

钙化性纳米微粒与泌尿系疾病相关性研究的新进展

康云鹏¹ 武进峰^{2△}

[摘要] 钙化性纳米颗粒(CNPs)是一种磷酸钙和蛋白质共同形成的纳米大小的球形复合物,具有自我复制的功能,曾被称为“纳米细菌”。然而在其被发现 27 年后,它们的性质仍未完全确定,到目前为止,没有人能够确定它们是否是地球上最小的能够自我复制的生命形式,抑或简单的蛋白质-矿物质组合体。同时,由于这些生物体主要从泌尿生殖道被分离出来,因此,越来越多的研究关注了这种颗粒在泌尿系统疾病病因学中所发挥的作用,包括肾结石、多囊肾以及慢性Ⅲ型前列腺炎(慢性盆腔疼痛综合征)。本文综述了钙化性纳米微粒的当前研究现状,并探索这些粒子如何影响泌尿系疾病。

[关键词] 钙化性纳米微粒;肾结石;慢性前列腺炎

doi:10.13201/j.issn.1001-1420.2015.05.028

[中图分类号] R692.4 **[文献标识码]** A

Latest progress of correlative studies between calcifying nanoparticles
and urinary system diseasesKANG Yun peng¹ WU Jin feng²

(¹Shanxi Medical University, Taiyuan, 030001, China; ²Department of Urology, Shanxi Dayi Hospital of Shanxi Medical University)

Corresponding author: WU Jinfeng, E-mail: wujf005@126.com

Abstract Calcifying nanoparticles (CNPs) appearing as self-propagating nano-sized complexes of calcium phosphate mineral and proteins, has been called the “nanobacteria”. Though they were discovered 27 years ago, their nature is still obscure. Up to now nobody has been successful in credibly determining whether they are the smallest self-replicating life form on Earth, or mineralo-protein complexes. These nanoparticles isolated mainly from urogenital tract, so more and more studies show the significant role of CNPs in the etiopathogenesis of urinary system diseases including nephrolithiasis, polycystic kidney disease and type III chronic prostatitis (chronic pelvic pain syndrome). This paper reviews the current research situation of CNPs, and explore how these particles affect the urinary system diseases.

Key words calcifying nanoparticles; nephrolithiasis; chronic prostatitis

Kajander 等于 27 年前在污染的牛血清培养基中发现了钙化性纳米微粒(CNPs),几年后他们的成果得以发表^[1]。然而,对于这些微粒性质的争论至今仍未结束,尽管进行了许多最新的研究,但到目前为止,仍然没有人能够确定他们是否是地球上最小的能够自我复制的生命形式,或者只是简单的蛋白质-矿物质组合体。这两种理论都有其支持者,其观点针锋相对,产生了巨大的争议,同时,一些文献报道它们与肾结石的形成、多囊肾钙化和慢性前列腺炎密切相关。本文将综述钙化性纳米微粒存在及性质的证据、在泌尿系统疾病病因学中所扮演的角色以及针对纳米细菌的特异性治疗是否将成为泌尿系统疾病的新的治疗方案。

1 钙化性纳米微粒

1.1 钙化性纳米微粒的发现及争议

Kajander 等^[2]在调查牛血清培养失败时发现了一种直径为 0.2~0.5 μm 的颗粒物,在特殊的

培养条件下产生了一些能够进行自我复制的球形颗粒,因为它们的繁殖方式和细菌类似,当时这些颗粒被命名为“纳米细菌”。从此之后,有报道称它们可在多种器官中轻易分离出来,比如培养基、各种哺乳动物的血清、肾结石、胎盘、唾液以及钙化的冠状动脉^[3]。然而,随着它们越来越多地被发现,对于“纳米细菌”性质的争议也越来越大,有一些学者开始指出“纳米细菌”并不能认为是真正的有机物,而称之为“钙化性纳米微粒”似乎更为合理。首先,Raoult 等^[4]认为钙化性纳米微粒并不包含核酸,同时它们对两种核酸酶相抵抗;一些研究也认为其中不存在 16SRNA^[5,6]。因此,它们的繁殖并不依赖 DNA 或者 RNA^[4];第二,纳米钙化颗粒体积小于细菌体积的 10 倍,仅仅比核糖体大 10 倍,这与已知的生物体代谢机制相矛盾^[4];第三,纳米钙化颗粒可以在经过 γ 射线照射过的血清中生存^[1,7],可以耐受 90 ℃ 的高温达 1 小时,以及耐受其他可以杀灭细菌的各种治疗;此外,Young 等^[8]通过免疫印迹试验显示钙化性纳米微粒的独特抗体实际上是通过胎球蛋白 A 交叉反应而来。尽管

