



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20160080

## GSNO 通过亚硝酰化抑制 Myocardin 诱导的心肌肥厚

郑德亮, 廖兴华, 魏兆强, 杜福, 周浩, 张同存

(工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津市工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

**摘要:** Myocardin 可以诱导心肌肥厚, 而一氧化氮(NO)对于心肌具有一定保护作用, 但在心肌肥厚发生的过程中, NO 的作用尚未报道. 本文首先用 NO 荧光探针检测亚硝基谷胱甘肽(S-Nitrosoglutathione, GSNO)处理能够引起 H9c2 细胞中 NO 总含量的上升. 随后利用 200  $\mu\text{mol/L}$  GSNO 处理细胞, 检测发现 Myocardin 可以发生亚硝酰化修饰, 同时心肌肥厚标志基因  $\alpha\text{-MHC}$  在 mRNA 水平和蛋白水平的表达均下调. 最后通过荧光素酶报告分析、RT-PCR 以及 Western blot 分析表明, 过表达 Myocardin 可以激活 GSNO 还原酶(GSNO reductase, GSNOR)的表达, 并且降低细胞内 NO 总量. 以上结果表明, 亚硝酰化可以抑制由 Myocardin 诱导的心肌肥厚的发生, 同时 Myocardin 可以激活 GSNOR 的转录, 间接抑制 GSNO 对 Myocardin 的作用.

**关键词:** 亚硝酰化; Myocardin; GSNO; GSNOR

中图分类号: Q28 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2017)04-0030-06

## GSNO Inhibiting Myocardin Induced Cardiomyocyte Hypertrophy Via S-nitrosylation

ZHENG Deliang, LIAO Xinghua, WEI Zhaoqiang, DU Fu, ZHOU Hao, ZHANG Tongcun

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** Myocardin can induce cardiomyocyte hypertrophy and nitric oxide can protect cardiac tissue, but the effect of NO on cardiomyocyte hypertrophy remains unclear. First, in this research, NO fluorescent probe was used to detect the level of NO in H9c2 cells. The results show that the NO level was significantly increased after S-Nitrosoglutathione (GSNO) treatment. Myocardin could be S-nitrosylated and modified when the cells were treated with 200  $\mu\text{mol/L}$  GSNO, and inhibited  $\alpha\text{-MHC}$  expression in both mRNA and protein. Finally, overexpressing Myocardin can activate the transcription of GSNO reductase (GSNOR) expression and reduce the amount of intracellular NO. In conclusion, S-nitrosylation can inhibit hypertrophy induced by Myocardin. Myocardin can activate GSNOR transcription and indirectly inhibit GSNO's effect on Myocardin.

**Key words:** S-nitrosylation; Myocardin; GSNO; GSNOR

心肌肥厚是心脏应对如高血压、主动脉狭窄和心肌梗塞等疾病的一种代偿性功能, 主要发生在长期压力负荷过重的情况下, 对于疾病有缓解作用<sup>[1-3]</sup>. 但是, 由于心肌细胞体积增大和质量增加, 冠状动脉的供血量往往不能满足, 造成心肌缺血, 严重时更有可能发生心肌梗死<sup>[4]</sup>.

Myocardin 是血清应答因子 (serum response fac-

tor, SRF) 的一种辅转录因子, 在心肌细胞和平滑肌细胞中特异性表达<sup>[5]</sup>. 研究<sup>[6]</sup>表明, 在心肌细胞中过表达 Myocardin 会引起其下游如心房钠因子 (atrial natriuretic factor, ANF)、 $\alpha\text{-}$ 肌球蛋白重链 (myosin heavy chain,  $\alpha\text{-MHC}$ ) 等靶基因的上调, 从而诱导心肌肥厚.

蛋白质巯基亚硝酰化 (S-nitrosylation) 是指一氧

收稿日期: 2016-03-09; 修回日期: 2016-05-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31171303)

作者简介: 郑德亮 (1990—), 男, 甘肃人, 硕士研究生; 通信作者: 张同存, 教授, tony@tust.edu.cn

化氮(NO)作用于蛋白质半胱氨酸残基的一种修饰过程,是近年来新近发现的蛋白质翻译后修饰方式. 研究<sup>[7-8]</sup>发现,NO通过蛋白质巯基亚硝酰化修饰进行氧化还原信号转导调控,进而影响蛋白质的表达、构象、活性和功能. Sun等<sup>[9]</sup>研究发现,心肌组织蛋白亚硝酰化水平的升高,可引起心肌组织中多个蛋白发生亚硝基化修饰并影响其活性功能,从而减轻心肌缺血再灌注损伤.

