

尿感方清除受感染膀胱上皮细胞胞内尿道致病性大肠杆菌的作用

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(马齿苋、蒲公英)清除受感染膀胱上皮细胞胞内尿道致病性大肠杆菌(uropathogenic *Escheriehia coli*, UPEC)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) 细胞模型,观察尿感方含药尿液清除受感染膀胱上皮细胞胞内 UPEC 的作用;同时采用分子生物学技术,观察其对 TLR4/cAMP 信号传导通路的主要环节 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)、腺苷酸环化酶 3 (adenylate cyclase 3, AC3)、环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP)、蛋白激酶 A (protien kinase A, PKA)、肌球蛋白Ⅶa 和 Rab 蛋白相互作用蛋白 (Myosin ⅦA and Rab interacting protein, MyRIP)、Rab27b 和小窝蛋白 1 (Caveolin-1) 的影响。**结果** 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的细菌胞吐率增加。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 TLR4、AC3 蛋白的表达及胞内 cAMP 的水平,促进 PKA 活化,增加 TLR4、AC3、MyRIP、Rab27b 和 Caveolin-1 蛋白的表达。**结论** 尿感方具有一定的清除受感染膀胱上皮细胞胞内 UPEC 的作用,其作用机制与 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;胞吐;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:** 1001-1528(2017)12-2469-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.12.005

Effect of Niaogan Decoction on expulsion of uropathogenic *Escheriehia coli* from human bladder epithelial cells

WU Yu, JIANG Jian, HE Min*, ZHANG Lei-yang, CHEN Weng-weng
(Department of Clinical Pharmacology, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai 201203, China)

ABSTRACT: **AIM** To observe the effects of Niaogan Decoction (*Portulacae Herba*, *Taraxaci Herba*) on expulsion of uropathogenic *Escheriehia coli* (UPEC) from human bladder epithelial cells and to explore its mechanism. **METHODS** After HTB-9 was infected with UPEC, drug urine exocytosed the UPEC invaded into urinary bladder epithelial cell were observed. With molecular biology technology, the mechanism of key factors to TLR4/cAMP signal pathway such as Toll-like receptor 4 (TLR4), adenylate cyclase 3 (AC3), cyclic adenosine monophosphate (cAMP), protien kinase A (PKA), Myosin ⅦA and Rab interacting protein (MyRIP), Rab27b and Caveolin-1 were analyzed. **RESULTS** Treatment with Niaogan Decoction resulted in a significant increase in UPEC exocytosis compared with the blank control high dose group. Niaogan Decoction group improved TLR4, AC3, MyRIP, Rab27b and Caveolin-1 protein expression, increased intracellular cAMP content and promoted PKA activation. **CONCLUSION** Niaogan Decoction has the capacity to exocytose UPEC, its mechanism may relate to TLR 4/cAMP signal pathway.

KEY WORDS: Niaogan Decoction; UPEC; expulse; human urinary bladder epithelial cell; TLR4/cAMP signal pathway

收稿日期: 2017-07-28

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: hem-inmiao@163.com

反复发作和耐药菌株增多是尿路感染 (urinary tract infection, UTI) 防治面临的重点和难点, 有研究显示约 50% 的妇女一生中会发生 UTI, 其中 25% 会复发^[1], 造成女性患者的躯体痛苦和精神痛苦, 甚至严重影响工作和生活^[2-3]。

