S100A2,a putative tumor suppressor,at early stage of human lung carcinogenesis[J]. Cancer Res,2001,61(21):7999-8004.

[21] 唐兆前,李力,张玮,等.卵巢癌细胞卡铂耐药相关肿瘤抑制基因的表达变化及其启动子区甲基化观察[J].山东医药,2010,50(18):22-24.

[22] Tsai WC,Tsai ST,Jin YT,et al. Cyclooxygenase-2 is involved in S100A2-mediated tumor suppression in squamous cell carcinoma [J]. Mol Cancer Res,2006,4(8):539-547.

(收稿日期:2011-05-15)

·综 述·

细菌群集运动与生物被膜和耐药性的关系

赵龙华 综述,杨维青△ 审校
(广东医学院微生物学与免疫学教研室,广东湛江 524023)

关键词:群体感应; 抗药性; 生物被膜; 群集运动
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.17.032 **文献标识码**:A **文章编号**:1673-4130(2011)17-1986-03

群集运动是细菌表面迁移的最快形式,它可使群集细菌迅速到达营养丰富的环境和宿主组织定植形成菌落,这给细菌提供了生态学优势。同时群集运动作为一种多细胞行为与被膜群体有很多相似性。群集运动的形成可使细菌逃逸抗菌剂和机体免疫系统的作用,使多种细菌产生耐药,甚至在细菌侵染植物和真菌的过程中也有群集运动的参与。细菌群集运动的形成受多系统的调控,包括群体感应(quorum sensing,QS)系统和环二核苷酸信号系统(C-di-GMP)等。鉴于群集运动在临床治疗及生态环境保护等方面的危害,阐明群集运动形成的调控机制,揭示群集运动的药物作用靶点,具有十分重要的现实意义。

1 细菌群集运动简介

群集运动是指细菌以群体方式在培养基表面由接种点向周围进行的依赖鞭毛的迁移运动[1-2],是细菌表面迁移的六种形式之一,这种形式的运动,在真细菌界普遍存在,然而该运动是一种特殊形式的运动,与泳动有着明显的区别[3]。一般而言,群集运动特指细菌在大于 0.45%的琼脂上所进行的表面迁移,而泳动发生在小于 0.45%的琼脂的培养基上。当 0.4%的琼脂被补充了 0.1%的酪蛋白氨基酸时,细菌同样在琼脂表面以协调方式进行迁移,这是群集运动的特例[4]。

群集运动的形成极其复杂,一般分为 3 个阶段:细菌首先在接种点形成一个整齐的菌落,之后即开始其分化过程,在菌落边缘短的繁殖体细胞分化成长达 50 μm 多核质和高鞭毛密度的群集细胞,最后这些分化了的细胞沿其长轴紧密排列形成群体,在鞭毛运动力推动下以群体方式移动。群体移动-固化(consolidation)即停止扩展开始繁殖生长,这个过程反复进行,形成变形杆菌特有的同心环状菌落。副溶血弧菌也能形成类似的周期行为;而其他群集运动细菌,如沙雷菌,则不出现周期性变化和明确的发育阶段。

2 群集运动的分子调控机制

群集运动既不是一个饥饿反应,也不是绝对的生长发育阶段,而是细菌对环境的一种激烈而又可逆的反应行为和复杂的适应过程[5]。该现象的群集特点提示存在于胞体间的信号,可能是关键的刺激因素。这些信号可能通过双成分调节系统、甚至表面的鞭毛来感受和传递。

目前研究的热点集中在两种最基础的细菌信号传导途径,即 QS 系统和 C-di-GMP。研究表明,这两种小分子信号途径足以调控很多复杂的细菌行为,包括群集运动、生物膜合成以及毒力因子等[6]。除了 QS 系统和 C-di-GMP,噬菌体 DMS3 也能影响群集运动的形成。在铜绿假单胞菌中,DMS3 能抑制该菌的群集运动和被膜形成[7]。

2.1 QS 系统对群集运动的调控 QS 系统是多数细菌中存在的一种监测群体密度并协调细菌生物学功能的信息交流机制,通过构建 QS 系统相关基因的缺失突变体以及对该系统信号分子的模拟,在群集运动的形成过程中起着重要作用。它可能通过调节细菌表面活性物质的产生,鞭毛基因的合成和群集细胞的分化而参与不同细菌的群集运动。