Myocardin在心肌肥厚的发生与发展过程中有着至关重要的作用,但其亚硝酰化在心肌肥厚中的作用仍不清楚. 因此,本文首先检测对比H9c2细胞中NO含量,再用NO供体亚硝基谷胱甘肽(S-Nitrosoglutathione, GSNO)处理细胞,进一步检测相关蛋白的活性与表达,以研究亚硝酰化在心肌肥厚中的作用.

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 细胞株

H9c2细胞株为本实验室保藏,在DMEM/HG培养基中加入体积分数为10%的胎牛血清、1%青霉素-链霉素溶液(100×),于37℃、5%CO<sub>2</sub>的环境下培养.

#### 1.1.2 主要试剂

DMEM/HG培养基, Gibco公司;胎牛血清,浙江天杭生物科技有限公司;GSNO, Santa cruz公司;Myocardin抗体、 $\alpha$ -MHC抗体、GSNOR抗体, Abcam公司;M-MLV逆转录酶、Trizol裂解液,上海英俊生物技术有限公司;随机引物B0043,上海生工生物工程有限公司; dNTP、限制性内切酶、T4连接酶, Solarbio公司;荧光素酶报告基因检测试剂盒, Promega公司.

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 细胞加药处理

将H9c2以 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 的密度接种于6孔板,分为2组:对照组,无血清DMEM/HG处理细胞;GSNO组,加GSNO(终浓度200  $\mu\text{mol/L}$ )于无血清的DMEM/HG中. 处理细胞1h或12h,收集上述细胞进行后续实验.

#### 1.2.2 RNA的提取

用1 mL Trizol裂解液在冰上裂解细胞20 min,重复吹悬使细胞充分裂解,加入0.2 mL的氯仿,剧烈振荡15 s,静置5 min, 4℃、12 000 r/min离心

15 min. 取上层水相到另一EP管中,加入等体积的异丙醇,混匀, -20℃放置30 min. 12 000 r/min离心10 min,弃掉上清液,加入体积分数75%乙醇1 mL洗涤RNA,离心弃上清液,室温晾干RNA. 加入20  $\mu\text{L}$  焦碳酸二乙酯水(DEPC)溶解RNA,放于-80℃保存.

#### 1.2.3 RNA逆转录及逆转录PCR(RT-PCR)

将提取的RNA用M-MLV逆转录方法进行逆转录. RNA 2  $\mu\text{g}$ 、随机引物(B0043)5  $\mu\text{L}$ , 70℃水浴5 min后迅速冰浴. 加入10 mol/L dNTPs 5  $\mu\text{L}$ 、5×buffer 5  $\mu\text{L}$ 、RNase inhibitor 0.625  $\mu\text{L}$ 、M-MLVRT 1  $\mu\text{L}$ 混匀,37℃反应1 h. 70℃保持10 min终止反应.

取1  $\mu\text{L}$ 产物进行RT-PCR扩增,以GAPDH作为内对照,扩增体系为25  $\mu\text{L}$ :双蒸水16.5  $\mu\text{L}$ , 10 mmol/L dNTP 2  $\mu\text{L}$ ,上、下游引物各1  $\mu\text{L}$ (100  $\mu\text{mol/L}$ )10×PCR缓冲液2.5  $\mu\text{L}$ ,模板、酶各1  $\mu\text{L}$ . PCR条件:95℃预变性5 min,95℃变性30 s,共28个循环,相应退火温度30 s,72℃延伸45 s;最后72℃延伸10 min. GAPDH(262 bp)上游引物5'-ATTCAACGGCACAGTCAAGG-3', GAPDH下游引物5'-GCAGAAGGGGCGGAGATGA-3';退火温度54℃;Myocardin上游引物5'-GCAGCAATGACTCGG-3', Myocardin下游引物5'-ACTGTCGTTGGCGTAG-3';退火温度56℃; $\alpha$ -MHC上游引物5'-GAAGAACGCCCAAGCCAC-3',  $\alpha$ -MHC下游引物5'-TCCTCTGCGTTCCTACTACTCC-3';退火温度54℃. GSNOR上游引物5'-TGCCGTCCTTGGTCTG-3', GSNOR下游引物5'-CTCCATCGGTCATCTC-3';退火温度54℃.

