

表达绿色荧光蛋白的布鲁氏菌 16M 和 M5 侵染小鼠巨噬细胞过程的差异分析

马 慧, 苟亚峰, 刘鹏涛, 高剑峰*

(石河子大学 生命科学学院, 中国新疆 石河子 832003)

摘 要: 通过布鲁氏菌(*Brucella*) 16M (强毒株)和 M5 (弱毒株)进入小鼠巨噬细胞后产生的荧光强度, 结合布鲁氏菌胞内生存能力分析二者侵染小鼠巨噬细胞过程的差异, 为布鲁氏菌在细胞内的生存繁殖及其分子机制研究提供理论依据。将绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)布鲁氏菌 16M (强毒株)和 M5 (弱毒株)分不同时间段侵染小鼠巨噬细胞(感染复数为 100:1), 通过胞内生存实验、激光共聚焦显微镜和流式细胞仪观察和检测布鲁氏菌侵入 RAW 264.7 过程的差异。结果表明, 布鲁氏菌 16M 和 M5 和 GFP 的 16M 和 M5 侵染 RAW264.7 的能力不受影响, 通过流式细胞仪可以鉴别 GFP 布鲁氏菌, 但是不能确定细菌的存活状态。结合布鲁氏菌 16M 和 M5 胞内生存能力分析发现 GFP⁺细胞的增加与活菌培养计数法(colony forming unit, CFU)数量的减少存在一一对应的关系, 并且在侵染初期(5~25 min) 16M 与 M5 的荧光强度并没有显著差异。结果提示, 布鲁氏菌 16M 和 M5 在侵染进入宿主细胞的初期即侵袭能力并没有明显差异, 认为造成毒力差异的主要原因是两者的繁殖能力。

关键词: 布鲁氏菌; 绿色荧光蛋白(GFP); 小鼠巨噬细胞; 激光共聚焦显微镜; 流式细胞仪

中图分类号: Q38

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2014)05-0401-06

Variance Analysis of Macrophages Infected in the Process with Green Fluorescent Protein-expressing *Brucella* 16M and M5

MA Hui, GOU Ya-feng, LIU Peng-tao, GAO Jian-feng*

(College of Life Science, Shihezi University, Shihezi 832003, Xinjiang, China)

Abstract: To explore *Brucella* 16M and M5 into the macrophages in mice after fluorescence intensity produced by the combination of *Brucella* intracellular survival ability to analyze and understand differences in both attack and the ability to reproduce. GFP-labeled 16M (virulent strain) and M5 (weak strain) were divided into different time infect mice macrophage RAW 264.7 (bacteria and cell ratio of 100:1), use of intracellular survival experiment, laser confocal microscope and flow cytometry for observation and detection. The results showed that *Brucella melitensis* 16M and M5 and GFP-labeled *Brucella melitensis* 16M and M5 are not affected into macrophages. By flow cytometry instrument can identify GFP *Brucella* but can not determine the survival of the bacteria. Combined with *Brucella* 16M and the M5 intracellular survival ability analyzed, it was found that GFP⁺ cells increased with the reduction in the number of CFU exists corresponding relationship, and at the beginning of the *Brucella* 16M and M5 there were no significant differences with fluorescence intensity. The results suggested that the *Brucella* 16M and M5 arrive the host cells ability is the same, but have the difference between the virulent strain and the weak strain, mainly with the ability of survival and intracellular replication.

收稿日期: 2014-02-28; 修回日期: 2014-05-05

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2010-CB530200)

作者简介: 马慧(1987-), 女, 新疆乌鲁木齐人, 硕士研究生, 主要从事新疆民族高发病的遗传研究, E-mail: bravemh@126.com; * 通讯作者: 高剑峰(1962-), 男, 新疆石河子人, 石河子大学教授, 博士, 主要从事生物化学与分子生物学研究, E-mail: jianfengg@shzu.edu.cn。

Key words: *Brucella melitensi*; green fluorescent protein (GFP); macrophage; laser fluorescent confocal microscope; flow cytometry

(*Life Science Research*, 2014, 18(5): 401~406)

