

耐有机溶剂脂肪酶基因 *lipI* 的克隆及其在毕赤酵母中的高效表达

王 琰¹, 张志敏^{1*}, 王 军¹, 张 琨¹, 訾 静¹, 万 一^{1*}, 王 燕¹, 张继生², 高建新³

(1. 陕西省微生物研究所, 陕西 西安 710043; 2. 西安新希望产业有限公司, 陕西 西安 710100;
3. 西安市动物疫病预防控制中心, 陕西 西安 710061)

摘要: 为了实现耐有机溶剂脂肪酶基因的真核表达, 参照 GenBank 公布的脂肪酶基因序列设计简并引物, 通过 PCR 扩增出 *G. geotrichum* SXL-107 的全长 1 692 bp、编码 563 个氨基酸的脂肪酶基因 *lipI*, 基因登录号为 JX074060。利用 Signal P 3.0 软件对 *lipI* 基因序列进行分析, 将去除自身信号肽的成熟 *lipI* 基因克隆到诱导型表达载体 pPIC9K 上, 构建胞外重组表达载体 pPIC9K-lipI, 转化毕赤酵母 KM71, 发酵培养 72 h, 发酵上清液中脂肪酶活力达到 70 U/mL, 与野生型脂肪酶产生菌 *Galactomyces geotrichum* SXL-107 相比, 脂肪酶活力提高 7 倍。获得的重组脂肪酶的最适温度 40 °C、pH 值为 6.5, 在 10% 的甲醇溶液中作用 48 h 后仍然保持 60% 以上的酶活力。

关键词: 耐有机溶剂; 脂肪酶基因; 毕赤酵母; 表达

中图分类号: S816.73 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2013)06-0143-06

Cloning and High-level Expression of Methanol-tolerant Lipase Gene *lipI* in *Pichia pastoris*

WANG Yan¹, ZHANG Zhi-min^{1*}, WANG Jun¹, ZHANG Kun¹, ZI Jing¹,
WAN Yi^{1*}, WANG Yan¹, ZHANG Ji-sheng², Gao Jian-xin³

(1. Shaanxi Province Institute of Microbiology, Xi'an 710043, China; 2. Xi'an Xinxiwang Bio-industry Company, Xi'an 710100, China; 3. Xi'an Center for Animal Disease Control and Prevention, Xi'an 710061, China)

Abstract: For the expression of lipase gene in *Pichia pastoris*, the *lipI* gene of *G. geotrichum* SXL-107 was cloned, which was 1 692 nucleotides long and encoded 563 amino acid residues. The mature lipase gene *lipI* without the signal peptide was cloned into inducible expression vector pPIC9K. The extracellular expression vector pPIC9K-lipI was constructed and transformed into *Pichia pastoris* KM71. Cultures of recombinant *P. pastoris* accumulated active enzyme in the supernatant up to 70 U/mL after induction for 72 h, which was 7 folds of lipase activity compared to the wild-type lipase. The optimum temperature and pH value for obtaining recombinant lipase were 40 °C and pH6.5, and the enzyme activity remained more than 60% in 10% methanol solution for 48 h.

Key words: tolerance to organic solvent; lipase gene; *Pichia pastoris*; expression

收稿日期: 2012-12-29

基金项目: 陕西省科学院应用基础研究项目(2011K-14); 中国科学院西部之光人才培养项目(2011DF02)

