

• 临床研究 •

上尿路结石患者血清、尿液、结石中纳米细菌的检测\*

粟宏伟,朱永生,邓清富,陈同良  
(泸州医学院附属医院泌尿外科,四川泸州 646000)

**摘要:**目的 检测上尿路结石患者与健康者的血清、尿液里纳米细菌和尿路结石标本里的纳米细菌感染情况,分析纳米细菌在尿路结石形成中的作用。方法 对 30 例健康者和 42 例上尿路结石患者的血清、尿液标本以及后者的结石标本处理后用含 10% 热灭活  $\gamma$ -胎牛血清( $\gamma$ -FBS)的 PMBI 1640 培养基行纳米细菌培养,观察其生长情况,并对培养后的标本行聚合酶链反应(PCR)检测,PCR 产物通过测序与原序列比对进一步分析。结果 培养 4~6 周后,部分培养管底出现肉眼可见的白色(或黄色)絮状物或沉淀物。PCR 检测结石患者与健康者的血清纳米细菌阳性率分别为 90.4% 和 6.7%,尿液中二者的纳米细菌阳性率分别为 92.8% 和 6.7%,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。纳米细菌在上尿路结石中的阳性率为 95.2%。碱基测序结果与原序列比对,吻合率高达 98.72%。结论 纳米细菌广泛存在于上尿路结石患者的血清、尿液与结石中,提示纳米细菌可能是上尿路结石形成的重要因素。

**关键词:** 纳米细菌;上尿路结石;聚合酶联反应

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.31.011

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)31-3754-03

Detection of nanobacteria in serum,urine and calculus of patients with upper urinary calculi\*

Su Hongwei,Zhu Yongsheng,Deng Qingfu,Chen Tongliang

(Department of Urology,the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College,Luzhou,Sichuan 646000,China)

**Abstract:** Objective To investigate the infection status of nanobacteria on patients with upper urinary calculi and healthy subjects, and analyze the role of nanobacteria in the formation of upper urinary calculi. **Methods** The serum,urine and calculus of 42 patients with upper urinary calculi were investigated by polymerase chain reaction (PCR) and by bacteria cultivation with 10%  $\gamma$ -FBS and PMBI 1640. The resulting PCR products were sequenced for further comparison with the reported sequence in gene bank. The serum and urine from 30 healthy adults were used as controls. **Results** After 4 to 6 weeks' culture, the white or yellow precipitate was visible at the bottom of the tube. The positive rate of PCR was 90.4% in calculous patients urine and 6.7% in healthy adults urine, as the positive was 92.8% and 6.7% in serum, which there is significant difference ( $P<0.01$ ). The positive rate of the nanobacteria in urinary calculi was 95.2%. The coincidence rate was 98.72% between the PCR products and the reported sequence in gene bank. **Conclusion** Nanobacteria are widely existed in the serum,urine and calculus of the patients with upper urinary calculi, this indicate that the nanobacteria might be have the most important influence on the formation process of urinary calculi.

**Key words:** nanobacteria; upper urinary calculi; polymerase chain reaction

纳米细菌为芬兰科学家 Kajander 等<sup>[1]</sup>发现,近年来的研究发现,纳米细菌与人体骨骼外钙化性疾病密切相关<sup>[2-3]</sup>。本研究采用哺乳细胞培养条件下培养和聚合酶链反应(PCR)检测等法观测上尿路结石患者的血液、尿液、结石以及健康人尿液、血液中纳米细菌的感染情况。

1 资料与方法

**1.1 一般资料** 健康者男 12 例,女 18 例,平均年龄(38.2±15.3)岁,来源于门诊健康体检者,血清与尿液标本各 30 份。上尿路结石患者 42 例,男 23 例,女 19 例,平均年龄(42.6±17.3)岁;其中肾结石 25 例,输尿管结石 17 例,结石来源于手术取石或体外震波碎石。

**1.2 血清与尿液处理** 将无菌条件下获得的尿液 2 mL 用生理盐水稀释 5 倍,离心 45 min(14 000×g);取管底 2 mL 混匀,以 0.45  $\mu$ m 滤纸过滤后,再以生理盐水稀释 5 倍,离心 45 min(14 000×g);取管底 1 mL 液体充分混匀后,经 0.22  $\mu$ m 的滤纸加压过滤。静脉血液 3 mL,分离获得血清后,经 0.22  $\mu$ m 的

滤纸加压过滤,收集备用。

**1.3 结石处理** 将结石放置于 1 mol/L HCl 中去矿物质处理,然后磷酸盐缓冲液(PBS)中和、洗涤;高速离心 15 min;将沉淀物加入 PMBI 1640 培养基混匀,经 0.22  $\mu$ m 的滤纸加压过滤,收集滤过液备用。

