

腹主动脉粥样硬化斑块中纳米细菌的培养与鉴定

耿文茂 张倩 吴亚光 秦成坤 苏忠学

【摘要】 目的 观察腹主动脉粥样硬化斑块中是否存在纳米细菌,并对其进行鉴定。**方法** 12 例腹主动脉粥样硬化斑块及 12 例正常动脉血管组织研磨,取上清液培养。8 周后收集培养瓶底白色粉末,用纳米细菌单克隆抗体间接免疫荧光法对其进行检测,并利用电镜进一步观察。**结果** 12 例动脉粥样硬化斑块中 10 例纳米细菌检测阳性,2 例阴性,12 例正常动脉血管组织中 1 例纳米细菌检测阳性,11 例阴性,差异有统计学意义($P < 0.05$)。纳米细菌单克隆抗体间接免疫荧光检测时可发出绿色荧光,电镜下测量纳米细菌直径约为 100 ~ 300 nm。**结论** 腹主动脉粥样硬化斑块中存在纳米细菌,它可能导致粥样硬化斑块不稳定。

【关键词】 纳米细菌; 粥样硬化斑块; 不稳定; 免疫荧光

The culture and detection of nanobacteria in abdominal aorta atherosclerotic plaque GENG Wen-Mao*, ZHANG Qian, WU Ya-Guang, QIN Cheng-Kun, SU Zhong-Xue. *Department of Hepatobiliary Surgery, Shandong Provincial Hospital affiliated to Shandong university, Shandong Province, Jinan 250021, China

Corresponding author: GENG Wen-Mao, Email: geng_wenmao@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To investigate whether the nanobacteria exists in abdominal aorta atherosclerotic plaque or not and detect it. **Methods** 12 case of abdominal aorta atherosclerotic plaques and 12 case of normal artery were grinded, the supernatant fluid was cultured for eight weeks. Subsequently, the white extract from the culture flask was detected by nanobacteria monoclonal antibody immunofluorescence and electron microscope. **Results** Nanobacteria was positive in 10 case of atherosclerotic plaques but only in 1 case of normal artery, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Green fluorescence could be present during indirect immunofluorescence detection. The size of nanobacteria was measured ranging from 100nm to 300nm by electron microscope analysis. **Conclusion** Nanobacteria was detected in abdominal aorta atherosclerotic plaques and might led to atherosclerotic plaques instability.

【Key words】 Nanobacteria; Atherosclerotic plaque; Unstability; Immunofluorescence

腹主动脉粥样硬化斑块不稳定易造成严重后果,但确切机制目前仍未阐明。既往研究集中于局部血流动力学改变对斑块的影响,1993 年以来炎症假说逐渐受到重视^[1-2],该学说认为微生物感染扮演重要角色。目前对这些可疑感染因子的研究主要集中于肺炎衣原体^[3]、幽门螺旋杆菌^[4]、巨细胞病毒^[5-6]等多种微生物。但是这些微生物均不能解释动脉粥样硬化斑块中钙化斑块的存在。纳米细菌是最近发现的一类具有特殊矿化能力的微生物,且纳米细菌存在于 8% 左右的正常人血清中^[7],它的矿化能力使研究者将其与动脉粥样硬化斑块不稳定的发病机制联系起来。那么,纳米细菌是否存在于腹主动脉粥样硬化斑块中,是否会导致动脉粥样硬化斑块不稳定?本研究旨在探讨腹主

动脉粥样硬化斑块中是否存在纳米细菌及其作用。

材料与方法

1. 一般资料:实验组:新鲜腹主动脉粥样硬化斑块标本 12 例来自我院手术患者。对照组:来源于我院骨科急诊手术截肢的肱动脉 3 例,尺动脉 2 例,桡动脉 3 例,股动脉 2 例,胫后动脉 2 例。高速低温离心机、超净工作台、CO₂ 细胞培养箱、Nikon300 型自动摄像倒置显微镜,高糖 DMEM(美国 Gibco 公司)、40 nm 过滤的特级胎牛血清(天津 TBD 公司)、纳米细菌单克隆抗体(芬兰 Nanobac 试剂公司)、Hoechst33258、免疫荧光二抗免疫组织化学试剂盒(晶美生物公司)。

2. 培养基培养:经 40 nm 滤器过滤的含 10% 特级胎牛血清 DMEM 培养基 10 ml 做 1 个月试培养,观察是否被其他微生物污染及所用胎牛血清是否含有纳米细菌。

