

文章编号: 1000- 0615(2004) 05- 0541- 06

## 蟹源致病性拟态弧菌的粘附及侵袭特性

胡守奎<sup>1,2</sup>, 李 瑾<sup>1</sup>, 余 为<sup>1</sup>

(1. 安徽农业大学畜牧水产学院, 安徽 合肥 230036;  
2. 安徽省疾病预防控制中心, 安徽 合肥 230061)

**摘要:** 病原菌对机体的致病作用是由其产生的各种毒力因子共同作用的结果, 其中病原菌对组织细胞或粘膜的表面粘附是造成机体感染的首要条件。病原菌的粘附因子主要包括菌毛粘附素和其它非菌毛粘附素(如鞭毛、外膜蛋白和血凝素等), 其中以菌毛介导的病原菌对组织细胞的粘附是细菌在体内定居、增殖释放毒力因子发挥致病作用的关键。为了揭示拟态弧菌 HX-4 的致病机理, 以经典粘附模式细胞 HEp-2 细胞作为体外细胞模型, 探讨蟹源致病性拟态弧菌 HX-4 株的粘附特性以及受体物质和抗全菌抗体对细菌粘附作用的影响, 同时采用庆大霉素清洗裂解培养法测定该菌对 HEp-2 细胞的侵袭力。结果显示, HX-4 菌株能粘附 HEp-2 细胞, 对 HEp-2 细胞具有侵袭力。细菌对 HEp-2 细胞的粘附方式为集聚性粘附, 最佳粘附时间为 1h, 甘露糖和抗体能显著抑制该菌的粘附, 表明 HEp-2 细胞上含有甘露糖样受体。该菌的粘附素除了主要是菌毛外, 可能还含有鞭毛、外膜蛋白、血凝素等多种成分。

**关键词:** 中华绒螯蟹; 致病性拟态弧菌; 粘附性; 侵袭性

**中图分类号:** S945.1<sup>+</sup>9      **文献标识码:** A

## Adhesion and invasion of pathogenic *Vibrio mimicus* isolated from *Eriocheir sinensis*

HU Shou-kui<sup>1,2</sup>, LI Jin-nian<sup>1</sup>, YU Wei-yi<sup>1</sup>

(1. College of Animal Husbandry and Fisheries, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China;  
2. Anhui Center for Disease Control and Prevention, Hefei 230061, China)

**Abstract:** It is well known that the most pathogenic bacteria can produce various virulence factors and they play function together and lead to the pathogenicity of bodis. The adhesion to cells or mucosa of pathogenic bacteria is the prime process which results in the infection of bodis. The adhesive factors of bacteria include pilus adhesion and non-pilus adhesion( such as flagella, outer membrane proteins and hemagglutination etc. ). The adhesion to tissue-cells or mucosa of pathogenic bacteria mediating by pilus plays a key role in colonizing and propagating various virulence factors that result in the pathogenicity of bodis. In order to reveal the pathogenesis mechanism of *vibrio mimicus* strain HX-4 in this study we used classic adhesive model-cell HEp-2 cells as cell model in vitro to test the adhesive ability of pathogenic *vibrio mimicus* HX-4 strain isolated from diseased *Eriocheir sinensis* to HEp-2 cells and the effect of receptors and antibody on the adhesion of the strain. At the same time, the invasive ability of the strain into HEp-2 cells was measured by lysiscounting assay. The results showed that *vibrio mimicus* HX-4 strain had invasive ability into HEp-2 cells, and it can adhere to HEp-2 cells in the way of assembly. That is to

收稿日期: 2003-03-03

资助项目: 安徽省教育厅资助项目(2001kj071); 安徽省自然科学基金项目(01041206)

作者简介: 胡守奎(1974-), 男, 安徽利辛人, 硕士, 主要从事微生物检验方面的研究。Tel: 0551-2863834; E-mail: shoukuihu@163.com

say *vibrio mimicus* HX-4 strain was positive bacteria of adhesion and the optimal adhesivetime was one hour. At the same time we also found that mannose and antibody could inhibit adherence effectively. These results demonstrated that there was D-mannose structure among the adhesive receptor structure and the adhesion of *vibrio mimicus* HX-4 strain may also include flagella, outer membrane proteins besides pilus.

