

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(3):310-315; 4 March 2010
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

comE 基因缺陷影响肺炎链球菌体内诱导基因的表达

刘鑫, 尹楠林, 张雪梅, 杨晓亮, 庞丹, 王虹, 尹一兵, 胥文春*

(重庆医科大学医学检验系, 临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆市重点实验室, 重庆 400016)

摘要:【目的】筛选受 *comE* 调控的肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*, *S. pn*) 体内诱导基因。【方法】通过插入失活构建基因 *comE* 缺陷的 *S. pn* 菌株, 与野生菌株分别腹腔注射 BALB/c 小鼠, 经过体内诱导后取小鼠血, 分离细菌提取 RNA, 用 RT-PCR 法检测 13 个体内诱导基因 mRNA 水平差异。【结果】将 RT-PCR 结果通过 Quantity-one 灰度分析, 进行配对 t 检验, 显示 8 个体内诱导基因在缺陷菌株和野生菌株中 mRNA 表达水平具有统计学差异 ($P < 0.05$), 其中 *spd_0300*、*spd_0414*、*spd_0622*、*spd_1663*、*spd_1719*、*spd_0235*、*spd_0873* 受转化上调, *spd_1672* 受转化下调。【结论】筛选出受转化调控的体内诱导基因 *spd_0300*、*spd_0414*、*spd_0622*、*spd_1663*、*spd_1719*、*spd_0235*、*spd_0873*、*spd_1672*, 它们可能参与生长调节、温度感应、糖脂代谢等环节, 表明细菌转化可通过调节某些体内诱导基因的表达来增强细菌的毒力。

关键词: 肺炎链球菌; 转化; *comE*; 体内诱导基因; 毒力

中图分类号: R378.14 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2010) 03-0310-06

转化是指细菌形成感受态, 摄取外源性 DNA 的过程, 细菌的自然转化是许多重要生理现象的起始和源头。肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*, *S. pn*) 自然转化效率最高^[1], 大量证据表明转化可导致细菌的毒力和耐药性改变, 然而目前人们并不清楚转化如何调控其毒力。

细菌进入宿主体内后必须表达一些使自身毒力增强或对宿主损伤加剧的基因, 因此细菌在宿主体内表达的基因往往就是与致病紧密相关的毒力基因^[2]。本课题组前期通过体内表达技术 (*in vivo* expression technology, IVET) 和差异荧光诱导技术 (differential fluorescence induction, DFI), 筛选到了多个 *S. pn* 的小鼠体内诱导基因^[3], 其中多数功能已知, 但有 13 个基因编码功能未知的假想蛋白, 其是否与其他一些毒力因子一样受转化调控并不清楚。

comE 是影响 *S. pn* 感受态形成的关键基因, 各种环境因素对 *S. pn* 转化发生的调节都是通过直接

或间接方式影响 *comE* 的表达来实现的^[4], 因此失活基因 *comE* 将使细菌不能发生转化^[5]。本研究通过构建 D39 *comE* 缺陷菌 (D39 $\Delta comE$), 与 D39 野生菌同时腹腔注射小鼠后, 分析野生菌和缺陷菌中上述体内诱导基因的 mRNA 表达差异, 拟探讨这些基因是否受转化调控。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: *S. pn* 1t 菌株 (由美国加州大学 Morrison 教授惠赠 *S. pn* 的 CPM17, 扩增含红霉素抗性的 *comE* 断裂基因, 转化到由中国医学科学院提供的 2 型 *S. pn* 1 号菌株而得), 2 型 *S. pn* 菌株 D39, 购自英国国家典型菌种保藏中心 (National Collection of Type Culture, NCTC)。用于诱导 *S. pn* 形成感受态并发生转化的感受态刺激肽 (competence-stimulating peptide 2, CSP2) 由上海吉

基金项目: 国家自然科学基金 (30400376)

