

丙氨酰谷氨酰胺对体外培养人类黏膜成纤维细胞生物活性的影响研究*

车珂科¹, 刘鑫^{2△}, 卿尚兰², 张熙承²

(重庆市人民医院:1. 药学部;2. 口腔科 400014)

[摘要] **目的** 研究丙氨酰谷氨酰胺(Ala-Gln)溶液对体外培养的人类黏膜成纤维细胞的生长、蛋白合成和碱性磷酸酶(ALP)活性的影响。**方法** 实验分为对照组(N组)、Ala-Gln组(A组)和Gln组(G组),A、G组各设推荐浓度的8、4、2、1、1/2、1/4和1/8倍7个梯度浓度,在体外培养的人类黏膜成纤维细胞中分别加入上述各组溶液。培养至12、24、36、48、60和72h,用流式细胞仪计数细胞并绘制细胞生长曲线;用酶联免疫检测对应时段各自ALP水平,72h时检测各组细胞蛋白水平。**结果** N组在72h内细胞数量并未明显变化,ALP水平随着时间推移有所增加,但变化幅度小于A、G组($P < 0.05$);A、G组在24h以内都能明显促进细胞生长,ALP的水平也明显提高($P < 0.05$),且以1/2倍推荐浓度组最为显著;各药物浓度组细胞蛋白水平均高于N组($P < 0.05$)。**结论** Ala-Gln能促进颊黏膜成纤维细胞生长,浓度过高或过低可影响细胞持续生长,以1/2倍推荐浓度(即Ala-Gln浓度为16.5 mg/mL)时细胞生长情况最好。

[关键词] 口腔黏膜;成纤维细胞;碱性磷酸酶;丙氨酰谷氨酰胺;细胞生长

[中图分类号] R963

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)22-3028-03

The influence of alanyl-glutamine on the bioactivity of human buccal fibroblasts in vitro*

Che Keke¹, Liu Xin^{2△}, Qing Shanglan², Zhang Xicheng²

(1. Department of Pharmacy; 2. Department of Stomatology, People's Hospital of Chongqing, Chongqing 400014, China)

[Abstract] **Objective** To study the influence of alanyl-glutamine (Ala-Gln) on the cells growth, protein synthesis, and alkaline phosphatase (ALP) bioactivity of human buccal fibroblasts in vitro. **Methods** The human buccal fibroblasts in vitro were divided into the control group (group N), Ala-Gln group (group A) and Gln group (group G). Group A and G set up 7 gradient concentrations (8, 4, 2, 1, 1/2, 1/4, 1/8 times recommended concentration) respectively, then cultured for 12, 24, 36, 48, 60 and 72 h. Flow cytometry was used to count cells, and drew cell growth curve as well. In addition, the ALP concentration in the corresponding period was detected by using enzyme-linked immunosorbent assay, the total protein content of the cells was detected after 72 h. **Results** The amount of cells in group N did not change obviously within 72 h, ALP contents increased over time but the changes in group A and G were more significant ($P < 0.05$). The cell growths in group A, G were obviously accelerated within 24 h, and the content of ALP also increased significantly ($P < 0.05$). The change of 1/2 times recommended concentration group was significantly better than that of other concentration groups. The cell protein contents of each drug concentration group were higher than group N ($P < 0.05$). **Conclusion** Ala-Gln can accelerate the growth of buccal fibroblasts. However, when the concentration is too high or too low, the sustaining growth of cells is depressed. The 1/2 times recommended concentration of Ala-Gln (16.5 mg/mL) is more reasonable.