2.1.1 QS 系统通过调控生物表面活性剂来影响群集运动 细菌不同形式的运动性,包括耶尔森鼠疫杆菌的泳动和群集运动[8]、液化沙雷菌、铜绿假单胞菌、脂肪酶产生菌、洋葱假单胞菌、枯草芽孢杆菌和根瘤菌的群集运动都是受 QS 系统调控的。对于这些细菌来说,群集运动的产生依赖于强大的生物表面活性物质,它的合成是在 QS 系统的调控下完成的[9]。群集运动是群体感应调节的一种表型,在不同的细菌 QS 系统可能有不同的类型。如铜绿假单胞菌和脂肪酶产生菌,通过基于酰基化同型丝氨酸内酯(acyl-homoserine lactone,AHL)的 QS 系统来调节群集运动的形成;在液化沙雷菌和枯草芽孢杆菌中 SWrIR 群体感应系统控制群集运动;而洋葱假单胞菌的群集运动和被膜形成是 CEP 群体感应系统控制的。此外,AI-2 介导的群体感应和群集运动之间的联系也在奇异变形杆菌和副溶血性霍乱弧菌中发现。某些信号分子模拟化合物,如二酮哌嗪、卤代呋喃酮等可影响不同细菌的群集运动[10],又间接证明 QS 系统调节群集运动。

2.1.2 QS 系统通过对 flhdc 鞭毛操纵子的调控调节群集细胞分化 群集细胞最突出的特点是鞭毛的大量表达。对变形杆菌来说,其群集细胞可形成几百根鞭毛。群集运动产生的关键是鞭毛的生物合成,flhdc 鞭毛操纵子是支配细菌分化和迁移的调控网络的焦点,其编码的 FLHDC 转录活化因子是群集细胞分化的最主要的调节杠杆,该活化因子的浓度或活性状态决定细胞是否泳动或群集。flhdc 操纵子本身受到若干调节回路的控制,这些调节回路对于环境和营养条件的改变作出应答。在肠出血性大肠埃希菌中 QS 系统活化群体感应鞭毛调节子 QseB 的转录,该调节子编码一种反应调节器和感应器激酶。Sperndio 等表明这种双组份系统正向调节 flhdc 鞭毛操纵子,它依次活化鞭毛调节子的转录和鞭毛的有效合成和组装,从而促进群集细胞的分化。一般认为,flhdc 是控制鞭毛生物

△ 通讯作者,E-mail:yangwqgy@sina.com。

合成，细菌细胞分裂和毒力因子表达的整体调节因子。

2.2　C-di-GMP 对群集运动的调控　胞内信号分子 C-di-GMP 可以调控细菌的各种运动方式，包括泳动、群集运动、蹭行运动[11]等。C-di-GMP 调节群集运动的证据是铜绿假单胞菌中的 *bifA* 和 *sadc* 基因。*bifA* 基因编码 C-di-GMP 降解酶（PDE），该基因突变失活以后，细胞内 C-di-GMP 含量升高，细胞的群集运动丧失，说明 C-di-GMP 可以调控鞭毛介导的群集运动[12]。*sadc* 基因是位于细胞膜内侧的二鸟苷酸环化酶（DGC）编码基因具有 C-di-GMP 合成功能，敲除该基因以后，细胞内 C-di-GMP 含量降低，细胞的群集运动增强。因此 *bifA* 和 *sadc* 基因通过调整信号分子 C-di-GMP 的水平，共同调节群集运动。

此外，噬菌体 DMS3 与宿主菌体内的 CRISPR 区域相互作用可以抑制铜绿假单胞菌的被膜形成和群集运动[13]。这可能限制噬菌体在菌群内的传播影响，从而减少了感染更大群体的机会。鉴于此噬菌体有望成为控制生物被膜的新武器。

