

临床常见产 ampC β -内酰胺酶菌株中染色体 ampD 基因突变位点的研究

赵虎¹ 王寅² 涂婉¹ 方毅¹ 庞立峰¹

(¹复旦大学附属华东医院检验科 上海 200040; ²浙江中医药大学附属新华医院检验科 杭州 310005)

【摘要】 目的 了解临床常见产 ampC β -内酰胺酶菌株中染色体 ampD 的分布及其突变位点。方法 41 株临床常见产 ampC β -内酰胺酶菌株(阴沟肠杆菌,肺炎克雷伯菌,鲍曼不动杆菌,铜绿假单胞菌)分离自医院感染样本,抽提其染色体 DNA,PCR 法扩增 ampD 基因并连接入 pMD19-T 载体后,再行 PCR 确定其存在。双链测序后比对染色体 ampD 基因的突变位点。结果 41 株细菌的基因组中,使用 PCR 法扩增出染色体 ampD 基因有 36 株,并成功测定了其 ampD 基因的序列;比对后发现阴沟肠杆菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌和铜绿假单胞菌的染色体 ampD 基因的核苷酸序列差异较大。染色体 ampD 易突变位点分析统计表明,这些细菌的 ampD 基因的平均突变率分别为:64.5%、100.0%、97.0%和 95.0%。结论 大部分临床常见产 ampC β -内酰胺酶菌株含有 ampD 基因,并且有较高的突变率。

【关键词】 ampC β -内酰胺酶; ampD; 突变; PCR

【中图分类号】 Q 814 **【文献标志码】** A

Exploration of the mutations of genomic ampD from the clinical isolates producing ampC β -lactamases

ZHAO Hu¹, WANG Yin², TU Wan¹, FANG Yi¹, PANG Li-feng¹

(¹Department of Clinical Laboratory, Huadong Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China;

²Department of Clinical Laboratory, Xinhua Hospital, Zhejiang Chinese Medical University,

Hangzhou 310005, Zhejiang Province, China)

【Abstract】 **Objective** To explore the mutations of the genomic ampD from the clinical isolates producing ampC β -lactamases. **Methods** Forty-one bacilli produced ampC β -lactamases were isolated from the nosocomial infection. The genomic DNA was extracted, genomic ampD was amplified using PCR, ligated into pMD19-T vector, and sequenced. Mutation sites were analyzed. **Results** Of the 41 clinical isolates, 36 were identified to contain the genomic ampD sequences, and their sequences were successfully measured. The results of the mutation analysis showed that the average mutation rates of *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* were 64.45%, 100.00%, 97.00%, and 95.00%, respectively. **Conclusions** A large proportion of the clinical isolates producing ampC β -lactamases contained genomic ampD which is highly mutated.

【Key words】 ampC β -lactamases; genomic ampD; mutations; PCR

近年来,由于 β -内酰胺类抗生素的广泛使用,革兰阴性杆菌产超广谱 β -内酰胺酶(extended-spectrum β -lactamases, ESBLs)和 ampC β -内酰胺酶(简称 ampC 酶)等水解酶,使 β -内酰胺类抗生素开环失活,从而导致细菌对 β -内酰胺类抗菌药物产生耐药^[1-3]。

ampC 酶也是一类 β -内酰胺酶。其分子结构和基

因结构已大致了解^[2-5]。ampC 酶的产生受 ampC 酶调控基因(ampC、ampR、ampD 和 ampG)所控制,这些基因发生突变可导致 ampC 酶的活性或表达水平发生改变^[4],其中最常见突变发生在 ampD^[5]。但 ampD 发生突变的具体频率和突变的位点尚未完全知晓。本文研究了临床常见产 ampC 酶菌株中 ampD 基因的突变频率和突变位点。

材料和方法

实验菌株 2006年1月至2007年12月间,收集从华东医院和浙江省新华医院医院感染患者样本中分离培养出的革兰阴性杆菌。所有菌株经 VETEK(法国生物梅里埃公司)鉴定到种,并用头孢西丁初筛试验和头孢西丁三维试验^[3,4]筛选出产持续高产 ampC 酶的细菌 41 株,其中阴沟肠杆菌 18 株,鲍曼不动杆菌 11 株,绿脓假单胞菌 8 株,肺炎克雷伯菌 4 株。

