文章编号:1000-5404(2009)11-1005-04

论著

纳米细菌致Ⅲ型前列腺炎的实验研究

明爱民,沈学成,周占松,宋 波 (第三军医大学西南医院全军泌尿外科研究所,重庆 400038)

摘 要:目的 研究纳米细菌(nanobacteria, NB)对大鼠前列腺的慢性致炎作用。**方法** 成年雄性SD大鼠40只,分为3组:对照组、模型组、四环素治疗组,分别为16、16、8只。模型组和四环素治疗组由尿道逆行注入NB建立大鼠动物模型。4周后,对照组、模型组各处死8只动物,观察前列腺组织中白细胞、卵磷脂小体及病理变化。治疗组用四环素灌胃治疗,其余动物用蒸馏水灌胃,连续4周,处死剩余动物,进行同样的观察。并将所有动物前列腺组织进行NB再分离、培养和鉴定。**结果** 同对照组比较,4周后所有模型组动物前列腺组织呈慢性炎症改变,白细胞数明显升高,卵磷脂小体数明显下降($P<0.05$)。8周后同模型组比较,治疗组动物炎症明显减轻,白细胞数明显下降,卵磷脂小体数明显升高($P<0.05$)。模型组16只动物NB培养均阳性,对照组均阴性。**结论** NB能引起大鼠前列腺慢性炎症,NB可能是Ⅲ型前列腺炎的病因。四环素抗NB治疗有效。

关键词: 纳米细菌;慢性前列腺炎;大鼠;四环素
中图法分类号: R-332; R378; R697.33 **文献标识码:** A

Nanobacteria induces Type Ⅲ prostatitis in rats

MING Ai-min, SHEN Xue-cheng, ZHOU Zhan-song, SONG Bo (Urology Surgery Research Institute, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the chronic inflammation causing effect of nanobacteria (NB) on the prostates of SD rats, and to provide experiment evidence for etiology of type Ⅲ prostatitis. **Methods** Forty adult, male rats were divided into model group (16 rats), treatment group (8 rats) and control group (16 rats) at random. The rats in model group and treatment group were reproduced by infusing NB suspension transurethrally, and the animals of control group received an infusion of normal saline. After 4 weeks, WBC, lecithine and pathological changes of prostates were observed in model group (8 rats) and control group (8 rats). Tetracycline (100 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$) was administered to treatment group, and distilled water were given to other groups respectively for 4 weeks. Then all rats were sacrificed, and the same detections were done as before. NB from prostates of animal were re-isolated, cultured and identified. **Results** After 4 weeks, chronic inflammation were observed in model group. WBC became significantly higher and lecithine of prostates were lower in model group than in control group ($P<0.05$). After 8 weeks, relieved chronic inflammation, decreased WBC and increased lecithine of prostates were observed in treatment group comparing with model group. There was significant difference in model group with control group and treatment group ($P<0.05$), and no difference was seen between control group and treatment group ($P>0.05$). The positive cases of NB were 16 in model group, and none in control group. **Conclusion** Nanobacteria causes chronic inflammation in SD rat prostates. NB maybe the etiological agent of type Ⅲ prostatitis. Anti-NB treatment by tetracycline is effective for this inflammation.

Key words: nanobacteria; chronic prostatitis; rats; tetracycline

Ⅲ型前列腺炎发病率高,但病因未明[1]。最近Zhou等[2]报道从Ⅲ型前列腺炎患者前列腺液中分离并培养出了纳米细菌(nanobacteria,NB),认为NB可能是其发病的重要原因。这一发现为Ⅲ型前列腺炎病因提供了一条思路。为进一步证实NB在Ⅲ型前列腺炎可能的病因学作用,我们将从该类患者前列腺液中

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: 明爱民,男,湖北省广水市人,博士研究生,主要从事前列腺炎病因学方面的研究。E-mail: ming_aimin@yahoo.com.cn
通信作者: 宋 波,电话:(023)68754186,E-mail: songb-mr@vip.sina.com
周占松,电话:(023)68754186,E-mail: zhongzhansong@sohu.com
收稿日期: 2009-03-11;**修回日期:** 2009-04-03