3. 动脉粥样硬化斑块中纳米细菌的培养:新鲜腹主动脉粥样硬化斑块及对照组动脉组织放入消毒碾钵中,磨碎。加入生理盐水 5 ~ 10 ml,碾成匀浆,低速离

DOI:10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2012.02.055

作者单位:250021 济南,山东大学附属省立医院肝胆外科(耿文茂、吴亚光、秦成坤、苏忠学);济南市长青区人民医院内三科(张倩)

通信作者:耿文茂,Email:geng_wenmao@yahoo.com.cn

心(1000 r/min)5 min。取上清液,0.22 μm 滤菌器过滤,加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液 5 ml。置于 37 ℃、5% CO₂ 和 95% 空气条件下 CO₂ 孵箱内。每周显微镜下观察 1~2 次,30 d 换液 1 次,操作过程严格遵循无菌技术,培养 8 周。

4. 纳米细菌单克隆抗体间接免疫荧光染色鉴定:实验组和对照组标本培养 8 周后,每瓶取培养液 0.5 ml,常温离心,转速 13 200 r/min,时间 5 min,吸除上清液,沉淀物用磷酸盐缓冲液(PBS)0.5 ml 洗涤 2 次,每次洗涤后按上述转速及时间离心,弃上清液,将沉淀用少量 PBS 稀释后涂片,防尘自然风干,75 ℃ 烤箱烤 10 min,4 ℃ 冰箱保存。培养液涂片用 250 μl PBS 液湿化 5 min,吸干水分,150 μl 3% 的脱脂奶粉液封片 10 min,实验组片及对照组片加 150 μl 一抗应用液,防尘保存 1 h,吸干,250 μl PBS 洗 3 次,每次 3 min,吸干,转入暗室操作,加二抗应用液 150 μl,染色 30 min,吸干,PBS 洗 3 次,在蒸馏水中漂洗 5 s,滤纸吸干,荧光显微镜下观察。紫外光下找到观察平面,转到激发波长,绿色荧光者即为纳米细菌。

5. 纳米细菌的电镜鉴定:纳米细菌单克隆抗体免疫荧光检测阳性的培养菌液 3 ml 加入 EP 管中,13 200 r/min 离心 1 min,PBS 洗涤后弃上清液,离心洗涤,重复 3 次,弃上清液用滤纸充分吸干水分,加 3% 戊二醛固定 2 h,锇酸固定 2 h。磷酸缓冲液冲洗 2 次,1% 醋酸双氧铀染色 1 h。50%、70%、90% 乙醇各脱水 10 min,100% 乙醇脱水 1 次,100% 丙酮脱水 1 次,每次 10 min。丙酮与包埋剂 1:1 混合液浸透 1 h 以上,纯包埋剂浸透,37 ℃ 过夜,60 ℃ 固化 48 h。降温、切片、上机观察。

6. 统计学方法:应用 SPSS 13.0 统计软件分析,采用 χ^2 检验。

结 果

1. 纳米细菌的单克隆抗体免疫荧光检测:纳米细菌单克隆抗体免疫荧光检测可见,黑色背景下均匀分布的绿色亮点,即为纳米细菌。完全培养基未见纳米细菌生长。12 例动脉粥样硬化斑块中 10 例纳米细菌阳性,12 例正常血管组织仅 1 例检测有纳米细菌生长,其余 11 例未见纳米细菌生长。 χ^2 检验两组差异有统计学意义($P < 0.05$,表 1)。

表 1 实验组和对照组纳米细菌荧光检测结果

组别	阳性例数	阴性例数
实验组	10	2
对照组	1	11

注: $\chi^2 = 13.59, P < 0.05$

2. 纳米细菌电镜检测结果:纳米细菌单克隆抗体免疫荧光检测阳性的 10 例实验组标本和 1 例对照组标本电镜检测可见:扫描电镜下纳米细菌成球状或杆状,大小不等,略显灰白,菌体互相连接,缠绕。透射电镜下纳米细菌密度较高,部分可见中央光亮区域,略显灰白,与外周壁比较有明显密度差异,透光区外包裹着一层较高密度外壳。电镜照片可清楚显示,部分外壳边缘有毛刺样结构,不同纳米细菌的外壳厚薄不同,同一细菌周边外壳也同样厚薄不一。纳米细菌的大小不等,测量可见其直径在 100~300 nm 之间。

3. 纳米细菌的光镜观察:纳米细菌单克隆抗体检测阳性的标本培养液 400 倍倒置显微镜下观察发现:绿色背景下可见黑色小颗粒,部分细颗粒可见到空泡结构,细菌大小不等,散在分布,运动缓慢且运动幅度较小,部分汇合成团,贴壁生长,少部分悬浮,运动方向随意性强。