3　群集运动与生物被膜形成的双重关系

细菌的运动性在细菌定植到宿主组织表面和后继的被膜形成中发挥了关键作用[14]。在多种细菌中鞭毛介导的群集运动与生物膜的形成密切相关。在铜绿假单胞菌、产气单胞菌、副溶血性弧菌等种属的细菌中发现群集运动使细菌在物体表面的快速蔓延能在一定程度上促进生物膜的形成。但最近 Thomas 等从临床住院患者中分离的 237 株铜绿假单胞菌中发现被膜形成和群集运动呈负相关[15]。Robert 等也提出了一致的观点：在该细菌中 CbrA 感受器激酶反相调节群集运动和被膜形成[16]。目前研究表明群集细菌通过表面活性剂的产生分散被膜的形成。当缺乏生物表面活性剂，如 serrawettin w2 或者 Lps 时，黏质沙雷菌和肠道沙门菌的群集运动受到抑制，但是促进了被膜的形成，反之亦然，如：来自枯草芽孢杆菌的表面活性素促进该菌群集运动的同时分散预成型的被膜，亦可以阻止肠道沙门菌、大肠杆菌和奇异变形杆菌的被膜形成。最近鼠李糖脂的一种新作用也被报道，高水平的鼠李糖脂可以阻碍被膜的形成[17]。群集运动在生物膜形成中的双重作用还有待进一步的完善。这也给人们提供了一种崭新的思路，能否通过模拟生物表面活性剂的结构来阻碍生物膜的形成。

4　群集运动与抗菌剂耐药性的关系

细菌所造成的感染中形成生物被膜是极为常见的现象，BF 对抗菌剂的耐药性明显增加并难以被彻底清除，由此造成的慢性反复感染已经成为临床上治疗的难题[18]。群集细菌与被膜群体有很多相似性，值得注意的是其对多种抗菌剂的高度耐受性[19]。伤寒杆菌、铜绿假单胞菌[20]、大肠杆菌、洋葱假单胞菌、黏质沙雷氏菌和枯草芽孢杆菌的群集细胞与它们的浮游菌相比明显提高对抗菌剂的耐受性。

虽然所有的细菌在高细胞密度时都可以耐受更高的抗菌剂浓度，但是运动能力和运动速度给了群集细菌额外的生存优势。研究表明，获得性耐药和运动速度之间存在直接关系。细菌在抗菌剂下的暴露时间是影响耐药性的关键因素。细菌的运动速度越快暴露在抗菌剂下的时间就越短，越不容易被抗菌剂杀死，耐药性也就越高。总之，具有群集现象的细菌在对抗抗菌剂方面显示出一种普遍的生存策略。因此通过调控病原细菌的群集运动而控制感染，有可能成为今后治疗病原菌感染和合成新型抗菌剂的重要手段。

5　群集运动的危害

很多细菌都具有运动的能力，细菌的运动具有重要的生态学和病理学意义。对于病原菌来说，运动性是重要的致病因素之一。细菌的群集迁移能力在许多病原菌和宿主相互作用过程中有非常重要的影响。研究表明群集运动有助于奇异变形杆菌对泌尿道的定植[21]。该菌分化成高鞭毛密度的群集细胞后，除了能使细菌群体快速迁移到泌尿道黏膜表面释放大量的毒力因子溶血素，促进细菌对宿主细胞的入侵外，还使得该菌对多黏菌素 B 产生高水平耐药[22]。群集细胞的毒力蛋白表达也是增加的如溶血素、尿素酶和蛋白酶等[23]。此外，群集细胞对抗菌剂的抗性提高了 10～200 倍，是造成当前细菌耐药性的罪魁祸首之一，对抗机体免疫，导致严重的临床问题。最近拉维等人在体外建立的铜绿假单胞菌泌尿道感染模型中发现亚 MIC 剂量的阿奇霉素可以明显抑制该菌 QS 信号分子、泳动、群集运动、颤搐运动和被膜的形成，是该菌的毒力明显降低[24]。此外，蔓越橘提取物原花青素和其他含有鞣酸的物质也可以抑制铜绿假单胞菌的群集运动。但上述物质能否抑制其他细菌的群集运动还有待进一步研究。

从应用的角度来看，控制群集运动在临床治疗及生态环境保护和工业生产等方面具有非常重要的意义。通过建立简单、易操作的细菌群集运动模型来了解有关细菌中信号调节。抗菌剂耐药、生物膜和毒力因子的产生等具有重要意义。

参考文献

[1] Butler MT, Wang Q, Harshey RM. Cell density and mobility protect swarming bacteria against antibiotics[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(8): 3776-3781.

[2] Verstraeten N, Braeken K, Debkumari B, et al. Living on a surface: swarming and biofilm formation[J]. Trends Microbiol, 2008, 16(10): 496-506.

[3] Turner L, Zhang R, Darnton NC, et al. Visualization of flagella during bacterial swarming[J]. J Bacteriol, 2010, 192(13): 3259-3267.

