

尿感方抗尿道致病性大肠杆菌侵袭膀胱上皮细胞的作用研究

吴 雨, 蒋 健, 贺 敏*, 张磊阳, 陈文文

上海中医药大学附属曙光医院 临床药理科, 上海 201203

摘 要: 目的 观察尿感方抗尿道致病性大肠杆菌 (uropathogenic *Escherichia coli*, UPEC) 侵袭膀胱上皮细胞的作用, 并探讨其作用机制。方法 通过 UPEC 感染人膀胱癌细胞 5637 (human bladder cancer cell 5637, HTB-9) 侵袭模型, 观察尿感方含药尿液保护膀胱上皮细胞抗 UPEC 侵袭的作用; 同时采用分子生物学技术, 观察其对 Toll 样受体 4 (TLR4)/环磷酸腺苷 (cAMP) 信号传导通路的主要环节: TLR4、腺苷酸环化酶 3 (AC3)、环磷酸腺苷 (cAMP)、蛋白激酶 A (PKA) 和 Rac-1 的影响。结果 与大鼠空白尿液高剂量组 (体积分数 10% 空白尿液) 比较, 尿感方大鼠含药尿液高剂量组 (体积分数 10% 含药尿液) 的细菌入侵率降低; 与模型组比较, 大鼠空白尿液组的细菌入侵率无显著性差异。与大鼠空白尿液高剂量组比较, 尿感方大鼠含药尿液高剂量组增加了 TLR4、AC3 蛋白的表达及胞内 cAMP 的水平, 促进了 PKA 活化, 抑制了 Rac-1 的活性。结论 尿感方具有一定的抗 UPEC 侵袭膀胱上皮细胞的作用, 其作用机制与影响 TLR4/cAMP 信号传导通路的环节有关。

关键词: 尿感方; 尿道致病性大肠杆菌; 侵袭; 人膀胱上皮细胞; TLR4/cAMP 信号传导通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)09-2084-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.09.016

Niaogan Prescription protects bladder epithelial cells against uropathogenic *Escherichia coli* invasion

WU Yu, JIANG Jian, HE Min, ZHANG Lei-yang, CHEN Wen-wen

Department of Clinical Pharmacology, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai 201203, China

Abstract: Objective To observe the role of Niaogan Prescription against uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in invading bladder epithelial cells, and to discuss its mechanism of action. **Methods** After HTB-9 infected with UPEC, the cell invasion model was used to observe the protective effects of drug urine in human bladder cancer cell 5637 (HTB-9) against UPEC invasion. Effects of Niaogan Prescription on the main steps of signaling pathway: Toll-like receptor 4 (TLR4), adenylate cyclase 3 (AC3), cyclic adenosine monophosphate (cAMP), protein kinase A (PKA), and Rac-1 was investigated by molecular biology techniques. **Results** Compared with the blank urine high dose group (10% volume fraction of blank urine), treatment with the drug-containing urine high dose group of Niaogan Prescription (10% volume fraction of drug urine) resulted in a significant decrease in UPEC invasion, the bacterial invasion rate of the rat blank urine group had no significant difference compared with the model group. Compared with the blank urine high dose group, the drug-containing urine high dose group of Niaogan Prescription improved TLR4 and AC3 protein expression, increased intracellular cAMP content, promoted PKA activation, and inhibited Rac1 activity. **Conclusion** Niaogan Prescription have the certain capacity against UPEC invasion of bladder epithelial cells, which mechanism is related to TLR4/cAMP signaling pathway.

Key words: Niaogan Prescription; uropathogenic *Escherichia coli*; invasion; human bladder epithelial cells; TLR4/cAMP signal pathway

尿路感染 (urinary tract infection, UTI) 是指由细菌直接侵袭尿路引起的非特异性感染, 主要包括膀胱炎和肾盂肾炎, 是位居第 2 位的感染性疾病^[1-2], 反复发作和耐药菌株增多是 UTI 防治面临的重点和难点^[3]。

尿道致病性大肠杆菌 (uropathogenic *Escherichia*

coli, UPEC) 是导致 UTI 的主要致病菌, UPEC 成为胞内寄生菌导致 UTI 反复发作的主要因素之一^[3-4]。UPEC 携带的多种毒力因子能通过干预宿主细胞的信号转导机制侵入膀胱上皮细胞 (bladder epithelial cells, BECs), 继而在 BECs 内繁殖, 形成胞内生