作者简介: 王 琰(1982-), 女, 河南荥阳人, 助理研究员, 硕士, 主要从事微生物与分子生物学方面的研究。

E-mail: 900smile@163.com

* 通讯作者: 张志敏(1977-), 女, 河南许昌人, 助理研究员, 博士, 主要从事微生物学方面的研究。

E-mail: machexibb@126.com

万 一(1975-), 男, 河北昌黎人, 副研究员, 博士, 主要从事基因工程药物开发方面的研究。

E-mail: wanyi6565@sina.com

脂肪酶(lipase, E C 3. 1. 1. 3), 又称三酰基甘油酯基水解酶, 是生物体内广泛存在的一种酶, 属于 α/β 折叠酶家族。脂肪酶具有多种催化能力, 可以催化三酰甘油酯及其他一些非水溶性酯类的水解、醇解、氨解、酯化、转酯化及酯类的逆向合成反应, 除此之外还表现出其他一些酶的活性, 如卵磷脂、溶血卵磷脂、胆固醇酯酶、酰肼水解酶活性等^[1-2]。脂肪酶不同活性的发挥依赖于反应体系的特点, 如在油水界面促进酯类水解, 而在有机相中可以进行酶促合成和酯交换。脂肪酶反应条件温和, 具有优良的立体选择性, 并且不会造成环境污染, 因此, 在洗涤、油脂改良、食品加工、医药、造纸、生物柴油等诸多领域均有广泛的应用^[3-4]。

近年来, 酶制剂一直是国内外动物营养研究的热点之一。它们在饲料工业中的有效应用使得饲料工业和养殖业安全、高效、环保及可持续发展成为可能。研究发现^[5-6], 微生物脂肪酶可提高断奶仔猪的生产性能, 在幼畜日粮中添加外源性脂肪酶能补充体内内源酶的不足, 减轻断奶应激; 同时, 对内源消化酶的分泌还有一定的促进作用, 有利于畜禽对营养成分的消化分解和吸收利用。因此, 脂肪酶作为酶制剂在饲料行业中有着广泛的应用前景, 但目前国内外还处于起步阶段。

在前期的工作中, 陕西省微生物研究所利用当地的微生物资源, 建立了脂肪酶菌种资源库^[7], 从野生型脂肪酶产生菌中获得了具有甲醇耐受性的 *G. geotrichum* SXL-107 菌, 该菌产生的胞外脂肪酶能够耐受 10% 的甲醇溶液^[8]。本研究主要借助生物信息学, 克隆具有甲醇耐受性的 *G. geotrichum* SXL-107 的脂肪酶基因 *lipI* (GenBank 登录号: JX074060); 并通过构建重组表达载体 pPIC9K-lipI, 成功实现该脂肪酶基因 *lipI* 在毕赤酵母 KM71 中的有效表达, 为该重组脂肪酶的规模化生产及应用奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 *Galactomyces geotrichum* SXL-107, 由陕西省微生物研究所筛选、鉴定并保存; *Escherichia coli* DH5 α 、*Pichia pastoris* KM71 和分泌型表达载体 pPIC9K 由陕西省微生物研究所保存。

1.1.2 主要试剂和仪器 酵母提取物和蛋白胨为 Oxford 公司产品; 丙烯酰胺、N,N-亚甲叉丙烯酰胺和 IPTG 为 Sigma 公司产品; Taq DNA 聚合酶、

各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA 胶回收试剂盒、DNA marker、dNTP Mixture、dATP、pGM-T 试剂盒为 TaKaRa 公司产品; 生物素和 pfu DNA 聚合酶为 Fermentas 公司产品; PCR 仪为 Applied Biosystems 公司产品; 电泳仪为北京六一仪器厂产品; 基因导入仪为宁波新芝生物科技股份有限公司产品。

1.1.3 引物设计及合成 根据已报道的 *Geotrichum* 属脂肪酶基因的保守核苷酸序列设计简并引物 GlipF1 (5' - ATGGTTTCCAAAVCWTTK-TTTTRGC - 3') 和 GlipR1 (5' - TTAACCG-WAGAGAKTAACGTCA GWCTC - 3'), 扩增全长脂肪酶基因 *lipI*; 根据全长 *lipI* 基因序列设计引物 GlipF2 (5' - CTGAATTCCAGGCCCCACGGC-CGTTCT - 3') 和 GlipR2 (5' - CTTGCGGC-CGCTTAACCGTAGAGATTAACGT - 3'), 下划线序列为限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Not* I 识别序列, 扩增不含信号肽序列的成熟 *lipI* 基因。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 脂肪酶基因的扩增 以 GlipF1 和 GlipR1 为引物, 以 *G. geotrichum* SXL-107 基因组 DNA 为模板, 采用高保真 pfu DNA 聚合酶扩增全长脂肪酶基因 *lipI*。PCR 扩增条件为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 53 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min 30 s, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增产物经 DNA 产物纯化试剂盒纯化回收后与 pGM-T 连接, 由上海生工生物工程技术有限公司测序。

