

牵张作用对成骨样细胞 MG63 的线粒体跨膜电位的影响 *

张卫群¹ 刘云启² 朱智敏³ 巢永烈^{3Δ}

(1 山东大学附属省立医院口腔种植科 山东 济南 250021; 2 滨州医学院附属医院身肾内科 山东 滨州 256600;
3 四川大学华西口腔医学院 四川 成都 610041)

摘要 目的:探讨在低渗透压形成的静牵张应力环境下线粒体跨膜电位与细胞增殖分化及凋亡的关系。**方法:**用成骨样细胞 MG63 细胞株进行体外培养、扩增,在对数生长期采用不同的低渗透压对细胞进行刺激,检测不同作用条件下线粒体跨膜电位($\Delta\Psi_m$)、细胞增殖比例(S 期百分比)以及凋亡指数。**结果:**240 mOsm 组 $\Delta\Psi_m$ 呈上升趋势,4 h 达到峰值,6 h 逐渐下降,但仍高于对照组; 163 mOsm 组 $\Delta\Psi_m$ 在 6 h 时明显降低。277 和 240 mOsm 组 S 期百分比在 6 h 和 8 h 达到峰值(26.54 ± 0.71 , 28.10 ± 0.39 ; 26.96 ± 0.33 , 28.55 ± 0.26)。三个实验组的凋亡峰均提前,且大于对照组,尤以 163 mOsm 组为最(54.87 ± 0.78 ★)。**结论:**成骨样细胞 MG63 $\Delta\Psi_m$ 的变化与时间和力学刺激强度有一定的依赖性,预示线粒体跨膜电位的变化与细胞增殖活性之间存在一定的关系。

关键词:成骨样细胞; 牵张作用; 线粒体跨膜电位; 凋亡

中图分类号:R246.83 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2008)12-2269-03

Stretching -induced the mitochondrial membrane potential and apoptosis in human osteoblast- like MG63*

ZHANG Wei-qun¹, LIU Yun-q², ZHU Zhi-ming³, CHAO Yong-lie^{3Δ}

(1 Department of Oral Implantodontics, Shandong College Affiliated Provincial Hospital, Jinan, 250021, China;

2 Department of kidney, Binzhou medical school Affiliated Hospital, Binzhou, 266600, China;

3 West China College of Stomatology Sichuan University, Chengdu, 610041, China)

ABSTRACT Objective: To explore the relationships between mitochondrial membrane potential and proliferation index or apoptosis ratio by stretching of hyposmolality solutions. **Methods:** Mechanical loading was applied by swelling osteoblast-like cells MG63 in hypotonic solutions. Scanning Laser Confocal Microscope imaging of mitochondria stained with JC-1, a trans-membrane potential-sensitive vital dye, showed that ratio of red/green, mitochondrial membrane potential. Cell apoptosis ratio and proliferation index were used to assay apoptosis and proliferation of osteoblast-like cell MG63. **Results:** Mitochondria membrane potential ($\Delta\Psi_m$) increased following the accrescence of swelling. The $\Delta\Psi_m$ was highest under 240 mOsm at 4 h, while the lowest under 163 mOsm at 6 h. The proliferation index of four groups showed maximum at 6 h and 8 h (26.54 ± 0.71 , 28.10 ± 0.39 ; 26.96 ± 0.33 , 28.55 ± 0.26). With the decreasing of hypotonic pressure, apoptosis ratio increased, the 163mOsm group showed higher (24.68 ± 0.51). **Conclusions:** The response of MG63 osteoblast-like cell line was dependent on the magnitude and time of the swelling applied, which showed a tight relationship between the mitochondrial membrane potential and proliferation and apoptosis in MG63 osteoblast-like cell line.

