论著

文章编号:1000-5404(2007)14-1402-04

革兰阴性杆菌节律性释放调控物质的研究

窦 君[1,2],刘俊康[2],王 娉[1],徐启旺[2],张富春[1] ([1]新疆大学生命科学与技术学院省部共建国家重点实验室培育基地,新疆生物资源基因工程重点实验室,乌鲁木齐 830046;[2]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)波动生长过程中生物波调控因子(biological wave regulating factor, BRF)的节律性释放及作用。**方法** 应用MTT实验和激光共聚焦显微镜观察BRF对细菌代谢的影响;采用凝集抑制实验检测PM周期性释放BRF;原子力显微镜观察PM在潜-生序变化中BRF生成情况。**结果** PM在波动生长过程中周期性释放BRF,潜生体可合成大量的BRF。BRF能提高细菌的代谢水平,促进细胞内pH值的变化。**结论** PM的波动生长过程是细菌生长代谢的消长与环境平衡-远离平衡变化之间互为因果的动态过程,是与细菌自身调控物质BRF协同作用的结果。

关键词: 奇异变形杆菌;生物波调控因子;波动生长;原子力显微镜

中图法分类号: Q935;Q939.1 **文献标识码:** A

Study on regulation factor released periodically by the leather blue negative bacillus

DOU Jun[1,2], LIU Jun-kang[2], WANG Ping[1], XU Qi-wang[2], ZHANG Fu-chun[1] ([1]National Key Laboratory Basis of Xinjiang Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046; [2]Research Center of Biowave, College of Medical Laboratory, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the periodic release of biological wave regulating factor (BRF) during the waving growth of *Proteus mirabilis* (PM) and the effect of BRF on waving motility. **Methods** MTT assay and laser scanning confocal microscope were adopted to observe the influence of BRF on PM metabolism; The agglutination inhibition test was used to detect periodic release of BRF and atomic force microscope was applied to observe BRF synthesis during biological waving growth of PM. **Results** BRF could periodically be released during waving growth of PM, and cryptic growth cells could produce many BRF. BRF could enhance bacterium metabolism and promote the change of intracellular pH. **Conclusion** Dynamic process is the waving growth of PM that resulted from the interaction of bacterial metabolism and periodic changes of the environment. This process is related to BRF that the bacterium itself produced.

Key words: *Proteus mirabilis*; biological wave regulating factor; waving growth; atomic force microscope

奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*, PM)的迁徙生长(swarming growth)是原核生物群体协同运动和自主分化的表现[1]。细菌以群体的方式构成多细胞有机体表现其生命活动,发挥致病作用以及通过改变结构和生理功能适应不断变化的环境甚至极端环境,表现出高度的适应能力[2]。PM的群集协同运动具有较强的致病性,是导致泌尿系统感染的重要病因[3]。PM宏观上的波动生长是由高活力、少鞭毛、短杆状的繁殖体(vegetative cell, VC)与低代谢、多鞭毛、纤细状的潜生体(cryptic growth cell, CGC)呈微观上的潜-生序变化。研究表明,细菌的这种波动生长特征与生物波调控因子(biological wave regulating factor, BRF)有关[4]。BRF的成功分离纯化,为研究BRF在变形杆菌周期性群集运动中的作用奠定基础。本研究结合生物波理论[5,6],研究波动生长过程中BRF节律性释放及对PM代谢的影响,进一步阐明变形杆菌群集协同运动的自组织机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和波动培养基 奇异变形杆菌,由本实验室保

作者简介:窦 君(1968-),男,云南省昆明市人,博士研究生,主治医师,主要从事分子微生物学方面的研究。电话:(0991)8583259

通讯作者:张富春,电话:(0991)8583259, E-mail: zfcxju@xju.edu.cn

徐启旺,电话:(023)68752191,E-mail: biowave2000@163.com

收稿日期:2006-10-08;修回日期:2007-01-31

存。波动培养基(1% 胰蛋白胨,0.5% 酵母提取物,1% NaCl,0.1% 葡萄糖,0.05% 2,4,6-三苯基四氮唑,0.1% 琼脂,pH 7.2)。

1.1.2 BRF　本室分离提纯,4 ℃保存。麦芽凝集素(wheat germ agglutinin,WGA):Vector 公司产品。

1.1.3 仪器　原子力显微镜 SPI3800-SPA400 由中国科学院化学研究所 SFM 室提供;CS-NT165211 激光共聚焦显微镜(Leica Inc, Germany)由本校仪器中心提供。