[Key words] mouth mucosa; fibroblasts; alkaline phosphatase; alanyl-glutamine; cell growth

口腔复发性阿弗他溃疡(recurrent aphthous ulcer, RAU)是最常见的口腔黏膜病,是以口腔黏膜自发性、复发性溃疡为特点的一种疾病,普通人群的发病率为20%左右;RAU的局部治疗目前以消炎、止痛、防止继发感染、促进愈合为原则^[1]。谷氨酰胺(Glutamine, Gln)是免疫细胞及成纤维细胞等快速增殖细胞的主要能量来源^[2],除了具有增加葡萄糖胺、氨基己糖、黏蛋白的生物合成和促进溃疡组织再生等生物活性外,还具有有效调节免疫应答、改善机体代谢状况、提高机体抗氧化能力等药理作用^[3-4]。由于Gln在水溶液中溶解度低且不稳定^[5],目前临床使用具有化学稳定性好、水溶性强、能耐受高温消毒等优点的丙氨酰谷氨酰胺(Ala-Gln)为Gln的供体,通过在细胞外发生的水解,为机体提供稳定的Gln^[6]。本文就Ala-Gln对体外培养的人类黏膜成纤维细胞(fibroblast)的生长、蛋白合

成和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性进行研究,并与对应含量的Gln进行对比,以期Ala-Gln治疗RAU的临床研究及应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 标本采自重庆市人民医院口腔科在颊黏膜取送活检的组织中的正常组织,均征得患者本人及其家属同意并签署知情同意书。

1.1.2 主要试剂和仪器 Ala-Gln(重庆莱美药业股份有限公司,批号F151210),Gln(武汉千润生物工程有限公司赠送,批号140618),D-Hanks缓冲液(自配,含100 U/mL青霉素,100 μg/mL链霉素);DMEM培养基、RPMI-1640培养液、胰蛋白酶、优等胎牛血清(FBS)和I型胶原酶(美国Gibco公司);二

甲基亚砷 (DMSO, 美国 MPBIO 公司); 四甲基偶氮唑盐 (MTT, 美国 Amresco 公司); 二氧化碳细胞恒温培养箱 (美国 Forma Scientific 公司); CKC-TR-2W 型倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); 酶联免疫检测仪 (芬兰 Labsystems dragon MK3 公司); YJ-875 型超净化工作台 (苏州净化设备厂); 96 孔培养板 (北京中杉金桥生物技术有限公司); 波形丝蛋白、角蛋白一抗及即用型 SABC 试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司); 二喹啉甲酸 (BCA) 蛋白浓度测定试剂盒 (上海美季生物有限公司); 碱性磷酸酶试剂盒 (南京建成生物公司)。

1.2 方法

1.2.1 人类黏膜成纤维细胞的原代培养、分离纯化及鉴定^[7-8] 无菌条件下取出颊黏膜组织, 剔除坏死组织及血渍, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗 3 次, 青霉素、链霉素浸泡 0.5 min, PBS 冲洗 2 次, 剪成约 0.5 mm × 0.5 mm, 加入 0.25% 胰蛋白酶 37 °C 孵箱消化 30 min, 加入 0.2% I 型胶原酶振荡消化 30~60 min, 至组织完全溶解, 用含 10% FBS 的 DMEM 等体积中和, 200 目过滤, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清, 用含 15% FBS 的 DMEM 培养基重悬细胞, 接种至 25 cm² 培养瓶。于 37 °C 5% CO₂ 饱和温度培养箱中培养。48 h 后去除未贴壁细胞。此后每 72 小时换液 1 次, 倒置显微镜下观察细胞形态, 用机械刮出法及酶消化法去除成纤维细胞, 细胞达到 80%~90% 汇合时, 用 0.25% 的胰酶消化, 按 (4~6) × 10³/cm² 传代。取第 3 代对数生长期成纤维细胞, 用 SABC 法进行波形蛋白、角蛋白免疫组织化学染色, 鉴定细胞来源。

1.2.2 实验分组及处理 根据加药情况, 将加入 Ala-Gln 溶液的定为 A 组; 加入 Gln 溶液的定为 G 组; 含 20% FBS 的 RPMI-1640 培养基培养细胞作为对照, 定为 N 组。根据 Ala-Gln 产品使用说明书中的推荐浓度, 结合预实验结果, 将 Ala-Gln 溶液的基础浓度定为 33 mg/mL, 折算 Gln 溶液的基础浓度为 22 mg/mL, 然后按加入溶质的量共设立 8、4、2、1、1/2、1/4 和 1/8 倍 7 个浓度梯度组, 分别用 A8、A4、A2、A1、A1/2、A1/4、A1/8 和 G8、G4、G2、G1、G1/2、G1/4、G1/8 表示。

