薛毅, 朱娇丽, 等. 补中愈淋汤联合头孢唑肟防治复发性尿路感染 45 例[J]. 光明中医, 2024, 39(7): 1380-1382.
- [11] YU L, O'BRIEN VP, LIVNY J, et al. Mucosal infection rewires TNFα signaling dynamics to skew susceptibility to recurrence[J]. Elife, 2019, 8:e46677. doi: 10.7554/eLife.46677.
- [12] MURRAY BO, FLORES C, WILLIAMS C, et al. Recurrent urinary tract infection: a mystery in search of better model systems[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 691210. doi: 10.3389/fcimb.2021.691210.
- [13] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 1063-1064.
- [14] 任继学. 伏邪探微[J]. 长春中医学院学报, 2005, 21(1): 4-7.
- [15] HANNAN TJ, ROBERTS PL, RIEHL TE, et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 prevents chronic and recurrent cystitis[J]. EBioMedicine, 2014, 1(1): 46-57.
- [16] RUSSELL SK, HARRISON JK, OLSON BS, et al. Uropathogenic Escherichia coli infection-induced epithelial trained immunity impacts urinary tract disease outcome[J]. Nat Microbiol, 2023, 8(5): 875-888.
- [17] GALLO LI, DALGHI MG, CLAYTON DR, et al. RAB27B requirement for stretch-induced exocytosis in

bladder umbrella cells[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2018, 314(3):C349–C365.

[18] MIAO Y, LI G, ZHANG X, et al. A TRP channel senses lysosome neutralization by pathogens to trigger their expul-

sion[J]. Cell, 2015, 161(6):1306–1319.

[19] 魏砚明, 任晋宏, 栾智华, 等. 多种细胞自噬调节剂对自噬标记物 LC3 II 及 p62 表达的影响[J]. 中国药科大学学报, 2018, 49(3):341–347.

Effects of *Buzhong Yulin Decoction* (补中愈淋汤) for Mice with Recurrent Urinary Tract Infection on Bladder Mucosal Barrier and Bacterial Load of Bladder Epithelial Cells

YIN Hao¹, XUE Yi¹, ZHANG Biao¹, JIN Zhuohui¹, ZHU Jiaoli¹, JIANG Yi¹, WANG Xiaofang¹, FENG Chen¹, JIN Yunyun², JIN Qingjiang¹, JIN Qinglei¹, WANG Xin¹

1. Suzhou Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Suzhou, 215101; 2. Yuexi Health Hospital of Wuzhong District, Suzhou

ABSTRACT **Objective** To investigate the possible mechanism of *Buzhong Yulin Decoction* (补中愈淋汤) in the prevention and treatment of recurrent urinary tract infection. **Methods** The mouse models of recurrent urinary tract infection were established by uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strain UTI89 by bladder perfusion, and the successful mouse models were randomly divided into a model group, an antibiotic group, and a low- and high-dose *Buzhong Yulin Decoction* group, with six mice in each group. In addition, 5 C57BL/6 mice without modelling were taken as blank group. The low- and high-dose *Buzhong Yulin Decoction* groups received 0.1 ml/10 g of decoction by gavage, with concentrations of 1.3 g/ml and 5.2 g/ml, respectively; the antibiotic group received 0.1 ml/10 g of levofloxacin hydrochloride solution with 5 mg/ml by gavage; the blank and model groups received 0.1 ml/10 g of distilled water by gavage. Each group was gavaged once a day for 7 consecutive days. The total number of urine marks, the number of central urine marks, and the total urine volume of the urine marks were observed by the urine marking test; HE staining was used to observe the histopathological changes in the bladder of mice; serum levels of the inflammatory factors interleukin 1 β (IL-1 β), interleukin 6 (IL-6) and tumour necrosis factor α (TNF- α) were detected by ELISA; the morphology of the epithelial cells of bladder was observed by scanning electron microscopy; immunofluorescence assay to detect bladder tissue anti-UroPlakin 3A protein level and UPEC bacterial load; the spread plate method to detect urinary bacterial load and bacterial load of bladder epithelial cells; RT-PCR method to detect Ras-related protein Rab-11A (RAB11A) and Ras-related protein Rab-27B (RAB27B) mRNA level in bladder tissue; immunoblotting to detect microtubule-associated protein 1 light chain3 (LC3) and P62 protein levels in bladder tissue. **Results** Compared with the blank group, the bladder epithelial cell layers were lost and showed abnormal morphology in mice of the model group; bladder tissue UroPlakin 3A protein and RAB11A and RAB27B mRNA levels reduced, the total number of urine marks, the number of central urine marks, bladder tissue UPEC bacterial load, urinary bacterial load, bacterial load in bladder epithelial cells, serum IL-1 β , IL-6, and TNF- α levels, and LC3 and P62 protein levels in bladder tissue all elevated ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the model group, the bladder epithelial cell layers were intact and the morphology of epithelial cells were regular in the low- and high-dose *Buzhong Yulin Decoction* groups; the average surface area of bladder epithelial cells reduced, the levels of UroPlakin 3A protein and RAB11A and RAB27B mRNA in bladder tissues elevated, and total number of urine marks, the number of central urine marks, bladder tissue UPEC bacterial load, urinary bacterial load, bacterial load in bladder epithelial cells, serum IL-1 β , IL-6, and TNF- α levels, and P62 protein levels in bladder tissue all reduced ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), but LC3 protein levels showed no statistically significant ($P > 0.05$). In the antibiotic group, the bladder epithelial cells were partially missing and the morphology of epithelial cells was abnormal. Compared with the antibiotic group, the average surface area of the bladder epithelial cells in the mice increased in the low- and high-dose *Buzhong Yulin Decoction* groups, the bacterial load of the bladder epithelial cells decreased, and the P62 protein level of the bladder tissue decreased ($P < 0.05$). When comparing between the low- and high-dose *Buzhong Yulin Decoction* groups, the differences in each index were not statistically significant ($P > 0.05$). **Conclusion** *Buzhong Yulin Decoction* may prevent and treat recurrent urinary tract infection by repairing the bladder mucosal barrier, increasing RAB11A and RAB27B level and enhancing autophagy in bladder tissues, thereby facilitating bacterial clearance from bladder epithelial cells and reducing the bacterial load of bladder epithelial cells.

Keywords recurrent urinary tract infection; uropathogenic *Escherichia coli*; *Buzhong Yulin Decoction* (补中愈淋汤); bladder; mucosal barrier; bacterial load; uroplakins

(收稿日期: 2024-05-08; 修回日期: 2024-08-20)

[编辑: 邓媛]