#### 1.2.4 免疫印迹实验(Western blot)

收集各组细胞,PBS洗1次,SDS细胞裂解液冰上裂解细胞30 min,沸水浴变性15 min,12% SDS-PAGE电泳,电转法将蛋白转至NC膜. 5%的脱脂奶粉室温封闭1 h后,分别用 $\beta$ -actin抗体(1:500)、 $\alpha$ -MHC抗体(1:1 000)、Myocardin抗体(1:1 000)4℃孵育过夜,PBS洗3次,每次5 min,IRDye<sup>®</sup>800CW山羊抗鼠抗体(1:5 000)、IRDye<sup>®</sup>680山羊抗兔抗体(1:5 000)室温孵育2 h后,PBS洗3次,每次5 min,Odyssey成像系统扫膜成像.

#### 1.2.5 细胞内NO含量检测

将H9c2细胞以 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 的密度接种6孔板,用药物对细胞进行诱导刺激24 h,再去除细胞培养基,将NO荧光探针以1:1 000稀释后加入细胞

装载探针,每孔 1 mL,置于细胞培养箱内孵育 20 min,用 PBS 洗涤细胞 3 次,收集细胞在荧光酶标仪上进行检测.

1.2.6 重组质粒的构建

利用生物信息学方法,在 NCBI 网站获得 GSNOR 启动子序列.设计启动子扩增引物序列.GSNOR 上游引物 5'-CGAGGTACCCAGAAATCCA GTAGGCAGTT-3'(kpn I),GSNOR 下游引物 5'-TATACGCGTATGTTTCACGGATTCTGGTCG-3'(mlu I).PCR 反应条件:95 °C 5 min;95 °C 1 min,56 °C 60 s,72 °C 90 s,35 次循环;72 °C 10 min.以大鼠基因组为模板,按上述 PCR 条件扩增后,纯化 PCR 产物.用相应限制性内切酶酶切,将酶切产物与用同样限制性内切酶酶切的 pGL3-Basic 质粒用 T4 DNA 连接酶在 16 °C 连接过夜.转化 DH5α,在氨苄青霉素抗性平板上挑选单克隆后,在 LB 培养基中,37 °C 扩大培养 12 h,提取质粒,双酶切验证,DNA 测序.

1.2.7 瞬时共转染实验检测

瞬时共转染实验检测荧光素酶报告基因的表达.将 H9c2 细胞在转染前 12 h 以每孔 1 × 10<sup>5</sup> mL<sup>-1</sup> 的密度接种到 24 孔板,待细胞融合至 80% 时更换为无血清 DMEM 培养基.按 Lipo2000 使用说明书进行细胞转染,每孔转染 GSNOR 启动子质粒 0.5 μg,Myocardin 表达质粒以 0.1 μg 递增,浓度梯度(0 ~ 0.5 μg)转染.以 pcDNA3.1a 调平,加入 2 μL 转染试剂混匀后孵育 20 min;加入细胞无血清培养基孵育 6 h;更换含体积分数 10% 血清的 DMEM/HG 培养 24 h.按荧光素酶报告检测系统检测荧光素酶活性,蛋白质定量试剂盒检测蛋白质含量,计算相对荧光素酶的活性.

1.3 统计分析

所有实验数据均用 SPSS 17.0 统计软件计算,以“平均值 ± 标准差”表示.用 t 检验显著性,\*P < 0.05 表示统计学上有显著性差异,\*\*P < 0.01 表示统计学上有极显著性差异.

2 结果与分析

2.1 GSNOR 的 NO 释放量

为探究 GSNOR 处理后 H9c2 细胞内的 NO 浓度,利用 NO 荧光探针检测了 200 μmol/L GSNOR 处理 12 h 后 H9c2 细胞内的 NO 含量,结果如图 1 所示.由图 1 可知,与对照组相比,GSNOR 处理可以使

H9c2 细胞内的 NO 含量显著上升.

