

- lipopolysaccharide-induced inflammatory response and migration via the Notch-1 signaling pathway in activated microglia [J]. *Neuromolecular Med*, 2022, 24(2): 139-154.
- [15] Dong C M, Wang X L, Sun L X, et al. ATM modulates subventricular zone neural stem cell maintenance and senescence through Notch signaling pathway [J]. *Stem Cell Res*, 2022, 58: 102618.
- [16] Weiss M, Anderlueh M, Gobec M. Inhibition of O-GlcNAc transferase alters the differentiation and maturation process of human monocyte derived dendritic cells [J]. *Cells*, 2021, 10(12): 3312.
- [17] Zhang S Z, Wang Q Q, Yang Q Q, et al. Ng2 glia regulate brain innate immunity via TGF- β 2/TGFBR2 axis [J]. *BMC Med*, 2019, 17(1): 204.
- [18] Dahl T M, Reed M, Gerstner C D, et al. Effect of conditional deletion of cytoplasmic dynein heavy chain DYNC1H1 on postnatal photoreceptors [J]. *PLoS One*, 2021, 16(3): e0248354.
- [19] Yang M L, Shin J, Kearns C A, et al. CNS myelination requires cytoplasmic dynein function [J]. *Dev Dyn*, 2015, 244(2): 134-145.
- [20] Herbert A L, Fu M M, Drerup C M, et al. Dynein/dynactin is necessary for anterograde transport of *Mbp* mRNA in oligodendrocytes and for myelination *in vivo* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(43): E9153-E9162.

基于毒力因子 *FimH* 探讨尿感方抗尿道致病性大肠杆菌的作用机制

朱盼盼, 蒋健, 陈君灏, 乔昀, 元唯安, 梁群梅, 贺敏*
(上海中医药大学附属曙光医院, 上海 201203)

摘要: **目的** 观察尿感方对尿道致病性大肠杆菌 (UPEC) 毒力因子 *FimH* 的作用和 UPEC 侵袭力的影响, 并探讨其作用机制。**方法** UPEC 分别经含空白尿液、尿感方含药尿液的培养基和空白培养基预处理后, 观察 UPEC 毒力因子 *FimH* 表达的情况, 并通过 UPEC 感染细胞模型, 评价其侵袭力, 同时采用 Western blot、ELISA、RT-qPCR 法检测整合素 $\alpha 3$ (integrin $\alpha 3$)、integrin $\beta 1$ 、p-FAK、p-Src、p-PI3K、p- α PAK 蛋白表达, Rcl、Cdc42 活性和三磷酸肌醇 (IP3) 水平, integrin $\alpha 3$ 、integrin $\beta 1$ 和细胞骨架蛋白 [纽蛋白 (vinculin)、踝蛋白 (talin)、桩蛋白 (paxillin)、F-肌动蛋白 (*F-actin*)、 α -辅助肌动蛋白 (α -actinin)] mRNA 表达。**结果** 大鼠空白尿液和健康人空白尿液对 UPEC *FimH* mRNA 表达和 UPEC 入侵率无明显影响 ($P>0.05$), 对 integrin $\alpha 3$ 、integrin $\beta 1$ mRNA 和蛋白表达, p-FAK、p-Src、p-PI3K、p- α PAK 蛋白表达, Rcl、Cdc42 活性, IP3 水平, 细胞骨架蛋白 mRNA 表达均无明显影响 ($P>0.05$)。大鼠含药尿液和健康人含药尿液降低了 *FimH* mRNA 表达, UPEC 入侵率, integrin $\alpha 3$ 、integrin $\beta 1$ mRNA 和蛋白表达, p-FAK、p-Src、p-PI3K、p- α PAK 蛋白表达, Rcl、Cdc42 活性, IP3 水平, 细胞骨架蛋白 mRNA 表达 ($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 尿感方能影响 UPEC *FimH* 表达, 减弱 UPEC 侵袭力, 其作用机制与 *FimH*/integrin $\alpha 3$ 、 $\beta 1$ /FAK 信号传导通路有关。

关键词: 尿感方; 尿道致病性大肠杆菌; *FimH*; 整合素 $\alpha 3$ (integrin $\alpha 3$); 整合素 $\beta 1$ (integrin $\beta 1$); 粘附斑激酶 (FAK); 细胞骨架蛋白

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2023)01-0217-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.01.040

反复发作是防治尿路感染面临的难点^[1], 其最常见的致病菌是尿道致病性大肠杆菌 (UPEC)。UPEC 侵入宿主细胞后, 在胞内繁殖所形成的细胞内菌落群是尿路感染再燃或复发的主要病灶源^[2-3]。尿路感染是细菌与宿主相互作用的病理过程, UPEC 通过影响宿主细胞自身的信号传导来实现对其的侵入^[2-3]。UPEC 的毒力因子 *FimH* 是其进入

