

呼吸道合胞病毒感染人肺上皮细胞一氧化氮的产生及其作用

黄升海^{1*} 王 杨² 刘 伟¹ 史晓侗¹

(1. 安徽医科大学微生物学教研室 安徽 合肥 230032)
(2. 安徽医科大学第一附属医院儿科 安徽 合肥 230022)

摘要: 本文探讨呼吸道合胞病毒(RSV)感染人肺上皮细胞(A549 细胞)后, 一氧化氮(NO)的水平变化及其在RSV感染中的氧化损伤和抗病毒作用。RSV以不同时间感染A549 细胞, 并予以NO合成的抑制剂氨基胍(AG)处理。收集细胞培养上清, 分别用硝酸还原酶法和硫代巴比妥酸法检测NO和丙二醛(MDA)含量, 化学法检测羟自由基(OH·)与超氧阴离子(O₂⁻)水平, 空斑形成试验测定病毒复制滴度(PFU)。结果显示在RSV感染4 h后即上调NO、OH·、O₂⁻和MDA的表达水平。当RSV感染中给予AG处理以抑制iNOS合成NO时, 则降低OH·、O₂⁻和MDA含量, 但病毒PFU升高。各指标的变化与相应时间点的感染组相比, 差异均有显著性。提示RSV感染肺上皮细胞诱导生成的NO与细胞内自由基水平升高和加重细胞的自由基损伤程度有关; 但在一定程度上可抑制病毒的增殖水平。

关键词: 呼吸道合胞病毒, 一氧化氮, 氧化损伤, 抗病毒作用

The Production and Effect of Nitric Oxide in Respiratory Syncytial Virus-infected Human Lung Epithelial Cells

HUANG Sheng-Hai^{1*} WANG Yang² LIU Wei¹ SHI Xiao-Yi¹

(1. Department of Microbiology, Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230032, China)
(2. Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230022, China)

Abstract: To investigate the formation and effect of nitric oxide (NO) on oxidative injury and anti-virus in human lung epithelial cells (A549) infected with respiratory syncytial virus (RSV) *in vitro*. A549 cells infected with RSV treated or untreated with Aminoguanidine (AG), the specific inhibitor for inducible nitric oxide synthase, were used to collect cellular supernatants and do the experiments. At indicated time points, the concentrations of NO, hydroxy radical (OH·), superoxide anion (O₂⁻) and malondialdehyde (MDA) were measured according to the kit reference. The viral titers were evaluated by plaque forming unit (PFU) assay. We found that RSV infection could markedly up-regulate the levels of OH· and O₂⁻ in A549 cellular supernatants since 4 hours after infection. Meanwhile, the levels of MDA increased obviously in a

time-dependent manner. The changes of each index varied significantly compared with the control group. But the NO content in the cellular supernatants could significantly decrease when AG inhibitor was used, and the levels of $\text{OH}\cdot$, O_2^- and MDA were also decreased accordingly in comparison with the corresponding RSV-infected group. In addition, the titer of virus was increased, which was about 1.5 times as many the RSV group 24 h after RSV infection. The changes of these indices have significantly different compared with the corresponding RSV-infected group. In conclusion, RSV infection could induce high-level NO. The NO may associate with the content of free radical, which could decrease the viral titers in the infection, but lead oxidative injury to normal cells.

Keywords: Respiratory syncytial virus, Nitric oxide, Oxidative injury, Anti-viral role

呼吸道合胞病毒(Respiratory syncytial virus, RSV)是引起婴幼儿下呼吸道感染的重要病毒性病原体^[1],其致病机理尚未完全清楚,目前认为主要是免疫病理反应造成的细胞损伤。病毒感染后能诱导宿主表达和分泌大量的细胞因子、趋化因子、活性氧等生物活性介质^[2-4]。这些活性介质的过度分泌,可导致严重的毛细支气管炎、肺炎,诱发喘息,与婴幼儿哮喘密切相关。至今对RSV感染尚无有效的治疗药物和理想的疫苗接种,因此研究RSV感染时的炎症产生及其损伤机制,可为临床治疗提供新的思路和方法。