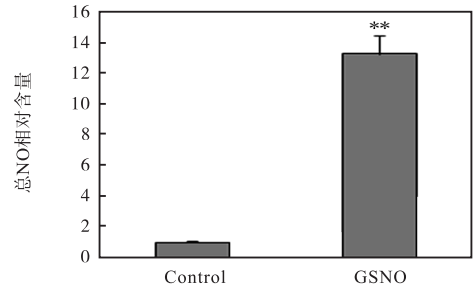


图 1 H9c2 细胞内总 NO 含量  
Fig. 1 Total level of NO in H9c2 Cells

2.2 GSNOR 对心肌肥厚标志基因的影响

α-MHC 是心肌肥厚重要的标志基因之一,该基因表达水平反映了心肌肥厚发生的程度.利用 RT-PCR 和 Western blot 检测 H9c2 细胞的心肌肥厚标志基因 α-MHC 的 mRNA 水平和蛋白水平的表达.结果如图 2 所示:用 200 μmol/L GSNOR 处理细胞 1 h,对照组用 DMSO 处理相同时间,提取细胞总 RNA,逆转录 RT-PCR 分析,GSNOR 处理组的 α-MHC mRNA 水平明显下调.随后,以相同浓度 GSNOR 处理 H9c2 细胞 12 h,SDS 裂解液裂解细胞收集总蛋白,Western blot 结果如图 3 所示:GSNOR 处理组的 α-MHC 蛋白水平也出现明显下调.

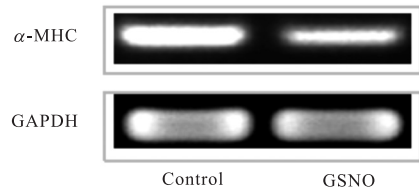


图 2 GSNOR 抑制心肌肥厚 marker α-MHC mRNA 表达水平

Fig. 2 GSNOR inhibiting the mRNA level of cardiomyocyte hypertrophy marker

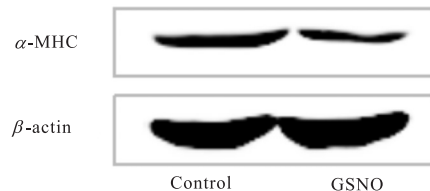


图 3 GSNOR 抑制心肌肥厚 marker α-MHC 蛋白表达水平

Fig. 3 GSNOR inhibiting the protein level of cardiomyocyte hypertrophy marker

2.3 Myocardin 亚硝酰化的检测

Myocardin 在调节心肌肥厚的过程中具有重要的

作用,能够上调其心肌肥厚相关基因的表达,而亚硝酰化修饰能调节蛋白的活性及蛋白-蛋白相互作用,因此利用生物素法检测 Myocardin 亚硝酰化水平<sup>[10-12]</sup>. GSNO 诱导 Myocardin 亚硝酰化结果如图 4 所示,GSNO 处理细胞使 Myocardin 出现明显的亚硝酰化修饰.同时,过表达 Myocardin 后,由 GSNO 诱导的 $\alpha$ -MHC 的下调作用被抑制,说明 Myocardin 的过表达可能激活了某种抑制 GSNO 的蛋白表达,后者对 GSNO 起到了一定的抑制作用,从而抑制了 GSNO 对 $\alpha$ -MHC 的下调作用(图 5).

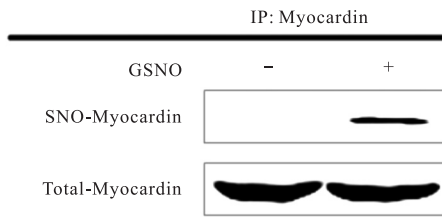


图 4 GSNO 诱导 Myocardin 亚硝酰化  
Fig. 4 GSNO induced Myocardin S-nitrosylation

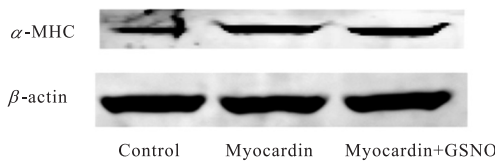


图 5 过表达 Myocardin 逆转 GSNO 诱导的 $\alpha$ -MHC 下调  
Fig. 5 Myocardin overexpression reversing GSNO induced reduction of  $\alpha$ -MHC

