

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54(5):487-497; 4 May 2014
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicroen
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.05.003

洋葱伯克氏菌致病因子的研究进展

唐庆华, 朱辉, 覃伟权*

中国热带农业科学院椰子研究所, 海南 文昌 571339

摘要: 洋葱伯克氏菌群 (*Burkholderia cepacia* complex, Bcc) 大部分成员是重要的人类条件致病菌。虽然其分类学和分子鉴定研究已取得较大进展, 但致病分子机理尚不明确, 新药物开发进展十分缓慢。Bcc 对许多常用临床抗菌药物都有耐药性, 因此揭示其致病因子对新型抗菌药物或治疗方法开发具有重要意义。本文对 Bcc 主要致病因子、致病机理研究中存在的问题和采用的遗传工具方面的进展做了综述, 重点介绍了耐药性、蛋白分泌系统、群体感应系统等 6 类重要致病因子。

关键词: 洋葱伯克氏菌群, 致病因子, 耐药性, 蛋白分泌系统, 群体感应系统

中图分类号: S432.4 文章编号: 0001-6209(2014)05-0487-11

洋葱伯克氏菌群 (*Burkholderia cepacia* complex, Bcc) 是伯克氏菌属一组重要成员, 由表型相似、基因型不同的 17 个种组成^[1], 具有极其丰富的代谢多样性和环境适应性, 广泛分布于各种环境中^[2-3]。Bcc 既是人类的“朋友”又是危险的“敌人”。尽管一些 Bcc 成员具有生物防治、生物修复等功能, 但同时也是人类、动物和植物的重要病原菌。大部分 Bcc 成员是囊性纤维化 (cystic fibrosis, CF) 病人和免疫力低下人群的条件致病菌, 能引起多种疾病, 如败血症、肺炎、心内膜炎和伤口感染等, 其中 *B. cepacia* 曾引起患者死亡^[2]。目前, 尽管在 Bcc 分类及分子鉴定方面取得了显著进步, 但这些细菌致病性的分子机理研究和新药物开发等进展依然非常缓慢。Bcc 可在患者之间传播且对许多抗生素具有较高的耐药性, 由其引起的感染治疗非常困难, 死亡率很

高。因此, Bcc 致病机理和致病因子的研究对开发新型抗菌药物或治疗方法具有非常重要的意义。本文对 Bcc 主要致病因子包括耐药性、电缆式菌毛、黏附素、鞭毛、BCESM (*Burkholderia cepacia* epidemic strain marker, BCESM) 序列和 Cenocepacia 岛、群体感应系统和蛋白分泌系统等进行了系统概述, 并对今后的研究方向进行了展望。

1 Bcc 致病因子

迄今, 已经鉴定的 Bcc 致病因子有耐药性、电缆式菌毛和鞭毛、胞外多糖、脂多糖、嗜铁素、胞外蛋白、蛋白分泌系统、群体感应系统、Hfq 调控因子、调控蛋白 Pbr 和其他一些致病因子^[1-8]。Bcc 毒性因子的定位及其功能见图 1 (引自 Loutet 和 Valvano^[5])

基金项目: 海南省自然科学基金项目 (312041); 海南省重点项目编号 (ZDXM20130004, ZDXM20130049); 海南省重大科技项目 (ZDZX2013008); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (1630052012002)

* 通信作者。Tel: +86-898-63331269; E-mail: QWQ268@163.com

作者简介: 唐庆华 (1978-), 男, 河北景县人, 助理研究员, 博士, 研究方向为病原细菌-寄主互作的功能基因组学。E-mail: tchuna129@163.com

收稿日期: 2013-07-29; 修回日期: 2013-12-09

并获得了美国微生物学学会的授权,以 *B. cenocepacia* 为代表菌)和表 1,以下介绍的是 11 类

Bcc 主要致病因子。

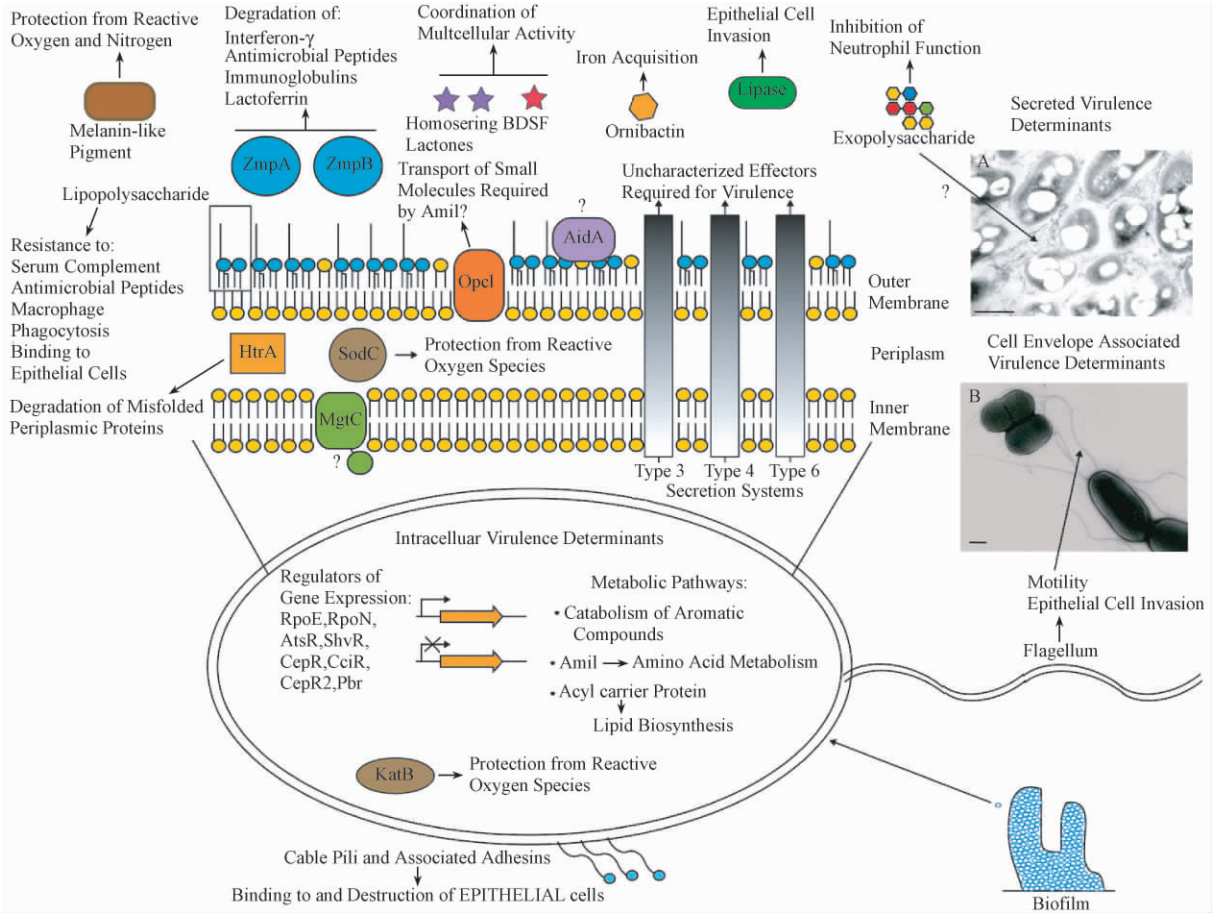


图 1. *Burkholderia cenocepacia* 毒性因子的定位及功能

Figure 1. Localization and known functions of *Burkholderia cenocepacia* virulence determinants.