**1.4 纳米细菌的培养** 取处理后的血清、尿液、结石的滤过液 1 mL 加入含 10% 热灭活  $\gamma$ -胎牛血清( $\gamma$ -FBS)的 PMBI 1640 培养基中培养 4~6 周,培养条件为 37  $^{\circ}$ C、pH7.4、5% CO<sub>2</sub> 和 95% 空气。以等量经 0.22  $\mu$ m 的滤纸过滤的生理盐水、 $\gamma$ -FBS 和 PMBI 1640 在相同条件下培养作为阴性对照。

**1.5 纳米细菌的鉴定** (1)每周观察培养液的变化情况,看有无白色絮状物或沉淀物形成,从而确定有无纳米细菌生长;(2)从 NCBI 基因库搜索到纳米细菌的基因序列,编号 X98419,来源于超滤的血液以及血液制品,将该序列进行 BLAST 比对,发现该基因在与其他不同来源的基因有较大的相似性,于是作者采用差异较大部分分段合成引物(上海博亚),上游引物为

\* 基金项目:四川省卫生厅资助项目(100288)。 作者简介:粟宏伟(1973~),副教授,硕士,主要从事泌尿系结石研究。

PrimerA(1-21):5'-AAC GAA CGC TGG CGG CAG GCT-3'; PrimerB(529-549):5'-AGG GCT CAA CCC CGG AAC TGC-3';下游引物为 PrimerC(1284-1304):5'-GGC CCG GGA ACG TAT TCA CCG-3';PrimerD(1386-1406):5'-CAC CCC AGT CGC TGA CCC TAC-3'。取培养液用 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤,以过滤液作为模板,分段进行 PCR,共 4 个反应。PrimerA 与 PrimerC、PrimerA 与 PrimerD、PrimerB 与 PrimerC、以及 PrimerB 与 primerD。反应体系如下:上下游引物各 1  $\mu$ L,buffer 3  $\mu$ L,MgCl<sub>2</sub> 2  $\mu$ L,Taq 酶(Takara) 1  $\mu$ L,H<sub>2</sub>O 22  $\mu$ L,总体系 30  $\mu$ L。将产物进行凝胶电泳,并将产物送测序,将测序结果与原基因通过 Jellyfish 进行比对。

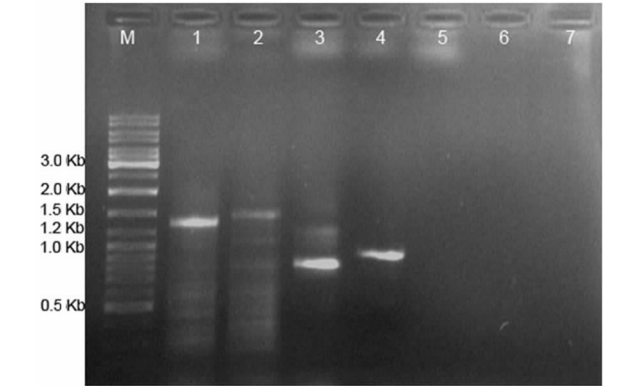
1.6 统计学处理 统计软件为 SPSS11.5。计数资料采用  $\chi^2$  检验,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 培养液观察结果 培养液观察 4~6 周后,健康者的血清、尿液培养管各有 1 例(3.33%)出现附于管底的白色沉淀物。42 例上尿路结石患者的血清培养管中,有 28 例(66.7%)出现肉眼可见的白色(黄色)絮状物或沉淀物,尿液培养管中有 31 例(73.8%)出现白色(黄色)絮状物或沉淀物,结石标本培养管中有 36 例(85.7%)出现白色或黄色絮状物或沉淀物。而对照的生理盐水、 $\gamma$ -FBS 和 PMBI 1640 组中均无白色(黄色)絮状物或沉淀物出现。对于出现白色絮状物或沉淀物的标本经常规染色在普通显微镜下均未见细菌或真菌。见图 1。



图 1 结石患者尿液培养 6 周后结果



M:maker;1:AC 引物扩增片段;2:AD 引物扩增片段;3:BC 引物扩增片段;4:BD 引物扩增片段;5~7:以对照组培养产物作为模版扩增,无目的片段。

图 2 PCR 法检测纳米细菌

2.2 PCR 检测 健康者的血清、尿液的纳米细菌的阳性率均

为 6.7%;上尿路结石患者的血清、尿液和结石纳米细菌的阳性率分别为 90.4%、92.8%和 95.2%。纳米细菌在健康者和上尿路结石患者中的阳性率差异有统计学意义( $P<0.01$ )。所有在培养瓶底出现沉淀物的标本 PCR 检测均为阳性,亦有部分无肉眼可见沉淀物出现的标本 PCR 检测为阳性。见图 2。