* 通信作者。Tel: +86-23-68485006; E-mail: xuwen0303@126.com

作者简介: 刘鑫 (1983 -), 男, 四川绵阳人, 硕士研究生, 主要从事肺炎球菌致病机制的研究。E-mail: zxkgx@126.com

收稿日期: 2009-09-07; 修回日期: 2009-11-12

尔生化有限公司合成。

1.1.2 动物:雌性 BALB/c 小鼠,体质量 18 - 22 g,购自重庆医科大学实验动物中心。

1.1.3 主要试剂和仪器:C + Y 半合成培养基(本课题组自配);TSA 血平板(重庆庞通医疗器械有限公司);DNA 提取试剂盒、胶回收试剂盒、逆转录试

剂盒(TaKaRa);RNA 提取试剂盒(Omega);PCR 仪(Bio-Rad);凝胶成像仪(Bio-Rad);低温微量离心机(Thermo Scientific);紫外分光光度计 ND-1000(Thermo Scientific)

1.1.4 引物:引物由 TaKaRa 公司合成,序列见表 1。

表 1 各基因引物序列

Table 1 The primer sequences for amplifying different genes

| Gene | Primers (5'→3') | |
|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | Forward | Reverse |
| <i>comE</i> ^[6] | TGCTCAGTCAATTGCTCTATGCTCG | ACCACCGACCTTCTATCTGTAGC |
| 16S rRNA | GTAGTCCACGCTGTAAACGATGAGT | CTGTCCCGAAGGAAAACCTCTATCT |
| <i>erm</i> ^[6] | CCGGGCCAAAATTTGTTTGAT | AGTCGGCAGGCACTCATAGAAT |
| YZ | TGTTTGGGAAGATGGATA | ACAGGACCGATGATTACA |
| spd_0300 | AGTTCCTTGAACGCTTGATG | CGGCTGGATTTGATGGATTT |
| spd_0414 | GCAAGAAGGAGTGAGAAAACGAG | AAATAGGGGCAGGATAGTCAAGG |
| spd_0622 | CTTTCTTGAAGCAGATGAAGATGTT | AAGCCACCGCCGAATACA |
| spd_1794 | AAGAACCAGACCAAAGGACA | TCACGAGCCCTATTTCCAAG |
| spd_1024 | ACGGACGGATTTACACCT | CACGGTTGCTTGTCTTTG |
| spd_1719 | AAGCATAGCCAACCAAGA | AATCAATCACCCGAGACC |
| spd_0873 | TAGACAGCAACTGGGACA | CAAACCGATTATTGACCT |
| spd_1663 | ACGATGGTTTGTCTGTA | GTCTAAGTTTGTGCTTCT |
| spd_0438 | TTTCGTTATTCTTGGCTAC | TCTATCTTCCATCGCTTAC |
| spd_1830 | ATTCITTCGGCACTTC | CTTGGCAAACCTTACG |
| spd_1672 | CGAACTCCCAAATCACT | TGTTTACAACGACCAAG |
| spd_1925 | GGCAAGAGCATCCACAATC | TTACCTATTCGGACGGGAC |
| spd_0235 | AGAAGGTGGAGCACTAT | ATAAGCAGCAGTAACCA |

1.2 *comE* 断裂基因的准备

从 -70℃ 冰箱中取出保存的 *S. pn* 1t(含 *comE* 断裂基因,即 *comEup-erm-comEdw*),室温融化后取 50 μL 菌液加入到盛有 10 mL C + Y 培养基的灭菌试管中,37℃ 培养至对数生长期的中晚期收获细菌,提取细菌 DNA。以该 DNA 为模板,加入 *comE* 的上、下游引物进行 PCR 扩增,用胶回收试剂盒纯化 PCR 产物,即得到 *comE* 断裂基因(*comEup-erm-comEdw*)。

