

# 年龄相关性白内障患者房水中纳米细菌的培养和检测

郑幼平<sup>1</sup>, 蓝兴锐<sup>2</sup>, 郭少琼<sup>2</sup>, 刘洁梅<sup>1</sup>, 王桂芳<sup>3</sup>

基金项目: 中国广州市番禺区科技攻关计划资助项目 (No. 2009-Z-123-1)

作者单位: (511400) 中国广东省广州市番禺区中医院<sup>1</sup> 眼科; <sup>2</sup> 检验科; <sup>3</sup> (510630) 中国广东省广州市, 暨南大学第一附属医院眼科

作者简介: 郑幼平, 男, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 白内障、眼视光学。

通讯作者: 郑幼平. zhengyouping2004@163.com

收稿日期: 2011-11-16 修回日期: 2011-12-09

## Cultivation and identification of nanobacteria in aqueous humor of patients with age-related cataract

You-Ping Zheng<sup>1</sup>, Xing-Rui Lan<sup>2</sup>, Shao-Qiong Guo<sup>2</sup>, Jie-Mei Liu<sup>1</sup>, Gui-Fang Wang<sup>3</sup>

Foundation item: Panyu District Program for Tackling Key Problems in Science and Technology, Guangzhou, China (No. 2009-Z-123-1)

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology; <sup>2</sup>Department of Laboratory, Panyu District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 511400, Guangdong Province, China; <sup>3</sup>Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China

Correspondence to: You-Ping Zheng, Department of Ophthalmology, Panyu District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 511400, Guangdong Province, China. zhengyouping2004@163.com

Received: 2011-11-16 Accepted: 2011-12-09

## Abstract

• AIM: To isolate, culture and identify the nanobacteria (NB) from aqueous humor of patients with age-related cataract in our department.

• METHODS: Sample nanobacteria in aqueous humor of 30 patients with age-related cataract were collected for NB culture in this study. Immunohistochemistry, transmission electron microscopy (TEM) were used to investigate the appearance and components of cultured NB.

• RESULTS: Twelve aqueous samples out of 30 (40%) showed growth of NB, 1 of 5 showed growth of NB in the saline control group, but none growth in the control group. TEM showed needle-like nanobacteria aggregates of different sizes.

• CONCLUSION: For the first time we isolated, cultured and identified nanobacteria in aqueous of patients with age-related cataract, indicating that nanobacteria infection is related with age-related cataract.

• KEYWORDS: age-related cataract; nanobacteria;

infection; aqueous humor

Zheng YP, Lan XR, Guo SQ, *et al.* Cultivation and identification of nanobacteria in aqueous humor of patients with age-related cataract. *Guji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(1):98-100

## 摘要

目的: 分离、培养与检测年龄相关性白内障房水中的纳米细菌 (nanobacteria, NB), 为进一步探讨 NB 致白内障的机制奠定基础。

方法: 白内障超声乳化联合人工晶状体植入手术术前收集 30 份房水标本, 通过脱矿、过滤、离心处理, 用细胞培养的方法进行 NB 培养, 观察其生长情况。采用免疫组织化学、透射电镜方法观察培养物形态。

结果: 培养 6wk 后, 对培养标本进行观察, 发现 12 瓶 (40%) 培养液中存在絮状漂浮成团的 NB, 并且其中 8 瓶培养液瓶底亦可见贴壁生长的成团的或散在分布的颗粒沉淀状 NB; 对照组一看见 1 例絮状漂浮, 并可见管底颗粒沉淀; 对照组二未见絮状漂浮和颗粒沉淀。透射电镜可见 NB 为针状物的聚集体, 大小不一。