2.3 碱基测序 将引物 A、C 扩增出的 PCR 产物直接连接到 T 载体上,通过蓝白斑筛选白斑克隆,提取质粒电泳,PCR 验证后送测序,测序结果显示,从尿结石培养物中获得的 PCR 产物与基因 BANK 的序列 X98419 用软件 Jellyfish 进行比对,碱基序列与报告序列高度吻合,吻合率高达 98.72%。见图 3、4。

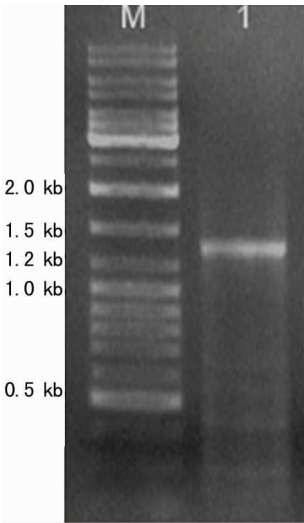


图 3 PCR 鉴定重组质粒

	221	231	241	251	261	271	281
5'	CTGCGGGT	TGCTGCCACTGT	CACCACCATTTAG	CACGTGTGTAG	CCAGCCCGTA	AAGGCAAT	
X98419	CTGCGGGT	TGCTGCCACTGT	CACCACCATTTAG	CACGTGTGTAG	CCAGCCCGTA	AAGGCAAT	
Consensus	ctgcgggt	tgctgccactgt	caccacccattgt	agcacgtgtgtag	ccagcccgta	aaggcaat	
	331	341	351	361	371	381	391
5'	AGTCCCTTAGAGT	GCCCAACTGAAT	GATGGCACTA	AGGGCGAGGGT	TGCGCTGTTG	CGGGACT	
X98419	AGTCCCTTAGAGT	GCCCAACTGAAT	GATGGCACTA	AGGGCGAGGGT	TGCGCTGTTG	CGGGACT	
Consensus	agtcccttagagtg	cccaactgaatg	atgggcaacta	agggcgaggggt	tgcgctgttg	cgggact	
	441	451	461	471	481	491	501
5'	CCTGTACDGGAT	CAGCCTAACTGA	AGGAACCATCTCT	GTAACDGGAT	CGGGATGTC	CAAGGGC	
X98419	CCTGTACDGGAT	CAGCCTAACTGA	AGGAACCATCTCT	GTAACDGGAT	CGGGATGTC	CAAGGGC	
Consensus	cctgtaccgatcag	cctaactga	aggaaccatctct	gtaacdgcat	cgggatgtc	caagggc	

图 4 测序结果与基因 BANK 提供的序列比较

3 讨 论

泌尿系结石是泌尿外科的常见病之一,我国泌尿系结石发病率为 1%~5%,南方高达 5%~10%,其中 25%的患者需住院治疗,严重威胁患者的健康<sup>[4]</sup>。结石的发生机制有很多学说,但目前尚无定论。纳米细菌具有独特的矿化能力,具有明显的促成核作用,在体内可能诱导钙化和促进结石的形成<sup>[5-6]</sup>。近年来的研究发现纳米细菌有肾趋向性和细胞毒性,可致肾慢性感染、肾小管上皮细胞损害凋亡等,从而诱发形成肾结石,这可能是肾结石形成的一种重要的危险因素和机制<sup>[6-9]</sup>。国内于澄钺等<sup>[10]</sup>亦研究发现纳米细菌损伤细胞后,细胞的晶体黏附性明显增强,随损伤作用时间的延长,细胞与一水草酸钙晶体的黏附量也会相应地增加。

纳米细菌是已知最小的细菌,常规检测方法难以发现,细菌培养有助于发现纳米细菌,但其无法在普通微生物培养条件

下倍增,而在哺乳细胞培养条件下却能繁殖<sup>[11-12]</sup>。作者采用 Ciftcioglu 等<sup>[7]</sup>介绍的方法和培养条件分别对上尿路结石患者的血清、尿液、结石和健康者的血清、尿液进行培养,在 4~6 周后,部分培养管里陆续出现白色(黄色)的絮状物,其中部分管底附有白色(黄色)沉淀,而生理盐水、 $\gamma$ -FBS 和 PMBI 1640 对照组则未出现。所有出现白色(黄色)的絮状物或附有白色(黄色)沉淀的样本,随后的 PCR 检测均为阳性,证实了特殊环境的培养,是鉴定纳米细菌的重要方式之一。但其所需时间较长,临床使用不便,故需进一步改进方法或结合其他方式来缩短鉴定周期。