1.1 耐药性

Bcc 的一个特点是对许多临床抗菌药物具有先天耐药性 (Innate resistance to antibiotics), 其耐药性与外膜渗透性低、具有可诱导的头孢菌素酶或存在主动外排泵系统等有关^[9-10]。*Bcc* 能产生二氢叶酸还原酶,使其能耐甲氧苄氨嘧啶类药物。一些 *Bcc* 菌株能产生超广谱 β -内酰胺酶,它不仅能水解青霉素,而且可利用 β -内酰胺类抗生素作为碳源,从而对青霉素类药物耐药。*Bcc* 外膜渗透性低有助于对其他类抗菌药物的耐药性^[11]。*Bcc* 外膜上的膜孔蛋白能阻止亲水性抗菌药物通过,使得 *Bcc* 菌对 β -内酰胺类、多黏菌素类和氨基糖苷类抗菌药物具有耐药性。*Bcc* 还具有与铜绿假单胞菌泵出系统相同的外膜脂蛋白,表现出对喹诺酮类抗菌药物和氯霉素也高度耐药。最近,有学者发现 *Bcc* 可通过自发

变异或通过质粒或整合子的基因转移等从其他细菌中获得耐药性^[12]。总之,多重耐药性通常是多个突变和(或)耐药性基因作用积累的结果,但 *Bcc* 特定的生长状态对多重耐药性也有促进作用。

1.2 电缆式菌毛和 22 kDa 黏附素

菌毛 (Pili) 的作用是黏附寄主细胞。*Bcc* 菌毛有五种类型,但只有电缆式菌毛 (Cable pili) 与流行性菌株有关。电缆式菌毛具有周生表达的附属结构,可能起固定大团细胞聚合物的作用,该菌毛及 22 kDa 黏附素 (22-kDa adhesin) 调控的粘蛋白和细胞角蛋白 CK13 (一种中间丝蛋白) 对于细菌毒性和激发 IL-8 诱导炎症反应是必须的^[13]。表达电缆式菌毛和粘附素基因的 *B. cenocepacia* 菌株可以利用 CK13 作为寄主细胞受体^[14]。在 CF 患者呼吸道上皮细胞的 CK13 表达量增加,这表明携带 CK13 的

B. cenocepacia 极有可能引起寄主尤其是 CF 患者感染。不表达或很少表达菌毛基因的 Bcc 菌株不产生 22 kDa 蛋白也不能结合黏蛋白。在 Bcc 中, 22 kDa 菌毛相关蛋白还可能调控菌毛结合到口腔上皮细胞。此外, Sajjan 等发现仅有同时表达电缆式菌毛和 22 kDa 黏附素的菌株才能结合、侵入并穿过鳞状上皮^[15], 这表明电缆式菌毛和 22-kDa 粘附素对吸附作用是必需的, 也表明侵袭性 Bcc 菌株含有这些毒性因子。

1.3 鞭毛

鞭毛(Flagella)对侵袭体外培养的肺上皮细胞有贡献。*B. cenocepacia* 菌株 J2315 丧失移动能力的 *fliG*(细菌鞭毛马达蛋白复合体的一个组分)和 *fliI*(鞭毛转运蛋白必需的 ATP 酶亚基)基因突变体能吸附但不能侵入人工培养的肺细胞, 这表明细菌运动能力与该缺陷表型有关^[16]。Urban 等构建了一个 *B. cenocepacia*(菌株 K56-2) II 型鞭毛蛋白基因 *fliCII* 缺失突变体。实验发现野生型菌株感染 3d 后小鼠死亡率达 40%, 而突变株感染的小鼠没有出现垂死现象, 感染 3d 后全部存活了下来。有趣的是野生型菌株和突变株感染后, 小鼠的体重、白细胞或支气管肺泡灌洗液中的中性粒细胞差异不明显; 但野生菌株感染 24h 后, 小鼠的血清和支气管肺泡灌洗液中 IL-8 同系物(KC 和 MIP-2)水平高于突变株感染的小鼠, 且前者的支气管肺泡灌洗液中含有血液。这些结果表明, 可能是由于感染野生型菌株的小鼠体内炎症反应增加从而加剧了肺损伤, 最终导致了死亡率的差异^[17]。细菌鞭毛蛋白是类 Toll 受体 5 (TLR5) 识别的唯一配体^[18]。*B. cenocepacia* 通过与 TLR5 互作可启动信号通路从而引起下游转录因子 NF- κ B 的激活和 IL-8 的分泌。该结果表明, *B. cenocepacia* 细胞免疫应答中 IL-8 的诱导至少部分是 TLR5 信号介导引起的, 而该信号受鞭毛表达的调控^[17]。

1.4 BCESM 序列和 Cenocepacia 岛

Mahenthiralingam 等^[19]发现 Bcc 流行性菌株(epidemic strains)基因组 DNA 内存在一段 1.4 kb 的保守序列 BCESM, 该标记中存在一个 834 bp 的开放阅读框, 称为 *esmR*, 它与一些负转录调控因子同源。随后发现 BCESM 序列具有 *B. cenocepacia* 特异性, 在非流行性 CF 菌株中不存在, 也很少分布于环境菌株中, 但它并不反映一个菌株能否引起 CF 患