1.3 缺陷菌株构建

1.3.1 D39 *comE* 缺陷菌株(D39 Δ*comE*)的构建方法:将 *comE* 断裂基因转化入 D39,替代失活 D39 菌株中的 *comE* 基因,参考本课题组前期改进的转化模型^[7]。

1.3.2 缺陷菌株的鉴定:分别以 D39 及 D39 Δ*comE* 的 DNA 为模板,用 *comE*、*erm* 的引物扩增 *comE*(753 bp)基因、*comE* 断裂基因(*comEup-erm-comEdw*, 1515 bp)和 *erm*(726 bp)基因;并将 *comE* 引物扩增的 *comEup-erm-comEdw* 作胶回收,送宝生物工程(大连)有限公司测序部测序。

1.4 缺陷菌株的生长情况

分别挑取 D39 野生型及 *comE* 缺失型的单个菌落接种于 C + Y 培养基中,37℃ 培养 12 h,转接于 20 mL C + Y 培养基中。定时测定吸光度值 OD_{620} ,以吸光度为纵坐标,时间为横坐标绘制细菌的生长曲线。

1.5 体内诱导

取冻存于 -70℃ 冰箱的 D39 及 D39 Δ*comE*,接种于 C + Y 培养基中,37℃ 培养生长至 $OD_{620} = 0.5$ 左右。各取 10 mL 以 10000 × g 离心 2 min 后弃上清,加入 1 mL PBS 重悬。用重悬后的 D39 Δ*comE* 原液、D39 10⁶ 倍稀释后菌液,分别腹腔注射 10 只 BALB/c 雌性小鼠。

1.6 体内细菌 RNA 的提取

腹腔感染约 18 h 后,小鼠毛发散乱,行动迟缓,濒临死亡。遂采集小鼠眼眶血按 1:8 稀释至无菌 PBS 中,600 × g 离心 6 min,小心吸取上清至新的 EP 管,10000 × g 离心 3 min,富集细菌至一支 EP 管。按说明书直接从搜集到的细菌中提取 RNA,并将所得的 RNA 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,分析其完整性。

1.7 体内诱导基因 mRNA 表达量检测

将经过体内诱导后的 D39 及 D39 $\Delta comE$ RNA 进行逆转录,以得到的 cDNA 为模板,依据 D39 DNA 序列设计跨非编码区的引物(YZ,跨基因 *spd_0391* 与 *spd_0392* 间区,共 256 bp),验证有无 DNA 污染;以 D39 和 D39 $\Delta comE$ 的 cDNA 为模板,16S rRNA 引物(此为内参基因)和表 1 中的引物分别进行 PCR 反应,重复 3 次。PCR 产物琼脂糖凝胶电泳,成像后,通过软件 Quantity-one (version 4.6.2, BioRad, USA) 进行灰度分析,计算各基因与相应 16S rRNA 的灰度值比值,用 SPSS11.5 进行野生菌和缺陷菌配对 t 检验。

2 结果

2.1 D39 $\Delta comE$ 的构建及鉴定

从含红霉素(*erm*)的 TSA 血平板挑取菌落,同时取冻存于 -70°C 冰箱的 D39 分别接种于 C + Y 培养基,生长至 $OD_{620} = 0.5$ 左右,提取 DNA 作为模板,以 *comE*、*erm* 的引物分别扩增 *comE* (753 bp) 基因、*comE* 断裂基因 (*comEup-erm-comEdw*, 1515 bp) 和 *erm* (726 bp) 基因,结果见图 1,与预期相符。测序结果显示 *comE* 断裂基因序列正确,表明 D39 $\Delta comE$ 构建成功。

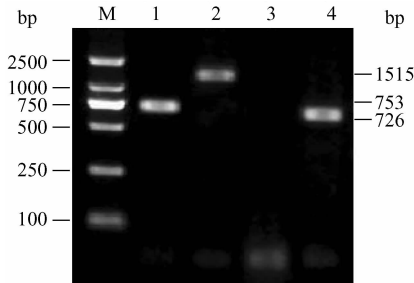


图 1 D39 $\Delta comE$ 的 PCR 鉴定

Fig. 1 D39 *comE*-deficient strain was identified by PCR. M. 2000 bp DNA maker; 1, 2. Amplification productions of D39 and D39 *comE*-deletion strain using primer *comE*; 3, 4. PCR products of D39 and D39 *comE*-deletion strain using primer *erm*.

