

部分健康成年人群血清中纳米细菌感染的调查

王学军 刘威 杨竹林 魏红 文宇 李永国

【摘要】 目的 检测部分健康成年人群血清中纳米细菌感染状况。方法 采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 和免疫组化染色方法 检测 336 例健康成年人群血清中纳米细菌抗原。结果 部分健康成年人群血清纳米细菌感染率为 8.0% ,用 ELISA 法检测为 8.0% ,免疫组化法为 5.7% 。两方法间比较无差异。男女间感染率差异无显著性。年龄 ≤ 30 岁组较 ≥ 60 岁组感染率低 ($P < 0.05$)。年龄、性别并未增加纳米细菌感染的危险。结论 部分健康人群血清存在纳米细菌感染。

【关键词】 纳米细菌 ; 酶联免疫吸附试验 ; 免疫组化染色

The detection of nanobacteria infection in serum of healthy Chinese people WANG Xue-jun*, LIU Wei, YANG Zhu-lin, WEI Hong, WEN Yu, LI Yong-guo. *Hepabiliary Disease Laboratory, 2nd Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China
Corresponding author: LI Yong-guo. Email: yongguoli@371.net

【Abstract】 Objective Nanobacteria, a new kind of bacteria found by a Finnish scholar, is considered to relate to many human diseases like nephrolithiasis. However, there are no data available on nanobacteria infection in Chinese people. **Methods** Nanobacteria was detected in serum of 336 cases of healthy adults in Southern China by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunohistochemistry stain. The monoclonal antibody of nanobacterium was supplied by Kuipio University of Finland. **Results** Nanobacteria infection rates were 27(8.0%), 19(5.7%) in the healthy adults by ELISA and immunohistochemistry stain respectively. No difference was shown between the 2 methods and between male and female, statistically. Age and sex did not seem to be related to the infectious risk of nanobacteria. However, the infectious rate was lower in those below 30-year-old than that of people over 60-year-old ($P < 0.05$). **Conclusion** Nanobacteria was existed in the serum of Chinese healthy people with an infectious rate of 8.0%.

【Key words】 Nanobacteria ; Enzyme-linked immunosorbent assay ; Immunohistochemistry

纳米细菌(nanobacteria)为新近发现的细菌,有坚硬的矿化外壳覆盖,并能感染人体的大多数细胞,导致骨骼外钙化^[1]。研究表明,纳米细菌与肾结石、膀胱结石、多囊肾、动脉粥样硬化等人类疾病的发生相关^[2,3]。因而研究纳米细菌在人类疾病中的作用,进行健康人群纳米细菌感染状况的调查十分必要。国外已有报道正常人血清纳米细菌的感染情况^[1,4],但对于中国健康人群则尚无文献报告。本研究应用酶联免疫吸附试验(ELISA)和免疫组化法检测我国部分健康人群纳米细菌感染状况,为进

一步的研究提供重要的依据。

对象与方法

1. 对象选择与标本采集 :实验对象为 2001 年 12 月至 2002 年 9 月中南大学湘雅医学院校医院、中南大学湘雅第二医院门诊体检的健康人,共 336 名,其中男 207 名,女 129 名,平均年龄(31.7 ± 11.3)岁。上述人群均符合以下标准 :甲型肝炎(甲肝)、乙型肝炎(乙肝)、丙型肝炎(丙肝)病毒学检测(-)、血清谷氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)以及胆红素值正常;全身无明显器质性病变。清晨空腹抽血 2 ml,注入无菌试管,15 000 r/min 10 min 后取血清,少量制血清涂片,其余置 -70℃ 低温冰箱保存。

2. 试剂与仪器 :小鼠抗纳米细菌单克隆抗体

基金项目 教育部重大项目基金资助(教科司[2001]171)

作者单位 :410011 长沙,中南大学湘雅第二医院肝胆研究室
(第一作者现工作单位 :300060 天津医科大学附属肿瘤医院腹部肿瘤科)

通讯作者 李永国 Email: yongguoli@371.net

(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)由芬兰 Kuopio 大学生物化学教研室 Kajander 教授馈赠(芬兰 Nanobac OY 公司生产)。ELISA 检测采用美国 KPL 公司 Protein Detector[®] ELISA Kit。吸光度(A)测定用 Labsystems 公司 Wellscan MK2 型酶标仪。即用型 ABC 试剂盒(羊抗小鼠)购自武汉博士德公司。

3. 方法与步骤:

(1)血清中纳米细菌的 ELISA 测定:①待测标本解冻后,取少量(50~100 μl)用抗原包被液适当稀释;②取100 μl 包被液至各孔,4 $^{\circ}\text{C}$ 18~24 h,洗涤液洗3次 \times 3 min,每次设一阴性对照;③加入封闭液每孔200 μl ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h,洗涤液洗3次 \times 3 min;④各孔加入抗纳米细菌单克隆抗体(鼠抗 5/2) 100 μl ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h,洗涤液洗3次 \times 3 min;⑤各孔加入羊抗鼠二抗 IgG 100 μl (1:300),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h,洗涤液洗3次 \times 3 min,最后一遍浸泡5 min;⑥每孔加入100 μl 底物复合液,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光显色,约5~15 min后加入终止液50 μl ,在30 min内用酶标仪在波长405 nm处测定标本 A 值。每个标本测定2孔,求2孔均值。以所测的阳性孔/阴性孔 A 值 $>$ 2.0判定为阳性结果。

(2)血清纳米细菌免疫组化检测:吸取少许血清制成涂片,置无水乙醇/乙醚混合液(1:1)固定15 min,采用链酶亲和素-生物素-过氧化酶复合物免疫组化法(SABC法)。阳性判断标准:在高倍视野下可见微小的棕黄至黄褐色杆状或球状颗粒者为纳米细菌。

4. 统计学方法:采用 SPSS 11.5 统计软件进行分析,设 $\alpha=0.05$ 。计数资料采用 χ^2 检验,理论频数 $<$ 1时使用确切概率法。纳米细菌感染率与可能的危险因素之间的关系采用 logistic 回归分析。

结 果

1. 血清中纳米细菌的 ELISA 测定:

(1)包被抗原浓度的确定:要得到满意的包被效果,纳米细菌抗原浓度的选择是关键,本实验利用我们已经从胆囊结石胆汁中培养得到的1株纳米细菌,经过超声波处理后,以1~100倍系列浓度分别包被酶标板,发现随 A 值变化在1:25稀释度时达峰值,故确定1:25为阳性品最适包被浓度。

(2)血清标本最适稀释度的选择:将收集的血清进行稀释以得到满意的测定效果。分别将阴、阳性标本作不同稀释,选择两者 A 值差异最大时的稀释

度血清1:4为最适稀释度。

(3)血清纳米细菌感染的检测结果:两种方法经配对资料的 χ^2 检验无统计学意义($P=0.152$)。结果发现性别间纳米细菌感染率差异无统计学意义($P>0.05$),其中男女组感染率 ELISA 法分别为7.7%(16/207)和8.5%(11/129),免疫组化法则分别为5.3%(11/207)和6.2%(8/129)。本实验表明各年龄组间差异有统计学意义($P<0.05\sim 0.01$),其中年龄 $>$ 60岁组与 $<$ 30岁组感染率差异也有统计学意义($P<0.05\sim 0.01$) (表1、2)。

表1 336名健康人血清纳米细菌感染的检测结果

免疫组化	ELISA		合计
	阳性	阴性	
阳性	11	8	19(5.7)
阴性	16	301	317(0.05)
合计	27(8.0)	309(0.02)	

表2 不同年龄组人群血清中纳米细菌感染率的比较

年龄(岁)	人数	ELISA		免疫组化法	
		阳性例数	阳性率(%)	阳性例数	阳性率(%)
≤ 30	235	13	5.5	11	4.7
31~59	86	10	11.6	5	5.8
≥ 60	15	4	26.7*	3	20.0**

注:各年龄组之间纳米细菌感染率比较均 $P<0.05$,年龄 ≥ 60 岁组与 ≤ 30 岁组间比较:* $\chi^2=9.938, P=0.002$;** $\chi^2=6.259, P=0.012$

2. 健康人群血清纳米细菌感染与危险因素的关系:将所测定人群的性别、年龄与血清 ELISA 结果进行 logistic 回归分析,发现上述两因子与纳米细菌感染无显著相关(分别 $P=0.518, 0.785$)。

讨 论

纳米细菌是由芬兰科学家 Kajander 在进行哺乳动物细胞培养时发现并于1990年命名,它直径50~500 nm,可通过0.1~0.4 μm 的滤菌膜^[1-3],是革兰阴性菌,生长过程中在 pH 7.4和生理性钙磷浓度中能形成羟磷灰石碳酸盐结晶,产生坚硬的矿化外壳覆盖于菌体周围,使细菌耐受高温强酸^[2]。它能感染细胞,发生细胞内外钙化,同时分泌内毒素、脂多糖、白细胞介素等,引起被感染细胞空泡样变性、溶解和凋亡^[5]。DNA 基因序列分析表明纳米细菌与蛋白细菌家族 $\alpha 2$ 亚群的布鲁氏菌、巴尔通菌同属,具有相同的16S rRNA片段^[1]。许多抗生素治疗对纳米细菌无效,但四环素能对从胎牛血清和