结论: 从年龄相关性白内障患者房水中分离培养鉴定出 NB, 表明其感染与白内障发病可能有关, 需进一步研究其致病机制。

关键词: 年龄相关性白内障; 纳米细菌; 感染; 房水

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2012.01.31

郑幼平, 蓝兴锐, 郭少琼, 等. 年龄相关性白内障患者房水中纳米细菌的培养和检测. 国际眼科杂志 2012;12(1):98-100

## 0 引言

纳米细菌 (nanobacteria, NB) 是近年发现的一种感染谱极广而且广泛存在于矿物质和生物体内的原核微生物, 能感染人类和牛、鹿等多种哺乳动物<sup>[1]</sup>。目前已被证实与 NB 有关的疾病有: 肾结石、胆结石、动脉粥样硬化、钙化性主动脉狭窄、睾丸结石、不孕不育, 牙髓结石, 软化斑、硬皮病、关节炎、老年痴呆症、松果体钙化、肿瘤等疾病。NB 与一些人体内组织的病理性钙化和硬化的发生、发展密切相关<sup>[2]</sup>。NB 的生物学特性是体积微小, 可以穿透所有细胞并在细胞内寄宿, 对机体的影响是并不引起急性炎症反应, 而是发生病理性钙化和组织硬化<sup>[3]</sup>。白内障患者晶状体组织硬化和组织钙化是白内障手术医师和研究学者对白内障患者晶状体组织病理学认识不争的事实。年龄相关性白内障的临床表现和病程进展不一, 不能排除多种发病机制参与的可能, 如果房水中分离培养鉴定出 NB, 表明其感染与白内障发病可能有关。房水中是否存在 NB, 国内外尚无报道。本研究采用免疫组织化学、透射电镜 (TEM) 方法对本院眼科年龄相关性白内障患者房水中 NB 进行观察研究, 以了解患者房水中 NB 的感染情况。

## 1 对象和方法

**1.1 对象** 选择 2009-06/12 在广州市番禺区中医院眼科接受白内障超声乳化联合人工晶状体植入手术治疗的年龄相关性白内障患者 30 例 30 眼, 参照 Emery 及 Little 晶状体核硬度分级标准: II 级核 8 例 8 眼, III 级核 15 例 15 眼, IV 级核 7 例 7 眼; 排除青光眼、葡萄膜炎等眼局部疾病及糖尿病、高血压等全身疾病。手术前无菌操作留取患者房水液标本 0.2mL 做 NB 培养与检测。仪器与试剂: 芬兰 Nanobac 公司鼠纳米细菌单克隆抗体 8D10, 美国 Gibco 公司 1640 培养基, 美国 Gibco 公司  $\gamma$ 2FBS, 北京中山金桥公司山羊抗小鼠 IgG, Millipore 公司 0.22 $\mu$ m 和 0.45 $\mu$ m 细菌滤器, HITACHI-600 型透射电镜。

### 1.2 方法

**1.2.1 纳米细菌的分离与培养** NB 的分离: 将无菌条件下采集的房水液标本 0.2mL 置于离心机 1500r/min 离心 5min, 取上清液依次经过 0.45 $\mu$ m 和 0.22 $\mu$ m 滤器过滤至细胞培养瓶中; 培养液的处理: 将含 100mL/L (体积分数)  $\gamma$  射线灭活的胎牛血清 ( $\gamma$ 2FBS) 的 1640 培养基在 56 $^{\circ}$ C 的水浴锅中热灭活 30min; NB 的培养: 将分离的 NB 加入培养瓶中, 在 37 $^{\circ}$ C, 50mL/L (体积分数) CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱中培养, 每 30d 换液 1 次。另外, 分别将 5 份生理盐水加 1640 培养基培养、5 份含 100mL/L (体积分数)  $\gamma$ 2FBS 的 1640 培养基, 作为对照组一和对照组二同样条件下培养。

**1.2.2 纳米细菌的鉴定与观察** 免疫组织化学染色法: 将黏附有 NB 的载玻片重复 3 次用 PBS 洗, 2min/次; 然后滴加 30mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温 10min 消除内源性过氧化氢酶活性, 重复 3 次用 PBS 洗, 2min/次; 血清封闭; 再滴加体积比 1:40 的 8D10, 放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存过夜; 次日将标本从冰箱中取出后置于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱复温 1h, 重复 3 次以 PBS 洗去一抗 (8D10), 2min/次; 滴加二抗 (中山金桥抗小鼠 IgG) 孵育 45min, 以 PBS 重复 3 次清洗, 2min/次; 用 AEC 染色剂显色 1~3min, 封片观察。透射电镜观察: 将培养的 NB 用 30mL/L 戊二醛固定, 将 NB 悬液滴加于 200 目的有膜镍网上 10min, 将镍网置入含 1mol/L 氢氧化钠和 10g/L 磷钨酸的混合溶液中染色 3min, 白炽灯烤干, 电镜观察。

统计学分析: 资料用 SPSS 10.0 软件行数据处理, 采用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 细菌培养液** 的观察 本研究共入选年龄相关性白内障患者 30 例 30 眼, 房水标本培养 6wk 后, 可见有 6 瓶培养液轻度混浊, 并可见大量灰白色小沉淀; 光镜下可见 12 瓶 (40%) 培养液中存在白色沉淀状贴壁生长的成团的 NB, 并且其中 5 培养瓶底亦可见絮状漂浮成团的 NB 或散在分布的; 对照组一可见 1 例絮状漂浮, 并可见管底白色沉淀; 对照组二未见絮状漂浮和白色沉淀; 各组絮状漂浮和白色沉浮的比较, 差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 22.216, P = 0.000; \chi^2 = 32.477, P = 0.000$ ), 房水分离培养 NB 的生长情况见表 1。

