

氟康唑对热带念珠菌活性氧和 线粒体膜电位的影响

邱莲女¹ 周永列^{1*} 胡庆丰¹ 朱永泽¹ 郭伟² 吕火焯¹

(1. 浙江省人民医院检验中心 浙江 杭州 310014)

(2. 南京医科大学 江苏 南京 210029)

摘要: 为了探讨氟康唑作用机制, 观察它对热带念珠菌作用后存活率、活性氧(Reactive oxygen species, ROS)、线粒体膜电位(Mitochondrial membrane potential, $\Delta\Psi_m$)和细胞周期的变化。参照 NCCLS M27-A 方案的微量稀释法测定氟康唑对热带念珠菌的最低抑菌浓度(MIC); 热带念珠菌与不同浓度氟康唑共同培养后用流式细胞术(Flow cytometry, FCM)分析热带念珠菌存活率、ROS、线粒体膜电位 $\Delta\Psi_m$ 和细胞周期的变化。结果表明, 氟康唑作用后, 热带念珠菌氟康唑耐药株的存活率、ROS、线粒体膜电位 $\Delta\Psi_m$ 和细胞周期各期比例均没有明显变化; 而热带念珠菌氟康唑敏感株的存活率和线粒体膜电位 $\Delta\Psi_m$ 明显下降, ROS 明显升高, 而且大部分热带念珠菌阻滞于 G2/M 期, 并出现明显凋亡峰, 呈一定的时间剂量依赖关系。自由基清除剂谷胱甘肽抑制热带念珠菌 ROS 的产生, 阻止细胞周期 G2/M 期阻滞和降低凋亡。由此可见, 氟康唑可能通过刺激热带念珠菌产生过多 ROS, 并使线粒体膜电位 $\Delta\Psi_m$ 下降, 从而诱导热带念珠菌凋亡。

关键词: 热带念珠菌, 氟康唑, 活性氧, 线粒体膜电位, G2/M 期阻滞, 流式细胞术

Effect of fluconazole on reactive oxygen species and mitochondrial membrane potential of *Candida tropicalis*

QIU Lian-Nv¹ ZHOU Yong-Lie^{1*} HU Qing-Feng¹ ZHU Yong-Ze¹
GUO Wei² LV HUO-Xiang¹

(1. Medicine Central Laboratory of Zhejiang Provincial People's Hospital, Hangzhou, Zhejiang 310014, China)

(2. Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210029, China)

Abstract: To explore fluconazole's effect mechanism, we investigated the changes of viability rate, reactive oxygen species (ROS), mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and cell cycle of *Candida tropicalis* after treatment with fluconazole. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the clinical isolates *Candida tropicalis* to fluconazole were tested by NCCLS M27-A microdilution method. After

基金项目: 浙江省科技厅基金项目(No. 2006C33014); 浙江省医学重点学科建设基金项目(No. 07-010)

*通讯作者: Tel: 86-571-85893266; ✉: Lab_zyl@126.com

收稿日期: 2010-07-15; 接受日期: 2010-10-18

treatment with different concentration of fluconazole, viability rate, the intracellular accumulation of ROS, the loss of mitochondrial membrane potential $\Delta\Psi_m$ and cell cycle of *Candida tropicalis* were detected with flow cytometry, respectively. After treatment with fluconazole, there were no significant variation among viability rate, ROS, mitochondrial membrane potential $\Delta\Psi_m$ and cell cycle in fluconazole-resistant strains, but a decrease of mitochondrial membrane potential $\Delta\Psi_m$ and viability rate, an increase of ROS accumulation were detected in a time-dose-dependent manner in fluconazole-susceptible strains. A majority of *Candida tropicalis* were arrested in G2/M phase and apoptosis peak was seen. Free radicals scavenger glutathione inhibited ROS production, prevented G2/M arrest and decreased apoptosis in fluconazole-susceptible strains. According to it, fluconazole maybe induce intracellular accumulation of ROS and decrease of mitochondrial membrane potential $\Delta\Psi_m$, which could result in apoptosis of *Candida tropicalis*.

Keywords: *Candida tropicalis*, Fluconazole, Reactive oxygen species, Mitochondrial membrane potential, G2/M arrest, Flow cytometry

近年来随着广谱抗生素、免疫抑制剂和细胞毒药物的广泛使用以及介入治疗、恶性肿瘤和器官移植的增加,深部真菌尤其是念珠菌的感染率迅速上升。氟康唑作为抗念珠菌属的常用药,随着临床使用率增高,热带念珠菌对氟康唑的耐药率有增加的趋势。研究发现,真菌的凋亡与哺乳动物的凋亡有着许多相似之处,真菌的凋亡过程中线粒体也发生一系列的生理变化^[1]。线粒体是细胞内活性氧(ROS)产生的主要场所,又是 ROS 作用的重要靶部位,正常情况下 ROS 生成速度受线粒体膜电位 $\Delta\Psi_m$ 的控制。线粒体产生的 ROS 对细胞的信号调节起着重要作用,尤其在诱导细胞凋亡机制中,ROS 分子的作用越来越受到重视^[2]。国内从细胞凋亡角度探讨氟康唑对热带念珠菌作用机制较少,为此,本实验利用 FCM 检测氟康唑作用后热带念珠菌 ROS、线粒体膜电位 $\Delta\Psi_m$ 和细胞周期的变化,探讨氟康唑的作用机制。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株:白色假丝酵母菌标准菌株 ATCC90029、近平滑念珠菌标准菌株 ATCC22019 获赠于梅里埃公司;16 株热带念珠菌,为本院临床分离的热带念珠菌。