2.2 D39 和 D39 $\Delta comE$ 的生长曲线

从生长曲线可以看出在液体培养基中缺陷菌株较野生株生长缓慢,表明 *comE* 基因缺失后影响细菌的生长(图 2)。

2.3 RNA 及 cDNA 鉴定

提取的 RNA 各样品在甲醛变性 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析中出现 23S、16S 和 5S 3 条带,经紫外比色法检测,样品的 $OD_{260/280}$ 均在 1.8 - 2.0 之间。将 D39 和 D39 $\Delta comE$ RNA 逆转录后得到的 cDNA,

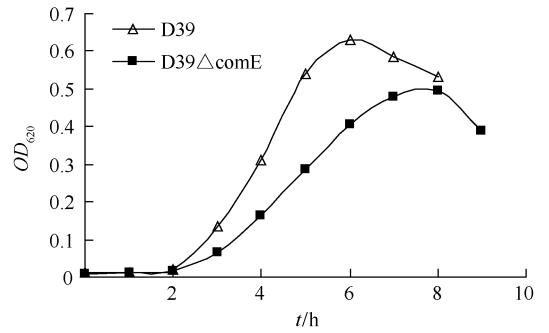


图 2 D39 和 D39 $\Delta comE$ 在 C + Y 培养基中的生长曲线

Fig. 2 The growth curve of *S. pn* D39 and *comE*-deletion strain in C + Y media.

用跨编码间区引物(YZ)进行 PCR,结果如图 3,产物大小与预计相符(D39 和 D39 $\Delta comE$ 的 DNA 扩增产物应为 535 bp,而它们的 cDNA 由于缺少编码间区为 279 bp),说明得到的 mRNA 纯度较高,无 DNA 掺杂,可以用于后续实验。

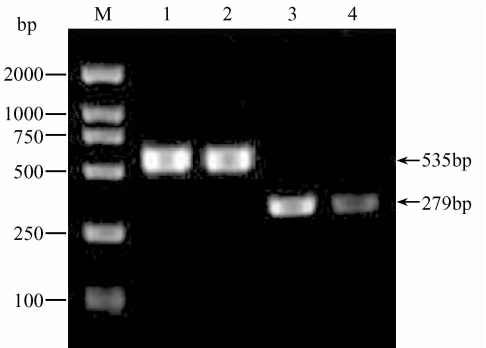


图 3 D39 及 D39 $\Delta comE$ 逆转录后 cDNA 纯度验证

Fig. 3 Identification the purity of cDNAs reverse transcribed from RNA of D39 and D39 *comE*-deletion strain. M. 2000 bp DNA maker; 1. D39 DNA; 2. D39 $\Delta comE$ DNA; 3. D39 cDNA; 4. D39 $\Delta comE$ cDNA.

2.4 体内诱导基因 mRNA 表达量检测

以 16S rRNA 为内参基因,比较经 IVET 和 DFI 筛选出的 13 个体内诱导基因通过体内诱导后,在 D39 野生菌和缺陷菌中 mRNA 表达水平差异(图 4-A)。通过 Quantity-one (version 4.6.2, BioRad, USA) 灰度检测,将重复 3 次 PCR 后的数据用 SPSS11.5 进行数据分析,筛选出 7 个受转化上调的基因,分别是 *spd_0300*、*spd_0414*、*spd_0622*、*spd_1663*、*spd_1719*、*spd_0235*、*spd_0873*, 1 个受转化下调的基因 *spd_1672* ($P < 0.05$),结果见图 4-B。