近年来一氧化氮(Nitric oxide, NO)在细菌、霉菌和病毒等多种病原体感染所致炎症中的作用日益受到重视^[5,6]。NO合成中的关键限速酶为一氧化氮合酶(Nitric oxide synthases, NOS),研究表明由诱导型一氧化氮合酶(iNOS)合成的NO在呼吸道病毒感染中发挥主导作用^[7-9]。我们曾报道,RSV感染人肺上皮细胞可诱导iNOS和NO的水平升高^[10]。本文就NO在RSV感染中的氧化损伤及抗病毒等作用进行进一步研究,为探讨RSV致病机理提供有力的实验依据。

呼吸道上皮组织是RSV感染时侵犯的主要部位,A549细胞为肺腺癌上皮细胞,具有肺泡II型上皮细胞的特征,对RSV敏感。本实验拟用RSV体外感染A549细胞,并给予iNOS特异性抑制剂氨基胍(Aminoguanidine, AG)处理,以抑制NO产生。收集细胞培养上清,分别检测NO和丙二醛(Malondialdehyde, MDA, 自由基氧化损伤指标)的含量、活性氧指标羟自由基(Hydroxy radical, $\text{OH}\cdot$)与超氧阴离子(Superoxide anion, O_2^-)的水平,以及病毒复制水平(以空斑形成单位数表示,Plaque forming unit, PFU),进一步探讨NO在RSV感染中的可能作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒和细胞: RSV-Long株(国际标准株)和Hep-2细胞(人喉癌上皮细胞),均为我室保存。病毒传代后经聚乙二醇沉淀、蔗糖密度梯度离心后测定病毒感染单位量为 1.0×10^8 PFU/mL,保存于 -80°C 备用。A549细胞(人肺腺癌上皮细胞)购于上海实生细胞生物技术有限公司。

1.1.2 主要试剂: DMEM培养基购自美国Gibco公司,AG为美国Sigma公司产品。新生小牛血清,杭州四季清公司。 NO 、 $\text{OH}\cdot$ 、 O_2^- 和MDA检测试剂盒,均购自南京建成生物工程研究所。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与病毒接种: 将A549细胞置于24孔细胞培养板中,待细胞长至80%满时接种病毒,加入0.1 MOI(感染复数, Multiplicity of infection, MOI)RSV吸附2 h后^[11],换细胞维持液并调整培养液终体积为0.5 mL,于 33°C 中培养。

1.2.2 实验分组: 整个实验分为正常对照组(未感染RSV)、RSV感染组(RSV)、氨基胍抑制组(1 mmol/L AG + RSV),AG于RSV感染的同时加入。每组设立4 h、8 h、16 h和24 h四个感染时间点,每组重复4个复孔。

1.2.3 A549细胞培养上清中NO、 $\text{OH}\cdot$ 、 O_2^- 和MDA的检测: 用硝酸还原酶法和硫代巴比妥酸法分别检测NO和MDA含量,化学法检测 $\text{OH}\cdot$ 与 O_2^- 的水平,均严格按试剂盒操作说明书进行。

1.2.4 测定细胞培养上清中病毒感染单位量: 进行空斑形成试验,用PFU表示结果。将Hep-2细胞接种于6孔细胞培养板中,培养24 h长成单层后,弃去各孔营养液,加入作10倍连续系列稀释(10^{-1} ~ 10^{-7})的待测标本(细胞培养上清)0.5 mL。 33°C

吸附 2 h 后弃去各孔病毒液, PBS 轻轻洗涤 1 次, 每孔加入 2 mL 覆盖层(含 6% 新生牛血清的 DMEM 与 1.5% 琼脂糖等体积混匀), 静置 15 min 使其凝固, 置 33°C、5% CO₂ 孵箱中培养 3 d。剔除覆盖层, 用 0.5% 结晶紫染色 10 min, 自来水冲洗后选择空斑数清晰且易于分辨的稀释度计数空斑, 根据空斑数计算病毒的 PFU。PFU = $\frac{a \cdot b}{v}$ (PFU: 空斑形成单位/mL; a: 空斑均数; b: 病毒稀释度的倒数; v: 病毒量/mL)