Key words: human osteoblast-like cell, stretching, mitochondrial membrane potential, apoptosis

Chinese Library Classification: R246.83 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2008)12-2269-03

前言

牙槽骨的改建一直是口腔正畸及修复治疗中学者们关心的问题。为探讨机械应力对成骨细胞功能影响,在体外模拟成骨细胞受力的实验研究已经很多。如何促进成骨细胞的增殖、分化,并抑制其凋亡,获得良好的骨组织结构,是口腔医学、整形修复以及骨缺损重建等临床医学希望解决的问题。模拟成骨细胞体外受力的形式很多,其中最常用的是四点弯曲加力和流体剪切力^[1]。由于低渗透液加力方式多用于膜片钳技术,该加载方法简便、准确,且可以对各组细胞同期批量加载,是一种值得

推广的力学加载方式。线粒体作为细胞代谢的能量基地和呼吸代谢的场所,其跨膜电位的维持,对细胞的氧化磷酸化、ATP 等合成具有重要生物学意义。本实验拟尝试采用低渗透液加载方式,探讨成骨细胞在该应力作用下,线粒体跨膜电位的变化,以及与细胞增殖分化和凋亡的关系,为口腔细胞生物力学提供基础性研究。

1 材料和方法

1.1 主要材料

人成骨样细胞株 MG-63 (中国典型培养物保藏中心,武

* 基金项目:滨州医学院科技攻关项目(2006-7 BY2005KJ19)

作者简介:张卫群,女,(1970-),主治医师,博士,研究方向为细胞生物力学

Δ 通讯作者:巢永烈,E-mail: nestcn @263.net

(收稿日期:2008-04-16 接受日期:2008-05-10)

汉), DMEM 细胞培养基(高糖)(GIBCO 公司, 美国), 小牛血清(哈里, 中国), 六孔培养板(FALCON.USA), JC-1(5,5',6,6'-tetra-chloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide, T3168, Fluca USA), 共聚焦激光扫描显微镜(TCS SP2, Leica 公司, German)、流式细胞仪(Becton-Dickinson 公司的 FACSsort)

1.2 细胞培养

人类成骨样细胞株 MG-63, 用含 10%FBS 的 DMEM 培养, 同时加入 100 u/ml 青霉素、100 ug/ml 链霉素, 培养条件为 37°C, 5%CO₂。经过扩增、0.25%胰酶和 0.03%EDTA 溶液消化, 并按 1:4 进行传代。传代后的细胞均匀接种于六孔板的爬片上, 每孔接种密度约为 2×10^5 /ml, 至亚融合状态时加入无血清培养基孵育 12 h, 使细胞同步化, 随后加入含 10%FBS 培养基进行实验。

1.3 实验分组

实验分为三个低渗组和一个对照组, 每组重复细胞孔数为 3, 按正常人的血浆渗透压标准(280~320 mmol/L)设计 3 组低于正常范围的低渗液。1 组: 渗透压为 277 mOsm; 2 组: 渗透压为 240 mOsm; 3 组: 渗透压为 163 mOsm; 4 组: 为空白对照组(DMEM)。将成骨样细胞株 MG-63 接种在 6 孔板中, 每孔均放有盖玻片, 待细胞生长处于对数生长期时, 分别加入上述预先配置好的不同低渗液, 对照组重新换成新鲜的 DMEM 培养液。实验中各组视检测目的进行相应的处理。

1.4 低渗液的配制

低渗液配制参阅相关文献^[2]。由以下成分组成: 154 mM 甘露醇, 65 mM NaCl, 5.5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 20 mM HEPES (pH7.4 with NaOH), 8 mM 葡萄糖, 1 mg/ml 牛血清白蛋白, 低渗溶液(163, 240, 277 mOsm)除了甘露醇浓度不同外, 其它成分均相同。渗透压由气压型渗透压计在室温下检测校对。对照组为 DMEM 组(DMEM 渗透压为 282.5 mmol/L)。

1.5 线粒体跨膜电位 MP($\Delta\Psi_m$)的检测

在标本进行荧光染色前采集图像, 用以校正暗电流和杂散光线的影响。采集跨膜电位为 0 的图像, 用以校正非特异性结合产生的荧光。为此, 可将溶液换成为等渗高钾溶液(140 mmol/L), 并加入 1 μ M 的 Valinomycin, 将细胞和线粒体跨膜电位钳置于 0, 此时采集的图像即为非特意结合荧光图。