1.2 方法

1.2.1 BRF 对奇异变形杆菌 CGC 代谢活性影响的实验

参考 Hansen 等[7]的方法进行了修改,即将奇异变形杆菌点种在波动培养基上,置于波动培养系统中孵育 18 ~ 24 h,取黄环 CGC 于 50 mol/L PBS 缓冲液(pH 7.2)中,制成浊度为 0.1 的菌悬液。加 100 μl 5% 的 BRF。然后应用 MTT 法,于波长 570 nm 处测定光密度值[$D(570)$]。

1.2.2 激光共聚焦显微镜测定细胞内 pH 的实验　用无菌去离子蒸馏水将波动培养基上的黄环 CGC 制成浊度为 0.1 的菌悬液。将 BRF 加入菌悬液(已加 BCECF/AM 液,使其终浓度为 1 μl/ml),使其终浓度为 10^{-2} μg/ml。取 50 μl 加在多聚赖氨酸包被的载玻片上,37 ℃孵育 30 min,应用激光共聚焦显微镜进行观察。激发光波长为 488 nm,测量 525/640 nm 发射荧光的强度比值。对照选用无菌的生理盐水。

1.2.3 奇异变形杆菌波动生长过程中 BRF 周期性释放实验

参照文献[8],修改如下:分别取已在波动培养基Ⅰ号平板上波动培养 18 h 的红环和黄环奇异变形杆菌,用 0.1 mol/L PBS 缓冲液(pH 7.4)制成浊度为 0.1 的菌悬液。取 1 滴菌悬液于玻片上,滴加 WGA 液 40 μl,轻轻振荡 5 min,滴加 4% 红细胞液 1 滴,轻轻混匀 3 min,于显微镜下观察红细胞凝集反应情况。将 5% BRF 液按 5 倍稀释法配制成 1∶5、1∶25、1∶125、1∶625、1∶3 125、1∶15 625 6 个不同浓度,进行凝集抑制实验。

1.2.4 奇异变形杆菌表面 BRF 的原子力显微镜(atom force microscope, AFM)观察[9]　用无菌 0.1 mol/L PBS 缓冲液(pH 5.0)分别将波动培养基上的黄环 CGC 和红环 VC 制成浊度为 0.1 的菌悬液。取 200 μl 菌悬液于云母片上,静置 10 min,用去离子蒸馏水轻轻漂洗,去除多余的盐份,滴加 20 μl 20 μg/ml WGA 液,30 s 后,用 0.2 mol/L PB 缓冲液(pH 7.2)轻轻漂洗 4 次去除游离的 WGA 后,再放入去离子蒸馏水中除尽盐份1 h 后取出,室温干燥。采用原子力显微镜对样本进行观察。在原子力显微镜上配制的直击式相差显微镜下观察定位后,采用 AFM 气相模式下使用 100 μm Scanner,其参数为:X:115 μm,Y:115 μm,Z: 29.97 μm,表示应用的 Scanner 在 X、Y 轴方向上的扫描移动范围最大值为 115 μm,在 Z 轴方向上移动范围最大值为 29.97 μm,应用 AFM Triangle 200 nm 的探针及支架。所有图像都经过自动平滑处理以消除慢扫描方向的低频噪音。

AFM 图像的处理及统计:每个标本随机取 2 处进行扫描,每个扫描点上取 4 处 50 nm × 50 nm 的范围内对 WGA 颗粒进行计数,从而得出 WGA 的密度,即 WGA 密度 = WGA 颗粒数/100 nm^2。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.5 统计软件进行 t 检验。

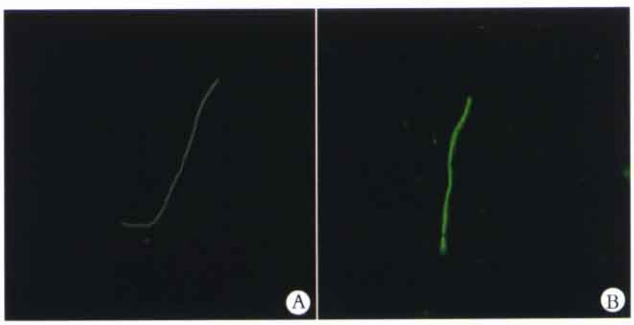
2 结果

2.1 BRF 对 PM CGC 代谢活性的调节作用

CGC 的代谢活性(0.162 ± 0.019)明显低于 VC(0.398 ± 0.029)($P < 0.05$);在 BRF 的作用下,CGC 的代谢活性(0.331 ± 0.006)显著增强($P < 0.05$),与 VC 代谢活性(0.162 ± 0.019)没有显著性差异($P > 0.05$);但 BRF 对 VC 代谢活性(0.162 ± 0.019)的影响不明显($P > 0.05$)。