尿道致病性大肠杆菌 (uropathogenic *Escherichia coli*, UPEC) 侵袭膀胱上皮细胞 (bladder epithelial cells, BECs) 成为细胞内寄生菌是导致 UTI 反复发作的主要因素之一^[4]。UPEC 是一种兼性胞内菌, UPEC 借助自身携带的多种毒力因子干预宿主细胞的信号转导机制帮助细菌内化到细胞内, 从而逃避了尿流的机械冲洗作用和宿主细胞释放的炎症因子以及免疫效应细胞的攻击, 且免疫原性及对抗菌药物的敏感性也大为降低, 进入宿主细胞内 UPEC 在胞内大量繁殖, 形成细胞内菌落群, 成为尿路感染再燃或复发的潜在细菌贮存库, 当所入侵的宿主细胞脱落时, 大量 UPEC 释放, 侵袭邻近细胞, 开始新一轮的感染过程, 从而引起复发或再燃^[5-7]。有研究表明^[8] 33% 复发感染 UTI 的致病菌与初次感染的致病菌血清型一致。

尿感方是治疗 UTI 的有效方剂 (授权专利号: ZL200910201845.6)。课题组前期研究已证实尿感方具有抗炎、利尿、免疫调节等多种药理作用, 治疗 UTI 具有良好的临床疗效^[9-15]。和其他具有抗菌作用的中药一样, 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。药物血清虽可针对口服吸收入血的成分, 结合了中药在体内的处置过程, 但大部分成分在血中的含有量很低。有些中药口服后, 所吸收原型成分以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, 此外, 对于研究治疗 UTI 的中药, 研究药物尿液也更来得直接。因此, 基于上述原因, 在前期研究的基础上, 参考国外同类研究^[16], 课题组将药物尿液引入研究。

大分子物质在细胞内被一层膜所包围, 形成囊泡, 囊泡移动到细胞膜处, 与细胞膜融合, 并且向细胞外张开, 使内含物质排出细胞之外, 这种现象叫做胞吐^[17]。最新的研究进展表明 UPEC 侵入 BECs 后, 受感染的 BECs 能够通过胞吐清除胞内的 UPEC, 而 Toll 样受体 4 (TLR4) /环磷酸腺苷 (cAMP) 信号传导通路则是介导此细胞行为的关键通路^[18-19]。本研究在前期研究的基础上, 通过 UPEC 感染人膀胱癌细胞 5637 (HTB-9) 细胞模型, 观察尿感方清除受感染膀胱上皮细胞胞内 UP-

EC 的作用及其对 TLR4/cAMP 信号传导通路的主要环节: TLR4、腺苷酸环化酶 3 (AC3)、cAMP、蛋白激酶 A (PKA)、肌球蛋白 V II a 和 Rab 蛋白相互作用蛋白 (MyRIP)、Rab27b 和小窝蛋白 1 (Caveolin-1) 的影响, 为该方治疗 UTI 提供依据。

1 材料

1.1 动物和细胞株 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 (上海曙光医院细菌室馈赠)。试验前接种于 LB 培养基, 37 °C 培养箱中培养 24 h 后, 取出用 PBS 配制成细菌悬液备用, 实验前通过核酸蛋白测定仪 (OD₆₀₀) 估算细菌浓度, 并将要加入的细菌做倍比稀释涂板计数。

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); 胎牛血清 (Gibco 公司); 庆大霉素、磺胺甲恶唑、甲氧苄啶 (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、LDH 试剂盒 (Dojindo Molecular Technologies 公司); 蛋白酶磷酸酶抑制剂 (Thermo Scientific 公司); Tris、Glycerine、十二烷基硫酸钠、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); Prestained Protein Maker (Fermantas 公司); PVDF 膜 (Millipore 公司); 甲醇 (分析纯, 上海国药集团化学试剂有限公司); cAMP ELISA 试剂盒 (Enzolifesciences 公司); PKA (protein kinase A) Activity Kit (Arbor assays 公司); TLR4 anti-Rabbit IgG、GAPDH (Proteintech 公司); AC3 anti-Rabbit IgG、Rab7b anti-Rabbit IgG、Caveolin-1 anti-Rabbit IgG、MyRIP anti-Rabbit IgG (Abcam) 公司。

