

## 纳米细菌及其诱发泌尿系结石形成的研究进展\*

汪越<sup>1</sup> 张力<sup>1</sup> 郝宗耀<sup>1△</sup> 梁朝朝<sup>1△</sup>

**[摘要]** 泌尿系结石是泌尿外科常见疾病。近年来,我国泌尿系结石的发病率有逐渐增加的趋势,对于结石的病因与发病机制的认识也经历了一个很长的过程,但仍然无法得出一个完整的定论。20 世纪 90 年代后,纳米细菌的发现使人们对于泌尿系结石的形成过程有了新的认识。但纳米细菌是否作为一个真实的生命体,以及如何导致相关疾病的发生等方面仍存在很大的争议。本文旨在介绍纳米细菌的本质及其独特的生物作用,综述纳米细菌近年来的研究进展,讨论纳米细菌作为泌尿系结石的发病因素在临床上的应用并作出展望。

**[关键词]** 泌尿系结石;纳米细菌;16s rRNA;胎球蛋白-A;生物矿化作用

doi: 10.13201/j.issn.1001-1420.2015.07.026

**[中图分类号]** R691.4 **[文献标识码]** A

### Nanobacteria and the research progress of its effect on urinary stone formation

WANG Yue ZHANG Li HAO Zongyao LIANG Chaozhao

(Department of Urology, First Affiliated Hospital of Anhui Medical University; Institute of Urology, Anhui Medical University, Hefei, 230022, China)

Corresponding author: LIANG Chaozhao, E-mail: liang\_chaozhao@163.com

**Abstract** Urinary calculus is the common disease in urology. In recent years, the incidence of urinary calculi in our country gradually increases. The understanding of the etiology and pathogenesis of stone also has experienced a long process, but we still can't draw a valid conclusion. Since the 1990s, the discovery of nanobacteria has made people have a new understanding of the formation process of urinary calculi. However, whether the nanobacteria are real lives, or how they lead to the occurrence of related diseases is still controversial. This article is to introduce the nature and unique biological role of nanobacteria, review the research progress of nanobacteria in recent years, discuss the application of nanobacteria as urinary calculi incidence factors in clinic and open up a bright prospect.

**Key words** urinary calculi; nanobacteria; 16s rRNA; Fetuin- A; biomineralization

泌尿系结石是泌尿外科常见疾病,它既是一种历史古老的疾病,又是一个现代医疗上的重要问题,我们不应简单地将其看作是尿盐在尿路中沉淀形成结石,它实际上是人体异常矿化的一种表现。目前较普遍地认为它是多种原因共同促成的,并且通过基础与临床多学科的合作,从分子、细胞、组织、器官乃至全身的水平,形成了以下几种泌尿系结石的形成机制:肾钙斑学说,过饱和结晶学说,基质学说,抑制物缺乏学说,游离颗粒和固定颗粒成石学说,取向附生学说,免疫损伤学说等<sup>[1]</sup>。但是,假说毕竟只是假说,针对泌尿系结石的发病机制的研究,仍然未能得到一个确切的结果。

20 世纪 90 年代,芬兰科学家 Kajander 教授及其同事研究发现了一种直径在 0.1~2 μm 之间、目前所知的最小生命体,并将其命名为纳米细

菌<sup>[2]</sup>。自此之后,纳米细菌作为一种新的微生物被临床及科研人员广泛研究,临床上一些疾病的病因、发病机制以及相关诊疗思路也因此产生了新的方向。

#### 1 纳米细菌的生物学特性

纳米细菌广泛存在于自然界的矿物质中和生物体内,并且可以感染人体各种组织及细胞。Khullar 等<sup>[3]</sup>对纳米细菌的形态学及免疫学的研究发现纳米细菌为革兰染色阴性菌,直径约为 50~500 nm,为普通细菌的 1/100,并且能通过 0.2 μm 的滤过膜,其增长繁殖的速度比一般细菌慢,在不含血清的培养基中需要 6 天才能繁殖一代,而在加入血清的培养基中约需 3~5 天,若加入胎牛血清,则其繁殖速度会更快<sup>[4]</sup>。实验证明,纳米细菌需在 RPMI-1640 培养基中,并且客观环境为 37 °C,5% CO<sub>2</sub> 以及 95% 空气,至少培养 3~4 周方可出现肉眼可见的沉淀物<sup>[5]</sup>。纳米细菌的生长繁殖能力较强,它可耐受 90 °C 1 小时,15 kGy 的 γ 射线和 5% NaCl。并且纳米细菌对多种抗生素如青霉素、庆大霉素、链霉素、红霉素、环丙沙星等均有一定的耐受性,但其生长可被四环素、复方新诺明、呋喃妥英