收稿日期: 2017-09-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81403168)

作者简介: 吴 雨 (1988—), 女, 博士, 住院医师, 从事中医药防治感染性疾病的临床基础研究。Tel: (021)20256053 E-mail: littlerainer@163.com

*通信作者 贺 敏 (1977—), 博士, 副研究员, 从事中医药防治感染性疾病的临床基础研究。Tel: (021)20256053 E-mail: heminmiao@163.com

物膜样菌落,当宿主细胞脱落时,UPEC 被释放,侵袭邻近细胞,引起复发或再燃。膀胱利用尿流的机械冲洗作用可以冲走细菌,UPEC 要成为细胞内寄生菌就必须实现对 BECs 的侵袭。最近的研究发现 BECs 上 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) / 环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 信号传导通路介导的天然免疫应答具有抗 UPEC 侵袭的能力^[5-8]。通过调节天然免疫提高 BECs 抗 UPEC 侵袭的能力对于 UTI 的防治可能是个良好的辅助治疗策略。

目前,化学药对 UTI 的治疗仍以广谱抗生素为主,但在临床实践中发现抗生素虽能使病情有所缓解,但并未降低本病的复发率;且随着抗生素普遍和频繁使用,耐药菌株逐渐增多,其疗效已逐年下降,国内资料显示 UPEC 对氟喹诺酮类、庆大霉素和哌拉西林的耐药率近 50%或以上,对阿莫西林/克拉维酸和复方磺胺甲噁唑的耐药率分别为 31%和 71%^[9-10]。

尿感方是治疗 UTI 的有效方剂(授权专利号 ZL200910201845.6),由马齿苋、蒲公英组成,具有清热利湿通淋之功。前期研究已证实尿感方治疗 UTI 具有良好的临床疗效,具有抗炎、利尿、免疫调节等多种药理作用^[11-17]。与化学药物相比,尿感方所服用的临床常用量的血药浓度难以达到最小抑菌浓度;大多数中药口服后,所吸收的原型成分及代谢产物绝大部分都存在于尿液中,且浓度大多远高于其在血清中的浓度;另外,对于研究治疗 UTI 的中药,研究含药尿液也更为直接。因此,课题组在前期研究^[17]的基础上,参考国外同类研究^[18],结合尿液自身的特点,将含药尿液引入研究。本研究通过 UPEC 感染人膀胱癌细胞 5637 (human bladder cancer cell 5637, HTB-9) 细胞侵袭模型,研究尿感方大鼠含药尿液保护 BECs 抗 UPEC 侵袭的作用及其机制,为尿感方治疗 UTI 提供依据。

1 材料

1.1 动物与细胞株

SD 大鼠,SPF 级,雌雄各半,体质量(300±10)g,购于上海斯莱克实验动物中心,生产许可证号 SCXK(沪)2012-0002,于上海中医药大学实验动物中心清洁级动物房饲养,自由饮水。HTB-9 细胞来源于中国科学院细胞库,目录号 TCHu 1。

1.2 实验药物

尿感方由马齿苋、蒲公英组成;马齿苋(配方颗粒),每袋 1.5 g,相当于饮片 15 g,江阴天江药

业有限公司生产,批号 1412060;蒲公英(配方颗粒),每袋 2 g,相当于饮片 15 g,江阴天江药业有限公司生产,批号 1505128。

1.3 菌种

UPEC CI5(上海中医药大学附属曙光医院细菌室馈赠),实验前接种于 LB 培养基,37℃培养箱中培养 24 h 后,取出用 PBS 配制成细菌悬液备用,实验前通过 600 nm 波长处的吸光度(*A*)值估算细菌浓度,并将要加入的细菌进行倍比稀释,涂板计数。