Gln 溶液的配制方法: 按照上述浓度梯度的设置, 称取 Gln 原料药适量, 溶于灭菌 PBS (pH 7.4) 中, 超声助溶, 配制好的储备液于 0 °C 冰箱中储存。Ala-Gln 溶液的配制方法同 Gln。

1.2.3 细胞生长情况的检测 取第 5 代传代的成纤维细胞,

胰蛋白酶消化贴壁培养的细胞, 终止消化后添加 15% FBS 培养基, 用移液管反复轻轻吹打成单细胞悬浮液, 按 1:3 的接种比例传代培养。将长好的贴壁细胞消化后, 以细胞密度为 0.75 × 10⁶/mL 转入摇瓶进行扩大培养。待细胞形态良好, 以每瓶 100 mL 培养基均匀接入 250 mL 三角瓶中 (接种密度为 1.0 × 10⁶/mL), 按照 1.2.2 项的分组情况加入对应浓度的溶液, 置于 37 °C 培养箱内培养。每隔 12 h 取样, 流式细胞仪计数细胞, 并将本实验重复进行 3 次。

1.2.4 细胞蛋白水平检测 细胞以 1 × 10⁵/mL 的密度接种于 96 孔板, 每孔 1.0 mL。血清饥饿 12 h 后, 各浓度组加入 96 孔板中, 每种浓度加 6 孔; 对照组加含 0.5% FBS 的 DMEM。96 孔板置于 CO₂ 培养箱中培养 72 h 后, 弃去孔内液体, 用 pH 7.4 的 PBS 冲洗 3 次, 吸干, 每孔加入 150 μL 0.5% Triton X-100 裂解过夜后, 取 200 μL 裂解液按蛋白浓度试剂盒说明用酶联免疫检测仪于 450 nm 波长测吸光度值, 根据标准曲线将吸光度值换算成蛋白水平 (μg/mL)。

1.2.5 细胞 ALP 活性检测 取第 5 代颊黏膜成纤维细胞, 以 1 × 10⁵/mL 的细胞浓度接种于 96 孔培养板, 10% DMEM 培养基共培养 4 d, 弃孔内液体, 加入 Triton X-100, 4 °C 过夜, 进行如下实验: 在 12、24、36、48、60 和 72 h 时, 取上述各孔液体及空白对照的蒸馏水一并转入另一个 96 孔板。按 ALP 试剂盒说明依次按比例加入缓冲液、基质液, 水浴, 加入对硝基苯磷酸二钠 (PNPP) 显色剂后在酶联免疫检测仪上于 405 nm 波长下测吸光度值, 间接反映细胞 ALP 活性。根据标准曲线将吸光度值换算成 ALP 水平 (U/mgprot), 并将 ALP 用蛋白水平进行校正。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计学软件进行分析, 多组均数的比较采用单因素方差分析, 两两之间比较用 Tamhane's T2 检验, 以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体外培养的人类黏膜成纤维细胞情况 胞体呈梭型或不规则三角形, 中央有卵圆形核, 胞质向外伸出 2~3 个长短不等的突起, 生长时呈放射状。经 SABC 法染色鉴定培养细胞表现为角蛋白染色阴性, 胞质不着色, 波形丝蛋白染色阳性, 细胞胞质棕黄色着色, 说明细胞来源于中胚层, 为结缔组织源性细胞。见图 1~3。

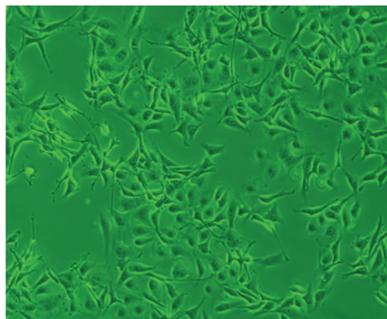


图 1 体外培养的人类黏膜成纤维细胞 (×40)