者感染或在患者间传播的能力。在加拿大 CF 患者中超过 80% 的 *B. cenocepacia* 菌株存在 BCESM 序列, 但在美国只有 23% 的菌株含有该标记^[20]。尽管存在这些流行性差异, 但现已证明含有该序列的菌株高度危险, 能够取代 *B. multivorans* 进行侵染, 可在病人之间传播并可能导致 CF 患者死亡率上升。Baldwin 等最近发现 BCESM 标记是基因组岛 Cenocepacia 岛(Cenocepacia island, *cci*)的一部分, 它具有细菌致病岛的所有特征^[19, 21]。除了毒力功能, 它还编码几个与代谢相关的基因。*cci* 基因编码的产物包括群体感应(CciIR 系统)、脂肪酸生物合成和氨基酸代谢必需的基因以及插入序列、转录调控因子(包括最初命名的 *esmR*)和一些保守的功能未知的基因。突变酰胺酶基因(氨基酸代谢簇的一部分)产生的突变株在大鼠慢性感染过程中侵染持续性降低, 而突变酰胺酶基因下游的群体感应系统或孔蛋白基因产生的突变株引起的炎症反应显著减少^[19]。有趣的是, 同样在大鼠慢性感染模型中突变 *esmR* 基因并不影响毒力, 这表明在这种模式下该调控因子可能并不控制毒力必需基因的表达。

1.5 蛋白分泌系统

蛋白分泌(Protein secretion)也是一种重要毒性机制, 它对细菌毒力和生存是至关重要的。目前, 在 Bcc 中已经鉴定了 6 种蛋白分泌系统, 可转运各种细菌毒力因子, 如蛋白酶、溶血素和粘附素。在 *B. cenocepacia* ET12 家系和 *B. vietnamiensis* 中 I 型和 II 型分泌系统负责运输溶血活性蛋白。*B. vietnamiensis* 菌株 G4 中 V 型分泌系统编码的主动转运黏附素的基因突变后, 可导致细菌在寄主植物体内过度定植^[22]。*B. cenocepacia* 菌株 J2315 中有一个 III 型分泌系统, 其突变株感染小鼠肺部后迅速被清除, 这表明 III 型分泌系统对毒力很重要^[13]。最近, IV 型和 VI 型分泌系统的重要性也被发现。Aubert 等发现 *B. cenocepacia* 菌株 K56-2 中 VI 型分泌系统对毒力具有作用^[23]。在 *B. cenocepacia* 中鉴定了两个 IV 型分泌系统, 其中 Ptw 系统的作用是泌出植物细胞毒性蛋白, 该蛋白可调控发病植物组织的水浸状表型, 该系统对 *B. cenocepacia* 在吞噬细胞内的生存也是必需的^[24]; 而 bc-VirB/D4 系统在质粒移动中起作用^[25]。此外, Saldías 和 Valvano^[13]发现 VI 型分泌系统对吞噬细胞的定位功能有助于 *B. cenocepacia* 的生存。

1.6 群体感应系统

群体感应或群体效应(Quorum sensing, QS)是一种细菌群体行为调控机制,是细菌细胞间利用扩散性信号分子(diffusible signal factor, DSF)进行信息交流的过程,以响应群体密度从而产生各种协调性行为,如调控基因表达^[26]。现已证明所有 *Bcc* 中都存在群体感应系统,可以调控细菌许多不同毒力表型,包括毒素、蛋白酶、脂肪酶和嗜铁素的产生、群集运动以及生物膜的形成^[27-28]。第一个 *Bcc* 群体感应基因是在 *B. cenocepacia* 菌株 K56-2 中鉴定的,称为 *cepI* 和 *cepR*, *CepIR* 系统在啮齿动物和蠕虫感染模型中对毒力是至关重要的。另外一个重要发现是某些 *B. cenocepacia* 菌株中有两个细胞-细胞通信系统,其中一个在 *B. cenocepacia* 毒力岛内编码。突变毒力岛系统(*CciIR*)的合酶基因 *ccil* 产生的突变株能引起大鼠呼吸道感染后炎症反应显著降低,这表明该系统对毒力是必需的^[23]。此外, *B. cenocepacia* 能对铜绿假单胞菌群体感应分子做出应答。有趣的是在某些环境中(包括植物和囊性纤维化患者肺内)绿脓杆菌、*B. cenocepacia* 和嗜麦芽窄食单胞菌可一起共存^[29],但是绿脓假单胞菌不产生信号分子 DSF(顺式-11-甲基-2-癸烯酸)或 BDSF(顺式-2-十二碳烯酸)。3 个系统是如何调节毒力基因表达的还有待进一步研究。

1.7 胞外多糖

胞外多糖(Exopolysaccharide, EPS)是一种重要致病因子和生物膜的组分,有助于细菌在恶劣条件下生存^[30]。*Bcc* 菌株能产生一种名为 Cepacian 的菌表多糖。Cepacian 在启动生物膜形成中不是必需的,但在生物膜形成中起作用。最近证明 Cepacian 是一种致病因子^[31],能抑制嗜中性粒细胞的趋化性和活性氧的产生。此外, *Cepacian* 对 *Bcc* 在干旱条件下的生存和对毒性金属离子的耐性中是必需的,这表明它对 *Bcc* 菌在恶劣环境下的生存很重要^[32]。*B. cenocepacia* 临床菌株产生的 EPS 能干扰人嗜中性粒细胞吞噬细菌并有助于小鼠感染模型中细菌的存活。Zlosnik 等^[33]发现在 CF 患者分离的 *Bcc* 临床菌株粘液状表型与肺部持久感染有关,而该表型与胞外多糖的生产有关。

1.8 脂多糖

脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)是许多革兰氏阴性细菌的毒力因子,由脂质 A、核心寡糖和 O-

抗原组成, *Bcc* 的 LPS 能引起强烈的免疫反应从而促进宿主细胞损伤^[11]。*Bcc* 脂质 A 骨架的磷酸残基上连有许多 4-氨基-4-脱氧核糖,该结构有助于 *Bcc* 降低细胞表面的阴离子电荷,抑制其与阳离子抗菌药物如多粘菌素和抗菌肽的结合,从而降低这些药物的作用。O-侧链是抗原决定因子,可作为细菌免疫学分类的依据。*B. cenocepacia* 菌株 J2315 的 O-抗原基因簇位于 1 号染色体,该基因簇可能是通过水平基因转移获得的。*Bcc* 菌株 LPS 活性与另外一种主要 CF 病原菌铜绿假单胞菌具有显著差异。与后者的 LPS 相比, *Bcc* 菌株在上皮细胞诱导增加的中性白细胞爆发活性和诱导增加的白介素-8(IL-8)是铜绿假单胞菌的 4-5 倍^[34]。这些特点可能与 *Bcc* 和铜绿假单胞菌在相同感染部位的病理生理差异有关。此外,脂多糖还具有清除活性氧的作用,从而减少宿主免疫系统对 *Bcc* 的伤害^[35]。