布鲁氏菌属于革兰氏阴性胞内菌,可以对人类和家畜造成严重的慢性感染。人若患有此病会经常发高烧,精神萎靡,嗜睡,关节炎和脾肿大。在反刍动物中,布鲁氏菌病可导致流产,造成巨大的经济损失。近几年的研究发现布鲁氏菌没有典型的外毒素、Ⅲ型分泌系统等毒力元件,其毒力主要表现在侵袭力和繁殖力。作为胞内寄生菌,它们既能在小鼠巨噬细胞生存,也能在非巨噬细胞(如滋养层细胞,上皮细胞等)中生存,并且可以引起天然宿主网状内皮系统持续性感染^[1]。因此了解布鲁氏菌在细胞内的生存繁殖及其分子机制是理解布鲁氏菌致病性的关键^[2]。布鲁氏菌强毒株 16M 和疫苗株 M5 是两种典型胞内寄生菌,同属布鲁氏菌 I 型标准菌株,进入宿主后,能以不同方式逃避巨噬细胞的杀灭并在细胞内生存、繁殖,还能逃避体液免疫和抗生素的杀灭作用,使巨噬细胞反而成为庇护所,导致临床治疗困难^[3]。但就目前来说,对布鲁氏菌进入宿主胞内和繁殖机制还有很多未知^[4]。因此,通过含有 GFP 的载体 pMC-221 电转进入布鲁氏菌 16M 和 M5,利用 GFP 布鲁氏菌侵染 RAW 264.7 进行流式细胞和胞内生存能力分析,对布鲁氏菌 16M 和 M5 侵染小鼠巨噬细胞过程的侵袭力和繁殖力比较,分析导致两者毒力差异的主要因素。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌种、细胞系和载体

布鲁氏菌标准强毒株 16M 和弱毒株 M5、RAW 264.7 系由新疆石河子大学人畜共患病实验室保存。载体 pMC-221 由美国威斯康星大学 Jerome S. Harms 博士惠赠。

1.1.2 主要试剂和仪器

布鲁氏菌液体和固体培养基均购自美国 BD 公司; DMEM 培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司; 丙三醇、庆大霉素、青霉素、链霉素、过氧化氢均为国产试剂; PCR 仪 (Techne、BIO-RAD、Biometra); UV 凝胶成像系统 (BIO-RAD); 超速离心机 (Eppendorf, centrifuge-5415D); 恒温培养箱 (DNP-9162); 恒温摇床 (ZHUY-2102C), 高速冷冻

离心机 (Sigma, 2-16K); 常温离心机 (Beckman microcentrifuge 16, Thermo PC21); 水浴锅 (DKB-501A); 全自动高压蒸汽灭菌罐; 超低温冰箱; 电泳仪; 超净工作台; 去离子水仪器 (Thermo); 电热恒温培养箱 (DNP-9162 型、EYELA SLI-700); 电转仪 (Eppendorf epurator); 电击杯 (Eppendorf)。

1.2 方法

1.2.1 布鲁氏菌 16M 和 M5 的培养

将布鲁氏菌 16M 和 M5 接种到布鲁氏菌固体培养基上,封口置于 37 °C 培养箱倒置培养 3~5 d。挑取单菌落置于 20 mL 布鲁氏菌液体培养基中,置于 37 °C, 180 r/min 摇床振荡培养 3~4 d。

1.2.2 布鲁氏菌 16M 和 M5 电转化感受态细胞的制备

挑取布鲁氏菌 16M 和 M5 单菌落,分别至 20 mL 布鲁氏菌液体培养基中, 180 r/min、37 °C 振荡培养 24 h; 转接 50 μL 菌液至 100 mL 布鲁氏菌液体培养基,培养 16~18 h,取 94 μL 的菌液至无菌 EP 管中,取出布鲁氏菌 16M 和 M5 的菌液冰上放置 30 min,期间摇动几次,保证冷却均匀; 4 °C 8 000 r/min 离心 5 min, 收菌; 用 20 mL 预冷的去离子水重悬浮菌体, 4 °C 8 000 r/min 离心 5 min, 倒掉上清; 重复上一步 3 次; 加入预冷的 15 % 甘油,加入的量为浓缩 60~80 倍; 重悬浮体,分装,每管 100 μL,置于 -80 °C 保存。