**Key words:** *Eriocheir sinensis*; pathogenic *Vibrio mimicus*; adhesive ability; invasive ability

拟态弧菌(*Vibrio mimicus*)是弧菌属主要病原菌之一,不仅可引起人类的腹泻、中耳炎、外伤感染,而且能引起水产动物的弧菌病,给水产养殖业带来严重的经济损失<sup>[1,2]</sup>,因此,对该菌致病性的研究日益受到重视。病原菌的致病性是由其产生的毒力因子决定的,其中菌毛介导的病原菌对宿主细胞的粘附是细菌在体内定居、增殖释放毒力因子发挥致病作用的关键。本试验从发病河蟹体内分离鉴定到一株致病性拟态弧菌(HX-4株),经研究发现该菌可产生毒性较强的外毒素<sup>[3,4]</sup>。进一步以HEp-2细胞作为体外模型探讨该菌是否具有粘附、侵袭细胞能力,为研究其致病机理奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

拟态弧菌HX-4株由本室分离鉴定<sup>[5]</sup>。大肠杆菌标准株及沙门氏菌标准株购自中科院微生物研究所。HEp-2细胞由安徽医学科学研究所病毒室提供。D-甘露糖、D-葡萄糖、D-半乳糖和D-果糖购自上海试剂二厂。刀豆素A购自Sigma公司。1640细胞营养液自配。胰酶和Trion X-100购自上海生工试剂公司。庆大霉素购自安徽新力药业股份有限公司。兔抗HX-4全菌抗体由本实验室自行制备。

### 1.2 HX-4菌株的粘附试验

**细菌培养与菌液配制** HX-4菌株接种营养肉汤,28℃振荡培养24h,用无菌的10mmol·L<sup>-1</sup> pH7.2的PBS离心(1000r·min<sup>-1</sup>,15min)洗涤4次,菌体沉淀采用倾注平板法进行活菌计数,并用PBS配成10<sup>7</sup>CFU·mL<sup>-1</sup>的细菌悬液。

**细胞培养** 将培养瓶中长满单层的HEp-2细胞,用0.25%胰酶消化后,配成浓度为1×10<sup>5</sup>ind·mL<sup>-1</sup>的细胞液,分装在预先加有盖玻片(20mm×20mm)的细胞培养皿中(每皿2mL),置37℃CO<sub>2</sub>培养箱中培养24h,待细胞长成单层后,吸去营养液,用10mmol·L<sup>-1</sup> pH 7.2 PBS洗3次待用。

**粘附试验**<sup>[6]</sup> 将浓度为2×10<sup>7</sup>CFU·mL<sup>-1</sup>的细菌悬液混匀后加入细胞培养皿中(每皿2mL),置37℃培养箱分别孵育50min、1h、1.5h、3h,吸去菌液,用10mmol·L<sup>-1</sup> pH7.2的PBS洗涤3次,取出盖玻片,用甲醇/冰乙酸(体积比为3:1)固定5min,自然干燥,革兰氏染色5min,水洗、干燥封片,置油镜下观察记录粘附菌数。同时做PBS空白对照和大肠杆菌阳性对照。

**结果判定** 每一盖玻片上随机选取30个感染细胞,逐个计数粘附的菌数,求出平均值,以每个细胞平均粘附细菌数超过10个,判定为粘附阳性。

### 1.3 受体物质对HX-4菌株粘附作用的影响

**刀豆素(ConA)对细菌粘附作用的影响**<sup>[7]</sup> 将2mL 500μg·mL<sup>-1</sup>的ConA加入长满单层的细胞培养皿中,置37℃恒温箱中30min,倾去ConA,用PBS洗3次,然后再加入2mL 4×10<sup>6</sup>CFU·mL<sup>-1</sup>细菌悬液,37℃恒温箱中继续作用1h,吸去菌液,用无菌PBS冲洗3次后,取出盖玻片,甲醇-冰乙酸固定5min、干燥、革兰氏染色5min,水洗、干燥、封片镜检,记录粘附结果。同时做粘附试验对照。