1.1.2 材料:RPMI1640 培养基由 RPMI1640 粉(含谷氨酰胺,不含碳酸氢钠, Gibco 公司), MOPS 缓冲

液粉(Amresco 公司)加双蒸水配制而成,调 pH 至 7.0,于 4 °C 贮存备用。氟康唑原粉(批号:100314-200503)购自中国药品生物制品检定所。谷胱甘肽、碘化丙啶(PI)和二氢罗丹明(DHR)购自美国 Sigma 生物制品公司;碘化四氯代四乙基苯咪唑羰花青(JC-1)为 BioTeam 产品;DNA-Prep 试剂盒购自美国 Coulter 公司。流式细胞仪为美国 Beckman Coulter 公司 EPICS-XL 型流式细胞仪。

1.2 方 法

1.2.1 最低抑菌浓度(MIC)测定:参照 NCCLS 的 M27-A 方案,采用微量稀释法测定氟康唑对临床分离热带念珠菌的最低抑菌浓度(MIC)。菌液先调整到 0.5 个麦氏浓度,1 000 倍稀释,最终浓度为 $1-5 \times 10^3$ CFU/mL。35 °C 培养 48 h,490 nm 波长在酶标仪比浊,以空白对照调零。MIC 判断终点为生长对照吸光度 50%的最低药物浓度。

1.2.2 菌株分离培养和实验分组:所有受试菌株至少应在沙氏培养基(SDA)上转种 2 次,以确保其纯度和生长力,培养温度为 35 °C。取大的无菌管,加入 3 mL 无菌生理盐水,挑取生长 24 h、单个菌落 25 个左右,在管壁上充分涂开加塞后颠倒混匀。利用牛鲍氏计数盘进行计数热带念珠菌数量,菌液以 1.0×10^6 CFU/mL 接种于试管里,以不加氟康唑为空白对照组,以加不同浓度氟康唑(0.25、2、16、128 mg/L)为氟康唑实验组,同时加不同浓度氟康唑和 2.5 mmol/L 谷胱甘肽为氟康唑+谷胱甘肽组。

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

1.2.3 存活率的检测: 各实验组培养 3 h 和 6 h 后, 3 000 r/min 离心 5 min 后弃去上清, 加入 200 μ L 浓度为 50 mg/L 的 PI 染液, 室温下染色 15 min, 加 20 μ L 去氧胆酸钠(25 mmol/L), 5 min 后上 FCM 检测, 计数 10 000 个菌细胞, 计算热带念珠菌存活率。

1.2.4 ROS 水平的检测: DHR 是一种极易被氧化的亲脂性染料, 可自由进出细胞膜, 进入菌体后可被 ROS (主要为超氧化物、过氧化氢和过氧化亚硝基) 氧化成一种具有正电荷、能发出荧光的 Rh123, 并被泵入线粒体内, 从而维系在菌体内。经过一定时间的累积, 即可通过流式细胞仪检出相应的荧光。各实验组培养 3 h 和 6 h 后收集菌体, 用 PBS 洗涤后加 150 μ L DRH (10 μ mol/L), 室温避光孵育 1 h 后收集菌体, PBS 洗涤后用 FCM 检测 Rh123 的平均荧光强度(Mean fluorescence intensity, MFI), 该值即代表 ROS 水平。

1.2.5 细胞周期和 DNA 倍体分析: 各实验组培养 3 h 和 6 h 后收集菌体, PBS 洗涤后加 50 μ L DNA-Prepkit 透膜剂, 轻摇 20 s, 加 500 μ L PI, 室温避光孵育 15 min, FCM 检测 10 000 菌体以上, 并用 Muticycle 软件进行 DNA 倍体及细胞周期分析, 计算亚二倍体峰(subG1)的百分率。

1.2.6 线粒体膜电位 $\Delta\Psi_m$ 的检测: JC-1 是一种阳离子型的亲脂性染料, 其特点是线粒体膜电位低时主要以单体形式存在, 488 nm 激发时最大发射波长为 527 nm, 呈绿色荧光; 膜电位高时形成聚集体, 488 nm 激发时最大发射波长为 590 nm, 呈红色荧光, 流式细胞仪测定红、绿色荧光强度, 以红/绿荧光比值代表细胞线粒体膜电位; 各实验组培养 3 h 和 6 h 后收集菌体, PBS 洗涤后加 150 μ L JC-1 (10 μ mol/L), 室温避光孵育 30 min 收集菌体, PBS 洗涤后用 FCM 检测线粒体膜电位 $\Delta\Psi_m$ 的变化。