分离培养的 NB 感染 SD 大鼠前列腺,观察其病理变化,并进行干预治疗和 NB 的再培养,依据 Koch 三原则,用动物实验为Ⅲ型前列腺炎病因学研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 NB 的培养

按照 Zhou 等[2]的方法从Ⅲ型前列腺患者的前列腺液中分离、培养的 NB 配成 1 个标准麦氏单位的悬浮菌液。

1.2 实验动物及分组

雄性 SD 大鼠 40 只,体质量 250 ~ 300 g,清洁级,由第三军医大学实验动物中心提供。分为对照组、模型组及治疗组,分别为 16、16 只和 8 只。

1.3 动物模型制作及标本的获取

按照 Nickel 等[3]以前描述制作慢性细菌性前列腺炎的方法进行。模型组和治疗组动物用乙醚麻醉后,70% 酒精消毒尿道外口,随后插入无菌润滑聚乙烯尿管。一个胰岛素注射器抽吸 0.2 ml 提前配制的 NB 悬浮液注入雄性 SD 大鼠前列腺部尿道。对照组 SD 大鼠用同样方法注入生理盐水。常规饲养 4 周,在对照组和模型组中各取 8 只,断脊处死,无菌条件下取前列腺标本备用,其余继续饲养 4 周。治疗组按每次四环素 100 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$溶解在 2 ml 生理盐水给予胃饲治疗,连续 4 周。然后将 3 组动物同法处死,取标本备用。

1.4 动物前列腺组织中 NB 的再分离、培养与鉴定

将在无菌条件下切取动物相同部位的前列腺组织,制成匀浆混匀,在稀释、滤过和离心预处理后,按 Zhou 等[2]以前描述的方法培养,利用间接免疫荧光法进行鉴定。一抗用抗 NB 的鼠单克隆抗体 8D10 (NanoBac Oy 公司),二抗是结合了异硫氰酸荧光素山羊抗鼠 IgG (American Qualex 公司)。PBS 替代 8D10 作为一抗用作阴性对照。

1.5 前列腺组织白细胞数和卵磷脂小体计数

将在无菌条件下切取动物相同部位的前列腺组织剪碎,取 50 mg,按每毫克前列腺组织加生理盐水 4 μl,剪碎,充分混匀。取试管 1 支,加白细胞稀释液 0.38 ml,用移液器准确吸取上述制备好的标本 20 μl,于试管稀释液底部轻轻放出,吹打 3 次混匀,充池,用低倍镜计数四角 4 个大方格内的白细胞总数。白细胞数(L^{-1}) =4 个大方格内的白细胞数/4 × 20 × 10^7;卵磷脂小体密度按同样方法计算。记录镜下白细胞数和卵磷脂小体密度。

1.6 电镜观察

切取实验动物的前列腺组织,一部分置于 2.5% 戊二醛中固定切片,在有膜的铜网上,用 3% 磷钨酸染色 1 ~ 2 min,置于透射电镜下观察。

1.7 光镜观察

将每组动物剩余的前列腺组织块,置于 10% 的福尔马林中固定,脱水,石蜡包埋后切片。脱蜡后 HE 染色。

1.8 免疫组化法鉴定前列腺组织中 NB

无水乙醇、乙醚混合液(1∶1) 固定前列腺石蜡切片,采用鼠抗 SABC 试剂盒(购自武汉博士德公司)行免疫组化染色,高倍镜下组织中微小的棕黄至黄褐色杆状或球状颗粒为 NB。

1.9 统计学分析

采用 SPSS 11.5 统计软件对数据进行处理,对计量资料用方差分析。

2 结果

2.1 动物感染及 NB 再培养阳性情况

通过对不同时段的动物标本进行病检和 NB 再培养,发现对照组中无慢性炎症改变,组织再培养无 NB 生长。模型组动物在感染 NB 4、8 周后 16 只均发生慢性炎症改变,并有 NB 生长。治疗组中有 6 只发生慢性炎症改变和 NB 生长。见表 1。