1.9 生物膜

生物膜(Biofilms)可以保护细菌免受各种环境因子的伤害。*Bcc* 细菌在体内和体外都可形成生物膜^[36],且该过程与产生酰基-高丝氨酸内酯的能力相关,后者是参与生物膜形成的细胞间信号转导分子。*Bcc* 和铜绿假单胞菌均可形成混合生物膜。在生物膜中, *Bcc* 可以接收铜绿假单胞菌分泌的群体感应信号,这表明存在“交叉对话”。生物膜的形成有助于 *Bcc* 在 CF 患者肺部免受抗菌药物以及寄主防御因子的影响。因此,生物膜在 *Bcc* 持续侵袭患者肺部过程中起着关键作用。

1.10 嗜铁素

在 *Bcc* 致病过程中嗜铁素(Siderophore)如螯铁蛋白、水杨酸、洋葱伯克菌素和 ornibactin 也起作用^[37]。除了铁元素吸收作用,螯铁蛋白在组织损伤中也起作用^[38]。现已证明螯铁蛋

白结合的离子是一种有效的羟基自由基(OH)形成催化剂,这些离子被周围的超氧化物和过氧化氢氧化后可增加 *Bcc* 对肺动脉、血管内皮细胞和肺上皮细胞的损伤。

1.11 MgtC 蛋白

MgtC 是一种内膜毒性蛋白,存在于亲缘关系较远的多种致病菌(如沙门氏菌、结核杆菌和 *B. cenocepacia*)中,是病原菌对小鼠的毒力、在巨噬细胞中的存活以及在低 Mg^{2+} 条件下的生长均是必需的^[5, 39-41]。*B. cenocepacia* 菌 *mgtc* 突变株在小鼠的

巨噬细胞和大鼠琼脂珠慢性肺感染模型中不能存活,但是 MgtC 对 *B. cenocepacia* 抵抗巨噬细胞内各种环境因子不是必需的,如活性氧以及阳离子抗菌肽等^[39]。目前,对 MgtC 的作用机制尚不清楚。

我们对 Bcc 细菌的致病因子作了总结(表 1)。这些毒性因子有以下几个特点:第一,多集中在少数几个种且大多是通过动物模型开展研究的。目前,研究最多的 Bcc 菌是 *B. cepacia*、*B. cenocepacia*、*B. multivorans* 和 *B. vietnamiensis*,其中前两者既是人类病原菌又是植物病原菌^[1-3]。大多数 Bcc 细菌的致病因子是通过动物模型(如大鼠模型)鉴定的,在植物模型中验证的有嗜铁素(ornibactin)、脂多糖、CciRI 群体感应系统、III 型分泌系统等。第二,一些毒性因子(如生物膜)可能存在于 Bcc 所有种内,但仅在少数种内进行了详细研究。第三,一些毒性因子仅分布于一个或几个种内,如 *Cenocepacia* 岛仅存

在于 *B. cenocepacia* 中。此外,Bcc 细菌的一些毒性因子与其他病原细菌也存在差异。以群体感应信号分子为例,尽管绿脓杆菌、*B. cenocepacia* 和嗜麦芽窄食单胞菌可一起共存,但是绿脓假单胞菌不产生信号分子顺式-11-甲基-2-癸烯酸(DSF)或顺式-2-十二碳烯酸(BDSF);而在黄单胞菌中对信号分子的研究更深入,现已证明十字花科黑腐病菌的信号分子顺式-11-甲基-2-十二碳烯酸可以调控至少 165 个基因(包括一些致病基因)的表达^[42]。

尽管 Bcc 细菌能产生各种致病因子,但是并非所有的 Bcc 菌株都产生这些致病因子,且尚无证据表明哪一类致病因子在致病过程中起主导作用。事实上,相对于其他病原菌,Bcc 细菌致病性并不依赖于某个单一基因,越来越多的证据表明其毒力是多基因控制的,涉及许多胁迫条件下与生存相关的基因^[7,43]。

表 1. 洋葱伯克氏菌群毒性因子及其分布

Table 1. *Burkholderia cepacia* complex virulence determinants and their distribution

virulence determinant	distribution	function	reference
resistance to antibiotics	all species	Has innate resistance to multiple clinically-relevant antimicrobials	1, 9 - 12
flagella	<i>B. cenocepacia</i>	Required for full adherence to mucin and epithelial cells	1, 13 - 15
flagella	all species	Required for cellular invasion, but not adherence in <i>B. cenocepacia</i> ; required for signalling through TLR5 and virulence in mouse lung infection model	1, 16 - 18
Cenocepacia island	<i>B. cenocepacia</i> only	Encodes second quorum-sensing system; required for persistence and inflammation in rat lung infection model	1, 19 - 21
type III secretion	genomovars II to VII, absent from genomovar I	Required for virulence of <i>B. cenocepacia</i> in a murine infection model	1, 13
type IV secretion	identified in <i>B. cenocepacia</i>	Necessary for causing plant tissue water soaking in onions and for intracellular survival in epithelial cells and macrophages played a role in plasmid mobilization	2, 13, 24 - 25
type V secretion	studied in <i>B. vietnamiensis</i>	Related to the colonization in plant host for <i>B. vietnamiensis</i>	2, 22
type VI secretion	<i>B. cepacia</i> , <i>B. cenocepacia</i> , <i>B. vietnamiensis</i>	Required for protection from predation by the amoeba <i>Dictyostelium discoideum</i> ; played a role in infection	1 - 2, 23
quorum sensing	probably all species; systematically studied for genomovars I-V	Required for full virulence; modulates expression of toxins, proteases, lipases and siderophores; modulates swarming motility and biofilm production	1, 2, 26 - 29
exopolysaccharide	<i>B. cepacia</i> and <i>B. cenocepacia</i>	Inhibited neutrophil chemotaxis and the production of oxygen reactive species; played a role in the establishment of thick biofilms; required for survival to desiccation conditions and resistance to toxic ion metals	1 - 3, 30 - 33
LPS	all species	Resistance to the antibiotic effects of cationic antimicrobial peptides and polymyxin; contributed to host cell damage	1, 11, 34 - 35
biofilm formation	probably all species; systematically studied for genomovars I-V	Formation dependent on membrane biogenesis and quorum sensing; provided increased resistance to antibiotics	1, 36

