论著

文章编号:1000-5404(2008)02-0124-03

前列腺结石患者结石中纳米细菌的分离和16S rRNA基因的鉴定

沈学成[1],杨 杰[2],饶贤才[2],宋 波[1],周占松[1] (第三军医大学:[1]西南医院全军泌尿外科研究所,[2]基础医学部微生物学教研室,重庆市微生物工程实验室,重庆 400038)

摘 要:目的 检测纳米细菌在前列腺结石中的分布情况,探讨其在前列腺结石发病中的作用。方法 采集前列腺结石患者的前列腺结石标本,分离培养纳米细菌,采用PCR法对纳米细菌16S rRNA基因进行扩增,电泳分析结果并测序。结果 将PCR得到的特异性片段的测序结果与已知纳米细菌16S rRNA序列进行比较,相似度为98%;分值=2 480 bits(1 290),期望值=0.0;相似度=1 387/1 409(98%),缺失=4/1 409(0%);链=正/正。结论 PCR法和测序可以作为纳米细菌16S rRNA基因的检测手段;前列腺结石患者的结石中存在着纳米细菌的感染。

关键词:纳米细菌;前列腺结石;聚合酶链式反应;16S rRNA基因
中图法分类号:R372;R394;R697.340.2 文献标识码:A

Nanobacteria: isolation from prostatic calculus and identification of its 16S rRNA gene

SHEN Xue-cheng[1], YANG Jie[2], RAO Xian-cai[2], SONG Bo[1], ZHOU Zhan-song[1] ([1]Institue of Renal Surgery, Southwest Hospital, [2]Department of Microbiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400058, China)

Abstract: Objective To explore the distribution of nanobacteria in prostatic calculus and investigate its role in the formation of prostatic calculus. Methods The stones of 40 patients with prostatic calculus was used to isolate and culture the possible bacteria. The genomes of obtained bacteria were extracted, and the 16S rRNA was amplified by PCR followed by sequencing. Results The obtained specific fragment had a 98% resemblance with 16S rRNA of nanobacteria: Score = 2 480 bits (1 290), Expect = 0.0; Identities = 1 387/1 409 (98%), Gaps = 4/1 409 (0%); Strand = Plus/Plus. Conclusion Nanobacteria is proved existing in the stones of prostatic calculus patients by PCR and sequencing.

Key words: nanobacteria; prostatic calculus; polymerase chain reaction; 16S rRNA

纳米细菌(nanobacteria, NB)是由芬兰科学家Kajander发现并命名,是迄今发现的唯一能产生羟磷灰石矿物沉积于人体的病原菌,且在人群中的感染率较高。纳米细菌生长过程中能在菌体周围产生坚硬的矿化外壳,导致被感染细菌产生病理性钙化[1]。国外学者研究发现肾结石患者的血液、尿液和结石中存在纳米细菌[2-6],并成功地建立了纳米细菌致大鼠肾结石动物模型[3]。前列腺结石和肾结石在成核机制方面有许多相似之处,如细菌感染、促或抑成核因子的作用、钙离子浓度等,但前列腺结石中是否存在纳米细菌,国内外尚少见报道。本研究应用基因扩增和测序的方法探索纳米细菌在前列腺结石中的分布情况,并对其在前列腺结石发病中的作用进行研究。

1 资料与方法

1.1 对象及分组

随机选择2006年11月至2007年3月在第三军医大学西南医院泌尿外科住院的前列腺结石患者,根据病史、X线、B超检查结果筛选出40例,年龄52~67岁,平均60岁。手术中无菌采集前列腺结石患者的结石标本。

1.2 主要试剂

RMPI1640培养基购自Hyclone(北京)公司,γ射线照射过的胎牛血清(γ-FBS)购自美国Gibco公司,PMD-18T载体购自大连宝生物公司,DNA提取试剂盒、胶回收试剂盒购自TIANDZ科技公司,PCR反应体系购自大连宝生物公司,引物合成于上海生物工程公司。

1.3 纳米细菌的分离培养

1.3.1 标本的处理 手术中无菌采取患者结石标本,

基金项目:国家自然科学基金(30672094)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30672094)
作者简介:沈学成,男,安徽省合肥市人,硕士研究生,医师,主要从事前列腺结石中纳米细菌致病机制方面的研究。电话:(023)68754186
通信作者:宋 波,电话:(023)68754186
周占松,电话:(023)68765341
收稿日期:2007-08-31;修回日期:2007-11-07