1.2.2 毕赤酵母重组表达载体的构建 以经过测序验证含有脂肪酶基因正确阅读框的质粒 pGM-T-lipI 质粒为模板, 以 GlipF2 和 GlipR2 为引物, 扩增不含信号肽序列的成熟脂肪酶基因 *lipI*。反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 共 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。扩增产物用 *EcoR* I、*Not* I 限制性内切酶进行双酶切, 并将其克隆至酵母表达载体 pPIC9K。

1.2.3 电击转化毕赤酵母及阳性转化子的筛选 将重组质粒 pPIC9K-lipI 和 pPIC9K 空质粒用限制性内切酶 *Sal* I 线性化后, 分别电击转化酵母菌株 *P. pastoris* KM71, 转化条件和转化方法参照 Invitrogen 公司毕赤酵母操作手册。用梯度稀释法对多拷贝子进行筛选, 用 BMMY-三丁酸甘油酯平板进行功能验证。对筛选到的阳性转化子用 KOD Fx Neo 酶进行酵母菌落 PCR 验证, 选择最佳转化子。

1.2.4 重组酵母工程菌株的诱导表达 将筛选到的

最佳转化子进行摇瓶培养, BMMY 诱导表达, 每 24 h 收集一次发酵液, 并补加甲醇至终体积分数为 0.5% 以维持诱导。将收集的发酵液, 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min, 上清液即为重组脂肪酶粗酶液。

1.2.5 脂肪酶活力测定 采用 GB/T23536-2009 酸碱滴定法。一个单位的脂肪酶活力定义为: 1 mL 酶液在一定的温度和 pH 条件下, 每分钟水解底物产生 1 μ mol 可滴定的游离脂肪酸所需的酶量。

1.2.6 重组毕赤酵母表达产物分析 采用 TCA (三氯乙酸)-丙酮法浓缩发酵液中的蛋白, SDS-PAGE 法分析不同诱导时间的重组蛋白表达情况, 电泳分析参照分子生物学实验指南进行^[9]。

1.2.7 最适反应温度和热稳定性 用 pH 值 7.5、0.025 mol/L 的磷酸盐缓冲液稀释重组脂肪酶, 在 30~60 °C 范围内测定同一稀释酶液的脂肪酶活性, 确定脂肪酶的最适反应温度, 其中以酶活性最高者设为 100%。将稀释的重组脂肪酶在不同温度中放置 60 min, 测定残余酶活力, 以处理前的酶活力设为 100%。

1.2.8 最适 pH 值和 pH 值稳定性 在最适温度下, 测定重组脂肪酶在 pH 值 4.0~9.0 缓冲液中脂肪酶活力, 寻求最适 pH 值, 以酶活最高者设为 100%。将酶液与不同 pH 值的缓冲液以 1:10 混合, 在 4 °C 放置 24 h, 测定残余酶活力, 以处理前的脂肪酶活力设定为 100%。

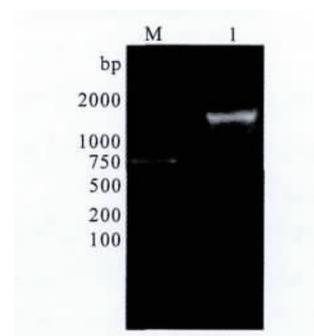
1.2.9 甲醇耐受性 重组脂肪酶在浓度分别为 5%、10%、15%、20%、25%、30% (V/V) 的甲醇中作用 1 h 后, 测定残余酶活力, 以处理前的酶活力为 100%。重组脂肪酶在浓度 10% (V/V) 的甲醇中作用 1、2、4、12、24、48 h 后, 测定残余酶活力, 以处理前的酶活力设定为 100%。