续表 1

virulence determinant	distribution	function	reference
siderophore production	all species; systematically studied in <i>B. cepacia</i> and <i>B. Cenocepacia</i>	Ornibactin biosynthesis and uptake are essential for virulence of <i>B. cenocepacia</i> in rat lung infection model	1 37 - 38 43
MgtC protein	studied in <i>B. cenocepacia</i>	Required for intraphagosomal survival in macrophages and growth under conditions of low magnesium	5 39 - 41
Hfq regulator	studied in <i>B. cepacia</i>	Acted as RNA chaperones involved in the riboregulation of target mRNAs; played a major role in the survival of Bcc bacteria under those stress conditions; contributed to virulence	1
catalase and SOD	all species	Resistance to reactive oxygen species might allow intracellular survival	1 5
regulatory protein Pbr	studied in <i>B. cenocepacia</i> isolate K56 - 2	Contributed to virulence of strain K56 - 2 in <i>C. elegans</i> ; involved in the regulation of phenazine biosynthesis , important for several cellular processes related to stress resistance and virulence.	1 5 44
extracellular proteases	genomovars I , III , IV , VII , IX	Required for virulence in strain K56 - 2 but not Pc715j; HtrA can aid in to degrade misfolded proteins; degrade lactoferrin , type IV collagen , immunoglobulins , and antimicrobial peptides	5
haemolysin	identified in <i>B. cenocepacia</i>	Induced degranulation and cell death in human phagocytes; haemolytic activity observed in genomovars I , III , IV , VII , IX	1 5
melanin	genomovar I , II , and III	Scavenges free radicals in vitro	1 5
aidA protein	studied in <i>B. cenocepacia</i>	Virulent for <i>B. cenocepacia</i> isolate K56 - 2 in rat agar bead , <i>G. mellonella</i> , and alfalfa seedling model	5 43
outer membrane porin OpcI	studied in <i>B. cenocepacia</i>	Full virulence in <i>C. elegans</i> , <i>G. mellonella</i> models , and alfalfa seedling model	5 43
phenylacetic acid catabolic pathway	studied in <i>B. cenocepacia</i>	Required for virulence in the <i>C. elegans</i> model and up-regulated in vitro when bacteria are grown in synthetic cystic fibrosis medium; may be important for nutrient acquisition or the metabolism	5
regulatory protein RpoE	studied in <i>B. cenocepacia</i>	Required for the ability of engulfed <i>B. cenocepacia</i> to delay phagolysosomal fusion in murine macrophages; required for the ability of <i>B. cenocepacia</i> to grow under conditions of high osmolarity and high temperature	5
regulatory protein RpoN	studied in <i>B. cenocepacia</i>	Required for the ability of engulfed <i>B. cenocepacia</i> to delay phagolysosomal fusion in murine macrophages; necessary for <i>B. cenocepacia</i> motility and biofilm formation	5
ShvR regulator	studied in <i>B. cenocepacia</i>	Related to virulence in <i>C. elegans</i> , <i>G. mellonella</i> models; shiny colony morphology was related to biofilm formation , motility , and production of extracellular matrices and siderophores	5
acyl carrier protein	studied in <i>B. cenocepacia</i>	Related to fatty acid content and increased cell surface hydrophobicity; relevant to virulence	5
amidase amil	studied in <i>B. cenocepacia</i>	Related to lipid biosynthesis	5
kinase regulator AtsR	studied in <i>B. cenocepacia</i>	Acted as a negative regulator of multiple virulence properties	5

2 Bcc 致病因子研究的模型及策略

2.1 Bcc 致病因子研究的模型

侵袭模型对 Bcc 致病因子研究至关重要,有动物和植物模型、体内和体外模型之分^[1,3,5]。最常见的动物模型是大鼠琼脂珠模型,该模型最早用于肺

部慢性感染铜绿假单胞菌的研究,小鼠中也有类似的实验。在慢性肉芽肿病研究中则为小鼠模型。线虫、蜡螟幼虫和斑马鱼也常用于动物模型。植物模型有苜蓿幼苗和洋葱组织模型。此外,还有巨噬细胞、上皮细胞、树突细胞、嗜中性粒细胞和变形虫模型。

2.2 Bcc 致病因子研究的策略及遗传工具

可用于伯克氏菌遗传操作的策略有基因敲除、

RNA 高通量测序 (RNA-seq)、转座子诱变、微阵列和消减杂交等^[3,5]。先前,由于可用的遗传工具有限以及对用于遗传选择的大多数抗生素具有高度耐药性,这使得伯克氏菌遗传操作极具挑战性,其致病机理研究一直非常缓慢。但是,近十年来已经开发出一系列专门用于 *Bcc* 的诱变技术^[47]。目前,已报道的技术有等位基因置换、无标记靶标基因缺失和无标记等位基因置换^[5]等。高通量 RNA 测序 (RNA-seq) 策略可通过比较转录水平的差异,从而揭示出 *B. cenocepacia* 临床菌株与环境菌株间的调控差异,有助于阐释不同生境菌株的特定适生性^[48]。转座子随机诱变策略在 *Bcc* 致病因子研究中应用较广泛,一些 *Bcc* 重要致病因子(如编码参与胞外多糖 Cepacian 生物合成的 *bceI* 基因簇)就是采用该策略鉴定的^[3];该策略也已成功用于水稻白叶枯病菌^[49]和十字花科黑腐病菌^[50]的研究。我们则采用了信号标签诱变策略 (Signature tagged mutagenesis, STM) 开展 *B. andropogonis* 菌致病因子的研究,这是一种引入了检测体系的转座子随机插入策略,优点是可显著减少工作量和实验动物。目前,STM 在突变体鉴定、功能验证中应用非常广泛,已帮助科研人员获得了大量生物学信息^[51]。此外,我们还在开展 *B. andropogonis* 菌全基因组测序工作。目前,全基因组测序工程已给生命科学研究带来了革命性的进步。对 *Bcc* 基因组序列进行深入分析有助于了解其生理学、对特定环境的分子适应性以及重要的致病因子等^[52-56]。总之,全基因组序列信息等与上述策略、遗传工具珠联璧合有望在基因组水平实现高通量的致病因子筛选和功能验证。

3 *Bcc* 致病因子研究存在的问题

Bcc 致病因子研究中最大的问题是侵染模型。首先,不存在可以准确地模拟 *Bcc* 感染人类的模型。尽管建立了各种侵染模型,但仅有脊椎动物具有适应性免疫系统,其他大多数生物完全依赖其先天免疫系统抵御 *Bcc* 的侵染。尽管这些侵染模型可以模拟一些环境和临床 *Bcc* 菌株存活的各种不同生态位,但是没有一个模型能够准确地反映 *Bcc* 侵染的真实环境(如 CF 患者肺部)。因此,这些模型各有其优点和不足。第二,*Bcc* 菌株间存在较大变异。例如,研究广泛的 3 个 *B. cenocepacia* 菌株 H111、

