

抗 HMGB1 单抗对小鼠脑缺血—再灌注 损伤后 IL-1 β IL-6 表达的影响

孙 恺¹ 谢 楠² 陶庆霞¹ 王 翀³

(¹潍坊医学院 2013 级研究生, 山东 潍坊 261053; ²徐州市中心医院, 江苏 徐州 221000;

³ 济宁医学院附属济宁市第一人民医院, 山东 济宁 272011)

摘 要 目的 探讨抗高迁移率族蛋白 B1(high mobility group protein box 1, HMGB1)单抗(mAb)对小鼠脑缺血—再灌注损伤后炎症因子 IL-1 β 、IL-6 mRNA 表达的影响。**方法** 采用大脑中动脉阻断术(MCAO)建立小鼠脑缺血—再灌注损伤模型,造模成功后随机分为假手术组(sham 组),脑缺血—再灌注组(I/R 组),抗 HMGB1 单克隆抗体组(mAb 组)和单抗对照组(control IgG 组),mAb 组小鼠经尾静脉注射 30 μ g/g 抗 HMGB1 单抗,control IgG 组尾静脉注射同等剂量小鼠 IgG;ELISA 测定血清 HMGB1 浓度;干湿重法测定脑水肿程度;HE 染色观察病理形态学变化;实时荧光定量 PCR 测定小鼠脑组织 IL-1 β 、IL-6 mRNA 的表达量变化。**结果** 1)ELISA 测得 I/R 小鼠血清 HMGB1 的浓度为(47.75 $\pm$ 3.667)ng/ml,明显高于 sham 组小鼠的 HMGB1 浓度(5.353 $\pm$ 1.489)ng/ml($t=10.71$, $P<0.001$);2)I/R 组、mAb 组脑组织含水量分别为(78.34 $\pm$ 2.836)%、(65.09 $\pm$ 1.934)%,I/R 组显著高于 mAb 组($t=3.86$, $P<0.05$);3)mAb 组脑组织缺血损伤病理学改变明显轻于 I/R 组;4)I/R 组 IL-1 β mRNA 表达量(0.783 $\pm$ 0.028)显著高于 mAb 组(0.417 $\pm$ 0.047) ($t=22.08$, $P<0.01$),mAb 组 IL-6mRNA 表达量(0.655 $\pm$ 0.052)与 I/R 组(0.650 $\pm$ 0.052)相比,无明显差异($t=0.089$, $P>0.05$)。**结论** HMGB1 介导脑缺血—再灌注损伤机制中炎症反应过程,小鼠静脉注射抗 HMGB1 单抗可有效保护受损脑组织。

关键词 脑缺血—再灌注损伤; 炎症因子; 高迁移率族蛋白 B1; 单克隆抗体

中图分类号: R743 文献标识码: A 文章编号: 1000-9760(2015)10-313-05

Effect of anti-HMGB1 monoclonal antibody on the expression of IL-1 β and IL-6 after brain ischemia reperfusion

SUN Kai, XIE Nan, TAO Qingxia, WANG Chong,

(Weifang Medical University, Weifang, 261053, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of anti-HMGB1 monoclonal antibody on the expression of IL-1 β and IL-6 after brain ischemia reperfusion. **Methods** The models were established by an intraluminal suture method to induce brain ischemia reperfusion injury. Animals were randomly divided into sham group, ischemia reperfusion (I/R) group, anti-HMGB1 monoclonal antibody (mAb) group (30 μ g/g), and IgG control group. After that, serum HMGB1 levels were measured by ELISA analysis, Brain edema was investigated by dry-wet method. H&E staining was used to observe pathologic changes, and the expressions of IL-1 β and IL-6 were tested by real-time PCR. **Results** 1) The concentrations of serum HMGB1 in I/R group[(47.75 $\pm$ 3.667)ng/ml] were significantly higher than that of sham group[(5.353 $\pm$ 1.489)ng/ml] ($t=10.71$, $P<0.0001$). 2) The brain water content in I/R group[(78.34 $\pm$ 2.836)%] was higher than mAb group [(65.09 $\pm$ 1.934)%] ($t=3.86$, $P<0.05$); 3) I/R group presented worse damage to the brain compared with mAb group showed by H&E staining. 4) The expressions of IL-1 β in I/R group (0.783 $\pm$ 0.028) were significantly increased by contrast with mAb group (0.417 $\pm$ 0.047) ($t=22.08$, $P<0.01$). There was no significant difference in the expressions of IL-6 between the 2 groups ($t=0.089$, $P>0.05$). **Conclusion** HMGB1 mediates the process of inflammatory reaction in brain ischemia reperfusion. Anti-HMGB1 monoclonal antibody contributes to the protection against ischemia reperfusion injury in brain.

