论著

文章编号:1000-5404(2005)09-0868-03

奇异变形杆菌周期性群集运动的研究

贾雄飞,刘俊康,徐启旺 (第三军医大学医学检验系生物波研究中心,重庆 400038)

提 要: 目的 研究奇异变形杆菌(proteus mirabilis, PM)迁徙生长过程中形态、数量、呼吸酶活性等指标周期性变化。**方法** 在培养基中加入2,3,5-三苯基四唑氯化物(2,3,5-tetraphenyltetrazolium chloride, TTC)作为呼吸酶活性的指示剂观察细菌呼吸酶活性的变化。采用透射电子显微镜对细菌形态、鞭毛进行对比观察。比浊法计数PM在时间、空间上的数量的变化。**结果** PM在固体培养基迁徙生长过程中出现菌体数量逐渐减少、形态由短小到细长、鞭毛由少变多、呼吸酶从有活性向无活性转变的周期性变化。**结论** PM在培养基迁徙生长过程中,微观上出现菌体长度、鞭毛数量、细菌密度等周期性变化,宏观上出现水波样的环状运动,这是环境、鞭毛、细胞间信号传递和细菌密度等多因素联合作用的结果。

关键词: 奇异变形杆菌;群集运动;鞭毛;迁徙生长

中图法分类号: Q935; R378.99 **文献标识码**: A

Periodic variety in swarming motility of *Proteus mirabilis*

JIA Xiong-fei, LIU Jun-kang, XU Qi-wang (Research Center of Biowave, College of Medical Laboratory, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the periodic variety at the germ form, quantity, flagellar expression and activity of breath enzyme *etc* during the swarming motility of *Proteus mirabilis* (PM). **Methods** The 2, 3, 5-tetraphenyltetrazolium chloride (TTC), as indictor of breath enzyme, was added to the culture medium. Electronic microscope was adopted to observe the germ form and flagellar. Quantity of PM was measured by turbidimetry. **Results** During the PM growth and migration at LB medium, the germ quantity reduced and form changed from short and small to long and thin, flagellar got more and breath enzyme turned into inactive. **Conclusion** At the LB medium, PM in growth process appeared varieties in length of germ body, flagellar quantity and germs density, *etc*. PM in solid medium appeared wave motility, resulting from many factors including the environment, the signal transduction in cells and the density of germ.

Key words: *Proteus mirabilis*; swarming motility; flagellar; migrate growth

在许多病原菌和宿主相互作用过程中细菌的泳动能力起到重要的作用[1],一些病原菌同时还具有多细胞的群集迁移能力。研究表明变形杆菌群集运动能力有助于其在泌尿道的定植[2]也可能与尿导管上生物膜的形成有关[3]。奇异变形杆菌分化成高鞭毛密度的群集体细胞后,除了能使群集体快速迁移,还能促进细菌对宿主细胞的入侵能力。目前对于变形杆菌迁徙能力的认识主要侧重于对鞭毛的研究。本实验以奇异变形杆菌为对象,结合生物波理论对运动活泼具有潜在生长能力的细菌潜生体(cryptic growth cell, CGC),和运动能力弱或无、生长繁殖力旺盛繁的繁殖体(vegetative cell, VC)的研究[4,5]来观察PM迁徙生长过程中菌体形态、鞭毛数量、呼吸酶活性的变化,进一步阐述变形杆菌的周期性群集运动机制。

1 材料与方法

1.1 实验菌株和培养基

奇异变形杆菌(proteus mirabilis, PM)由本实验室保存LB培养基(1%胰胨,0.5%酵母提取物,1% NaCl,pH 7.2);普通营养琼脂培养基(1%蛋白胨, 0.3%牛肉膏,0.5% NaCl)。