表 1 不同时间点动物感染及 NB 再培养阳性情况(n =8)

时间		感染数	感染率(%)	NB 阳性数	NB 阳性率(%)
4 周	对照组	0	0	0	0
	模型组	8	100	8	100
8 周	对照组	0	0	0	0
	模型组	8	100	8	100
	治疗组	6	75	6	75

2.2 各组动物前列腺组织中白细胞和卵磷脂小体数的比较

通过对 4 周和 8 周前列腺组织中白细胞和卵磷脂小体数的检测,发现 4 周后模型组白细胞数比对照组明显升高,卵磷脂小体数比对照组明显降低($P < 0.05$);8 周后模型组白细胞数比对照组和治疗组明显升高,卵磷脂小体数比对照组和治疗组明显降低($P < 0.05$,表 2)。

表 2 不同时间点前列腺组织中白细胞数和卵磷脂小体数的比较
(L^{-1}, n =8, $\bar{x} \pm s$)

时间		白细胞数	卵磷脂小体数
4 周	对照组	19.50 ± 9.57[a]	27.86 ± 2.94[a]
	模型组	36.61 ± 8.43	18.26 ± 5.35
8 周	对照组	19.36 ± 8.94[a]	27.54 ± 2.87[a]
	模型组	35.43 ± 9.02	19.48 ± 2.64
	治疗组	20.32 ± 8.99[a]	26.41 ± 2.25[a]

a: $P < 0.05$,与模型组比较

2.3 前列腺组织光镜观察

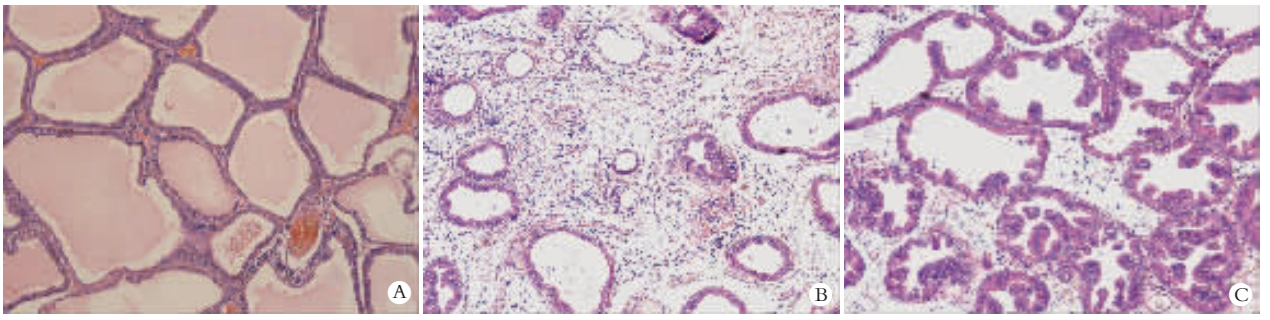
对照组前列腺腺泡大小规则,间质薄。腺上皮立方或柱状,排列整齐,腺腔内有粉染分泌物,未见水肿和炎性细胞浸润(图 1A)。感染后 4 周,前列腺组织前列腺腔失去正常结构,上皮呈乳头状增生,突入腺腔,腺腔缩小,腔内见炎性细胞。间质血管扩张充血,有明显纤维组织增生和多量淋巴细胞浸润,呈慢性炎症改变(图 1B)。治疗组大鼠前列腺腺泡上皮呈乳头状增生程度、间质水肿,淋巴细胞浸润较模型组明显减轻(图 1C)。

2.4 前列腺组织透射电镜观察

TEM 观察对照组腺上皮细胞内无变化(图 2A)。模型组见细胞内线粒体、溶酶体肿胀,2 万倍下可见前列腺细胞质内有较多球形和球杆状颗粒,断面为圆形或卵圆形的 NB 类似物,其周围组织呈透明、空泡状改变(图 2B)。