Keywords: Cerebral ischemic reperfusion injury; Inflammatory factors; High mobility group protein B1

(HMGB1); Monoclonal antibody

缺血性脑卒中 (ischemic stroke, IS) 已经成为世界范围内主要的公共健康问题,也是引发较高致残率及致死率的首要原因^[1]。脑缺血后通过快速恢复缺血组织血液灌注的方式在可以挽救濒临死亡的脑细胞的同时,也会产生脑缺血一再灌注损伤。大量研究表明,炎症反应在脑缺血一再灌注损伤发病机制中扮演极为重要的角色^[2]。作为炎症反应的关键调控因子,高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group protein box 1, HMGB1) 通过与其受体结合参与炎症反应^[3]。因此,通过以 HMGB1 为靶点治疗脑缺血一再灌注损伤已经成为人们研究的热点。本文通过建立小鼠局灶性缺血一再灌注模型,观察使用抗 HMGB1 单抗 (anti-HMGB1 monoclonal antibody, mAb) 前后小鼠神经行为学、病理形态及脑水肿程度的改变,并对比脑组织内 IL-1 β 和 IL-6 mRNA 表达的差异,进而探讨使用 mAb 治疗脑缺血一再灌注损伤的可能机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

栓线购自北京西浓科技有限公司;HMGB1 单克隆抗体购自 Abcam 公司;抗 HMGB1 单克隆抗体由美国范斯坦医学研究所提供;小鼠单抗对照 IgG 抗体购自北京百奥莱博科技有限公司;HMGB1 ELISA 试剂盒购自美国 R&D System Inc;Trizol 试剂盒和 RT-PCR kit (二步法) 购自加拿大 invitrogen 公司,使用 Primers 3 软件设计 IL-1 β 和 IL-6 PCR 引物。

1.2 实验动物及分组

8~12 周 C57BL/6J 小鼠 48 只,体重 16~20g,由北京军区总医院附属八一脑科医院实验室提供。随机分为假手术组 (sham 组),脑缺血一再灌注组 (I/R 组),抗 HMGB1 单克隆抗体组 (mAb 组) 和单抗对照组 (control IgG 组) 4 组,每组 12 只,分别用于脑水肿评估、脑部 HE 染色、脑组织 IL-1 β 和 IL-6 mRNA 表达的检测,sham 组和 I/R 组测定血清 HMGB1 的水平。

1.3 脑缺血一再灌注模型制备

大脑中动脉闭塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 模型参考 Zea Longa 法经适当改良后制备。小鼠称重后腹腔注射 3.6% 水合氯醛 (350mg/kg),显微镜下分离右侧颈总动脉 (CCA),颈外动脉 (ECA) 和颈内动脉 (ICA),充分游离

ECA 并于其在残端剪一小口,将栓线向内上方插入 ICA 颅内段,当遇到轻微阻力时停止,结扎 ECA 根部丝线。确认无出血后,消毒并缝合皮肤,2h 后取出栓线。假手术组不插入线栓,余步骤同 I/R 组。

