

# 口蹄疫病毒样颗粒作为抗癌药物载体的条件探索

闫丹, 郭慧琛, 冯霞, 靳野, 魏衍全, 孙世琪\* (中国农业科学院兰州兽医研究所, 家畜疾病病原生物学国家重点实验室, 甘肃兰州 730046)

**摘要** [目的]探讨口蹄疫病毒样颗粒作为抗癌药物载体运载药物进入细胞的可行性。[方法]利用原核表达系统表达纯化口蹄疫结构蛋白,在组装缓冲液中形成口蹄疫病毒样颗粒,利用化学偶联试剂将抗癌药物偶联到病毒样颗粒的表面,形成的载体药物复合物处理细胞,荧光染色观察复合物进入细胞情况。[结果]口蹄疫病毒样颗粒作为新型抗癌药物载体,能够有效携带抗癌药物,该研究为设计新型药物载体提供了可能。[结论]口蹄疫病毒样颗粒具有作为新型药物载体的潜力。

**关键词** 口蹄疫病毒样颗粒;药物载体;抗癌作用

**中图分类号** S85 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)13-152-04

## Investigation on the Foot and Mouth Disease Virus-like Particle as Drug Delivery Vector

YAN Dan, GUO Hui-chen, FENG Xia, SUN Shi-qi\* et al (State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, National Foot and Mouth Disease Reference Laboratory, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730046)

**Abstract** [Objective] To explore the formation of a new anticancer drug carrier in vitro as well as to research its anticancer effect. [Method] Using prokaryotic expression system to express and purified FMDV structural proteins of VP0, VP3 and VP1, then self-assemble to form the FMDV virus-like particles in the assembly buffer, after that, coupling chemical anticancer drug to the virus-like particle surface, forming a new anti-cancer drugs carrier. [Result] FMDV virus-like particles as a novel anti-cancer drug carrier is capable of porting anti-cancer drugs, then may providing a new approach for designing novel drug carrier. [Conclusion] FMDV virus-like particles have potential as a novel drug carrier.

**Key words** FMDV-VLP; Drug-carrier; Anti-cancer

口蹄疫病毒(Foot and mouth disease virus, FMDV)是小RNA病毒科口蹄疫病毒属的成员,根据血清学类型可以分为7种血清型,分别为O型、A型、C型、亚洲1型(Asia 1)、南非1型(SAT1)、南非2型(SAT2)和南非3型(SAT3)<sup>[1]</sup>。FMDV基因组由单股正链RNA组成,长度约为8 500 bp,病毒核酸被衣壳蛋白包被,形成二十面体结构,该二十面体衣壳是由口蹄疫病毒的4个结构蛋白VP1、VP2、VP3和VP4各60个拷贝组成。大量研究表明,口蹄疫病毒结构蛋白可以在体外环境中自组装形成不含病毒遗传物质的空衣壳,即病毒样颗粒(Virus-like particle, VLP)。病毒样颗粒作为纳米级生物材料,表现出良好的应用潜力,除了利用病毒样颗粒优越的免疫原性来研发新型疫苗外<sup>[2]</sup>,由于其生物相容性好,有较大的体表面积,运载量大,目前病毒样颗粒在异源抗原呈递、药物载体和运载外源小分子等方面也表现出独具的优势<sup>[3]</sup>。

抗癌药物阿霉素(DOX)在临床上被广泛应用于治疗,但由于其自身对细胞没有选择性,在应用中的缺点是毒副作用较大,这限制了其在临床上的应用,因此有必要对其进行相应修饰,改善其药物动力学效应,以期实现增效减毒的目的<sup>[4]</sup>。常用方法是在抗癌药物表面链接靶向分子(如抗体、受体配体等),或者利用药物载体运载抗癌药物等<sup>[5-8]</sup>。笔者基于亚洲1型口蹄疫衣壳蛋白VP0、VP3、VP1在体外具有自组装能力,应用融合表达技术,原核表达可溶性口蹄疫病毒衣壳蛋白6×His-SUMO-VP0、6×His-SUMO-VP3和6×His-SUMO-VP1,切除衣壳蛋白肽链N端的6×His-SUMO标签蛋白使衣壳蛋白在特定组装体系中自组装成VLPs<sup>[9]</sup>,然

后在其表面偶联抗癌药物,探索口蹄疫病毒样颗粒作为抗癌药物载体的可行性。

## 1 材料与方法

**1.1 仪器** BIO-RAD DNA Engine(USA);BIO-RAD 蛋白电泳仪(USA);核酸电泳仪和脱色摇床(北京六一仪器厂);振荡仪 HZQ-Q(北京东联哈尔仪器制造有限公司)、恒温培养箱和恒温水浴锅,均购自上海精宏;Gel-DOC XR 凝胶成像仪(USA);台式常温离心机和各种规格微量移液器,均购自Eppendorf;超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物股份有限公司);贝克曼超速离心机(XPN-100/90/80);紫外吸收仪(B&W TEK;USA);酶标仪(PerkinElmer Victor X4);共聚焦激光显微镜(Leica, USA)