将上述接种密度为 2×10^5 /ml 细胞培养板, 弃原培养液, 加入不同渗透压的低渗液, 分别于 0.5 h、2 h、4 h 和 6 h 后弃去, 用 PBS 冲洗, 加入 1.5 μ M 的 JC-1 荧光染料, 置于细胞培养箱里孵育 30 min 后, 弃原液, 用 PBS 缓冲液反复冲洗 3 次, 采用激光共聚焦显微镜检测红绿荧光比值。激光共聚焦显微镜采用双通道激发波长, 绿色激发波长为 490 nm, 发射波长为 527 nm; 红色激发波长为 490 nm, 发射波长为 590 nm。MP($\Delta\Psi_m$)通过红绿荧光比值来进行测量, 计算公式为 $MP = \log R - \log G$, 其中 R、G 分别为红绿荧光强度值。

1.6 细胞增殖周期的检测

细胞培养处理同上, 在加入不同渗透压液体后, 分别在 0.5 h、4 h、6 h、8 h、24 h 和 48 h 收集细胞, 75%乙醇固定, 4°C 保存。制备单细胞悬液后, 碘化丙啶染色 30 min, 流式细胞仪检测^[3], 分析细胞 S 期细胞百分比以及凋亡率的变化。

1.7 统计分析

样本统计采用计量资料, 所得数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间差异比较采用单因素方差分析法, 所有数据处理均在 SPSS12.0 统计软件上进行分析。p<0.01 时, 差异有显著性。

2 结果

2.1 不同渗透压作用对线粒体跨膜电位($\Delta\Psi_m$)影响

细胞染色图像中可以看到, 胞浆中充满了大量的颗粒状或丝状线粒体, 没有细胞核染色出现。背景染色不明显。说明该荧光染料特异性很高。通过对线粒体跨膜电位的荧光定量分析发现, 随着渗透压的降低, 以及作用的时间延长, 红色荧光增强, 绿色荧光减弱, $\Delta\Psi_m$ 有增高的趋势, 其中 277 mOsm $\Delta\Psi_m$ 轻度增高, 但与对照组没有明显差别; 240 mOsm 组 $\Delta\Psi_m$ 总体高于对照组, 且作用 2 h、4 h 和 6 h 时, $\Delta\Psi_m$ 明显高于对照组, 在作用 4 h 时达到峰值, 两组比较有统计学差异, p<0.01; 163 mOsm 在作用初期, 就有明显的 $\Delta\Psi_m$ 增高, 但是随着作用时间的延长, 红色荧光减弱, 绿色荧光明显增强, $\Delta\Psi_m$ 降低, 且作用 4 h 以后, 明显低于对照组, 两组比较 p<0.01(图 1)。