**糖类对细菌粘附作用的影响**<sup>[8]</sup> 将2mL 1%葡萄糖、甘露糖、半乳糖和果糖溶液分别加入长满细胞单层的不同细胞培养皿中,37℃,30min,吸去糖液,加入2mL 2×10<sup>6</sup>CFU·mL<sup>-1</sup>的细菌悬液,于37℃培养箱继续作用1h,其余步骤同上。

### 1.4 抗体对细菌粘附作用的影响

将2mL 4×10<sup>6</sup>CFU·mL<sup>-1</sup>的细菌悬液和2mL兔抗HX-4株全菌抗体于37℃恒温箱中预作用30min,然后取2mL混合液加入长满单层的细胞培养皿中,于37℃恒温箱中继续作用1h,其余步骤同上。

### 1.5 侵袭试验

**庆大霉素最佳浓度的选择** 将庆大霉素配成200μg·mL<sup>-1</sup>、150μg·mL<sup>-1</sup>、100μg·mL<sup>-1</sup>、50μg·mL<sup>-1</sup>和20μg·mL<sup>-1</sup>5个浓度,各浓度庆大霉素液

分别与  $8 \times 10^6 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$  的细菌悬液等体积混合 (庆大霉素终浓度分别为  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $75 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  和  $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 置  $37^\circ\text{C}$  培养箱作用 2h 后, 分别取 100 $\mu\text{L}$  不同浓度庆大霉素作用的细菌悬液涂布接种营养琼脂平板,  $28^\circ\text{C}$  培养 48h, 观察有无细菌生长。

**侵袭试验** 采用庆大霉素清洗裂解培养法。将 1mL 浓度为  $1 \times 10^5$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$  的 HEp-2 细胞液加入 2 块 24 孔细胞培养板各孔中。第 1 块板各孔内预先加有小盖玻片, 待培养板中的 HEp-2 细胞长成单层后, 倾去培养液, 用  $10 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  pH 7.2 的 PBS 洗 3 次后, 在培养板各孔内加入 500 $\mu\text{L}$   $4 \times 10^6 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 HX-4 株细菌液; 第 2 块板分成 4 组, 每组 6 孔, 第 1 组加入 500 $\mu\text{L}$   $4 \times 10^6 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 HX-4 株细菌悬液, 第 2 组加入 500 $\mu\text{L}$   $4 \times 10^6 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$  的沙门氏菌细菌悬液做阳性对照, 第 3 组加入经兔抗 HX-4 抗体预处理后的 500 $\mu\text{L}$   $4 \times 10^6 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$  的细菌悬液, 第 4 组为不加细菌的细胞对照。将 2 块培养板置于  $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养箱中孵育 1h, 吸去细菌悬液, 用无菌  $10 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  pH 7.2 PBS 洗 10 遍, 接着每孔加入 1mL 含  $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  庆大霉素的营养液, 放  $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养箱继续孵育 2h, 再用  $10 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  pH 7.2 PBS 洗 5 遍。取出第 1 块板中的盖玻片, 进行固定、干燥、染色和油镜观察, 观察是否有侵入细胞的细菌。第 2 块板每孔加入 500 $\mu\text{L}$  含 1% Triton X-100 的 PBS,  $37^\circ\text{C}$  作用 5min, 迅速再加入 500 $\mu\text{L}$   $10 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  pH 7.2 PBS, 用吸管吹打数次获得细胞裂解液, 取 100 $\mu\text{L}$  细胞裂解液涂布接种营养琼脂平板

(每孔样品涂布 1 块), 置  $37^\circ\text{C}$  培养 48h, 记录菌落数量, 计算每孔内菌数。凡每孔细菌数  $\geq 1000$  CFU 者, 判为阳性, 表明该菌具有侵袭力。