**1.2 试剂** 蛋白纯化树脂(Ni-NTAsefinose<sup>TM</sup> resin)亲和层析柱,购自上海生工生物工程股份有限公司。阿霉素、偶联试剂碳二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),均购自Sigma公司;咪唑和TritonX-100,均购自Amresco公司;其他化学试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。细胞培养液(DMEM)和胎牛血清(FBS)购自Gibco公司;试验用水均为超纯水(18.2 MΩ/cm)。

**1.3 菌种、表达载体及抗体** 含亚洲1型FMDV分离株VP1编码区的重组克隆质粒pSMA-VP1及带有SUMO和6×His融合标签的pSMK、pSMA表达载体与JM109大肠杆菌及BL21(DE3)-RIL表达菌株,均购自生工生物工程(上海)有限公司。兔抗亚洲1型单克隆抗体、FITC标记山羊抗兔IgG抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔IgG抗体,均购自Sigma公司。

## 1.4 方法

**1.4.1 FMDV 衣壳蛋白VP0、VP3和VP1的表达纯化。**将测序正确的阳性重组质粒pSMK-VP0VP3和pSMA-VP1共转化

**作者简介** 闫丹(1988-),男,河南三门峡人,硕士研究生,研究方向:预防兽医学。\*通讯作者,副研究员,博士,硕士生导师,从事兽医微生物学方面的应用研究。

**收稿日期** 2015-03-23

感受态细胞 BL21(DE3)-RIL 中,挑取单克隆菌落,接种于卡那霉素、氯霉素和氨苄青霉素抗性的 LB 液体培养基中,37 °C 下 220 r/min 过夜培养,然后将过夜培养的表达菌按 1:100 的比例重新接种到新的含有上述抗性的 LB 培养基,于 37 °C,220 r/min 的条件下培养至  $OD_{600}$  为 0.9 左右,将菌液转入 16 °C 条件下,加入 1 mol/ml 的 IPTG,使终浓度为 0.75 mmol/ml,诱导表达 16 h 后收集样品。按 1:50 浓缩比例将菌体悬浮于 Buffer A (500 mmol/L NaCl,20 mmol/L Tris-HCl,20 mmol/L Imidazole,2 mmol/L DTT,0.05% TritonX-100,pH 8.4)中,充分混匀后在冰上超声波处理 8 min,然后 11 500 r/min 4 °C 下离心 20 min 收集上清,通过亲和层析柱纯化目的蛋白。然后,将纯化后的蛋白按照 1:100 的体积加入 SUMO 酶,混匀后加入到截留分子量为 8 kD 的透析袋中,过夜透析,切除标签蛋白。

**1.4.2 免疫印迹试验。**将切除标签蛋白的样品进行 12% SDS-PAGE 电泳(80 V,2 h),随后用半干转法将重组蛋白转移至聚偏氟乙烯杂交膜(PVDF 膜)上(200 mA,3 h),用 5% 脱脂奶粉(PBS,pH7.0)37 °C 条件下封闭 1 h,TBST 洗涤 3 次,然后分别用兔抗亚洲 1 型血清(1:4 000)37 °C 孵育 1 h,TBST 充分洗涤后分别用辣根过氧化物酶标记的山羊抗体 IgG(1:6 000)37 °C 孵育 1 h,TBST 充分洗涤后于暗室加入 ECL 发光底物反应 3 min,胶片曝光,显影及定影固定后观察目的蛋白表达情况。

**1.4.3 FMDV-VLPs 体外组装。**将切除标签蛋白的样品装入截留分子量为 8 kD 的透析袋中,透析袋置于 500 ml 组装 Buffer(250 mmol/L NaCl,20 mmol/L Tris-HCl,20 mmol/L Imidazole,1 mmol/L CaCl<sub>2</sub>,2 mmol/L DTT,0.1% TritonX-100,pH 8.4)中,4 °C 下轻微搅拌。24 h 后收样,使用动态光散射仪(DLS)检测组装情况。