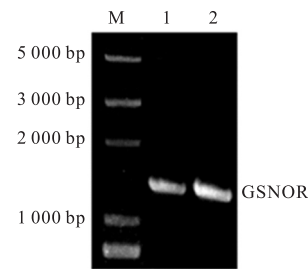
2.4 Myocardin 促进 GSNOR 表达

亚硝基谷胱甘肽还原酶(GSNO reductase, GSNOR)在体内能够还原 GSNO,使其失去提供 NO 的能力<sup>[13-14]</sup>. 在 NCBI 数据库获得 GSNOR 启动子序列,分析发现其中含有 9 个 CarG box,为探究 Myocardin 是否能够激活 GSNOR 基因,从 H9c2 细胞中获得大鼠基因组序列后,利用 PCR 方法获得目的基因片段(启动子区域-1 263 ~ +91 的片段,其中包含-1169 的 CarG box),在 1 000 bp 位置上方有一明显条带,与设计的片段 1 355 bp 大小基本一致,连接 pGL3-Basic 质粒经双酶切和测序验证,确定为所需目的片段(图 6).

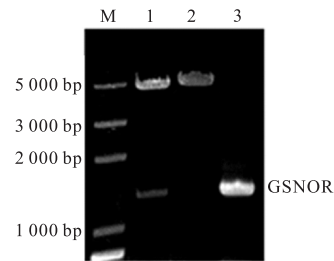
2.5 Myocardin 对 GSNOR 基因启动子活性的影响

在 H9c2 细胞中,通过脂质体转染 Myocardin 表达质粒以及 GSNOR 启动子质粒,24 h 后荧光素酶活性分析结果如图 7 所示.与转染 pcDNA3.1a 对照组相比,过表达 Myocardin 基因后 GSNOR 启动子荧光素酶活性随 Myocardin 质粒的质量增加而升高.过表

达 Myocardin 上调 GSNOR mRNA 水平和蛋白水平的表达,证明 Myocardin 可以激活 GSNOR 的表达(图 8). Myocardin 对 GSNOR 的激活作用抑制了 GSNO,从而降低细胞内 NO 的总量(图 9).



M. marker 5 000 bp; 1—2. GSNOR  
(a) PCR 获得目的基因



M. marker 5 000 bp; 1. GSNOR 转化子经 *kpn* I 和 *mlu* I 酶切结果; 2. 经 *kpn* I 和 *mlu* I 酶切的线性 pGL3; 3. GSNOR 基因 PCR 条带

(b) 双酶切验证

图 6 重组质粒的构建

Fig. 6 Construction of recombinant plasmids

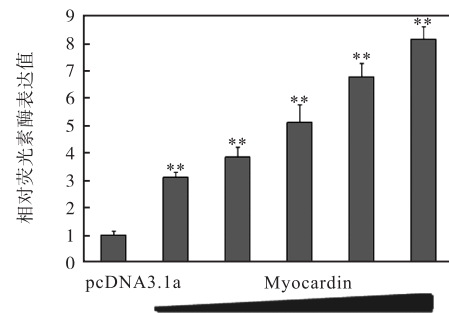
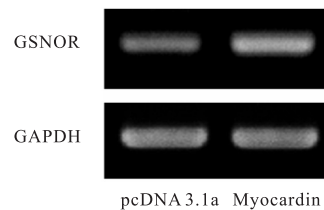
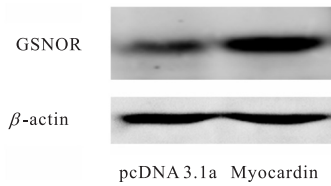