1 mol/L HCl 浸泡 30 min，以去除矿物质，0.5 mol/L tris 进行中和，碾碎结石，用生理盐水配成 5% 浓度，用 0.22 μm 滤膜过滤，4 ℃离心 40 min(20 000 × *g*)。

1.3.2　标本的培养　　沉淀加入 3 ml 含 10 % 热灭活 γ-FBS 的 RPMI1640 培养基悬浮，置 37 ℃、5% CO_2 和 95% 空气条件下培养 3 ~ 4 周，整个操作中严格遵循无菌技术。每周观察并纪录纳米细菌的生长情况。分别用 RPMI1640（不加标本）、含 10% 热灭活 γ-FBS 的 RPMI1640（不加标本）、生理盐水加入 RPMI1640 做为阴性对照培养。

1.4　纳米细菌 16S rRNA 基因的鉴定

1.4.1　引物设计　　根据纳米细菌 16S rRNA 基因序列（GenBank 登陆号：X98419）设计 1 对引物：5′-AACGAACGACTGGGGCGGCAGGC-3′，5′-CACCCCAGTCGCTGACCC-3′，由上海生工公司合成。

1.4.2　提取纳米细菌全基因组 DNA　　培养 4 周后，培养管底部出现白色菌群沉淀，将培养管中的培养基大部分弃去，留取管底部分 100 μl，彻底混匀后，移入离心管中，加入适量生理盐水，4 ℃离心 40 min（20 000 × *g*）；去上清，沉淀中加入 1 mol/L HCl 0.5 ml 混匀，37 ℃放置 30 min；加入 1 mol/L Tris 0.5 ml 中和，4 ℃离心 40 min（20 000 × *g*），留沉淀备用；余下步骤按 TIANDZ 公司细菌 DNA_{OUT} 使用手册 V1.3 进行操作。

1.4.3　用合成的引物进行 PCR 扩增　　PCR 反应体系：TaKaRa EX *Taq*（5 U/μl）0.25 μl，10 × EX *Taq* Buffer（Mg^2 Free）5 μl，$Mgcl_2$（25 mmol/L）4 μl，dNTP Mixture（各 2.5 mmol/L）4 μl，摸板 DNA 2.5 ng，引物 1（20 μmol/L）1 μl，引物 2（20 μmol/L）1 μl，双蒸水加至 50 μl。PCR 反应条件：94 ℃ 5 min，94 ℃ 30 s，57 ℃ 30 s，72 ℃ 90 s，30 个循环，72 ℃ 10 min。结果检测：反应结束后取 5 μl 反应产物，琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4.4　回收特异性扩增片段　　按 TIANDZ 公司柱式 DNA_{BACK} 使用手册 V2.2 进行操作。

1.4.5　克隆鉴定特异性扩增片段　　扩增片段克隆到 PMD-18T，按 TaKaRa PMD18-T Vector 使用手册 D101A 进行操作，转化的质粒送大连宝生物工程公司进行核苷酸测序，将测序结果与纳米细菌 16S rRNA 基因序列进行比较，鉴定新分离的纳米细菌。

1.5　统计学处理

采用 SPSS 11.0 软件进行 χ^2 检验。

2　结果

2.1　培养结果的观察

2.1.1　标本生长情况　　结石标本，用含 10 % 热灭活 γ-FBS 的 RPMI1640 培养基培养 3 ~ 4 周后进行观察，发现 28 例培养管底部出现紧贴管壁生长的白色沉淀物（图 1）。根据生长情况的不同，将标本分为 Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ 4 组。其中 4 例摇晃后完全呈絮状漂浮（归入 Ⅰ 组），8 例摇晃后既有絮状漂浮物，又有部分白色物质黏附于管底壁（归入 Ⅱ 组），16 例摇晃后完全黏附于管底壁（归入 Ⅲ 组），12 例无沉淀出现（归入 Ⅳ 组）。对全部标本行单克隆抗体间接免疫荧光染色，白色沉淀完全或部分黏附于培养管底部者（Ⅱ + Ⅲ），纳米细菌阳性率达 83.3%；而沉淀完全呈絮状或无沉淀者（Ⅰ + Ⅳ），阳性率仅为 37.5%，两者间差异有统计学意义（$\chi^2 = 8.86$，$P < 0.01$）。说明具有紧密黏附于管底的沉淀物是纳米细菌培养过程中的一个重要的微生物学特性，如伴有絮状漂浮物，则可能合并有其他细菌污染。

