

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.15.005

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220417.1326.002.html\(2022-04-19\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220417.1326.002.html(2022-04-19))

节律基因 Bmal1 对结直肠癌细胞放疗敏感性的影响及其机制*

张博汝, 魏 柏[△], 石晓雅, 谢梦丽

(华中科技大学同济医学院附属梨园医院肿瘤科, 武汉 430077)

[摘要] **目的** 通过体外细胞实验,从分子水平探讨脑和肌肉芳香烃受体核转样蛋白 1(Bmal1)基因对结直肠癌细胞放疗敏感性的影响及其机制。**方法** 体外培养结直肠癌细胞,运用 RNA 干扰技术转染 Bmal1 siRNA,构建 Bmal1 基因敲除的结直肠癌细胞株。将体外培养的细胞分为对照组、Bmal1 基因敲除组(敲除组)、放疗组、Bmal1 基因敲除联合放疗组(联合组)。CCK-8 检测各组结直肠癌细胞的增殖能力。RT-qPCR 检测各组细胞 Bmal1、缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)和血管内皮生长因子(VEGF)的 mRNA 表达水平。Western blot 检测各组细胞 Bmal1、HIF-1 α 和 VEGF 的表达水平。**结果** CCK-8 检测结果显示,细胞增殖能力由强到弱依次为:对照组、敲除组、放疗组、联合组,各组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。RT-qPCR 检测结果显示,联合组细胞 HIF-1 α 和 VEGF mRNA 的表达水平在 4 组细胞中均为最低,分别为对照组的 0.40 倍和 0.38 倍,其次为放疗组、敲除组,对照组 HIF-1 α 和 VEGF mRNA 表达水平最高,各组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。Western blot 检测结果显示,HIF-1 α 和 VEGF 在联合组细胞中表达水平最低,分别为对照组的 0.45 倍和 0.35 倍,其次为放疗组、敲除组,对照组 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白的表达水平最高,各组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 敲除节律基因 Bmal1 可以增加结直肠癌细胞对放疗的敏感性,其机制可能与调节 HIF-1 α /VEGF 信号通路有关。

[关键词] 脑和肌肉芳香烃受体核转样蛋白 1 基因;结直肠癌细胞;放射治疗;缺氧诱导因子-1 α ;血管内皮生长因子

[中图分类号] R735.3**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2022)15-2544-05**Effect of rhythm gene Bmal1 on radiotherapy sensitivity of colorectal cancer cells and its mechanism***ZHANG Boru, WEI Bai[△], SHI Xiaoya, XIE Mengli

(Department of Oncology, Liyuan Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430077, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of rhythm gene Bmal1 on the radiotherapy sensitivity of colorectal cancer cells and its mechanism at the molecular level through in vitro cell experiment. **Methods** Colorectal cancer cells were cultured in vitro and transfected with Bmal1 siRNA by RNA interference technique to construct colorectal cancer cell lines with Bmal1 gene knockout. The cells cultured in vitro were divided into the control group, Bmal1 gene knockout group(knockout group), radiotherapy group, Bmal1 gene knockout combined with radiotherapy group(combined group). CCK-8 was used to detect the proliferation ability of colorectal cancer cells in each group. The mRNA relative expression levels of Bmal1, HIF-1 α and VEGF were detected by RT-qPCR. The expression levels of Bmal1, HIF-1 α and VEGF were detected by Western Blot. **Results** The CCK-8 experiment results showed that the cell proliferation ability from strong to weak was in turn the control group, Bmal1 gene knockout group, radiotherapy group, combined group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The RT-qPCR detection results showed that the expression levels of HIF-1 α and VEGF mRNA in the combined group were the lowest in the four groups, which were 0.40 and 0.38 times of that in the control group, respectively, followed by the radiotherapy group and gene knockout group. The expression levels of HIF-1 α and VEGF mRNA in the control group were the highest, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The Western Blot experiment results showed that the expression levels of HIF-1 α and VEGF protein in the combined group were the lowest, which were 0.45 and

* 基金项目:湖北省自然科学基金项目(20190101041)。 作者简介:张博汝(1997—),住院医师,硕士,主要从事恶性肿瘤基础研究。

[△] 通信作者, E-mail: doctorwb@hust.edu.cn。

0.35 times of that in the control group, respectively, followed by the radiotherapy group and knockout group. The expression levels of HIF-1 α and VEGF protein in the control group were the highest, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Knockout of rhythm gene Bmal1 can increase the sensitivity of colorectal cancer cells to radiotherapy, and its mechanism may be related to the regulation of HIF-1 α /VEGF signaling pathway.