图 7 Myocardin 对 GSNOR 启动子的荧光素酶活性的影响

Fig. 7 Effect of Myocardin on relative luciferase activities of GSNOR promoter



(a) GSNOR mRNA 水平的上调



(b) GSNOR 蛋白水平的上调

图 8 Myocardin 上调 GSNOR 的表达

Fig. 8 Myocardin promoting the expression of GSNOR

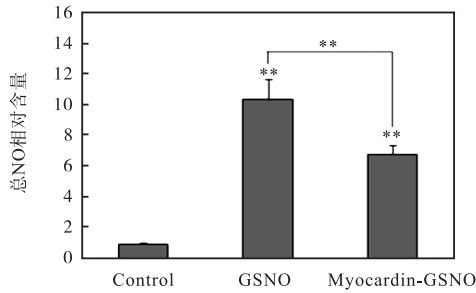


图 9 Myocardin 抑制 GSNO 释放 NO

Fig. 9 Myocardin inhibiting GSNO from releasing NO

### 3 讨论

Myocardin 在细胞核内通过其谷氨酰胺富含域参与 SRF 相互作用,二者形成复合物绑定在下游基因启动子序列上的 CarG box,激活相关基因的转录,如心肌肥厚标志基因 ANF、α-MHC 以及平滑肌细胞分化标志基因 SM22、ACTA2 等<sup>[15]</sup>。因此,在 Myocardin 激活其下游靶基因转录的过程中,Myocardin 的蛋白构象的稳定性至关重要,亚硝酰化是 NO 分子结合蛋白质残基半胱氨酸巯基的过程<sup>[16]</sup>,Myocardin 亚硝酰化修饰抑制了其对于心肌肥厚标志基因的转录激活作用,使 α-MHC 的表达受到抑制。本文结果表明 GSNO 处理细胞会引起 Myocardin 的亚硝酰化修饰并且会影响 Myocardin 的转录激活活性,但是具体的修饰位点及蛋白构象的变化尚未确定,而过表达 Myocardin 可以逆转由 GSNO 抑制的心肌肥厚标志基因 α-MHC 的表达,说明 Myocardin 可能促进了 GSNOR 的表达。

GSNO 在体内作为一种小分子化合物受 GSNOR 的直接调控。GSNOR 为乙醇脱氢酶家族成员之一,在体内将 GSNO 还原为氧化性谷胱甘肽(GSSG),使其丧失释放 NO 的分子的功能,调节细胞内 NO 及亚硝酰化水平,保护机体免受亚硝酰化胁迫的影响<sup>[17]</sup>。GSNOR 启动子序列上含有数个 CarG box,本文研究表明过表达 Myocardin 可以激活 GSNOR 启动子活

性,并且在 mRNA 水平和蛋白水平的研究表明 Myocardin 会上调 GSNOR 的表达,说明 Myocardin 可以上调 GSNOR 的表达,间接抑制 GSNO 同时下调 GSNO 对 Myocardin 的抑制,形成一条反馈抑制途径。

### 参考文献:

[ 1 ] Li M, Wang N, Gong H Q, et al. Ca<sup>2+</sup> signal-induced cardiomyocyte hypertrophy through activation of myocardin[J]. Gene, 2015, 557(1): 43-51.

[ 2 ] Liao X H, Wang N, Liu Q X, et al. Myocardin-related transcription factor-A induces cardiomyocyte hypertrophy[J]. Iubmb Life, 2011, 63(1): 54-61.

[ 3 ] Akazawa H, Komuro I. Roles of cardiac transcription factors in cardiac hypertrophy[J]. Circulation Research, 2003, 92(10): 1079-1088.

[ 4 ] Frey N, Olson E N. Cardiac hypertrophy: The good, the bad, and the ugly[J]. Annual Review of Physiology, 2003, 65: 45-79.

[ 5 ] Wang D, Chang P S, Wang Z, et al. Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor[J]. Cell, 2001, 105(7): 851-862.

[ 6 ] Xing W, Zhang T C, Cao D, et al. Myocardin induces cardiomyocyte hypertrophy[J]. Circulation Research, 2006, 98(8): 1089-1097.

[ 7 ] Simon J N, Duglan D, Casadei B, et al. Nitric oxide synthase regulation of cardiac excitation-contraction coupling in health and disease[J]. Journal of Molecular & Cellular Cardiology, 2014, 73: 80-91.

[ 8 ] Bredt D S, Snyder S H. Nitric oxide: A physiologic messenger molecule[J]. Annual Review of Biochemistry, 1994, 63: 175-195.