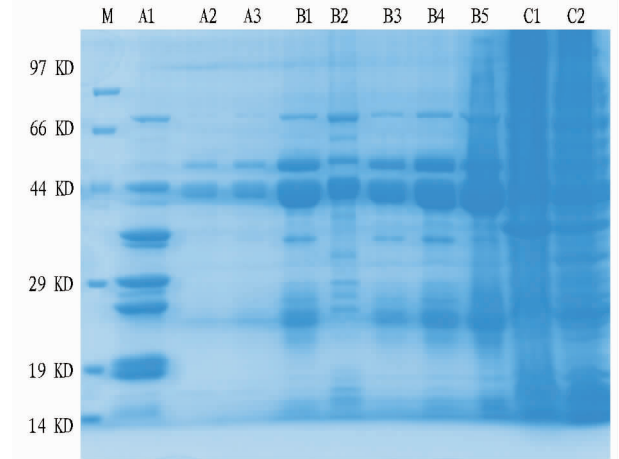
**1.4.4 FMDV-VLPs 体外偶联阿霉素。**取 1 ml 组装好的体系,加入 EDC 和 NHS 溶液各 40  $\mu$ l(浓度均为 1 mmol/ml),反应 30 min 后将混合物加入到透析袋中,置于 4 °C 冰箱内过夜透析,将未反应的分子去除。然后,将透析后的偶联物平铺到蔗糖密度梯度(15%、25%、35%、45%)离心管上,小心放到超高速低温离心机中,4 °C 下 35 000 r/min 离心 2 h,然后将离心管中的液体每毫升收集 1 次,通过 SDS-PAGE 确定偶联物所在的位置。

**1.4.5 细胞示踪试验。**将 A549 细胞接种到有玻片的 35 mm 培养皿中,接种密度约为  $1 \times 10^4$  个/ml,37 °C 培养箱培养 24 h。加入口蹄疫病毒样颗粒和复合物后 1 h 和 2 h 分别处理细胞,接着用 PBS 洗涤 3 次,然后用 4% 的多聚甲醛室温下固定细胞 15 min,再用 PBS 洗涤 3 次,用 1% Triton X-100 穿透 15 min,用 1:2 000 的猪源亚洲 1 型口蹄疫血清孵育 1 h,PBS 洗涤 3 次后,用 FITC 标记的山羊抗猪的二抗孵育 1 h,PBS 洗涤 3 次后用 DAPI 进行染核处理。15 min 后用共聚焦显微镜观察。

## 2 结果与分析

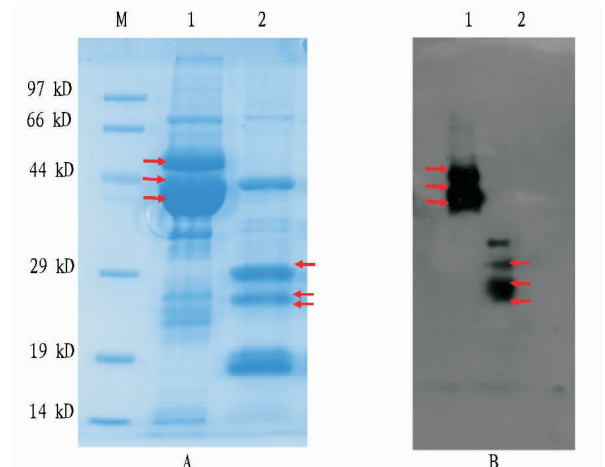
**2.1 口蹄疫结构蛋白纯化结果** 将实验室保存的阳性重组

质粒 pSMK-VPOVP3 和 pSMA-VP1 共转化 *E. coli* 表达菌 BL21(DE3)codon plus-RIL 中,发现融合蛋白 His-SUMO-VPO、His-SUMO-VP3 及 His-SUMO-VP1 在 16 °C 条件下经 IPTG 诱导能成功表达,其分子量与理论值(45 kD、36 kD、35 kD)相近。分析发现,目的蛋白以可溶性融合蛋白的形式出现在菌体裂解液的上清中可溶性效果好,经亲和层析柱纯化融合蛋白(图 1),并且在低温条件下可溶性蛋白的表达量达到 2.5 mg/ml。为了进行体外组装,用特异性 SUMO 酶对 his-sumo 标签进行酶切,利用 SDS-PAGE 和 Western blot 进行验证,如图 2 所示。



注:M. 低蛋白 Maker;A1. Buffer A 洗脱液;A2. 5% Buffer B 洗脱;A3. 10% Buffer B 洗脱;B1~B5 均为 Buffer B 洗脱液得到的目的蛋白;C1. 上清;C2. 菌体裂解后的沉淀。图中红色箭头所指从上到下依次为 His<sub>6</sub>-Sm-VPO、His<sub>6</sub>-Sm-VP3 和 His<sub>6</sub>-Sm-VP1。