## 2 结果

### 2.1 HX-4 菌株对 HEp-2 细胞的粘附

随机选取 30 个 HX-4 菌株感染的细胞, 观察记录其粘附菌数, 结果显示每个细胞平均粘附菌数为  $16.03 \pm 4.66$ , 即 HX-4 菌株为粘附阳性菌 (表 1)。试验中可见当 HX-4 菌株与 HEp-2 细胞作用为 50min 和 1h 时, 菌体集聚性粘附在细胞周围并且细胞形态完好。而当细菌与细胞作用 1.5h 后, 细胞膜破裂, 细胞开始变圆, 3h 时细胞发生明显病变, 大部分细胞脱落, 故选择最佳粘附时间为 1h。同时可见大肠杆菌阳性对照菌呈弥散性粘附在细胞周围, PBS 空白对照组的细胞形态完好, 无细菌粘附 (图版 6)。

### 2.2 受体物质对 HX-4 菌株粘附作用的影响

受体物质对 HX-4 菌株粘附作用的影响结果见表 2, 数据经 t 检验显示: D-甘露糖处理组与对照组差异显著 ( $P < 0.01$ ), 甘露糖可明显抑制 HX-4 菌株粘附细胞, 仅个别细胞表面含有 1~3 个细菌。而其它 3 种糖以及刀豆素处理组与对照组无明显差异 ( $P > 0.05$ ), 它们对 HX-4 菌株的粘附作用无明显影响 (图版 7~11)。

### 2.3 抗体对细菌粘附作用的影响

经抗体预处理后的 HX-4 菌体几乎不能粘附细胞, 只有个别细胞上有 1~3 个细菌粘附, 即抗体可明显抑制细菌粘附细胞 (图版 12)。

表 1 HX-4 菌株对 HEp-2 细胞的粘附 (粘附时间 1h)

Tab. 1 Adhesion of strain HX-4 to HEp-2 cells (adhesion for 1h)

细胞数 cell	各细胞粘附细菌数 number of adhesive bacteria					平均粘附细菌数(X $\pm$ D) (average)
30	29	12	13	18	20	$16.03 \pm 4.66$
	11	16	13	16	26	
	18	15	17	10	15	
	9	19	15	8	17	
	23	15	19	17	20	
	13	17	15	11	14	

## 2.4 HX-4 菌株对 HEp-2 细胞的侵袭力

将细菌悬液与不同浓度的庆大霉素溶液等体积混合作用 2h 后, 接种营养琼脂平板, 28℃ 培养 48h, 发现庆大霉素终浓度为  $100\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $75\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $50\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $25\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时均能完全抑制细菌生长; 而用终浓度为  $10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  庆大霉素溶液处理的菌液接种营养琼脂平板后仍有少数细菌生长, 故侵袭试验中选择庆大霉素最佳浓度为  $25\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

由表 3 可见: HX-4 菌株试验组及沙门氏菌阳性对照组的细胞裂解液中含菌量分别为  $1616\text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$  和  $2200\text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 根据判定标准, 均为侵袭阳性。而抗体处理组的细胞裂解液中含菌量为  $166\text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 呈侵袭阴性, 即抗体可抑制 HX-4 菌株侵袭细胞。同时未经裂解的感染细胞内有内化的细菌, 有些细菌正穿过细胞膜进入细胞(图版-14)。