1.2.3 电击转化

取 pMC-221 质粒^[4] (图 1) 9 μL 加入布鲁氏菌感受态细胞中,吹打混匀,冰上静置 15 min,转移至 1 mm 电击杯中,电击参数为 1.8 kV/mm, 4.5 ms, 1 次脉冲。电击完成后立即加入 37 °C 预热的 900 μL 的布鲁氏菌液体培养基,吹打均匀,转移到 1.5 mL EP 管中,封口膜封口,置于 37 °C, 180 r/min 培养 24 h。常温 8 000 r/min 离心 2 min 收菌,重悬浮体,涂布于氯霉素抗性的布鲁氏菌固体培养基上,置于 37 °C 恒温培养箱培养 3~5 d,挑出单菌落。挑取单菌落至含有 1 mL 的布鲁氏菌液体培养基的 EP 管中,置于 37 °C、180 r/min 振荡培养 24 h。取 100 μL 菌液至 1 mL 的 EP 管中 85 °C 金属浴灭活 1 h。菌液 PCR 鉴定阳性克隆菌。

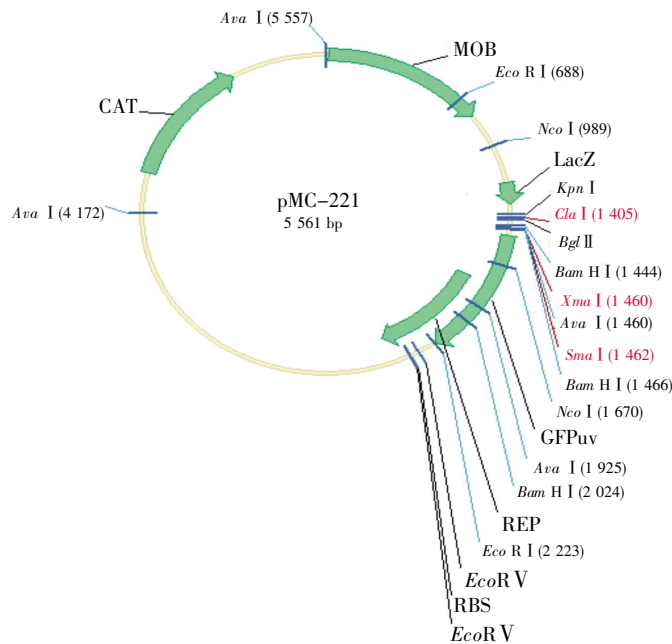


图 1 pMC-221 载体

Fig.1 pMC-221 vector

1.2.4 巨噬细胞系 RAW264.7 培养和细胞计数

无菌条件下将细胞瓶内小鼠巨噬细胞经 2.5%胰酶消化后,转移至 6 孔板中,孔内细胞培养液加至 4 mL,放入细胞培养箱,5% CO₂、37 °C,24 h 半量换液,培养 2 d,备用。取六孔板中 1 孔,用 300 μL 2.5%胰酶消化 2 min,加 1 mL 培养液,用吸管吹打至完全脱落,收集至 1.5 mL 离心管,2 000 r/min 离心 2 min,弃上清,加入 1 mL PBS,取 10 μL 至另一含 90 μL PBS 的 1.5 mL 离心管,稀释混匀,取 10 μL 悬液滴在计数板上,细胞计数。

1.2.5 布鲁氏菌 16M 和 M5 侵染小鼠巨噬细胞和菌液计数

取 1 μL 经计数的菌液于 50 mL 离心管中,3 min 12 000 r/min, PBS 洗 3 次,然后加 19 mL 无双抗、含 10%胎牛血清的新鲜细胞培养液,重悬。按照布鲁氏菌与 RAW 264.7 的比例为 100:1,麦氏比浊至所需浓度,稀释至 1 mL 重悬细菌液。弃去六孔板中旧完全培养基,加入重悬细菌液,放入细胞培养箱,5% CO₂、37 °C 条件下分别培养 5、10、20、30 min、1、1.5、2、2.5、6、12、24、48 h 取出六孔板, PBS 洗 3 遍,加入 2 mL 含 2%双抗、10%胎牛血清的新鲜细胞培养液,备用。