图 2 成纤维细胞波形丝蛋白染色阳性 (×100)

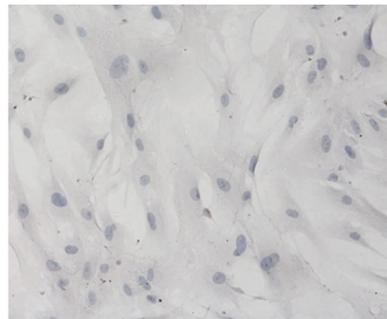


图 3 成纤维细胞角蛋白染色阴性 (×100)

2.2 细胞生长情况 N 组细胞的生长和凋亡处于一种平衡, 细胞数并未明显变化, 在 (1.00~1.01) × 10⁶/mL; 加入两种药物后, 特别是 24 h 以内, 都能明显促进细胞生长 (P < 0.05); 其

中, A8、A4 和 G8、G4 从 24 h 后, 细胞数目未明显变化; 48 h 后, A2 和 G2 细胞数目增长开始逐渐减慢, 而 A1/8 和 G1/8 细胞数目开始下降; 60 h 后, A1 和 G1 细胞数目增长开始逐渐减

慢。在整个 72 h 内, A1/2、A1/4 和 G1/2、G1/4 细胞数目都能保持持续增长的状态, 特别是 A1/2 在 72 h 时达到了 $4.20 \times 10^6/\text{mL}$, 为本项实验数据最大值; 无论是 A 组或者 G 组, 1/4 浓度组的生长曲线低于 1/2 浓度组, 但 A 组和 G 组对应浓度组之间, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 4。

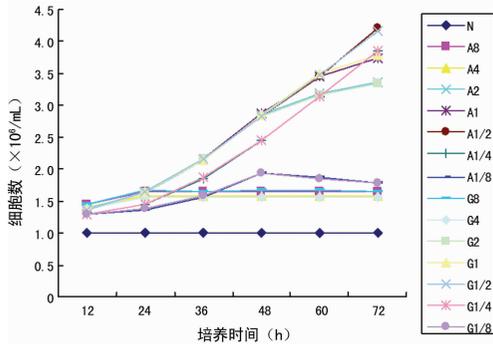


图 4 各组颊黏膜成纤维细胞生长曲线

2.3 细胞蛋白水平 各药物浓度组细胞蛋白水平均高于 N 组 (673.68 mg/mL), A1/2 和 G1/2 细胞蛋白水平为各自组别最高, 分别为 1 407.51、1 393.35 mg/mL, 而 A 组和 G 组同梯度浓度的细胞蛋白水平比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 5。

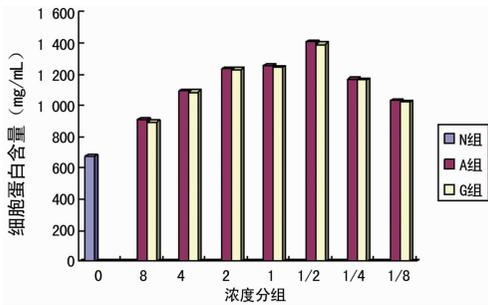


图 5 各组颊黏膜成纤维细胞蛋白水平比较

2.4 细胞 ALP 活性 N 组细胞的 ALP 水平随着时间推移有所增加, 但变化幅度不如 A、G 组明显, 在加入 Ala-Gln 或 Gln 后, 特别是 24 h 内, ALP 的水平显著提高; 其中, A8、A4 和 G8、G4 从 24 h 后, ALP 水平未明显变化; 48 h 后, A2 和 G2 ALP 增长幅度开始逐渐减慢, 而 A1/8 和 G1/8 ALP 水平开始下降, 但仍较 N 组有显著升高; 60 h 后, A1 和 G1 ALP 水平增长开始逐渐减慢。72 h 内 A1/2、A1/4 和 G1/2、G1/4 ALP 水平都能保持持续增长的状态, 特别 A1/2 在 72 h 时达到了 53.48 U/mgprot; 无论是 A 组或 G 组, 1/4 浓度组各时间点 ALP 的水平都低于 1/2 浓度组, 但 A 和 G 组同梯度浓度组之间, ALP 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 6。