1.5 主要仪器和设备 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 blot 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 药物尿液制备^[15-16] 将尿感方饮片剂量 (马齿苋 72 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, 加入蒸馏水配制成 1.69 g 生药/mL 的药液, 然后震荡混匀, 备用。灌胃给药 2 次/d, 连续 3 d, 次日晨再灌胃给药 1 次。

20 只 SD 大鼠随机分为空白组和尿感方组 (25.4 g 生药/kg), 每组 10 只。各组灌胃给药 2 次/d, 连续 3 d, 次日晨再灌 1 次; 空白组给予同容积的蒸馏水, 1.5 mL/100 g。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 ℃ 水浴中 30 min 灭活, 经过 0.22 μm 滤过膜过滤除菌后, -80 ℃ 冻存储备用。尿样行尿常规检查, 结果异常或有白细胞或亚硝酸盐者则剔除。

2.2 细胞培养及传代 HTB-9 细胞予含 10% FBS 的 1640 培养基, 37 ℃ 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 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 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 ℃、5% CO₂ 孵箱中培养。

2.3 药物毒性试验 采用 cck-8 法确定药物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 细胞分为大鼠含药尿液高、低剂量组, 大鼠空白尿液高、低剂量组, 模型组和质控组。将含药尿液用 1640 培养基稀释至终浓度为 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 1640 培养基稀释至终浓度为 5% (低剂量组) 和 10% (高剂量组), 然后分别加入细胞共同培养; 模型组、质控组加入等体积不含尿液的 1640

培养基; 各组培养 12 h。

2.5 模型制备 各组培养结束后, 用培养基洗脱 3 次后, 加入细菌/细胞比例 (MOI) 为 100 的 UP-EC C15 共同培养造模 1 h, 质控组加入等体积的无菌培养基。

2.6 胞吐率测定 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 ℃ 孵育 30 min, 再用 PBS 清洗 3 次^[19]。然后按参考文献方法^[19] 测定各组的胞吐率。

2.7 cAMP 含有量测定 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 250 μL 的 0.1 mol/L HCl, 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 (Protein Kinase A) Activity Kit 说明书进行操作。

2.9 TLR4、AC3、MyRIP、Rab27b 和 Caveolin-1 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有量。采用 Western blot 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, 加入一抗体工作液, 4 ℃ 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 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件包进行统计学分析, 数据用均数 ± 标准差表示, 方差齐性检验后, 多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 药物毒性试验 HTB-9 细胞经 10% 大鼠空白尿液、10% 大鼠含药尿液经预处理 24 h 后, 细胞存活率均大于 90%。提示各组药物浓度对 HTB-9 细胞无明显毒性, 可用于实验。

3.2 尿感方清除受感染 HTB-9 细胞胞内 UPEC 的作用 如图 1 所示,与大鼠 10% 空白尿液组比较,尿感方 10% 含药尿液组的胞吐率明显增加 ($P < 0.01$);与尿感方 5% 含药尿液组比较,尿感方 10% 含药尿液组的胞吐率增加 ($P < 0.05$);与模型组比较,大鼠空白尿液组 (5% 空白尿液、10% 空白尿液) 的胞吐率无显著性差异 ($P > 0.05$);与大鼠 5% 空白尿液组比较,大鼠 10% 空白尿液组的胞吐率无显著性差异 ($P > 0.05$)。

3.3 尿感方对 HTB-9 细胞胞吐 UPEC 模型 cAMP 和 PKA 的影响 如图 2 所示,与大鼠 10% 空白尿液组比较,尿感方 10% 含药尿液组 cAMP 和 PKA 的水平均显著增加 ($P < 0.01$);与模型组比较,10% 空白尿液组 cAMP 和 PKA 的水平均无显著性差异 ($P > 0.05$)。