表 2 受体物质对 HX-4 菌株粘附作用的影响

Tab. 2 The effect of receptors on adhesion of strain HX-4 to HEp-2 cells

受体物质 receptors	30 个细胞粘附菌数 number of adhesive bacteria of 30 cells										平均粘附菌数(X±D) average
	13	11	17	17	12	14	10	10	10	12	
D-果糖 D-fructose	15	17	16	16	14	13	12	15	12	10	13.3±2.37
	16	14	14	12	11	16	10	16	14	11	
D-葡萄糖 D-glucose	19	18	9	14	13	19	18	9	15	17	14.8±3.01
	12	13	13	14	13	15	19	17	9	17	
	20	14	16	14	14	16	11	17	15	14	
D-半乳糖 D-galactose	14	17	16	13	14	10	12	12	15	13	13.6±1.99
	16	12	13	14	15	13	14	10	15	12	
D-甘露糖 D-mannose	0	1	1	0	2	1	3	3	0	0	1.5±1.22
	2	1	3	0	3	1	2	1	1	3	
刀豆素 ConA	2	0	0	2	0	3	4	1	3	2	13±2.1
	12	12	10	14	17	12	13	15	10	11	
对照组 contrast	15	11	11	16	13	11	16	14	15	14	16.03±4.66
	11	13	11	13	10	15	14	17	13	14	
	29	18	16	26	17	9	8	15	20	15	
	12	20	13	18	10	19	17	19	13	11	
	13	11	16	15	15	15	23	17	17	14	

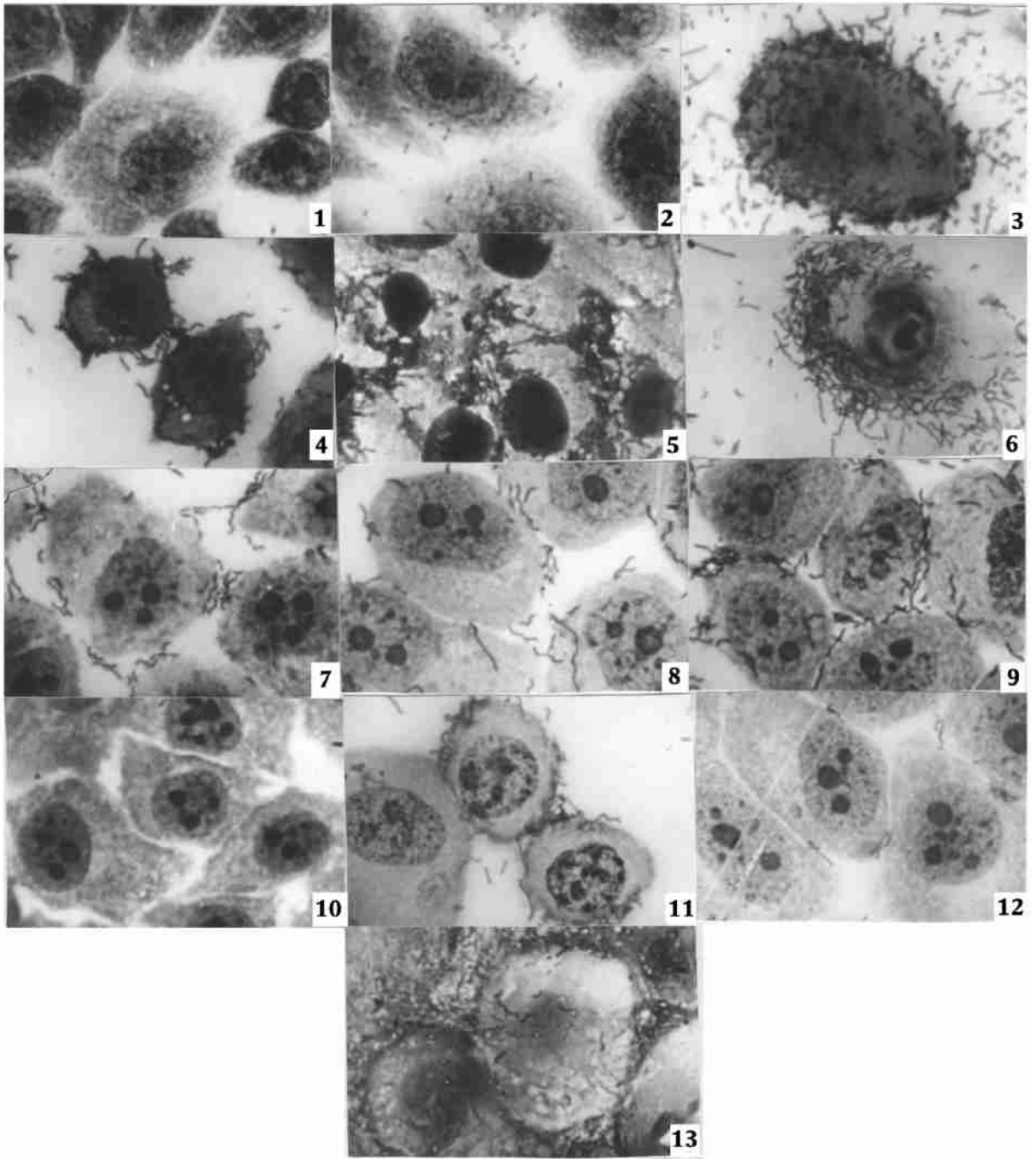
注: 甘露糖处理组与对照组比较差异极显著( $P < 0.01$ ); 其它受体物质处理组与对照组比较无显著差异( $P > 0.05$ )