1.2 TTC指示剂培养观察

将已经高压灭菌的LB培养基溶化后待其温度降至50 ℃左右按比例加入TTC混匀使其终浓度为0.5‰。中心点种奇异变形杆菌37 ℃过夜培养。

1.3 电子显微镜观察

将奇异变形杆菌接种于LB培养基在37 ℃恒温过夜培养(12 h)。用接种环从最外环和红环刮取少许细菌,分别在装有

作者简介:贾雄飞(1977-),男,内蒙古包头市人,硕士研究生,医师,主要从事细菌学方面的研究。电话:(023)68752190

通讯作者:徐启旺,电话:(023)68752191,E-mail:biowave@bio-waves.com

收稿日期:2004-10-09;修回日期:2005-03-21

1 ml 无菌生理盐水 EP 管中制成菌悬液。将包被有聚乙烯醇缩甲醛的铜网放于菌液中 5 min,使细菌附着于铜网上。取出铜网用磷钨酸负染 10 min,放干。在 PHILIPS TECNAI10 透射电子显微镜下观察。

2　结果

2.1　奇异变形杆菌在 TTC 指示剂培养基培养观察结果

在含有 TTC 的 LB 培养基中心点种 PM,8 h 后即形成中心菌落,此后在光镜下观察,每过 3 h 可出现新的红色环状菌落,黄环区域位于红环之间,为未显色菌落(图 1)。红环是 TTC 被呼吸酶还原的结果,清楚地显示了奇异变形杆菌在迁徙生长过程中呼吸酶活性的周期性变化,表现为红黄相间的同心环状,红环表示变形杆菌呼吸酶活性正常,不显红色区域反之。

2.2　培养的奇异变形杆菌透射电子显微镜观察结果

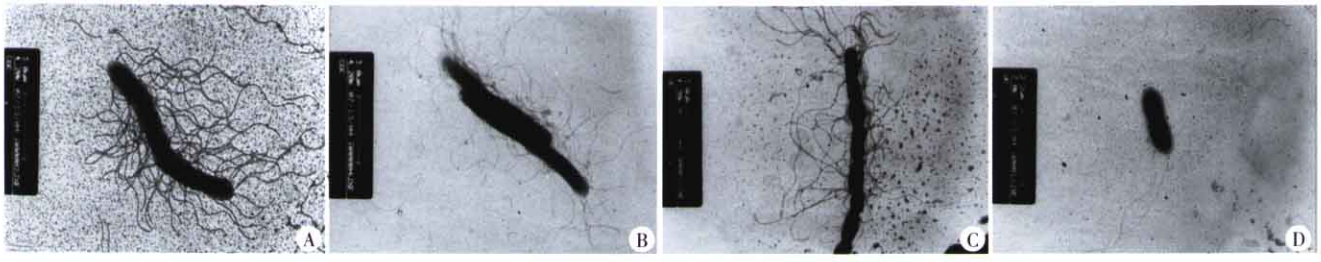
在电镜下可见不显红色区域的 PM 形态均为细长杆状长度一般超过 8 μm,菌体上附着大量的鞭毛的 CGC(图 2A,B);红环边缘处为正在断裂繁殖的 CGC(图 2C);红环上的 PM 形态大多为球杆状的 VC 长度为 0.5 ~ 8 nm,鞭毛显著减少,有些菌体鞭毛缺失(图 2D)。



The red district meant normal activity of the breath enzyme; The district except for the red area meant abnormal activity of the breath enzyme

图 1　TTC 指示剂培养观察结果

Fig 1　PM culture with TTC indictor



A, B: Cryptic growth cells (TEM × 4 200); C: Cell division of cryptic growth cells (TEM × 4 200); D: Vegetative cells (TEM × 7 000)

图 2　奇异变形杆潜生体和繁殖体

Fig 2　Cryptic growth cells and vegetative cells of *Proteus mirabilis*

3　讨论

本次实验以细菌群集运动过程中奇异变形杆菌为对象,对其在平板上的迁徙生长现象进行了的研究,发现 PM 在周期波动生长过程中,菌体形态、鞭毛的多少、呼吸酶活性和细菌密度的变化也存在周期性的同步变化。VC 在固体培养基由于各种因素的作用分化成运动活泼、菌体细长、鞭毛高度表达,菌体沿其长轴方向有序排列的 CGC(图 2B),但其有氧呼吸活动是在一定程度上是被抑制,这说明 CGC 在形态、表面分化、代谢产能方面也与 VC 有很明显的不同,而且这种变化是周期性的。在有 TTC 作为呼吸酶指示剂的平板上培养的 PM 菌落不显红色的区域对应的是 CGC 扩散的阶段,而红色区域则对应 CGC 去分化后进行断裂繁殖的阶段。