K56-2 和 J2315 在蜡螟和线虫侵染模型中表现完全不同^[44]。此外,菌株间某些特定致病因子的产生、对毒力的贡献甚至是否存在该因子等均有差异,如调控蛋白 Pbr 在菌株 K56-2 侵染线虫时对毒力有贡献,但该蛋白在菌株 J2315 中却不存在^[45]。第三,*Bcc* 细菌致病因子功能验证不能仅限于一个或两个侵染模型实验。迄今,尚没有发现在所有侵染模型(脊椎动物、无脊椎动物、植物和组织培养模型)均表现无毒性的突变株。因此,那么许多有价值的突变株还必须进行其他侵染模型的功能验证以确定它们对毒力贡献的大小。一些 *Bcc* 毒力因子具有寄主特异性,若采用多种模型进行实验,其结果可能会明显不一致^[44]。因此,选择侵染模型时要非常慎重。总之,对于 *Bcc*(尤其是新鉴定的)致病因子,要在各种侵染模型进行验证以检验他们是否在种内和种间所有菌株中对毒力都是必须的。

开展 *Bcc* 毒力因子和致病机理研究旨在鉴定新的靶标位点从而合理设计治疗 *Bcc* 感染的新策略和新药物,这是目前也是今后研究的重点。需要指出的是一个特定基因或基因产物必须满足:(1)对 *Bcc* 在寄主内的生存是必需的;(2)在不同菌株间应非常保守的(如 RND 超级家族外排泵基因^[3,46]);(3)在人类体内完全不存在或极少存在,那么该基因或基因产物才能作为一个潜在的药物靶标加以研究、开发和利用。

4 结论和展望

Bcc 致病性为多基因控制,这涉及许多已知和未知的致病因子和决定因素。由于 *Bcc* 耐药性是一个全球性难题,患者被感染后难以治愈。因此,*Bcc* 细菌致病因子和致病机理研究对鉴定新靶标从而合理设计新策略和药物以防治 *Bcc* 感染至关重要,现在迫切需要用于开发新药物的靶标位点。目前,有几类致病因子具有现实的和潜在的开发价值,如外排泵系统、群体感应系统和调控蛋白等。此外,其他病原细菌(如人类病原菌铜绿假单胞菌和植物病原黄单胞菌等)致病机理的研究也有很好的借鉴意义,如针对编码调控毒力因子表达的基因(如群体感应系统的组分)或参与关键毒力因子(如胞外多糖 Cepacian)合成的蛋白质也是潜在的新靶标;主要调控蛋白如非编码小 RNA 分子伴侣 Hfq 也具有显

著的新药物和新疗法开发的價值。从长远来看,针对 LPS 和表面蛋白进行疫苗开发以及针对重要调控蛋白以及群体感应系统进行抑制剂开发有望成为今后研究的重点。开展 Bcc 致病因子和致病机理研究,需要选择合适的侵染模型、策略以及遗传操作工具,但是不应局限于单个菌株或某个种,而应该针对所有常见的 Bcc 细菌,理想情况是对 *Burkholderia* 属所有致病菌。总之,今后基因组相关策略的应用,包括基因组测序、基于微阵列的表达技术以及大规模诱变等技术将有助于发现新的和未知的致病因子以及开发新策略和抗菌药物,从而防治 Bcc 感染引起的疾病。

致谢:在本文修改过程中葡萄牙生物技术和生物工程研究所的助理教授 Jorge H. Leitão 就洋葱伯克氏菌侵染模型的问题方面给予作者很好的启发,加拿大西安大略大学的 Miguel A. Valvano 教授提供了 *B. cenocepacia* 毒性因子的原图,在此表示衷心感谢。

参考文献

[1] Mahenthiralingam E , Urban TA , Goldberg JB. The multifarious , multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. *Nature* , 2005 , 144(3) : 144-156.

[2] Leitão JH , Sousa SA , Ferreira AS , Ramos CG , Silva IN , Moreira LM. Pathogenicity , virulence factors and strategies to fight against *Burkholderia cepacia* complex pathogens and related species. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 2010 , 87(1) : 31-40.

[3] Sousa SA , Ramos CG , Leitão JH. *Burkholderia cepacia* complex: emerging multihost pathogens equipped with a wide range of virulence factors and determinants. *International Journal of Microbiology* , 2011. doi: 10.1155/2011/607575: 1-9.

[4] Deng Y , Boon C , Eberl L , Zhang LH. Differential modulation of *Burkholderia cenocepacia* virulence and energy metabolism by the quorum-sensing signal BDSF and its synthase. *Journal of Bacteriology* , 2009 , 191(23) : 7270-7278.

[5] Loutet SA , Valvano MA. A decade of *Burkholderia cenocepacia* virulence determinant research. *Infection and Immunity* , 2010 , 78(10) : 4088-4100.

[6] Ramos CG , Sousa SA , Grilo AM , Eberl L , Leitão JH. The *Burkholderia cenocepacia* K56-2 pleiotropic regulator

Pbr is required for stress resistance and virulence. *Microbial Pathogenesis* , 2010 , 48(5) : 168-177.

[7] Sousa SA , Ramos CG , Moreira LM , Leitão JH. The *hfg* gene is required for stress resistance and full virulence of *Burkholderia cepacia* to the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Microbiology* , 2010 , 156(Part 3) : 896-908.

[8] Sousa SA , Feliciano JR , Ramos CG , Leitão JH. *Burkholderia cenocepacia* J2315 small non-coding RNA MavA is required for fitness and virulence. *Journal of Cystic Fibrosis* , 2013 , 12(Supplement 1) : S76.

[9] Kumar A , Schweizer HP. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Advanced Drug Delivery Reviews* , 2005 , 57(10) : 1486-1513.

[10] Rajendran R , Quinn RF , Murray C , McCulloch E , Williams C , Ramage G. Efflux pumps may play a role in tigecycline resistance in *Burkholderia* species. *International Journal of Antimicrobial Agents* , 2010 , 36(2) : 151-154.

[11] Vinion-Dubiel AD , Goldberg JB. Review: lipopolysaccharide of *Burkholderia cepacia* complex. *Innate Immunity* , 2003 , 9(4) : 201-213.

[12] Chernish RN , Aaron SD. Approach to resistant gram-negative bacterial pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* , 2003 , 9(6) : 509-515.

[13] Saldías MS , Valvano MA. Interactions of *Burkholderia cenocepacia* and other *Burkholderia cepacia* complex bacteria with epithelial and phagocytic cells. *Microbiology* , 2009 , 155(Part 9) : 2809-2817.

[14] Chernish RN , Aaron SD. Approach to resistant Gram-negative bacterial pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* , 2003 , 9(6) : 509-515.

[15] Sajjan US , Xie H , Lefebvre MD , Valvano MA , Forstner JF. Identification and molecular analysis of cable pilus biosynthesis genes in *Burkholderia cepacia*. *Microbiology* , 2003 , 149(Part 4) : 961-971.

