论著

文章编号:1000-5404(2008)12-1122-03

前列腺结石患者结石中纳米细菌的培养和形态学鉴定

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]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 分离、培养、鉴定纳米细菌(nanobacteria, NB),探索其在前列腺结石中的分布情况,分析其在前列腺结石发病中的作用。**方法** 手术中无菌收集前列腺结石患者的结石标本,经过稀释、过滤、离心处理后,用细胞培养的方法进行细菌培养,观察其生长情况。运用透射电镜、钙染色和革兰染色等手段观察其形态特征,采用单克隆抗体间接免疫荧光染色进行细菌鉴定。**结果** ①培养3~4周后,对前列腺结石标本进行观察,发现部分培养管底部出现紧贴管壁生长的白色沉淀物。②钙染色和革兰染色观察可发现NB成簇分布。③单克隆抗体间接免疫荧光染色鉴定发现26例标本中存在着NB,阳性率为65.0%。④免疫荧光阳性标本透射电镜下观察,NB呈球状或球杆状,大小100~500 nm。**结论** 前列腺结石患者的结石中存在着NB的感染,表明NB与前列腺结石发病的关系密切。

关键词: 纳米细菌;前列腺结石;间接免疫荧光染色;电子显微镜
中图法分类号: R372;R446.5;R697.34 **文献标识码:** A

Culture and morphological identification of nanobacteria from prostatic calculus

SHEN Xue-cheng[1], YANG-Jie[2], RAO Xian-cai[2], SONG Bo[1], ZHOU Zhan-song[1] ([1]Urinary Surgery Research Center, Southwest Hospital, [2]Department of Microorganism, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the distribution of the nanobacteria in the prostatic calculus. **Methods** Calculus specimens were collected from 40 patients of prostatic calculus during operation. After the stones were crushed and rinsed with saline, the liquid was diluted, filtrated and centrifuged, then cultured in strict aseptic condition. The obtained cells were observed using transmission electron microscopy (TEM), detected with alizarin red staining and Gram staining, and identified by indirect immunofluorescence staining with monoclonal antibody 8D10 against nanobacteria. **Results** ①After 3 to 4 weeks' culture, a white precipitate adhering to the tube bottom was found. ②The positive rate of nanobacteria were 65.0% in 40 calculus patients. ③Alizarin red staining and Gram staining indicated nanobacteria were distributed in cluster. ④Nanobacteria appeared coccoid- or coccobacillary-like in shape and ranged from 100 to 500 nm in size. **Conclusion** Nanobacteria infection exists in calculus patients.

Key words: nanobacteria; prostatic calculus; immunofluorescence; electron microscopy

纳米细菌(nanobacteria, NB),是由芬兰科学家Kajander发现并命名[1],在生长过程中能使被感染细胞发生病理性钙化[2],同时释放毒素引起组织炎症[3]。由于这种微生物是从泌尿系统排出体外的,所以对其在一些泌尿疾病如多囊肾、肾结石及慢性前列腺炎等的病理发生过程中的作用人们给予了极大的关注[4-6]。我们在前期研究中已经用通过鉴定纳米细菌的16S rRNA,证实纳米细菌与前列腺结石的发病存在一定的关系[7]。本研究应用细菌培养、钙染色和革兰染色、间接免疫荧光染色、透射电镜扫描(TEM)等方法对纳米细菌的形态学特征进行观察,进一步探讨其在前列腺结石中的分布情况。

1 材料与方法

1.1 对象选择

选择2006年11月至2007年3月在本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~

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,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,E-mail:shenxuecheng@126.com
通信作者:宋 波,电话:(023)68754186, E-mail: songb-mr@vip.sina.com
收稿日期:2007-09-14;修回日期:2007-11-20

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　主要仪器与试剂

OLYMPUS BX41 荧光显微镜(日本);PHILIPS TECNAI 10 透射电镜(荷兰);BECKMAN Avanti-J30i 离心机(美国);Thermo Forma 3111 温控 CO_2 培养箱(美国);RPMI1640 培养基购自北京 HyClone 公司;γ-FBS 购自美国 GIBCO 公司;Mouse monoclonal antibody 8D10 against Nanobacteria 购自芬兰 NANOBAC OY 公司;FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 购自北京鼎国生物公司。