1.4 主要试剂

羊血琼脂平板,上海伊华科技有限公司;RPMI 1640 培养基、PBS、0.25%胰酶, Thermo Scientific 公司;胎牛血(FBS), Gibco 公司;庆大霉素、磺胺甲噁唑、甲氧苄啶,大连美仑生物公司;甲基-D-吡喃甘露糖苷、TritonX-100, Sigma Aldrich 公司;CCK-8 试剂盒、乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒, Dojindo Molecular Technologies 公司;蛋白酶磷酸酶抑制剂, Thermo Scientific 公司;三羟甲基氨基甲烷(Tris)、甘油、十二烷基硫酸钠、过硫酸铵(APS)、*N,N,N,N*-四甲基乙二胺、30%丙烯酰胺, Bio-rad 公司;BCA protein Assay kit, RIPA 裂解液(强), SDS-PAGE protein loading buffer、封闭液、一抗稀释液、二抗稀释液,碧云天生物技术研究所;Prestained Protein Marker, Fermentas 公司;PVDF 膜, Millipore 公司;甲醇(分析纯),上海国药集团;环磷酸腺苷(cAMP) ELISA 试剂盒, Enzo Lifesciences 公司;蛋白激酶 A(PKA) 活性试剂盒, Arbor assays 公司;TLR4 兔抗 IgG、GAPDH, Proteintech 公司;腺苷酸环化酶 3(AC3) 兔抗 IgG, Abcam 公司;Ras 相关的 C3 肉毒素底物 1(Rac1) 活性分析试剂盒, Cell Biolabs 公司。

1.5 主要仪器与设备

比浊仪, BioMerieux 公司;离心机, Beckman Coulter 公司;低温离心机, Eppendorf 公司;普通倒置显微镜, Olympus 公司;超净工作台、CO₂ 培养箱, Thermo Scientific 公司;Western blotting 电泳系统、转膜仪, Bio-Rad 公司;Odyssey 双色红外激光成像系统, Li-COR 公司;迷你水平摇床、旋涡混合器, 海门其林贝尔仪器制造有限公司。

2 方法

2.1 含药尿液的制备^[17]

将尿感方饮片剂量(马齿苋 70 g、蒲公英 55 g)换算为配方颗粒剂量后,用天平称取马齿苋、蒲公英配方颗粒,加入蒸馏水配制生药质量浓度为 1.69

g/mL 的药液, 然后震荡混匀, 备用。20 只 SD 大鼠随机分为空白组和尿感方组 (生药 25.0 g/kg, 2 倍临床等效量), 每组 10 只。各组 ig 给药, 每天 2 次, 连续 3 d, 第 4 天清晨再给药 1 次; 空白组给予同容积蒸馏水, 15 mL/kg。末次给药前禁食不禁水 12 h, 收集末次给药后 3 h 内的尿液, 尿液经 4 000 r/min 离心 15 min, 56 °C 水浴中灭活 30 min, 经过 0.22 μm 滤膜滤过除菌后, -80 °C 冻存储备用。两组尿样行尿常规检查, 结果异常或有白细胞或亚硝酸盐者剔除。经尿常规检查, 两组大鼠尿样均符合要求, 分别将空白组和尿感方组各 10 只大鼠的尿样分别合并, 备用。

2.2 细胞培养及传代

HTB-9 细胞给予含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基, 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养。当培养瓶内细胞铺至 70%~80% 时进行传代。弃去陈旧培养基, 加入适量 0.25% 胰酶消化, 放入培养箱中 10 min, 显微镜下动态观察, 细胞变圆时加入含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基中止消化; 然后用吸管轻轻吹打, 使细胞脱离瓶底, 1 200 r/min 离心 5 min 后弃上清, 加入含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基, 吹打均匀, 将细胞按 1:2 传代于新培养瓶中, 置于 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养。

2.3 药物毒性试验

采用 CCK-8 法确定含药尿液及空白尿液的安全范围, 具体操作按 CCK-8 细胞活性计数试剂盒说明书操作。

2.4 分组及给药

HTB-9 细胞分为尿感方含药尿液高、低剂量组, 大鼠空白尿液高、低剂量组, 模型组和质控组。将尿感方含药尿液用 RPMI 1640 培养基稀释至终体积分数为 5% (低剂量组) 和 10% (高剂量组), 然后分别加入细胞共同培养; 空白尿液组将空白尿液用 RPMI 1640 培养基稀释至终体积分数为 5% (低剂量组) 和 10% (高剂量组), 然后分别加入细胞 (HTB-9 细胞接种于 96 孔板, 每孔 4×10^4 个细胞; TLR4、AC3 蛋白表达和 Rac-1 活性检测时 HTB-9 细胞接种于 6 孔板, 每孔 1×10^5 个细胞) 共同培养; 模型组、质控组加入等体积不含尿液的 RPMI 1640 培养基; 各组培养 12 h。