主要试剂 细菌基因组抽提试剂盒为 Sigma 公司产品,X-Gal、IPTG、PCR 扩增试剂盒、pMD19-T 载体购自 Takara 公司,PCR 产物纯化试剂盒购自博大泰克公司,100 bp DNA ladder 和感受态细胞 DH5 α 购自上海天根生物技术有限公司。

细菌染色质 DNA 提取 参照 Sigma 公司产品操作手册进行。

ampD 基因全序列的 PCR 扩增 根据各种细菌 ampD 基因前端保守区核苷酸序列设计 ampD 基因 PCR 扩增引物,由上海生工生物科技公司合成。肺炎克雷伯菌,参考序列 *Klebsiella pneumoniae* isolate kpn 462(GenBank accession No. EF125013),正向引物 5'-CAGTTGAACGAGGGGTGGTTGG,反向引物 5'-TGAGGTCTCCTTTTCTGACGGG;阴沟肠杆菌,参考序列 *Enterobacter cloacae* strain 212(GenBank accession No. AY302261),正向引物 5'-TTGTTAGA-AAACGGATGGCTGG,反向引物 5'-TGTTATCT-CCTTATCTGACGAC;鲍曼不动杆菌,参考序列 *Acinetobacter baumannii* isolate KB343(GenBank accession No. EU118266),正向引物 5'-AAGCAAAT-CACACCGTATGAAGTT,反向引物 5'-AGTTTT-TTTCTGTGCTAACAACACT;铜绿假单胞菌,参考序列 *Pseudomonas aeruginosa* strain TUM1786(GenBank accession No. AB211126),正向引物 5'-CATTTTCGATTCCGTTACCGGCT,反向引物 5'-TGTTTCCTCCTTGGAAATCGGTCA。PCR 反应体系中含 10 \times LA PCR Buffer(含 Mg²⁺) 5 μ L、LA Taq DNA 聚合酶 2.5 U、dNTP 各 200 μ mol/L、引物各 1 μ mol/L,模板约 10 ng,灭菌双蒸水加至 50 μ L。扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 45 s,56 $^{\circ}$ C(基因组)/64 $^{\circ}$ C(T 载体质粒)45 s,72 $^{\circ}$ C 60 s,共 33 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min;4 $^{\circ}$ C 保护。取 10 μ L PCR 扩增产物进行 1.5%琼脂糖凝胶电泳,切取含 560 bp DNA 片段的琼脂糖凝胶进行回收纯化。

pMD19-T/ampD 重组质粒的构建 参照文献

[6]完成。将约 560 bp 的 PCR 产物片段接入 pMD19-T 载体,转化入大肠埃希菌感受态细胞 DH5 α ,转化菌液接种至含 X-Gal 40 μ g/mL、IPTG 0.2 μ mol/mL、氨苄西林 100 μ g/mL 的 LB 琼脂平皿,37 $^{\circ}$ C 孵育过夜。将过夜筛选平皿上生长的单个白色菌落编号后接种至含氨苄西林 100 μ g/mL 的 LB 肉汤中,震荡过夜,提取重组质粒作为模板,再以对应的 ampD 基因扩增引物进行 PCR,对重组子的插入片段长度进行鉴定。PCR 反应体系和扩增条件见前述。扩增出约 560 bp DNA 片段的视为阳性克隆,即可能含有目的 ampD 基因。

ampD 基因的序列测序、分析和引物设计 由上海鼎安生物科技有限公司完成对 pMD19-T/ampD 重组质粒中插入片段的测序。测序引物为 M13F(-47)和 M13R(-48)。序列比对使用 DNAsis V2.9(Hitachi Software Engine)。菌种特异性的引物使用 Primer Premier 5.0 设计。