1.3　细菌的分离培养

1.3.1　标本的处理　手术中无菌采取患者的结石标本,在 1 mol/L HCl 中浸泡 30 min,以去除矿物质,加入 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　细菌的培养　将沉淀加入 3 ml RPMI1640 培养基或含 10% 热灭活 γ-FBS 的 RPMI1640 培养基中悬浮,置于 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。每周观察并记录细菌的生长情况。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 作阴性对照。

1.4　细菌的鉴定

1.4.1　茜素红(钙染色)　取培养标本涂片固定,蒸馏水冲洗 3 遍,每遍 2 min;2% 茜素红 2S 染液染 2 ~ 5 min,蒸馏水速洗;0.2% 淡绿水溶液复染 20 ~ 30 s,0.5% 醋酸水溶液速洗;95% 乙醇和 100% 乙醇脱水,烘干后用二甲苯透明中性树胶封固,油镜观察。

1.4.2　革兰染色　取培养标本涂片固定,常规革兰染色,油镜观察。

1.4.3　间接免疫荧光染色　将培养标本 4 ℃离心 30 min(20 000 × g),弃上清,留取底部 0.5 ml 充分混匀,取 1 滴到玻片上,自然晾干,4% 多聚甲醛固定 15 min,水洗后在 70 ℃烤 10 min。滴加一抗(Mouse monoclonal antibody 8D10 against Nanobacteria,0.1 mg/ml),37 ℃孵育 60 min,PBS(pH 7.4)冲洗 2 min × 3 次。滴加二抗(FITC 标记山羊抗小鼠 IgG,0.03 mg/ml),37 ℃孵育 40 min,PBS(pH 7.4)冲洗 2 min × 3 次。80% 甘油封片,置于荧光显微镜下观察。用 PBS 替代 8D10 抗体作为阴性对照。

1.4.4　透射电镜扫描(负染法)　将培养标本用 2.5% 的戊二醛固定,细菌稀释液滴在有膜的铜网上,静置数分钟后,用滤纸尖吸掉,用 3% 磷钨酸染色 1 ~ 2 min ,置于 PHILPS TECNAI10 透射电镜下观察照相,工作电压 80 kV。

1.4.5　结果判定标准　Kajander 等[1,2] 通过电镜观察可见纳米细菌呈球状或球杆状,大小 100 ~ 500 nm,菌体周围有一层黑色的物质包绕;单克隆抗体间接免疫荧光染色可见阳性标本在高倍视野中呈绿色的杆状或球状颗粒分布。李永国等[8] 通过钙染色和革兰染色发现纳米细菌绝大多数聚集成簇,呈革兰阴性。

1.5　统计学处理

用 SPSS 11.0 统计软件进行 χ^2 检验。

2　结果

2.1　前列腺结石标本培养后的生长情况

培养 3 ~ 4 周后进行观察,发现部分培养管底部出现紧贴管壁生长的白色沉淀,而阴性对照培养后均未见白色沉淀物出现。根据管底有无白色沉淀出现和摇晃培养管后白色沉淀黏附于管底的情况,将培养的标本分为 4 组。生长情况见表 1。阴性对照培养后均未见白色沉淀物出现。

表 1　前列腺结石标本培养后的生长情况

组别	生长情况	标本数(例)
Ⅰ组	摇晃后完全呈絮状漂浮	4
Ⅱ组	摇晃后既有絮状漂浮物,又有部分白色物质黏附于管底	8
Ⅲ组	摇晃后白色物质完全黏附于管底	16
Ⅳ组	无沉淀出现	12