2 结果与分析

2.1 目的基因的扩增

以 *Galactomyces geotrichum* SXL-107 基因组 DNA 为模板, 扩增出约 1 700 bp 的目的片段(图 1)。构建 pGM-T-lipI 重组载体, 测序结果表明, 所克隆的全长脂肪酶 *lipI* 基因 ORF 为 1 692 bp, 编码 563 个氨基酸; 采用信号肽在线预测软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)进行氨基酸序列分析, 其中信号肽序列长 57 bp, 编码 19 个氨基酸, 与 Bertolinimic 等^[10]、阎金勇等^[11]的报道一致。该基因序列已登录至 GenBank(登录号为 JX074060)。与已报道的基因序列进行多重比对发现, *lipI* 与 3 个不同种的 *Galactomyces geotrichum* 菌株(*G. geotrichum* 登录号

DQ313172, *G. fermentans* 登录号 AB000260, *G. candidum* NRRL Y-553 登录号 U02625, *G. candidum* NRRL Y-552 登录号 U02623) 的 *lipI* 同源率为 99%, 与 *G. candidum triacylglycerol* 脂肪酶基因(登录号 X81656)和 *G. geotrichum* strain ch-3 的脂肪酶基因序列的同源性为 87%, 与 *G. geotrichum* CBS772.71 的 *lipI* 基因序列(登录号 X78032)的同源性为 79%。

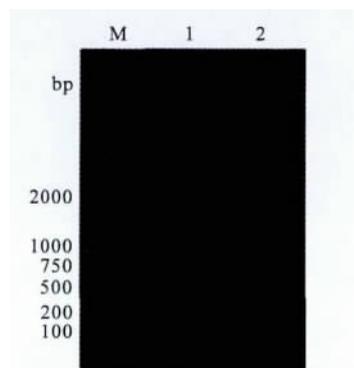


M DNA 标准; 1. *lipI* 基因 PCR 扩增产物

图 1 *lipI* 基因 PCR 产物

2.2 成熟蛋白编码序列的克隆及毕赤酵母重组质粒的构建

将经 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切的成熟脂肪酶基因 *lipI* 和 pPIC9K, 用 T4 DNA 连接酶连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 菌落 PCR 验证获得阳性重组质粒 pPIC9K-lipI, 用 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切阳性重组质粒得到的片段长度与预期结果相符, 见图 2。

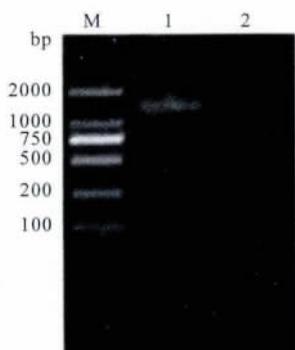


M. DNA 标准; 1. 质粒 pPIC9K-lipI; 2. 酶切质粒

图 2 质粒 pPIC9K-lipI 的酶切鉴定

2.3 重组毕赤酵母的筛选和鉴定

用含 G418 终质量浓度为 0、0.25、0.5、0.75、1 mg/mL 的 YPD 平板进行多拷贝子筛选, 用 BMMY-三丁酸甘油酯平板进行功能验证(图 3)。对筛选到的阳性转化子用 GlipF2 和 GlipR2 引物进行菌落 PCR 验证。重组菌株能扩增得到 1.65 kb 左右的 DNA 片段(图 3), 证明重组表达载体 pPIC9K-lipI 成功整合入酵母基因组 DNA。