图 1 亚洲 1 型衣壳蛋白的融合表达及纯化



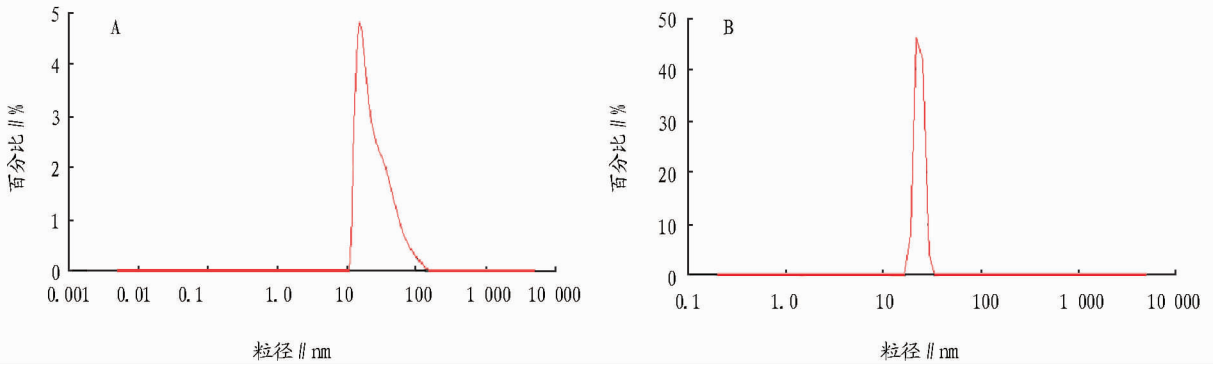
注:A 图中 M 为低蛋白 Marker,1 为酶切前带有 his-sumo 标签的融合蛋白,其中红色箭头所指从上到下依次为 His<sub>6</sub>-Sm-VPO、His<sub>6</sub>-Sm-VP3 和 His<sub>6</sub>-Sm-VP1,2 为酶切后除去 his-sumo 标签的衣壳蛋白,其中红色箭头所指从上到下依次为 VPO、VP3 和 VP1。B 图中,1 为酶切前带有 his-sumo 标签的融合蛋白,红色箭头所指从上到下依次为 His<sub>6</sub>-Sm-VPO、His<sub>6</sub>-Sm-VP3 和 His<sub>6</sub>-Sm-VP1,2 为酶切后除去 his-sumo 标签的衣壳蛋白,红色箭头所指从上到下依次为 VPO、VP3 和 VP1,所用一抗为兔抗的亚洲 1 型血清,二抗为过氧辣根酶标记的山羊抗兔 IgG。

图 2 酶切前后蛋白 SDS-PAGE 及 Western blot 结果

**2.2 FMDV-VLPs 体外组装结果** 模拟病毒体外组装条件,将切除 His-SUMO 标签后的衣壳蛋白置于自组装 Buffer 中,轻微搅拌 24 h 后,用 0.22  $\mu$ m 的滤器过滤,加入 60  $\mu$ l 样

品到动态光散射仪的测量杯中,按照仪器的操作说明测量后得到粒径大小分布图。从图 3 可以看出,偶联阿霉素后的病毒样颗粒粒径大小有增大的趋势,这是因为阿霉素偶联在病

毒样颗粒的表面,增加了病毒样颗粒的粒径,也说明了病毒样颗粒确实和阿霉素发生了偶联。剩下的病毒样颗粒用于后续偶联试验。



注:A. 偶联前;B. 偶联后。

图3 偶联前后病毒样颗粒的粒径大小

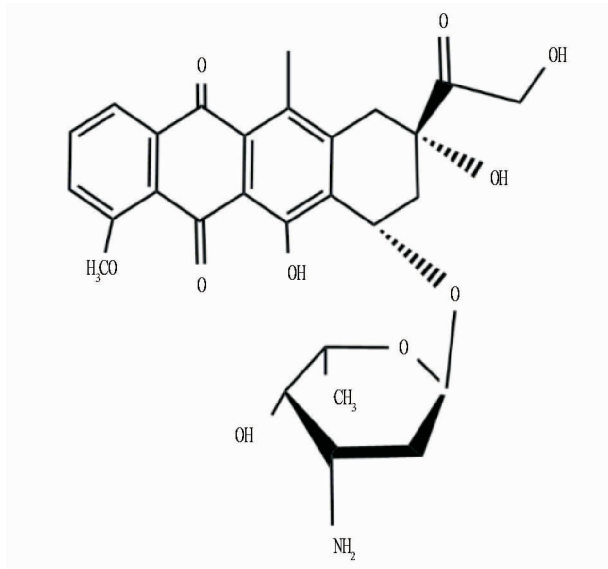


图4 阿霉素的化学分子结构

**2.3 FMDV-VLPs 病毒样颗粒偶联阿霉素** 从图 4 可以看出,阿霉素在其含氧苯环侧链上带有一个伯胺基团,而病毒样颗粒表面有很多羧基,通过常用的化学偶联试剂碳二亚胺(EDC)和 N-羟基丁二酰亚胺(NHS),使伯胺和羧基形成酰胺键,从而将阿霉素偶联到病毒样颗粒的表面。在 SDS-PAGE 和核酸胶上,由于 DOX 自身有荧光,能在紫外光下被激发而表现出荧光,从而可以证明 DOX 是否与病毒样颗粒发生偶联。从图 5 可以看出,目的条带所在的位置有明显的荧光,而没有偶联的病毒样颗粒在相同的位置处,没有荧光。用非变性核酸胶电泳,由于病毒样颗粒携带了阿霉素,与未偶联的相比泳动速度变慢,从而跑在病毒样颗粒后面。