[4] Huber B, Riedel K, Hentzer M, et al. The cep quorum-sensing system of Burkholderia cepacia H111 controls biofilm formation and swarming motility[J]. Microbiology, 2001, 147(9): 2517-2528.

[5] Yeung AT, Torfs EC, Jamshidi F, et al. Swarming of Pseudomonas aeruginosa is controlled by a broad spectrum of transcriptional regulators, including MetR[J]. J Bacteriol, 2009, 191(18): 5592-5602.

[6] 丁莎莎，王瑶. 鞭毛介导的运动性与细菌生物膜的形成的关系[J]. 微生物学报, 2009, 49(4): 417-422.

[7] Zegans ME, Cady KC, Wagner JC, et al. Bacteriophage DMS3 inhibits biofilm formation and swarming of Pseudomonas aeruginosa in a CRISPR dependent manner[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008, 49: 4486.

[8] Merritt JH, Brothers KM, Kuchma SL, et al. SadC reciprocally influences biofilm formation and swarming motility via modulation of exopolysaccharid production and flagellar function[J]. J Bacteriol, 2007, 189(22): 8154-8164.

[9] Daniels R, Vanderleyden J, Michiels J. Quorum sensing and swarming migration in bacteria[J]. FEMS Microbiol Rev, 2004, 28(3): 261-289.

[10] Kim C, Kim J, Park HY, et al. Furanone derivatives as quorum-sensing antagonists of Pseudomonas aeruginosa[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2008, 80(1): 37-47.

[11] 路新枝，刘湛军，于文功. 环二鸟苷酸-新型的细菌第二信使[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2009, 25(5): 400-406.

[12] Kuchma SL, Ballok AE, Merritt JH, et al. CycliC-di-GMP-Mediated repression of swarming motility by Pseudomonas aeruginosa: the pilY1 gene and its impact on surface-associated behaviors[J]. J Bacteriol, 2010, 192(12): 2950-2964.

[13] Zegans ME, Wagner JC, Cady KC, et al. Interaction between bac-

teriophage DMS3 and host CRISPR region inhibits group behaviors of Pseudomonas aeruginosa[J]. J Bacteriol, 2009, 191(1): 210-219.

[14] O′May C, Tufenkji N. The swarming motility of Pseudomonas aeruginosa is blocked by cranberry proanthocyanidins and other tannin-containing materials[J]. Appl Environ Microbiol, 2011, 77(9): 3061-3067.

[15] Murray TS, Ledizet M, Kazmierczak BI. Swarming motility, secretion of type 3 effectors and biofilm formation phenotypes exhibited within a large cohort of Pseudomonas aeruginosa clinical isolates[J]. J Med Microbiol, 2010, 59(5): 511-520.

[16] Yeung AT, Bains M, Hancock RE. The sensor kinase CbrA is a global regulator that modulates metabolism, virulence, and antibiotic resistancein Pseudomonas aeruginosa[J]. J Bacteriol, 2011, 193(4): 918-931.

[17] Wilhelm S, Gdynia A, Tielen P, et al. The autotransporter esterase EstA of Pseudomonas aeruginosa is required for rhamnolipid production, cell motility, and biofilm formation[J]. J Bacteriol, 2007, 189(18): 6695-6703.

[18] 魏志华，徐元宏. 铜绿假单胞菌生物被膜耐药机制的研究进展[J]. 国际检验医学杂志，2009，30(5)：469-471.

[19] Lai S, Tremblay J, Déziel E. Swarming motility: a multicellular behaviour conferring antimicrobial resistance[J]. Environ Microbiol, 2009, 11(1): 126-136.

[20] Yeung AT, Torfs EC, Jamshidi F, et al. Swarming of Pseudomonas aeruginosa is controlled by a broad spectrum of transcriptional regulators, including MetR[J]. J Bacteriol, 2009, 191(18): 5392-5602.

[21] Wang WB, Chen IC, Jiang SS, et al. Role of RppA in the regulation of polymyxin B susceptibility, swarming, and virulence factor expression in Proteus mirabilis[J]. Infect Immun, 2008, 76(5): 2051-2062.

[22] Jiang SS, Lin TY, Wang WB, et al. Characterization of UDP-glucose dehydrogenase and UDP-glucose pyrophosphorylase mutants of Proteus mirabilis: defectiveness in polymyxin B resistance, swarming, and virulence[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(5): 2000-2009.