膀胱上皮细胞 (BECs) 的关键, 缺少 *FimH* 的 UPEC 不能侵入 BECs^[2-5]。UPEC 通过 *FimH* 与宿主细胞的整合素 (integrin) $\alpha 3$ 、 $\beta 1$ 结合, 激活粘附斑激酶 (FAK) 引发宿主细胞信号级联反应, 导致局部细胞骨架重排, UPEC 由此进入宿主细胞内^[5-9]

尿感方 (授权专利号 ZL200910201845.6) 具有抗菌、

收稿日期: 2022-01-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81874362)

作者简介: 朱盼盼 (1996—), 女, 硕士生, 从事中医药防治感染性疾病的临床基础研究。Tel: (021) 20256053, E-mail: zpp1650083130@163.com

* 通信作者: 贺敏 (1977—), 女, 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

抗炎、利尿、免疫调节等多种药理作用^[10-18]，是治疗尿路感染的有效方剂之一^[19]。UPEC生存于尿液环境中，研究尿液中药物的作用，对于尿路感染的研究更为直接，课题组前期研究发现尿感方含药尿液能抑制UPEC *Fim* 表达^[18]，但受到药物影响的UPEC *FimH* 表达、侵袭力变化，以及其所引发的宿主细胞信号级联反应会发生什么样的改变还不清楚。因此，本研究从致病菌的角度出发，观察UPEC 经尿感方含药尿液干预后，其毒力因子 *FimH* 表达的情况，并通过UPEC 感染细胞模型，评价其侵袭力所受到的影响，同时从 *FimH/integrin*α3、β1/FAK 信号传导通路探讨尿感方抗UPEC 的部分作用机制。

1 材料

1.1 动物 SD大鼠，SPF级，雌雄各半，体质量(250±10)g，实验动物生产许可证号SCXK(沪)2017-0005，购自上海斯莱克实验动物有限责任公司，饲养于上海中医药大学实验动物中心。本研究经上海中医药大学实验动物伦理委员会审查通过(审批号PZSHUTCM200807003)。

1.2 药物 马齿苋配方颗粒，每袋1.5g，相当于饮片15g，批号20020481；蒲公英配方颗粒，每袋2g，相当于饮片15g，批号20041181，均由江阴天江药业有限公司生产。

1.3 菌株和细胞株 UPEC J96(ATCC700336)购自上海北诺生物科技有限公司，实验前接种于卢里亚-贝尔塔尼(Luria-Bertani, LB)液体培养基，37℃培养24h后，配制成细菌悬液备用。HTB-9细胞来源于中国科学院细胞库，目录号TCHu1。

1.4 试剂 LB琼脂平板，购自上海科玛嘉微生物技术有限公司；Active Rac1 Pull-Down and Detection试剂盒、Active Cdc42 Pull-Down and Detection试剂盒、RPMI-1640培养基，购自美国Thermo Scientific公司；胎牛血清(FBS)、0.25%胰酶，购自美国Gibco公司；UNI-Q-10柱式Trizol总RNA抽提试剂盒、柱式细菌总RNA提取纯化试剂盒、LB无菌液体培养基、溶菌酶、无水乙醇、DEPC水、氯仿、异丙醇、PBS、庆大霉素，购自生工生物工程(上海)股份有限公司；Triton X-100，购自美国Sigma-Aldrich公司；integrin α3抗体、integrin β1抗体、磷酸化粘附斑激酶(p-FAK)抗体、磷酸化αP21活化蛋白激酶(p-αPAK)抗体，购自美国Santa Cruz公司；重组anti-Src(phospho Y418)抗体，购自英国Abcam公司；磷酸化磷脂酰肌醇-3激酶(p-PI3K)抗体，购自美国CST公司；β-actin抗体、BCA蛋白定量检测试剂盒、ECL显色试剂盒、SDS-PAGE凝胶制备试剂盒、RIPA裂解液、磷酸化蛋白酶抑制剂，购自武汉赛维尔生物科技有限公司；PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser试剂盒、TB Green Premix Ex Taq™ II试剂盒，购自日本TaKaRa公司；三磷酸肌醇(IP3)ELISA试剂盒，购自美国Bio Vision公司；*integrin*α3、*integrin*β1、纽蛋白(*vinculin*)、踝蛋白(*talin*)、桩蛋白(*paxillin*)、F-肌动蛋白(*F-actin*)、α-辅助肌动蛋白(α-actinin)及*GAPDH*引物由上海冠泰生物科技有限公司设计