1.4 血清 HMGB1 水平测定

再灌注 24h 后采用心脏穿刺获取小鼠血样,按照 ELISA 试剂盒说明检测各组血清样本中 HMGB1 含量。每个样本重复 3 个复孔,将 HMGB1 单抗包被于酶标板上,加入生物素化的抗 HMGB1 抗体和辣根过氧化物酶标记的亲合素,3 者形成免疫复合物,洗去游离成分,加显色底物及终止液,以酶标仪 450nm 测定吸光度,通过绘制标准曲线求出样品中 HMGB1 浓度。

1.5 脑组织含水量测定

再灌注后 24h 处死小鼠,沿脑桥上界水平面切断并分离左右半球,放于分析天平上称取脑半球组织湿重后,立即放入 100℃ 烤箱烘烤 48 h 得到干重。脑半球含水量的百分比通过公式计算:脑半球含水量百分比 = (湿重 - 干重) / 湿重 $\times$ 100%。

1.6 HE 染色观察各组小鼠脑组织病理变化

4 组各取 3 只小鼠,4% 多聚甲醛心脏灌注后断头取脑,4 μ m 连续切片,常规 HE 染色,光学显微镜下观察脑组织切片上 HE 染色所示的细胞形态学变化。

1.7 实时荧光定量 PCR 测定 IL-1 β 和 IL-6 mRNA 的表达

采用 Trizol 两步法提取总 RNA,采用 Primer3 引物设计软件设计引物,引物分别为:IL-1 β (L5'-GTGGAAGCTTGAGGCCACATT-3'; R5'-TGTGACAAATGCTGTGA), IL-6 (L5'-CCGAGAGGAGACCTTCA CAG-3'; R5'-TCCACGATTTCCAGAGAA C-3'), HPRT (L5'-CAAGCTTGC TGGTGAAGGA-3'; R5'-TGAAGTACTCA TTATAGTC AAGG GCATATC-3')。PCR 扩增条件:95℃ 预变性 10min, 95℃ 15 s, 60℃ 60 s, 72℃ 延伸 1min, 重复共 40 个循环,得到 IL-1 β 、IL-6 和内参 HPRT 的 Ct 值,以 HPRT 内参照作为内标,算出 IL-1 β 、IL-6 的相对表达量,以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 为指标。

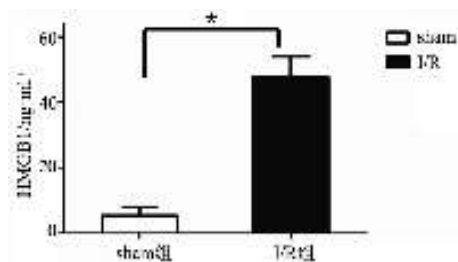
1.8 统计学方法

采用 SPSS17.0 软件进行统计分析。

2 结果

2.1 血清 HMGB1 的水平

I/R 组、sham 组小鼠 HMGB1 浓度分别为 (5.353 ± 1.489) ng/ml、 (47.75 ± 3.667) ng/ml, I/R 组明显高于 sham 组, 差异有统计学意义 (t 值为 10.71, $P < 0.001$)。见图 1。

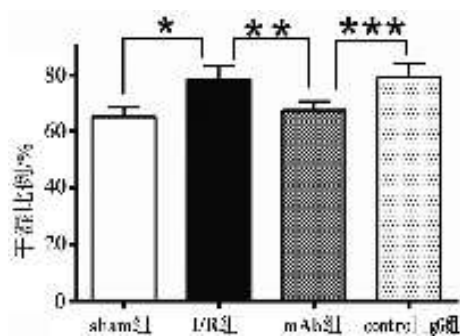


* I/R 组与 sham 组相比, $P < 0.001$

图 1 脑缺血一再灌注组和假手术组小鼠血清 HMGB1 的水平

2.2 各组小鼠脑组织含水量的测定

干湿重法测得各组小鼠脑组织含水量的比较。I/R 组、sham 组、mAb 组和 control IgG 组脑组织含水量分别为 $(78.34 \pm 2.836)\%$ 、 $(65.09 \pm 1.934)\%$ 、 $(67.47 \pm 1.775)\%$ 和 $(79.01 \pm 2.804)\%$, I/R 组显著高于 sham 组, 差异有统计学意义 (t 值为 3.86, $P < 0.05$), control IgG 组显著高于 mAb 组, 差异有统计学意义 (t 值为 3.477, $P < 0.05$), I/R 组显著高于 mAb 组, 差异有统计学意义 (t 值为 3.249, $P < 0.05$)。见图 2。