1.3 统计学处理

所有数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 用 SPSS11.0 版本统计软件进行分析。多个样本均数比较用单因素方差分析(one way ANOVA), 有显著性差异者用 Student-Newman-Kuels(SNK 检验)进行两两比较, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 RSV 感染 A549 细胞培养上清 NO 水平, OH·、O₂⁻ 和 MDA 含量变化

与正常对照组相比, RSV 感染诱导 NO 的生成增加, 随着 RSV 感染时间的延长, NO 的生成量逐渐升高; RSV 感染能促进 OH·、O₂⁻ 和 MDA 的产生, 与正常对照相比较, OH· 在感染后 24 h 升高具有显著性, O₂⁻ 在感染 8 h 后显著性升高, MDA 在感染 4 h 后显著性升高, 24 h 为正常基础表达量的 10 倍多(见表 1)。

2.2 AG 处理后对细胞培养上清 NO、OH·、O₂⁻、MDA 含量及病毒滴度的影响

加入 AG, 可显著降低 RSV 感染的细胞培养上清中 NO 生成量, 同时降低相应的升高的 O₂⁻、OH· 和 MDA 水平, 结果分别见图 1、2、3 和 4(数据未列出)。提示降低了 NO 生成后, 细胞的自由基氧

化损伤程度减轻。PFU 测定结果显示, 经 AG 处理后的病毒 PFU 值均高于相应时间点的 RSV 感染组, $P < 0.01$ (见表 2), 表明抑制 NO 合成后, 反而增加了病毒的复制水平。病毒空斑形成试验的典型结果见图 5。

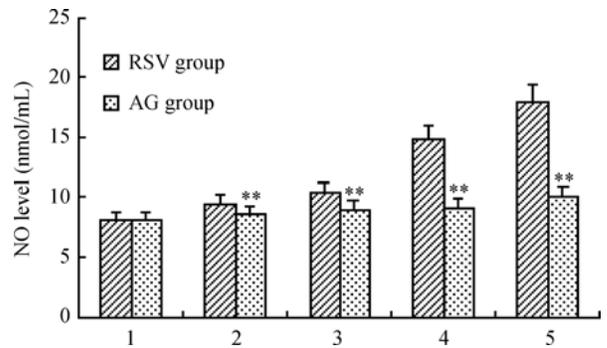


图 1 AG 处理对 RSV 感染 A549 细胞培养上清中 NO 生成的影响

Fig. 1 Effects of AG treatment on the NO production in A549 cellular supernatants infected with RSV

1: Control; 2: 4 h; 3: 8 h; 4: 16 h; 5: 24 h; **: $P < 0.01$ vs RSV group ($n=4$).

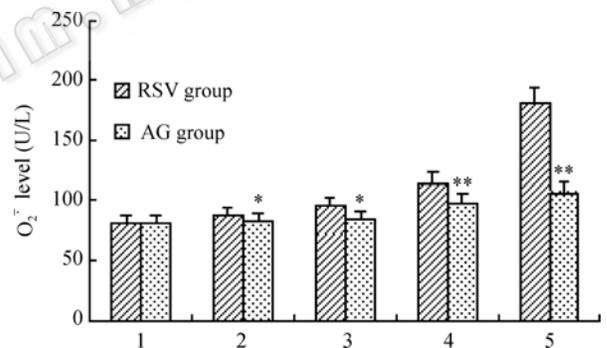


图 2 AG 处理对 RSV 感染 A549 细胞培养上清中 O₂⁻ 含量的影响

Fig. 2 Effects of AG treatment on the O₂⁻ levels in A549 cellular supernatants infected with RSV

1: Control; 2: 4 h; 3: 8 h; 4: 16 h; 5: 24 h; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ vs RSV group ($n=4$).

表 1 RSV 感染不同时间对 A549 细胞培养上清中 NO 生成、OH·、O₂⁻ 和 MDA 含量的影响
Table 1 Effects of various time point of RSV infection on NO production, OH·, O₂⁻ and MDA levels in A549 cellular supernatants

检测指标 Detection of indicators	正常对照 Normal control	RSV4 h	RSV8 h	RSV16 h	RSV24 h
NO(nmol/mL)	8.26±0.12	9.66±0.39**	10.58±0.36**	14.74±0.32**	17.76±0.34**
OH·(U/mL)	92.15±8.25	92.22±7.45	93.75±8.45*	93.93±6.58*	101.32±8.45**
O ₂ ⁻ (U/L)	85.06±7.26	87.54±6.45*	92.46±5.48**	114.94±8.14**	180.64±10.65**
MDA(nmol/mL)	0.86±0.08	1.19±0.11**	2.57±0.25**	4.78±0.22**	8.37±0.38**

注: *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ vs 对照组($n=4, \bar{x} \pm s$).