2.5 模型制备

各组培养结束后, 用培养基洗涤 3 次后, 加入细菌/细胞比例 (MOI) 为 100 的 UPEC CI5 共同培养造模 1 h, 质控组加入等体积的无菌培养基。

2.6 细菌入侵率测定^[7]

造模结束后, 采用庆大霉素保护法清除胞外细菌, 即用含 100 μg/mL 庆大霉素的 PBS 清洗细胞 3 次后, 放置于含 100 μg/mL 庆大霉素的 PBS 中 37 °C 孵育 30 min, 再用 PBS 清洗 3 次。然后按参考文献方法^[7]测定各组的细菌入侵率。

质控组是为保证实验体系而设, 其作用是质量控制。此组除不造模外, 所有操作与其他各组相同, 实验结果若模型组涂板计数有菌长出, 此组涂板计数无菌长出, 则该批数据可用; 若此组涂板计数也有菌长出, 提示操作步骤中有污染, 则该批数据不可用。

2.7 cAMP 含量测定

按“2.6”项所述操作后, 用 PBS 洗涤 3 次, 弃去洗液并吸干残液, 加入 0.1 mol/L HCl 250 μL, 放置 10 min, 离心, 收集上清。然后按 cAMP ELISA 试剂盒说明书进行操作。

2.8 PKA 活性测定

按“2.6”项所述操作后, 用 PBS 洗涤 3 次, 弃去洗液并吸干残液, 加入 Cell Lysis Buffer 裂解细胞, 收集裂解液。然后按 PKA 活性试剂盒说明书进行操作。

2.9 TLR4 和 AC3 蛋白表达的检测

按“2.6”项所述操作后, 用 PBS 洗涤 3 次, 弃去洗液并吸干残液, 培养皿中加入含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的细胞裂解液, 收集细胞裂解液, 以 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定总蛋白的含量。采用 Western blotting 法进行检测。将 25 μg 总蛋白质上样进行电泳分离并转移至 PVDF 膜, 封闭液室温封闭 1 h, 封闭结束后, 加入一抗工作液, 4 °C 孵育过夜, 孵育结束后以 TBST 洗涤 5 min × 3 次, 再加入与一抗相匹配的二抗工作液, 室温下孵育 1 h, 孵育结束后 TBST 洗涤 5 min。ECL 发光, 化学发光仪检测信号, 用 Odyssey2.1 软件分析灰度值, GAPDH 作为内参, 计算目标蛋白与 GAPDH 的灰度比值进行统计分析。各实验均重复 3 次。

2.10 Rac-1 活性检测

造模结束后, 用 PBS 洗涤 3 次, 弃去洗液并吸干残液, 培养皿中加入含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的细胞裂解液, 收集细胞裂解液, 以 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定总蛋白的含量。然后按照 Rac1 活性分析试剂盒说明书操作。各实验均重复 3 次。

2.11 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析, 数据用

$\bar{x} \pm s$ 表示, 方差齐性检验后, 多组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 药物毒性试验

HTB-9 细胞经体积分数为 10% 的大鼠空白尿液或体积分数为 10% 的大鼠含药尿液预处理 24 h 后, 细胞存活率均大于 90%。提示体积分数在 10% 以下的含药尿液对 HTB-9 细胞无明显毒性, 可用于实验。

3.2 尿感方对 HTB-9 细胞抗 UPEC 侵袭的影响

与模型组比较, 5%、10% 大鼠空白尿液组的细菌入侵率无显著性差异; 提示空白尿液无抗 UPEC 侵袭的作用。与大鼠空白尿液高剂量组 (10% 空白尿液) 比较, 尿感方含药尿液高剂量组 (10% 含药尿液) 的细菌入侵率显著降低 ($P < 0.05$); 提示尿感方含药尿液具有一定的抗 UPEC 侵袭作用。见图 1。

3.3 尿感方对 UPEC 侵袭 HTB-9 细胞模型 cAMP 和 PKA 的影响

与大鼠空白尿液组 (10% 空白尿液) 比较, 尿感方含药尿液组 (10% 含药尿液) cAMP ($P < 0.01$)

和 PKA ($P < 0.05$) 的含量增加。见图 2。

3.4 尿感方对 UPEC 侵袭 HTB-9 细胞模型 TLR4、AC3 蛋白表达的影响

与大鼠空白尿液组 (10% 空白尿液) 比较, 尿感方含药尿液组 (10% 含药尿液) TLR4、AC3 蛋白的表达均显著增加 ($P < 0.01$)。见图 3。