* I/R 组与 sham 组相比, $P < 0.05$;

** mAb 组与 I/R 组比较, $P < 0.05$;

*** control IgG 组与 mAb 组比较, $P < 0.05$ 。

图 2 各组小鼠脑组织含水量变化 (%)

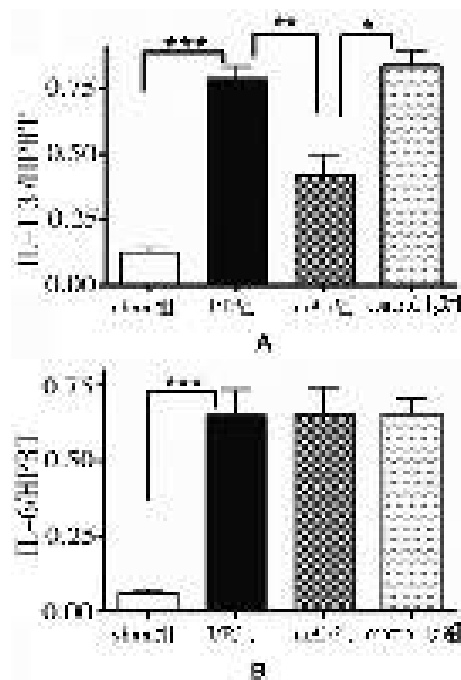
2.3 各组小鼠脑组织 HE 染色比较

sham 组脑组织 HE 染色可见细胞及血管形态正常, 结构完整, 细胞间质均匀。I/R 组脑组织神经元细胞数量明显减少, 细胞形态结构不清, 间质

水肿明显, 部分细胞出现坏死。IgG 组与 I/R 组相比无明显变化, 而 mAb 组脑组织较 I/R 组明显减轻, 坏死细胞数量减少, 可见部分细胞完整, 细胞间质水肿程度减轻。

2.4 各组小鼠脑组织 IL-1 β 和 IL-6 mRNA 的表达

利用实时荧光定量 PCR 技术测得各组小鼠 IL-1 β 和 IL-6 mRNA 的表达变化。I/R 组 IL-1 β mRNA 的表达量 (0.783 ± 0.028) 明显高于 sham 组 (0.126 ± 0.009), 差异有统计学意义 (t 值为 22.08, $P < 0.0001$); mAb 组 (0.417 ± 0.047) 与 IgG 组 (0.834 ± 0.059) 相比, 前者表达量明显高于后者, 差异有统计学意义 (t 值为 5.5, $P < 0.01$); I/R 组 IL-1 β mRNA 表达量 (0.783 ± 0.028) 显著高于 mAb 组 (0.417 ± 0.047), 差异同样有统计学意义 (t 值为 6.681, $P < 0.01$)。在 IL-6 mRNA 表达方面, I/R 组 (0.650 ± 0.052) 显著高于 sham 组 (0.059 ± 0.009), 差异有统计学意义 (t 值为 11.6, $P < 0.001$); 而 IgG 组 (0.655 ± 0.031) 和 mAb 组 (0.655 ± 0.052) 相比, mAb 组 (0.655 ± 0.052) 与 I/R 组 (0.650 ± 0.052) 相比, 两组对比均无明显差异 (t 值分别为 0.004 和 0.089, p 值均 > 0.05)。见图 3。



A: 4 组小鼠脑组织 IL-1 β mRNA 的表达量;