Note: *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ vs control group.

表 2 AG 处理对 RSV 感染 A549 细胞培养上清中病毒滴度的影响
Table 2 Effects of AG treatment on viral titers in A549 cellular supernatants infected with RSV

PFU/mL	4 h	8 h	16 h	24 h
RSV 组 RSV group	$(1.3 \pm 0.6) \times 10^2$	$(6.3 \pm 1.0) \times 10^3$	$(5.1 \pm 1.5) \times 10^4$	$(4.2 \pm 1.4) \times 10^6$
AG 抑制组 AG inhibition group	$(1.2 \pm 0.7) \times 10^2$	$(7.1 \pm 0.8) \times 10^3^{**}$	$(9.2 \pm 1.3) \times 10^4^{**}$	$(6.8 \pm 1.8) \times 10^6^{**}$

注: **: $P < 0.01$ vs 不同 RSV 感染时间组 ($n=4$, $\bar{x} \pm s$).

Note: **: $P < 0.01$ vs corresponding time point of RSV-infected group.

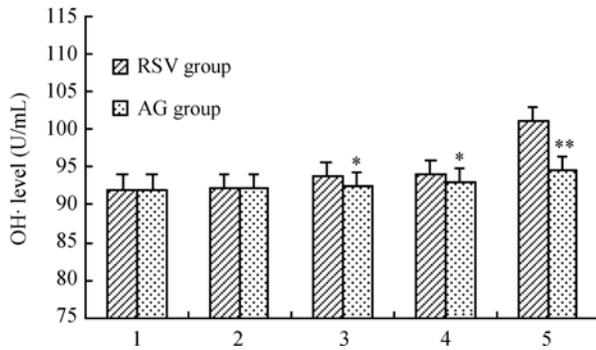


图 3 AG 处理对 RSV 感染 A549 细胞培养上清中的 OH· 含量影响

Fig. 3 Effects of AG treatment on the OH· levels in A549 cellular supernatants infected with RSV

1: Control; 2: 4 h; 3: 8 h; 4: 16 h; 5: 24 h; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ vs RSV group ($n=4$).

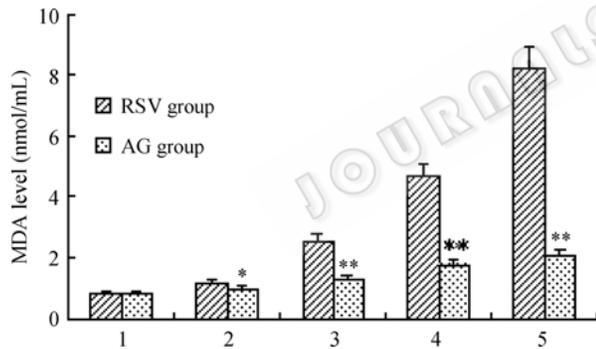


图 4 AG 处理对 RSV 感染 A549 细胞培养上清中 MDA 含量的影响

Fig. 4 Effects of AG treatment on the MDA levels in A549 cellular supernatants infected with RSV

1: Control; 2: 4 h; 3: 8 h; 4: 16 h; 5: 24 h; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ vs RSV group ($n=4$).