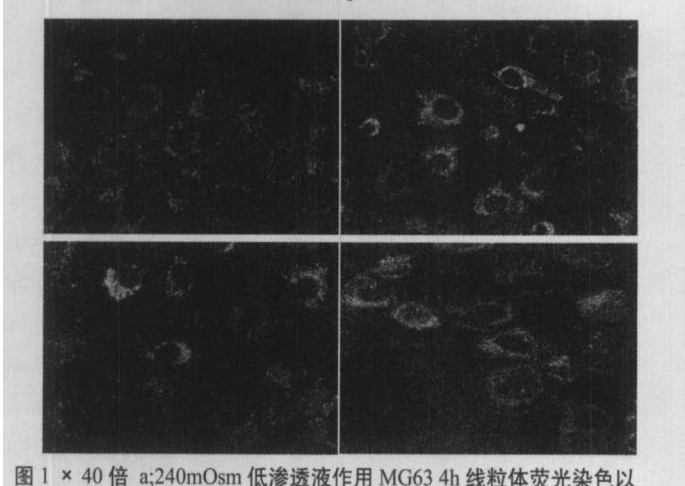


图 1 $\times 40$ 倍 a: 240mOsm 低渗透液作用 MG63 4h 线粒体荧光染色以

红色荧光为主, 红绿荧光比值增高,

b: 240mOsm 低渗透液作用 MG63 6h 线粒体红色荧光减少, 红绿荧光比值降低,

c: 163mOsm 低渗透液作用 MG63 4h, 线粒体的绿色荧光明显增强, 红色荧光减少,

d: 163mOsm 低渗透液作用 MG63 4h, 线粒体的绿色荧光继续增强, 红色荧光依稀可见,

Fig. 1 a, b: The image of MG63 cells treated with 240mOsm hypotonic solution for 4h, a distinct enhancement of red fluorescent was inspected ($\times 40$); c, d: The image of 163mOsm group for 4h and 6h, an obvious enhancement of green fluorescent was inspected ($\times 40$).

2.2 不同时间段渗透压静牵张力作用对细胞增值变化的影响

通过对 S 期分析发现, 细胞增殖具有时间规律。不同渗透压对 S 期的影响在 24 h 以内变化不是很大。另外, 几乎所有实验组和对照组均表现为 6 h 到 8 h 的 S 期比值最高(表 1)。

2.3 不同时间段渗透压静牵张力作用对细胞凋亡率的影响

通过对细胞凋亡率分析发现, 各实验组在作用 4 h 后都出现明显的凋亡峰值, 163 mOsm 组明显高于其它实验组以及对照组; 240 mOsm 组高于对照组的凋亡峰值。以后随着作用时间的延长, 各组凋亡率呈现降低趋势, 但 163 mOsm 组仍高于其它组。在 24 h 时, 163 mOsm 再次出现高的凋亡峰值(表 2)。

表1 牵张作用对成骨样细胞 MG63 增殖变化的影响(%_{n=72}, $\bar{x} \pm s$)Table 1 The effects of stretching on proliferation in osteoblast-like cell MG3(n=72, $\bar{x} \pm s$)

Time (h)	Control	Hypotonic solution group		
		277mOsm	240mOsm	163mOsm
		Group	Group	Group
0.5	7.03± 0.26	7.43± 0.33	6.67± 0.51*	2.89± 0.36
4	24.48± 0.79	24.32± 0.40	25.00± 0.22*	20.37± 0.32
6	24.85± 0.66*	26.54± 0.71*	26.96± 0.33	24.68± 0.52
8	26.37± 0.46*	28.10± 0.39*	28.55± 0.26	27.16± 0.41
24	23.62± 0.32	22.54± 0.58	21.42± 0.34	24.47± 0.75
48	23.05± 0.30	23.27± 0.63*	26.65± 0.42*	24.85± 0.62

Note: Compared with control, *P<0.01

3 讨论

3.1 线粒体跨膜电位($\Delta\Psi_m$)的维持以及意义

线粒体跨膜电位的维持,是通过电子传递链在能量方面有利的电子流,将质子自由泵送过膜,建立起一个跨线粒体内膜的电化学质子梯度。因此主动泵送质子导致两个结果:1 产生一个跨线粒体内膜的质子(H⁺)浓度梯度,使得基质的PH(约为8)较通常PH接近7的膜间隙高一个单位。2 产生一个线粒体内膜的膜电位,其内侧(基质侧)为负而外侧为正^[4]。也就是说任何刺激因素一旦改变线粒体内膜质子转运,都将改变线粒体跨膜电位;而跨膜电位的变化,将影响到细胞代谢,包括氧化磷酸化,以及ATP合成、转运,从而影响到细胞生物学特性。

3.2 JC-1 荧光染料的特点

实验中选用的JC-1是一种阳离子型的亲脂性活细胞染料,对线粒体具有特异性的荧光探针^[4]。可以自由通过细胞膜,可随 $\Delta\Psi_m$ 的变化在膜两侧保持一种动态平衡,由于其与非线粒体以外的膜无结合作用,因此可以排除其它假阳性结果的干扰。在 $\Delta\Psi_m$ 低时,JC-1以单体形式聚集的浓度也降低,激发波长为490nm,最大发射波长为527nm,表现为绿光;当跨膜电位升高时,则以聚集形式存在,激发波长为490nm,最大发射波长为590nm,呈现红光。采用双色红绿荧光比值检测MP,所用公式为:MP=logR-logG,其中R、G分别为红绿荧光强度比值。R、G仅依赖于跨膜电位的变化而变化。而不受其它干扰荧光信号的因素,如线粒体大小,形状以及密度等。