Notes: The group treated by D-mannose compared with the contrast are very significantly different( $P < 0.01$ ); Other receptors compared with the contrast are no difference( $P > 0.05$ )

表 3 裂解 HEp-2 细胞所释放的细菌数

Tab. 3 Number of bacteria from split HEp-2 cells

组别 group	各孔对应平板中菌落数(CFU/plate) number of bacterial colony						平均菌落数 average	各孔含菌量(CFU/well) bacterial number
	1	2	3	4	5	6		
1	190	180	120	220	100	160	161.6	1616
2	220	170	300	260	280	240	212	2120
3	8	12	23	27	16	15	16.6	166
4	0	0	0	0	0	0	0	0



### 图版 Plate

1. 细胞对照; 2. 大肠杆菌阳性对照(粘附 1h); 3. HX-4 菌株对 HEp-2 细胞的粘附(50min); 4. HX-4 菌株对 HEp-2 细胞的粘附(1h); 5. HX-4 菌株对 HEp-2 细胞的粘附(1.5h); 6. HX-4 菌株对 HEp-2 细胞的粘附(3h); 7. 葡萄糖处理组; 8. 半乳糖处理组; 9. 果糖处理组; 10. 甘露糖处理组; 11. 刀豆素处理组; 12. 抗体处理组; 13. 拟态弧菌侵入细胞

1. negative; 2. positive ( adhesion for 1h); 3. Adhesion to HEp-2 cells of HX-4 ( adhesion for 50min); 4. Adhesion to HEp-2 cells of HX-4 ( adhesion for 1h ); 5. Adhesion to HEp-2 cells of HX-4 ( adhesion for 1.5h); 6. Adhesion to HEp-2 cells of HX-4 ( adhesion for 3h ); 7. treated by D-Glucose; 8. treated by D- galactose; 9. treated by D-Fructose; 10. treated by D-mannose; 11. treated by ConA; 12. treated by antibody; 13. *Vibrio mimicus* strain HX-4 invaded to HEp-2 cells

### 3 讨论

病原菌感染的第一步就是在宿主的组织细胞上定居,在定居过程中菌毛作为一种主要粘附素起主要作用。本试验以国际公认的粘附、侵袭模式细胞 HEp-2 作为体外模型分析蟹源致病性拟态弧菌 HX-4 株的粘附特性以及受体物质和抗全菌抗体对细菌粘附作用的影响。结果显示该菌具有较强的粘附力,最佳粘附时间为 1h,粘附方式为集聚性粘附。D-甘露糖能显著地抑制粘附,证明该菌对 HEp-2 细胞的粘附介导物质之一,含有甘露糖样受体。抗体体外抑制细菌粘附细胞的方式和机理可能是抗体中各蛋白成分与菌毛、鞭毛等粘附素相结合,封闭了粘附素上受体结合位点,从而抑制了细菌与细胞膜上受体粘附,提示了可用菌毛与其它粘附素制成疫苗预防弧菌病<sup>[7]</sup>。