B: 4 组小鼠脑组织 IL-6 mRNA 的表达量。

*** $P < 0.0001$, ** $P < 0.001$, * $P < 0.01$

图 3 各组小鼠 IL-1 β 、IL-6 mRNA 的表达变化

3 讨论

脑缺血一再灌注损伤通过一系列复杂的病理生理机制导致神经元细胞死亡以及神经功能障碍等脑损伤表现^[4]。其中,炎症反应是参与上述复杂机制中较为重要的因素。脑缺血一再灌注时,在缺血灶局部存在大量炎症因子,并且炎症细胞的激活、浸润及黏附分子的合成分泌呈一种相互增强相互促进的级联反应,并通过一定的炎症信号通路使脑组织由缺血性损伤转向炎症性损伤^[5]。

最初被发现是作为核蛋白与染色体结合参与维持核小体结构稳定以及调节基因转录等功能^[6]。人们随后发现坏死的细胞可被动释放 HMGB1 至胞外^[7];同时,激活后的巨噬细胞和胶质细胞等可主动分泌 HMGB1^[8]。释放至胞外的 HMGB1 具有促进炎症因子样的活性,通过与细胞膜表面受体如晚期糖基化终末产物受体(receptor for advanced glycation end products, RAGE)和 Toll 样受体(toll like receptors, TLRs)结合,介导级联式的炎症反应^[7]。在脑缺血一再灌注损伤病理机制中, HMGB1 同样发挥着重要的作用。研究发现,小鼠 MCAO 模型及缺血性脑卒中患者脑组织中发现 HMGB1 由细胞核转移至细胞质,随后大量存在于脑脊液中^[9]。本文结果显示,通过与假手术组对比,脑缺血一再灌注组小鼠血清内 HMGB1 的含量明显高于前者。胞外聚集的较高浓度的 HMGB1 通过募集单核/巨噬细胞并进一步激活星形细胞和小胶质细胞,从而促进炎症因子如 IL-1 β , IL-6, TNF- α 等释放。本文通过对比脑缺血一再灌注组与假手术组小鼠脑组织 IL-1 β 和 IL-6 mRNA 的表达量,发现前者明显高于后者。说明 HMGB1 在参与脑缺血一再灌注损伤机制的同时,通过一系列复杂的级联式反应促进炎症因子的释放,从而进一步加重脑损伤。

目前,以 HMGB1 为治疗靶点的研究已经成为热点。通过采用与 RAGE 结合的 HMGB1 竞争性拮抗剂(如重组的 HMGB1 Box A 功能域和由 S100P 衍生的 RAGE),使用天然/合成的小分子 HMGB1 特异性抑制剂(如甘草酸和甲磺酸加贝酯),以及利用生物来源物质如 HMGB1 的特异性抗体、多肽、蛋白质或弯曲的 DNA based 双链等方式在抑制由 HMGB1 介导的相关疾病中发挥了重要作用^[10]。此外, Liu 等^[11]发现,注射抗 HMGB1 中和 mAb 可显著减轻脑梗死程度,表现为脑梗死

体积减小 90%,神经功能缺损评分明显提高,并减轻了血脑屏障的破坏。本文通过尾静脉注射 mAb 发现,脑水肿的程度显著减轻,由缺血一再灌注损伤引起的病理性破坏也得到一定程度的改善。作为神经毒性介质, IL-1 β 在脑缺血 30min 后即开始表达,并直接引发神经元细胞的凋亡并促进小胶质细胞和星形细胞过度表达炎症化学因子^[12]。本实验结果显示,注射 mAb 后, IL-1 β mRNA 的表达量明显下降,提示抗 HMGB1 单抗的保护性作用。

然而,在本实验中,使用抗 HMGB1 单抗后,小鼠脑组织内 IL-6 mRNA 的表达量并没有发生明显改变。我们推测,导致该结果出现的原因可能是由于 IL-6 在脑缺血一再灌注损伤过程中发挥双重作用有关。Huang 等^[13]研究发现,脑缺血一再灌注 24h 内, IL-6 水平明显升高,可使基质金属蛋白酶-1(MMP-1)表达增高,促进细胞间黏附分子(ICAM)-1 的表达,而导致脑组织损伤。然而,有研究显示,由脑细胞产生的 IL-6 通过激活 STAT3 信号通路发挥促血管生成及保护神经元细胞等功能^[14-15]。本实验中,注射 mAb 后, IL-6 表达量未发生明显变化,推测可能是其产生与 mAb 协同的保护性作用。