肾结石、多囊肾囊壁中分离的纳米细菌发挥杀菌效应^[6]。

本实验采用 ELISA 和免疫组化染色检测 336 名健康成年人血清中纳米细菌感染状况。采用桥接法 ELISA 测定血清中的纳米细菌抗原,以本课题组先前培养鉴定阳性的纳米细菌作为阳性对照,获得了较为满意的效果。桥接法利用已知的抗体检测包被的待测抗原,具有灵敏、节约抗体、易行的优点。因纳米细菌与衣原体、巴尔通菌等存在交叉免疫性^[1],我们使用芬兰 Kuopio 大学提供的纯化纳米细菌特异性抗体,联合应用 ELISA 和免疫组化染色检测健康人群血清中纳米细菌,最大限度地减少了假阳性结果的出现。

本实验在我国率先开展部分健康人群血清中纳米细菌的检测,并证实健康人血清中纳米细菌的存在。芬兰 Kajander 1998 年报告 5% 正常芬兰人血液中以及 80% 土耳其血液透析患者的血液、尿液中存在纳米细菌^[1]。瑞典学者检测了 400 例健康成人血清中纳米细菌抗原,阳性率为 14%,并且与性别、年龄、地域无关,而与是否接触动物相关,其中接触马者阳性率最高^[4]。我们已经检测胆囊结石患者血清纳米细菌感染率为 31.6%^[7]。本实验纳米细菌感染率与 Kajander 的结果相近,但低于瑞典人群。同时,将 ELISA 结果与人群性别、年龄进行 logistic 回归分析,发现性别、年龄不是感染纳米细菌的危险因素。

本实验用两种方法检测纳米细菌,均发现各年龄组间纳米细菌感染明显不同,尤其是年龄 ≤ 30 岁组的感染率要低于 ≥ 60 岁组。有研究表明美国几乎 100% 动脉粥样硬化患者血清中有纳米细菌感染^[8]。动脉粥样硬化斑块中已检出纳米细菌,两者关系密切。而在我们的研究中,老年人(≥ 60 岁)血清中纳米细菌感染明显高于年轻人(≤ 30 岁),而老年人动脉粥样硬化的发病率远高于年轻人群,这似

乎提示老年人血清中较高的纳米细菌感染可能与该人群中动脉粥样硬化的发生有关系。还应该指出的是,本实验中由于老年健康人群取材所限例数较少($n = 15$),而同时年轻人群数量相对较大,可能也在一定程度上影响了两组间感染率的精确比较,今后还需扩大检测样本量,以进一步明确年龄对纳米细菌感染的影响。

本实验中各年龄组间纳米细菌感染率有差异,但 logistic 回归分析提示性别、年龄均不能增加纳米细菌的感染率,这并不矛盾,因为各年龄组卡方检验是验证各组间的不同,而 logistic 回归提示的是高纳米细菌感染的危险因素;说明感染可能与其他因素有关系,尚需进一步探讨。

参 考 文 献

- 1 Kajander EO, Ciftcioglu N. Nanobacterial: an alternative mechanism for pathogenic intra- and extracellular calcification and stone formation. Proc Natl Acad USA, 1998, 95: 8274-8279.
- 2 Dennis A. An infectious origin of extracranial calcification. Proc Natl Acad Sci, 1998, 95: 7846-7847.
- 3 Wainwright M. *Nanobacteria* and associated 'elementary bodies' in human disease and cancer. Microbiology, 1999, 145: 2623-2624.
- 4 Holmberg M. Prevalence of human anti-*nanobacteria* antibodies suggest possible zoonosis. International *nanobacteria* minisymposium, March 2001, Kuopio, Finland. www.nanobac.com
- 5 Ciftcioglu N, Kajander EO. Interaction of *nanobacteria* with cultured mammalian cells. Pathophysiology, 1998, 4: 259-270.
- 6 Ciftcioglu N, Miller-Hjelle MA, Hjella JT, et al. Inhibition of *nanobacteria* by antimicrobial drugs measured by a modified microdilution method. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46: 2077-2086.
- 7 李永国, 文宇, 杨竹林, 等. 胆汁中纳米细菌的培养与鉴定. 中华医学杂志, 2002, 82: 1557-1560.
- 8 Puskas LG. *Nanobacteria* in atherosclerotic plaques. International *nanobacteria* minisymposium, March 8, 2001, Kuopio, Finland. www.nanobac.com

(收稿日期: 2003-06-19)

(本文编辑: 尹廉)