2.2 BRF 对 CGC 细胞内 pH 的影响

采用激光共聚焦显微镜测定 CGC 细胞内 pH 值在 BRF 作用前后的变化。结果表明 CGC 荧光强度比值明显偏低,显示细胞内 pH 偏高,代谢活性低下(图 1A);在 BRF 作用下,CGC 荧光强度显著升高,显示加入 BRF 后细胞内 pH 降低,CGC 代谢能力增高(图 1B)。



A: CGC 荧光强度较低,代谢活性低下; B: 加入 BRF 后,CGC 荧光强度较高,代谢能力增强

图 1　激光共聚焦显微镜测定 BRF 对 CGC 代谢活性的影响　(×400)

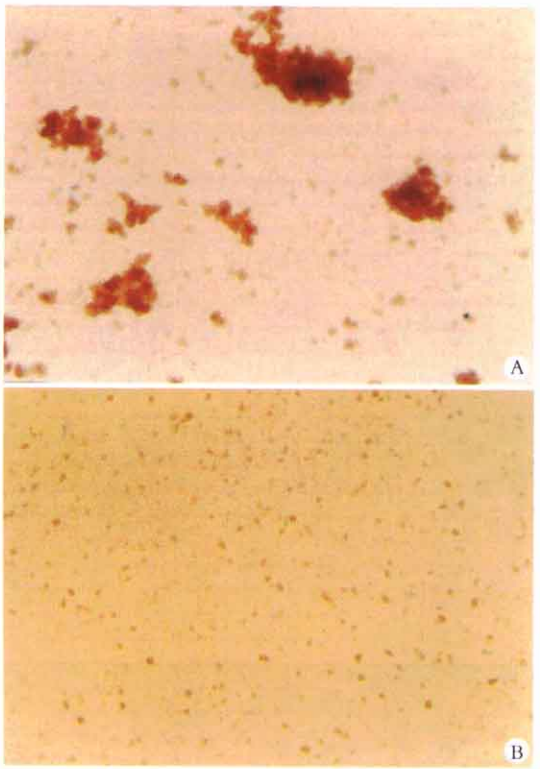
2.3 PM 波动生长过程中 BRF 周期性释放实验

采用提纯的 BRF 进行血球凝集抑制实验,BRF 稀释到 1∶625 才出现红细胞凝集,表明 BRF 能与 WGA 结合,竞争性地抑制其与红细胞的结合。

在加入 4% 小鼠红细胞液后 6 min,红环 PM(VC)出现明显的红细胞凝集(图 2A),而黄环 PM(CGC)没有发生凝集反应,持续观察 30 min,仍没有产生红细胞凝集(图 2B)。在实验中,分别滴加 20、30 μl 的 WGA 液,观察红细胞凝集反应。结果显示 20 μl 时红环 PM 在反应 9 min 后出现红细胞凝集,30 μl 时需反应 3 min 就产生凝集。但是,持续观察 20 min,黄环 CGC 均没有产生红细胞凝集。结果表明,黄环 CGC 细胞外 BRF 的含量比红环 VC 高。

2.4 原子力显微镜检测 PM 表面 BRF 的含量

应用 AFM,扫描面积为 500 nm × 500 nm。结果显示,VC 表面所结合的 WGA 颗粒极少,WGA 密度低于 1; CGC 表面则密集分布着直径约为 30 nm 的 WGA 颗粒,其密度为(9 ± 1)/100 nm^2。表明 PM CGC 所产生的 BRF 明显多于 VC。



A:红环 PM 处理后,小鼠红细胞凝块大小不一;B:黄环 PM 处理后,红细胞均匀散在,没有发生凝集反应

图2 CGC 抑制 WGA 引起的红细胞凝集 (×100)

3 讨论

PM 的纤细状变异涉及多基因的协同作用,决定鞭毛合成、LPS 和肽聚糖产生、细胞分裂以及脯氨酸酶的基因中任何一类的表达紊乱均可引起细胞纤细状变异[10]。Gygi 等[11]研究发现,鞭毛表达的转录活化因子 flhD/flhC 对细菌分化有很大影响。在 flhA 变异株中人为过量表达 flhDC 可使细胞延长,flhDC 的表达启动了纤细状菌的变异以及后续分化过程;同时也发现鞭毛组装和细胞分化之间是耦合的。看来 flhDC 的表达启动 PM 细胞体延长以及后续分化过程,而 flhA 的表达使鞭毛及毒力蛋白组装并进行后续分化。除了鞭毛基因外,其他的基因也可能参与细菌分化的调控。Hay 等[12]发现编码一种整体性转录调节因子 Lrp 的基因 lrp 在细胞分化中表达活跃;Tn5 插入 lrp 使 PM 失去细胞体延长、过度表达鞭毛及溶血素基因的能力。在此变异株细胞中人为过度表达 flhDC 可恢复细胞分化和迁移能力。因此,Lrp 可能是细胞分化及启动信号的产生或传递过程中一种关键成分,它是通过 flhDC 主操纵子发挥作用的。以上结果表明,细胞内环境稳定对 PM 的分化产生影响,并可能是由 lrp-fliDC 途径介导的。