3 讨论

从小鼠血中分离细菌,获得足够的高质量的 RNA 是本实验的关键。由于单只小鼠血中细菌含

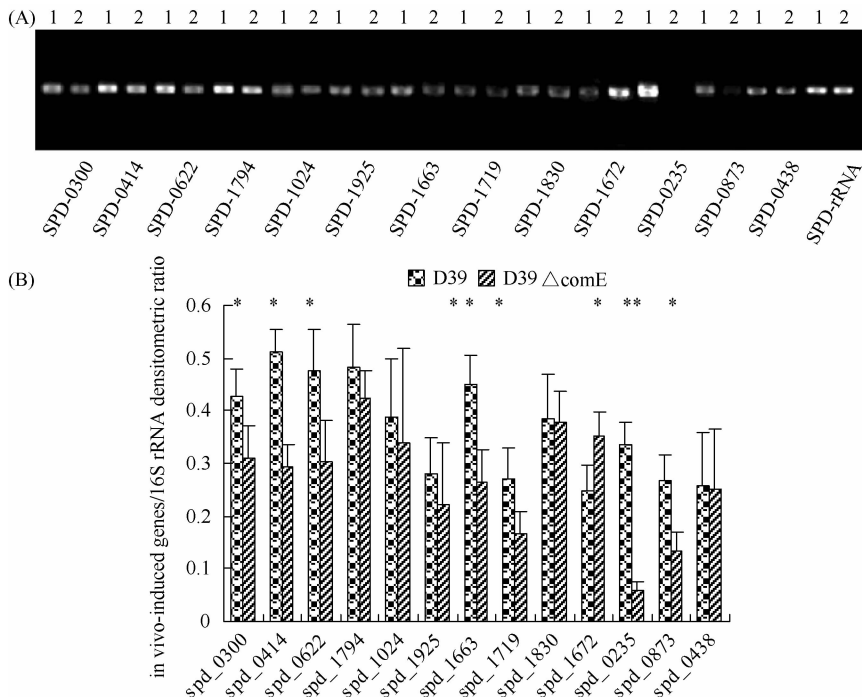


图 4 各体内诱导基因在缺陷菌株和野生菌株 mRNA 表达水平

Fig. 4 A: Amplified results of relative quantity of RT-PCR. 1. The mRNA expression levels of relative genes in D39; 2. The mRNA expression levels of relative genes in D39 *comE*-deletion strain. B: Relative mRNA concentrations of each in vivo-induced gene in D39 and D39 *comE*-deletion strain. The densitometric ratios of each in vivo-induced gene to the 16S rRNA were calculated between D39 and D39 *comE*-deletion strain. Paired-samples t test were applied to analyze the data using SPSS11.5 software; * and ** represent comparison between D39 and D39 *comE*-deletion strain using respective primer pairs (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$).

量较少,所以我们每次用 10 只小鼠取血收集细菌。同时先将血液用 PBS 作 1:8 倍稀释可降低红细胞的凝聚,利于细菌游离而增加得率;以 $600 \times g$ 离心 6 min,能很好的防止血细胞的掺杂又不致细菌被沉淀,保证了下一步实验的顺利进行。

S. pn 致病是一个复杂、动态的过程,其毒力基因的表达受到其所处的宿主体内环境的调节和影响^[8]。本课题组前期研究也发现 *S. pn* 转化缺陷菌株的自溶酶、神经氨酸酶、透明质酸酶三种毒力因子的 mRNA 表达较野生菌株减弱^[9],提示细菌的转化有利于其毒力基因的表达。因此,我们从转化角度来分析本课题组前期 IVET 和 DFI 系统性搜寻出的受体内诱导的 *S. pn* 致病基因,探讨转化与毒力改变的关系。这些基因中多数功能已知,但其中 13 个基因编码功能未知的假想蛋白,其在肺炎链球菌中的致病机理并不清楚。由于这些假想蛋白都是体内诱导表达的毒力因子,是否与其他毒力因子一样受转化调控也不清楚。本研究通过构建 D39 *comE* 缺陷菌株,检测野生菌与缺陷菌中这 13 个基因经体内诱导后的表达情况。结果表明有 5 个基因不受 *comE* 的调控,它们在体内的高表达可能受其它机制调节;