1.3 统计学分析

用 SPSS 10.0 软件分析, 测定结果取均值, 各期数值之间比较用独立样本的 *t* 检验, $P < 0.05$ 认为有统计学意义, 并进行相关性分析。

2 结果

2.1 热带念珠菌的 MIC 值

根据 M27-A 方案, 临床分离的 16 株热带念珠菌中有 12 株为氟康唑敏感株, 其 MIC 值均为 0.5 mg/L。其余 4 株为氟康唑耐药株, 其 MIC 均 > 128 mg/L。M27-A 方案微量稀释法测定时, 质控菌株对氟康唑的 MIC 值均在允许范围内。

2.2 氟康唑对热带念珠菌存活率的影响

从图 1 中可见, 不同浓度氟康唑作用后, 氟康唑耐药株热带念珠菌基本没死亡, 存活率基本都在 96% 以上, 而热带念珠菌氟康唑敏感株存活率低于空白对照组, 随着氟康唑浓度的增加和培养时间的延长, 存活率逐渐下降, 呈一定的时间剂量效应关系。

2.3 氟康唑对 ROS 水平的影响

从图 2 中可以看出, 不同浓度氟康唑作用后, 氟康唑耐药株 ROS 均没有变化, 而热带念珠菌氟康唑敏感株 ROS 明显高于空白对照组, 随着氟康唑浓度的增加和培养时间的延长, ROS 逐渐增高, 呈一定的时间剂量效应关系。由图 3 可见, 氧自由基清除剂谷胱甘肽预处理后, 显著抑制氟康唑敏感株 8–128 mg/L 氟康唑诱导 6 h 产生的 ROS, 证实氟康唑能引起氟康唑敏感株氧化应激诱导效应。

2.4 氟康唑对细胞周期和倍体的影响

从表 1 和图 4 可以看出, 不同浓度氟康唑作用后, 热带念珠菌氟康唑耐药株细胞周期比例均没有明显变化, 而 8 mg/L 氟康唑作用 3 h 后热带念珠菌氟康唑敏感株细胞周期进程明显受影响, G0/1 期减少, G2/M 期增多; 随着氟康唑浓度的增加和培养时间的延长, 细胞周期 G2/M 逐渐增高, 呈一定的时间剂量效应关系; 8 mg/L 氟康唑作用 6 h 开始出现 subG1 凋亡峰, 128 mg/L 氟康唑凋亡明显增多。可见, 氟康唑作用后能引起 G2/M 期阻滞, 诱导热带念珠菌氟康唑敏感株的凋亡。

由表 2 可见, 2–128 mg/L 氟康唑+谷胱甘肽组作用 6 h, 氟康唑敏感株细胞周期 G2/M 期比例明显低于单氟康唑组, 凋亡比例也随着降低, 这提示氟康唑诱导热带念珠菌氟康唑敏感株 ROS 的过量产生可能是导致 G2/M 期阻滞及凋亡的重要原因。