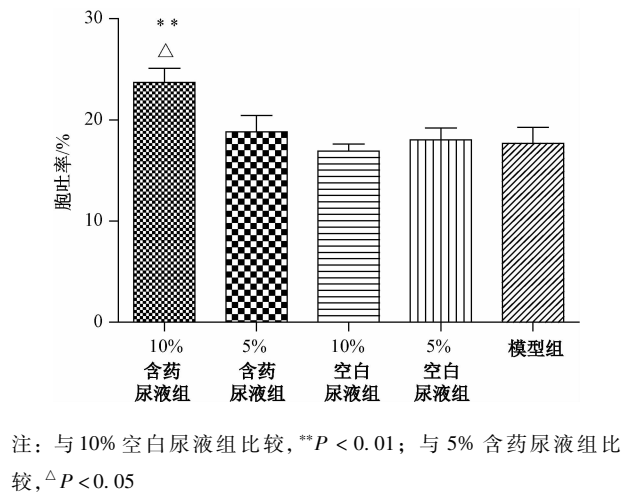


图 1 尿感方清除受感染 HTB-9 细胞胞内 UPEC 的作用 ($n = 12$)

Fig. 1 Niaogan Decoction pretreatment increases UPEC expulsion in infected HTB-9 *in vitro* ($n = 12$)

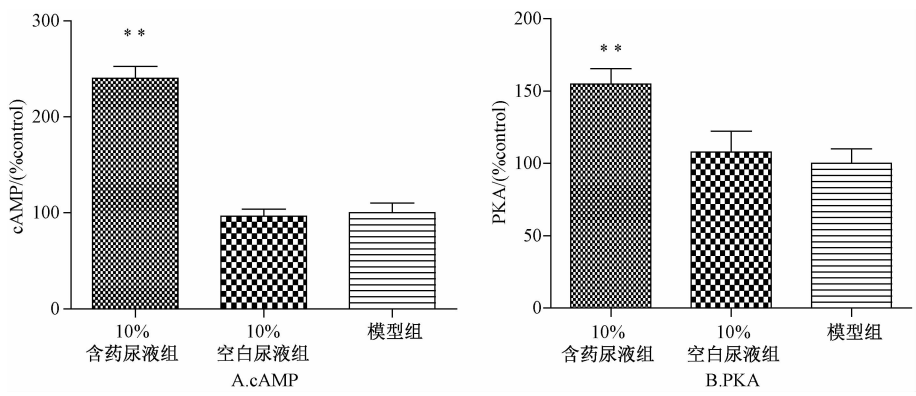


图 2 尿感方对 HTB-9 细胞胞吐 UPEC 模型 cAMP 和 PKA 活性的影响 ($n = 10$)

Fig. 2 Niaogan Decoction enhances intracellular cAMP levels, promoting PKA activity of infected HTB-9 ($n = 10$)