[Key words] brain and muscle arnt-like protein-1 genes; colorectal cancer cells; radiation therapy; hypoxia inducible factor 1 α ; vascular endothelial growth factor

结直肠癌是常见的消化道恶性肿瘤之一,在全球发病率和病死率分别位于恶性肿瘤的第三和第二,对人类的健康造成威胁^[1]。放疗是结直肠癌治疗的重要手段之一,因此,提高结直肠癌对放疗的敏感性对降低患者的病死率和改善预后至关重要。脑和肌肉芳香烃受体核转运样蛋白 1(Bmal1)基因是调节哺乳动物昼夜节律的重要转录因子,在肿瘤细胞中,Bmal1 基因可以参与调节细胞增殖、衰老、内质网介导的应激恢复、逃避凋亡等,作为一种可能的致癌基因,通过 DNA 损伤修复途径、细胞迁移、缺氧、全身免疫应答,促进化疗耐药性或转移^[2-4]。然而关于节律基因 Bmal1 能否影响结直肠癌细胞对放疗的敏感性尚少见报道,本文通过体外细胞生物学和分子生物学实验,旨在观察 Bmal1 基因对结直肠癌细胞放疗敏感性的影响及其可能作用的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

细胞:小鼠结直肠癌细胞由华中科技大学附属协和医院肿瘤中心馈赠。试剂:RPMI-1640 培养基购自美国 Gibco 公司(批号:8120473),胎牛血清购自以色列 BI 公司(批号:2120140),胰蛋白酶(批号:70080500)、青霉素链霉素溶液(批号:88100500)购自 Biosharp 公司,Bmal1 siRNA 和阴性对照 negative control siRNA 由武汉奇景生物科技有限公司合成,HiPerFect 转染试剂购自 Qiagen 公司,CCK-8 试剂盒购自赛文创新生物科技有限公司(批号:20210102),RNA 提取试剂 TRIzol 购自北京天根生化科技有限公司,Bmal1、缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、血管内皮生长因子(VEGF)、GAPDH 引物由武汉天一辉远生物科技有限公司合成,反转录试剂盒和 qPCR 试剂盒购自南京诺唯赞医疗科技有限公司,RIPA 裂解液购自上海碧云天生物公司,兔抗小鼠 GAPDH 多克隆抗体(批号:161802)、兔抗小鼠 HIF-1 α 多克隆抗体(批号:AC2103033E)、辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔二抗(批号:CR2104081)购自武汉塞维尔生物科技有限公司,兔抗小鼠 Bmal1 多克隆抗体(批号:00011253)、兔抗小鼠 VEGF 多克隆抗体(批号:4000003012)购自武汉爱博泰克生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和转染

结直肠癌细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640

培养基接种于 T25 培养瓶中,培养在含 5% CO₂、37 °C 恒温培养箱中,选择处于对数生长期的细胞接种于 6 孔板中,待细胞生长至汇合度为 60%~70% 时进行转染,转染操作步骤按照 HiPerFect Transfection Reagent 转染试剂说明书进行,将转染 Bmal1 siRNA 细胞记为敲除组,将转染阴性对照 negative control siRNA 的细胞记为对照组。siRNA Bmal1 序列,上游引物:5'-CCG AGG GAA GAU ACU CUU UTT-3';下游引物:5'-AAA GAG UAU CUU CCC UCG GTC-3'。

1.2.2 细胞 X 射线照射实验

将转染后的结直肠癌细胞接种于 6 孔板中,进行放射处理。用直线加速器,照射源至细胞培养板的距离为 100 cm,照射野的面积为 10 cm \times 10 cm。根据实验需要给予合适的射线剂量,6MV X 射线,总剂量 6 Gy 照射处理。把细胞分为对照组、Bmal1 基因敲除组(敲除组)、放疗组、Bmal1 基因敲除联合放疗组(联合组)。

1.2.3 CCK-8 检测各组细胞增殖能力

各组细胞经过照射后,吸去 6 孔板中旧培养基,用 PBS 清洗 2 遍,收集细胞悬液转移至 10 mL 离心管中,1 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,用 1 mL 完全培养液重悬,反复轻轻吹打细胞,取 10 μ L 进行细胞计数,每孔吸取 1 \times 10⁴ 个细胞接种到 96 孔板,每组设 3 个复孔,以细胞贴壁为 0 h,每孔加 10 μ L CCK-8 溶液,在培养箱继续培养 2 h 后,用酶标仪在 450 nm 处测每孔细胞光密度(OD)值,依次在 24、48 h 时测每组细胞的 OD 值。