\* 基金项目:卫生部国家临床重点专科建设项目(2012);国家自然科学基金项目(编号 81170698;81370856);安徽省科技攻关项目(编号 12010402128);安徽省自然科学基金项目(编号 1508085MH177)

<sup>1</sup> 安徽医科大学第一附属医院泌尿外科,安徽医科大学泌尿外科研究所(合肥,230022)

<sup>△</sup> 审校者

通信作者:梁朝朝,E-mail: liang\_chaozhao@163.com

等所抑制<sup>[6]</sup>。

若要研究纳米细菌,首要任务就是纳米细菌的分离并培养,而培养得到真正的纳米细菌则需要满足上述严格的条件。由于纳米细菌这一系列独特的生物学特性,对其研究就增加了难度,国内外学者培养纳米细菌的过程中就遇到了诸多问题,因此,纳米细菌的分离培养条件值得进一步探究与完善。

## 2 纳米细菌与 16s rRNA

正是由于纳米细菌分离培养的困难性,加之人们对纳米细菌的认识未能完善,因此有人提出纳米细菌是否为一个真正的生命体还值得商榷,对纳米细菌本质的研究也受到了业界的广泛关注。

Evan 等<sup>[7]</sup>在研究胎盘钙化组织中的纳米颗粒时,成功提取出其 DNA,并利用分子生物学方法将相关 DNA 测序,并将结果通过比对,结果证明该扩增的 DNA 与已知的 16s rRNA 有 83% 相似性,因此,她提出纳米细菌拥有“类似核酸的原材料”,并通过这种“原材料”进一步形成钙化组织及羟磷灰石结晶等,而这种“原材料”就是纳米细菌的遗传物质—16s rRNA,因此,她提出纳米细菌是真实存在的微生物,而不是蛋白质或简单的羟基磷灰石沉淀物。

另一方面,Khullar 等<sup>[3]</sup>有足够的证据证明纳米细菌是有生命的微生物,他们用一种 DNA 特异性染料—高浓度碘化普罗匹定来观察细菌细胞中 DNA 的存在,结果发现大部分脱矿化后的纳米细菌均被染料标记。这样的结果证实了纳米细菌中 DNA 的存在,因此,他们提出纳米细菌拥有自身的遗传物质,是一个真正存在的生命体。

然而,Wu 等<sup>[8]</sup>在培养纳米细菌时,利用 30 kGy 的  $\gamma$  射线照射未经过培养的血清,培养基内仍然有矿化颗粒的形成;并且,他们利用 PCR 无法扩增出所谓的 16s rRNA。因此,他们提出纳米细菌不是一个存在的生物体,它们的繁殖不是靠他们所谓的 DNA 或者 RNA 的复制。

Wu 等<sup>[9]</sup>观察到,在不管是脱氧核糖核酸酶还是核糖核酸酶的环境中,纳米细菌的生长都没有改变,并且,当利用 PCR 扩增基因后,测序结果通常显示为  $\alpha$ -变形菌门及  $\gamma$ -变形菌门等细菌的遗传物质,而这些细菌都是实验过程中通过水传播的常见污染物。因此,他们提出所谓的“纳米细菌”可能有种能聚集培养环境中的 16s rRNA 碎片的能力,以至于大多数研究者被迷惑,而其本身并不含有相关基因序列。因此,纳米细菌是一种不含有核酸的、但可以转移至其他生物体的实体。

因此,纳米细菌的本质到目前为止还是有很大的争议,虽然有学者分离出了所谓的“纳米细菌”,但纳米细菌的生长条件与一般细菌差别很大,实验

室分离出来的到底是真实的生命体,还是实验室污染所造成的假象,都很难做一个定论。

## 3 纳米细菌与胎球蛋白

胎球蛋白是一种肝细胞合成的、存在于血液循环中的糖蛋白,实验证明,胎球蛋白-A 通过合成血流中胎球蛋白 A-磷酸钙复合物的可溶性胶体微粒来阻止软组织的钙化<sup>[10]</sup>。而纳米细菌的矿化作用与胎球蛋白有一定的联系。