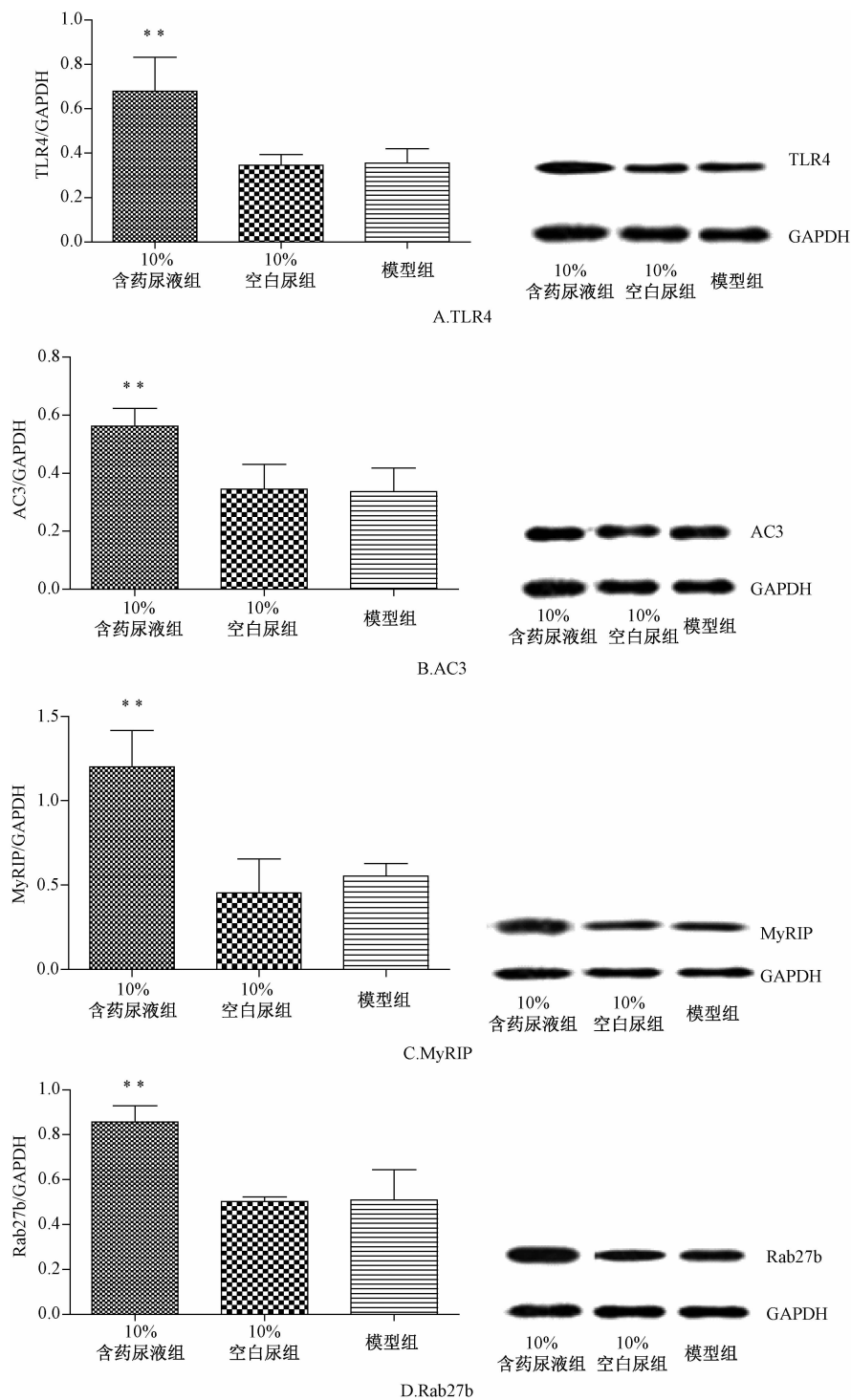
3.4 尿感方对 HTB-9 细胞胞吐 UPEC 模型 TLR4、AC3、MyRIP、Rab27b 和 Caveolin-1 蛋白表达的影响 如图 3 所示,与 10% 空白尿液组比较,尿感方 10% 含药尿液组 TLR4、AC3、MyRIP、Rab27b 和 Caveolin-1 蛋白的表达均显著增加 ($P < 0.01$);与模型组比较,10% 空白尿液组 TLR4、AC3、MyRIP、Rab27b 和 Caveolin-1 蛋白的表达均无显著性差异 ($P > 0.05$)。