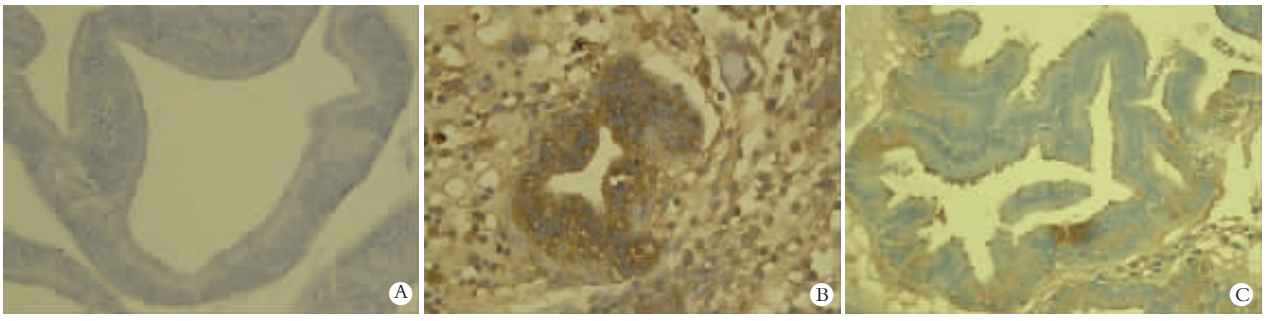
2.5 免疫组化观察前列腺组织中 NB

经单克隆抗体标记后,NB 在 200 倍光镜呈细小的黄褐色或棕黄色颗粒。模型组中前列腺腺腔内、上皮细胞间及组织间隙内可见多量的黄褐色或棕黄色颗粒,有的呈团块状,有的均匀分布,数量多。治疗组中也有黄褐色或棕黄色颗粒存在,但较模型组明显减少。对照组中未见(图 3)。



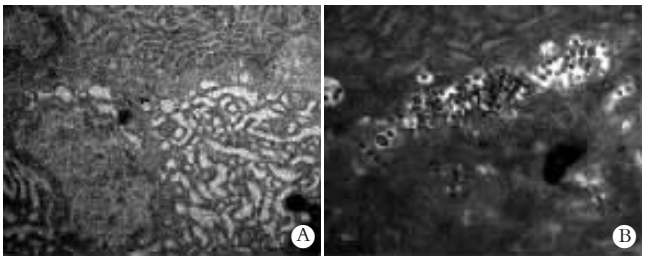
A:对照组;B:模型组;C:治疗组

图 1　前列腺组织病理学观察　(HE ×100)



A:对照组;B:模型组;C:治疗组

图 3　免疫组化染色观察前列腺组织中纳米细菌的表达　(SABC ×200)



A:对照组;B:模型组

图 2　前列腺组织超微结构观察　(TEM ×20 000)

3　讨论

NB 广泛存在于自然界的矿物质中,易造成人类感染[4]。已证实 NB 存在于血液、尿和其他许多器官组织中[5]。体内感染的 NB 主要经尿液排除[6],排尿时尿道高压可引起尿液返流进入前列腺导管和腺胞内,在此过程中,尿液中的 NB 容易被伴随转移,进入前列腺内[7-9],并寄生在其中。这可能在 NB 感染前列腺过程中发挥主要和积极的作用[2]。

在实验中我们用Ⅲ型前列腺炎患者前列腺液中分离培养出的 NB,模拟 NB 在泌尿生殖系可能的自然感染途径,由大鼠尿道逆行加压注入,感染前列腺。因为 NB 繁殖相对缓慢,我们适当加大了 NB 的浓度,分别在不同的时间点处死动物,收集标本。病理结果显示在感染 4 周后,模型组 16 只均出现慢性炎症改变,感染率达 100%,对照组无感染病例。这同 Nickel 等[3]报道的大肠杆菌的结果相近。另外在 TEM 超微结构下观察到细胞质内有聚集的球状或杆状 NB 存在,周围出现空泡状、透明样结构,同文献[10,11]报道的 NB 感染体外细胞及在体肾脏的病理损害相同。而对照组无任何改变。