Jones 等<sup>[11]</sup>首先将纳米细菌放在含有血清的无细胞培养基中培养、繁殖,一段时间后,再将其放在仅以胎球蛋白 A 为唯一蛋白来源的无血清培养基中培养。结果显示,培养基内产生钙化颗粒,这些颗粒的组成蛋白通过 2D 凝胶分析以及 Western Blotting 实验提示,它们仅由胎球蛋白 A 组成。因此他们提出胎球蛋白 A 是纳米细菌的一个主要组成部分,而且纳米细菌来源的胎球蛋白 A 拥有不同于普通胎球蛋白 A 的构型,这种构型能提前聚合钙离子,并且促进磷酸钙沉淀的形成。后来,他们对于肾结石中结石颗粒的研究表明肾结石导致天然的胎球蛋白 A 的构型发生改变,这进一步证明了胎球蛋白 A 对于纳米细菌所致结石、钙化等有密切的联系。

Hunter 等<sup>[12]</sup>在曾经用于培养纳米细菌的血清中发现了大量的胎球蛋白 A 浓聚,充分证明了胎球蛋白对于纳米细菌自身生长、矿化过程中的重要性。他们提出,像胎球蛋白 A 这种抑制钙化的因子可以结合钙、磷酸盐,从而构成无定形的纳米微粒,进而抑制其发展成更大的结晶物质。

可以看出,尽管针对胎球蛋白 A 与纳米细菌的关系的相关研究为数不多,但二者的相关性不言而喻,随着科学的进一步发展,对于纳米细菌中胎球蛋白 A 的构型及导致钙化、结石形成的机理的研究也会进一步深入。

## 4 纳米细菌的生物矿化作用

纳米细菌有一种独特的生物矿化功能。在 pH7.4 和生理性钙磷浓度下能形成坚硬的矿化外壳覆盖于菌体周围<sup>[13]</sup>。国内有学者<sup>[14]</sup>曾将结石患者血清培养所得的纳米细菌注射至大鼠体内,并成功建立了大鼠肾结石模型,同时发现纳米细菌可通过损伤肾小管上皮细胞的机制诱导大鼠肾小管内产生含钙结晶,从而促进肾结石的形成。

20 世纪 30 年代,Randall 通过对 1 000 例非选择性尸肾的研究,报告尸肾的肾乳头上皮组织下存在着一种钙化斑块,认为这些钙化斑出现在肾乳头上,本身对肾脏并不会造成明显的损害,并称之为 Randall 斑。Randall 根据他所发现的 Randall 斑,结合其研究实践并对相关的机理推测,形成了肾乳头钙化斑块尿石形成的主要学说。Kajander 等<sup>[4]</sup>引证该学说,提出了纳米细菌导致肾集合管及

肾乳头的损害,并结合其自身的生物矿化作用形成磷酸钙核心,从而逐渐诱发肾结石的学说。

随着研究一步步深入,Evan等<sup>[7]</sup>研究肾结石时发现这些斑块起源于Henle环的基底膜部位,并传播到乳突间隙,进而形成结石。而Randall斑块早期的微小斑块与所研究的人类组织中纳米细菌周围的斑块在形态学上有很大的相似性,因此怀疑纳米细菌在斑块形成过程中起着重要作用<sup>[15]</sup>。

Martel等<sup>[16]</sup>提出锰、钙等起沉淀作用的离子可在纳米细菌外形成一层坚硬的矿化被膜,并且只有当离子大量存在并超过机体本身的抵抗力时,结石颗粒才会生长聚集,并向结晶发展。因此,纳米细菌的生物矿化作用是需要一定条件的。随后,他们通过对从血清中分离的膜囊进行研究,得出膜囊通过结合培养液中钙离子及磷酸盐离子而导致了矿化沉淀的形成<sup>[17]</sup>。这种观点后来也被Mosa等<sup>[18]</sup>证实。

Chabriere等<sup>[19]</sup>将航天飞行员的尿路结石通过傅里叶变换红外光谱学及能量弥散X线光谱学检测其化学组成成分,并利用扫描电镜观察结石的晶体形态学,结果显示,结石主要成分为磷灰石;而当他们将结石脱矿化并行免疫荧光检测及电镜下负染法时,他们观察到其内部扫描电镜结果与纳米细菌的钙化外壳一致。为此,他们认为结石的形成与纳米细菌的生物矿化作用有很大的联系。