合成；16S *rRNA*、*Fim H*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。

表1 引物序列

基因	引物序列
<i>GAPDH</i>	正向 5'-GGGAAGGTGAAGCTCGGACT-3'
	反向 5'-GGGTCATTGATGGCAACA-3'
<i>integrin</i> α3	正向 5'-CTACCCTATTCTCCGAACCA-3'
	反向 5'-CTCCGAGTCAATGTCCACAG-3'
<i>integrin</i> β1	正向 5'-GCATCCCTGAAAGTCCCAAG-3'
	反向 5'-GCAGACGCACTCTCCATTGTTAC-3'
<i>vinculin</i>	正向 5'-GCGAATCCCAACCATAAGCA-3'
	反向 5'-CATGTGTAACCAGCATCTCTGTG-3'
<i>talin</i>	正向 5'-ACAGAACACATACGGCAGGAG-3'
	反向 5'-GTAGAGCTTTGGCAGGTGG-3'
<i>paxillin</i>	正向 5'-TCTTCTGCCTTCTCAGGAAAG-3'
	反向 5'-GATATGCCAGAGGAAATCAA-3'
<i>F-actin</i>	正向 5'-CCCTTCCATCGTCCACC-3'
	反向 5'-CCATTGAGAAGATTCGTCGTC-3'
α-actinin	正向 5'-CCGCAAATGCTTCTAAAACAC-3'
	反向 5'-CAGAGCTTTGGCTAGGAATGA-3'
16S <i>rRNA</i>	正向 5'-CAAGGGCACAACTCCAAAT-3'
	反向 5'-GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAG-3'
<i>Fim H</i>	正向 5'-CACTGCTCACAGCGCTCAA-3'
	反向 5'-GATGGGCTGCTCGGTAAATG-3'

1.5 仪器 SpectraMax i3x多功能酶标仪，购自美国Molecular Devices公司；细菌比浊仪，购自法国bioMerieux公司；低温离心机，购自德国Eppendorf公司；普通倒置显微镜，购自日本Olympus公司；超净工作台、CO₂培养箱，购自美国Thermo Scientific公司；Cycler PCR仪、Western blot电泳系统、转膜仪，购自美国Bio-Rad公司；QuantStudio 3定量PCR仪，购自美国ABI公司；Odyssey双色红外激光成像系统，购自美国Li-COR公司。

2 方法

2.1 含药尿液制备 将尿感方饮片剂量(马齿苋70g、蒲公英55g)换算为配方颗粒剂量，按课题组前期报道的方法^[17]制备健康大鼠和健康人的空白尿液及含药尿液，4000 r/min离心15 min，56℃水浴灭活30 min，0.22 μm微孔滤膜过滤后，-80℃冷冻保存。

2.2 细胞培养 HTB-9细胞予以含10% FBS的1640培养基，在37℃、5% CO₂孵箱中培养。

2.3 分组及制备 菌株分为大鼠空白尿液组、大鼠含药尿液组、健康人空白尿液组、健康人含药尿液组和对照组。各尿液组UPEC J96(1×10⁷CFU/mL)接种于含60%尿液的培养基中(此剂量含药尿液不影响UPEC J96的生长)；对照组UPEC J96接种于培养基中，均培养24 h。培养结束后收集细菌，实验前配制细菌悬液，通过OD₆₀₀值估算细菌浓度。

2.4 UPEC感染细胞模型建立 HTB-9细胞以每孔2.5×10⁵个的密度接种于24孔板过夜培养，培养结束后，用PBS清洗，加入细菌/细胞比例(MOI)为100的UPEC J96

(已按“2.3”项下方法预处理),与细胞共同培养2 h^[20]。

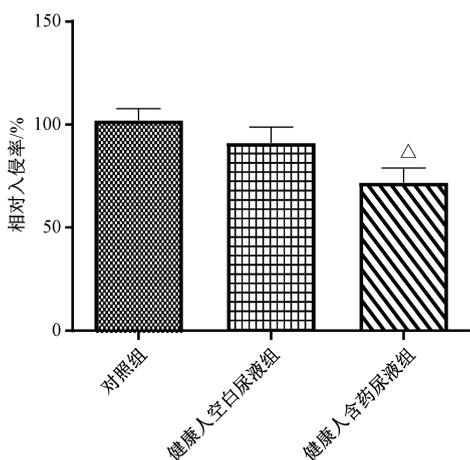
2.5 细菌侵袭力评价 细胞按“2.4”项下方法操作,造模结束后,采用庆大霉素保护法清除胞外细菌,加入0.25%胰酶37℃孵育10 min,使细胞停止贴壁,接着加入0.3% Triton X-100,37℃孵育15 min,再按100倍稀释,取稀释液涂板计数。