1.2.4 RT-qPCR 检测各组细胞 Bmal1、HIF-1 α 、VEGF mRNA 的表达水平

采用 TRIzol 法提取各组细胞的总 RNA,用反转录试剂盒合成 cDNA,以 cDNA 为模板,采用 qPCR 试剂盒检测各组细胞中 Bmal1、HIF-1 α 、VEGF 的 mRNA 表达水平,按照说明书加试剂进行 PCR 反应,引物序列见表 1。

1.2.5 Western blot 检测各组细胞 Bmal1、HIF-1 α 、VEGF 蛋白的表达水平

向 6 孔板细胞中加入细胞裂解液,提取各组细胞总蛋白。用蛋白质定量试剂盒(BCA 法)检测蛋白水平,分别取各个蛋白样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,切胶后转膜至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,在 5% 脱脂

奶粉中封闭 1 h。用 Tris-HCl 盐加吐温缓冲液 (TBST) 洗膜 3 次, 10 min / 次, 加入一抗 (1 : 1 000 稀释) 杂交, 4 °C 过夜孵育。加入二抗 (1 : 3 000 稀释) 杂

交, 室温孵育 1 h。曝光、显影。用 Image J 软件分析每组各个蛋白条带灰度值, 目的蛋白相对表达量 = 目的蛋白的灰度值 / 内参 GAPDH 的灰度值。

表 1 引物序列 (5'-3')

基因	上游引物	下游引物	产物大小(bp)
GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG	140
Bmal1	TGCCACCAATCCATACACAG	TTCCCTCGGTACATCCTAC	120
HIF-1 α	AATGAAGTGTACCCTAACTAGCCG	GTTCAAAATCAGCACCAAGC	90
VEGF	ACAACAAATGTGAATGCAGACCA	GAGGCTCCAGGGCATTAGAC	130

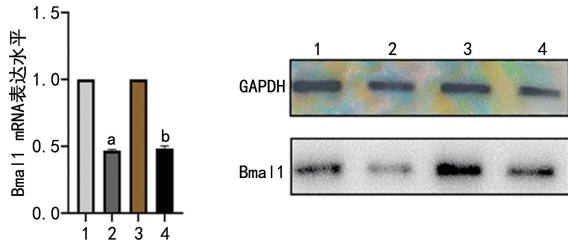
1.3 统计学处理

采用软件 GraphPad Prism 8 软件分析各组数据, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间差异用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞 Bmal1 mRNA 和蛋白表达水平比较

RT-qPCR 和 Western blot 检测结果显示, 与对照组比较, 敲除组细胞 Bmal1 mRNA 和蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.05$); 与放疗组比较, 联合组细胞 Bmal1 mRNA 和蛋白表达水平均明显降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 1。

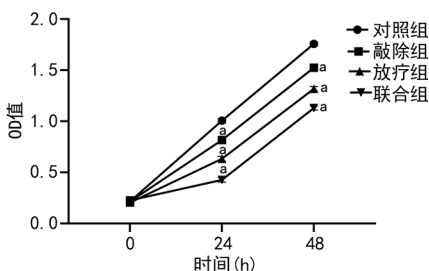


1: 对照组; 2: 敲除组; 3: 放疗组; 4: 联合组; ^a: $P < 0.05$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与放疗组比较。

图 1 各组细胞 Bmal1 mRNA 和蛋白表达水平

2.2 各组细胞增殖能力比较

CCK-8 检测各组细胞 OD 值结果显示, 0 h 各组细胞 OD 值比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。24 h 后 4 组细胞增殖能力大小依次为: 对照组细胞最强, 其次为敲除组、放疗组, 增殖能力最低的为联合组细胞, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 2。



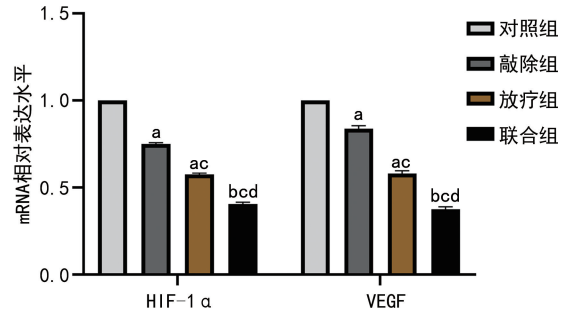
^a: $P < 0.05$, 与对照组比较。

图 2 各组细胞增殖能力比较

2.3 各组细胞 HIF-1 α 、VEGF mRNA 表达水平比较

RT-qPCR 检测结果显示, HIF-1 α 、VEGF mRNA

的表达水平均在联合组细胞最低, 分别是对照组细胞的 0.40、0.38 倍, 其次是放疗组、敲除组, 对照组细胞表达水平均最高, 各组细胞 HIF-1 α 、VEGF mRNA 比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 3。