而在受转化调控的 8 个基因中,7 个基因被上调,1 个基因被下调,在宿主体内,细菌转化可通过调节这些基因的表达而增强细菌毒力。

spd_1663 编码产物为假想的葡聚糖苷酶 *DexS*,与 α -磷酸盐海藻糖酶有着很高的相似性,后者对拟南芥利用碳水化合物和生长必不可少^[10]。spd_0235 编码产物为假想的甲酸乙酰转移酶,包含 *PFL2_DhaB_BssA* 结构域。Utrilla 等^[11] 研究发现丙酮酸盐甲酸裂解酶 PFL 与 ATP 代谢相关,缺失该酶会导致细菌生长明显减缓。spd_0622 编码产物为假想的转录调节子,通过预测属于 TENA/THI-4 家族蛋白。这类家族蛋白在枯草杆菌中,可增强胞外酶(如碱、中性蛋白酶、果聚糖蔗糖酶)的表达,参与维生素 B1 的生物合成,还能刺激微生物的生长^[12]。因此,细菌的转化可能通过调控这 3 个促进细菌生长繁殖的基因而增强细菌的毒力。

spd_0414 编码产物是一种假想蛋白,Marra 等^[13] 发现 spd_0414 在 37°C 时表达较 30°C 增高,因此推测在内环境温度发生变化时,该基因受转化上调而增强细菌毒力。spd_1719 编码产物经预测属于 PAP2 家族蛋白,Nakamura 等^[14] 研究结果提示

PAP 酶在蓝藻中参与光合作用,与糖类和脂质代谢密切相关,表明转化可通过调节糖和脂质的代谢增强细菌毒力。

spd_0300、spd_0873、spd_1672 的编码产物均是假想蛋白,功能未知,转化调控其表达到底是通过何种途径增强细菌毒力还有待于进一步研究。

S. pn 与相关的共栖菌寄生在上呼吸道,当宿主体内环境改变时,细菌发生转化,上调或下调某些基因,在它们高度协调的作用下,细菌毒力得以增强,侵袭机体并致病。我们拟将筛选出来的这些受转化调控的基因,通过基因缺失技术构建突变体,深入分析其功能,以进一步探讨 *S. pn* 转化对其毒力的调控机制。