### 2.2 纳米细菌的鉴定结果

**2.2.1 免疫组织化学染色** 在油镜 ( $\times 1000$ ) 下观察, 可见球形或球杆状的 NB 呈成团或散在分布, NB 大小约为 100~500nm (图 1)。

**2.2.2 透射电镜观察** 标本可见直径约 200nm 的纳米颗

表 1 房水分离培养纳米细菌的生长情况

组别	n	絮状漂浮阳性	白色沉淀阳性
对照组一	5	1	1
对照组二	5	0	0
II 级核组	8	1	3
III 级核组	15	2	6
IV 级核组	7	2	3

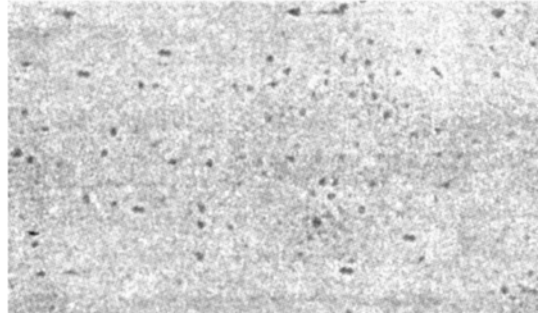


图 1 油镜下的纳米细菌 ( $\times 1000$ )。

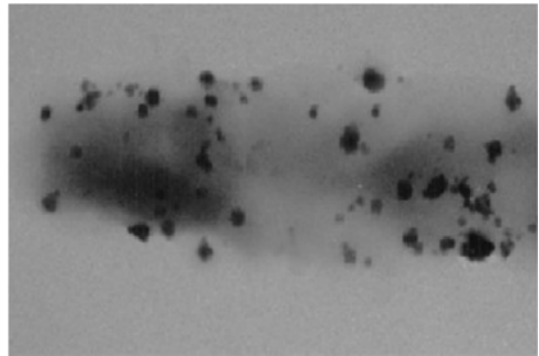


图 2 透射电镜下的纳米细菌 ( $\times 10000$ )。

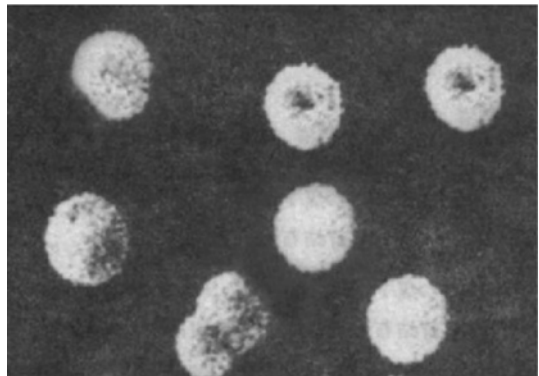


图 3 透射电镜下的纳米细菌 ( $\times 25000$ )。

粒分布于细胞基质, 椭圆形结构, 密度不均, 纳米颗粒为非细胞内结构, 初步认定为 NB (图 2, 3)。

## 3 讨论

1988 年, 芬兰 Kajander 教授发现了一种目前所知最小的生命体, 命名为“纳米细菌” (nanobacteria, NB), 其生长于细胞内, 属革兰氏阴性菌, 呈球状或球杆状, 细胞壁厚, 无荚膜与鞭毛, 直径 50~500nm, 可通过 0.1~0.4 $\mu$ m 的滤菌膜。NB 有一种独特功能, 即“生物矿化”作用——在 pH7.4 和生理性钙磷浓度中能形成羟磷灰石碳酸盐结晶, 从而在菌体的周围形成一层坚硬的外壳覆盖于菌体表面, 使其在高温、强酸等许多微生物难以生存的条件下仍然能够存活<sup>[2,4]</sup>。NB 能感染机体任何组织和细胞, 并与

被感染细胞建立一种寄生关系<sup>[4]</sup>。NB能分泌钙化的脂多糖生物膜,毒性较大,能引起受感染细胞空泡形成,组织的炎症,并引起多种相关炎症因子反应,与人类病理性钙化类疾病密切相关。文字等<sup>[5]</sup>研究发现我国正常人群血清中和胆囊结石患者血清中NB感染率分别为8.0%和31.6%。理论上而言NB可能在部分人群的眼房水中存在感染。