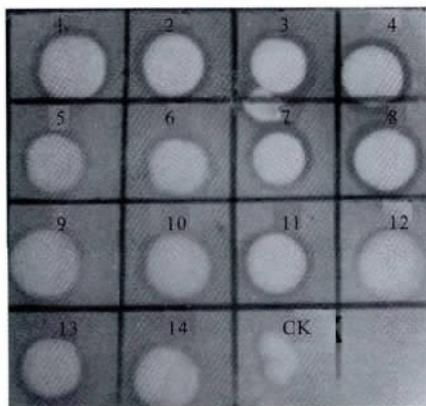


M. DNA 标准; 1. pPIC9K - lipI/KM71PCR; 2. KM71PCR

图 3 pPIC9K - lipI 转入 KM71 的 PCR 结果

2.4 脂肪酶基因 *lipI* 在毕赤酵母中的诱导表达及 SDS - PAGE 分析

为了将重组脂肪酶分泌到培养液中, *lipI* 脂肪酶基因融合到 pPIC9K 载体的 α - factor 信号肽之后。转化到 KM71 感受态细胞中, 涂布 MD 平板, 筛选转化子, 经过 G418 复筛, 获得抗性较强的 1 - 14 号转化子, 在 BMMY - 三丁酸甘油酯平板上点样, 菌落周围可见明显的水解圈(图 4), 选取最佳转化子进行诱导表达, 每 24 h 取样一次并添加甲醇。发酵培养 72 h 时, 脂肪酶 *lipI* 的酶活达到 70 U/mL。SDS - PAGE 分析检测不同时间发酵液上清液中 *lipI* 的表达情况, 获得主条带约为 63 kD 的重组脂肪酶, 与预期蛋白分子量相当(图 5)。



1-14. 阳性转化子; CK. 对照样

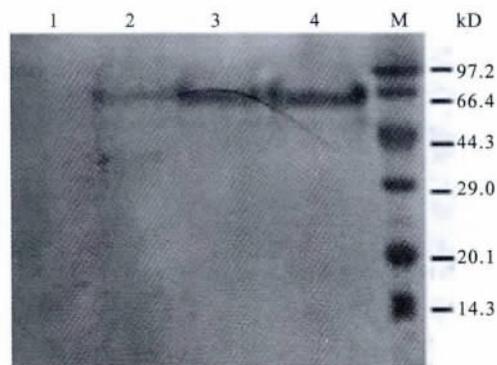
图 4 转化子的水解圈

2.5 最适温度和温度稳定性

对获得的重组脂肪酶在 25 ~ 60 °C 测定其脂肪酶的活力, 由图 6A 可知, 该重组脂肪酶的最适作用温度为 40 °C; 由重组脂肪酶温度稳定性试验结果(图 6B)可知, 该重组酶在 4 ~ 50 °C 具有下作用 60 min, 仍剩余有 80% 以上的脂肪酶活力, 在 50 °C 下作用 60 min, 残余酶活力在 60% 以上。

2.6 最适 pH 值和 pH 值稳定性

由图 6C 可知, 该重组脂肪酶的最适 pH 值为 6.5; 由图 6D 可知, 该重组脂肪酶在 pH 值 6.0 ~ 9.0 缓冲液中作用 24 h 后, 仍能保留 55% 以上脂肪酶活力。



M. 蛋白分子质量标准; 1-4 为培养 0、24、48、72 h 时表达量

图 5 pPIC9K - lipI/KM71 不同时间发酵上清 SDS - PAGE

2.7 重组脂肪酶的甲醇耐受性

由图 6E 可知, 该重组脂肪酶在 20% 的甲醇中作用 1 h 后, 剩余相对酶活性仍保持在 60% 以上, 在 10% 的甲醇下作用 1 h 后, 酶活性保持在 80% 以上, 因此该重组酶对 10% 的甲醇溶液具有一定的耐受性。由图 6F 可知, 重组脂肪酶在 10% 的甲醇溶液中作用 48 h 后, 剩余相对酶活在 60% 以上。

3 讨论

在众多来源的微生物脂肪酶中, 白地霉脂肪酶对长链不饱和脂肪酶具有高度底物特异性, 是目前的研究热点。针对白地霉脂肪酶而言, 无论在手性化合物的合成、选择性水解鱼油富集高营养价值的不饱和脂肪酶、选择性酯化分离功能性共轭亚油酸异构体、酶法合成生物柴油等领域中的应用, 还是作为饲用酶制剂应用于养殖业, 都有着巨大的应用潜力。本研究主要借助生物信息学, 根据已报道的地霉属脂肪酶基因, 进行同源比对, 设计简并引物, 在基因组水平上成功克隆并表达了 *G. geotrichum* SXL - 107 的脂肪酶基因, 避免了文库构建、氨基酸测序等繁琐的工作, 丰富了真菌脂肪酶基因资源, 并为研究脂肪酶催化特性、明确脂肪酶结构与功能之间的关系、阐明脂肪酶诱导表达调控机制等奠定了基础。