[23] Bala A, Kumar R, Harjai K. Inhibition of quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa by azithromycin and its effectiveness in urinary tract infections[J]. J Med Microbiol, 2011, 60(Pt 3): 300-306.

[24] Gode-Potratz CJ, Chodur DM, McCarter LL. Calcium and iron regulate swarming and type III secretion in vibrio parahaemolyticus[J]. J Bacteriol, 2010, 192(22): 6025-6038.

（收稿日期：2011-05-15）

·综　　述·

PCR-HRM 技术在微生物鉴定中的应用

于静波 综述，孟冬娅△，薛文成 审校
（沈阳军区总医院检验科，辽宁沈阳 110840）

关键词：聚合酶链反应；　高分辨熔解曲线；　微生物；　应用
DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2011.17.033　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1673-4130(2011)17-1988-02

目前，在微生物检验中，分子生物学技术的应用逐渐增多[1-6]，高分辨熔解曲线(high resolution melting, HRM)技术就是其中的一种[7]，其分析原理是在标准 PCR 试剂的基础上再加入可与双链 DNA 结合的饱和性荧光染料，扩增结束后即开始运行 HRM 程序，将 PCR 产物自低到高(60～95 ℃)逐步升温，每次升温 0.02～0.1 ℃，此过程双链 DNA 解链，荧光染料脱落，不再产生荧光信号。以温度为横坐标，荧光强度变化率为纵坐标作图，即可得出对应于特定双链 DNA 的特征曲线。本文从以下两种策略就 HRM 在微生物鉴定、分型及细菌的耐药性基因分析等方面的研究进展综述如下。

1　设计通用引物，对比特异性熔解曲线与标准株曲线(或者数据库)，对细菌进行鉴定

Samuel 等[8]于 2009 年针对 16S rRNA 基因序列 3 个高变区(V1、V3 和 V6)设计通用引物，对 58 种共 100 株细菌进行了 PCR-HRM 分析。每组中不同的曲线用惟一的字母代码标识，同一可变区内相似的曲线使用相同的字母代码。结果显示同一可变区内的不同菌种有相似的曲线，但是当 3 个可变区编码串联组合分析时，可将受检的 58 种共 100 株细菌准确鉴别，包括靶基因中只有单个核苷酸差异的炭疽芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌。随后的验证试验中，作者随机抽取了 40 个关节液和脑脊液临床样本，与常规培养鉴定的符合率为 100%。该作者于 2010 年将该技术应用于血培养检测[9]，除 6/52 混合感染或所建立的数据库中不存在的菌株，其余菌株均被准确鉴定到种水平。

2　设计针对某菌属(种)特异性序列引物，在 PCR-HRM 分析中又分以下两种方法

2.1　与已建立的标准曲线对比进而鉴定菌种或分型　Castellanos 等[10]于 2010 年设计针对鸟结核杆菌 *MAP*1506 基因的特异性引物，采用熔解曲线标准化比值方法，准确地区分了 30 例已知序列的鸟结核杆菌类结核亚种的Ⅰ型、Ⅱ型、Ⅲ型。此次实验中，作者利用标准化比值成功消除因温度变化导致荧光强度背景差异所引起的曲线漂移。Stephens 等[11]利用该技术分析 *spaX* 基因重复序列的高度多态性，对 MRSA 进行分型，准确区分了 44 例 MRSA 中的 20 种基因型，有两种基因型仅 1 bp 碱基差异，该方法未能将其区分。利用此策略的还有 Richardson 等[12]对化脓性链球菌进行的多位点序列分型，Jonasl 等[13]对布氏杆菌的 8 个种进行鉴定。

Steer 等[14]用 RT-PCR-HRM 法对 12 种血清型的鸡腺病毒六位体基因的 3 个基因片段进行检测，与限制性核酸内切酶法的结果进行对比，仅 301～890 bp 区间的产物能准确地将 12 种血清型区分开。Ghorashi 等[15]通过该方法检测传染性黏液囊病病毒的 *VP*2 基因的高度可变区，认为该方法可用于病毒筛查、分型和发现突变株。

2.2　将扩增产物与非标记探针(标准株基因片段)混合，通过

△　通讯作者，E-mail：mengdongya@hotmail.com。