3.3 $\Delta\Psi_m$ 与细胞增殖的关系

$\Delta\Psi_m$ 的改变,将影响到细胞的氧化磷酸化以及ATP的合成、转运等生物学功能^[4]。实验中发现, $\Delta\Psi_m$ 、S期百分比以及细胞凋亡率的变化均表现出一定的相关性。从渗透液由277mOsm到240mOsm,再到163mOsm,渗透压逐渐降低,以及作用的时间延长, $\Delta\Psi_m$ 有增高的趋势趋势,共聚焦显微镜下可以看到,染色的线粒体中红色荧光增强,绿色荧光相对假弱(图2A)。同期细胞的S期百分比增高,凋亡峰形成,说明低渗刺激可增强线粒体呼吸功能,使DNA合成增多,细胞代谢活跃。其中277mOsm组的 $\Delta\Psi_m$ 轻度增高,但与对照组没有明显差别;240mOsm组的 $\Delta\Psi_m$ 总体高于对照组,4h时达到峰值,以后有所回落,但维持在一个较高水平。277mOsm组、240mOsm

表2 不同渗透压培养液在不同时间细胞凋亡率变化情况(%_{n=72}, $\bar{x} \pm s$)Table 2 The effects of stretching on apoptosis index of osteoblast-like cell MG3 (%_{n=72}, $\bar{x} \pm s$)

Time (h)	Control	Hypotonic solution group		
		277mOsm组	240mOsm组	163mOsm组
		0.5	2.23± 0.29	2.93± 0.57
4	20.17± 0.82	20.15± 0.12*	28.29± 0.61*	54.87± 0.71
6	19.73± 0.54*	24.90± 0.49*	10.99± 0.37	21.38± 0.36
8	11.75± 0.29*	17.64± 0.23	12.92± 0.52*	18.48± 0.55
24	4.13± 0.74*	0.48± 0.61*	4.58± 0.61*	34.58± 0.80
48	3.82± 0.37	2.87± 0.48*	5.32± 0.53*	12.93± 0.27

Note: Compared with control, * P<0.01

组、163mOsm组和对照组均表现为6h到8h的S期比值最高,提示该时期为细胞增殖旺盛期。试验中还发现,随着低渗液作用时间的延长,以及渗透压的降低,277和240mOsm凋亡率值呈现降低趋势。但在24h时163mOsm组再次出现高的凋亡峰值。48h以后各组趋于平稳。分析原因,可能由于277mOsm和240mOsm刺激强度较弱,受损细胞相对较少;而163mOsm组刺激强度相对较大,受损细胞较多,细胞机械应答作用更强烈,细胞凋亡率增加。说明长时间过大应力,不利于骨的改建,骨组织表现以吸收为主。这一点已经被实验和临床所证实^[6,7]。

3.4 低渗透液与其他力学加载形式的不同

低渗透液是降低细胞外环境的渗透压,一方面是导致大量的离子和小分子进入胞浆内,导致胞膜持续膨胀发生形变,形成持续的机械静牵张作用,从而激活胞膜表面的一系列机械信号通道;另一方面由于渗透压的改变,还可能激活胞膜内外的电化学通道,如Na⁺、K⁺泵等,从而引发一系列的细胞生物学特性^[4]。因此,本试验所得的结论还不能与单纯的机械应力结果等同,其中的机制还有待于进一步的研究。但是采用低渗透压加载研究成骨细胞的力学响应,不失为一个操作简单,便于控制的力学形式,有其一定的优越性。

致谢:衷心感谢四川大学口腔生物医学实验室对本课题支持。

参考文献(References)