结 果

41 株细菌基因组 PCR 克隆 ampD 基因的结果

我们共收集了阴沟肠杆菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌和绿脓假单胞菌共 41 株菌种。为了证实哪些细菌中含有染色质 ampD,我们从 genbank 网站上查得部分菌种的参考序列,并根据该序列设计引物,扩增染色质 ampD 基因。根据查得的参考序列,该四种细菌的染色质 ampD 大小在 560 bp 左右,如图 1A 箭头所指位置即有可能是我们所要的目的条带。但由于细菌基因组比较庞大,因此细菌扩增染色质 ampD 时可能会出现比较多的非特异性的条带(图 1A,显示肺炎克雷伯菌的结果)。因此,我们首先需要将 560 bp 左右的条带切割下来,再接入 T 载体中,进一步 PCR 鉴定并最终测序。

为了验证接入 T 载体的是否为染色质 ampD 基因,我们进一步使用 PCR 法来鉴定。模板为连接有目的片段的 T 载体,引物同上,扩增 ampD 基因。琼脂糖凝胶电泳后,部分细菌仍可见目的条带,大小为 560 bp 左右;部分细菌则不可见目的条带,说明不含有 ampD 基因(图 1B,显示肺炎克雷伯菌的结果)。41 株细菌基因组扩增 ampD 产物,36 株可见清晰、唯一的条带,大小在 560 bp 左右,另外 5 株则为阴性。结果提示,大多数革兰阴性杆菌染色质上含有 ampD 基因,尤其以阴沟肠杆菌和鲍曼不动杆菌携带率高(均为 100%),铜绿假单胞菌(62.5%)和肺炎克雷伯菌(50.0%)也携带有 ampD 基因(表 1)。

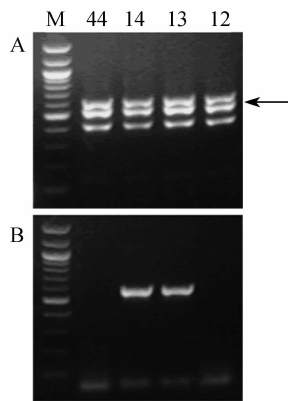


图 1 ampD 基因的 PCR 扩增

Fig 1 amplification of ampD by PCR

A: The results of electrophoresis from *K. pneumoniae* ampD amplification by PCR. It had many strips. The arrow showed the stip of ampD, about 560 bp. B: The results of electrophoresis from *K. pneumoniae* ampD amplification, after cutting off the 560 bp strips, ligated into pMD19-T vector. The result showed the strips about 560 bp from # 13 and # 14 strains, but # 12 and # 44 strains had not ampD. M: The DNA ladder.

表 1 PCR 克隆染色质 ampD 的结果统计

Tab 1 Results of the cloning of genomic ampD by PCR

Bacteria	Numbers of strains	Positive numbers of ampD	Positive rate(%)
<i>Enterobacter cloacae</i>	18	18	100.0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	2	50.0
<i>Acinetobacter baumannii</i>	11	11	100.0
<i>Pseudomonsa aeruginosa</i>	8	5	62.5
Total	41	36	87.8

基因组 ampD 易突变位点统计 收集 PCR 扩增产物, 连接入 T 载体。对含有目的染色质 ampD 基因的 T 载体测序, 测序引物为 M13 F(-47) 和 M13 R(-48)。

将各个菌株 ampD 基因的测序结果与其对应菌株的标准序列比对, 比对使用 Hitachi Software Engine 设计的 DNAsis v2.9 进行。将突变率高于 50% 的位点进行了统计。结果见表 2、表 3、表 4 和表 5。

表 2 阴沟肠杆菌 ampD 突变率高于 50% 的突变位点 (564 bp)

Tab 2 The mutaion size of ampD from *Enterobacter cloacae* (mutaion rate >50%)