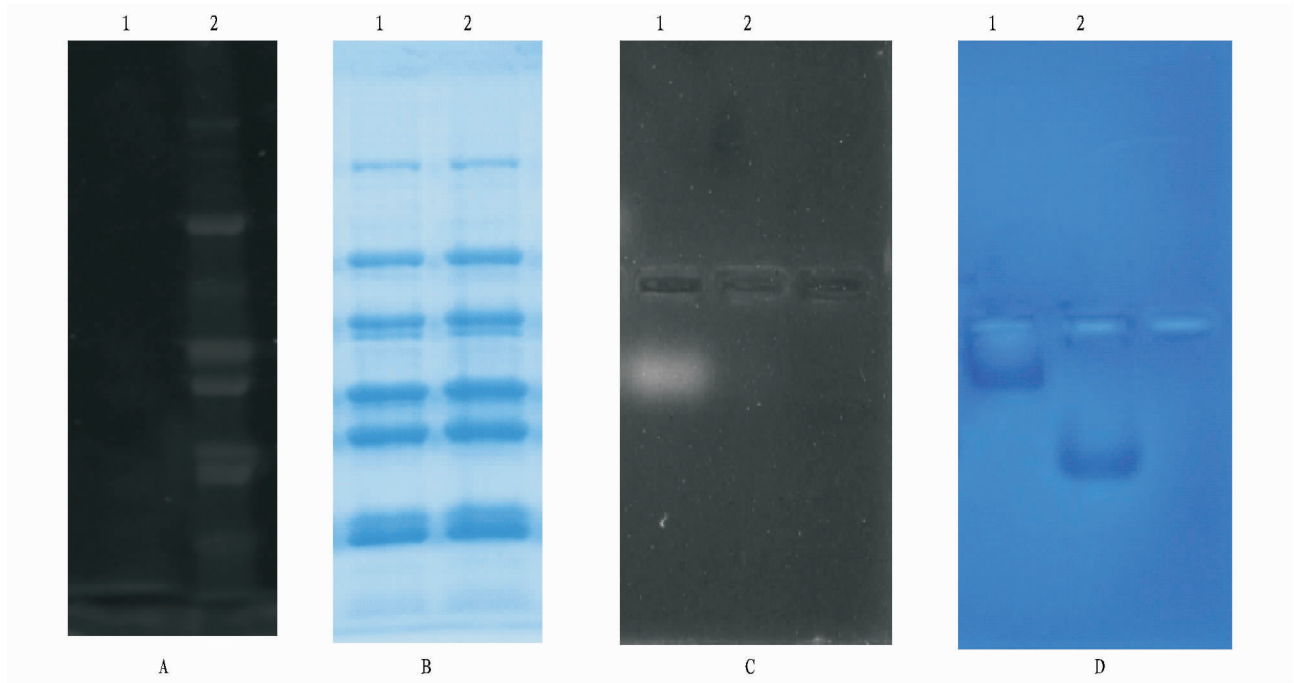
**2.4 细胞示踪作用** 通过不同的时间点(1,2 h)收集 A549 细胞样品,探讨偶联后的复合物是否能够特异性吸附癌细胞并且通过受体介导的作用进入细胞。已经有大量研究表明,在癌细胞表面,整合素受体与细胞的扩散增殖有关,所以会过量表达<sup>[10-12]</sup>,而口蹄疫病毒样颗粒在自组装的过程中保持了空间构型的完整,在 VP1 的 loop 结构中有抗原决定区,

已经被证实该区域的 RGD 序列高度保守,能够利用整合素受体吸附细胞从而被内化进入细胞。从图 6 可以看出,在共聚焦显微镜照片中,单独的病毒样颗粒和偶联阿霉素的病毒样颗粒都能够随着时间的变化从细胞膜向细胞质内转移,说明病毒样颗粒偶联阿霉素后并没有影响其与整合素受体结合的能力。