讨 论

纳米细菌是 1988 年芬兰科学家 Kajander^[8] 在进行细胞培养时偶然发现的一种革兰氏阴性菌,呈球状或杆状,细胞壁厚,无荚膜与鞭毛结构,约 50~500 nm,可通过 0.1~0.4 μm 的滤菌膜,体积极小,通过电子显微镜和其他高分辨率显微镜可辨认。目前研究认为纳米细菌可能与尿路结石^[9]、肝胆系统结石^[10]、牙周结石、牙龈炎症^[11] 等疾病有密切关系。

鉴定纳米细菌最有价值方法是单克隆抗体间接免疫荧光染色法^[8],纳米细菌在紫外光下不发光但被激发后可发出绿色荧光。实验组标本中 10 例纳米细菌检测阳性,2 例纳米细菌检测阴性。对照组 1 例纳米细菌检测阳性,11 例纳米细菌检测阴性,两组之间差异有统计学意义,这说明腹主动脉粥样硬化斑块中存在纳米细菌。正常对照组中出现纳米细菌阳性的原因可能与中国人中存在 8% 的纳米细菌阳性率有关^[7]。那么,存在于动脉粥样硬化斑块中的纳米细菌的作用是什么?

既往炎症假说等均无法解释粥样斑块中大量钙化物质形成。纳米细菌的发现为这些问题的解决提供了一种新的思路,由于纳米细菌具有独特矿化能力,我们认为其可能参与动脉粥样硬化斑块的形成及不稳定的发病,目前众多研究也支持这种可能,已经有学者从心脏瓣膜及动脉瘤中分离出纳米细菌^[12];使用由依地酸钙钠(EDTA)和四环素结合而成的复方依地酸钙钠(comET,一种体外使用证明对纳米细菌有效的制剂)来治疗已经确诊冠心病患者^[13],治疗 4 个月对冠状动脉钙化重新进行评分,第 2 和第 4 个月时检测血液

中纳米细菌抗原水平,77 例患者完成了此项研究,其中 44 例纳米细菌血清抗原检测阳性患者冠状动脉钙化计分明显下降,33 例阴性者冠状动脉钙化计分则无变化或升高,19 例心绞痛症状患者中 16 例症状减轻或完全消失。此外,纳米细菌可能分泌一些细胞毒素及细胞因子(如内毒素、脂多糖、白细胞介素等),引起被感染细胞死亡^[14]。体外实验表明纳米细菌能够结合哺乳动物细胞,通过内吞作用而进入细胞内,哺乳动物静脉注射纳米细菌可经尿路排出,在大鼠可引起肾小管和肾乳头上皮细胞凋亡和脱落^[15]。因此,粥样斑块中存在的纳米细菌可能参与动脉粥样硬化形成且作为一种感染性物质破坏了斑块稳定性,致使斑块容易破裂,引发血栓或栓塞,但具体机制仍待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 1993, 362: 801-809.
- [2] 王育林, 江森, 赵欣, 等. β -钙联蛋白在兔腹主动脉粥样硬化斑块中的表达. *中华实验外科杂志*, 2006, 23: 1100.
- [3] Grayston JT. Background and current knowledge of Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis. *J Infect Dis*, 2000, 181: 402-410.
- [4] Rožanković PB, Huzjan AL, Cupić H, et al. Influence of CagA-positive Helicobacter pylori strains on atherosclerotic carotid disease. *J Neurol*, 2011, 258: 753-761.
- [5] Tremolada S, Delbue S, Ferrareso M, et al. Search for genomic sequences of microbial agents in atherosclerotic plaques. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2011, 24: 243-246.
- [6] 夏豪, 谭安安, 王志维, 等. 巨噬细胞炎症蛋白-1 α 在大鼠主动脉斑块中的表达及其与血管生成的关系. *中华实验外科杂志*, 2007, 24: 1254-1256.
- [7] 王学军, 刘威, 杨竹林, 等. 部分健康成年人群血清纳米细菌感染的调查. *中华流行病学杂志*, 2004, 25: 492-493.
- [8] Kajander EO. Culture and detection method for sterile filterable autonomously replicating biological particles. U S Patent, 1992, 135: 851.
- [9] Kumon H, Matsumoto A, Uehara S, et al. Detection and isolation of nanobacteria-like particles from urinary stones; long-withheld data. *Int J Urol*, 2011, 18: 458-465.
- [10] Wen Y, Li YG, Yang ZL, et al. Detection of nanobacteria in serum, bile and gallbladder mucosa of patients with cholecystolithiasis. *Chin Med J*, 2005, 118: 421-424.
- [11] Zeng J, Yang F, Zhang W, et al. Association between dental pulp stones and calcifying nanoparticles. *Int J Nanomedicine*, 2011, 6: 109-118.
- [12] Candemir B, Ertas FS, Kaya CT, et al. Association between antibodies against calcifying nanoparticles and mitral annular calcification. *J Heart Valve Dis*, 2010, 19: 745-752.
- [13] Maniscalco BS, Taylor KA. Calcification in coronary artery disease can be reversed by EDTA-tetracycline long-term chemotherapy. *Pathophysiology*, 2004, 11: 95-101.
- [14] Tulunay KC, Sinan EF, Hasan T, et al. Anticalcifying nanoparticle antibody titer is an independent risk factor for coronary artery calcification. *Coron Artery Dis*, 2011, 22: 394-400.
- [15] Hjelte JT, Miller-Hjelte MA, Poxton IR, et al. Endotoxin and nanobacteria in Polycystic kidney disease. *Kidney Int*, 2000, 57: 2360-2374.