目前研究表明,鞭毛表达的转录活化因子 FlhD/FlhC 会抑制有氧呼吸中的酶活性[6],flhDC 在表达上非常小的变化都会对群集细胞的生长发育产生很大影响[7],这就可以解释为什么奇异变形杆出现菌体在培养基不同区域集体性变长或变短、鞭毛变多或变少甚至消失、细菌的密度也发生增多和减少的周期性变化[8]。以 TTC 作为有氧呼吸的活动变化的指示剂,出现有趣的水波纹样的同心环状的周期波动现象,也在宏观上有力的支持了上述研究结果。因此变形杆菌作为致病菌,其 CGC 多细胞迁移能力是对于泌尿道的定植致病性的重要因素[9]。

可以说奇异变形杆菌在 LB 培养基迁徙生长过程中从微观的菌体长度、鞭毛数量、细菌密度等周期性变化,到宏观上的出现的水波样的环状运动,是包括环境,细胞间的信号传递,细菌密度,flhDC 操纵子等多因素联合作用的结果。

参考文献:

[1] Allison C, Emody L, Hughes C. The role of swarm cell differentiation and

multicellular migration in the uropathogenicity of Proters mirabilis[J]. Infect Dis, 1994, 169(11): 1155 - 1158.

[2] Kim D, Boylan B, George N. Inactivation of ompR promotes precocious swarming and flhDC expression in Xenorhabdus nematophila[J]. Bacteriol, 2003, 185(17): 5290 - 5294.

[3] Otteman K, Meller F. Roles for motility in bacterial-host interactions[J]. Mol Microbil, 1997, 24(10): 1109 - 1117.

[4] 丛延广, 刘俊康, 袁泽涛, 等. 潜生体定植的原位观察技术研究[J]. 中国微生态学杂志, 2000, 12(02): 70 - 72.

[5] 丛延广, 刘俊康, 袁泽涛, 等. 单种群菌落分形结构的形成及其机制研究[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(6): 571 - 574.

[6] Pruss B, Campbell J W, Van Dyk T k, *et al*. FlhD/FlhC is a regulator of anaerobic respiration and the Enter Doudoroff pathway through induction of the methyl-accepting chemotaxis protein Aer[J]. Bacteriol, 2003, 185(2): 534 - 543.

[7] Bleves S, Marenne M, Detry G. Up regulation of the Yersinia enterocolitica yop regulon by deletion of the flagellum master operon flhDC[J]. Bacteriol, 2002, 184(12): 3214 - 3223.

[8] Rauprich O, Matsushita M, Weijer C. Periodic phenomena in *Proteus mirabilis* swarm colony development[J]. Bacteriol, 1996, 178(22): 6525 - 6538.

[9] Fraser G, Hughes C. Swarming motility[J]. Curr Opin Microbiol, 1999, 2(6): 630 - 635.

