

尿感方治疗尿路感染的主要药效学研究

孙怡婕¹, 贺敏¹, 金若敏², 符胜光², 李秀芳³, 张茜²,
高建东¹, 陈华英,² 盛云华², 蒋健^{1*}

(1. 上海中医药大学附属曙光医院, 上海 200021; 2. 上海中医药大学,
上海 201203; 3. 云南中医学院, 昆明 650500)

[摘要] 目的:探讨尿感方治疗尿路感染的药效。方法:将小鼠随机分为空白对照组、阳性药对照组、模型组、尿感方高、低剂量组(54.29, 27.15 g·kg⁻¹)。各组连续 ig 给药 7 d, 空白对照组及模型组予同容积蒸馏水, 第 7 天测定其体内抗菌、抗炎作用。将大鼠随机分为空白对照组、阳性药对照组、模型组、尿感方高、低剂量组(38.01, 19.01 g·kg⁻¹)。给药方法小鼠, 第 7 天观察其对尿路感染模型大鼠的影响、对大鼠 5 h 尿量的影响、对大鼠尿分泌型免疫球蛋白 a(SIgA) 水平的影响。结果:尿感方给药剂量为 38.01 g·kg⁻¹ 时尿感模型大鼠尿菌落计数、肾脏病理等级明显小于模型组($P < 0.05$); 剂量为 54.29 g·kg⁻¹ 时感染小鼠存活率明显高于模型组($P < 0.05$); 剂量分别为 54.29, 27.15 g·kg⁻¹ 时致炎小鼠耳肿胀程度明显小于对照组($P < 0.01, P < 0.05$); 剂量为 38.01 g·kg⁻¹ 时大鼠 5 h 尿量及尿 SIgA 含量明显多于正常组($P < 0.01$)。结论:尿感方可从抗菌、抗炎、利尿、增强局部免疫等多方面起效, 具有治疗尿路感染的作用。

[关键词] 尿路感染; 分泌型免疫球蛋白 a; 尿感方

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2011)24-0144-03

[DOI] CNKI:11-3495/R.20111017.0941.010 **[网络出版时间]** 2011-10-17 9:41

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20111017.0941.010.html>

尿路感染的发病率占我国人口的 0.91%, 女性人口的 2.05%^[1-3]。本病常上行感染引起慢性肾盂肾炎, 是导致慢性肾功能不全的重要原因之一^[4]。单纯运用抗生素治疗尿路感染存在耐药性、肝肾功能损害、体内菌群失调等诸多问题。尿感方(专利号 200910201845.6) 是导师蒋健根据中医基础理论, 综合历代医家的认识及多年临床实践几经筛选组方而成, 具有清热利湿, 通淋解毒之功。前期研究显示其对尿频、尿急改善情况优于三金片及维沙欣对照组($P < 0.01$); 总有效率 优于三金片对照组($P < 0.01$), 具有较好的临床疗效^[5]。本课题研究其对尿路感染模型大鼠的体内抗菌、抗炎、利尿作用, 及对

尿液分泌型免疫球蛋白 a(SIgA) 值的影响, 初步探讨尿感方的药效作用。

1 材料

1.1 药物 尿感方水提液(马齿苋: 蒲公英 15:4, 水提, 以咖啡酸及总黄酮作为 质控指标, 中国科学院上海药物研究所制备)。维沙欣(乳酸左氧氟沙星片), 上海三维制药有限公司出品, 批号 20071119。吡喹酮片, 上海信谊九福药业有限公司, 批号 081101。呋塞米片, 上海朝晖药业有限公司, 批号 090103。

1.2 动物 昆明种小鼠 18 ~ 22 g, SD 大鼠(200 ± 10)g, SPF 级, 雌雄各半。上海中医药大学实验动物中心提供, 该动物中心饲养, 合格证号 SCXK(沪) 2007-2005。