1.2.6 布鲁氏菌 16M 和 M5 的胞内存活实验

RAW 264.7 传代至六孔板,分别编为 16M 组、M5 组、GFP-16M 组、GFP-M5 组。培养至铺满六孔板底部,细胞计数。将布鲁氏菌 16M 和 M5

接种到 20 mL 的布鲁氏菌液体培养基中,180 r/min,37 °C 恒温摇床培养至对数期。收菌, PBS 反复重悬浮菌体。依照 1.2.5 步骤计算出的细胞与细菌比例。

将布鲁氏菌加入到六孔板中,置于 CO₂ 浓度为 5.0, 37 °C 恒温培养箱培养。侵染 1 h 之后六孔板中每孔加入 2.5 μL 庆大霉素作用 45 min。侵染 4、8、12 h 之后的小鼠巨噬细胞用 PBS 清洗 3 次,每次 5 min; 收集细胞接种密度为 1×10¹¹ 个,之后加入 0.2% 细胞裂解液 1 mL,用移液器将 RAW 264.7 完全吹打混匀,释放出胞内菌。然后转移至 1.5 mL 的 EP 管中,冰浴处理 5 min; 然后按照 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 梯度稀释,移液器吹打均匀,然后每个梯度取 100 μL 均匀涂布至无抗性的布鲁氏菌固体培养基上,置于 37 °C 恒温培养箱倒置培养,3~4 d,记录平皿中细菌的数量,每组实验重复 3 次。

1.2.7 布鲁氏菌 16M 和 M5 侵染 RAW 264.7 的激光共聚焦显微镜试验

将 RAW 264.7 传代至六孔板(盖玻片置于每孔中),分别编为 *Brucella* 组和过氧化氢 *Brucella* 组(盖玻片以备置于每孔中)每孔 3 mL,放入细胞培养箱,5% CO₂、37 °C 条件下过夜培养(激光共聚焦显微镜试验中平铺在六孔板的数量最好维持在 (1~10)×10⁵/mL 为最佳,细胞数量较多,平铺在 6 孔板中形成层叠,造成荧光重叠,对荧光观测有一定影响)。次日在六孔板中将已爬好细胞玻片用

PBS 浸洗 3 次, 加入无双抗的培养液, 备用; 取 1 mL 经麦氏比浊法稀释的菌液加入每孔中, 侵染时间分别为 4 h; 侵染完成后在过氧化氢 *Brucella* 组中加入过氧化氢, 取出细胞爬片盖向滴有 70% 甘油的载玻片上, 制片完成放入保湿盒, 用于共聚焦显微镜观测, 每组实验重复 3 次。

1.2.8 羊布鲁氏菌 16M 和 M5 侵染 RAW 264.7 的流式细胞仪试验

将 RAW 264.7 加入六孔板, 放入细胞培养箱, 5% CO₂、37 °C 条件下过夜培养。次日取 1 mL 经麦氏比浊法稀释的菌液加入每孔中, 侵染时间分别为 5、10、15、20、25 min、6、12、24、48 h, 根据侵染时间依次加入 PBS 吹打细胞收集放入 1.5 mL EP 管中, 离心 3 min 12 000 r/min, 去除 PBS 加入 4% 多聚甲醛和庆大霉素 2.5 μL 吹打混匀, 静止 30 min, 在侵染 1 h 后加入 2.5 μL 庆大霉素为了防止残留在胞外的细菌侵染细胞影响实验结果⁹。之

后用于流式细胞仪分析试验, 每组实验重复 3 次。

2 结果

2.1 布鲁氏菌侵染之前 RAW 264.7 和菌量的计数结果

根据细胞计数方法得到细胞 1×10^{11} /mL, 按照细菌与细胞的 MOI 为 100:1 则需要细菌 1×10^8 。利用麦氏比浊管将布鲁氏菌比浊稀释至 1×10^8 /mL。