3 讨论

RSV 是婴幼儿下呼吸道感染最重要的病毒性病原体, 特别是 2~6 个月婴儿 RSV 感染后常发生严重的毛细支气管炎和肺炎。病毒的致病机理与气道局部的炎症反应密切相关。RSV 感染呼吸道上皮细胞后可产生大量的细胞因子、趋化因子、活性氧等生物活性介质, 使气道呈现高反应性, 引起支气管

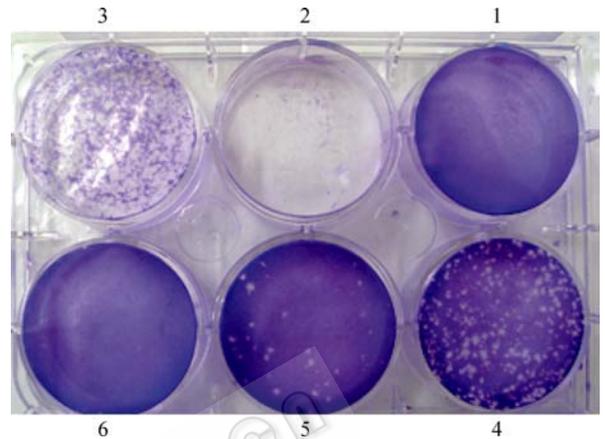


图 5 RSV 感染 24 h 的 A549 细胞培养上清病毒空斑形成试验结果

Fig. 5 The result of plaque forming unit assay for RSV-infected group at 24 h in supernatant fluids

注: 1: 对照; 2~6: 细胞培养上清稀释度分别为 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 。

Note: 1: Control; 2~6: Supernatant fluids were diluted 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , and 10^{-7} , respectively.

炎、肺炎、哮喘等疾病, 并加重原有肺部基础疾病患者的病情。

自 1987 年发现哺乳动物体内能合成内源性 NO 以来, NO 在炎症免疫中所发挥的重要作用已得到肯定^[12]。在流感病毒、鼻病毒等多种呼吸道感染引起的肺炎中, 均可见患者肺组织中诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 表达以及口鼻呼出气体中的 NO 含量明显增加^[7,8]。Baralidid 等研究也发现, 在有明显喘息音的病毒性肺炎婴幼儿呼出气体中, NO 含量明显高于正常水平^[9]。我们的结果显示, RSV 感染 A549 细胞在诱导产生大量 NO 的同时, OH·、 O_2^- 和 MDA 水平亦显著升高; 当 RSV 感染时给予 AG 处理抑制 NO 生成后, 则可显著降低细胞培养上清中 MDA 含量, 并抑制 OH· 和 O_2^- 的水平, 但病毒滴度却高于相应时间点的 RSV 感染组。表明 NO 可能与加重细胞的自由基损伤有关, 但在一定程度上可抑制感染中的 RSV 复制。

NO 的作用与其活泼的化学性质有关。NO 易溶

于水和脂肪, 因其不带电荷而带有一个未配对电子(自由基), 可迅速与组织中的水、氧以及广泛存在的超氧自由基发生结合反应, 生成一系列的超氧阴离子和自由基(主要为 $\text{OH}\cdot$ 、 O_2^- 、 OONO^- 等)。这些过量生成的氧自由基及硝基自由基可通过氧化硝基化作用, 修饰于病毒复制中的蛋白和核酸相关分子的靶分子位点, 降低病毒DNA合成中的限速酶及复制中关键蛋白酶的合成, 从而抑制病毒感染后的复制水平; 但这些氧化硝基化作用同样也作用于病毒感染的宿主细胞中靶位点的蛋白修饰, 破坏正常机体细胞中的巯基、酪氨酸类蛋白, 攻击不饱和脂肪酸, 产生脂质过氧化物等, 加重免疫炎症损伤^[13,14]。可见NO在RSV感染的炎症反应中可能发挥“双刃剑”作用, 即超生理水平的NO及其所诱导的大量氧自由基与硝基自由基产物具有一定的抗病毒作用, 但会在抗病毒的同时导致正常组织细胞的氧化损伤, 这与Akaike等报道的流感病毒小鼠体内实验结果基本一致^[15]。Ali-Ahmad等的体外实验证实, NO具有直接抗RSV活性^[16]; NO也可能通过影响细胞内信号转导通路来干扰病毒的复制周期^[17]。但NO具有趋化因子的特性, 能够趋化多种炎性细胞(如嗜酸性粒细胞)向感染部位集中^[18], 同时NO也是血管舒张剂, 在病毒感染时可能会增加肺部的血流供应和炎性细胞的渗出, 进一步加重肺部炎症水平^[19]。另有研究表明, 在RSV感染的BALB/c鼠中, 病毒复制本身并不对RSV临床疾病起重要作用^[12]。因此我们认为, RSV感染过程中诱导产生的NO主要介导炎症损伤作用。