- [1] Sorkin AM, Dee KC, Knothe Tate ML. 2004 "Culture shock" from the bone cell's perspective: Emulating physiological conditions for mechanobiological investigation [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2004, 287: C1527-C1536
 - [2] Chen X, Macica CM, Ng KW, et al. Stretch-Induced PTH-Related Protein Gene Expression in Osteoblasts [J]. J Bone Miner Res, 2005, 20: 1454-1461
 - [3] Zhou Chun-xi, Liang Xue-yin, Li Ning, et al. The Detection of Mitochondrial Membrane Potential in Apoptosis Cells by Flow Cytometry [J]. Journal of Analytical Science, 2003, 19 (5): 421-432 (In Chinese)
 - [4] 赵寿元, 金承志, 丁小燕, 等. 基础细胞生物学—细胞分子生物学入门 [M]. 上海科学技术出版社, 2002 (6): 378-9
- Zhao Shou-yuan, Jin Cheng-zhi, Ding Xiao-yan, et al. Essential Cell Biology: An Introduction to the Molecular Biology of the Cell [M]. Shanghai: Shanghai Science & Technology publishing house, 2002, 378-379

(下转第 2274 页)

链霉素 SM 主要作用于 MT 的核糖体,诱导遗传密码的错误,抑制 mRNA 转译的开始,干扰转译过程中的校对,从而抑制蛋白质合成。最近研究认为,某些菌株耐 SM 是由于其核糖体蛋白 S12 编码基因 rps L 或 16s r RNA 编码基因 rrs 突变所致,虽然 rrs 突变也会导致部分 MT 耐 SM,但 rps L 突变是 SM 耐药的主要分子机制^[11,12]。本试验中,32 株 SM 敏感株未检出 rps L 基因突变;而 30 株耐 SM 分离株中 21 株(70.0%)出现 SSCP 泳动异常,表明 rps L 基因发生突变,导致这些结核杆菌耐 SM,另 7 株分离株未出现 SSCP 泳动异常,可能尚存在其他耐药机制,如:细胞渗透性等^[13]。本实验选取样品测序的结果中发现 11 株 43 位密码子发生突变,为 AAG→AGG (Asn→Arg),5 株为 88 位密码子发生突变,为 AAG→AGG (Asn→Arg),同文献报道^[13,14]。

乙胺丁醇是一种阿拉伯糖类物,作用于靶分子阿拉伯糖基转移酶,抑制其聚合入阿拉伯半乳糖,从而影响细胞壁分枝菌酸-阿拉伯半乳糖-肽聚糖复合物的形成,导致菌细胞的死亡,同时也使作用于细胞内靶分子的药物(如利福平等)更易进入细胞而出现协同抗结核作用^[15]。本研究结果显示,33 株 EMB 敏感株与标准株有相同的 SSCP 图谱,检测 29 株耐 EMB 分离株中有 19 株出现 SSCP 异常,异常检出率达 65.5%,5 株 emb B 基因 306 位密码子发生突变,为 ATG→ATA (Met→Ile),证明 emb B 基因(尤其是 306 位密码子)突变是结核菌耐 EMB 产生的主要原因。但有一部分耐 EMB 菌株未检测到 emb B 基因有突变,提示某些菌株的耐 EMB 形成可能是存在其他耐药机制。如文献报道^[16,17]在耐 EMB 分离株中,还检测到 emb B 285 位 Phe (TTC)→Leu (TTA),330 位 Phe (TTC)→Val (GTC),630 位 Thr (ACC)→Ile (ATC)置换。此外,目前还发现 emb A 和 emb C 氨基酸置换可引起少数结核菌耐 EMB。

总之,本研究结果表明,PCR-SSCP 技术对基因突变的诊断与常规耐药性测定方法均有较高的符合率。在实验过程中我们发现,PCR-SSCP 技术操作比较简单,结果容易观察,是一种应用价值比较高的耐药检测方法,一般具有一定条件的医院或实验室均可开展此项检查。PCR-SSCP 技术可能成为测定部分结核分枝杆菌 EMB 耐药简便、快速的方法。

参考文献(References)