¹ 山西医科大学(太原,030001)

² 山西医科大学山西大医院泌尿外科

△ 审校者

通信作者:武进峰, E-mail: wujf005@126.com

存在如此多的证据,相反的意见仍然存在,一些学者仍然认为纳米钙化颗粒是一种活的有机物^[3,9,10]。

1.2 钙化性纳米细菌微粒的形成

为了解释纳米钙化颗粒的形成,现提出了两种假说^[8]:第一种假说认为钙化性纳米微粒是磷酸钙和钙化抑制物如胎球蛋白 A 和清蛋白共同沉淀所致^[8],第二种假说则认为胎球蛋白 A 存在一种可以相互传染的变异,使得其抗钙化特性得以改变^[4]。在这两种假说中都认为胎球蛋白 A 是钙化性纳米微粒形成的关键。

胎球蛋白 A(AHSG)是一种 59kD 糖蛋白,是 cystatin 超家族(半胱氨酸蛋白酶抑制剂家族)的一员,由两个 cystatin 样决定区和一个小的无关决定区组成^[11],存在于血液循环中,主要由肝细胞合成,它含有的两个同源的蛋白酶抑制肽链是一种对羟基磷灰石盐的亲合蛋白,可以防止晶体生长^[12,13],AHSG 在血液能与基质 Gla 蛋白(MGP)和钙、磷形成复合体^[14],抑制磷灰石前体矿物质的形成和沉积,占抑制血清钙磷沉积作用的 50%^[15]。AHSG 的 N 端富含酸性氨基酸残基,是碱性磷酸钙(BCP)的结合位点,可与 Ca^{2+} 、 PO_4^{3-} 形成可溶性的无定形胶体微粒,抑制血清过饱和的钙磷盐沉积^[16]。Jahnet-Dechent 等^[15]发现 AHSG 敲除的老鼠发生严重的软组织钙化和血管钙化。此外,计算机模拟域结构表明,AHSG 分子的氨基末端存在与转化生长因子- β (TGF- β)受体相似的序列,可与 TGF- β 结合,抑制成骨细胞增生^[17]。由此可见,胎球蛋白 A 与钙化性纳米微粒可能存在密切关系。

一项最近的研究中,Chabrière 等^[18]成功地在胎球蛋白 A 作为唯一蛋白质来源的培养基中培养出了钙化性纳米微粒,这使得科研人员可以轻易地分析钙化性纳米微粒中的蛋白质成分,他们的成果表明钙化性纳米微粒中所提取的胎球蛋白 A 具有不同的结构,但由于其构象的改变是适中的(15%~20%),变异的胎球蛋白 A 仍具有对羟基磷酸盐的结合特性^[18];包含大量酸性氨基酸或者磷酸化的蛋白质可以结合羟基磷酸盐^[19,20];高度糖基化的胎球蛋白 A 同样具有结合羟基磷酸盐的特性,可通过包绕和稳定早期磷酸钙颗粒从而阻止非生理钙化^[21,22]。尽管它具有抗钙化特性,但它确实是钙化性纳米微粒的主要组成部分,从钙化性纳米微粒中提取的胎球蛋白 A 具有不同的结构,这提示钙化性纳米微粒可能是由胎球蛋白 A 聚集组成,这些聚集的胎球蛋白 A 仍保持了其结合磷酸钙的能力,同时形成一个支架来促进钙沉淀。在体内,这种沉淀过程可以诱导其他蛋白质对钙和磷酸盐的吸附(例如清蛋白)^[8]。这或许可以解释为什么在