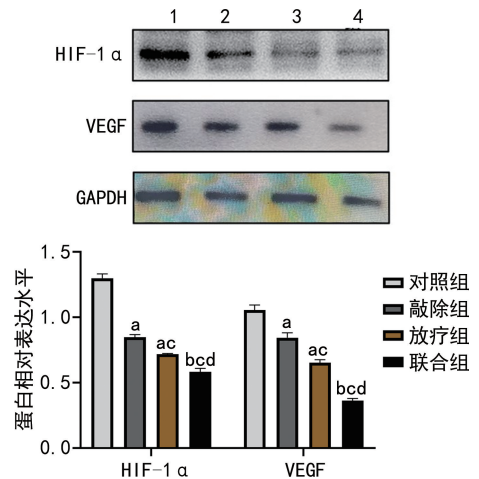


^a: $P < 0.05$, ^b: $P < 0.01$, 与对照组比较; ^c: $P < 0.05$, 与敲除组比较; ^d: $P < 0.05$, 与放疗组比较。

图 3 HIF-1 α 和 VEGF mRNA 表达水平比较

2.4 各组细胞 HIF-1 α 、VEGF 蛋白表达水平比较

Western blot 结果显示, HIF-1 α 、VEGF 蛋白的表达水平均在对照组最高, 而在联合组表达水平最低, 分别是对照组细胞的 0.45、0.35 倍, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。同时放疗组和敲除组 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白的表达水平均明显低于对照组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 4。



1: 对照组; 2: 敲除组; 3: 放疗组; 4: 联合组; ^a: $P < 0.05$, ^b: $P < 0.01$, 与对照组比较; ^c: $P < 0.05$, 与敲除组比较; ^d: $P < 0.05$, 与放疗组比较。

图 4 各组细胞 HIF-1 α 和 VEGF 表达水平比较

3 讨 论

随着放射技术和设备的发展,放疗作为结直肠癌重要的治疗手段,在一定程度上提高了患者的生存率,但是放射抵抗的出现,会使部分患者发生复发与转移,是导致治疗失败的原因之一。由此,本课题组猜测是否存在一种对正常组织细胞损害相对最小,而杀伤肿瘤效果最好的影响放疗诱导的肿瘤细胞凋亡的机制。寻找对肿瘤细胞产生最大毒性的同时尽量避免放疗抵抗的方法,可以突破放疗的局限性,对增加放疗敏感性具有重大意义。

2017 年 3 位科学家因揭示了生物钟基因调控生物体昼夜节律性的奥秘而获得了诺贝尔医学奖。节律基因 Bmal1 作为昼夜节律的核心元件之一,与肿瘤发生、发展的关系错综复杂,可作为抑癌基因或促癌基因,一项关于乳腺癌的研究表明,早晨放疗有更多的毒副作用,这与节律基因 Per3 突变有关^[5]。但是关于 Bmal1 基因是否对结直肠癌放疗的敏感性产生影响还少见报道,本研究通过 RNA 转染技术敲除 Bmal1 基因,旨在探索 Bmal1 是否可以通过 HIF-1 α /VEGF 信号通路调节结直肠癌细胞的放疗敏感性。

放疗对于肿瘤患者治疗的有效性取决于其破坏肿瘤细胞 DNA 的能力,放疗抵抗性的出现部分原因是肿瘤细胞高效和多余的 DNA 修复能力^[6],而 DNA 修复基因在 mRNA 和蛋白表达上有周期性的表达模式^[7-8]。近年来,有研究发现下调节律基因 Per1 可以减轻胶质瘤细胞的 DNA 损伤,使肿瘤细胞更不容易受到放疗导致的凋亡和其他损伤效应的影响^[9]。本研究通过 CCK-8 细胞增殖实验,结果发现敲除组、放疗组与对照组细胞相比,OD 值均降低,提示敲除 Bmal1 和放疗都可以抑制结直肠癌细胞的增殖能力;联合组细胞比其他 3 组细胞的增殖能力都低,提示 Bmal1 基因可以参与放疗敏感性的调控。这些结果表明,敲除 Bmal1 基因可以通过抑制结直肠癌细胞的增殖能力从而增加对放疗的敏感性。也有研究发现,Bmal1 基因过表达可以增强鼻咽癌的放疗敏感性^[10],可能与 P53、P21 蛋白上调有关,与本研究的结果不同可能是由于肿瘤细胞的种类和调控的分子机制不同导致。