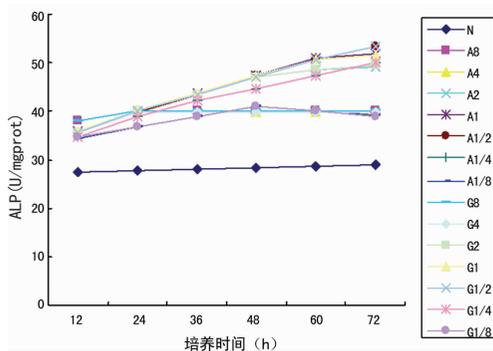


图 6 各组颊黏膜成纤维细胞 ALP 活性比较

3 讨论

RAU 的治疗目前多采用口腔局部用药^[9], 常用的药物包括生长因子、中药制剂、生物制剂、人工合成药物、免疫调节剂、微量元素补充剂等, 但由于病因复杂、药物价格及患者依从性等原因, 其疗效和推广应用都受到了很大的限制^[10]。本研究采用 Ala-Gln, 从促进溃疡愈合和增强黏膜局部免疫力等方面治疗 RAU, 从而克服目前临床上 RAU 治疗方面的不足。这一研究方案和初步研究成果已获得国家发明专利授权(专利号 ZL 2013 1 0375582.7)。

细胞增殖是生物生长、发育、繁殖的基础, 目前常用 MTT 法检测细胞的增殖效应, 但不能较好地反映细胞活性情况; 而流式细胞仪是对细胞进行自动分析和分选的装置, 可以快速测量、存贮、显示悬浮在液体中的分散细胞的一系列重要的生物物理、生物化学方面的特征参量, 并可以根据预选的参量范围把指定的细胞亚群从中分选出来, 经过设定, 可以计数活细胞和检测细胞活力^[11]。蛋白水平的变化可反映细胞功能的活跃程度, 细胞增殖与蛋白合成呈正相关, 活细胞数量增加, 其蛋白水平也应相应增多^[12]。ALP 是参与组织形成、代谢和再生的一种重要物质, 可作为评价细胞分化和成熟的一种指标, 目前已发现 ALP1、ALP2、ALP3、ALP4、ALP5 与 ALP6 6 种同工酶, 而其中 ALP5 来自上皮和成纤维细胞^[13], 测定 ALP 活性可以评价细胞分化情况。因此, 本文确定了细胞总数、蛋白水平、ALP 活性 3 个指标综合考察 Ala-Gln 对人类黏膜成纤维细胞生物活性的影响。

结果显示, A8、A4、G8 和 G4 组, 12 h 内细胞数目和 ALP 水平均明显高于对照组, 但 24 h 后二者几乎较 12 h 时无明显变化, 可能由于氨的生成较多, Gln 的利用受到抑制, Gln 在生成谷氨酸后经过脱氢途径的量减少, 更多地向转氨途径, 与脱氢途径相比, 细胞通过转氨途径产生的氨较少, 对细胞生长产生的抑制作用也较小。这与高氨浓度抑制细胞生长、细胞需要调整能量代谢的速率与生物合成的速率相协调的观点相符; 而在细胞培养过程中, 氨对细胞的生长有明显的抑制作用, 遵循二级抑制模型, 其模型常数 K_a 为 $4.46(\text{mmol/L})^2$ ^[14]。本研究中, A2 和 G2 组在 48 h 后, 以及 A1 和 G1 组在 60 h 后出现细胞生长和分化减缓, 可能与 Gln 分解造成的氨浓度增高有关。A1/2、A1/4、G1/8 和 G1/4 组 72 h 内一直保持较好的生长曲线, 48 h 内细胞的生长和 ALP 水平与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 48 h 后, G1/2 和 G1/4 组的细胞生长和 ALP 水平相对于 A1/2 和 A1/4 组稍偏低, 但其差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 推测原因为 Gln 在水溶液中不稳定, 可能与 Gln 有效成分降低和 Gln 分解造成氨水平增高有一定关联, 也应予以综合考虑。A1/8 和 G1/8 组从一开始就生长缓慢, ALP 水平偏低, 与其他浓度组的差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 60 h 后均停止生长并逐渐下降; 而 A1/2 和 G1/2 组较 A1/4 和 G1/4 组的细胞生长好, ALP 水平也较高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明 Ala-Gln 和 Gln 对细胞生长和分化的影响存在浓度依耐性。