本研究选用了 *Pichia pastoris* 表达系统, 该系统具有醇氧化酶 AOX1 基因强启动子, 可严格调控外源蛋白的表达, 作为真核表达系统可对蛋白进行加工、折叠、翻译后修饰等。此外, 该菌营养要求低、生长快、培

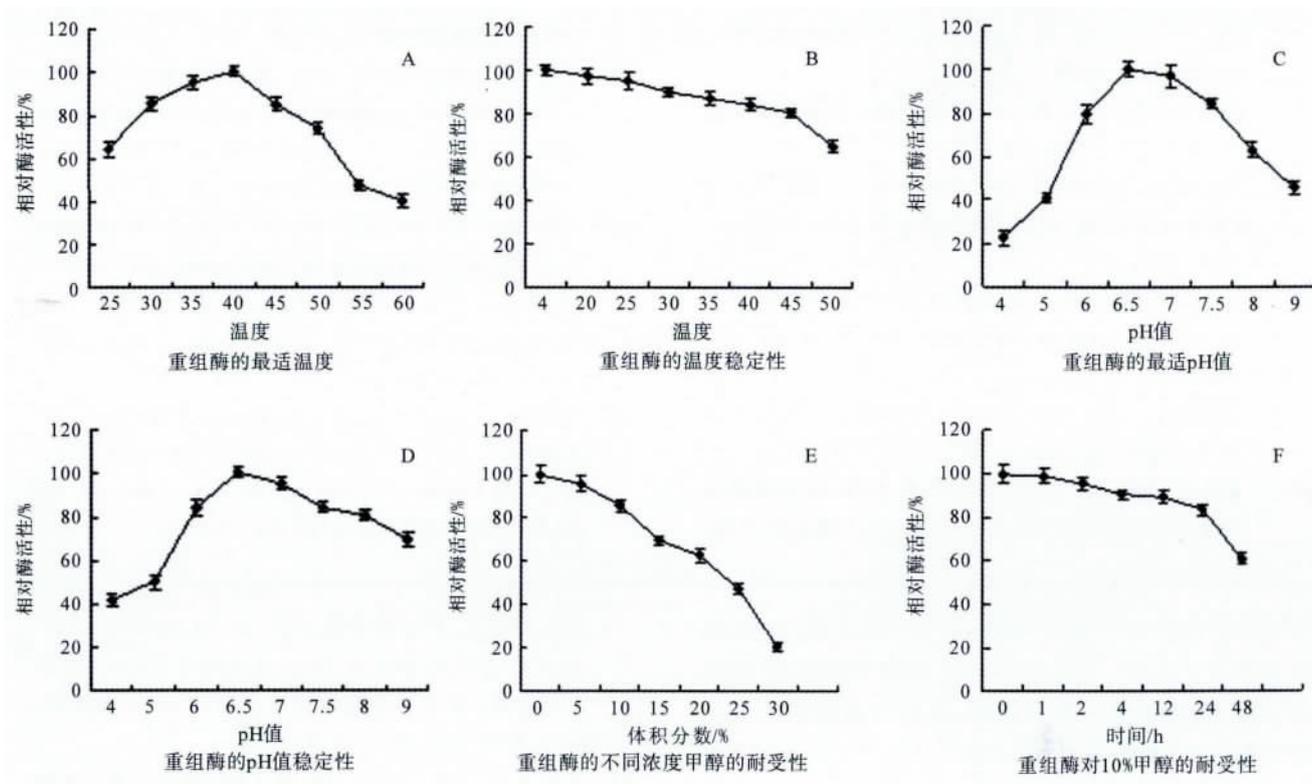


图6 重组脂肪酶的性质

培养基廉价,易进行操作。该系统外源蛋白表达量高、分泌效率强,自身分泌的内源蛋白少,利于外源蛋白的分离纯化;其高密度发酵技术已经成熟,便于进行工业化生产。研究报道^[6],*G. geotrichum* 脂肪酶在 *Pichia pastoris* GS115 的表达量为 55 U/mL; Fernandez 等^[12]、Catoni 等^[13]、Holmquist 等^[14] 在毕赤酵母中实现了 *G. candidum* 重组脂肪酶的表达^[12-14],目前文献报道的重组脂肪酶表达量在 23~57 U/mL。本研究将 *G. geotrichum* SXL-107 *lipI* 脂肪酶在 *Pichia pastoris* KM71 菌中表达,发酵培养 72 h,发酵上清液中脂肪酶活力达到 70 U/mL,该活力在目前的文献报道中处于较高水平。与野生型 *G. geotrichum* SXL-107 脂肪酶产生菌相比,酶活性提高了 7 倍,表明 *Pichia pastoris* 是一种有效的 *G. geotrichum* 脂肪酶表达系统。在后续研究中,我们将进一步优化重组脂肪酶工程菌的发酵条件,进一步提高其酶活力。

针对野生型脂肪酶产生菌 SXL-107 而言,橄榄油是脂肪酶的诱导剂,橄榄油的添加可以诱导胞外脂肪酶的分泌和表达。而对于该菌的重组脂肪酶而言,甲醇为诱导剂,从成本角度分析,本研究构建的工程菌可以降低脂肪酶的生产成本。不同的菌株其所受的诱导和抑制情况各不相同,所以应针对具体的菌株进行试验,以确定最佳培养基配方及发酵

工艺条件。在后续的研究中,一方面要研究重组脂肪酶的酶学性质,另一方面要优化工程的发酵条件,如脂肪酶生产过程中诱导剂的适时适量添加,葡萄糖、油脂等碳源的降解后的阻遏作用或增进作用,碳氮比值对微生物生长和产酶的影响,发酵温度和时间,通风及表面活性剂的作用等发酵工艺条件等,从而提高脂肪酶的活力,降低其生产成本,使其更好地应用于工业化生产。

参考文献:

- [1] Jaeger K E, Eggert T. Lipase for biotechnology[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, 13(4): 390-397.
- [2] Sharma D, Sharma B, Shukla A K. Biotechnological Approach of Microbial Lipase: A review[J]. *Biotechnology*, 2011, 10(1): 23-40.
- [3] Hasan F, Shah A A, Hameed A. Industrial applications of microbial lipases[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 39(2): 235-251.
- [4] 王海燕,李富伟,高秀华. 脂肪酶的研究进展及其在饲料中的应用[J]. *饲料工业*, 2007, 28(6): 14-17.