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

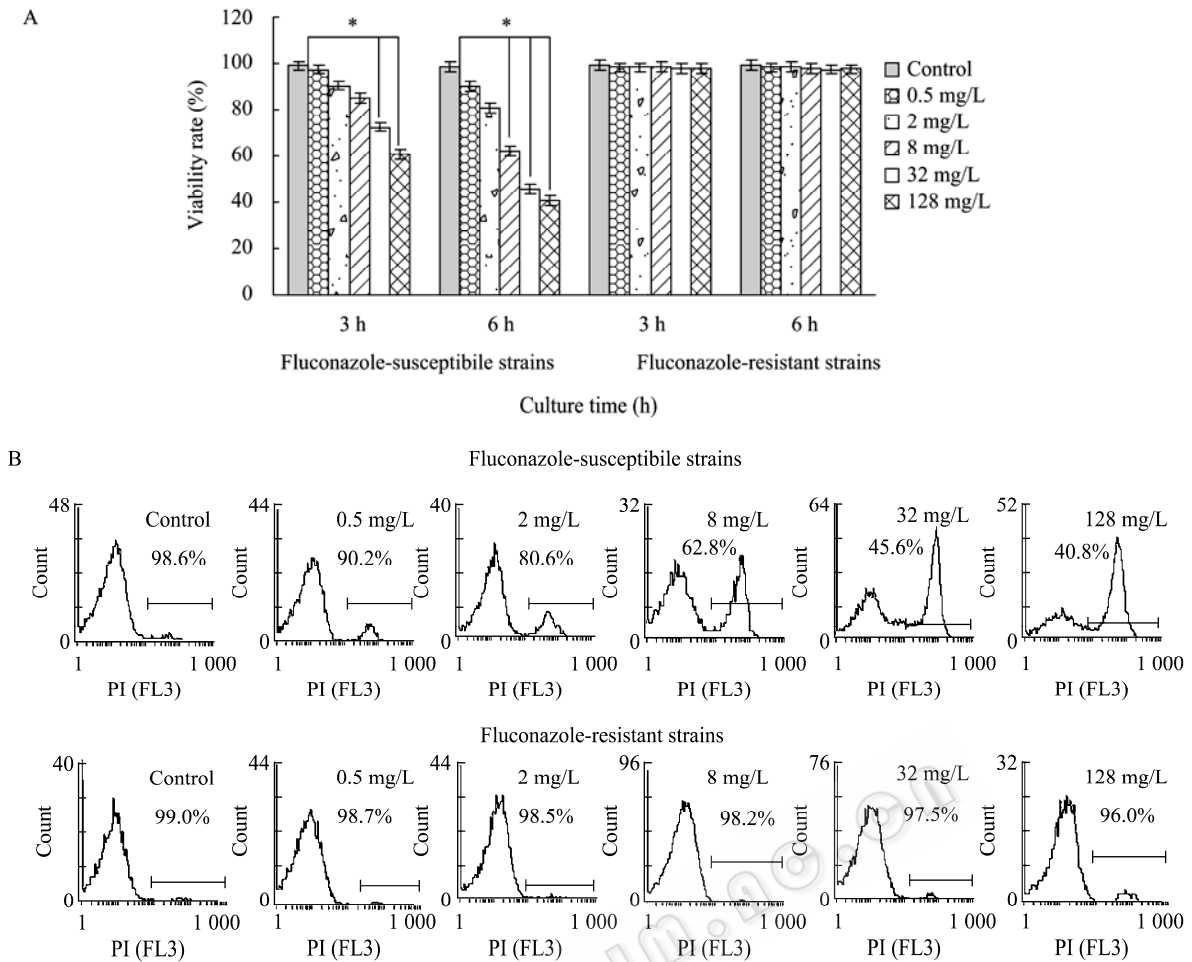


图 1 氟康唑对氟康唑敏感株和氟康唑耐药株存活率的影响

Fig. 1 The effect of fluconazole on viability rate of fluconazole-susceptible strains and fluconazole-resistant strains

Note: A: The variation of viability rate of fluconazole-susceptible strains and fluconazole-resistant strains after treatment with fluconazole for 3 h, 6 h (*: Compared with control, $P < 0.05$); B: Histogram of viability rate of fluconazole-susceptible strains and fluconazole-resistant strains after treatment with fluconazole for 6 h.

表 1 氟康唑对氟康唑敏感株和氟康唑耐药株的细胞周期和 SubG1 的影响(%, $x \pm s$)

Table 1 The effect of fluconazole on cell cycle and SubG1 peak of fluconazole-susceptible strains and fluconazole-resistant strains (%, $x \pm s$)

	氟康唑敏感株 Fluconazole-susceptible strains					氟康唑耐药株 Fluconazole-resistant strains			
	3 h		6 h			3 h		6 h	
	G01	G2/M	G01	G2/M	subG1	G01	G2/M	G01	G2/M
Control	74.1±3.2	12.0±1.7	73.1±3.2	13.4±2.8		73.3±3.2	12.7±2.1	72.3±3.2	13.7±1.9
0.5 mg/L	69.3±2.9	15.0±2.0	53.3±2.9	24.2±3.2		72.2±3.7	12.8±2.2	72.2±4.1	13.8±2.0
2 mg/L	64.7±5.0 [▲]	19.0±1.9	42.7±5.0 [▲]	35.9±3.2 [▲]		72.9±4.0	12.5±2.8	71.9±3.8	13.9±1.9
8 mg/L	59.4±4.6 [▲]	23.0±2.8 [▲]	38.4±4.6 [▲]	42.9±4.5 [▲]	3.27±1.43	73.2±3.9	12.6±2.4	71.2±3.5	13.6±2.8
32 mg/L	56.4±4.6 [▲]	26.8±2.8 [▲]	32.7±4.2 [▲]	48.8±6.2 [▲]	6.67±2.27	72.9±3.7	12.6±2.4	72.0±3.4	13.8±2.8
128 mg/L	48.0±2.9 [▲]	29.0±2.8 [▲]	30.0±2.9 [▲]	52.8±5.8 [▲]	16.7±3.23	69.9±4.2	12.9±3.5	68.9±2.9	14.7±2.6

Note: [▲]: Compared with control, $P < 0.05$.