### 3 讨论

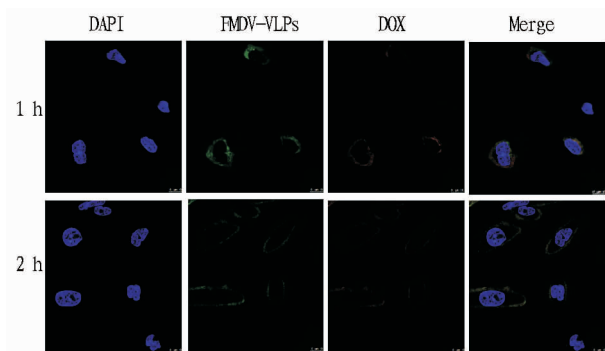
探索新一代生物材料始终是纳米科技发展比较活跃的领域,其中 VLP 是自然存在的来自病毒蛋白的纳米级生物材料,在运载外源物质方面展示出极大应用潜力<sup>[13-15]</sup>。首先,病毒样颗粒可以在多种表达系统中得到有效表达,在原核系统中 VLP 的纯化比较简单,能够在体外高效表达和纯化,易于大规模生产纯化。其次,VLP 作为一种纳米级材料,具有与其他纳米材料许多相同的特性,比如可以在其表面或者内部进行适当的化学或者基因修饰,能够容忍一定数量和大小外源蛋白插入,这些特点赋予了它们可以通过分子生物技术手段而获得了更多的生物医学功能。再次,来自不同病毒的 VLP 在其外壳蛋白中一般会含有该病毒吸附侵入病毒时所用的一些结合位点,可以靶向性结合宿主细胞,例如犬细小病毒样颗粒(CPV-VLP)对转铁蛋白受体有天然吸附趋势,因此可以通过和癌细胞表面过量表达的转铁素受体结合,就可能达到靶向性治疗癌症的作用。因此,VLP 可以作为一种生物学应用的工具而成为一个良好的多功能平台,在药物运输、基因治疗、细胞靶向定位和治疗癌症等方面发挥作用。

笔者利用大肠杆菌融合表达亚洲 1 型口蹄疫病毒的结构蛋白 VP1、VP2 和 VP3,并在体外组装缓冲液中形成和自然病毒形态机构十分相似的病毒样颗粒,运用一步偶联反应将抗癌药物偶联到口蹄疫病毒样颗粒表面,得到新型抗癌药物载体。通过 SDS-PAGE 和琼脂糖凝胶初步验证口蹄疫病毒样颗粒和抗癌药物发生了偶联,然后通过动态光散射仪测定了粒径大小,再次佐证了偶联反应确实发生。这说明口蹄疫病毒样颗粒可以作为一种纳米材料,对其表面进行适当的化



注:图 A 中,1 为偶联前的病毒样颗粒,2 为偶联后的复合物;图 B 为考马斯亮蓝染色后的条带;图 C 和 D 是非变性核酸胶;图 D 为考马斯亮蓝染色后的电泳结果,2 为未偶联的病毒样颗粒。

图 5 偶联前后 SDS-PAGE 和核酸胶表征偶联物



注:蓝色为核染料 DAPI,绿色为 FITC,红色为 DOX 自身被激发后产生的荧光。绿色为 FITC 标记的山羊抗兔二抗,红色为 DOX 自身被激发后产生的荧光,所需激发波长为 350 nm。

图 6 单独的病毒样颗粒和偶联物孵育细胞后 A549 细胞的吸收情况

学修饰,结果表明这些化学修饰没有破坏病毒样颗粒的完整性。

同时,还初步探讨了口蹄疫病毒样颗粒是否能够像自然病毒一样吸附入侵细胞,将偶联后的复合物和癌细胞共同孵育一段时间,然后借助共聚焦显微镜观察到病毒样颗粒复合物能够携带药物入侵到细胞质内,这为药物随后的治疗作用发挥提供了前提条件。该研究中获得病毒样颗粒表达系统为原核表达系统,该表达系统生产成本低,表达量高,这些条件为病毒样颗粒的其他生物应用提供了条件,使口蹄疫病毒样颗粒具有发展成为潜在的外源分子运载体的能力。虽然证实 VLPs 和药物可以形成复合物,但二者的最佳结合率还需要进一步摸索,新形成的复合物在不同条件下的稳定性还需要进一步探索,新形成的复合物的抗癌效果还可能需