2.2 布鲁氏菌侵染 RAW 264.7 激光共聚焦显微镜试验结果

按照图 2A 中显示结果来看, 布鲁氏菌侵染进入 RAW 264.7 后产生 GFP 绿色荧光蛋白, 未进入胞内的布鲁氏菌在胞外不产生绿色荧光。图 2B 结果显示来看, 加入过氧化氢的目的是使小鼠巨噬细胞破裂死亡并杀死胞内布鲁氏菌, 但是发现 GFP 没有因为 RAW 264.7 破裂被释放和伴随着布鲁氏菌的死亡而荧光强度受到影响。

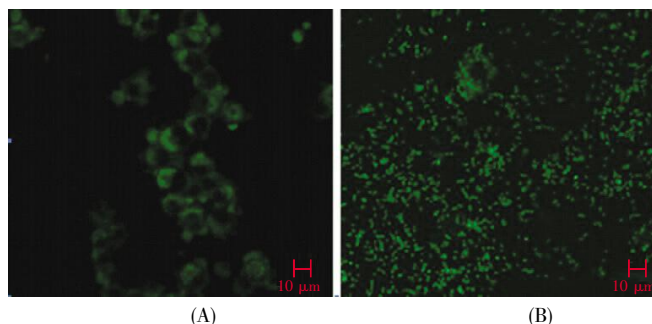


图 2 布鲁氏菌侵染 RAW 264.7 共聚焦显微镜观察图

(A) *Brucella* 组侵染 RAW 264.7 满 4 h 的共聚焦显微镜观察图; (B) 过氧化氢 *Brucella* 组侵染 RAW 264.7 满 4 h 的共聚焦显微镜观察图。

Fig.2 The confocal laser scanning microscope of *Brucella* infection the murine macrophages

(A) The confocal laser scanning microscope of murine macrophages were infected with brucell at 4 hours;

(B) The confocal laser scanning microscope of murine macrophages were infected with brucell+hydrogen peroxide at 4 hours.

2.3 16M 和 M5 侵染小鼠巨噬细胞的胞内生存能力实验结果

布鲁氏菌侵染小鼠巨噬细胞 0~12 h 的胞内菌 CFU 计数, 从图 3A、B 可以看出, GFP 布鲁氏菌 16M 和 M5 对比正常布鲁氏菌 16M 和 M5 在胞内生存能力方面并没有影响。因此, GFP 基因的整合重组并不会影响布鲁氏菌本身的生物特性。

2.4 16M 和 M5 侵染小鼠巨噬细胞 0~48 h 流式细胞仪检测

图 4A 中结果得知含有 GFP 的布鲁氏菌 16M 和 M5 侵染小鼠巨噬细胞 264.7 在 6~24 h 内 GFP⁺细胞百分数增长迅速, 证明是细胞免疫强烈阶段, 24~48 h 增长趋于平缓。图 4B 中我们可以

看出在 0~24 h 之间 CFU 数量减少, 24~48 h 后逐渐增加。图 3A、B 结合分析发现 GFP⁺细胞百分数与 CFU 数量在 0~48 h 之间有一一对应关系, 图 3A 实验结果可以得出流式细胞仪通过 GFP⁺细胞的百分数, 反映含有 GFP 布鲁氏菌 16M 和 M5 进入小鼠巨噬细胞 264.7 的数量, 但不能确定 GFP 布鲁氏菌进入宿主细胞后的存活状态, 但通过胞内菌 CFU 计数, 可以很好地弥补这一点。