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

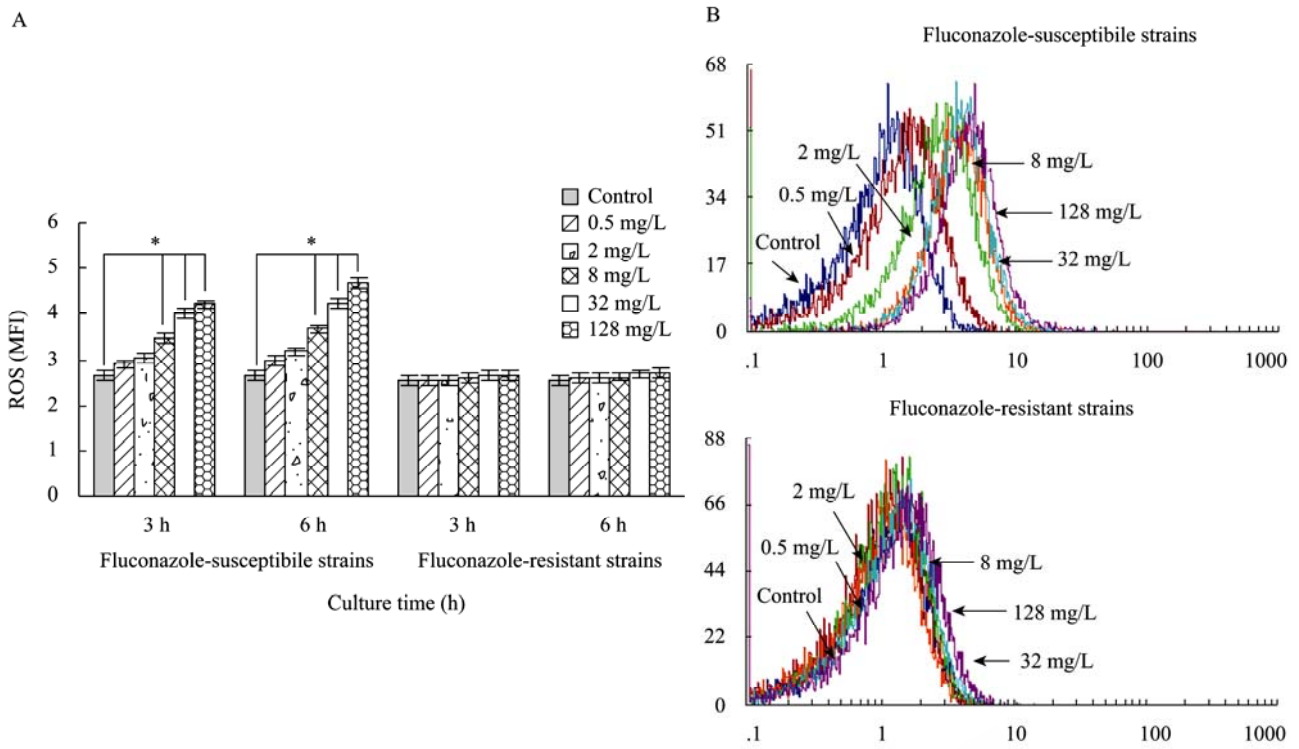


图 2 氟康唑对氟康唑敏感株和氟康唑耐药株 ROS 的影响

Fig. 2 The effect of fluconazole on ROS of fluconazole- susceptible strains and fluconazole-resistant strains

Note: A: The variation of ROS of fluconazole-susceptible strains and fluconazole-resistant strains after treatment with fluconazole for 3 h, 6 h (*: Compared with control, $P < 0.05$); B: The overlap of ROS of fluconazole-susceptible strains and fluconazole-resistant strains after treatment with fluconazole for 6 h (Blue: Control; Red: 0.5 mg/L; Green: 2 mg/L; Orange: 8 mg/L; Sky blue: 32 mg/L; Violet: 128 mg/L).

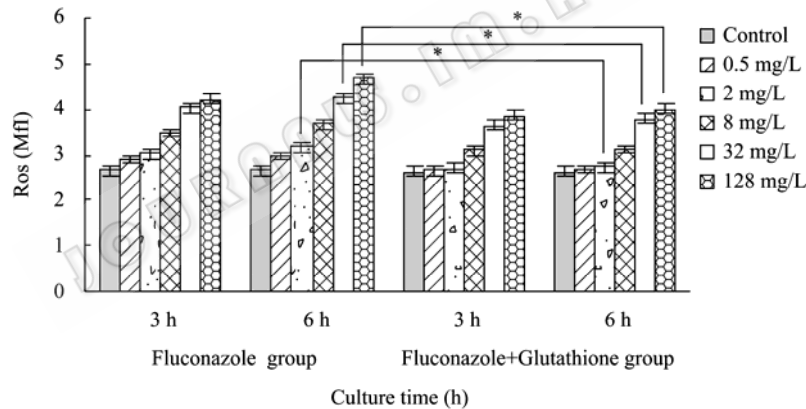


图 3 谷胱甘肽对氟康唑敏感株的 ROS 的影响

Fig. 3 The effect of glutathione on ROS of fluconazole-susceptible strains

Note: *: Compared with the corresponding fluconazole group, $P < 0.05$.