体外或者体内试验进行验证,这些初步探索为病毒样颗粒发挥更多的生物学应用提供了借鉴。

#### 参考文献

- [1] BOOTHROYD J C, HIGHFIELD P E, CROSS G A, et al. Molecular cloning of foot and mouth disease virus genome and nucleotide sequences in the structural protein genes [J]. *Nature*, 1981, 290(5809): 800-802.
- [2] ROLDAO A, MELLADO M C, CASTILHO L R, et al. Virus-like particles in vaccine development [J]. *Expert Review of Vaccines*, 2010, 9(10): 1149-1176.
- [3] GOLDMANN C, STOLTE N, NISSLEIN T, et al. Packaging of small molecules into VP1-virus-like particles of the human polyomavirus JC virus [J]. *Journal of Virological Methods*, 2000, 90(1): 85-90.
- [4] GAO W, XIANG B, MENG T T, et al. Chemotherapeutic drug delivery to cancer cells using a combination of folate targeting and tumor microenvironment-sensitive polypeptides [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(16): 4137-4149.
- [5] WANG X, LI J, WANG Y, et al. HFT-T, a targeting nanoparticle, enhances specific delivery of paclitaxel to folate receptor-positive tumors [J]. *ACS Nano*, 2009, 3(10): 3165-3174.
- [6] HYODO K, YAMAMOTO E, SUZUKI T, et al. Development of liposomal anticancer drugs [J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2013, 36(5): 703-707.
- [7] SENTER P D, SPRINGER C J. Selective activation of anticancer prodrugs by monoclonal antibody-enzyme conjugates [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001, 53(3): 247-264.
- [8] ZHANG C, PAN D, LUO K, et al. Peptide dendrimer-doxorubicin conjugate-based nanoparticle as an enzyme-responsive drug delivery system for cancer therapy [J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2014, 3(8): 1299-1308.
- [9] GUO H C, SUN S Q, JIN Y, et al. Foot-and-mouth disease virus-like particles produced by a SUMO fusion protein system in *Escherichia coli* induce potent protective immune responses in guinea pigs, swine and cattle [J]. *Veterinary Research*, 2013, 44: 48.
- [10] CHEN K, CHEN X. Integrin targeted delivery of chemotherapeutics [J]. *Theranostics*, 2011, 1: 189-200.
- [11] TEMMING K, SCHIFFELERS R M, MOLEMA G, et al. RGD-based strategies for selective delivery of therapeutics and imaging agents to the tumour vasculature [J]. *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, 2005, 8(6): 381-402.

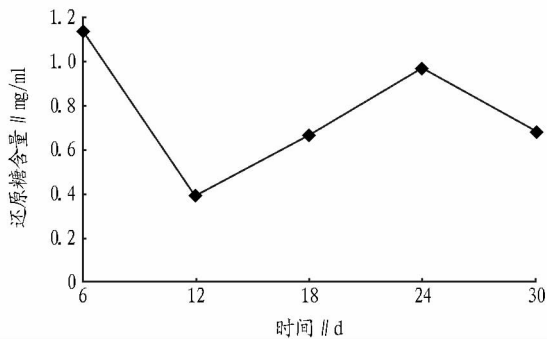


图2 白腐菌处理对玉米秸秆还原糖含量的影响

还原糖含量最高,约为 1.92 mg/ml;在第 18 天时还原糖含量达到一个较小值,约为 1.41 mg/ml;到第 24 天时,还原糖含量约为 1.52 mg/ml,比第 18 天增加了 0.11 mg/ml;在第 24 ~ 30 天期间,随着还原糖的被消耗达到一个稳定值,约为 1.48 mg/ml。考虑到玉米秸秆的降解程度和产氢能力,选择在第 12 天时加入光合产氢菌,可以使产氢效果较理想,产氢能力也较强。

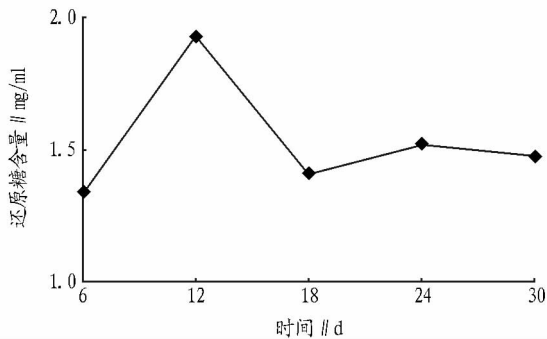


图3 白腐菌与氯化铁联合处理玉米秸秆对还原糖含量的影响

**2.4 不同处理对玉米秸秆中还原糖含量的影响** 由图 2 和 3 可知,不同方式处理的玉米秸秆中还原糖含量的走势不同,白腐菌单独处理的玉米秸秆还原糖含量先减少后增加,再减少,最后趋于稳定。这是因为玉米秸秆在刚接种白腐菌后,白腐菌在降解秸秆生成还原糖的同时,还要利用还原糖进行自身的繁殖生长<sup>[14]</sup>。而经氯化铁处理过的秸秆接种白腐菌后,在第 6 天还原糖含量达 1.33 mg/ml,在第 12 天达最大值 1.92 mg/ml,之后又减少,趋于稳定。这是因为玉米秸秆经过氯化铁处理后,其细胞壁结构已经被破坏,可以使白腐菌直接快速地降解木质素和纤维素,生成多糖。可见,经过氯