钙化性纳米微粒中的胎球蛋白 A 周围可以检测到大量的蛋白质^[3,23];这些蛋白质可能改变钙化性纳米微粒的生长速度和形态^[4]。先前的研究表明,血液中较低的和正常生理胎球蛋白 A 水平都与血管钙化相关^[24,25],如果纳米钙化颗粒中的胎球蛋白 A 的变异使得其不能抑制钙化,那么对上述矛盾是一个很好的解释。此外,他们发现肾结石可以诱导胎球蛋白 A 变异,这说明钙化性纳米微粒的复制可能发生在体内^[18]。

2 钙化性纳米微粒与泌尿系统疾病

许多文献都报道了钙化性纳米微粒在各种相关疾病中所扮演的重要角色,尤其是钙化相关性疾病,钙化性纳米微粒作为钙化的核心,并进一步促进了钙化的发展^[26]。事实上,钙化性纳米微粒已被从大多数肾结石^[26~28]、胆结石^[29]、主动脉瓣或血管钙化斑^[30~33]以及胎盘^[9]中分离出来。钙化性纳米微粒主要从肾脏排泄,Akerman 等^[34]利用放射性标记的钙化性纳米微粒感染兔模型,15 分钟内尿液中存在标记物,因此认为钙化性纳米微粒与泌尿系统相关疾病存在关联。

2.1 肾结石

钙化性纳米微粒致肾结石形成的假设由来已久^[35],Kajander 和 Ciftcioglu 指出这些颗粒是肾结石形成的一个原因^[26,27],理由包括:①大多数肾结石中可以鉴定及培养出钙化性纳米微粒;②大部分的肾结石中含有磷灰石,而这可能是钙化性纳米微粒的外壳;③钙化性纳米微粒是肾脏中唯一可以产生沉淀磷灰石的来源;④从肾结石中培养的钙化性纳米微粒可以形成新的钙化灶;⑤活体实验证明灌注钙化性纳米微粒的小鼠与肾结石形成存在剂量反应关系。一项由 NASA 发起的研究模拟微重力情况下钙化性纳米微粒的生长,这项研究表明钙化性纳米微粒在微重力条件下比在固定的条件下的增殖速度快 4.6 倍,而比摇瓶的增殖速度快 3.2 倍,研究人员认为纳米细菌可能是导致人类在空间活动中尿路结石高发的主要原因^[36]。其后,Khullar 等^[28]认为印度人群的肾结石中钙化性纳米微粒的检出率为 62%。然而对于这一观点仍存有争议,有些研究人员试图通过电子显微镜扫描上泌尿道结石中钙化性纳米微粒的存在,尽管这些微粒已经通过电子显微镜在细胞空泡内观察到,但是单克隆抗体的特殊染色却是阴性。此外,一些其他研究小组在重复肾结石中培养钙化性纳米微粒却并未成功^[37]。

2.2 多囊肾

已经有理论认为钙化性纳米微粒在常染色体显性多囊肾(ADPKD)患者的肾囊肿形成中起一定作用。这些颗粒的细胞毒靶点之一是小管细胞—ADPKD 患者肾囊肿形成的主要来源。Hjelle 评

估了 13 例多囊肾,证明了多囊肾中有钙化性纳米微粒的存在,重要的是,所有 13 例患者肾囊液中钙化性纳米微粒抗体均阳性。此外,他们测试了 AD-PKD 和对照组患者的尿液,证明了 ADPKD 患者中钙化性纳米微粒的阳性检出率更高(尤其是男性)^[38]。

2.3 慢性前列腺炎

钙化性纳米微粒亦是Ⅲ型前列腺炎/慢性盆腔疼痛综合征的一个可能原因。Shoskes 等^[39]使用四环素+EDTA 治疗Ⅲ型前列腺炎,该疗法耐受性较好,治疗前后分别评估 NIH-慢性前列腺炎评分及问卷调查,疼痛、生活质量及评价总分均得到了极大的改善($P<0.0001$),同时泌尿系统症状也明显缓解($P=0.01$),15 例患者中的 8 例在治疗后,NIH-慢性前列腺炎评分提高了 50% 以上。2008 年,Zhou 等^[40]对一个更大的患者人群进行了安慰剂对照试验,在治疗之后,患者前列腺分泌液中的钙化性纳米微粒含量从 62.5% 降至 16.7%,而尿液中的钙化性纳米微粒含量则从 12.5% 降至 0,而安慰剂组则无明显变化。最终,Shen 等^[41]在 2010 年利用动物模型证实了钙化性纳米微粒对于Ⅲ型前列腺炎的作用,将钙化性纳米微粒注入小鼠,8 周后,70% 小鼠的前列腺腔出现微钙化灶。