由于 HX-4 菌株对庆大霉素高度敏感,故采用庆大霉素清洗裂解培养法测定细菌对 HEp-2 细胞的侵袭力,其原理是庆大霉素不能通过细胞膜,加入的庆大霉素溶液仅能杀死胞外菌,去除庆大霉素后,裂解细胞,使侵入胞内的细菌释放出来,通过平板计数法测定侵入胞内的细菌数量即可判定结果。本试验选择出庆大霉素最佳作用浓度为  $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,经该浓度庆大霉素处理后的细胞裂解液中含菌量为  $1616 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,呈侵袭阳性。同时未经裂解的感染细胞中含有内化的细菌,说明平板计数的结果是胞内菌数的真实反映。

虽然体外细胞模型不能完全反映体内的真实情况,但很多试验表明,细菌对体外细胞的粘附力和侵袭力与其致病性呈平行关系。本试验获得较为可靠的结果,为进一步研究该菌菌毛的粘附特性,提供了可借鉴的方法。

### 参考文献

- [1] Sheng J Y, Yin W L, Qian D, *et al.* Studies on the pathogens of bacterial diseases of *Eriocheir sinensis* [J]. *J Fish Sci China*, 2000, 7(3): 89- 92. [沈锦玉,尹文林,钱冬,等.中华绒螯蟹“腹水病”及“抖抖病”并发症的研究[J].中国水产科学,2000,7(3): 89- 92.]
- [2] Lin C. Study on the status of sea products carrying about causative *Vibrio* [J]. *Modern Preventive Medicine*, 2001, 28(2): 92- 94. [林朝.部分海产品携带致病性弧菌情况调查[J].现代预防医学,2001,28(2): 92- 94.]
- [3] Li Y Y, Li J N, Yu W Y. Selection of optimal producing condition of the exotoxin of *Vibrio mimicus* from *Eriocheir sinensis* [J]. *J Fish China*, 2003, 27(15): 468~ 473. [李玉英,李瑾年,余为一.蟹源拟态弧菌最佳产毒条件的筛选[J].水产学报,2003,27(5): 468- 473.]
- [4] Li J N, Yu W Y, Jiang D F, *et al.* Numerical identification and characterization of pathogenic *Vibrio mimicus* isolated from *Eriocheir sinensis* [J]. *Chinese J Vete Sci*, 2002, 22(3): 231- 233. [李瑾年,余为一,江定丰,等.蟹源拟态弧菌的编码鉴定及其特性分析[J].中国兽医学报,2002,22(3): 231- 233.]
- [5] Dai D Z, Shan H, Zheng M Q, *et al.* The adherence characteristic of *pili* in avian strains of *escherichia coli* [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 1998, 18(3): 33- 36. [戴鼎震,单虎,郑明球,等.禽大肠杆菌菌毛粘附特性的研究[J].动物医学进展,1998,18(3): 33- 36.]
- [6] Liu W G, Lun Y Z, Huang M, *et al.* The experimental study of inhibiting *Candida albicans* adhere to human epithelium [J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2001, 13(3): 164~ 165. [刘为国,伦永志,黄敏,等.阻断白色念珠菌粘附口腔上皮细胞的实验研究[J].中国微生态学杂志,2001,13(3): 164- 165.]
- [7] Gao S Y, Chen L L, Deng Z L. The study of adherence to cells of *Candida albicans* of gastric carcinoma strains [J]. *Microbiol*, 2002, 22(6): 17- 18. [高仕瑛,陈丽丽,邓仲良.白色念珠菌胃癌株对细胞粘附作用的研究[J].微生物学杂志,2002,22(6): 17- 18.]
- [8] Li F, Liu D, Meng F L, *et al.* Study on the adherence effect of TCP of *Vibrio cholerae* [J]. *Chin Prev Med*, 2001, 2(3): 194- 197. [李峰,刘端,孟凡亮,等.霍乱弧菌 TCP 菌毛粘附作用的研究[J].中国预防医学杂志 2001,2(3): 194- 197.]