最近,Wu等<sup>[20]</sup>通过对血管平滑肌细胞中纳米细菌的提取、培养、观察等再次证明,纳米细菌的矿化颗粒由钙及磷构成,纳米细菌即是矿化外壳的核心,它可以聚集环境中的钙离子并形成矿化纳米颗粒。因此,纳米细菌以其独特的矿化能力,可作为活性中心,粘附、侵入并破坏肾集合管的上皮细胞和肾乳头细胞,形成磷灰石晶核,从而诱发结石形成<sup>[8]</sup>。

可以看出,不管是钙化还是结石,均离不开纳米细菌独特的生物矿化作用,特别是磷酸钙沉淀或磷酸钙结石,都是以纳米细菌为核心,通过不断结合钙离子,逐步在其周围聚集,最终形成沉淀,从而进一步形成钙化、结石等<sup>[21]</sup>。

## 5 总结

纳米细菌的发现是人类历史上重大的一步,它本身的存在以及它独特的生物矿化作用让更多的学者为之着迷,除泌尿系结石外,纳米细菌被证明在多种疾病的发生过程中起着重要作用,如血管的钙化<sup>[22,23]</sup>、胎盘的钙化<sup>[24~26]</sup>、二尖瓣环钙化<sup>[27]</sup>、牙结石<sup>[21,28]</sup>、胆结石<sup>[29]</sup>、Ⅲ型前列腺炎<sup>[30]</sup>等。在治疗上,目前已有学者<sup>[30]</sup>通过四环素治疗纳米细菌所致的间质性膀胱炎,效果显著。

对于泌尿系结石来说,纳米细菌的这一发现对其致病机制及治疗方案产生了很大的影响。纳米

细菌通过各种途径进入血液,依靠粘附血液中的钙、磷等离子以及自身的生物矿化作用形成矿化颗粒,进而形成结石<sup>[18]</sup>。目前证实纳米细菌与肾结石存在关系的依据是<sup>[31]</sup>:①95%肾结石患者血液、尿液和结石中均可检测出纳米细菌;②纳米细菌具有磷酸钙外壳,易于形成结石核心,经过晶体的进一步矿化而形成结石;③纳米细菌的动物实验可做出肾结石的模型。

## [参考文献]

- 1 叶章群,邓耀良,董诚主编. 泌尿系结石[M]. 北京:人民卫生出版社,2003:102-109.
- 2 Kajander E O, Ciftcioglu N. Nanobacteria: an alternative mechanism for pathogenic intra- and extra-cellular calcification and stone formation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(14):8274-8279.
- 3 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.
- 4 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.
- 5 Shiekh F A, Khullar M, Singh S K. Lithogenesis: induction of renal calcifications by nanobacteria[J]. Urol Res, 2006, 34(1): 53-57.
- 6 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.
- 7 Evan A P, Lingeman J E, Coe F L, et al. Randall's plaque of patients with nephrolithiasis begins in basement membranes of thin loops of Henle[J]. J Clin Invest, 2003, 111(5): 607-16.
- 8 Wu C Y, Young L, Young D, et al. Bions: A family of biomimetic mineralo-organic complexes derived from biological fluids[J]. PLoS One, 2013, 8(9): e75501.
- 9 Wu C Y, Martel J, Cheng W Y, et al. Membrane vesicles nucleate mineralo-organic nanoparticles and induce carbonate apatite precipitation in human body fluids[J]. J Biol Chem, 2013, 288(42): 30571-30584.
- 10 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 Biomaterialia, 2010, 6(10): 4065-4072.
- 11 Jones J A, Ciftcioglu N, Schmid J F, et al. Calcifying Nanoparticles (nanobacteria): an additional potential factor for urolithiasis in space flight crews[J]. Urology, 2009, 73(1): 210. e11-210. e13.
- 12 Hunter L W, Charlesworth J E, Yu S, et al. Calcifying nanoparticles promote mineralization in vascular smooth muscle cells: implications for atherosclerosis [J]. Int J Nanomedicine, 2014, 9: 2689-2698.
- 13 任海林,颜东文,史葆光,等. 上尿路结石中纳米细菌的