- [5] 时本利,王剑英,付文友,等. 微生物脂肪酶对断奶仔猪生产性能的影响[J]. *饲料博览*, 2010(3): 1-3.
- [6] Yan J Y, Liu S X, Hu J, et al. Enzymatic enrichment of polyunsaturated fatty acids using novel lipase preparations modified by combination of immobilization and

- fish oil treatment[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(14):7154-7158.
- [7] 王琰, 张志敏, 王斌, 等. 耐酸性脂肪酶产生菌筛选及酶学性质研究[J]. *饲料工业*, 2011, 32(10):29-33.
- [8] 王斌, 宗浩, 张志敏, 等. 耐甲醇脂肪酶产生菌筛选鉴定及酶学性质研究[J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(20):12001-12004.
- [9] Sambrook. *Molecular cloning*[M]. 2nd ed. Beijing: Science & Technology Press, 1996.
- [10] Bertolinimc M C, Laramee L, Thomas D Y, et al. Polymorphism in the lipase genes of *Geotrichum candidum* strains. *Eur J Biochem*. 1994, 219(1/2):119-125.
- [11] 阎金勇, 杨江科, 徐莉, 等. 白地霉 Y162 脂肪酶基因克隆及其在毕赤酵母中的高效表达[J]. *微生物学报*, 48(2), 2008:182-190.
- [12] Fernandez L, Perez V I, Zafra A, et al. High-level expression and characterization of *Geotrichum candidum* (BT107) lipase I in *Pichia pastoris*[J]. *Protein expression and purification*, 2006, 49(2):256-264.
- [13] Catoni E, Schmidt D C, Brocca S, et al. Overexpression of lipase A and B of *Geotrichum candidum* in *Pichia pastoris*: High-level production and some properties of functional expressed lipase B[J]. *Biotechnology Techniques*, 1997, 11(9):689-695.
- [14] Holmquist M, Tessier D C, Cygler M. High-level production of recombinant *Geotrichum candidum* lipase in yeast *Pichia pastoris*[J]. *Protein expression and purification*, 1997, 11(1):35-40.