[16] Tomich M , Herfst CA , Golden JW , Mohr CD. Role of flagella in host cell invasion by *Burkholderia cepacia*. *Infection and Immunity* , 2002 , 70(4) : 1799-1806.

[17] Urban TA , Griffith A , Torok AM , Smolkin ME , Burns JL , Goldberg JB. Contribution of *Burkholderia cenocepacia* flagella to infectivity and inflammation. *Infection and Immunity* , 2004 , 72(9) : 5126-5134.

[18] Hayashi F , Smith KD , Ozinsky A , Hawn TR , Yi EC , Goodlett DR , Eng JK , Akira S , Underhill DM , Aderem

- A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, 2001, 410 (6832): 1099-1103.
- [19] Baldwin A, Sokol PA, Parkhill J, Mahenthalingam E. The *Burkholderia cepacia* epidemic strain marker is part of a novel genomic island encoding both virulence and metabolism-associated genes in *Burkholderia cenocepacia*. *Infection and Immunity*, 2004, 72(3): 1537-1547.
- [20] Speert DP, Henry D, Vandamme P, Corey M, Mahenthalingam E. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex in patients with cystic fibrosis. *Canada Emerging Infectious Diseases*, 2002, 8(2): 181-187.
- [21] Hacker J, Kaper JB. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annual Review of Microbiology*, 2000, 54: 641-679.
- [22] O'Sullivan LA, Weightman AJ, Jones TH, Marchbank AM, Tiedje JM, Mahenthalingam E. Identifying the genetic basis of ecologically and biotechnologically useful functions of the bacterium *Burkholderia vietnamiensis*. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(4): 1017-1134.
- [23] Aubert DF, Flannagan RS, and Valvano MA. A novel sensor kinase-response regulator hybrid controls biofilm formation and type VI secretion system activity in *Burkholderia cenocepacia*. *Infection and Immunity*, 2008, 76(5): 1979-1991.
- [24] Sajjan US, Carmody LA, Gonzalez CF, LiPuma JJ. A type IV secretion system contributes to intracellular survival and replication of *Burkholderia cenocepacia*. *Infection and Immunity*, 2008, 76(12): 5447-5455.
- [25] Zhang R, LiPuma JJ, Gonzalez CF. Two type IV secretion systems with different functions in *Burkholderia cenocepacia* K56-2. *Microbiology*, 2009, 155(Part 12): 4005-4013.
- [26] Lazdunski AM, Ventre I, Sturgis JN. Regulatory circuits and communication in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 2004, 2(7): 581-592.
- [27] Venturi V, Friscina A, Bertani I, Devescovi G, Aguilar C. Quorum sensing in the *Burkholderia cepacia* complex. *Research in Microbiology*, 2004, 155(4): 238-244.
- [28] Li YH, Tian XL. Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. *Sensors*, 2012, 12: 2519-2538.
- [29] Ryan RP, Dow JM. Communication with a growing family: diffusible signal factor (DSF) signaling in bacteria. *Trends in Microbiology*, 2011, 19(3): 145-152.
- [30] Cescutti P, Cuzzi B, Herasimenka Y, Rizzo R. Structure of a novel exopolysaccharide produced by *Burkholderia vietnamiensis*, a cystic fibrosis opportunistic pathogen. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 94(1): 253-260.
- [31] Sousa SA, Ulrich M, Bragonzi A, Burke M, Worlitzsch D, Leitão JH, Meisner C, Eberl L, Sá-Correia I, Döring G. Virulence of *Burkholderia cepacia* complex strains in gp91^{phox-/-mice}. *Cell Microbiology*, 2007, 9(12): 2817-2825.
- [32] Ferreira AS, Leitão JH, Silva IN, Pinheiro PF, Sousa SA, Ramos CG, Moreira LM. Distribution of cepacian biosynthetic genes among environmental and clinical strains of the *Burkholderia* genus and role of this exopolysaccharide on resistance to stress conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(2): 441-450.
- [33] Zlosnik JE, Hird TJ, Fraenkel MC, Moreira LM, Henry DA, Speert DP. Differential mucoid exopolysaccharide production by members of the *Burkholderia cepacia* complex. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008, 46(4): 1470-1473.
- [34] Reddi K, Phagoo SB, Anderson KD, Warburton D. *Burkholderia cepacia*-induced IL-8 gene expression in an alveolar epithelial cell line: signaling through CD14 and mitogen-activated protein kinase. *Pediatric Research*, 2003, 54(3): 297-305.
- [35] Cuzzi B, Cescutti P, Furlanis L, Lagatolla C, Sturiale L, Garozzo D, Rizzo R. Investigation of bacterial resistance to the immune system response: Cepacian depolymerisation by reactive oxygen species. *Innate Immun.* 2012, 18(4): 661-671.
- [36] Coenye T. Social interactions in the *Burkholderia cepacia* complex: biofilms and quorum sensing. *Future Microbiology*, 2010, 5(7): 1087-1099.
- [37] Agnoli K, Lowe CA, Farmer KL, Husnain SI, Thomas MS. The ornibactin biosynthesis and transport genes of *Burkholderia cenocepacia* are regulated by an extracytoplasmic function factor which is a part of the Fur regulon. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(10): 3631-3644.
- [38] Lamont IL, Beare PA, Ochsner U, Vasil AI, Vasil ML. Siderophore mediated signalling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(10): 7072-7077.
- [39] Maloney, KE, Valvano MA. The *mgtC* gene of *Burkholderia cenocepacia* is required for growth under