前列腺慢性炎症常规会引起前列腺内白细胞升高,卵磷脂小体减少。动物实验结果表明,模型组感染 NB 后 4 ~8 周,前列腺组织中白细胞数比对照组持续升高,卵磷脂小体数持续降低,且差异有统计学意义($P<0.05$),与常规检查结果相同。以上结果表明 NB 感染大鼠前列腺后的确能引起慢性炎症反应。

为进一步验证 NB 在Ⅲ型前列腺炎中可能的病因学作用,根据 Koch 关于病因学三原则理论,我们对模型组和对照组动物前列腺组织进行了 NB 的再培养鉴定。结果模型组 16 只动物 NB 培养均阳性,对照组全部阴性。综合从细菌的提取、感染致病到细菌再培养的结果完全符合 Koch 理论,因此我们推测 NB 可能是Ⅲ型前列腺炎的一个重要病因,在其发生、发展中发挥着重要作用。

研究发现,在体外培养的 NB 上加入四环素,能在 NB 外壳上沉积并穿透钙化外壳发挥抗菌作用[12]。临床上 Shoskes 等[13]和 Zhou 等[2]在Ⅲ型前列腺炎患者中利用四环素进行抗 NB 诊断治疗,发现患者临床症状均明显改善,前列腺液中 NB 的阳性率明显下降,取得了良好的疗效。但以上只是临床报道,没有进一步的动物实验来证实。本实验中对感染动物用四环素治疗进行干预,治疗 4 周后,同模型组比较,治疗组动物

前列腺炎症感染例数和 NB 培养的阳性例数下降,慢性炎症程度明显减轻。同时组织中白细胞数明显减少,卵磷脂小体明显增多,差异有统计学意义($P<0.05$),这同上述临床报道相似。另外免疫组化的结果也发现治疗后组织中棕黄色的 NB 数量明显减少。这些结果均有力地证明四环素治疗 NB 感染的有效性。

总之,我们的实验为Ⅲ型前列腺炎病因学研究和指导临床治疗提供了一个动物实验的依据。但Ⅲ型前列腺炎病因复杂,要完全彻底阐明其病因还需要更广泛、更深入的临床和动物实验研究。

参考文献:

[1] Bartoletti R, Mondaini N, Pavone C, *et al*. Introduction to chronic prostatitis and chronic pelvic pain syndrome (CP/CPPS)[J]. Arch Ital Urol Androl, 2007, 79(2): 55-57.

[2] Zhou Z, Hong L, Shen X, *et al*. Detection of nanobacteria infection in type Ⅲ prostatitis[J]. Urology, 2008, 71(6): 1091-1095.

[3] Nickel J C, Olson M E, Barabas A, *et al*. Pathogenesis of chronic bacterial prostatitis in an animal model[J]. Br J Urol, 1990,66(1): 47-54.

[4] 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.

[5] Wood H M, Shoskes D A. The role of nanobacteria in urologic disease [J]. World J Urol, 2006, 24(1): 51-54.

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

[7] Barbalias G A, Nikiforidis G, Liatsikos E N. Alpha-blockers for the treatment of chronic prostatitis in combination with antibiotics[J]. J Urol, 1998, 159(3): 883-887.

[8] Barbalias G A. Clinical and therapeutical guidelines for chronic prostatitis. from bacteriological importance to neuromuscular considerations [J]. Eur Urol, 2000, 37(1): 116-117.

[9] Barbalias G A. Prostatodynia or painful male urethral syndrome? [J]. Urology, 1990, 36(2): 146-153.

[10] Ciftcioglu N, Kajander E O. Interaction of nanobacteria with cultured mammalian cells[J]. Physiopathology, 1998, 4(3): 259-270.

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

[12] 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.

[13] Shoskes D A, Thomas K D, Gomez E. Anti-nanobacterial therapy for men with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome and prostatic stones: preliminary experience[J]. J Urol, 2005, 173(2): 474-477.