参考文献

- [1] 张雪梅,尹一兵,康格非. 肺炎链球菌自然转化机制的研究进展. 国外医学临床生物化学与检验学分册 (*Foreign Medical Sciences (section of Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine)*), 2002, 23(6): 348-350.
- [2] Lombardo MJ, Michalski J, Martinez-Wilson H, et al. An in vivo expression technology screen for *Vibrio cholerae* genes expressed in human volunteers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007, 104(46): 18229-18234.
- [3] 孟江萍,尹一兵,张雪梅,等. 肺炎链球菌体内诱导基因的筛选及初步鉴定. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2006, 46(4): 537-541.
- [4] Guiral S, Henard V, Granadel C, et al. Inhibition of competence development in *Streptococcus pneumoniae* by increased basal-level expression of the *ComDE* two-component regulatory system. *Microbiology*, 2006, 152: 323-331.
- [5] Johnsborg O, Håvarstein LS. Regulation of natural genetic transformation and acquisition of transforming DNA in *Streptococcus pneumoniae*. *Federation of European Microbiological Societies*, 2009, 33(3): 627-642.
- [6] Lee MS, Morrison DA. Identification of a new regulator in *Streptococcus pneumoniae* linking quorum sensing to competence for genetic transformation. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(16): 5004-5016.
- [7] 赵清,李南,张雪梅,等. 肺炎链球菌转化模型的建立. 第四军医大学学报 (*Journal of the Fourth Military Medical University*), 2008, 29(9): 804-806.
- [8] Attali C, Durmort C, Vernet T, et al. The Interaction of *Streptococcus pneumoniae* with plasmin mediates transmigration across endothelial and epithelial monolayers by intercellular junction cleavage. *Infection and Immunity*, 2008, 76(11): 5350-5356.
- [9] 王燕,尹一兵,猪川嗣朗,等. 肺炎链球菌感受态的形成影响毒力因子 mRNA 的表达. 中华微生物和免疫学杂志 (*Chinese Journal of Microbiology and Immunology*), 2003, 23(3): 165-168.
- [10] Schlupepmann H, Pellny T, van Dijken A, et al. Trehalose 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003, 100(11): 6849-6854.
- [11] Utrilla J, Gosset G, Martinez A. ATP limitation in a pyruvate formate lyase mutant of *Escherichia coli* MG1655 increases glycolytic flux to D-lactate. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2009, 36(8): 1057-1062.
- [12] Treu BL, Arechederra R, Minter SD. Bioelectrocatalysis of ethanol via PQQ-dependent dehydrogenases utilizing carbon nanomaterial supports. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2009, 9(4): 2374-2380.
- [13] Marra A, Asundi J, Bartilson M, et al. Differential fluorescence induction analysis of *Streptococcus pneumoniae* identifies genes involved in pathogenesis. *Infection and Immunity*. 2002, 70(3): 1422-1433.
- [14] Nakamura Y, Tsuchiya M, Ohta H. Plastidic phosphatidic acid phosphatases identified in a distinct subfamily of lipid phosphate phosphatases with prokaryotic origin. *The Journal of Biological Chemistry*. 2007, 282(39): 29013-29021.

comE-deficient mutant affects *in vivo*-induced genes expression in *Streptococcus pneumoniae*

Xin Liu, Nanlin Yin, Xuemei Zhang, Xiaoliang Yang, Dan Pang, Hong Wang, Yibing Yin, Wenchun Xu*

(Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Ministry of Education, Faculty of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: [Objective] To screen *in vivo* genes of *Streptococcus pneumoniae* controlled by *comE* gene. [Methods] The *comE*-deficient strain was constructed by using insertion inactivation and identified by PCR and sequencing. The BALB/c mouse was used as test animal and injected with D39 wild type and D39 *comE*-deficient strain via intraperitoneal injection. The mice blood was obtained about 24 hours after the injection through posterior orbital venous plexus approach. Then the bacteria induced *in vivo* were collected from the blood and their RNA were extracted to measure the mRNA expression levels of each *in vivo*-induced gene by RT-PCR. [Results] The differences of the expressions of 8 *in vivo*-induced genes in D39 and D39 *comE*-deficient strain were statistically significant ($P < 0.05$) and in which *spd_0300*, *spd_0414*, *spd_0622*, *spd_1663*, *spd_1719*, *spd_0235*, *spd_0873* were up-regulated by transformation and meanwhile *spd_1672* was down-regulated. [Conclusion] *In vivo*-induced genes *spd_0300*, *spd_0414*, *spd_0622*, *spd_1663*, *spd_1719*, *spd_0235*, *spd_0873*, *spd_1672* regulated by transformation were screened out and they may participate in the processes such as growth regulation, temperature reception, carbohydrate metabolism, and lipoids metabolism. The bacterial transformation may enhance the virulence via regulating some *in vivo*-induced genes expression.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*; transformation; *comE*; *in vivo*-induced gene; virulence

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30400376)

* Corresponding author. Tel: +86-23-68485006; E-mail: xuwen0303@126.com

Received: 7 September 2009/ Revised: 12 November 2009

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

2010 年 3 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 | 月刊 | 48 | 1 - 12 |
| 2009 | 月刊 | 49 | 1 - 12 |
| 2010 | 月刊 | 50 | 3 |