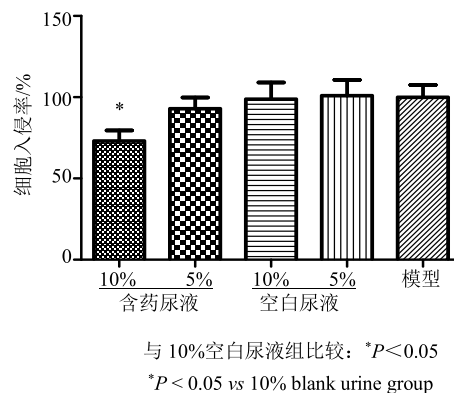


图 1 尿感方含药尿液对 UPEC 侵袭 HTB-9 细胞的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Fig. 1 Effects of Niaogan Prescription drug-containing urine on UPEC invasion into HTB-9 cells ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

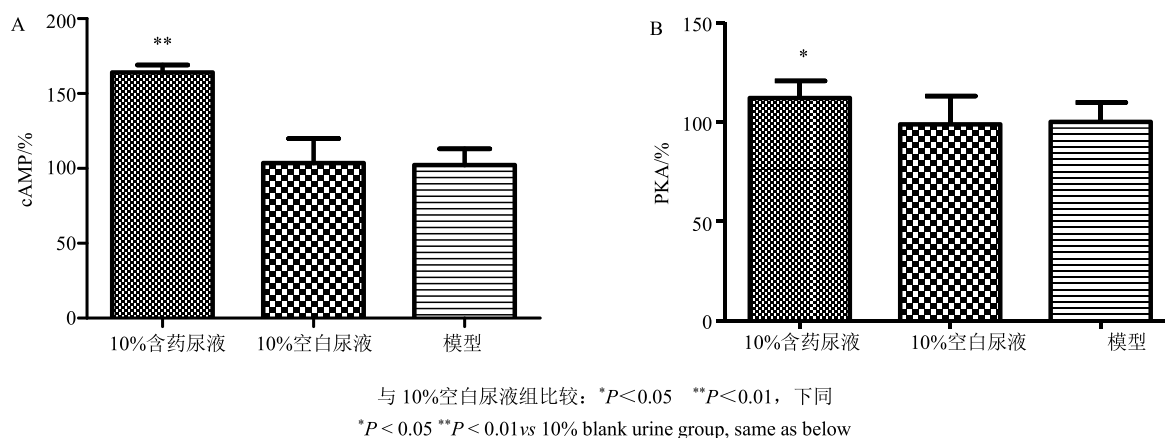


图 2 尿感方含药尿液对 UPEC 侵袭 HTB-9 细胞模型 cAMP (A) 和 PKA (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 2 Effects of Niaogan Prescription drug-containing urine on cAMP (A) and PKA (B) of HTB-9 cells with UPEC invasion ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3.5 尿感方对 UPEC 侵袭 HTB-9 细胞模型 Rac-1 活性的影响

与大鼠空白尿液组 (10% 空白尿液) 比较, 尿感方含药尿液组 (10% 含药尿液) Rac-1 的活性降低 ($P < 0.05$)。见图 4。

4 讨论

约 95% UTI 的起始感染部位是膀胱^[1], 膀胱利用尿流的机械冲洗作用可以冲走细菌, UPEC 侵入

BECs 是 UPEC 致病的重要条件^[3-4]。UPEC 主要通过 I 型菌毛顶端的 FimH 黏附素与 BECs 上受体结合, 引起脂筏组分的聚集从而启动了脂筏介导的 UPEC 对 BECs 的侵袭^[19-21]。脂筏是脂质双层内含有特殊脂质及蛋白质的微区, 在细胞内外信号的刺激下, 脂筏可动态性和选择性地募集宿主蛋白, 诱导宿主细胞局部重排, 介导细菌内化到细胞内^[20], 其中 Rac-1 是脂筏的主要组分, 它是肌动蛋白重组