在病毒感染中以iNOS活化产生的NO占主导地位, 抑制iNOS合成NO则有助于明确NO在感染中的作用。我们以AG作为iNOS抑制剂, AG为L-瓜氨酸(L-Arg)类似物, 与L-Arg竞争iNOS的结合位点从而达到抑制iNOS合成NO的作用, 对于iNOS有相对特异性抑制; 且抑制能力大于N-甲基-L-精氨酸(L-NMMA)^[20]。由于机体内产生的多种自由基可攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸, 引发脂质过氧化链式反应, 形成大量的MDA等脂质过氧化产物, 因此实验中以 $\text{OH}\cdot$ 、 O_2^- 水平作为活性氧自由基指标, 以MDA作为脂质过氧化损伤指标。在整个实验中, 采用空斑计数确定RSV复制水平, 因每个空斑是由一个具有活性的病毒感染颗粒在细胞中增殖形成的, 是病毒学中对活病毒定量最精确的鉴定方法, 并且

采用我们的方法对RSV计数, 出斑稳定, 计数清晰, 成功优化了RSV空斑形成试验的条件。本实验中, RSV感染A549细胞诱导生成大量的NO, 这与Kao等的报道一致^[11], 但与Tsumi等的仅在RSV感染同时加入细胞因子时才有明显NO产生报道不符^[21], 后者可能由于NO不稳定, 在感染48 h进行检测时已经下降。

总之, 该研究可能对RSV诱发的婴幼儿毛细支气管炎、肺炎、哮喘等疾病的发生机制研究提供新的依据。但在实验中仅设立NO抑制剂干预, 未能进行增加NO供体的正向干预来观察病毒滴度变化, 对此我们将进一步研究。此外, 在进行RSV治疗时, 如何采取有效措施调控NO产生, 使其浓度维持在既能抑制病毒复制而又不至于引起机体的氧化损伤, 值得深入探讨。

参 考 文 献

- [1] Hall CB. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. *N Engl J Med*, 2001, **344**(25): 1917–1928.
- [2] McNamara PS, Flanagan BF, Hart A, *et al.* Production of chemokines in the lungs of infants with severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Infect Dis*, 2005, **191**(8): 1225–1232.
- [3] Miller AL, Bowlin TL, Lukacs NW. Respiratory syncytial virus-induced chemokine production: linking viral replication to chemokine production *in vitro* and *in vivo*. *J Infect Dis*, 2004, **189**(8): 1419–1430.
- [4] Graham BS, Johnson TR, Peebles RS. Immune-mediated disease pathogenesis in respiratory syncytial virus infection. *Immunopharmacology*, 2000, **48**(3): 237–247.
- [5] Barnes PJ, Belvisi MG. Nitric oxide and lung disease. *Thorax*, 1993, **48**(10): 1034–1043.
- [6] Ricciardolo FL, Sterk PJ, Gaston B, *et al.* Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev*, 2004, **84**(3): 731–765.
- [7] Murphy AW, Platts-Mills TA, Lobo M, *et al.* Respiratory nitric oxide levels in experimental human influenza. *Chest*, 1998, **114**(2): 452–456.
- [8] De Kluijver J, Evertse CE, Sont JK, *et al.* Are rhinovirus-induced airway responses in asthma aggravated by chronic allergen exposure? *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, **168**(10): 1174–1180.
- [9] Baraldi E, Dario C, Ongaro R, *et al.* Exhaled nitric oxide concentrations during treatment of wheezing exacerbation in infants and young children. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999, **159**(4): 1284–1288.