- magnesium limitation conditions and intracellular survival in macrophages. *Infection and Immunity*, 2006, 74(10) : 5477-5486.
- [40] Rang C , Alix E , Felix C , Heitz A , Tasse L , Blanc-Potard AB. Dual role of the MgtC virulence factor in host and non-host environments. *Molecular Microbiology*, 2007, 63(2) : 605-622.
- [41] Retamal P , Castillo-Ruiz M , Mora GC. Characterization of MgtC , a virulence factor of *Salmonella enterica* serovar typhi. *PLoS One*, 2009, 4(5) : e5551.
- [42] Daniela Büttner , Ulla Bonas. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiology Review*, 2010, 34(2) : 107-133.
- [43] Saldías MS , Lamothe J , Wu R , Valvano MA. *Burkholderia cenocepacia* requires the RpoN sigma factor for biofilm formation and intracellular trafficking within macrophages. *Infection and Immunity*, 2008, 76(3) : 1059-1067.
- [44] Uehlinger S , Schwager S , Bernier SP , Riedel K , Nguyen DT , Sokol PA , Eberl L. Identification of specific and universal virulence factors in *Burkholderia cenocepacia* strains using multiple infection hosts. *Infection and Immunity*, 2009, 77(9) : 4102-4110.
- [45] Ramos CG , Sousa SA , Grilo AM , Eberl L , Leitão JH. The *Burkholderia cenocepacia* K56 - 2 pleiotropic regulator Pbr , is required for stress resistance and virulence. *Microbial Pathogenesis*, 2010, 48(5) : 168-177.
- [46] Perrin E , Fondi M , Papaleo MC , Maida I , Emiliani G , Buroni S , Pasca MR , Riccardi G , Fani R. Searching for new antimicrobial targets in *Burkholderia* genus: In silico analysis of the RND superfamily. *Journal of Cystic Fibrosis*, 2013, 12(Supplement 1) : S73.
- [47] Barrett , AR , Kang Y , Inamasu KS , Son MS , Vukovich JM , Hoang TT. Genetic tools for allelic replacement in *Burkholderia* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(14) : 4498-4508.
- [48] Yoder-Himes DR , Chain PSG , Zhu Y , Wurtzel O , Rubin EM , Tiedje JM , Sorek R. Mapping the *Burkholderia cenocepacia* niche response via high-throughput sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(10) : 3976-3981.
- [49] Zou HS , Yuan L , Guo W , Li YR , Che YZ , Zou LF , Chen GY. Construction of a Tn5-tagged mutant library of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* as an invaluable resource for functional genomics. *Current Microbiology*, 2011, 62(3) : 908-916.
- [50] Qian W , Jia YT , Ren SX , He YQ , Feng JX , Lu LF , Sun QH , Ying G , Tang DJ , Tang H , Wu W , Hao P , Wang LF , Jiang BL , Zeng SY , Gu WY , Lu G , Rong L , Tian YC , Yao ZJ , Fu G , Chen BS , R Fang X , Qiang BQ , Chen Z , Zhao GP , Tang JL , He CZ. Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Genome Research*, 2005, 15(6) : 757-767.
- [51] Mazurkiewicz P , Tang CM , Boone C , Holden DW. Signature-tagged mutagenesis: barcoding mutants for genome-wide screens. *Nature Reviews Genetics*, 2006, 7(12) : 929-939.
- [52] Pallen MJ , Wren BW. Bacterial pathogenomics. *Nature*, 2007, 449(7164) : 835-842.
- [53] Nandi T , Ong C , Singh AP , Boddey J , Atkins T , Sarkar-Tyson M , Essex-Lopresti AE , Chua HH , Pearson T , Kreisberg JF , Nilsson C , Ariyaratne P , Ronning C , Losada L , Ruan Y , Sung WK , Woods D , Titball RW , Beacham I , Peak I , Keim P , Nierman WC , Tan P. A genomic survey of positive selection in *Burkholderia pseudomallei* provides insights into the evolution of accidental virulence. *PLoS Pathogen*, 2010, 6(4) : e1000845.
- [54] Lieberman TD , Michel JB , Aingaran M , Potter-Bynoe G , Roux D , Jr MRD , Skurnik D , Leiby N , LiPuma JJ , Goldberg JB , McAdam AJ , Priebe GP , Kishony R. Parallel bacterial evolution within multiple patients identifies candidate pathogenicity genes. *Nature Genetics*, 2012, 43(12) : 1275-1280.
- [55] Vandamme P , Dawyndt P. Classification and identification of the *Burkholderia cepacia* complex: past, present and future. *Systematic and Applied Microbiology*, 2011, 34(2) : 87-95.
- [56] Holden MTG , Seth-Smith HMB , Crossman LC , Sebahia M , Bentley SD , Cerdeño-Tárraga AM , Thomson NR , Bason N , Quail MA , Sharp S , Cherevach I , Churcher C , Goodhead I , Hauser H , Holroyd N , Mungall K , Scott P , Walker D , White B , Rose H , Iversen P , Mil-Homens D , Rocha EPC , Fialho AM , Baldwin A , Dowson C , Barrell BG , Govan JR , Vandamme P , Hart CA , Mahenthiralingam E , Parkhill J. The genome of *Burkholderia cenocepacia* J2315 , an epidemic pathogen of cystic fibrosis patients. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(1) : 261-277.

Advances in virulence determinants in *Burkholderia cepacia* complex — A review

Qinghua Tang ,Hui Zhu ,Wei-quan Qin*

Coconut Research Institute , Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences , Wenchang 571339 , Hainan Province , China

Abstract: Most members of the *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) are important human opportunistic pathogens. Although progress has been achieved on the taxonomy and molecular identification of these bacteria , the molecular mechanisms of Bcc pathogenicity remain unclear and little development is made for new therapeutic agents. As Bcc is resistant to many common clinically-relevant antibiotics , revealing its virulence determinants is therefore very important to develop novel antibiotics or alternative anti-infective therapies. In this review , we summarize current advances in principal virulence determinants , limitations and genetic tools for studies of pathogenesis of Bcc. We primarily focus on key pathogenicity factors , including innate resistance to antibiotics , protein secretion system , and quorum-sensing systems.

Keywords: *Burkholderia cepacia* complexes , virulence determinant , resistance , protein secretion system , quorum-sensing system

(本文责编: 王晋芳)

Supported by the Natural Science Foundation of Hainan Province (312041) , by the Key Foundation of Hainan Province (ZDXM20130004 , ZDXM20130049) , by the Key Technological Protect of Hainan Province (ZDZX2013008) and by the National Nonprofit Institute Research Grant of CATAS-ITBB (1630052012002)

* Corresponding author. Tel: +86-898-63331269; E-mail: QWQ268@163.com

Received: 29 July 2013 / Revised: 9 December 2013

1953 年创刊以来所有文章全文上网

从 2008 年 1 月开始《微生物学报》的所有文章开始全文上网了。欢迎广大读者登陆本刊主页(<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>) 浏览、查询、免费下载全文! 由于《微生物学报》历史久远, 为方便读者查阅, 将刊期变化作以下统计。

《微生物学报》刊、期统计表

2014 年 5 月统计

时间	刊期	卷号	期号
1953 - 1956	半年刊	1 - 4	1 - 2
1957 - 1958	季刊	5 - 6	1 - 4
1959	季刊	7	1 - 2
1959 - 1962	停刊 3 年		
1962	季刊	8	3 - 4
1963 - 1965	季刊	9 - 11	1 - 4
1966	季刊	12	1 - 2
1966 - 1972	停刊 6 年半		
1973 - 1988	季刊	13 - 28	1 - 4
1989 - 2007	双月刊	29 - 47	1 - 6
2008 - 2013	月刊	48 - 53	1 - 12
2014	月刊	54	1 - 5