Mutation size	Standard order	The number of the strains															Mutation rate(%)
		2	3	9	10	11	39	40	59	61	72	96	98	101	N5	N31	
30	C	C	T	C	C	T	A	T	T	—	T	C	C	T	—	T	61.5
31	G	A	G	G	G	T	G	G	C	—	G	A	G	T	—	T	46.2
45	G	G	C	G	G	C	T	T	T	G	C	G	G	C	—	C	57.1
60	C	C	T	T	C	T	C	C	C	T	T	C	T	T	C	T	53.3
102	C	C	T	C	C	T	T	T	T	C	T	C	C	T	A	T	60.0
116	G	G	A	G	G	A	A	A	A	G	A	G	G	A	G	A	53.3
135	T	T	C	T	T	C	C	C	C	T	C	T	T	C	T	C	53.3
159	T	T	G	A	T	G	G	G	G	A	G	T	A	G	T	G	73.3
183	C	C	T	T	C	T	T	T	T	T	T	C	T	T	C	T	73.3
186	C	C	T	T	C	C	T	T	T	T	T	C	T	C	C	C	53.3
211	G	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	100
212	C	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	100
213	G	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	100
214	C	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	100
222	C	G	T	G	G	T	T	T	T	G	T	G	G	T	G	T	100
223	G	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	100
228	T	T	T	C	T	C	C	C	C	C	T	T	C	C	T	C	60.0
234	C	C	T	C	C	T	T	T	T	C	T	C	C	T	C	T	53.3
246	C	C	T	C	C	T	T	T	T	C	T	C	C	T	C	T	53.3
279	A	A	C	A	T	C	C	C	C	A	C	A	A	C	G	C	66.7
290	T	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T	C	C	T	C	80.0
309	G	G	C	G	G	C	C	C	C	G	C	G	G	C	G	C	53.3
318	G	G	A	G	G	A	A	A	A	G	A	G	G	A	T	A	60.0
327	T	T	C	T	T	C	C	C	C	T	C	T	T	C	C	C	60.0
336	C	T	C	C	C	T	T	T	T	C	C	T	C	T	A	T	60.0
342	A	A	G	A	A	G	G	G	G	A	G	A	A	G	G	G	60.0
345	T	T	C	T	T	C	C	C	C	T	C	T	T	C	T	C	53.3
357	A	A	C	A	A	C	C	C	C	A	C	A	A	C	A	C	53.3
363	C	C	T	C	C	T	T	T	T	C	T	C	C	T	C	T	53.3
372	T	T	C	T	T	C	C	C	C	T	C	T	T	C	C	C	60.0
382	G	G	T	G	G	T	T	T	T	G	T	G	G	T	G	T	53.3
384	G	G	A	G	G	A	A	A	A	G	A	G	G	A	G	A	53.3
387	A	A	G	A	A	G	G	G	G	A	G	A	A	G	G	G	60.0

续表 2

391	G	G	C	C	G	C	C	C	C	C	G	C	C	C	80.0
393	G	G	A	G	G	A	A	A	A	G	A	G	A	A	60.0
394	A	A	C	A	A	C	C	C	C	A	C	A	C	G	60.0
396	A	A	G	A	A	G	G	G	G	A	G	A	A	G	60.0
399	G	G	A	G	G	A	A	A	A	G	A	G	A	A	60.0
401	T	T	C	T	T	C	C	C	C	T	C	T	T	C	53.3
402	T	T	G	T	T	G	G	G	G	T	G	T	T	G	53.3
408	A	A	G	G	A	G	G	G	G	G	G	A	G	G	80.0
411	G	G	C	G	G	C	C	C	C	G	C	G	G	C	60.0
413	A	A	G	A	A	G	G	G	G	A	G	A	A	G	53.3
414	A	A	T	A	A	C	C	C	C	A	T	A	A	C	60.0
418	T	T	C	T	T	C	C	C	C	T	C	T	T	C	53.3
420	A	A	T	A	A	T	T	T	T	T	T	A	A	T	60.0
426	G	G	A	G	G	A	A	A	A	G	A	G	G	A	53.3
428	G	G	A	T	G	T	T	T	T	T	T	G	T	T	73.3
432	T	T	C	T	T	C	C	C	C	T	C	T	T	C	60.0
435	C	C	G	C	C	G	G	G	G	C	G	C	C	G	60.0
441	T	T	C	T	T	C	C	C	C	—	C	T	T	C	64.3
444	A	A	C	A	A	C	C	C	C	—	C	A	A	C	64.3
456	A	A	C	G	A	C	C	C	C	—	C	A	G	C	78.6
468	C	C	T	C	C	T	T	T	T	—	T	C	C	T	64.3
477	C	C	G	C	C	G	G	G	G	—	G	C	C	G	64.3
480	A	A	G	A	A	G	G	G	G	—	G	A	A	G	64.3
492	C	C	T	C	C	T	T	T	T	—	T	C	C	T	64.3
504	G	G	A	C	G	C	A	A	A	—	A	G	G	C	64.3
514	T	T	C	T	T	C	C	C	C	—	C	T	T	C	64.3
524	A	A	C	A	A	G	G	G	G	—	G	A	A	G	64.3
534	T	T	C	T	T	C	C	C	C	—	C	T	T	C	57.1
538	A	A	G	A	A	G	G	G	G	—	G	A	A	G	64.3