（编辑 汪勤俭）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2005)09-0870-01

肺癌伴皮下及全身多处转移1例

A case report of lung cancer with multiple systemic metastasis

陈若冰，周向东，黎 平，熊 震 （第三军医大学西南医院呼吸内科，重庆 400038）

肺癌远隔器官转移以肝、脑、骨多见，而皮下转移则较为少见。现报告如下。

1 临床资料

患者，女性，59岁，因全身多处疼痛、发热、咳嗽2个半月，发现全身多处结节1个月入院，病初有发热，体温在38 ℃左右，伴刺激性干咳，无咳痰及咯血。近1个月发现全身多处结节，无游走性。无生食虾蟹史，无吸烟史。查体：体温36.4 ℃，脉搏90次/min，呼吸20次/min，血压135/90 mmHg，发育正常，营养较差，消瘦体形，精神稍差，神志清楚。左颞部、左乳突、左右颈部、左右上臂前后侧、左上腹季肋区、右中腹部共触及11枚直径5～20 mm大小皮下结节，质硬，表面较光滑，边界清楚，活动，无压痛，局部皮肤无红肿破溃。双侧呼吸动度对称，右下肺语颤稍减弱，局部叩诊呈浊音，呼吸音稍减弱，双肺未闻及干、湿性啰音。血常规 WBC 14.96×10^9/L，N 0.718，L 0.144，M 0.103，E 0.032，HGB 87 g/L，PLT 190×10^9/L；肝功 GGT 205 U/L，ALP 388 U/L；K 3.45 mmol/L；ESR 14 mm/h；血 CEA 13.18 ng/L；乙肝三对示表面抗体及核心抗体阳性；结核抗体阴性，PPD试验(＋＋)；痰镜检见革兰阴性球菌及杆菌；T淋巴细胞计数及免疫球蛋白正常。凝血4项正常；肾功正常；尿常规基本正常；大便常规正常；大便查虫卵阴性。胸片：右下肺高密度块影，直径约5 cm×4 cm，密度不均，边缘不清，有分叶及毛刺。外院胸部CT示右肺下叶块状影，肺癌不除外。左颞部皮下结节针吸活检结果示送检涂片见有少数癌细胞。右中腹皮下结节活检，镜检于送检纤维脂肪组织中见癌组织，癌细胞呈圆形、卵圆形，胞浆淡红染，核圆形、卵圆形，大小不甚一致，可见核分裂像，癌组织排列呈片状及腺样结构，部分区域见坏死，提示(皮肤)纤维脂肪组织中见腺癌浸润。B超检查见左右肝内探及多个实质性减弱回声，边界不清，较大者直径49 mm。胰腺体尾部探及两个实质性减弱回声，较大者直径11 mm，提示：①肝多发性实质占位病变，考虑转移性肝癌；②胰腺体尾部实质占位病变，考虑转移灶。根据病理结果，结合胸部影像学表现，明确诊断为：①右下肺腺癌(T1N3M1 Ⅳ期)；②多发性皮下转移性腺癌；③肝转移性癌；④胰腺转移性癌；⑤肺部感染，第1天立即予紫杉醇150 mg静滴，第2天加卡铂580 mg静滴方案化疗，现该患者正在治疗观察中。

2 讨论

皮肤是各种恶性肿瘤常见的转移部位之一，皮肤转移肿瘤占转移性肿瘤的3%～4%，女性患者多来自乳腺癌(约69%)，其次为大肠癌(9%)，来自肺癌、卵巢癌和恶性黑色素瘤的占4%～5%。而原发性肺癌皮肤转移较少见，国外报道其发生率在1%～12%，马淑萍[1]报道为1.3%。Terashima等[2]认为大细胞未分化癌最易转移至皮肤，约10.3%～15.4%，其次为腺癌。马淑萍[1]报道27例中18例为腺癌，6例为鳞癌，3例为小细胞癌。肺癌并皮下转移多为单发，多发鲜见，表现为皮下孤立圆形结节或肿块，直径一般在0.5～6 cm，无痛，稍固定，质较硬，表面正常或稍红，少数破溃，不易愈合。以上所述均与本例相符。本例于1个月内迅速出现多达11处皮下转移，检查发现同时伴肝及胰内脏转移，实属罕见。临床上由于原发性肺癌起

（下转873页）

作者简介：陈若冰(1975－)，男，贵州省榕江县人，医师，主要从事内科临床方面的研究，现在贵州省施秉县人民医院内科。电话：(023)68765680
通讯作者：周向东，电话：(023)68765679，E-mail：xdzhou@mail.tmmu.com.cn

收稿日期：2004-12-10；修回日期：2005-03-28