2.5 16M 和 M5 侵染初期小鼠巨噬细胞 5~25 min 流式细胞仪检测

图 5 表示细菌侵染细胞的初级阶段, 5 min 时 GFP⁺细胞数量少且可忽略不计, 10 min 时 GFP⁺细胞逐渐增多但布鲁氏菌 16M 和 M5 之间

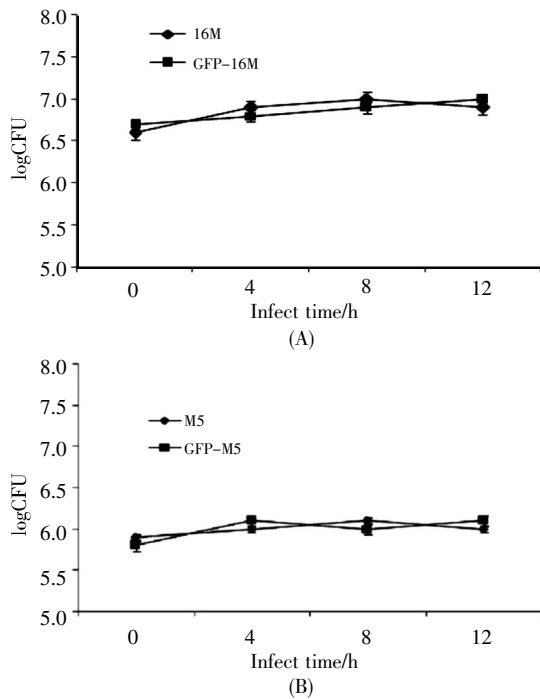


图 3 布鲁氏菌侵染小鼠巨噬细胞的 CFU
(A) 布鲁氏菌 16M 与 GFP-16M 侵染小鼠巨噬细胞 CFU;
(B) 布鲁氏菌 M5 与 GFP-M5 侵染小鼠巨噬细胞平板计数。

Fig.3 *Brucella* infected murine macrophage

(A) The CFU of *Brucella* 16M and GFP-16M infected murine macrophage; (B) The CFU of *Brucella* M5 and GFP-M5 infected murine macrophage.

的差异并不明显, 经统计学检验无显著性差异($P > 0.05$), 得知在侵染初期(5~25 min 之内)布鲁氏菌 16M 和 M5 进入小鼠巨噬细胞的数量大致相同。

3 讨论

布鲁氏菌 16M 和 M5 虽同为 I 型布鲁氏菌, 但至今对其致病机制没有更为深入的研究^[9], 目前, 国内外主要集中在布鲁氏菌毒力因子和宿主因子的筛选及功能研究上^[6, 7], 缺乏对布鲁氏菌 16M 和 M5 侵入、胞内存活、复制等过程的认识和差异比较^[8-11]。因此, 本实验利用流式细胞仪对荧光的高敏感性^[12, 13], 将含有 GFP 的布鲁氏菌 16M 和 M5 划分不同时间段侵染 RAW 264.7 得到的结果进行差异比较, 经研究证实含有 GFP 的布鲁氏菌与不含有 GFP 的布鲁氏菌在侵染细胞和进入宿主细胞后生存及繁殖能力上相同, 因此用含有 GFP 的布鲁氏菌来侵染小鼠巨噬细胞不会干扰实验结果^[14, 15]。从实验结果中我们得知 0~24 h 布鲁氏菌侵染细胞使得 GFP⁺细胞百分数增长迅速, 之后便达到饱和状态, 增长缓慢; 但通过 CFU 计数得知 0~24 h 布鲁氏菌 16M 和 M5 在胞内存活数量下

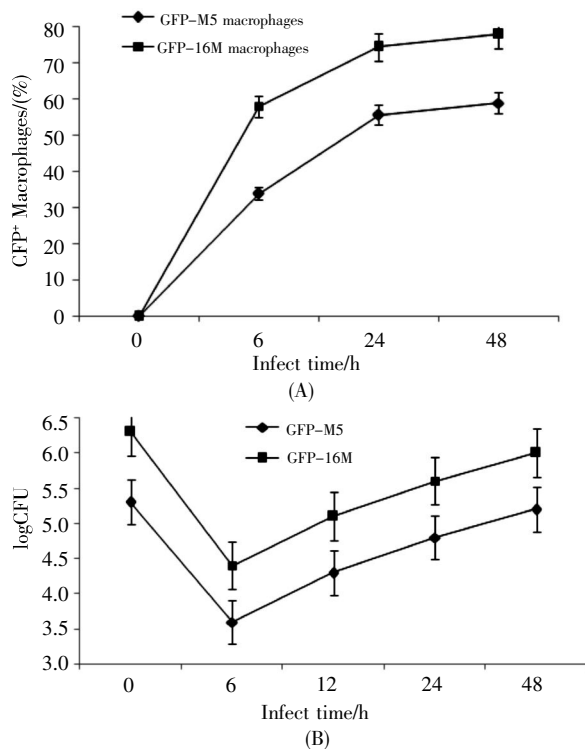


图 4 布鲁氏菌侵染小鼠巨噬细胞的 GFP⁺巨噬细胞测量和 CFU 计数

(A) 通过流式细胞仪检测含有 GFP 的布鲁氏菌 16M 和 M5 侵染 RAW 264.7 后 GFP⁺细胞的百分比含量 p 对比图; (B) 含有 GFP 布鲁氏菌 16M 和 M5 侵染小鼠巨噬细胞 CFU。