1.3 菌种 大肠杆菌 ATCC25922 标准菌株, 上海市临床检验中心, 批号 200909。

1.4 仪器及试剂 3% 戊巴比妥钠溶液, 上海化学试剂厂。羊血琼脂平板、营养肉汤等, 上海伊华科技有限公司出品。二甲苯, 国药集团化学试剂有限公司, 批号 F20090420。大鼠分 SIgA ELISA 试剂盒, 上海尚智生物技术有限公司。PYX-DHS-37X40-B 5 ~ 60 °C 隔水式电热恒温培养箱, 上海跃进医疗器械厂

[收稿日期] 20110501(003)

[基金项目] “重大新药创制” 创新药物研究开发技术平台建设(2008ZX09312-023); 上海市教委重点学科中药临床药理学(J50303); 浦东新区科委基金项目(PKM2010-12, PKM2010-18); 上海市科委基金项目(09dz1971200)

[第一作者] 孙怡婕, 硕士学位, 从事脾胃病中医药治疗研究

[通讯作者] * 蒋健, 医学博士, 主任医师, 博士生导师, 从事脾胃病与内科杂症的临床研究, Tel: 021-53821650, E-mail: jiangjiansg@126.com.

出品。bioMerieux 比浊仪,型号 DENSIMAT。ACS-A 型计价电子秤,上海衡器厂。SCOUT II 型电子秤、AR21301c 型电子天平,OHAUS,8 mm 打孔器。

2 方法

2.1 对尿路感染模型大鼠的影响 将大肠杆菌标准菌株干粉溶于无菌营养肉汤中,接种于羊血琼脂平板,35 ℃ 培养箱培养 18~24 h 后用无菌生理盐水配制成 1.00 麦氏比浊细菌悬液备用。

大鼠随机分为 4 组,即空白组、模型组、尿感方组、维沙欣组,每组 8 只,按文献方法造模^[6]。大鼠禁食禁水 18 h 后 3% 戊巴比妥钠按 40 mg·kg⁻¹ ip 麻醉,无菌操作下以适当松紧度“结扎”左侧输尿管,向正常组膀胱内注射 0.50 mL 生理盐水,其余 3 组注射等量菌液后缝合。术后 24 h 重新开放输尿管。各组 ig 给药 7 d,1 次/d;空白组及模型组予同体积蒸馏水(下同),容积均为 15.0 mL·kg⁻¹。尿感方组药物质量浓度相当于生药 2 530 g·L⁻¹;维沙欣组药物质量浓度 2.67 g·L⁻¹。末次给药前禁食 12 h,给药 1 h 后无菌操作下直接抽取膀胱尿液,留取肾脏。观察尿菌落计数:定量接种尿液后培养 48 h。无细菌生长为阴性,有细菌生长则计数培养皿上的菌落数,计算尿液含菌量(个/mL)。肾病理组织学检查:肾脏固定、切片、HE 染色。按高倍镜下肾盂肾盏黏膜下和肾小管周围白细胞浸润程度分级:0 级 <10 个;1 级 10~30 个;2 级 31~50 个;3 级 >50 个白细胞或有脓肿形成^[7]。

2.2 对大肠杆菌感染小鼠的保护作用 小鼠随机分为 5 组,即空白组、模型组、尿感方高、低剂量组、维沙欣组,每组 10 只,实验方法参考文献^[8]。各组给药频次、方法同实验 2.1,容积均为 21 mL·kg⁻¹。尿感方高剂量组药物质量浓度 2 530 g·L⁻¹;尿感方低剂量组药物质量浓度 1 270 g·L⁻¹;维沙欣组药物密度 1.33 g·L⁻¹。末次给药前 12 h 禁食,给药后 1 h ip 菌液 0.50 mL/只,细菌密度为 0.6 麦氏比浊。观察 48 h 内动物的死亡率。

