

纳米细菌感染在女性膀胱过度活动症发生中的作用研究*

何 鹏,王永权,潘进洪,周占松,张 恒

(陆军军医大学西南医院全军泌尿中心,重庆 400038)

[摘要] **目的** 探讨纳米细菌(NB)感染在女性膀胱过度活动症(OAB)发生中的作用。**方法** 对女性 OAB 患者尿液中培养细菌并采用 PCR 法扩增 16S rRNA 对其进行鉴定。将培养的膀胱黏膜上皮细胞分为实验组和空白对照组,12、24 h 后进行显微、超微形态学的观察,并测定培养液中乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛(MDA)的水平。**结果** 25 例尿液标本中,可观察到 17 例(68%)管底出现絮状的乳白色沉淀物,将培养标本离心后通过 16S rRNA 进行扩增鉴定,发现 15 例(60%)在 1 406 bp 处可见 NB 的特异性条带,证明所收集标本培养的细菌为 NB。NB 组细胞 12 h 胞浆内可见较大空泡样变,线粒体肿胀,24 h 后部分细胞可见核膜溶解,核仁消失。NB 组 MDA 和 LDH 水平在 12、24 h 均高于空白对照组($P < 0.05$)。**结论** NB 对体外培养的膀胱黏膜上皮细胞可造成损伤,NB 感染引起的膀胱黏膜炎症可能参与了女性 OAB 的发病。

[关键词] 纳米细菌;细菌感染;膀胱疾病

[中图法分类号] R69

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2019)21-3634-03

Study on the role of nanobacterial infection in female overactive bladder occurrence*

HE Peng, WANG Yongquan, PAN Jinhong, ZHOU Zhansong, ZHANG Heng

(Urology Center of AMU, Southwest Hospital, Army Military Medical

University, Chongqing 400038, China)

[Abstract] **Objective** To study the role of nanobacteria (NB) infection in female overactive bladder (OAB) occurrence. **Methods** The urine bacterial culture from female OAB patients was performed and the 16S rRNA method was adopted to conduct the identification. The cultured bladder mucosal epithelial cells were divided into the experimental group (NB group) and the control group, then the microscopic, ultrastructural morphological observation were performed after 12, 24 h, and the LDH and MDA contents in the culture liquid were detected. **Results** Among 25 cases of collected urine samples, the flocculent milky sediment appeared at the tube bottom in 17 cases (68%), after the culture sample was centrifuged, the amplification and identification were performed by 16S rRNA, the NB specific bands at 1 406 bp were found in 15 cases (60%), which certified that the bacterium cultured in the collected samples was NB. Mitochondrial swelling and large vacuole-like structures in the cytoplasm appeared in the NB group cells 12 h after bacterial culture and nuclear membranes lysis and nucleoli disappear were observed in some cells after 24 h. The levels of MDA and LDH at 12, 24 h in the NB group were higher than those in the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** NB could result in the damage of in vitro cultured bladder epithelium cells, and the NB infection inducing bladder inflammation may be involved in the onset of female OAB.

[Key words] nanobacteria; bacterial infections; urinary bladder diseases

膀胱过度活动症(overactive bladder, OAB)是女性泌尿系统极其常见的一种疾病。根据最新的国内泌尿外科诊治指南, OAB 的定义是一组以尿急症状为特征的症候群,常伴有明显尿频和夜尿增多表现,可伴有或不伴有急迫性的尿失禁症状,部分患者有下腹及会阴部不适症状,严重影响女性患者的生活质量。目前稳定膀胱的治疗方法因周期长会导致较高的医疗费用,其诊治和寻求有效的治疗方法已成为国

际泌尿界的难题^[1-2]。然而女性 OAB 的病因至今仍不清楚,有逼尿肌不稳定、膀胱黏膜感觉功能过敏及神经内分泌学说等。临床实践中发现女性 OAB 患者多有尿路感染病史,且检查尿中微生物高于正常对照,抗感染治疗常有效,表明膀胱黏膜有隐匿性感染,即病原微生物引起 OAB 的可能。目前为止,仍没有女性在 OAB 患者中明确检出相关的病原体,因此对未知的病原体进行探索有可能对该病的临床诊治产