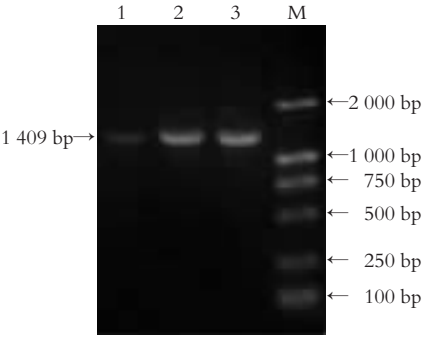


图 1　培养管底部的白色沉淀物

2.1.2　阴性对照培养情况　　RPMI1640（不加标本）、含 10% 热灭活 γ-FBS 的 RPMI1640（不加标本）、生理盐水加入 RPMI1640 等阴性对照培养后未见白色沉淀物出现。

2.2　16S rRNA 的鉴定

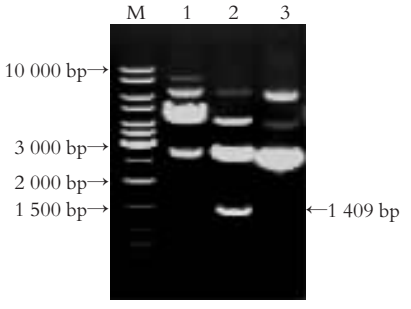
2.2.1　纳米细菌 16S rRNA 基因的扩增　　提取纳米细菌的全基因组，用合成的引物进行 PCR 扩增，取 5 μl 反应产物，1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。检测结果见图 2。



M：DNA 标准（DL 2000）；1 - 3：不同标本扩增出的目的片段

图 2　纳米细菌 16S rRNA 基因的表达

2.2.2　纳米细菌 16S rRNA 基因的克隆与酶切分析　　扩增片段克隆到 PMD-18T 载体上，进行质粒转化，提取质粒，并进行单、双酶切，使用 1 % 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。检测结果见图 3。



M：DNA 标准（DL 10000）；1：重组质粒；2：重组质粒 *Hind* Ⅲ/*Xba* Ⅰ 双酶切；3：重组质粒 *Hind* Ⅲ 单酶切

图 3　16S rRNA 基因重组质粒的酶切分析

2.2.3 纳米细菌16S rRNA基因的测序与相似性分析 转化的质粒送大连宝生物工程公司进行核苷酸测序,特异性片段的测序结果经软件与纳米细菌16S rRNA基因序列进行比较后发现相似度为98%。比照结果,分值=2 480 bits (1 290),期望值=0.0;相似度=1 387/1 409 (98%),缺失=4/1 409 (0%);链=正/正。

根据比照结果显示我们获得的特异性片段与基因库中的纳米细菌的16S rRNA基因高度一致,从而证实我们获得的特异性片段即是纳米细菌的16S rRNA,也证明了前列腺结石中确实存在着纳米细菌。

3 讨论

结石病是发病率较高的疾病,在我国的发病率为7%~10%,严重威胁患者的健康[7-10]。关于结石的发生机制有很多学说,但目前尚未定论[7]。由于新近发现纳米细菌具有独特的矿化作用,通过电镜观察证实纳米细菌的矿化外壳是由许多薄层矿物质组成的,傅立叶变换红外线色谱仪(FTIR)测得其主要成分为碳酸盐羟磷灰石。用能量色散X线微量分析(EDX)发现纳米细菌矿化外壳中钙磷成分明显占优,分别达23.4%~23.5%和12.3%~14.6%,这与结石的结构相似[1]。这一发现为阐明前列腺结石的病因提供了新的思路。

纳米细菌生长过程中能在菌体周围产生坚硬的矿化外壳,导致被感染细菌产生病理性钙化。Kajander等[1]于1998年报道5%的正常芬兰人血液中存在纳米细菌,我国31.6%胆囊结石患者血清中能检出纳米细菌[8]。Ciftcioglu等[11]对72例肾结石标本进行纳米细菌培养和单克隆抗体免疫荧光染色鉴定,其中70例阳性,阳性率高达97.2%。Garcia-Cuerpo等[3]应用培养的纳米细菌经皮肾内注射,成功地建立了纳米细菌致大鼠肾结石动物模型,从而提出人类肾结石形成的新学说,即纳米细菌作为结石核心发挥重要作用。Shiekh等[10]将培养的纳米细菌(0.19 mg)经静脉感染Wistar大鼠,8周后尸检显示实验鼠的肾小管内面发生广泛钙化并伴有间质性肾炎,而对照组无任何病理改变,进一步证实了纳米细菌在肾结石发生中的作用。