2.5 氟康唑对线粒体膜电位 $\Delta\Psi_m$ 的影响

从图 5 中可以看出, 空白对照组线粒体膜电位为 1.10 ± 0.16 , 氟康唑作用后氟康唑耐药株线粒体膜电位 $\Delta\Psi_m$ 均没有变化, 而 8 mg/L 氟康唑作用 3 h 后热带念珠菌氟康唑敏感株线粒体膜电位 $\Delta\Psi_m$ 出现明显下降, 与空白对照组相比有显著差异, 随着

氟康唑浓度的增加和培养时间的延长, 线粒体膜电位 $\Delta\Psi_m$ 逐渐下降, 呈一定的时间剂量效应关系。相关性分析结果显示, 线粒体膜电位 $\Delta\Psi_m$ 下降与细胞内 ROS 升高成负相关 ($r = -0.913, P < 0.05$)。这表明氟康唑能引起热带念珠菌氟康唑敏感株线粒体膜电位 $\Delta\Psi_m$ 明显去极化, 且与 ROS 氧化应激有一定关系。

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

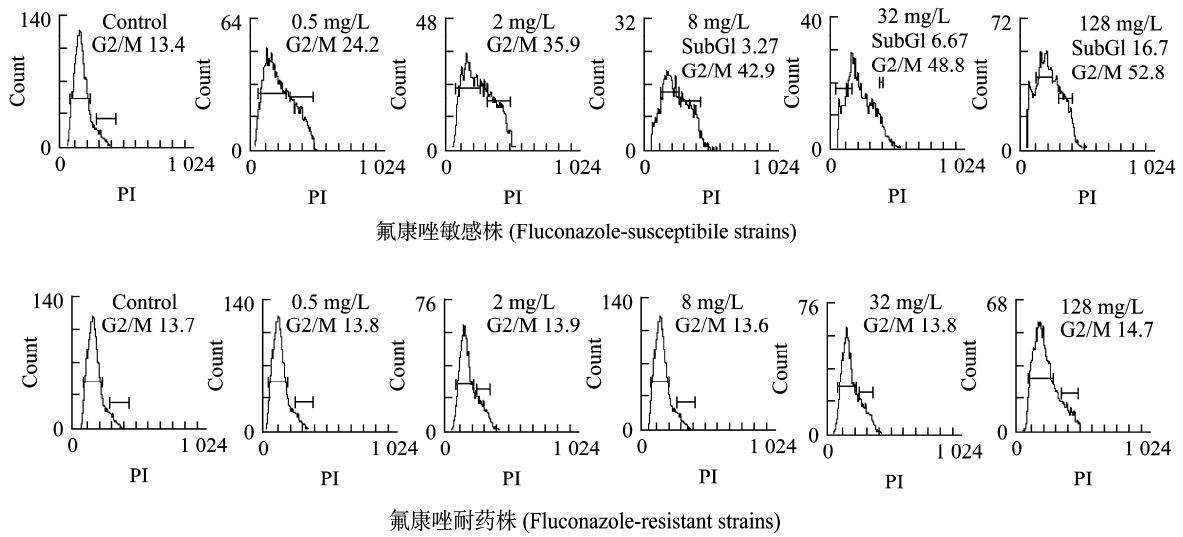


图 4 氟康唑对氟康唑敏感株和氟康唑耐药株细胞周期的影响

Fig. 4 The effect of fluconazole on cell cycle and SubG1 peak of fluconazole-susceptible strains and fluconazole-resistant strains (6 h)

表 2 谷胱甘肽对氟康唑敏感株的细胞周期和 SubG1 的影响
Table 2 The effect of glutathione on cell cycle and SubG1 peak of fluconazole-susceptible strains (% , $x \pm s$)

	氟康唑组 Fluconazole group					氟康唑+谷胱甘肽组 Fluconazole+Glutathione group				
	3 h		6 h			3 h		6 h		
	G01	G2/M	G01	G2/M	subG1	G01	G2/M	G01	G2/M	subG1
Control	74.1±3.2	12.0±1.7	73.1±3.2	13.4±2.8		74.1±3.2	12.0±1.7	73.1±3.2	13.4±2.8	
0.5 mg/L	69.3±2.9	15.0±2.0	53.3±2.9	24.2±3.2		73.5±3.0	12.3±1.8	71.5±3.0	13.7±2.6	
2 mg/L	64.7±5.0	19.0±1.9	42.7±5.0	35.9±3.2		70.7±3.4	13.6±1.7	58.9±3.3	24.7±2.2 [▲]	
8 mg/L	59.4±4.6	23.0±2.8	38.4±4.6	42.9±4.5	3.27±1.43	63.8±4.0	16.8±2.7	49.7±2.6	30.9±2.5 [▲]	2.17±0.53
32 mg/L	56.4±4.6	26.8±2.8	32.7±4.2	48.8±6.2	6.67±2.27	60.4±3.6	20.2±2.8	40.7±2.7	38.2±3.2 [▲]	4.26±1.73
128 mg/L	48.0±2.9	29.0±2.8	30.0±2.9	52.8±5.8	16.7±3.23	54.0±2.7	23.2±2.6	36.0±2.0	40.7±3.5 [▲]	9.23±2.03 [▲]

Note: [▲]: Compared with the corresponding fluconazole group, $P < 0.05$.