* 基金项目:重庆市科技局项目(cstc2016jcyjA2106);西南医院院管课题项目(SWH2016LCYB-12)。作者简介:何鹏(1981—),主治医师,博士,主要从事排尿功能障碍研究。

生较大的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2012 年 5 月至 2017 年 10 月在本院泌尿外科门诊确诊为 OAB 的 25 例女性患者为研究对象, 年龄 21~55 岁, 中位年龄 31 岁, 尿常规和培养结果均为阴性。

1.2 方法

1.2.1 NB 培养 严格清洁患者尿道外口后, 收集 10 mL 中段尿, 孔径 0.45 μm 滤器过滤, 4 $^{\circ}\text{C}$ 20 000 g 离心, 弃上清液后留取管底 1 mL, 再加入无菌生理盐水稀释 5 倍, 充分混匀, 0.22 μm 滤器再次过滤, 同样条件再次离心, 留取管底沉淀 1 mL。加入 4 mL 10% γ -FBS 的 RPMI 1640 培养基, 在 5% CO_2 、pH 7.4、37 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下无菌培养。

1.2.2 16S rRNA 鉴定 将 1 mol/L HCl 0.5 mL 加入菌液标本, 充分混匀, 水浴 30 min, 37 $^{\circ}\text{C}$; 1 mol/L Tris 碱 0.5 mL 加入中和, 4 $^{\circ}\text{C}$ 20 000 g 离心 40 min。管底沉淀使用细菌基因组提取试剂盒提取后进行 PCR 扩增。NB 16S rRNA 基因序列 (GenBank 登录号: X98419) 上游引物 5'-AAC GAA CGA CTG GGG CGG CAG GC-3', 下游引物 5'-CAC CCC AGT CGC TGA CCC-3'。PCR 反应体系: 模板 DNA 3 μL , PCR 2 \times TaqPCR Master-Mix 12.5 μL , 上游引物 1.0 μL (10 $\mu\text{mol/L}$), 下游引物 1.0 μL (10 $\mu\text{mol/L}$), 加 DDH_2O 至 25.0 μL 。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 57 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s, 30 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min。所有循环结束后, 取 5.0 μL 反应产物, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测目标基因。

1.2.3 NB 对膀胱黏膜上皮细胞的影响 将培养的膀胱黏膜上皮细胞 (上海然泰生物公司) 分为空白对照组 (胎牛血清、1640 培养液 + 膀胱黏膜上皮细胞) 和 NB 组 (光密度 2.00 的 NB 菌液、胎牛血清、1640 培养液 + 膀胱黏膜上皮细胞), 在 12、24 h 分别进行光镜和透射电镜的观察。细胞经胰酶消化、离心, 标本再转移至 EP 管内, PBS 清洗 10 min, 加入质量分数 3% 戊二醛, 固定 1~2 h, PBS 清洗 2 次, 加入质量分数 1% 的锇酸, 固定 1~2 h, 再用 PBS 清洗 2 次, 依次使用 50%、70% 和 90% 的乙醇梯度脱水, 再无水乙醇脱水 3 次。环氧丙烷浸透, Epon812 包埋和聚合, 80 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。超薄切片后轴、铅染色。4 000 倍及 20 000 倍显微镜下观察制片的细胞形态与结构变化。

1.2.4 细胞损伤的指标检测 通过测定培养 12、24 h 后乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 来评价细胞膜的损伤程度及是否有脂质过氧化参与损伤过程中。LDH 和 MDA 试剂盒比色法分别测定上清液 LDH 和 MDA 水平, 所有操作按试剂盒 (上海生工) 说明书进行。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 22.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PCR 法扩增 NB 16S rRNA 25 例尿液标本培养 4 周后, 可观察到 17 例 (68%) 管底出现絮状的乳白色沉淀物, 将培养标本离心后通过 16S rRNA 进行扩增鉴定, 发现 15 例 (60%) 在 1 406 bp 处可见 NB 的特异性条带, 证明所收集标本培养的细菌为 NB, 见图 1。