在纳米细菌的进一步鉴定方面,作者根据 NCBI 基因库里纳米细菌的基因序列(X98419)设计了相应引物,对培养液进行 PCR 检测,将 PCR 产物进行测序比对的结果显示,与基因库里纳米细菌的序列吻合率达 98.72%,证实了 PCR 产物即是纳米细菌,说明 PCR 检测纳米细菌是可行的,这与国内外的一些学者研究结果相似<sup>[13-14]</sup>。但也有学者未能扩增出目标序列,这可能与引物设计缺乏特异性或标本处理不当等有关。PCR 检测发现健康者血清的纳米细菌的阳性率为 6.7%,这与国内王学军等<sup>[15]</sup>采用酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测的结果相近,但明显低于上尿路结石患者的血清、尿液和结石纳米细菌 90.4%、92.8%、95.2%的阳性率。结石患者血清、尿液和结石中的高阳性率提示纳米细菌在上尿路结石形成中具有重要的作用,以至于 Kajander 等<sup>[6]</sup>推论肾结石的形成是由纳米细菌感染造成的,就像幽门螺旋杆菌导致消化性溃疡一样,起始因素为细菌感染,内源性的因素和饮食环境因素影响它们的进展。但其具体的机制和更多的证据尚需要进一步研究发现,下一步作者准备构建纳米细菌致上尿路结石的动物模型,深入研究纳米细菌在结石形成中的具体作用。

参考文献:

[1] Kajander EO, 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] Cisar JO, Xu DQ, Thompson J, et al. An alternative interpretation of Nanobacteria induced biomineralization[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(2): 1511-1515.

[3] Guo Y, Zhang D, Lu H, et al. Association between calcifying anoparticles and placental calcification [J]. *Int J Nanomedicine*, 2012, 13(7): 1679-1686.

[4] 那彦群. 中国泌尿外科疾病诊断治疗指南[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 166-167.

[5] Jelic TM, Chang HH, Roque R, et al. Nanobacteria-associated calcific aortic valve stenosis[J]. *Heart Valve Dis*, 2007, 16(1): 101-105.

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

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

[8] Shiekh FA, Khullar M, Singh SK. Lithogenesis; induction of renal calcifications by nanobacteria[J]. *Urol Res*, 2006, 34(1): 53-57.

[9] Hadley MW, Daniel AS. The role of nanobacteria in urologic disease[J]. *World J Urol*, 2006, 24(2): 51-54.

[10] 于澄钊, 黄晓波, 陈亮, 等. 纳米细菌对肾小管上皮细胞的损伤及晶体滞留的影响[J]. *北京大学学报: 医学版*, 2010, 42(4): 436-442.

[11] Khullar M, Sharma SK, Singh SK, 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.

[12] Barr SC, Linke RA, Janssen D, et al. Detection of biofilm formation and nanobacteria under long-term cell culture conditions in serum samples of cattle, goats, cats, and dogs[J]. *Am J Vet Res*, 2003, 64(2): 176-182.

[13] 唐金元, 周占松, 沈学成, 等. III型前列腺炎纳米细菌快速检测方法研究及临床评价[J]. *第三军医大学学报*, 2011, 33(6): 608-610.

[14] Kim TH, Kim HR, Myung SC. Detection of nanobacteria in patients with chronic prostatitis and vaginitis by reverse transcriptase polymerase chain reaction[J]. *Korean J Urol*, 2011, 52(3): 194-199.

[15] 王学军, 刘威, 杨竹林, 等. 部分健康成年人群血清中纳米细菌感染的调查[J]. *中华流行病学杂志*, 2004, 25(6): 492-494.

(收稿日期: 2013-06-25 修回日期: 2013-07-20)

(上接第 3753 页)

[24] Chen W, Tang X, Liu Q, et al. Short-term outcomes of induction therapy with tacrolimus versus cyclophosphamide for active lupus nephritis: A multicenter randomized clinical trial[J]. *Am J Kidney Dis*, 2011, 57(2): 235-244.

[25] 章海涛, 胡伟新, 谢红浪, 等. 普乐可复与环磷酰胺诱导治疗 IV 型狼疮性肾炎的疗效比较[J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2006, 15(6): 501-507.

[26] Ahsan N, Johnson C, Gonwa T, et al. Randomized trial of tacrolimus plus mycophenolate mofetil or azathioprine

versus cyclosporine oral solution (modified) plus mycophenolate mofetil after cadaveric kidney transplantation; results at 2 years1[J]. *Transplant*, 2001, 72(2): 245-247.

[27] Sun Q, Liu Z, Cheng Z, et al. Treatment of early mixed cellular and humoral renal allograft rejection with tacrolimus and mycophenolate mofetil[J]. *Kidney Int*, 2006, 71(1): 24-30.

(收稿日期: 2013-06-10 修回日期: 2013-07-15)