2.6 RT-qPCR检测各指标mRNA相对表达 取“2.3”项下处理后的细菌,按柱式细菌总RNA提取纯化试剂盒说明书操作提取细菌总RNA;取“2.4”项下处理后的细胞,按UNI-Q-10柱式TRIzol总RNA抽提试剂盒说明书操作提取细胞总RNA。逆转录和扩增操作步骤按说明书执行,各实验均重复3次。

2.7 Western blot法检测各指标蛋白相对表达 取“2.4”项下处理后的细胞,加入含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液,冰浴30 min,4℃、12 000 r/min离心10 min,收集上清,采用BCA法进行蛋白定量。取样品进行电泳分离并转移至PVDF膜,封闭1 h后加入一抗工作液,4℃孵育过夜,TBST洗涤后加入二抗工作液,室温孵育1 h,TBST洗涤后ECL显色试剂盒显色,凝胶成像分析系统拍照,用AlphaEase FC软件分析灰度值,以β-actin为内参,以目标蛋白与β-actin的灰度比值进行统计分析,各实验均重复3次。

2.8 Rac1、Cdc42活性检测 取“2.4”项下处理后的细胞,按Active Rac1 Pull-Down and Detection试剂盒和Active Cdc42 Pull-Down and Detection试剂盒的说明书操作检测Rac1、Cdc42活性,通过Western blot法进行定量,各实验均重复3次。

2.9 ELISA法检测IP3水平 按“2.4”项下处理后收集细胞培养液,按照试剂盒说明书操作检测各组细胞培养液中IP3水平。



注:与大鼠空白尿液组比较,* $P<0.05$;与健康人空白尿液组比较,[△] $P<0.05$ 。

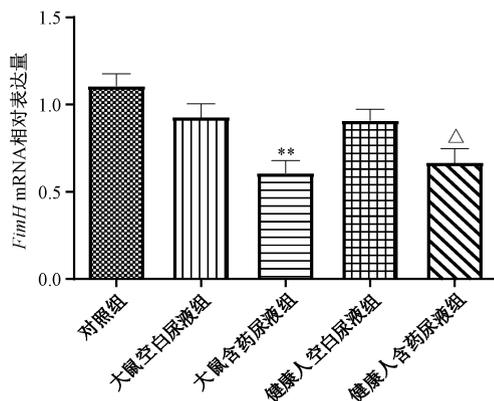
图2 尿感方对UPEC侵袭HTB-9细胞的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

3.3 尿感方干预后的UPEC对HTB-9细胞 integrin $\alpha 3$ 、integrin $\beta 1$ 表达的影响 如表2、图3所示,与对照组比较,大鼠空白尿液组和健康人空白尿液组 integrin $\alpha 3$ 、integrin $\beta 1$ mRNA和蛋白表达无明显变化($P>0.05$);与大鼠空白

2.10 统计学分析 通过SPSS 21.0软件进行处理,数据以($\bar{x}\pm s$)表示,方差齐性检验后,多组间比较采用单因素方差分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

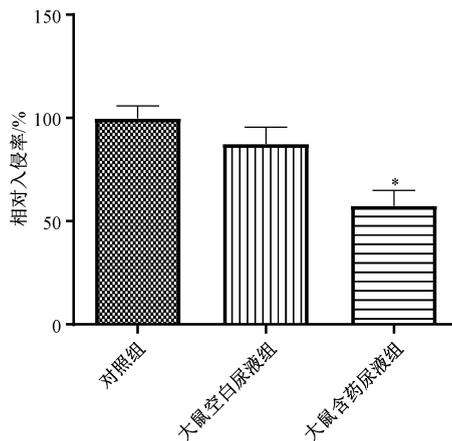
3.1 尿感方对UPEC毒力因子FimH mRNA表达的影响 如图1所示,与对照组比较,大鼠空白尿液组和健康人空白尿液组FimH mRNA表达无明显变化($P>0.05$);与大鼠空白尿液组比较,大鼠含药尿液组FimH mRNA表达降低($P<0.01$);与健康人空白尿液组比较,健康人含药尿液组FimH mRNA表达降低($P<0.05$)。