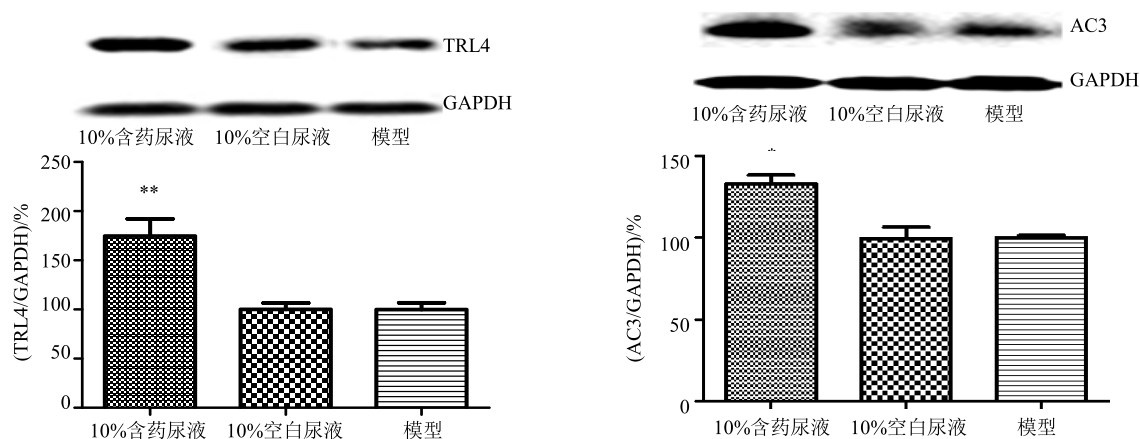


图 3 尿感方含药尿液对 UPEC 侵袭 HTB-9 细胞模型 TLR4 和 AC3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effects of Niaogan Prescription drug-containing urine on expression of TLR4 and AC3 protein of HTB-9 cells with UPEC invasion ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

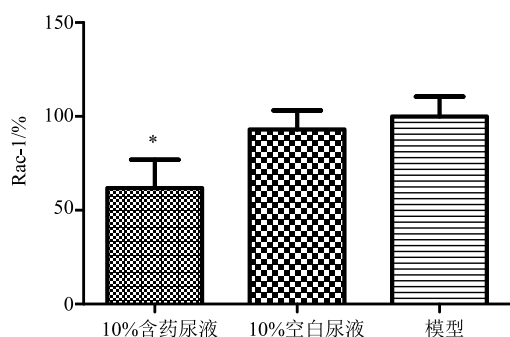


图 4 尿感方含药尿液对 UPEC 侵袭 HTB-9 细胞模型 Rac-1 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effects of Niaogan Prescription drug-containing urine on activity of Rac-1 of HTB-9 cells with UPEC invasion ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

和细菌侵入的必要元件。Rac-1 是 Rho 家族小 G 蛋白的重要成员, Rho 家族小 G 蛋白是调节细胞形态与运动迁移的关键蛋白质, 通过控制微丝的收缩和微管的分布来调节细胞的运动迁移, 并影响细胞形态^[19-20]。Rac-1 活化的水平与 UPEC 侵袭的程度呈正相关, UPEC 侵袭 BECs 时, 通过激活 Rac-1 增加肌动蛋白纤维在 UPEC 侵袭处的积累, 进而促进细胞板状伪足形成, 从而驱动细胞的运动, 使细菌进入胞内^[20]。

BECs 是机体抵抗 UPEC 的首要防线, BECs 的天然免疫应答是目前防治 UTI 研究的热点, 近期的研究发现 BECs 上 TLR4/cAMP 信号传导通路是 BECs 抗 UPEC 侵袭的关键通路之一。该信号通路通过活化 AC3, 进而催化 ATP 转变为 cAMP, 从而

激活 PKA, 活化后的 PKA 能抑制 Rac-1 活性^[7,22]。研究表明在 TLR4 基因敲除的 BECs 中, 活化的 Rac-1 水平和 UPEC 的入侵率明显高于正常的 BECs^[7]。

本研究结果表明, 与模型组比较, 经大鼠空白尿液预处理 12 h 后 HTB-9 细胞的细菌入侵率无显著性差异, 提示大鼠空白尿液无抗 UPEC 侵袭的作用; 与空白尿液组 (10%空白尿液) 比较, 经 10%大鼠含药尿液预处理 HTB-9 细胞 12 h 后的细菌入侵率降低, 提示含药尿液中的药物具有一定的抗 UPEC 侵袭作用。本研究结果还显示尿感方含药尿液能增加 HTB-9 细胞 TLR4、AC3 蛋白的表达, 增加胞内 cAMP 的含量, 促进 PKA 活化, 抑制 Rac-1 的活性, 提示尿感方保护 BECs 抗 UPEC 侵袭的作用机制与影响 TLR4/cAMP 信号传导通路的环节有关。该研究结果为尿感方的临床应用提供了依据。