本文通过静脉注射抗 HMGB1 单克隆抗体观察及测定小鼠脑缺血一再灌注损伤后脑水肿程度,脑组织破坏程度以及脑组织内 IL-1 和 IL-6 mRNA 的表达量的变化,表明 HMGB1 介导脑缺血一再灌注损伤机制中炎症反应过程,注射抗 HMGB1 单抗可有效保护受损脑组织。

参考文献:

- [1] Bacigaluppi M, Comi G, Hermann D M. Animal models of ischemic stroke. Part one: modeling risk factors[J]. Open Neurol J, 2010, 4: 26-33.
- [2] Shichita T, Sakaguchi R, Suzuki M, et al. Post-ischemic inflammation in the brain[J]. Front Immunol, 2012, 3: 132.
- [3] van Beijnum J R, Buurman W A, Griffioen A W. Convergence and amplification of toll-like receptor (TLR) and receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling pathways via high mobility group B1 (HMGB1) [J]. Angiogenesis, 2008, 11(1): 91-99.
- [4] Kim J B, Sig Choi J, Yu Y M. HMGB1, a novel cytokine-like mediator linking acute neuronal death and delayed neuroinflammation in the postischemic brain[J]. J Neurosci, 2006, 26(24): 6413-6421.
- [5] 王萍, 张密霞, 庄朋伟, 等. 脑缺血再灌注损伤的炎症反应机制研究进展[J]. 天津中医药大学学报, 2014, 33(5): 317-320.

- [6] Bianchi M E, Agresti A. HMG proteins; dynamic players in gene regulation and differentiation[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2005, 15(5): 496-506.
- [7] Scaffidi P, Misteli T, Bianchi M E. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation[J]. *Nature*, 2002, 418(6894): 191-195.
- [8] Wang H, Bloom O, Zhang M, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice[J]. *Science*, 1999, 285(5425): 248-251.
- [9] Kim S W, Lim C M, Kim J B, et al. Extracellular HMGB1 Released by NMDA Treatment Confers Neuronal Apoptosis via RAGE-p38 MAPK/ERK Signaling Pathway [J]. *Neurotox Res*, 2011, 20(2): 159-169.
- [10] 贺欣, 贺丹, 储小飞, 等. 通过调节高迁移率族蛋白 B1 治疗相关疾病的药物研究进展[J]. *药学服务与研究*, 2014, 14(5): 321-327.
- [11] Keyue Liu, Shuji Mori, Hideo K. Anti-high mobility group box 1 monoclonal antibody ameliorates brain infarction induced by transient ischemia in rats[J]. *FASEB J*, 2007, 21(14): 3904-3916.
- [12] Takashi Shichita, Ryota Sakaguchi, Mayu Suzuki, et al. Post-ischemic inflammation in the brain[J]. *Front Immunol*, 2012, 3: 132.
- [13] Huang J, Upadhyay U M, Tamargo R J. Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia[J]. *Surg Neurol*, 2006, 66(3): 232-245.
- [14] Jung J E, Kim G S, Chan P H. Neuroprotection by interleukin-6 is mediated by signal transducer and activator of transcription 3 and antioxidative signaling in ischemic stroke[J]. *Stroke*, 2011, 42(12): 3574-3579.
- [15] Gertz K, Kronenberg G, Kälin R E, et al. Essential role of interleukin-6 in post-stroke angiogenesis[J]. *Brain*, 2012, 135(Pt 6): 1964-1980.