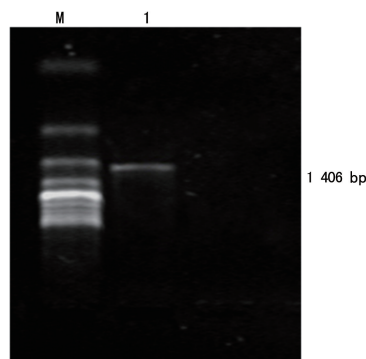
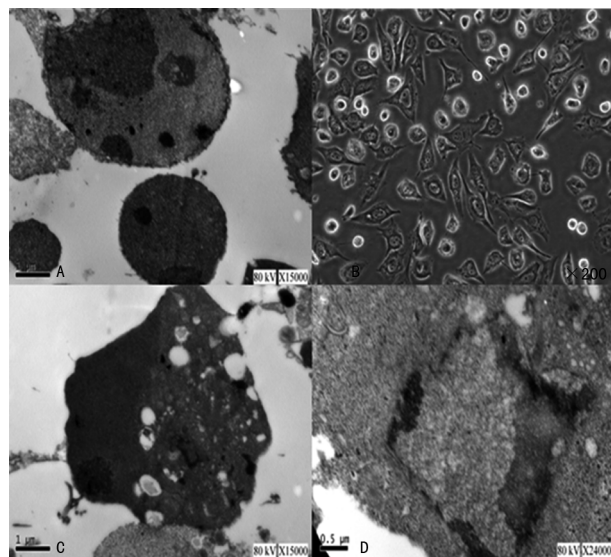


图 1 16S rRNA 基因片断扩增

2.2 NB 对膀胱黏膜上皮细胞的损伤作用 空白对照组膀胱黏膜上皮细胞规则, 细胞核及细胞质形态致密, 线粒体形态正常, 核膜完整, 无明显异常。NB 组细胞 12 h 细胞质内可见较大空泡样变, 线粒体肿胀, 24 h 后部分细胞可见核膜溶解, 核仁消失, 见图 2。



A: 正常对照, 细胞形态规则; B: 细胞皱缩, 脱落; C: 细胞质内可见散在的空泡样变; D: 核膜溶解, 核仁消失

图 2 细胞形态与结构变化

2.3 MDA 和 LDH 水平变化 NB 组 MDA 和 LDH 水平在 12、24 h 均高于空白对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 不同时间点两组 LDH 和 MDA 水平变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	MDA ($\mu\text{mol/L}$)		LDH (U/L)	
	12 h	24 h	12 h	24 h
空白对照组	8.3 \pm 2.1	8.6 \pm 2.0	729.3 \pm 165.6	987.1 \pm 227.3
NB 组	21.5 \pm 5.3	35.3 \pm 6.3	1 523.3 \pm 101.4	2 234.5 \pm 198.8

3 讨 论

NB 的发现及其致病特点为阐明女性 OAB 的病因提供了一条崭新的思路。NB 是一种非常特殊的细菌,1992 年芬兰科学家 KAJANDER 等在哺乳动物细胞培养时偶然发现,该细菌革兰氏染色呈阴性,大小为 50~200 nm,外观多呈球状或有一端突起,不像普通细菌一样有荚膜与鞭毛,该细菌对四环素有特殊的敏感性,并在特殊的 RPMI 1640 或 DMEM 等哺乳类细胞培养基中才能生长。由于具有很多特性,且体积微小,KAJANDER 等将之命名为 Nanobacteria,进一步的研究发现 NB 确实存在,而不是体积上的纳米颗粒,并且和很多病因不明的感染性疾病有关^[3]。

目前的研究证实,NB 在人群中的感染率较高,可能会导致多种感染性疾病,其潜在的致病作用引起了临床上的广泛关注^[4]。NB 感染虽然与多种人类疾病的发生有关,但普通临床的检测方法不能确诊,NB 具有特异的 16S rRNA 序列,因此,可以通过 16S rRNA 基因片段扩增来鉴定 NB^[5-6]。NB 致病机制主要包括两个方面:(1)NB 生长过程中可以形成坚硬的生物外壳,成分主要是羟磷灰石碳酸盐矿物结晶,导致被感染细胞发生类似骨骼样的病理性钙化,从而使组织器官硬化,这种病理改变在人类多种系统中均可发现,但病因一直不明。(2)NB 通过分泌一些生物毒素及细胞炎性因子(如白细胞介素-1、白细胞介素-6 和内毒素等),引起了感染组织的炎症和慢性疾病。