目前研究白内障发病机制方面,年龄相关性白内障多侧重于细胞和分子水平的研究,如晶状体蛋白质包括: $\alpha$ -晶状体蛋白、波形蛋白和热休克蛋白质(HSPs)、钙调蛋白(CaM)、 $\text{Ca}^{2+}$ -CaM系统等方面的研究;晶状体上皮细胞方面的研究;白内障与离子平衡方面的研究;目前比较明确的研究结果显示:白内障晶状体混浊与晶状体钙含量升高呈正相关关系,高钙能影响晶状体细胞膜的通透性,同时能够抑制 $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATP酶的活性,或通过钙调蛋白影响膜蛋白,开放钾、钠离子通道,影响水、钠、钾的代谢,因此低钙会破坏晶状体细胞膜的完整性其机制可能与激活内肽酶水解损伤蛋白有关<sup>[6]</sup>。Kajander等<sup>[7]</sup>认为NB能引起相关炎症反应,如热休克蛋白、白介素、基质金属蛋白酶、胶原酶和其它因子反应,导致被感染细胞死亡。同时,NB的生物矿化作用也可能改变晶状体钠、钙等离子代谢。理论上不能排除NB在部分白内障人群的发病机制中参与作用。1996年德克萨斯州立大学Folk教授,及其同事Kirkland和Lynch曾经在白内障患者的晶状体中发现NB。

经过20余年的研究,NB的分离、培养技术日臻成熟。房水标本在无菌条件下离心后,取上清液先后经 $0.45\mu\text{m}$ 和 $0.22\mu\text{m}$ 滤器两次过滤,使可能存在的NB分离,并过滤至经 $\gamma$ 2FBS处理过的含胎牛血清的1640培养基进行培养。含胎牛血清的1640培养基经 $\gamma$ 射线照射并 $56^\circ\text{C}$  30min的热灭活处理,这是因为高剂量的 $\gamma$ 射线照射能抑制NB生长,而热灭活处理能消除血清强效磷灰石结晶形成的抑制剂,有利于NB生物矿化<sup>[5]</sup>,我们采用含生理盐水加1640培养基、100mL/L热灭活 $\gamma$ 2FBS的1640培养基作为对照组一和对照组二,对照组二培养后未发现有白色沉淀出现,并采用单克隆抗体免疫组化染色,证实其中无NB感染,经 $\gamma$ 2FBS处理过的含胎牛血清的1640培养基进行培养可以减少造成假阳性结果产生。8D10是抗NB单克隆抗体,能结合NB外膜上特异的通道蛋白和糖多肽,是目前公认的特异性抗体<sup>[8]</sup>。本研究对照组一可见1例絮状漂浮,并可见管底白色沉淀;对照组二未见絮状

漂浮和白色沉淀;而实验组3组12瓶(40%)培养液中存在白色沉淀状贴壁生长的成团的NB,并且其中5培养瓶底亦可见絮状漂浮成团的NB或散在分布的。2002年李永国等<sup>[9]</sup>对胆汁NB的培养与鉴定时对75例病例标本行单克隆抗体免疫组化染色,出现完全或部分黏附于管底的白色沉淀者,NB阳性率为75.7%,沉淀完全呈絮状或无沉淀者,阳性率仅为47.4%,两者间差异显著,并认为NB呈阳性的特征,或出现黏附于管底的白色沉淀,或因细菌污染出现絮状漂浮物。本实验中亦可见部分标本絮状漂浮物但透射电镜下与白色沉淀物形态学特征基本相同,因为NB的培养过程要求消毒非常严格,因此也不能完全排除污染的可能性。本研究主要对NB进行形态学观察和鉴定,也缺乏精准度,有可能存在将培养液中的其它纳米颗粒误作NB,从而造成假阳性结果。但从研究结果来看,年龄相关性白内障的形成可能与房水中的NB存在着相关关系,而NB参与白内障的发生机制还有待于进一步研究证实。

#### 参考文献

- 1 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. *Am J Vet Res* 2003;64(2):176-182
- 2 郑永波,吴承堂,黄祥成. 纳米细菌研究进展. 中华微生物学和免疫学杂志 2003;23(11):914-915
- 3 Kajander EO, Ciftcioglu N. Nanobacteria: An alternative mechanism for pathogenic intra and extra cellular calcification and stoneformation. *PNAS* 1998;95(14):8274-8279
- 4 Rahman NU, Meng MV, Stoller ML. Infections and urinary stone disease. *Curr Pharm Des* 2003;9(12):975-981
- 5 文字,李永国,杨竹林,等. 胆囊结石患者血清、胆汁与胆囊黏膜中纳米细菌的分布研究. 中华外科杂志 2003;41(4):267-270
- 6 严宏. 白内障基础研究现状和展望. 第四军医大学学报 2006;27(13):1153-1155
- 7 Kajander EO, Ciftcioglu N, Miller-Hjelle MA, *et al.* Nanobacteria: controversial pathogens in nephrolithiasis and polycystic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2001;10(3):445-452
- 8 Hu YR, Zhao Y, Sun YW, *et al.* Detection of nanobacteria-like material from calcified cardiac valves with rheumatic heart disease. *Cardiovasc Pathol* 2010;19(5):286-292
- 9 李永国,文字,杨竹林,等. 胆汁纳米细菌的培养与鉴定. 中华医学杂志 2002;82(22):1557-1560