[ 9 ] Sun J, Morgan M, Shen R F, et al. Preconditioning results in S-nitrosylation of proteins involved in regulation of mitochondrial energetics and calcium transport[J]. Circulation Research, 2007, 101(11): 1155-1163.

[ 10 ] Jones S P, Bolli R. The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection[J]. Journal of Molecular & Cellular Cardiology, 2006, 40(1): 16-23.

[ 11 ] Liao X H, Wang N, Zhao D W, et al. NF-κB(p65) negatively regulates myocardin-induced cardiomyocyte hypertrophy through multiple mechanisms [J]. Cellular Signalling, 2014, 26(12): 2738-2748.

[ 12 ] Mengel A, Chaki M, Shekariesfahlan A, et al. Effect of

- nitric oxide on gene transcription-S-nitrosylation of nuclear proteins[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2013, 4(2):140-144.
- [13] Haldar S M, Stamler J S. S-nitrosylation: Integrator of cardiovascular performance and oxygen delivery[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2013, 123(1):101-110.
- [14] Liu L, Hausladen A, Zeng M, et al. A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans[J]. *Nature*, 2001, 410(6827):490-494.
- [15] Wang D, Chang P S, Wang Z, et al. Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor[J]. *Cell*, 2001, 105(7):851-862.
- [16] Seth D, Stamler J S. The SNO-proteome: causation and classifications[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2011, 15(1):129-136.
- [17] Anand P, Stamler J S. Enzymatic mechanisms regulating protein S-nitrosylation: Implications in health and disease [J]. *Journal of Molecular Medicine*, 2012, 90(3):233-244.

责任编辑:郎婧

(上接第23页)

- [9] Lee C Y, Kuo S C, Teng C M, et al. Synthesis and anti-platelet activity of 9-benzyl-3-(hydroxymethyl)carbazoles[J]. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 2002, 54(1):25-34.
- [10] Albanese D, Landini D, Penso M, et al. Chemoselective N-alkylation of 2-hydroxycarbazole as a model for the synthesis of N-substituted pyrrole derivatives containing acidic functions[J]. *Tetrahedron*, 1995, 51(19):5681-5688.
- [11] Favia A D, Habrant D, Scarpelli R, et al. Identification and characterization of carprofen as a multitarget fatty acid amide hydrolase/cyclooxygenase inhibitor[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2012, 55(20):8807-8826.
- [12] Stresser D M, Turner S D, McNamara J, et al. A high-throughput screen to identify inhibitors of aromatase (CYP19) [J]. *Analytical Biochemistry*, 2000, 284(2):427-430.

责任编辑:郎婧

(上接第29页)

- [8] Fan P, He F, Yang Y, et al. In-situ microbial degumming technology with *Bacillus* sp. HG-28 for industrial production of ramie fibers[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2015, 97:50-58.
- [9] 石杰, 吴昌斌, 姬妍茹, 等. 亚麻脱胶微生物的筛选及应用研究[J]. *中国麻业科学*, 2013, 35(1):22-27.
- [10] 王贵宾. 大麻脱胶功能菌株的选育及在沤麻中的应用[D]. 哈尔滨:黑龙江大学, 2009.
- [11] Li Y, Pickering K L, Farrell R L. Analysis of green hemp fibre reinforced composites using bag retting and white rot fungal treatments[J]. *Industrial Crops and Products*, 2009, 29(2/3):420-426.
- [12] Zhang L L, Zhu R Y, Chen J Y, et al. Seawater-retting treatment of hemp and characterization of bacterial strains involved in the retting process[J]. *Process Biochemistry*, 2008, 43(11):1195-1201.
- [13] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 18147.2—2008 大麻纤维试验方法·第2部分:残胶率试验方法[S]. 北京:中国标准出版社, 2008.
- [14] 中国国家标准化管理委员会. GB 5889—86 苧麻化学成分定量分析方法[S]. 北京:中国标准出版社, 1986.
- [15] 东秀株, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社, 2001:353-363.
- [16] Ali M M. Aerobic bacteria involved in the retting of jute[J]. *Applied Microbiology*, 1958, 6(2):87-89.

责任编辑:郎婧