注:与大鼠空白尿液组比较,** $P<0.01$;与健康人空白尿液组比较,[△] $P<0.05$ 。

图1 尿感方对UPEC毒力因子FimH mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

3.2 尿感方对UPEC侵袭力的影响 如图2所示,与对照组比较,大鼠空白尿液组和健康人空白尿液组细菌入侵率无明显变化($P>0.05$);与大鼠空白尿液组比较,大鼠含药尿液组细菌入侵率降低($P<0.05$);与健康人空白尿液组比较,健康人含药尿液组细菌入侵率降低($P<0.05$)。



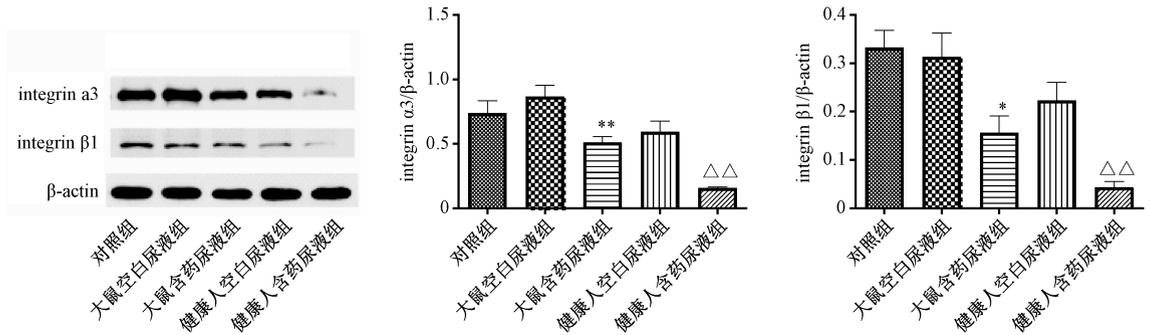
尿液组比较,大鼠含药尿液组 integrin $\alpha 3$ 、integrin $\beta 1$ mRNA和蛋白表达降低($P<0.05, P<0.01$);与健康人空白尿液组比较,健康人含药尿液组 integrin $\alpha 3$ 、integrin $\beta 1$ mRNA和蛋白表达降低($P<0.05, P<0.01$)。

表2 尿感方干预后的UPEC对HTB-9细胞 *integrin α3*、*integrin β1* mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	<i>integrin α3</i>	<i>integrin β1</i>
对照组	1.14±0.31	1.10±0.31
大鼠空白尿液组	1.16±0.30	0.98±0.35
大鼠含药尿液组	0.83±0.11*	0.48±0.17**
健康人空白尿液组	1.15±0.28	1.09±0.16
健康人含药尿液组	0.77±0.17 [△]	0.51±0.10 ^{△△}

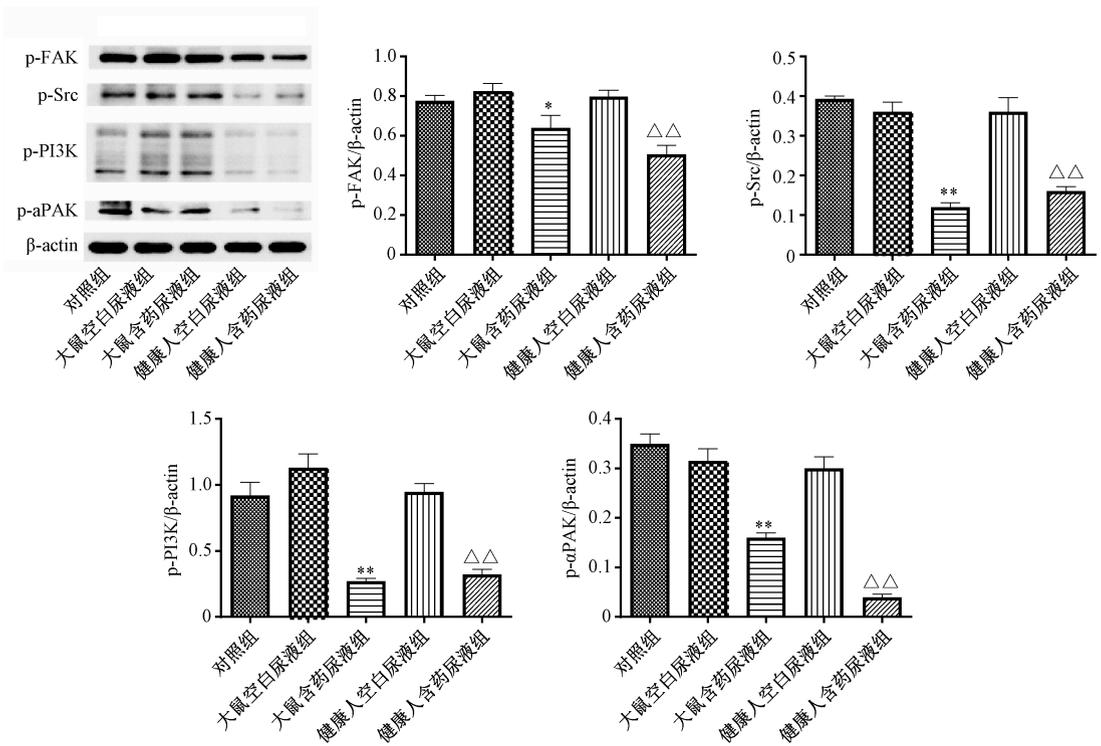
注：与大鼠空白尿液组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；与健康人空白尿液组比较，[△] $P<0.05$ ，^{△△} $P<0.01$ 。