- [10] 刘伟, 云云, 黄升海. 人肺上皮细胞感染呼吸道合胞病毒后核内活性因子 κ B 与诱导型一氧化氮合酶的表达. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, **12**(15): 2834-2837.
- [11] Kao YJ, Piedra PA, Larsen GL, *et al.* Induction and regulation of nitric oxide synthase in airway epithelial cells by respiratory syncytial virus. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, **163**(2): 532-539.
- [12] Stark JM, Khan AM, Chiappetta CL, *et al.* Immune and functional role of nitric oxide in a mouse model of respiratory syncytial virus infection. *J Infect Dis*, 2005, **191**(3): 387-395.
- [13] Lepoivre M, Fieschi F, Coves J, *et al.* Inactivation of ribonucleotide reductase by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, **179**(1): 442-448.
- [14] Saura M, Zaragoza C, McMillan A, *et al.* An antiviral mechanism of nitric oxide: inhibition of a viral protease. *Immunity*, 1999, **10**(1): 21-28.
- [15] Akaike T, Noguchi Y, Ijiri S, *et al.* Pathogenesis of influenza virus-induced pneumonia: involvement of both nitric oxide and oxygen radicals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**(6): 2448-2453.
- [16] Ali-Ahmad D, Bonville CA, Rosenberg HF, *et al.* Replication of respiratory syncytial virus is inhibited in target cells generating nitric oxide in situ. *Frontiers in Bioscience*, 2003, **8**: a48-53.
- [17] Mannick JB, Asano K, Izumi K, *et al.* Nitric oxide produced by human B lymphocytes inhibits apoptosis and Epstein-Barr virus reactivation. *Cell*, 1994, **79**(7): 1137-1146.
- [18] Thomazzi SM, Ferreira HH, Conran N, *et al.* Role of nitric oxide on *in vitro* human eosinophil migration. *Biochem Pharmacol*, 2001, **62**(10): 1417-1421.
- [19] Batra J, Chatterjee R, Ghosh B. Inducible nitric oxide synthase (iNOS): role in asthma pathogenesis. *Indian J Biochem Biophys*, 2007, **44**(5): 303-309.
- [20] Griffiths MJ, Messent M, MacAllister RJ, *et al.* Aminoguanidine selectively inhibits inducible nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol*, 1993, **110**(3): 963-968.
- [21] Tsutsumi H, Takeuchi R, Ohsaki M, *et al.* Respiratory syncytial virus infection of human respiratory epithelial cells enhances inducible nitric oxide synthase gene expression. *J Leukoc Biol*, 1999, **66**(1): 99-104.

~~~~~  
(上接 p.683)

### 2009 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表(2-2)

| 序号 | 会议名称                 | 主办单位                   | 时间              | 人数  | 地点       | 联系人                                       |
|----|----------------------|------------------------|-----------------|-----|----------|-------------------------------------------|
| 10 | 全国酶工程会议              | 中国微生物学会酶工程专业委员会        | 待定              | 待定  | 待定       | 金城<br>010-64807425                        |
| 11 | 2009 年生物过程模型化与控制学术会议 | 中国微生物学会生化过程模型化与控制专业委员会 | 9 月             | 100 | 上海       | 袁景淇<br>021-34204055                       |
| 12 | 重要人兽共患病研究新进展学术研讨会    | 中国微生物学会人兽共患病病原学专业委员会   | 10 月<br>14-18 日 | 200 | 湖南<br>衡阳 | 万康林<br>010-61739466                       |
| 13 | 第七届全国微生物毒素学术会议       | 中国微生物学会微生物毒素专业委员会      | 10 月            | 180 | 重庆       | 梁华平<br>023-68757404                       |
| 14 | 第三届全国资源生物技术与糖工程学术研讨会 | 中国微生物学会基础微生物学专业委员会     | 10 月            | 150 | 山东<br>济南 | 李越中<br>0531-88564288                      |
| 15 | 首届全国生物固氮学术研讨会        | 中国微生物学会农业微生物学专业委员会     | 10 月            | 100 | 湖北<br>武汉 | 李友国, 张忠明<br>027-87281685,<br>027-87281687 |
| 16 | 2009 年中国微生物学会学术年会    | 中国微生物学会                | 11 月            | 400 | 待定       | 王旭<br>010-64807200                        |
| 17 | 第十二次全国环境微生物学术研讨会     | 中国微生物学会环境微生物学专业委员会     | 11 月            | 250 | 湖北<br>武汉 | 蒋建东<br>025-84396348                       |
| 18 | 植物线虫的微生物防治研讨会        | 中国微生物学会农业微生物学专业委员会     | 12 月            | 60  | 昆明       | 张克勤<br>0871-5033790                       |