Fig.4 *Brucella* infect RAW 264.7 detect GFP⁺ cell and CFU

(A) By flow cytometry instrument to detect GFP-*Brucella* infect RAW 264.7 after the percentage content of GFP⁺ cells; (B) The CFU of GFP-*Brucella* 16M and M5 infected murine macrophage.

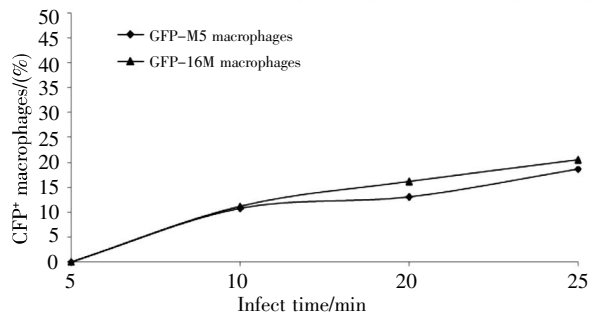


图 5 通过流式细胞仪检测含有 GFP 的布鲁氏菌 16M 和 M5 侵染 RAW 264.7 后 GFP⁺细胞的百分比含量对比图

Fig.5 By flow cytometry instrument to detect GFP-*Brucella* infect RAW 264.7 after the percentage content of GFP⁺ cells

降了 15 倍之多, 说明大部分布鲁氏菌并没有逃脱内吞作用^[16, 17]; 24~48 h 后细菌在胞内繁殖使得数量增加, 但胞内布鲁氏菌 16M 与 M5 的数量差距也在不断增大。之后通过流式细胞仪测定侵染初期 5~25 min 时发现, 布鲁氏菌 16M 和 M5 进入

细胞的数量差距并不明显,反映出布鲁氏菌 16M 与 M5 进入细胞的侵入能力相同但胞内存活和复制的能力 16M 强于 M5,因此认为二者产生差异的原因主要是与胞内存活与复制有关。

参考文献(References):