3.4 尿感方干预后的UPEC对HTB-9细胞关键激酶蛋白表达的影响 如图4所示，与对照组比较，大鼠空白尿液组和健康人空白尿液组 p-FAK、p-Src、p-PI3K、p-αPAK 蛋白表达无明显变化 ($P>0.05$)；与大鼠空白尿液组比较，大鼠含药尿液组 p-FAK、p-PI3K、p-Src、p-αPAK 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)；与健康人空白尿液组比较，健康人含药尿液组 p-FAK、p-PI3K、p-Src、p-αPAK 蛋白表达均降低 ($P<0.01$)。



注：与大鼠空白尿液组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；与健康人空白尿液组比较，^{△△} $P<0.01$ 。

图3 尿感方干预的UPEC对HTB-9细胞 *integrin α3*、*integrin β1* 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

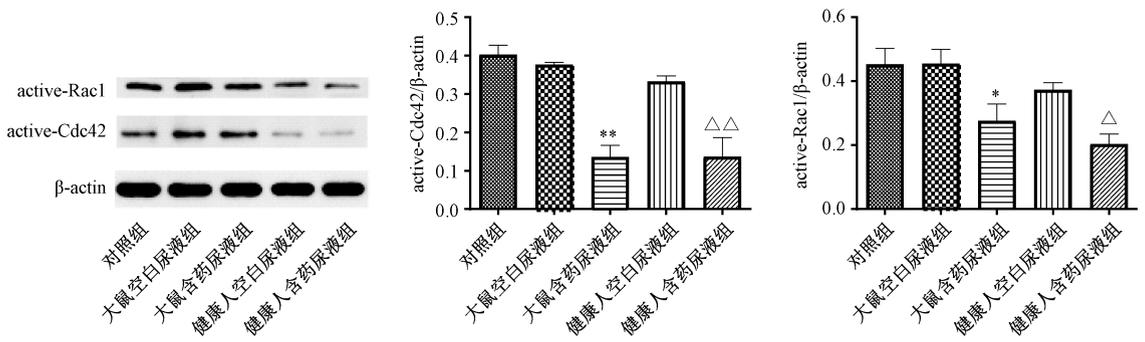


注：与大鼠空白尿液组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；与健康人空白尿液组比较，^{△△} $P<0.01$ 。

图4 尿感方干预的UPEC对HTB-9细胞关键激酶蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.5 尿感方干预后的UPEC对HTB-9细胞 Rac1、Cdc42 活性的影响 如图5所示，与对照组比较，大鼠空白尿液组和健康人空白尿液组 active Rac1、active Cdc42 蛋白表达无明显变化 ($P>0.05$)；与大鼠空白尿液组比较，大鼠含药

尿液组 active Rac1、active Cdc42 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)；与健康人空白尿液组比较，健康人含药尿液组 active Rac1、active Cdc42 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

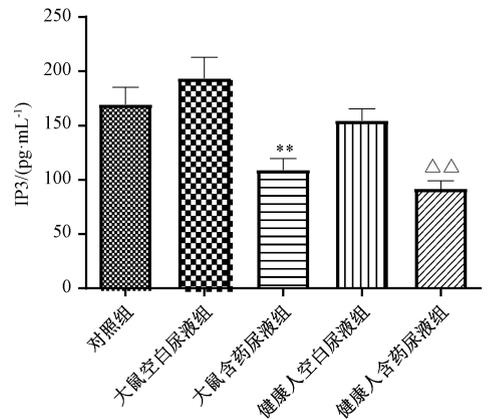


注：与大鼠空白尿液组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与健康人空白尿液组比较，△ $P < 0.05$ ，△△ $P < 0.01$ 。