- [1] 全国结核病流行病学抽样调查技术指导组.第四次全国结核病流行病学抽样调查报告[J].中国结核和呼吸杂志,2002,25(1):3-7
National Technic Steering Group of the Epidemiological Sampling Survey for Tuberculosis. Report on fourth national epidemiological sampling survey of tuberculosis [J]. Chin J Tuberc Respir Dis, 2002, 25(1): 3-7
- [2] Jin Xin. The Epidemic State of Tuberculosis and Its Control Strategies in Xinjiang from 1979 to 2000 [J]. Endemic Diseases Bulletin, 2003,18(1):50-52(In Chinese)
- [3] Liu Yu-hong, Jiang Guang-lu, Zhao Li-ping, et al. Drug resistance of Mycobacterium tuberculosis in a nationwide epidemiological survey in China in the year of 2000 [J]. Chin J Tuberc Respir Dis, 2002, 25(4):224(In Chinese)
- [4] Ouerol J M, Farga MA, Granda D, et al. The utility of polymerase chain reaction (PCR) in the diagnosis of pulmonary tuberculosis [J]. Chest, 1995, 107(6): 1631
- [5] Fukuda M, Kogalt H, Ohonh H, et al. Relationship between streptomycin susceptibility and rps L mutation of M. tuberculosis strains [J]. Kekkaku, 1997, 72(9): 507-513
- [6] Sreevatsan S, Stockbauer KE, Pan X, et al. Ethambutol resistance in Mycobacterium tuberculosis: critical role of emb B mutations [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1997, 41(8):1677-1681
- [7] Telenti A, Philipp WJ, Sreevatsan S, et al. The emb operon, a gene cluster of Mycobacterium tuberculosis involved in resistance to ethambutol [J]. Nature Medicine, 1997, 3(5):567-570
- [8] A lcaide F, Pfyffer GE, Telenti A. Role of embB in natural and acquired resistance to ethambutol in mycobacteria [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1997, 41(10):2270-2273
- [9] Ramaswamy SV, Amin AG, Goksel S, et al. Molecular genetic analysis of nucleotide polymorphisms associated with ethambutol resistance in human isolates of Mycobacterium tuberculosis [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(2):326-336
- [10] 中国防痨协会. 结核病诊断细菌学检验规程 [J]. 中国防痨杂志, 1996, 18(2): 80-85
China Antituberculosis Association. The Laboratory Science Procedure of Diagnostic Bacteriology in Tuberculosis [J]. The Journal of the Chinese Antituberculosis Association. 1996, 18(2): 80-85
- [11] Finken M, Kirschner P, Meier A, et al. Molecular basis of streptomycin resistance in M. tuberculosis: alterations of the ribosomal protein S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot [J]. Mol Microbiol, 1993, 9(6):1239-1246
- [12] Morris S, Bai GH, Suffys P, et al. Molecular mechanism of multiple drug resistance in clinical isolates of mycobacterium tuberculosis [J]. J ID, 1995, 171(4):954-957
- [13] Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in Mycobacterium tuberculosis [J]. Tubercle and Lung Disease. 1998,79(1):3-29
- [14] Bottger EC. Resistance to drugs targeting protein synthesis in mycobacteria [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(2): 443-450
- [15] Belanger AE, Besra GS, Ford ME, et al. The emb AB genes of Mycobacterium avium encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(21): 11919-11924
- [5] Chen Cai zhen, Lu Jian, Xu Hao-wen, et al. Effects of long-term physical activity on complex of skeletal muscle mitochondria of old mice [J]. Modern Rehabilitation, 2000, 4(4):568-569(In Chinese)
- [6] Liu Chun-ming, Song Ru yao, Song Ye guang, et al. Hard palate lengthening by palatal suture expansion:an experimental study in dogs [J]. Chinese Journal of Plastic Surgery, 2000, 4(4):568-569(In Chinese)
- [7] Cahill A, Cunningham CC, Adachi M, et al. Effects of alcohol and oxidative stress on liver pathology: the role of the mitochondrion Alcohol [J]. Clin Exp Res, 2002, 26(6):907-15

(上接第 2271 页)