参考文献

- [1] 陈 山. 泌尿系感染诊断治疗指南 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011.
- [2] 吴阶平. 吴阶平泌尿外科学 [M]. 济南: 山东科学技术出版社, 2004.
- [3] McLellan L K, Hunstad D A. Urinary tract infection: Pathogenesis and outlook [J]. *Trends Mol Med*, 2016, 22(11): 946-957.
- [4] Hannan T J, Totsika M, Mansfield K J, et al. Host-pathogen checkpoints and population bottlenecks in persistent and intracellular uropathogenic *Escherichia coli* bladder infection [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2012, 36(3): 616-648.

- [5] Bien J, Sokolova O, Bozko P. Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage [J]. *Int J Nephrol*, 2012, 2012: 681473.
- [6] Totsika M, Moriel D G, Idris A, *et al.* Uropathogenic *Escherichia coli* mediated urinary tract infection [J]. *Curr Drug Targets*, 2012, 13(11): 1386-1399.
- [7] Song J, Bishop B L, Li G, *et al.* TLR4 initiated and cAMP mediated abrogation of bacterial invasion of the bladder [J]. *Cell Host Microbe*, 2007, 1(4): 287-298.
- [8] Svanborg C, Bergsten G, Fischer H, *et al.* Uropathogenic *Escherichia coli* as a model of host-parasite interaction [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2006, 9(1): 33-39.
- [9] 阮亘杰, 郑 波, 刘玉村. 2012 年中国男性尿路感染细菌分布及耐药状况 [J]. 中国临床药理学杂志, 2015, 31(11): 1007-1014.
- [10] 李湘燕, 郑 波, 刘玉村. 2012 年中国女性尿路感染细菌分布及耐药状况 [J]. 中国临床药理学杂志, 2015, 31(11): 1014-1021.
- [11] 周贤慧, 孙怡婕, 高建东, 等. 尿感方治疗慢性尿路感染 (下焦湿热证) 的临床疗效观察 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(3): 688-689.
- [12] 高建东, 赵晓燕, 孙怡婕, 等. 尿感方抗尿道致病性大肠杆菌的实验研究 [J]. 上海中医药大学学报, 2011, 25(5): 83-85.
- [13] 孙怡婕, 贺 敏, 金若敏, 等. 尿感方治疗尿路感染的主要药效学研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 24(17): 144-146.
- [14] 孙怡婕, 贺 敏, 张 珏, 等. 尿感方体外抗菌活性的初步研究 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(3): 625-626.
- [15] 洪 婷, 缪 萍, 林 云, 等. 尿感颗粒治疗慢性尿路感染的药效学研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(9): 2319-2323.
- [16] 洪 婷, 缪 萍, 崔 晨, 等. 尿感方对小鼠抗炎与免疫调节作用及对大鼠黏膜免疫的影响 [J]. 上海中医药杂志, 2013, 47(1): 66-69.
- [17] 洪 婷, 缪 萍, 林 云, 等. 尿感方对大肠杆菌生物膜形成及与毒力基因 *fim*、*usp*、*hly A* 表达的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(11): 2319-2323.
- [18] Howell A B, Botto H, Combescure C, *et al.* Dosage effect on uropathogenic *Escherichia coli* anti-adhesion activity in urine following consumption of cranberry powder standardized for proanthocyanidin content: A multicentric randomized double blind study [J]. *BMC Infect Dis*, 2010, 10(94): 1-11.
- [19] Dhakal B K, Kulesus R R, Mulvey M A. Mechanisms and consequences of bladder cell invasion by uropathogenic *Escherichia coli* [J]. *Eur J Clin Invest*, 2008, 38(3): 2-11.
- [20] Duncan M J, Li G, Shin J S, *et al.* Bacterial penetration of bladder epithelium through lipid rafts [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(18): 18944-18951.
- [21] Eto D S, Jones T A, Sundsbak J L. Integrin-mediated host cell invasion by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli* [J]. *PLoS Pathog*, 2007, 3(7): e100.
- [22] Song J M, Abraham S N. TLR mediated immune responses in the urinary tract [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2008, 11(1): 66-73.