2.3 对二甲苯致小鼠耳肿胀的抗炎作用 小鼠随机分为 4 组,即对照组、尿感方高剂量组、尿感方低剂量组、吡啶美辛片组,每组 10 只,造模按二甲苯致小鼠耳肿胀法^[8,9]。吡啶美辛片组从第 6 天开始给药,药物浓度 0.44 g·L⁻¹,其余各组给药同实验 2.2。末次给药前禁食 12 h,给药后 1 h,二甲苯 50 μL/只涂于小鼠右耳廓两面致炎,左耳作对照。致

炎 20 min 后用直径 8 mm 的打孔器取下耳片,称质量,并按下式计算:

$$\text{肿胀度(mg)} = \text{致炎侧耳片质量(mg)} - \text{非致炎侧耳片质量(mg)}$$

$$\text{肿胀抑制率} = \frac{\text{对照组平均肿胀度} - \text{药物组平均肿胀度}}{\text{对照组平均肿胀度}} \times 100\%$$

2.4 利尿作用 大鼠随机分为 4 组,即空白组、尿感方高剂量组、尿感方低剂量组、咪唑米片组,每组 8 只。实验方法参照利尿实验法^[8],筛选合格大鼠后,尿感方低剂量组给药浓度 1 270 g·L⁻¹,咪唑米片组给药浓度 0.66 g·L⁻¹,给药方法同 2.1。末次给药前禁食 12 h,给药后每 1 h 收集 1 次尿液,连续收集 5 h 并记录。

2.5 对分泌型免疫球蛋白 a(SIgA)的影响 大鼠随机分为 3 组,即空白组、尿感方高剂量组、维沙欣组,每组 8 只。按实验 2.1 方法给药后收集尿液,据试剂盒说明书操作检测尿中 SIgA 含量。

2.6 数据处理 计量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据运用 SPSS 17.0 统计软件包进行处理分析,计量资料用方差分析,等级资料用秩和检验,计数资料用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对尿路感染模型大鼠的影响 尿感方组尿菌落计数、肾脏病理等级明显小于模型组($P < 0.05$);正常组、维沙欣组尿菌落计数、肾脏病理等级明显少于模型组($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 尿感方对尿路感染模型大鼠的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	尿细菌数 /log10	肾脏病变分级/n			
			0 级	1 级	2 级	3 级
正常	-	0.00 ± 0.00 ²⁾	8 ²⁾	0	0	0
模型	-	2.10 ± 0.84	0	2	1	5
尿感方	38.01	0.91 ± 0.97 ¹⁾	2 ¹⁾	4	1	1
维沙欣	0.04	0.00 ± 0.00 ²⁾	8 ²⁾	0	0	0

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.2 对大肠杆菌感染小鼠的保护及抗炎作用 尿感方高剂量组、维沙欣组、正常组的小鼠存活率明显高于模型组($P < 0.05$)。尿感方高、低剂量组、吡啶美辛片组的小鼠耳肿胀程度明显小于对照组($P < 0.01, P < 0.05$)。见表 2。

3.3 利尿作用及对分泌型免疫球蛋白 a(SIgA)的影响 尿感方高剂量组、咪唑米片组大鼠 5 h 尿量

表 2 尿感方对大肠杆菌感染小鼠的保护及对二甲苯致小鼠耳肿胀的抗炎作用 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	小鼠存 活率/%	肿胀度 /mg	抑制率 /%
正常	-	100 ¹⁾	-	-
模型/对照	-	20	8.10 ± 3.70	-
尿感方	54.29	60 ¹⁾	2.40 ± 1.26 ²⁾	70.37
	27.15	40	4.80 ± 3.19 ¹⁾	40.74
吡喹啉美辛片	0.01	-	5.00 ± 4.69 ¹⁾	38.27
维沙欣	0.03	100 ¹⁾	-	-