化铁处理过的 40 目玉米秸秆再用白腐菌处理,还原糖含量及周期有了明显的提高。

### 3 结论

先利用化学法处理玉米秸秆,再利用白腐菌中黄孢原毛平革菌进行处理,以酶解后还原糖含量作为考察指标,确定最佳工艺。结果表明,用 0.5 mol/L 的三氯化铁溶液,固液比为 1/20 g/ml,在 100 ~ 108 °C 下处理玉米秸秆 30 min 后,其纤维素、木质素、半纤维素含量均有明显的变化,且纤维素含量最高增加了 52.78%,半纤维素最高减少了 12.06%。经氯化铁处理过的玉米秸秆接种白腐菌后,在第 12 天时还原糖含量最高达 1.92 mg/ml,此时的玉米秸秆作为光合产氢的基质效果最好。氯化铁处理秸秆后,滤液中的铁离子可回收利用共沉淀法制备纳米四氧化三铁等工业用品<sup>[15]</sup>,用于工业生产,不仅节约成本,同时也可以保护环境。

### 参考文献

- [1] 吴忠海,杨璐,李红,等. 能源植物的研究现状与展望[J]. 安徽农业科学,2014(6):1805-1807.
- [2] 张全国,尤希凤,张军合,等. 生物制氢技术研究现状及其进展[J]. 生物质化学工程,2006,40(1):27-31.
- [3] 杨尉,刘立国,武书彬. 木质纤维素燃料乙醇生物转化预处理技术[J]. 广州化工,2011,39(13):8-12.
- [4] 曾国明. 玉米秸秆发酵前金属离子处理及动力学研究[D]. 重庆:重庆大学,2012.
- [5] 潘亚杰,张雷,郭军,等. 农作物秸秆生物法降解的研究[J]. 可再生能源,2005(3):33-35.
- [6] 蒋丹萍. 光合产氢用秸秆类生物质微生物预处理的实验研究[D]. 郑州:河南农业大学,2013.
- [7] 蒋轩,孙君社,刘莉,等. 金属阳离子促进酸预处理玉米秸秆效果[J]. 农业工程学报,2009,25(4):185-189.
- [8] 许敬亮,尹依婷,张宇,等. 白腐菌预处理稻草秸秆对 Z28 产纤维素酶的影响[J]. 太阳能学报,2010,31(8):955-957.
- [9] 陈贤情,商晋,宋慧芳,等. 秸秆中纤维素/半纤维素和木质素的几种测定方法对比[C]//中国农业工程学会 2011 年学术年会论文集,2011:1-6.
- [10] 赵凯,许鹏举,谷广焯,等. 3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖含量的研究[J]. 食品科学,2008,29(8):534-536.
- [11] SHEN Z B, JIN C N, PEI H S. Pretreatment of corn stover with acidic electrolyzed water and FeCl<sub>3</sub> leads to enhanced enzymatic hydrolysis[J]. Cellulose, 2014, 21:3383-3394.
- [12] ILGOOK KIM, MUHAMMAD SAIF UR REHMAN, JONG-IN HAN. Fermentable sugar recovery and adsorption potential of enzymatically hydrolyzed rice straw[J]. Cleaner Production, 2014, 66:555-561.
- [13] LÓPEZ-LINARES J C, ROMERO I, MOYA M, et al. Pretreatment of olive tree biomass with FeCl<sub>3</sub> prior enzymatic hydrolysis[J]. Bioresource Technology, 2013, 128:180-187.
- [14] 熊建华,王双飞,李可成,等. 白腐菌 Trametes hirsuta 19-6 预处理竹子化机浆的研究[J]. 造纸科学与技术,2009,28(3):19-23.
- [15] 于文广,张同来,张建国,等. 纳米四氧化三铁(Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)的制备和形貌[J]. 化学进展,2007,19(6):884-892.

(上接第 155 页)

- [12] GOEL H L, LI J, KOGAN S, LANGUINO L R. Integrins in prostate cancer progression[J]. Endocrine-Related Cancer, 2008, 15(3):657-664.
- [13] SCHOTT J W, GALLA M, GODINHO T, et al. Viral and non-viral approaches for transient delivery of mRNA and proteins[J]. Current Gene Therapy, 2011, 11(5):382-398.

- [14] BOISGÉRAULT F, MORÓN G, LECLERC C. Virus-like particles: a new family of delivery systems[J]. Expert Rev Vaccines, 2002, 1(1):101-109.
- [15] ARCANGELI C, CIRCELLI P, DONINI M, et al. Structure-based design and experimental engineering of a plant virus nanoparticle for the presentation of immunogenic epitopes and as a drug carrier[J]. Journal of Biomolecular Structure & Dynamics, 2014, 32(4):630-647.