一项大规模的癌症生物信息学分析发现,肿瘤缺氧的标志物 HIF 和 VEGF,与昼夜节律失调之间存在关联,包括昼夜节律抑癌因子的缺失或昼夜节律促癌因子的激活,HIF 可以改变昼夜节律^[11-12]。昼夜节律也会影响 HIF-1 α 的缺氧反应,此外,在 HIF-1 α 基因的启动子上有一个 E-box,表明 Clock/Bmal1 可以诱导 HIF-1 α 的表达^[13]。也有研究发现,在小鼠体内节律基因 Cry1 可以直接与 HIF-1 α 蛋白结合,从而抑制靶基因 HIF-1 α 的表达^[14]。基于以上学者的研究,本研究 RT-qPCR 和 Western blot 检测结果显示,无论是否经过放疗处理,与对照组比较,Bmal1 基因敲除

后 HIF-1 α 和 VEGF mRNA 和蛋白的相对表达水平均降低,提示节律基因 Bmal1 可以调控 HIF-1 α /VEGF 信号通路。MA 等^[15]学者研究发现,敲除 Bmal1 基因可以降低 HIF-1 α 和 VEGF 的表达,从而影响软骨细胞的发育^[15]。

本研究通过 RT-qPCR 和 Western blot 检测技术,结果显示,无论有无敲除 Bmal1 基因,放疗组比对照组的 HIF-1 α 和 VEGF 的 mRNA 和蛋白表达水平均明显降低($P < 0.05$),提示 HIF-1 α 和 VEGF 的表达水平与放疗敏感性相关,表明 HIF-1 α /VEGF 通路可以参与调节结直肠癌放疗敏感性。有研究发现,宫颈癌在放疗过程中,HIF-1 α 和 VEGF 可以预测宫颈癌患者放疗效果及患者预后^[16];在宫颈鳞癌中放疗缓解患者组织中 HIF-1 α 和 VEGF 的表达阳性率明显低于放疗未缓解患者^[17]。彭明尧等^[18]证实了食管鳞癌患者肿瘤组织中 HIF-1 α 、VEGF 的阳性表达与近期放疗效果密切相关。

本研究结果显示,Bmal1 基因敲除联合放疗细胞的 HIF-1 α 和 VEGF 表达水平比单纯放疗和 Bmal1 基因敲除细胞均降低($P < 0.05$),且与对照组比较明显降低($P < 0.01$),说明敲除 Bmal1 基因可以通过调控 HIF-1 α /VEGF 信号通路来增加对结直肠癌细胞放疗的敏感性。

综上所述,本研究从细胞和分子水平上,来观察 Bmal1 基因对结直肠癌细胞放疗敏感性的影响,本研究结果显示,节律基因 Bmal1 为改善结直肠癌放疗效果提供了一定的理论基础,但参与结直肠癌放疗敏感性调节的其他可能的分子机制还有待进一步探索。

参考文献

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6):394-424.
- [2] DIERICKX P, VAN L L, GEIJSSEN N. Circadian clocks; from stem cells to tissue homeostasis and regeneration[J]. EMBO Rep, 2018, 19(1): 18-28.
- [3] SHOSTAK A, BRUNNER M. Help from my friends-cooperation of BMAL1 with noncircadian transcription factors[J]. Genes Dev, 2019, 33(5/6):255-257.
- [4] KOJETIN D J, BURRIS T P. REV-ERB and ROR nuclear receptors as drug targets[J]. Nat Rev Drug Discov, 2014, 13(3):197-216.
- [5] JOHNSON K, CHANG-CLAUDE J, CRITCHLEY A M, et al. Genetic variants predict opti-