3 结论

尽管对于钙化性纳米微粒的性质仍未明朗,但有足够的证据证明这种极小的颗粒在活的生物体中普遍存在,其生成很可能与胎球蛋白 A 相关。这些颗粒和钙化过程紧密相连,尤其是泌尿系统,当然,钙化性纳米微粒在泌尿系统中的出现并未提供泌尿系统相关疾病明确的证据,然而,早期的安慰剂对照证据证明在肾结石和Ⅲ型前列腺炎中使用抗钙化性纳米微粒治疗将有助于减轻症状。将来,需要更多的试验来验证钙化性纳米细菌的性质及其与人类疾病的相关联系,以及针对纳米细菌的特异性治疗是否将成为泌尿系统疾病的新的治疗方案。

[参考文献]

- Kajander E O, Kuronen I, Akerman K K, et al. Nanobacteria from blood: the smallest culturable autonomously replicating agent on Earth [C]//Optical Science, Engineering and Instrumentation'97. International Society for Optics and Photonics, 1997: 420—428.
- 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.
- Kutikhin A G, Brusina E B, Yuzhalin A E. The role of calcifying nanoparticles in biology and medicine[J]. Int J Nanomedicine, 2012, 7: 339—350.
- Raoult D, Drancourt M, Azza S, et al. Nanobacteria are mineralo fetuin complexes[J]. PLoS Pathog, 2008, 4(2): e41.
- Barba I, Villacorta E, Bratos-Perez M A, et al. Aortic valve-derived calcifying nanoparticles: no evidence of life[J]. Rev Esp Cardiol (Engl Ed), 2012, 65(9): 813—818.
- Cisar J O, Xu D Q, Thompson J, et al. An alternative interpretation of nanobacteria—induced biomineralization[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(21): 11511—11515.
- Martel J, Wu C Y, Young J D. Critical evaluation of gamma-irradiated serum used as feeder in the culture and demonstration of putative nanobacteria and calcifying nanoparticles[J]. PLoS One, 2010, 5(4): e10343.
- Young J D, Martel J, Young L, et al. Putative nanobacteria represent physiological remnants and culture by-products of normal calcium homeostasis [J]. PLoS One, 2009, 4(2): e4417.
- Lu H, Guo Y, Liu S, et al. Nanobacteria may be linked to calcification in placenta [J]. Ultrastruct Pathol, 2012, 36(3): 160—165.
- Zheng J, Tang J, Yin S, et al. Comparison of polymerase chain reaction and immunologic methods for the detection of nanobacterial infection in type-III prostatitis[J]. Urology, 2014, 84(3): 731. e9—13.
- Pedersen K O. Fetuin, a new globulin isolated from serum[J]. Nature, 1944, 154(3914): 575—575.
- Vitorino R, Lobo M J C, Duarte J, et al. In vitro hydroxyapatite adsorbed salivary proteins[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 320(2): 342—346.
- Armstrong W G. Characterisation studies on the specific human salivary proteins adsorbed in vitro by hydroxyapatite[J]. Caries Research, 1971, 5(3): 215—227.
- Price P A, Thomas G R, Pardini A W, et al. Discovery of a high molecular weight complex of calcium, phosphate, fetuin, and matrix γ -carboxyglutamic acid protein in the serum of etidronate-treated rats[J]. J Biol Chem, 2002, 277(6): 3926—3934.
- Jahnen-Dechent W, Schinke T, Trindl A, et al. Cloning and targeted deletion of the mouse fetuin gene[J]. J Biol Chem, 1997, 272(50): 31496—31503.
- Price P A, Lim J E. The inhibition of calcium phosphate precipitation by fetuin is accompanied by the formation of a fetuin-mineral complex[J]. J Biol Chem, 2003, 278(24): 22144—22152.
- Heiss A, DuChesne A, Denecke B, et al. Structural basis of calcification inhibition by alpha 2-HS glycoprotein/fetuin-A. Formation of colloidal calciprotein particles[J]. J Biol Chem, 2003, 278(15): 13333—13341.
- Chabrière E, Gonzalez D, Azza S, et al. Fetuin is the key for nanon self-propagation [J]. Microb Pathog, 2014, 73: 25—30.
- Weiner S, Addadi L. Acidic macromolecules of miner-