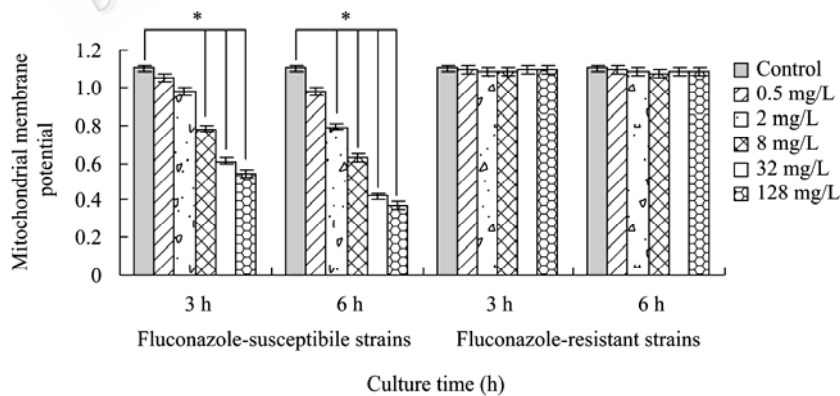


图 5 氟康唑对氟康唑敏感株和氟康唑耐药株线粒体膜电位 $\Delta\Psi_m$ 的影响

Fig. 5 The effect of fluconazole on mitochondrial $\Delta\Psi_m$ of fluconazole-susceptible strains and fluconazole-resistant strains
Note: *: Compared with control, $P < 0.05$.

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

3 讨论

ROS 是真核细胞有氧呼吸过程中形成的, 是一组化学性质活泼的具有含氧基团的化合物, 自由基是最主要的活性氧。自由基过度增加或持续存在大大超过细胞自身的抗氧化防御能力, 可对细胞形成氧化应激, 从而影响细胞的完整性和功能, 导致细胞不可逆的损伤和死亡。谷胱甘肽含有巯基, 由谷氨酸、甘氨酸、半胱氨酸组成的三肽, 它可以保护含巯基的重要蛋白质或酶免受氧化物尤其是过氧化物的损害, 它还是自由基清除剂, 可以清除 O_2 、 H_2O_2 等自由基。本研究发现, 氟康唑作用后, 氟康唑耐药株存活率和 ROS 没有发生明显变化, 而氟康唑敏感株存活率下降, ROS 明显升高。自由基清除剂谷胱甘肽预处理后, 显著抑制了氟康唑诱导的热带念珠菌 ROS 产生, 证实氟康唑对热带念珠菌的氧化应激诱导效应。低浓度氟康唑作用后, ROS 虽在热带念珠菌中产生但积累量不高, 热带念珠菌仍能够承受这种压力, 保持较高的活性, 死菌所占比例只有 5%左右, 随着氟康唑浓度的增加和培养时间的延长, ROS 过量产生使热带念珠菌处于氧化应激状态, 激活细胞凋亡的相关途径^[3-4], 可能是氟康唑热带念珠菌存活率下降的重要机制。

细胞周期 G2/M 检测点是监控细胞进入有丝分裂期的重要关卡。G2/M 期阻滞是对已复制的 DNA 进行检查与修复, 防止损伤的染色体进入子代细胞, 若周期阻滞后损伤仍不能修复, 就会刺激细胞凋亡来终结。Gao 等^[5]研究发现 As_2O_3 诱导 NB4 细胞的 G2/M 期阻滞及凋亡与 ROS 表达水平升高有关, 表明 ROS 可能具有选择性诱导 G2/M 期阻滞及凋亡的作用。Phillips 等^[6]研究也发现两性霉素 B 诱导的白色假丝酵母菌 G2/M 阻滞及凋亡与 ROS 表达水平升高有关。本研究发现氟康唑能引起 G2/M 期阻滞, 诱导热带念珠菌氟康唑敏感株凋亡。氧自由基清除剂谷胱甘肽清除 ROS, 氟康唑敏感株细胞周期 G2/M 期阻滞和凋亡比例降低, 这提示氟康唑诱导热带念珠菌氟康唑敏感株 ROS 的过量产生可能是导致 G2/M 期阻滞及凋亡的重要原因。

正常情况下 ROS 生成速度受线粒体膜电位 $\Delta\Psi_m$ 的控制。在自由基产生过多或抗氧化防御系统作用减弱时, 线粒体内自由基则不能被有效地清除而累积, ROS 可氧化线粒体渗透性转运孔上的相应氧化还原敏感位点, 导致线粒体的氧化性损伤。ROS 除作用于线粒体外, 还能与 Apaf-1、caspase-9 前体、ATP/dATP 形成凋亡小体, 通过级联反应引起细胞凋亡^[2,7]。另一方面, 损伤的线粒体内锰超氧化物歧化酶(Mn-SOD)等清除 ROS 的能力下降而聚积更多的 ROS^[8], 从而影响线粒体膜电位 $\Delta\Psi_m$ 。膜电位的维持是线粒体发挥功能的必要前提。线粒体膜电位 $\Delta\Psi_m$ 的下降被认为是细胞凋亡级联反应过程中最早发生的事件, 线粒体膜电位 $\Delta\Psi_m$ 下降与细胞 ROS 过量产生可激活细胞凋亡相关下游信号通路^[9-10], 从而诱导细胞凋亡。本研究发现, 氟康唑作用后热带念珠菌 ROS 明显升高, 同时线粒体膜电位 $\Delta\Psi_m$ 下降, 两者呈明显负相关性, 提示氟康唑引起热带念珠菌线粒体氧化损伤, 可能与线粒体受到高浓度 ROS 的氧化攻击有关。