在细胞蛋白水平方面, 无论是 A 组还是 G 组, 在 1/8~1/2 浓度, 其蛋白水平呈浓度依赖性。1/2 浓度组蛋白水平也明显高于 1 倍浓度组, 而 2~8 倍浓度组水平明显降低, 可能是 Gln 代谢和分解产生了高浓度的氨, 对细胞的生长有抑制作用。另外, 实验结果显示 A 组的细胞蛋白水平及(下转第 3033 页)

响。本研究发现,TP 能够通过增加抑制素的转录,拮抗铝对睾丸支持细胞的损伤效应,增加睾丸支持细胞活性。其机制可能是提高 cAMP 活性,抑制一氧化氮合酶的产生,从而拮抗铝对睾丸支持细胞的损伤。

参考文献

- [1] Llobet JM, Colomina MT, Sirvent JJ, et al. Reproductive toxicology of Aluminum in male mice[J]. *Fundam Appl Toxicol*, 1995, 25(1): 45-51.
- [2] 高明, 吴南翔, 宋杨, 等. 原代培养大鼠睾丸支持细胞 PCB153 暴露后超氧化物歧化酶活力和丙二醛含量的时间变化特征[J]. *环境与健康杂志*, 2011, 23(5): 380-382.
- [3] 刘国红, 王翀, 刘宏凯, 等. p, p'-DDE 对大鼠睾丸 Sertoli 细胞雄激素结合蛋白, 转铁蛋白和抑制素 B mRNA 表达的影响[J]. *中华男科学杂志*, 2006, 12(2): 104-107.
- [4] 钟先玖, 吴鑫, 周元陵, 等. 丙烯腈对大鼠睾丸中雄激素结合蛋白和抑制素基因表达的影响[J]. *环境与职业医学*, 2005, 22(5): 414-416.
- [5] 苏式兵, 王汝宽, 李梢, 等. 医学发展趋势和前景分析[J]. *世界科学技术: 中医药现代化*, 2007, 9(1): 112-118.
- [6] 耿文学, 董华进. 茶多酚免疫调节及抗肿瘤的研究进展[J]. *实用癌症杂志*, 2009, 24(3): 315-317.
- [7] 李锐, 杜芳, 乐卫东. 绿茶多酚的神经保护作用[J]. *中国临床神经科学*, 2003, 11(4): 428-431.
- [8] 赵龙坡, 徐铮, 张文, 等. 大鼠睾丸支持细胞的原代培养,

鉴定与抑制素的表达[J]. *华北国防医药*, 2006, 18(4): 232-234.

- [9] 韩晓冬, 龚朕, 屠志刚, 等. 大鼠睾丸支持细胞的原代培养与鉴定[J]. *解剖学报*, 2005, 36(6): 682-684.
- [10] 崔慧慧, 白晓琴, 李莉, 等. 三氯化铝暴露致雄性小鼠生殖细胞的遗传毒性[J]. *环境与健康杂志*, 2009, 26(1): 68-70.
- [11] 徐华雷, 刘萍, 郝丽娜, 等. 铝螯合剂对染铝大鼠睾丸抗氧化系统及必需元素的影响[J]. *环境与健康杂志*, 2009, 26(4): 290-292.
- [12] Gassei K, Schlatt S, Ehmcke J. De novo morphogenesis of seminiferous tubules from dissociated immature rat testicular cells in xenografts[J]. *J Androl*, 2006, 27(4): 611-618.
- [13] Guo CH, Lin CY, Yeh MS, et al. Aluminum-induced suppression of testosterone through nitric oxide production in male mice[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2005, 19(1): 33-40.
- [14] 张军, 张敬, 石红军, 等. 茶多酚对紫外线引起的 DNA 损伤的保护作用[J]. *同济大学学报(医学版)*, 2004, 25(2): 91-92.
- [15] 刘英莉, 张艳淑, 王广增. 茶多酚联合维生素 C、维生素 E 对染尘大鼠肺泡巨噬细胞 DNA 损伤的保护实验研究[J]. *中国职业医学*, 2000, 27(5): 21-22.