2.2　钙染色和革兰染色观察

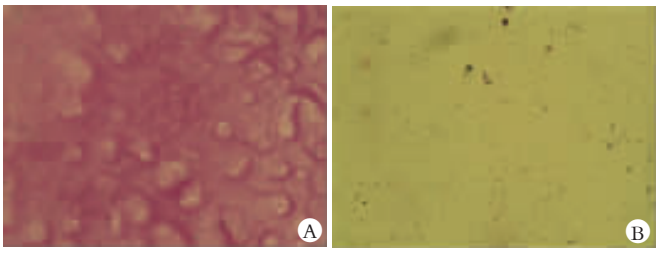
细菌绝大多数聚集成簇,呈革兰阴性,微小(图 1),初步判定所培养细菌为纳米细菌。

2.3　单克隆抗体间接免疫荧光染色鉴定

单克隆抗体间接免疫荧光染色后,培养的纳米细菌与小鼠的抗纳米细菌单克隆抗体 8D10 可以发生特异性结合,在荧光显微镜下可见阳性标本在高倍视野中呈绿色的杆状或球状颗粒分布(图 2)。结果发现 26 例结石标本中有纳米细菌存在,阳性率为 65.0%。其中Ⅰ + Ⅳ组中有 6 例,阳性率为 37.5%;Ⅱ + Ⅲ组中有 20 例,阳性率为 83.3%。两者间差异有统计学意义($\chi^2 = 8.86$, $P < 0.01$)。用 PBS 代替抗体 8D10 的阴性对照未观察到绿色荧光颗粒。其他对照组经染色后也均为阴性。

2.4　细菌在透射电镜下观察

细菌呈球状或球杆状,大小 100 ~ 500 nm,菌体周围有一层黑色的物质包绕,并有羟基磷灰石分布(图 3),依据判定标准可以确定所培养细菌即为纳米细菌。



A:钙染色(×1 000);B:革兰染色(×1 000)

图 1　油镜观察 NB 分布情况

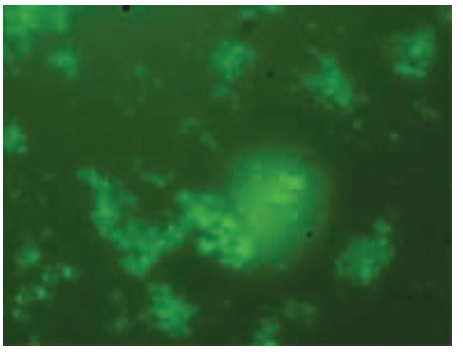


图 2　NB 的形态学观察　(免疫荧光 ×400)

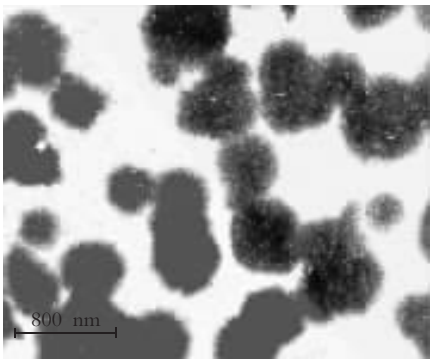


图3 负染法观察 NB （TEM）

3 讨论

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，国内外尚无报道。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，经过稀释、过滤、离心处理后，用细胞培养的方法进行纳米细菌培养，观察其生长情况，采用单克隆抗体间接免疫荧光染色进行纳米细菌鉴定。结果显示26例标本中存在着纳米细菌，阳性率为65.0％。其中培养管底部出现白色沉淀的标本，阳性率高达83.3%，明显高于无白色沉淀出现的标本。这说明培养过程中白色沉淀的出现是纳米细菌生长的一个重要的微生物特征，可以做为初步判断纳米细菌生长的一个评价指标。