- alized tissues; the controllers of crystal formation[J]. Trends Biochem Sci, 1991, 16: 252—256.
- 20 Hunter G, Hauschka P, Poole A, et al. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins[J]. Biochem J, 1996, 317: 59—64.
- 21 Brylka L, Jahnke-Dechent W. The role of fetuin-A in physiological and pathological mineralization[J]. Calcif Tissue Int, 2013, 93(4): 355—364.
- 22 Rochette C N, Rosenfeldt S, Heiss A, et al. A shielding topology stabilizes the early stage protein-mineral complexes of fetuin-A and calcium phosphate: a time-resolved small-angle X-ray study[J]. Chembiochem, 2009, 10(4): 735—740.
- 23 Shiekh F A, Charlesworth J E, Kim S H, et al. Proteomic evaluation of biological nanoparticles isolated from human kidney stones and calcified arteries[J]. Acta Biomater, 2010, 6(10): 4065—4072.
- 24 Ketteler M, Bongartz P, Westenfeld R, et al. Association of low fetuin-A (AHSG) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross-sectional study [J]. The Lancet, 2003, 361 (9360): 827—833.
- 25 Price P A, Williamson M K, Nguyen T M T, et al. Serum levels of the fetuin-mineral complex correlate with artery calcification in the rat[J]. J Biol Chem, 2004, 279(3): 1594—1600.
- 26 Ciftcioglu N, Björklund M, Kuorikoski K, et al. Nanobacteria: an infectious cause for kidney stone formation[J]. Kidney Int, 1999, 56(5): 1893—1898.
- 27 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.
- 28 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.
- 29 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.
- 30 Miller V M, Rodgers G, Charlesworth J A, et al. Evidence of nanobacterial-like structures in calcified human arteries and cardiac valves[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004, 287(3): H1115—H1124.
- 31 Puskas L G, Tiszlavicz L, Rázga Z, et al. Detection of nanobacteria-like particles in human atherosclerotic plaques[J]. Acta Biol Hung, 2005, 56(3): 233—245.
- 32 Bratos-Pérez M A, Sánchez P L, de Cruz S G, et al. Association between self-replicating calcifying nanoparticles and aortic stenosis: a possible link to valve calcification[J]. Eur Heart J, 2008, 29(3): 371—376.
- 33 Hu W G, Wang X F, Xu T, et al. Establishment nephrolithiasis rat model induced by nanobacteria and analysis of stone formation[J]. Beijing Da Xue Xue Bao, 2010, 42(4): 433—435.
- 34 Akerman K K, Kuikka J T, Ciftcioglu N, et al. Radio-labeling and in-vivo distribution of nanobacteria in rabbits[C]//Optical Science, Engineering and Instrumentation 97. International Society for Optics and Photonics, 1997: 436—442.
- 35 Goldfarb D S. Microorganisms and calcium oxalate stone disease[J]. Nephron Physiol, 2004, 98(2): p48—54.
- 36 Ciftcioglu N, Haddad R S, Golden D C, et al. A potential cause for kidney stone formation during space flights: enhanced growth of nanobacteria in microgravity[J]. Kidney Int, 2005, 67(2): 483—491.
- 37 Drancourt M, Jacomo V, Lépidi H, et al. Attempted isolation of Nanobacterium sp. microorganisms from upper urinary tract stones[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(1): 368—372.
- 38 Hjelle J T, Miller-Hjelle M A, Poxton I R, et al. Endotoxin and nanobacteria in polycystic kidney disease [J]. Kidney Int, 2000, 57(6): 2360—2374.
- 39 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.
- 40 Zhou Z, Hong L, Shen X, et al. Detection of nanobacteria infection in type III prostatitis [J]. Urology, 2008, 71(6): 1091—1095.
- 41 Shen X, Ming A, Li X, et al. Nanobacteria: a possible etiology for type III prostatitis[J]. J Urol, 2010, 184 (1): 364—369.

(收稿日期:2014-11-22)