(编辑 王 红)

(上接1001页)

育;⑥~⑧EGb + AOPP-BSA 组:分别用 50、100、150 μg/L EGb 加3 mmol/L AOPP-BSA;⑨SOD + AOPP-BSA 组:用 200 U/ml SOD 加 AOPP-BSA;⑩L-精氨酸 + AOPP-BSA 组:3 mmol/L L-精氨酸加 AOPP-BSA;⑪ SOD + L-精氨酸 + AOPP-BSA 组。

1.3.2 银杏叶提取物和 AOPP-BSA 对血管组织 MDA 的影响

分5组,每组8个血管环(长2 cm)。①正常对照组;②BSA 对照组(3 mmol/L);③AOPP-BSA 组(3 mmol/L);④EGb + AOPP-BSA 组(AOPP-BSA + 150 μg/L EGb);⑤EGb 对照组(150 μg/L)。

1.4 统计学分析

数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间的比较用单因素方差分析,由 SPSS 11.0 统计软件完成。

2 结果

血管环与高浓度 AOPP-BSA 孵育 90 min 后最大舒张比(E_{max})较正常组明显减小[分别为(43.6 ± 6.8)%、(93.2 ± 7.3)%,$P<0.01$]。与高剂量 AOPP-BSA 组相比,100、150 μg/L EGb 能明显降低 AOPP-BSA 对 EDR 反应的抑制[(63.9 ± 5.5)% *vs*(43.6 ± 6.8)%,$P<0.05$;(83.6 ± 6.0)% *vs*(43.6 ± 6.8)%,$P<0.01$]。与高剂量 EGb + AOPP-BSA 组[(83.6 ± 6.0)%]比较,SOD[(70.2 ± 5.9)%]或 L-精氨酸[(63.5 ± 5.7)%]只能部分降低 AOPP-BSA 对血管环 EDR 反应的抑制($P<0.05$),但两者同时应用则比单独应用显著降低 AOPP-BSA 对 EDR 反应的抑制[(86.1 ± 6.6)%,$P<0.01$]。与正常组[(4.3 ± 0.5) nmol/mg]比较,AOPP-BSA 组血管组织 MDA 含量显著增加[(7.6 ± 1.0) nmol/mg,$P<0.01$]。经 EGb 处理后,与 AOPP-BSA 组比较,MDA 含量明显下降[(5.4 ± 0.8) nmol/mg,$P<0.01$]。

3 讨论

本研究表明 AOPP-BSA 可明显抑制 ACh 诱导的 EDR 反应,而同浓度 BSA 对 ACh 诱导的 EDR 反应没有影响;EGb 可逆转 AOPP-BSA 诱导的内皮功能损害。此外,L-精氨酸或 SOD 只能部分逆转 AOPP-BSA 诱导的内皮舒张功能损伤,而两者同时应用才可得到与 EGb 相似的保护作用。且 AOPP-BSA 可使血管组织中 MDA 含量明显升高,而 EGb 则能降低 MDA 水平。由此表明氧自由基的产生增加和 NO 的合成减少可能是 AOPP-BSA 损伤血管内皮的部分机制,EGb 可能因清除氧自由基,抗氧化活性和促进 NO 的合成而可有效的保护损伤的血管内皮。

EGb 是从银杏叶中提取的天然活性物质,含有二萜内酯和黄酮苷等化学成分,本实验结果表明 EGb 能明显改善 AOPP-BSA 对大鼠离体胸主动脉 EDR 反应的损害,减少血管组织中 MDA 含量。综上所述,EGb 的保护作用可能与清除氧自由基、抗氧化及减少 NO 的灭活有关。

关键词:银杏叶提取物;蛋白氧化终产物;内皮依赖性舒张;超氧化物歧化酶;一氧化氮

中图法分类号:R965 **文献标识码**:B

参考文献:

[1] Descamps-Latscha B, Witko-Sarsat V, Nguyen-Khoa T, *et al*. Advanced oxidation protein products as risk factors for atherosclerotic cardiovascular events in nondiabetic predialysis patients[J]. Am J Kidney Dis, 2005, 45(1): 39-47.

(编辑 栾 嘉)