前列腺结石和肾结石在成核机制方面有许多相似之处,如细菌感染、促或抑成核因子的作用、钙离子浓度等,但前列腺结石中是否存在纳米细菌,国内外尚少见报道。我们在临床上筛选出前列腺结石患者40例,手术中无菌采集结石标本,并从中分离培养出纳米细菌的菌液,采用基因扩增和测序的的方法进行检测。我们根据纳米细菌16S rRNA基因序列(GenBank登录号:X98419)设计引物,并扩增出特异性片段,经过胶回收、T载体克隆、基因测序和比对,结果显示我们获得的特异性片段与基因库中的纳米细菌的16S rRNA基因高度一致,从而证实我们获得的特异性片段即是纳米细菌的16S rRNA,也证明了前列腺结石中确实存在着纳米细菌。由此,我们可以得出结论:前列腺结石的发生的确与纳米细菌的感染存在一定的关系。

我们认为某些学者未能扩增出目的片段,可能是由于引物设计缺乏特异性,或纳米细菌菌体过小,基因提取困难等环节造成的。下一步我们还将利用蛋白质分离、测序、质谱等技术鉴定出纳米细菌矿化作用相关基因,进一步通过基因克隆、表达等研究,探讨目标基因对纳米细菌矿化作用的影响,为深入认识纳米细菌的矿化机制奠定基础。如果我们发现了纳米细菌的矿化作用相关基因,探明出纳米细菌在前列腺结石中的致病机制,并针对纳米细菌的矿化相关基因对前列腺结石患者进行治疗,这就为根治前列腺结石提供了一条崭新的道路。

参考文献:

[1] Kajander E O, Ciftcioglu N. Nanobacteria: an alternative mechanism for pathogenic intra- and extracellular calcification and stone formation [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(14): 8274-8279.

[2] Akerman K K, Kuikka J T, Ciftcioglu N, *et al*. Radiolabeling and in vivo distribution of nanobacteria in rabbit[J]. Proc SPIE, 1997, 3111(5): 436-442.

[3] Garcia-Cuerpo E, Olavi-Kajander E, Ciftcioglu N, *et al*. Nanobacteria. An experimental neo-lithogenesis model[J]. Arch Esp Urol, 2000, 53(4): 291-303.

[4] Wang L, Shen W, Wen J, *et al*. An animal model of black pigment gallstones caused by nanobacteria[J]. Dig Dis Sci, 2006, 51(6): 1126-1132.

[5] Silay M S, Miroglu C. The risk of urolithiasis recurrence may be reduced with anti-nanobacterial therapy[J]. Med Hypotheses, 2007, 68(6): 1348-1350.

[6] Benzerara K, Miller V M, Barell G, *et al*. Search for microbial signatures within human and microbial calcifications using soft x-ray spectromicroscopy[J]. J Investig Med, 2006, 54(7): 367-379.

[7] Rieu P. Infective lithiasis[J]. Ann Urol (Paris), 2005, 39(1): 16-29.

[8] Wen Y, Li Y G, Yang Z L, *et al*. Detection of nanobacteria in serum, bile and gallbladder mucosa of patients with cholecystolithiasis[J]. Chin Med J (Engl), 2005, 118(5): 421-424.

[9] Khullar M, Sharma S K, Singh S K, *et al*. Morphological and immunological characteristics of nanobacteria from human renal stones of a north Indian population[J]. Urol Res, 2004, 32(3): 190-195.

[10] Shiekh F A, Khullar M, Singh S K. Lithogenesis: induction of renal calcifications by nanobacteria[J]. Urol Res, 2006, 34(1): 53-57.

[11] Ciftcioglu N, Miller-Hjelle M A, Hjelle J T, *et al*. Inhibition of nanobacteria by antimicrobial drugs as measured by a modified microdilution method[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(7): 2077-2086.

(编辑 龙 亮)