本实验证明了前列腺结石中存在着纳米细菌。我们认为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。结合相关文献推测纳米细菌沿泌尿系统进入前列腺后，可能是由于以下机制形成结石：(1)纳米细菌所致炎症因素使前列腺组织中基质蛋白形成增加，而基质蛋白、炎症细胞及纳米细菌共同组成结石基质。基质形成后：①诱发或推动成核，抑制晶体生长和聚集；②提供表面生长点，使得矿化物形成一个有序结构；③使矿物质与有机物质连接形成结石。(2)纳米细菌可以充分利用周围环境中的磷酸盐和钙，通过机制未明的生物矿化作用合成磷灰石外壳，形成自身独特的生物膜，包裹自己并且以出芽的方式，新的纳米细菌不断加入形成新的矿化生物膜，借以逃避宿主的免疫攻击和药物杀伤，并为纳米细菌的增殖提供适宜的环境。矿化生物膜逐步增厚，形成以纳米细菌为核心的微结石。

既然证明了前列腺结石的发生与纳米细菌的感染存在一定的关系，在临床治疗中我们可根据纳米细菌的微生物特性，从清除纳米细菌入手来治疗前列腺结石，这就为前列腺结石的根治提供了一条崭新的道路。

人类已认识到微生物可以以多细胞形式存在，形成一个与环境相适应的“小社会”，并对细菌的增殖、抗药性、逃避宿主免疫攻击等生物学行为具有决定性影响。郭利君等[9]在研究感染性结石中尿素酶的活性时，发现在菌落生物膜中其活性最强，结石基质中次之，结石晶体中无活性。认为细菌由于生物膜的保护，抗生素很难奏效，且抗生素不能抑制细菌分泌尿素酶。提出要从根本上解决感染结石形成，必须研制开发能同时溶解结石基质和菌落生物膜的药物，再辅以有效抗生素才能从根本上解决感染性结石。这与新近开发出来的名为 Nanobac TX 的抗纳米细菌疗法的机制不谋而合。Nanobac TX 的抗纳米细菌疗法主要利用 EDTA（乙二胺四乙酸）螯合纳米细菌钙质外壳后，再用四环素杀灭失去保护壳的纳米细菌，已在动脉粥样硬化的临床试验中显示出显著的疗效，甚至可逆转病理性钙化[10]。

纳米细菌的研究是一个全新的领域，目前研究仍处于形态描述阶段，对纳米细菌的本质仍然认识甚少。纳米级生物其生命特征很可能与普通微生物有本质的不同，不宜用常规的观念来认识纳米细菌。下一步我们还将通过制作纳米细菌致前列腺结石的大鼠动物模型，并同时对部分模型给予抗纳米细菌药物干预，深入探讨纳米细菌在前列腺结石病中的病因作用，为该病的临床治疗提供新的病原学依据。

参考文献：

[1] Kajander E O, Ciftcioglu N, Aho K, *et al*. Characteristics of nanobacteria and their possible role in stone formation[J]. Urol Res, 2003, 31(2): 47-54.

[2] 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.

[3] Kajander E O, Ciftcioglu N, Miller-Hjelle M A, *et al*. Nanobacteria: controversial pathogens in nephrolithiasis and polycystic kidney disease [J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2001, 10(3): 445-452.

[4] Ciftcioglu N, Bjorklund M, Kuorikoski K, *et al*. Nanobacteria: an infectious cause for kidney stone formation[J]. Kidney Int, 1999, 56(5): 1893-1898.

[5] Conte-Visus A, Grases-Freixedas F, Costa-Bauza A, *et al*. Microinfections and kidney lithiasis[J]. Arch Esp Urol, 2001, 54(9): 855-860.

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

[7] 沈学成，杨 杰，饶贤才，等. 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[J]. 第三军医大学学报，2008，30(2)：124-126.

[8] 李永国，文 宇，杨竹林，等. 胆汁纳米细菌的培养与鉴定[J]. 中华医学杂志，2002，82(22)：1557-1560.

[9] 郭利君，秦 骏，何家扬，等. 感染结石中尿素酶的活性定位[J]. 中华实验外科杂志，1994，11(1)：37-38.

[10] Kajander E O, Aho K M, Maniscalco B S, *et al*. The pathogenesis of vascular calcification, new clinical diagnostic markers and a new curative nanobiotic treatment for reversing atherosclerosis in humans[J]. Medical Symposium, 2003, 24(3): 20-22.

（编辑 薛国文）