(上接第 142 页) 循环的蛋白质得以表达, 进而促进细胞进入 S 期, 使得 S 期和 G₂/M 期细胞比例增高, 使细胞重新进入循环过程, 进而改善脾脏的病理学变化, 提高脾脏的免疫功能。

任师颜等^[15]报道, 脾脏可以影响创伤愈合, 但具体原因未做分析。本研究认为地黄多糖通过促进脾脏淋巴细胞有丝分裂, 改善脾脏病理学变化, 提高脾指数, 进而提高创伤小鼠脾脏免疫功能, 促进创面愈合。然而创面愈合是一个极其复杂的过程, 各种细胞因子、细胞种群之间的具体调控机制尚不清楚, 有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 臧亚超, 杨太新, 李先恩, 等. 农杆菌介导的地黄遗传转化体系的优化[J]. *中国农学通报*, 2012, 28(33):218-222.
- [2] 裴广柱, 施书东, 陈允国. 生肌象皮膏制备工艺两次改进[J]. *中国医院药学杂志*, 2001, 21(3):175-176.
- [3] 邓博, 郭彦涛, 杨少锋. 象皮生肌膏治疗外伤性皮肤全层缺损的临床观察[J]. *中医药导报*, 2008, 14(50):62-79.
- [4] 谢成, 简华刚. T 淋巴细胞与创伤愈合[J]. *中国药业*, 2007, 16(21):1-3.
- [5] 施松善, 王顺春. 多糖生物活性研究进展[J]. *生命科学*, 2011, 23(7):662-670.
- [6] 吴旋, 白东清, 杨广, 等. 灵芝多糖对黄颡鱼免疫细胞活性的影响[J]. *华北农学报*, 2011, 26(3):195-198.
- [7] 张红英, 王学兵, 崔保安, 等. 山药多糖对 PRRSV 灭活疫苗免疫猪抗体和 T 细胞亚群的影响[J]. *华北农学报*, 2010, 25(2):236-238.
- [8] 薛俊龙, 张李俊, 王采先, 等. 鸡犬肠杆菌多价复合佐剂灭活疫苗的研制[J]. *山西农业科学*, 2009, 37(11):50-53, 57.
- [9] 邹曜宇, 王月. 黄芪多糖在家禽养殖业中的应用[J]. *现代农业科技*, 2010(12):280, 283.
- [10] 盛荣华, 陈靠山. 多糖对肠道黏膜免疫的影响及其抗肿瘤活性研究进展[J]. *现代农业科技*, 2011(1):16-17.
- [11] 于加平, 常序, 李文渊. 超临界 CO₂ 处理黄花忍冬果后多糖的提取及含量测定[J]. *西南农业学报*, 2010, 23(1):181-183.
- [12] Ariel A, Timor O. Hanging in the balance; endogenous anti-inflammatory mechanisms in tissue repair and fibrosis[J]. *J Pathol*, 2013, 229(2):250-263.
- [13] Mandal A, Poddar MK. Does caffeine reverse the EAC cell-induced immune suppression?[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2007, 59(7):1001-1009.
- [14] 张强, 赵新淮. 黄酮和黄酮醇诱导食管癌细胞周期停滞的分子机制[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2008, 35(9):1031-1038.
- [15] 任师颜, 玉敖川, 马宏敏. 脾脏与创伤愈合的实验研究[J]. *第三军医大学学报*, 1990, 12(4):357-358.