(收稿日期: 2011-07-20)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

中华医学会系列杂志从 2009 年开始标注数字对象惟一标识符

数字对象惟一标识符 (digital object identifier, DOI) 是对包括互联网信息在内的数字信息进行标识的一种工具。在传统的出版物中, 书刊、磁带、光盘都有国际标准编号 (ISBN、ISSN、ISCN) 及其条形码, 作为出版物的惟一标识。这些标识使出版物得到有效的管理, 便于读者查找和利用。而网上的文档一旦变更了网址便无从追索。数字信息标注 DOI 如同出版物的条形码, 是一个永久和惟一的标识号。随着时间推移, 数字对象的某些有关信息可能会有变化 (包括存储的物理位置), 而 DOI 可让使用者直接由此链接到出版商的数据库、文献、摘要甚至是全文, 识别码可以直接指引到出版物的本身, 使国内外各种来源、不同物理地址的各种类型的学术信息实现互链互通。DOI 是一个可供全球期刊快速链接的管理系统, 整个系统由国际 DOI 基金会 (IDF) 进行全球分布式管理。随着 DOI 的普及, 可以借助其进行相关的科研评价, 分析高被引频次作者、单位和论文等相关信息, 了解各个领域学术研究的热点、影响和趋势, 以及研究者在本研究领域的影响力及最新研究成果。中文和外文资源, 一次和二次文献, 科技文献和数据通过 DOI 可实现动态的、开放式的知识链接, 整体提升包括期刊在内的数字资源的使用率, 为读者提供更好的服务。进而逐步提高中国期刊的被引率, 整体上提高中国精品期刊在国际上的影响度和显示度, 最终推动并建立一个与世界接轨的、永久的、开放互动、成员主动参与、覆盖主要学术研究信息领域的知识链接系统, 推动数字期刊的发展和繁荣。

为了实现中华医学会系列杂志内容资源的有效数字化传播, 同时保护这些数字资源在网络链接中的知识产权和网络传播权, 为标识对象的版权状态提供基础, 实现对数字对象版权状态的持续追踪, 自 2009 年第 1 期开始, 中华医学会系列杂志纸版期刊和数字化期刊的论文将全部标注 DOI。即中华医学会系列杂志除科普和消息类稿件外, 其他文章均需标注 DOI, DOI 标注于每篇文章首页脚注的第 1 项。由中华医学会杂志社各期刊编辑部为决定刊载的论文标注 DOI。

参照 IDF 编码方案 (美国标准 ANSI/NISO Z39. 84-2000) 规定, 中华医学会系列杂志标注规则如下: “DOI: 统一前缀/学会标识. 信息资源类型. 杂志 ISSN. * * * * - * * * * . 年. 期. 论文流水号”。即: “DOI: 10. 3760/cma. j. issn. * * * * - * * * * . yyyy. nn. zzz”。

中华医学会系列杂志标注 DOI 各字段释义: “10. 3760” 为中文 DOI 管理机构分配给中华医学会系列杂志的统一前缀; “cma” 为中华医学会 (Chinese Medical Association) 缩写; “j” 为 journal 缩写, 代表信息资源类别为期刊; “issn. * * * * - * * * * ” 为国际标准连续出版物号 (ISSN); “yyyy” 为 4 位出版年份; “nn” 为 2 位期号; “zzz” 为 3 位本期论文流水号。

中华医学会杂志社