本实验以群集协同运动过程中的 PM 为对象,研究其在波动生长中 BRF 的周期性变化。细菌在生长过程中,其代谢产物能引起周围环境的恶化,一定程度上造成了细菌外环境的不平衡,局部形成较高的累积。当细菌处于不利环境时,就会发生改变,形成 CGC。但环境的过度恶化,就会造成细菌的自溶或死亡。不利环境引起 CGC 产生 BRF,相对改变局部环境条件,使其能充分利用自身释放的 BRF,维持 CGC 生存和运动的基本条件。细菌在黄环时,由于环境因素的影响,导致 CGC 的形成。为了防止局部环境的过度恶化,CGC 自组织地形成 BRF。通过激光共聚焦显微镜测定和 MTT 实验,证实了 BRF 有增强细菌代谢能力的功能。BRF 能促进胞内 pH 值的变化。细胞内 pH 值瞬间变化,即 H^+ 的流动参与多种生物学过程,尤其是酶活性的调节,而且细胞通讯也受胞内 pH 值影响。当细菌运动到营养丰富区,加之自身代谢产生的 BRF,从而形成高营养环境,CGC 充分利用营养物质,通过出芽、多点断裂等方式,形成大量的 VC(红环)[13]。因此,CGC 形成的自组织过程是细菌生长代谢的消长与环境平衡-远离平衡变化之间互为因果的动态过程,是与细菌自身调控物质 BRF 协同作用的结果。

BRF 在黄环 CGC 中的含量高于红环 VC,可能与黄环的环境条件不利于细菌的生长,但能启动 BRF 的合成途径有关。以上分析可以得出,BRF 释放的周期性与 CGC 形成的自组织过程密切相关。

目前,BRF 的检测主要是通过生物分析的方法[4]。AFM 作为一种新的技术手段,利用具有力敏感元件的扫描探针与被扫描样品间的作用力梯度信息对样品进行成像。其分辨率极高,而且所观察的样本不需要包埋、覆盖、染色,也不受样品导电性的影响,可在大气条件或液体环境中进行成像[14]。本研究应用 AFM 对 PM 释放的 BRF 进行间接的观察,发现 PM CGC 的表面具有大量的 BRF,而 VC 表面的 BRF 极少,进一步说明周期性产生的 BRF 是细菌适应不断变化环境的自组织过程。AFM 即可以作为研究细菌形态学的一种方法,又可作为原位定量检测 BRF 的手段。虽然 AFM 已广泛应用于对生理生化反应中蛋白质、核酸等生物大分子的形态或功能的动态研究,可以肯定 AFM 对研究活细胞膜表面结构(细胞壁、外膜蛋白、膜通道、膜受体等)将有巨大的潜能。

参考文献:

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

[2] Henke J M, Bassler B L. Bacterial social engagements[J]. Trends

Cell Biol, 2004, 14(11): 648 - 656.
[3] Kim D J, Boylan B, George N, *et al*. Inactivation of ompR promotes precocious swarming and flhDC expression in Xenorhabdus nematophila [J]. J Bacteriol, 2003, 185(17): 5290 - 5294.
[4] 徐启旺, 袁泽涛, 王 源, 等. 生物波调控因子生物作用检测方法研究[J]. 生物医学工程学杂志, 2000, 17(2): 233 - 234, 237.
[5] 徐启旺, 刘俊康, 郭 刚, 等. 微生物生长的群体、周期和波[J]. 自然杂志, 1992, 15(3): 195 - 197.
[6] 贾雄飞, 刘俊康, 徐启旺. 奇异变形杆菌周期性群集运动的研究[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(9): 868 - 870.
[7] Hansen M B, Nielsen S E, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill[J]. J Immunol Methods, 1989, 119(2): 203 - 210.
[8] Aguilera A, Gonzalez-Gil S. Lectin analysis of surface saccharides during the cell cycle in four dinoflagellate species[J]. J Exp Mar Biol Ecol, 2001, 256(2): 149 - 166.
[9] Drake B, Prater C B, Weisenhorn A L, *et al*. Imaging crystals, polymers, and processes in water with the atomic force microscope[J]. Science, 1989, 243(4898): 1586 - 1589.
[10] Belas R, Goldman M, Ashliman K. Genetic analysis of *Proteus mirabilis* mutants defective in swarmer cell elongation[J]. J Bacteriol, 1995, 177(3): 823 - 828.
[11] Gygi D, Bailey M J, Allison C, *et al*. Requirement for FlhA in flagella assembly and swarm-cell differentiation by *Proteus mirabilis*[J]. Mol Microbiol, 1995, 15(4): 761 - 769.
[12] Hay N A, Tipper D J, Gygi D, *et al*. A nonswarming mutant of *Proteus mirabilis* lacks the Lrp global transcriptional regulator[J]. J Bacteriol, 1997, 179(15): 4741 - 4746.
[13] 刘俊康, 丛延广, 王 源, 等. 应用干涉相差显微镜观察细菌潜生体繁殖方式的研究[J]. 第三军医大学学报, 1999, 21(1): 13 - 15.
[14] Lehenkari P P, Charras G T, Nykanen A, *et al*. Adapting atomic force microscopy for cell biology[J]. Ultramicroscopy, 2000, 82(1 - 4): 289 - 295.

(编辑 龙 亮)

文章编号:1000-5404(2007)14-1405-01

个案与短篇

羊膜带综合征 2 例

程春霞 (中南大学湘雅三医院妇产科,长沙 410013)

羊膜带综合征(amniotic band syndrome, ABS)是由于羊膜形成纤维带缠绕或粘连胎儿所致的一种少见的先天性畸形综合征[1]。患者孕早期无明显临床症状、体征,且病例散发,目前仍有许多超声及临床医师对于此类畸形认识不足,故产前诊断率较低,容易造成漏诊及误诊。现将我院 2 例 ABS 报告如下。

1 临床资料

病例 1:患者 27 岁,G_2P_0,因停经 6 个月余,发现胎儿畸形 1 d 于 2005 年 3 月 4 日入院。停经 40 d 因阴道少量流血于当地医院保胎治疗 10 d。2005 年 3 月 3 日行超声检查,发现胎儿无脑畸形。患者孕期无毒物接触史。1 年前稽留流产 1 次。入院后第 2 天予依沙吖啶羊膜腔内注射引产,17 h 后自娩一死男婴,体表多发性畸形(图 1):头颅骨缺损,脑及脑膜膨出,左眼缺如,唇腭裂明显;羊膜附着于头顶部,并见一羊膜带与右膝关节外下方粘连,双手指呈屈曲痉挛状,左手 6 指,短指畸形;双膝、踝关节呈屈曲状,胭窝有翼状皮肤附着,左足内翻。胎盘分叶,副胎盘。总羊水量 3 000 ml。产后诊断:1 孕 25 周,死婴;2 ABS;3 羊水过多。

病例 2:患者 23 岁,G_1P_0,因停经 8 个月余,下腹胀痛伴阴道少量流血 1 d 于 2000 年 9 月 20 日入院。停经 30 d 上呼吸道感染 1 次。入院后行超声检查:胎儿颅骨光环缺损,头顶部见一混合性包块,大小约 60 mm × 45 mm,向外膨出,羊水中似可见一带状增强回声漂浮,并与胎儿头顶部相连。羊水指数 73 mm。遂行催产素引产,自娩出一死男婴。见头颅骨缺如,脑及脑膜膨出,唇腭裂,一羊膜片自胎盘脐带起始处分离并与胎儿头顶相连;单脐动脉,总羊水量 200 ml。产后诊断:1 孕 34 周,死婴;2 ABS;3 单脐动脉;4 羊水过少。

因患者拒绝,2 例死婴未行尸解及染色体检查。



图 1 ABS 所致胎儿多发畸形

2 讨论

ABS 是围生儿死亡的重要原因之一。迄今为止,该征病因尚不清楚。多数学者同意 1968 年 Torpin 提出的羊膜早破引起纤维带状物缠绕胎儿所致 ABS 的假说。胎儿可表现出各种畸

(下转 1409 页)

作者简介:程春霞(1975 -),女,山东省泰安市人,硕士,主治医师,主要从事妇产科临床方面的研究,发表论文 7 篇。电话:0731-8618045, E-mail: chunxiacheng@hotmail.com

收稿日期:2006-10-08;修回日期:2006-12-22