- [1] ANDERSON T D, CHEVILLE N F. Ultrastructural morphometric analysis of *Brucella abortus*-infected trophoblasts in experimental placentitis[J]. *The American Journal of Pathology*, 2006, 1(24): 226-237.
- [2] BARQUERO C, CHAVES E, WEISS D S, *et al.* *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the on set of infection[J]. *The Public Library of Science*, 2007, 2(7): 1-14.
- [3] CAMPOS M A, ROSINHA G M, AMCIDA C, *et al.* Role of Tol-like receptor 4 in induction of cell-mediated immunity and resistance to *Brucella abortus* infection in mice[J]. *Infect Immun*, 2004, 72(1): 176-186.
- [4] ESKRA L, CANAVESSI A, CAREY M, *et al.* *Brucella abortus* genes identified following constitutive growth and macrophage infection[J]. *Infect Immun* 2001, 69(12): 7736-7742.
- [5] MURPHY E, ROBERTSON G T. Major histocompatibility complex class I and II expression on macrophages containing a virulent strain of *Brucella abortus* measured using green fluorescent protein expressing Brucellae and flow cytometry[J]. *Infect Immun*, 2002, 33(2): 191-200.
- [6] HE Y, REICHOW S, RAMAMOORTHY S, *et al.* *Brucella melitensis* riggers time-dependent modulation of apoptosis and down-regulation of mitochondrion-associated gene expression in mouse macrophages[J]. *Infect Immun*, 2006, 74(9): 5035-5046.
- [7] MARIANNE M, MICHEL S Z, AXEL C. Marine mammal *Brucella* isolates with different genomic characteristics display a differential response when infecting human macrophages in culture[J]. *Microbes and Infection*, 2009, 1(1): 361-366.
- [8] PIZARRO C J, MERESSE S, PARTON R G, *et al.* *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of non professional phagocytes[J]. *Infect Immun*, 1998, 66(13): 571-5724.
- [9] PIZARRO C, MORENO E, SANGUEDOLC E V, *et al.* Virulent *Brucella abortus* prevents lysosome fusion and is distributed within autophagosome-like compartments[J]. *Infect Immun*, 1998, 66(10): 2387-2392.
- [10] DELRUE R M, MARTINEZ M P. Identification of *Brucella* spp. Genes involved in intracellular trafficking[J]. *Cellular Microbiology*, 2001, 3(31): 487-497.
- [11] ANDERSON T D, CHEVILLE N F. Ultrastructural morphometric analysis of *Brucella abortus*-infected trophoblasts in experimental placentitis. Bacterial replication occurs in rough endoplasmic reticulum[J]. *The American Journal of Pathology*, 2006, 1(18): 226-237.
- [12] DETILLEUX P G, DEYOUE B L, CHEVILLE N F. Entry and intracellular localization of *Brucella* spp. in Vero cells: Fluorescence and electron microscopy[J]. *Veterinary Pathology*, 1999, 2(7): 317-328.
- [13] DELVECCHIO V G, KAPATRAL V, REDKAR R J, *et al.* The genome sequence of the facultative intracellular Pathogen *Brucella melitensis*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2002, 99 (1): 443-448.
- [14] JIANG X, BALDWIN C L. Effects of cytokines on intracellular growth of *Brucella abortus*[J]. *Infect Immun*, 1993, 6(1): 124-134.
- [15] JIANG X, LEONARD B, BENSEN R, *et al.* Macrophage control of *Brucella abortus*: role of reactive oxygen intermediates and nitric oxide[J]. *Cellular Immunology*, 1993, 1(51): 309-319.
- [16] FRENCHICK P J, MARKHAM R J, COCHRANE A H. Inhibition of phagosome-lysosome Fusion in macrophages by soluble extracts of virulent *Brucella abortus*[J]. *American Journal of Veterinary Research*, 1985, 4(6): 332-335.
- [17] GORVEL J P, MORENO E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication[J]. *Veterinary Microbiol*, 2002, 90(22): 281-297.

中文核心期刊《生命科学研究》2015 年征稿征订启事

《生命科学研究》是由中华人民共和国新闻出版署、科技部批准创办的,国内外公开发行的反映生命科学领域中最新研究成果的综合性学术期刊。本刊已经进入包括北大《中文核心期刊要目总览》(2011 版)、中国科学引文索引数据库(CSCD)、中国科技论文统计源期刊数据库、中国核心期刊(遴选)数据库、中国期刊网、美国《化学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》等国内外多家重要检索数据库。本刊为双月刊,国内公开刊号为 CN43-1266/Q,国际标准刊号为 ISSN1007-7847, CODEN:SKYAFL。本刊主要刊登国内外生命科学领域中的具有创造性的学术论文及少量反映国内外重大进展或热点问题的快讯或综述性文章,覆盖的主要学科是:生物化学与分子生物学、发育生物学、细胞生物学、生物技术、遗传学、植物学、动物学、微生物学、解剖学、生理学、基因工程、农业工程、病理学、毒理学、药理学、免疫学、基础医学等等。开设“研究进展与综述”、“研究论文”等栏目。本刊诚邀反映国内外生命科学相关领域最新研究成果的中英文论文,国家自然科学基金等国家自然科学基金资助论文将优先发表。

通讯方式:

地 址:长沙市湖南师范大学生命科学学院 1 号楼 105 房《生命科学研究》编辑部,邮编:410081

投稿网址: <http://smkx.hunnu.edu.cn>

E-mail: smkxyj@vip.126.com; life@hunnu.edu.cn

咨询电话:0731-88872616; 传 真:0731-88872616

《生命科学研究》每期定价 18 元,全年 108 元。国内邮发代号:42-172,国外发行代号:DK43008。

《生命科学研究》承诺“特快通道”稿件审理周期不超过 30 天,修回后 2 个月内出版;研究性论文修回后 6 个月内出版。热诚欢迎国内外各大专院校、科研院所生命科学相关领域的研究人员投稿!

欢迎投稿! 欢迎订阅! 欢迎发布广告!