图5 尿感方干预后的UPEC对HTB-9细胞Rc1、Cdc42活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.6 尿感方干预后的UPEC对HTB-9细胞信号分子IP3水平的影响 如图6所示，与对照组比较，大鼠空白尿液组和健康人空白尿液组IP3水平无明显变化 ($P > 0.05$)；与大鼠空白尿液组比较，大鼠含药尿液组IP3水平降低 ($P < 0.01$)；与健康人空白尿液组比较，健康人含药尿液组IP3水平降低 ($P < 0.01$)。

3.7 尿感方干预后的UPEC对HTB-9细胞骨架蛋白mRNA表达的影响 如表3所示，与对照组比较，大鼠空白尿液组和健康人空白尿液组vinculin、talin、paxillin、F-actin、α-actinin mRNA表达无明显变化 ($P > 0.05$)；与大鼠空白尿液组比较，大鼠含药尿液组talin、α-actinin、vinculin、paxillin、F-actin mRNA表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)；与健康人空白尿液组比较，健康人含药尿液组talin、paxillin、F-actin、vinculin、α-actinin mRNA表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。



注：与大鼠空白尿液组比较，** $P < 0.01$ ；与健康人空白尿液组比较，△△ $P < 0.01$ 。

图6 尿感方干预后的UPEC对HTB-9细胞IP3水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

表3 尿感方干预后的UPEC对HTB-9细胞骨架蛋白mRNA表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	talin	paxillin	F-actin	α-actinin	vinculin
对照组	1.06±0.15	1.07±0.21	1.44±0.35	1.12±0.28	0.86±0.25
大鼠空白尿液组	1.07±0.21	1.09±0.31	1.28±0.54	1.07±0.15	0.84±0.19
大鼠含药尿液组	0.78±0.18*	0.46±0.25**	0.41±0.20**	0.71±0.28*	0.52±0.12**
健康人空白尿液组	1.10±0.29	1.04±0.31	1.00±0.33	1.16±0.24	0.82±0.17
健康人含药尿液组	0.81±0.18△	0.63±0.31△	0.56±0.28△	0.65±0.10△△	0.60±0.13△

注：与大鼠空白尿液组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与健康人空白尿液组比较，△ $P < 0.05$ ，△△ $P < 0.01$ 。

4 讨论

UPEC 是否能通过自身携带的毒力因子影响宿主细胞的信号传导，是其进入宿主细胞内的关键^[1,4]。粘附蛋白 *FimH* 是 UPEC 最重要的毒力因子，*FimH* 的表达直接影响着 UPEC 的侵袭力，*FimH* 表达下调时，UPEC 的侵袭力明显减弱^[2,5]。integrin α3、β1 在成熟和不成熟的 BECs 均有分布，是 *FimH* 结合的主要受体，具有粘附和信号传导功能，介导了细胞内外之间的双向信号传导^[7-9]。当 integrin α3、β1 表达减少或活性降低时，侵入 BECs 胞内的 UPEC 数量明显下降^[6-9]。UPEC 通过 *FimH* 与 BECs 的 integrin α3、β1 结合激活 FAK^[7]，FAK 是 integrin 介导胞外内信号传导通路的基础性信号传递分子^[21-23]。在 FAK 的激活过程中，Src 激酶与 FAK 的磷酸化区域结合而被激活，活化的 Src 催化 FAK 的酪氨酸，从而完全活化 FAK^[23]，活化的 FAK 与

talin 和 paxillin 结合，使后两者磷酸化，进而通过其下游信号通路导致细胞骨架重排；另一方面，活化的 FAK 激活信号分子 Rac1 和 Cdc42，继而通过 PAK 作用于细胞骨架，F-actin、α-actinin 和 vinculin 结合形成复合体，使 UPEC 定植区域的细胞骨架结构重排^[22-26]。再者，FAK 的 Tyr397 与 PI3K 结合，激活 PI3K，生成信号分子 IP3，引发下游的信号传递和细胞骨架重排，导致 UPEC 进入宿主细胞内^[23]。

本研究结果显示，空白尿液对 UPEC 的毒力因子 *FimH* 表达无明显影响；经空白尿液干预后的 UPEC 的侵袭力未受到明显影响；经空白尿液干预后的 UPEC 与宿主细胞之间发生的相互作用也没有明显变化，即对 HTB-9 细胞 integrin α3、integrin β1 表达，关键激酶 FAK、Src、PI3K、PAK 表达，Rac1、Cdc42 活性，IP3 水平，细胞骨架蛋白 (*vinculin*、*talin*、*paxillin*、*F-actin*、*α-actinin*) mRNA 表达均