- 检测[J]. 中华泌尿外科杂志, 2006, 27(9): 620—620.
- 14 胡卫国, 王晓峰, 徐涛, 等. 纳米细菌大鼠肾结石模型初步建立及成石因素分析[J]. 北京大学学报, 2010, 42(4): 433—435.
- 15 Guo Y, Zhang D, Lu H, et al. Association between calcifying nanoparticles and placental calcification[J]. *Int J Nanomedicine*, 2012, 7: 1679—1686.
- 16 Martel J, Young J D. Purported Nanobacteria in Human Blood as Calcium Carbonate Nanoparticles [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(14): 5549—5554.
- 17 Raoult D, Drancourt M, Azza S, et al. Nanobacteria are mineralo fetuin complexes[J]. *PLoS Pathog*, 2008, 4(2): e41.
- 18 Mosa O F, Mohamad I H, Salama M M. Relationship between fetuin-A and systemic lupus erythematosus as a predictor marker for atherosclerosis[J]. *Am Med J*, 2012, 3: 249—254.
- 19 Chabriere E, Gonzalez D, Azza S, et al. Fetuin is the key for nanon self-propagation [J]. *Microb Pathog*, 2014, 73: 25—30.
- 20 Wu C Y, Martel J, Young D, et al. Fetuin-A/albumin-mineral complexes resembling serum calcium granules and putative nanobacteria; demonstration of a dual inhibition-seeding concept [J]. *PLoS One*, 2009, 4(11): e8058.
- 21 Zeng J, Yang F, Zhang W, et al. Association between dental pulp stones and calcifying nanoparticles [J]. *Int J Nanomedicine*, 2011, 6: 109—118.
- 22 Schlieper G, Kruger T, Heiss A, et al. A red herring in vascular calcification: 'nanobacteria' are protein-mineral complexes involved in biomineralization [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2011, 26(11): 3436—3439.
- 23 Cenizo Revuelta N, Gonzalez-Fajardo J A, Bratos M A, et al. Role of calcifying nanoparticle in the development of hyperplasia and vascular calcification in an animal model [J]. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2014, 47(6): 640—646.
- 24 Pasquinelli G, Papadopulos F, Nigro M. Nanobacteria and psammoma bodies: ultrastructural observations in a case of pathological placental calcification [J]. *Ultrastruct Pathol*, 2010, 34(6): 344—350.
- 25 Lu H, Guo Y N, Liu S N, et al. Nanobacteria may be linked to calcification in placenta [J]. *Ultrastruct Pathol*, 2012, 36(3): 160—165.
- 26 Lu H, Guo Y N, Liu S N, et al. Isolation, cultivation and identification of nanobacteria from placental calcification [J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2012, 25(11): 2182—2185.
- 27 Candemir B, Ertas F S, Kaya C T, et al. Association between antibodies against calcifying nanoparticles and mitral annular calcification [J]. *J Heart Valve Dis*, 2010, 19(6): 745—752.
- 28 Zhang S M, Tian F, Jiang X Q, et al. Evidence for calcifying nanoparticles in gingival crevicular fluid and dental calculus in periodontitis [J]. *J Periodontol*, 2009, 80(9): 1462—1470.
- 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 Zhang Q H, Shen X C, Zhou Z S, et al. Decreased nanobacteria levels and symptoms of nanobacteria-associated interstitial cystitis/painful bladder syndrome after tetracycline treatment [J]. *Int Urogynecol J*, 2010, 21(1): 103—109.
- 31 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.

(收稿日期: 2015-01-19)

## 投稿基本要求

本刊采用远程投稿处理系统, 凡投寄本刊的稿件, 请使用电子版按要求投寄至“<http://www.whuhzss.com>”(选择《临床泌尿外科杂志》)投稿系统。投稿系统一旦收到稿件, 即自动发回“收稿回执”并通知编号。作者可根据此编号上网查询稿件处理情况。凡寄给个人的稿件, 本刊一律不予受理; 凡通过 E-mail 投寄的稿件, 本刊均不算正式投稿(编辑部通知除外)。作者投稿时请注明自身有效的联系方式和通信作者及其有效的联系方式(手机和电子邮箱), 以备及时联系。

《临床泌尿外科杂志》编辑部