(收稿日期: 2016-02-15 修回日期: 2016-04-20)

(上接第 3030 页)

ALP 水平略高于 G 组, 估计与 Ala-Gln 代谢过程中产生的丙氨酸作为另一种氨基酸来源参与细胞生长有关。

综上所述, Ala-Gln 可以提高人类黏膜成纤维细胞的 ALP 和细胞蛋白水平, 促进细胞生长, 提高细胞活性, 当 Ala-Gln 浓度过高或过低可影响细胞持续生长, 以 1/2 倍推荐浓度(即 Ala-Gln 浓度为 16.5 mg/mL)时细胞生长情况最好。

参考文献

- [1] Babae N, Baradaran M, Mohamadi H, et al. Therapeutic effects of Zataria Multiflora essential oil on recurrent oral aphthous lesion[J]. *Dent Res J (Isfahan)*, 2015, 12(5): 456-460.
- [2] Tarakji B, Gazal G, Al-Maweri SA, et al. Guideline for the diagnosis and treatment of recurrent aphthous stomatitis for dental practitioners[J]. *J Int Oral Health*, 2015, 7(5): 74-80.
- [3] 刘寿荣, 黄文豹. 谷氨酰胺对急性肝功能不全大鼠的防治作用[J]. *中国现代应用药学杂志*, 2015, 22(6): 508-510.
- [4] Pradelli L, Povero M, Muscaritoli M, et al. Updated cost-effectiveness analysis of supplemental glutamine for parenteral nutrition of intensive-care patients[J]. *Eur J Clin Nutr*, 2015, 69(5): 546-551.
- [5] Stehle P, Kuhn KS. Glutamine: An obligatory parenteral nutrition substrate in critical care therapy[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 545467.

- [6] Jakopin M. Murabutide revisited; a review of its pleiotropic biological effects[J]. *Curr Med Chem*, 2013, 20(16): 2068-2079.
- [7] 章静波. 组织和细胞培养技术[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 66.
- [8] 王春, 向学熔, 杨鑫, 等. 盐酸小檗碱抑制人类黏膜成纤维细胞炎症反应的初步实验研究[J]. *重庆医学*, 2010, 39(10): 1222-1223.
- [9] 张优琴, 江春霞, 王智巍, 等. 复发性口腔溃疡的临床治疗进展[J]. *中国药房*, 2015, 26(35): 5030-5032.
- [10] Kalaev VN, Artiukhov VG, Nechaeva MS. Micronucleus test of human oral buccal epithelium; problems, progress and prospects[J]. *Tsitol Genet*, 2014, 48(6): 62-80.
- [11] 薛雅蓉, 庄重, 刘智慧. 设计利用现代科学仪器紧跟科学前沿的细胞生物学实验[J]. *实验技术与管理*, 2013, 30(6): 163-166.
- [12] Ivanov KP. Modern medical problems of energy exchange in humans[J]. *Vestn Ross Akad Med Nauk*, 2013, 6(1): 56-59.
- [13] Bishop N. Clinical management of hypophosphatasia[J]. *Clin Cases Miner Bone Metab*, 2015, 12(2): 170-173.
- [14] 黄剑峰, 王佳鸣, 崔磊. 氨对人表皮角质细胞生长和代谢的影响[J]. *中国医药生物技术*, 2007, 2(2): 123-129.

(收稿日期: 2016-02-08 修回日期: 2016-03-15)