由此可见, 氟康唑的刺激可引起热带念珠菌产生过多 ROS 和线粒体膜电位 $\Delta\Psi_m$ 下降, 这些可能是氟康唑诱导热带念珠菌凋亡的重要机制。

参考文献

- [1] Eisenberg T, Büttner S, Kroemer G, et al. The mitochondrial pathway in yeast apoptosis[J]. *Apoptosis*, 2007, 12(5): 1011-1023.
- [2] Van-Houten B, Woshner V, Santos JH. Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress[J]. *DNA Repair (Amst)*, 2006, 5(2): 145-152.
- [3] Li FJ, Kondo T, Zhao QL, et al. A lipophilic free radical initiator, 2,2'-azobis (2,4-dimethylvaleronitrile) (AMVN) enhances caspase-dependent apoptosis induced by hyperthermia[J]. *Int J Hyperthermia*, 2003, 19(2): 165-177.
- [4] Yuki H, Kondo T, Zhao QL, et al. A free radical initiator, 2,2'-azobis (2-aminopropane) dihydrochloride enhances hyperthermia-induced apoptosis in human uterine cervical cancer cell lines[J]. *Free Radic Res*, 2003, 37(6): 631-643.
- [5] Gao F, Yi J, Yuan JQ, et al. The cell cycle related apoptotic susceptibility to arsenic trioxide is associated with

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

- the level of reactive oxygen species[J]. Cell Res, 2004, 14(1): 81-85.
- [6] Phillips AJ, Sudbery I, Ramsdale M. Apoptosis induced by environmental stresses and amphotericin B in *Candida albicans*[J]. PNAS, 2003, 100(24): 14327-14332.
- [7] Wenisch C, Moore CB, Krause R, et al. Antifungal susceptibility testing of fluconazole by flow cytometry correlates with clinical outcome[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2001, 39(7): 2458-2462.
- [8] Rudensky B, Broidie E, Yinnon AM, et al. Rapid flow-cytometric susceptibility testing of *Candida* species[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2005, 55(1): 106-109.
- [9] Curtin JF, Donovan M, Cotter TG. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis[J]. J Immunol Methods, 2002, 265(1/2): 49-72.
- [10] Shirliff ME, Krom BP, Meijering RAM, et al. Farnesol-induced apoptosis in *Candida albicans*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009, 53(6): 2392-2401.

征 稿 简 则

1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的,以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括:工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、病毒学、酶工程、发酵工程、代谢工程等领域的最新研究成果,产业化新技术和新进展,以及微生物学教学研究和改革等。设置的栏目有:研究报告、专论与综述、生物实验室(原技术与方法)、高校教改纵横(原高等院校教学)、名师名课(原名师讲堂)、教学与科研成果展示、显微世界、专题专栏、专家论坛、书讯、会讯等。

2 投稿方式

投稿时请登录我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>, 点击作者投稿区,第一次投稿请先注册,获得用户名和密码,然后依照提示提交稿件,详见主页“投稿、征稿须知”。

作者必须在网站投.doc 格式的电子稿,图与文字编好页码、图号后合成一个文件上传。凡不符合(投稿须知)要求的文稿,本部恕不受理。

3 写作要求

来稿要求论点明确,数据可靠,简明通顺,重点突出。

3.1 篇幅

以 A4 纸 5 号字计算,综述、教学和方法类文章最好在 4 页以内,研究报告 4-7 页(以上均包括图表)。

3.2 图表

文中的图表须清晰简明,文字叙述应避免与图表重复。所有小图的宽度应小于 8 cm (占半栏),大图的宽度应小于 17 cm (通栏)。

3.3 参考文献及脚注

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码,未公开发表的资料请勿引用。我刊的参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出,多于 3 人时列出前 3 人,后加“等”或“et al.”,作者姓前、名后,名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名可以缩写,但必须标准,不加缩写点,非斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

期刊: [1] 刘杰,成子强,史宣玲. SARS 冠状病毒 *nsp14* 基因的克隆和表达[J]. 微生物学通报, 2007, 34(2): 1-3.

[2] Kajiura H, Mori K, Tobimatsu T, et al. Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase[J]. J Biol Chem, 2001, 276(39): 36514-36519.

图书: [3] 钱存柔,黄仪秀. 微生物实验教程[M]. 北京: 北京大学出版社, 2000: 4.

[4] 董志扬,张树政,方宣钧,等. 海藻的生物合成及抗逆机理//华珞等. 核农学进展[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 115-120.

脚注(正文首页下方):

基金项目: 基金项目(No.)

*通讯作者 Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 2011-00-00 ; 接受日期: 2011-00-00

(下转 p.126)

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>