泌尿系统是体内感染的 NB 主要的排出通道,因此可能与男性泌尿生殖系的感染性疾病有关,现在明确在泌尿系结石、前列腺和睾丸钙化患者的标本中相继培养出 NB。目前众多研究证实 NB 感染和肾结石形成有关,通过单克隆抗体免疫荧光染色对 70 余例肾结石标本培养的 NB 进行鉴定,发现感染率高达 97.2%,发病机制可能与 NB 导致的细胞脂质过氧化等反应有关^[7-9]。笔者所在部门的前期研究证实 NB 感染和慢性前列腺炎有关,并可能是导致前列腺结石形成的致病因素,通过从临床确诊的Ⅲ型前列腺炎患者分离培养出的 NB,再灌注注入实验大鼠前列腺,可以有效地导致前列腺的炎症,通过四环素治疗可明显的缓解^[10-11]。

女性 OAB 的病因仍不清楚,但有研究表明,许多 OAB 患者曾有尿路感染,抗感染治疗也常有效,膀胱黏膜有可能存在非常规的隐匿性感染,即特殊病原微生物引起 OAB 的可能。NB 的生物矿化能力可能导致软组织感染、损伤和钙化,进而可能导致其他疾病,NB 可能是钙化相关疾病和感染病因不明确的疾病的一个因素,其与因为钙化形成的屏障导致临床治疗的困难^[12]。NB 可能参与了 OAB 致病的主要依据有:NB 可感染人体多种细胞,体内感染的 NB 主要经泌尿系统排出,因而其在泌尿系统中的潜在感染不容忽视。NB 在普通的微生物培养条件下不能生长繁殖,

可能与临床上很多 OAB 患者尿液标本采用常规微生物培养法检测不出病原,但膀胱黏膜却有慢性炎症存在有关。本研究发现,在女性 OAB 患者尿液中可以分离培养出 NB,并且导致培养的膀胱黏膜上皮细胞损伤,因此,可以推测 NB 的感染可能参与了 OAB 患者膀胱黏膜上皮细胞损伤,导致膀胱黏膜的慢性炎症。但目前还有待进一步的研究,主要是因为纳米颗粒也有可能致细胞的损伤,即有生命的 NB 和纳米颗粒的鉴别还需要更多的实验来证实。但从目前的研究结果来看,深入探讨 NB 在 OAB 中的病因作用,有望为该病的临床治疗提供新的病原学依据。

参考文献

- [1] MURRAY B, HESSAMI S H, GULTYAEV D, et al. Cost-effectiveness of overactive bladder treatments: from the US payer perspective[J]. *J Comp Eff Res*, 2019, 8(1):61-71.
- [2] 李杰荣,谢克基,刘国庆,等.膀胱不同部位注射 A 型肉毒素治疗女性难治性膀胱过度活动症的临床研究[J]. *重庆医学*, 2015, 44(16):2191-2193.
- [3] ANSARI H, SEPAHI A A, SEPAHI M A. Different approaches to detect nanobacteria in patients with kidney stones: an infectious cause or a subset of life? [J]. *Urol J*, 2017, 14(5):5001-5007.
- [4] ABBOTT A. Battle lines drawn between 'nanobacteria' researchers[J]. *Nature*, 1999, 401(6749):105.
- [5] WILK I, MARTIROSIAN G. Nanobacteria—microbiological characteristics[J]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2004, 58:60-64.
- [6] 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.
- [7] LIN X C, GAO X, LU G S, et al. Role of calcifying nanoparticles in the development of testicular microlithiasis in vivo[J]. *BMC Urol*, 2017, 17(1):99-105.
- [8] 于澄帆,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.
- [9] HONG X, WANG X, WANG T, et al. Role of nanobacteria in the pathogenesis of kidney stone formation[J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(7):3227-3234.
- [10] SHEN X C, MING A, LI X, et al. Nanobacteria: a possible etiology for type III prostatitis[J]. *J Urol*, 2010, 184(1):364-369.
- [11] ZHOU Z, HONG L, SHEN X, et al. Detection of nanobacteria infection in type III prostatitis[J]. *Urology*, 2008, 71:1091.
- [12] SARDARABADI H, MASHREGHI M, JAMIALAHMADI K, et al. Resistance of nanobacteria isolated from urinary and kidney stones to broad-spectrum antibiotics[J]. *Iran J Microbiol*, 2014, 6(4):230-233.