- mal timing of radiotherapy to reduce side-effects in breast cancer patients[J]. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 2019, 31(1):9-16.
- [6] BIAU J, CHAUTARD E, VERRELLE P, et al. Altering DNA repair to improve radiation therapy: specific and multiple pathway targeting[J]. *Front Oncol*, 2019, 9:1009.
- [7] WANG J, MAUVOISIN D, MARTIN E, et al. Nuclear proteomics uncovers diurnal regulatory landscapes in mouse liver[J]. *Cell Metab*, 2017, 25(1):102-117.
- [8] MURE L S, LE H D, BENEGLIAMO G, et al. Diurnal transcriptome Atlas of a Primate across major neural and peripheral tissues[J]. *Science*, 2018, 359(6381):eaao0318.
- [9] ZHU L, WANG Q, HU Y, et al. The circadian gene *per1* plays an important role in Radiation-Induced apoptosis and DNA damage in glioma[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2019, 20(7):2195-2201.
- [10] 孟熙, 李媛媛, 蒋子庆, 等. 时钟基因 *Bmal1* 对鼻咽癌移植瘤放疗敏感性的影响[J]. *中国肿瘤临床*, 2020, 47(1):12-17.
- [11] CHANG W H, LAI A G. Timing gone awry: distinct tumour suppressive and oncogenic roles of the circadian clock and crosstalk with hypoxia signalling in diverse malignancies[J]. *J Transl Med*, 2019, 17(1):132.
- [12] ADAMOVICH Y, LADEUX B, SOBEL J, et al. Oxygen and Carbon dioxide rhythms are circadian clock controlled and differentially directed by behavioral signals[J]. *Cell Metab*, 2019, 29(5):1092-1103.
- [13] WU Y, TANG D, LIU N, et al. Reciprocal regulation between the circadian clock and hypoxia signaling at the genome level in mammals[J]. *Cell Metab*, 2017, 25(1):73-85.
- [14] DIMOVA E Y, JAKUPOVIC M, KUBAICHUK K, et al. The circadian clock protein *CRY1* is a negative regulator of *HIF-1 α* [J]. *iScience*, 2019, 13:284-304.
- [15] MA Z M, JIN X, ZHUANG Q, et al. Deletion of clock gene *Bmal1* impaired the chondrocyte function due to disruption of the *HIF1 α* -*VEGF* signaling pathway[J]. *Cell Cycle*, 2019, 18(13):1473-1489.
- [16] WAN K M, OEHLER M K. Rapid progression of Low-Grade cervical dysplasia into invasive cancer during natalizumab treatment for relapsing remitting multiple sclerosis[J]. *Case Rep Oncol*, 2019, 12(1):59-62.
- [17] 潘秀花, 白力, 谢福川, 等. 宫颈鳞癌患者组织中 *HIF-1 α* 和 *VEGF* 的表达及在放疗中的意义[J]. *实用癌症杂志*, 2020, 35(3):366-369.
- [18] 彭明尧, 周雪宇, 蒋利华. *VEGF*、*HIF-1 α* 表达对食管鳞癌患者放疗疗效的影响[J]. *实用癌症杂志*, 2020, 35(10):1631-1634.

(收稿日期:2021-11-21 修回日期:2022-04-15)

(上接第 2543 页)

- [27] QI S R, CUI Y J, LIU J X, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG components, SLP, gDNA and CpG, exert protective effects on mouse macrophages upon lipopolysaccharide challenge[J]. *Lett Appl Microbiol*, 2020, 70(2):118-127.
- [28] 迟涛, 徐晓娟, 刘洋硕, 等. 干酪乳杆菌 *yha I* 基因敲除菌株的构建及其耐药表型的分析[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(6):106-110.
- [29] DE WAARD R, CLAASSEN E, BOKKEN G C, et al. Enhanced immunological memory responses to *Listeria monocytogenes* in rodents, as measured by delayed-type hypersensitivity (DTH), adoptive transfer of DTH, and protective immunity, following *Lactobacillus casei* Shirota ingestion[J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2003, 10(1):59-65.
- [30] 杨素芳, 陈旭丰, 杨志叶, 等. 绞股蓝黄芪保健茶对免疫功能的影响[J]. *安徽农学通报*, 2018, 24(8):48-51.
- [31] 杨志杰, 樊星花, 梁宇红. 落地生根水提物对 H22 肝癌小鼠免疫功能的影响分析[J]. *医药前沿*, 2019, 9(32):206-208.
- [32] 张梦兰, 杨琴, 张冰洁, 等. 牡丹籽油复方软胶囊增强免疫力的功能研究[J]. *中国油脂*, 2019, 44(11):121-126.
- [33] 郭帅, 韩之皓, 白梅, 等. 嗜热链球菌 S10 复合植物乳杆菌 P-8 发酵豆乳中挥发性风味物质的 SPME-GC-MS 分析[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(10):268-279.

(收稿日期:2021-11-18 修回日期:2022-04-24)