表 3 鲍曼不动杆菌 ampD 突变率高于 50% 的突变位点 (570 bp)

Tab 3 The mutation size of ampD from *Acinetobacter baumannii* (mutation rate >50%)

Mutation size	Standard order	The number of the strains					Mutation rate(%)
		107	108	109	119	124	
58	G	A	A	A	G	A	80
95	C	G	G	G	G	G	100
177	G	A	A	A	A	A	100
276	G	A	A	A	G	A	80
321	C	T	T	T	T	T	100
334	A	G	G	G	G	G	100
384	T	C	C	C	C	C	100
385	T	C	C	C	C	C	100
387	A	G	G	G	A	G	80
393	T	C	C	C	C	C	100
399	C	A	A	A	A	A	100
405	A	G	G	G	G	G	100
408	T	C	C	C	C	C	100
409	G	A	A	A	A	A	100
410	A	G	G	G	G	G	100
411	A	C	C	C	C	C	100
414	G	A	A	A	A	A	100
420	T	C	C	C	C	C	100
423	C	T	T	T	T	T	100
426	T	A	A	A	A	A	100
430	A	G	G	G	A	G	100
438	C	T	T	T	T	T	100
446	C	T	T	T	T	T	100

表 4 铜绿假单胞菌 ampD 突变率高于 50% 的突变位点 (567 bp)

Tab 4 The mutation size of ampD from *Pseudomonas aeruginosa* (mutation rate >50%)

Mutation size	Standard order	The number of the strains					Mutation rate(%)
		78	82	105	121	N2	
102	T	C	C	C	C	C	100
144	T	C	C	C	C	C	100
443	G	C	C	C	C	C	100
489	G	A	A	A	G	A	80

表 5 肺炎克雷伯菌 ampD 突变率高于 50% 的突变位点 (564 bp)

Tab 5 The mutation size of ampD from *Klebsiella pneumonia* (mutation rate >50%)

Mutation size	Standard order	The number of the strains		Mutation rate(%)
		13	14	
553	G	A	A	100

统计结果提示,不同菌种、相同菌种不同菌株之间,ampD 基因的核苷酸序列差异较大,几乎找不到相同的基因片段。染色质 ampD 易突变位点分析统计也表明,绝大多数细菌的 ampD 基因均易发生突变,如肺炎克雷伯菌 (564 bp) 平均突变率为 100.00%,鲍曼不动杆菌 (570 bp) 和铜绿假单胞菌 (567 bp) 的突变率为 97.00% 和 95.00%,阴沟肠杆菌 (564 bp) 突变率为 64.45%,最高也达

100.00%(表6)。

表6 ampD 基因突变率分析
Tab 6 Analysis of mutation rate ampD

Bacteria	Length of ampD fragment(bp)	Numbers of mutation spots	Average mutation rate(%) *
<i>Enterobacter cloacae</i>	564	62	64.50(46.20 - 100.00)
<i>Klebsiella pneumonia</i>	564	1	100.00(—)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	570	23	97.00(80.00 - 100.00)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	567	4	95.00(80.00 - 100.00)

* The numbers in the brackets showed the highest and lowest mutation rates.