及尿 SIgA 含量明显多于正常组 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 尿感方对正常大鼠 5 h 尿量及尿液 SIgA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	尿量 /mL	log ₁₀ SIgA /mmol·L ⁻¹
正常	-	5.19 ± 0.69	0.03 ± 0.52
尿感方	38.01	8.78 ± 1.27 ¹⁾	0.79 ± 0.63 ¹⁾
	19.01	5.26 ± 0.88	-
呋喃米片	0.01	6.66 ± 1.21 ¹⁾	-
维沙欣	0.04	-	0.45 ± 0.67

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

膀胱注射细菌、单侧输尿管结扎的尿感大鼠模型,易发生尿液自发性反流,造成逆行性感染,与人类肾盂肾炎相似^[7],药物的整体作用靶点定位准确。研究显示给药剂量为 38.01 g·kg⁻¹时对尿感模型大鼠具有治疗作用。

为初步探索其作用机制,课题分别从以下几个角度对尿感方进行研究。其一,给药剂量为 54.29 g·kg⁻¹时对大肠杆菌感染小鼠有保护作用,具体内抗菌效果。其二,尿感急性膀胱炎可表现为黏膜充血潮红,上皮细胞肿胀,黏膜下组织充血水肿、白细胞浸润^[8]。尿感方给药剂量为 27.15 g·kg⁻¹时即具有一定的抗炎作用;且随着剂量的提高,抗炎的效果愈发明显,具有显著的量效关系。其三,无湿不成淋,利水渗湿可使湿热之邪随小便而散。现代医学理论也认为排尿可冲洗膀胱和尿道,避免细菌在尿路繁殖,是最实用有效的预防方法^[1]。尿感方给药剂量为 38.01 g·kg⁻¹时具有一定的利尿作用。其四,SIgA 是机体黏膜特异性免疫的主要成分,对各种病

原体有较强的凝集能力,防止细菌在尿路上皮细胞的黏附^[10-11]。尿路黏膜增加 SIgA 分泌量可防止尿感发生,反之则易造成尿感反复发作、迁延不愈^[12]。尿感方给药剂量为 38.01 g·kg⁻¹时可增加尿液 SIgA 含量,提高机体局部免疫力。

与抗生素仅对细菌的活力产生影响不同,尿感方亦能提高机体局部免疫力、增加尿液冲刷量、减轻组织炎症改变。从尿感发病机制的各个方面起到防范与治疗作用,印证了中医治疗淋证“实则清利,虚则补益”的处方原则,体现了中医药多靶点的作用特色,也不存在耐药性的问题,从药物的综合疗效角度而言,尿感方是不输抗生素的有效药物。

[参考文献]

- [1] 王海燕. 肾脏病学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1998:801.
- [2] 叶任高. 肾脏病的诊断与治疗[M]. 北京:人民卫生出版社,1985:324.
- [3] 罗云间. 泌尿专科中医临床诊治[M]. 北京:人民卫生出版社. 2000:9.
- [4] 杜晓霞,刘虹,彭佑铭. 1137 例慢性肾功能衰竭病人病因分析[J]. 湖南医科大学学报,2003,28(6):641.
- [5] 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.
- [6] Michel P Glauser, Patrick B Francioli, Jacques Bille, et al. Effect of indomethacin on the incidence of experimental escherichia coli pyelone phritis [J]. Infection Immunity, 1983,40(2): 529.
- [7] 侯芳玉,高庆英,郭超. 大鼠急性逆行性肾盂肾炎模型的制作[J]. 中国实验动物学杂志,1998,8(1):31.
- [8] 徐叔云,陈修,卞如濂,等. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2006:1664,911,1223.
- [9] 彭代银,章小兵,余世春,等. 清热祛湿胶囊主要药效学实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2005, 11(5):28.
- [10] 龚非力. 医学免疫学[M]. 北京:科学出版社, 2000:83.
- [11] 杨永清,陈汉平. SIgA 的基础和临床研究进展[J]. 现代免疫学,1991,11(3):21.
- [12] 鲍广君. 尿路感染反复发作与机体免疫状态关系的研究[J]. 中国综合临床,2003,19(12): 1108.

[责任编辑 聂淑琴]