无明显影响。另外,尿感方含药尿液中的药物能够下调 UPEC *FimH* 表达,降低 UPEC 的侵袭力;受到药物影响的 UPEC 与宿主细胞之间的相互作用也发生了变化,即降低了 HTB-9 细胞 integrin $\alpha 3$ 、integrin $\beta 1$ 表达,关键激酶 FAK、Src、PI3K、PAK 表达, Rac1、Cdc42 活性, IP3 水平,细胞骨架蛋白 mRNA 表达。上述结果提示,生存于尿液环境中 UPEC 会受到尿液中药物的直接作用,尿感方含药尿液中的药物抑制了 UPEC 毒力因子 *FimH* 的表达,由其所引起的与宿主细胞之间的相互作用亦随之减弱,最终导致成功进入宿主细胞胞内的 UPEC 数量减少,即 UPEC 的侵袭力受损。

综上所述,尿感方含药尿液中的药物通过影响 UPEC *FimH* 表达,减弱 UPEC 的侵袭力,其作用机制与 *FimH*/integrin $\alpha 3$ 、 $\beta 1$ /FAK 信号传导通路有关。

参考文献:

[1] Neugent M L, Hulyalkar N V, Nguyen V H, et al. Advances in understanding the human urinary microbiome and its potential role in urinary tract infection [J]. *mBio*, 2020, 11 (2): e00218-e00220.

[2] Terlizzi M E, Gribaudo G, Maffei M E. UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) infections; Virulence factors, bladder responses, antibiotic, and non-antibiotic antimicrobial strategies [J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 1566.

[3] McLellan L K, Hunstad D A. Urinary Tract infection: Pathogenesis and outlook [J]. *Trends Mol Med*, 2016, 22(11): 946-957.

[4] Lüthje P, Brauner A. Virulence factors of uropathogenic *E. coli* and their interaction with the host [J]. *Adv Microb Physiol*, 2014, 65: 337-372.

[5] Martinez J J, Mulvey M A, Schilling J D, et al. Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of ladder epithelial cells [J]. *EMBO J*, 2000, 19(12): 2803-2812.

[6] Dhaka 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 Suppl 2: 2-11.

[7] Eto D S, Jones T A, Sundsbak J L, et al. Integrin-mediated host cell invasion by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli* [J]. *PLoS Pathog*, 2007, 3(7): e100.

[8] Lewis A J, Richards A C, Mulvey M A. Invasion of host cells and tissues by uropathogenic bacteria [J]. *Microbiol Spectr*, 2016, 4(6): 1-29.

[9] Khandelwal P, Ruiz W G, Apodaca G. Compensatory endocytosis in bladder umbrella cells occurs through an integrin-regulated and RhoA- and dynamin-dependent pathway [J]. *EMBO J*, 2010, 29(12): 1961-1975.

[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] 吴雨, 蒋健, 贺敏, 等. 尿感方清除受感染膀胱上皮细胞内尿道致病性大肠杆菌的作用 [J]. 中成药, 2017, 39(12): 2469-2474.

[16] 吴雨, 蒋健, 贺敏, 等. 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 [J]. 中草药, 2018, 49(9): 2084-2089.

[17] 吴雨, 蒋健, 贺敏, 等. 尿感方对尿道致病性大肠杆菌感染膀胱上皮细胞感染早期分泌 IL-6、IL-8 的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(2): 534-537.

[18] 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*、*hlyA* 表达的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(11): 2319-2323.

[19] 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.

[20] Shen X F, Ren L B, Teng Y, et al. Luteolin decreases the attachment, invasion and cytotoxicity of UPEC in bladder epithelial cells and inhibits UPEC biofilm formation [J]. *Food Chem Toxicol*, 2014, 72: 204-211.

[21] Hu P, Luo B H. Integrin bi-directional signaling across the plasma membrane [J]. *J Cell Physiol*, 2013, 228(2): 306-312.

[22] Margadant C, Monsuur H N, Norman J C, et al. Mechanisms of integrin activation and trafficking [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2011, 23(5): 607-614.

[23] Mierke C T. The role of focal adhesion kinase in the regulation of cellular mechanical properties [J]. *Phys Biol*, 2013, 10(6): 065005.

[24] Martinez J J, Hultgren S J. Requirement of Rho-family GTPases in the invasion of Type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli* [J]. *Cell Microbiol*, 2002, 4(1): 19-28.

[25] Chi X J, Wang S, Huang Y F, et al. Roles of rho GTPases in intracellular transport and cellular transformation [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(4): 7089-7108.

[26] Mosaddeghzadeh N, Ahmadian M R. The RHO family GTPases: Mechanisms of regulation and signaling [J]. *Cell*, 2021, 10(7): 1831.