(收稿日期 2015-06-29)

(上接第 312 页)

- [23] Shen H, Mo X, Chen X, et al. Purification and enzymatic identification of an acid stable and thermostable α -amylase from *Rhizopus microsporus*[J]. *J I Brewing*, 2012, 118(3): 309-314.
- [24] Metin K, KoçÖznur, Bıyık Z B B A H. Purification and characterization of α -amylase produced by *Penicillium citrinum* HBF62[J]. *Afr J Biotechnol*, 2010, (45): 7692-7701.
- [25] Sharma A, Satyanarayana T. Characteristics of a high maltose-forming, acid-stable, and Ca^{2+} -independent α -amylase of the acidophilic *Bacillus acidicola*[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2013, 171(8): 2053-2064.
- [26] Shoji H, Sugimoto T, Hosoi K, et al. Simultaneous production of glucoamylase and acid-stable α -amylase using novel submerged culture of *Aspergillus kawachii* NBRC4308[J]. *J Biosci Bioeng*, 2007, 103(2): 203-205.
- [27] Masuda S, Shoji H. Development of a submerged culture method for high production of acid-stable α -amylase and glucoamylase using *Aspergillus kawachii* without glucose concentration control[J]. *J I Brewing*, 2012, 118(4): 346-351.
- [28] 游玟娟. 紫外线诱变选育酸性 α -淀粉酶高产菌株[J]. *安徽农学通报*, 2010, 16(11): 70-71.
- [29] 钱萍. 酸性淀粉酶菌株的诱变选育及酶学性质研究[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(11): 183-186.
- [30] 黄伟, 刘永乐, 王发祥, 等. 原生质诱变选育高产酸性 α -淀粉酶黑曲霉菌株[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(3): 160-167.
- [31] 王发祥, 俞健, 王建辉, 等. 1 株产酸性 α -淀粉酶黑曲霉原生质体制备和再生条件优化[J]. *食品科学*, 2014, 35(1): 155-158.
- [32] 戚薇, 王海燕, 王建玲, 等. 氮离子注入选育耐酸性 α -淀粉酶产生菌诱变效应的研究[J]. *天津科技大学学报*, 2007, 22(3): 6-9.
- [33] Heng C, Chen Z J, Du L X, et al. Expression and secretion of an acid-stable α -amylase gene in *Bacillus Subtilis* by *SacB* promoter and signal peptid[J]. *Biotechnol Lett*, 2005, 27(21): 1731-1737.
- [34] Mehta D, Satyanarayana T. Biochemical and molecular characterization of recombinant acidic and thermostable raw-starch hydrolysing α -amylase from an extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans* [J]. *J Mol Catal B: Enzym*, 2013, 85(3): 229-238.
- [35] Roy J K, Manhar A K, Nath D, et al. Cloning and extracellular expression of a raw starch digesting α -amylase (Blamy-I) and its application in bioethanol production from a non-conventional source of starch[J]. *J Basic Microbiol*, 2015, doi: 10.1002/jobm.201400949.
- [36] 魏涛, 孙浩, 申玉龙, 等. *Sulfolobus tokodaii* strain 7 高温酸性 α -淀粉酶基因在大肠杆菌中克隆表达及其酶学性质[J]. *食品与发酵工艺*, 2013, 39(5): 13-17.
- [37] Zeng Q, Wei C, Jin J, et al. Cloning of the gene encoding acid-stable alpha-amylase from *Aspergillus niger* and its expression in *Pichia pastoris*[J]. *Afr J Food Sci*, 2011(5): 668-675.
- [38] Hmidet N, Bayoudh A, Berrin J G, et al. Purification and biochemical characterization of a novel α -amylase from *Bacillus licheniformis* NH1 cloning, nucleotide sequence and expression of amyN gene in *Escherichia coli* [J]. *Proc Biochem*, 2008, 43(5): 499-510.
- [39] Sharma A, Satyanarayana T. Production of acid-stable and high-maltose-forming α -amylase of *Bacillus acidicola* by solid-state fermentation and immobilized cells and its applicability in baking[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2012, 168(5): 1025-1034.

(收稿日期 2015-09-08)