讨 论

临床上由于 ampC 酶引起的对青霉素类和头孢菌素类抗生素的耐药现象,导致产酶细菌引发的感染不易被及时控制,甚至造成感染扩散,已引起临床高度重视^[1-3]。ampC 酶的由 ampC 基因所编码,其转录翻译受多种调控因子的调控尤其是 ampR 和 ampD 基因。ampR 编码产生的 ampR 蛋白为 ampC 酶转录的激活因子,在无 β -内酰胺类抗生素存在时,ampR 与抑制性配体(UDP-N-乙酰胞壁酰五肽)结合,处于失活状态,ampC 不转录或仅转录少量 ampC 酶。细菌胞体内还存在一种 ampR 的无效配体-N-乙酰胞壁酰酞三肽,可与竞争性配体竞争 ampR 上的结合位点。ampD 基因编码产生的 ampD 酰胺酶可分解包括 N-乙酰胞壁酰酞三肽在内的粘肽成分,调节菌体内 ampR 无效配体的水平。当有 β -内酰胺类抗生素存在时,其破坏细菌细胞壁粘肽的合成,使细菌胞质内 N-乙酰胞壁酰酞三肽的含量升高,当超过 ampD 酰胺酶的分解能力时,即可通过竞争抑制作用,解除抑制性配体对 ampR 的抑制作用,激活 ampC 转录,产生 ampC 酶(诱导酶)。而当 ampD 基因发生突变,不能编码产生 ampD 酰胺酶或仅产生无正常功能的 ampD 酰胺酶,不能分解 N-乙酰胞壁酰酞三肽,使其在胞体内大量积聚,通过上述的竞争抑制作用,激活 ampC 转录,持续、大量地产生 ampC 酶(非诱导酶)^[1-3]。因此,当调节基因因某种原因发生突变,而导致其表达的调节蛋白出现功能改变或缺失,就会直接影响 ampC 基因的表达。

本研究首先分析了从临床分离的阴沟肠杆菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌和绿脓假单胞菌中 ampD 基因的分布情况。国内对阴沟肠杆菌中 ampD 的研究较多^[7-9],但其他菌种尚未见报道。我们的实验结果显示大多数革兰阴性杆菌染色质上含有 ampD 基因,尤其以阴沟肠杆菌和鲍曼不动杆菌携带率高(均为 100%),铜绿假单胞菌(62.5%)

和肺炎克雷伯菌(50%)也携带有 ampD 基因。

ampD 基因的测序结果表明,不同菌种、以及相同菌种不同菌株之间,ampD 基因的核苷酸序列差异较大,几乎找不到相同的基因片段。染色质 ampD 易突变位点分析统计也表明,绝大多数细菌的 ampD 基因均易发生突变,如肺炎克雷伯菌(564 bp)突变率为 100%,鲍曼不动杆菌(570 bp)和铜绿假单胞菌(567 bp)的突变率为 80%~100%,阴沟肠杆菌(564 bp)突变率为 46.2%~100%。同种细菌间 ampD 虽然可以找到较易突变的位点,但其余突变的位点比较散在,具有随机性、不规律性。

我们检测到的临床分离菌株和标准菌株相比,ampD 基因存在很多突变的位点。当然,其中部分是无义突变,即并没有导致编码氨基酸的改变,有的突变虽然导致了氨基酸的改变,但并没有导致 ampD 阻遏作用的消失,因此,事实上只有部分为数不多的关键位点的突变才有可能导致 ampC 酶的持续性高产^[10-12]。对于这些关键位点的确认,具有极高的学术科研价值。在本次实验中,我们已经统计出了 ampD 的易突变位点,但是从这些易突变位点中找出关键位点,则需要进一步大量收集临床分离菌株和由于 ampD 突变导致产酶的标准菌株,同时需要大量的统计分析和生物信息学的帮助。

参 考 文 献

- [1] 张磊. ampC β -内酰胺酶:抗感染治疗面临的新挑战[J]. 国外医学:抗生素分册,2000,21(3):116-122.
- [2] 朱卫民,钱元恕. β -内酰胺酶分子生物学研究进展[J]. 国外医学:抗生素分册,2001,22(2):57-60.
- [3] 赵虎,孔宪涛. ampC β -内酰胺酶的检测[J]. 中华检验医学杂志,2003,26(6):390-392.
- [4] Wiedemann B, Dietz H, Pfeifle D. Induction of β -lactamase in *Enterobacter cloacae*[J]. *Clin Infect Dis*, 1998, 27(Suppl 1): S42-47.
- [5] Lindberg F, Lindquist S, Normark S. Genetic basis of induction and overproduction of chromosomal class I beta-lactamase in nonfastidious gram-negative bacilli [J]. *Rev Infect Dis*, 1988, 10(4):782-785. (下转第 357 页)