4 讨论

在实验分组设计中,考虑尿液本身的情况,故设置与药物尿液同浓度的空白尿液组作对照。

细菌与宿主机体相互作用并引起不同程度的病理过程称为细菌感染。宿主的免疫防御功能是决定感染的发生、发展与结局的主要因素^[20]。黏膜上

皮细胞是机体抵抗细菌的首要防线,其除了自身的机械屏障作用,还是天然免疫应答的主动参与者。革兰氏阴性细菌的天然免疫应答过程主要由 TLR4 所介导。UPEC 是革兰氏阴性细菌,BECs 所表达的 TLRs 中,TLR4 所介导天然免疫应答在抗 UPEC 感染中尤为关键^[18],研究表明^[21] TLR4 基因突变小鼠抗尿路感染的能力存在明显缺陷。研究表明 UPEC 侵入 BECs 后,受感染的 BECs 能通过胞吐清除胞内的 UPEC,而这种清除行为正是由 TLR4/cAMP 信号传导通路所介导的;BECs 上 TLR4 表达减少时,BECs 对胞内 UPEC 的清除能力明显下降;AC3 活性降低时,BECs 对胞内 UPEC 的清除能力也明显下降;胞内 cAMP 的水平影响着 BECs 胞吐 UPEC 的能力,增加胞内 cAMP 的水平,能够增强



注：与 10% 空白尿液组比较，** $P < 0.01$

图 3 尿感方对 HTB-9 细胞胞吐 UPEC 模型 TLR4、AC3、MyRIP、Rab27b 和 Caveolin-1 蛋白表达的影响 (n = 3)
Fig. 3 Effect of Niaogan Decoction on the TLR4, AC3, MyRIP, Rab27b and caveolin-1 expressions of infected HTB-9 (n = 3)

BECs 对胞内 UPEC 清除，反之亦然；PKA 则通过影响下游靶蛋白的磷酸化，影响细胞对 UPEC 的胞吐；包裹 UPEC 囊泡膜中的组分：MyRIP、Rab27b 和 Caveolin-1 也参与了对胞吐 UPEC 的调节，支架蛋白 MyRIP 能够整合 PKA，Rab27b 介导调节囊泡

运输到质膜，Caveolin-1 是一个整合膜蛋白，与 MyRIP 和 Rab27b 相互作用^[18-19]。

前期研究已证实尿感方是治疗 UTI 的有效方剂，具有多种药理作用。本研究结果表明尿感方大鼠含药尿液（10%）预处理 HTB-9 细胞 12 h

后,受感染 BECs 胞吐 UPEC 的胞吐率增加,提示尿感方具有一定的清除受感染 BECs 胞内 UPEC 的作用。尿感方能增加受感染 HTB-9 细胞 TLR4、AC3 蛋白的表达;增加胞内 cAMP 的含有量,促进 PKA 活化;增加 MyRIP、Rab27b 和 Caveolin-1 蛋白的表达,提示尿感方清除受感染 BECs 胞内 UPEC 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运用提供了依据。

参考文献:

[1] Hooton T M. Recurrent urinary tract infection in women[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2001, 17(4): 259-268.

[2] Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs [J]. *Am J Med*, 2002, 113(Suppl 1A): 5-13.

[3] Ciani O, Grassi D, Tarricone R. An economic perspective on urinary tract infection: the “costs of resignation” [J]. *Clin Drug Investig*, 2013, 33(4): 255-261.

[4] 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.

[5] 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.

[6] 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.

[7] 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.

[8] Ikäheimo R, Siitonen A, Heiskanen T, *et al*. Recurrence of urinary tract infection in a primary care setting: analysis of a 1-year follow-up of 179 women[J]. *Clin Infect Dis*, 1996, 22(1): 91-99.

[9] 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.

[10] 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.

[11] 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, 17(24): 144-146.

[12] 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.

[13] 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): 1724-1726.

[14] 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.

[15] 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.

[16] 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.

[17] 翟中和,王喜中.细胞生物学[M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2007.

[18] Song J, Abraham S N. TLR-mediated immune responses in the urinary tract [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2008, 11 (1): 66-73.

[19] Song J, Bishop B L, Li G, *et al*. TLR4-mediated expulsion of bacteria from infected bladder epithelial cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(35): 14966-14971.

[20] 石佑恩. 病原生物学[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2011.

[21] Bishop B L, Duncan M J, Song J, *et al*. Cyclic AMP-regulated exocytosis of *Escherichia coli* from infected bladder epithelial cells[J]. *Nat Med*, 2007, 13(5): 625-630.