

# 嗜水气单胞菌脂多糖提取及毒性研究

## Study on extraction and toxicity of lipopolysaccharide from aeromonas hydrophila

蒋栋磊 刘 延 葛攀玮 吴满刚 葛庆丰 方维明

JIANG Dong-lei LIU Yan GE Pan-wei WU Man-gang GE Qing-feng FANG Wei-ming

(扬州大学食品科学与工程学院, 江苏 扬州 225127)

(School of Food Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225127, China)

**摘要:**以嗜水气单胞菌脂多糖(LPS)为研究对象,采用热酚水法提取及酶解法、氯仿/甲醇沉淀法纯化,测算LPS产率及样品中蛋白质、核酸含量,SDS-PAGE电泳银染法分析纯度。并通过巨噬细胞 Ana-1 模型来评价纯化 LPS 样品的毒性和生物活性。结果显示,纯化后 LPS 产率为 1.22%,蛋白质含量为 1.53%,核酸为 0.79%,SDS-PAGE 主要条带清晰,位置与 LPS 标准品相同。经纯化 LPS 样品处理后 Ana-1 细胞活力降低了 21.20%, $Ca^{2+}$  荧光强度为  $1.67 \pm 0.19$ ,与 LPS 标准品数据无显著性差异( $P > 0.05$ )。说明该试验提取、纯化得到的 LPS 样品纯度高,且有较高毒性与生物活性。

**关键词:**嗜水气单胞菌;脂多糖;提取纯化;细胞模型

**Abstract:** To study the lipopolysaccharide (LPS) of *Aeromonas hydrophila*, LPS was extracted by hot phenol-water method, purified by enzymatic hydrolysis and chloroform/methanol precipitation. The yield of LPS and the contents of protein, DNA were determined. The purity of LPS was analyzed by SDS-PAGE and silver staining. Ana-1 cell model was established to evaluate the toxicity and biological activity of LPS samples. The results showed that the yield of LPS was 1.22%, and the contents of protein and nucleic acid were 1.53% and 0.79% respectively. The main bands of SDS-PAGE were clear and located at same position as the LPS standard. After LPS treatment, the viability of Ana-1 cells decreased by 21.20%, and the fluorescence intensity of  $Ca^{2+}$  was  $1.67 \pm 0.19$ , without significant difference compared with LPS standard. The LPS samples extracted from *Aeromonas hydrophila* had high purity, toxicity and biological

activity. This study provided technical support for the development of subsequent extraction and detection methods.

**Keywords:** *Aeromonas hydrophila*; lipopolysaccharide; extract and purify; cell model

中国淡水养殖业发达,淡水鱼主要依靠微冻保鲜技术保存<sup>[1]</sup>,但部分耐冷菌株增殖导致鱼类腐败变质,造成严重经济损失<sup>[2]</sup>。其中嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)是主要腐败菌之一<sup>[3]</sup>。大量研究表明嗜水气单胞菌腐败能力与其毒力因子密切相关<sup>[4-5]</sup>,其中脂多糖(LPS)由多糖链与类脂组成,具有高毒性和免疫学活性<sup>[6]</sup>。

细胞是构成生物体的基本组成和功能单元<sup>[7]</sup>。细胞模型利用细胞的高敏感性,迅速识别外界环境变化,具有主动、真实、准确等优势<sup>[8]</sup>。根据细胞生理变化和细胞力学的特殊性质,可将细胞用于对危害物的检测和评价<sup>[9-10]</sup>。本试验选用的巨噬细胞 Ana-1 对外源物应激反应较强,具有充足的研究基础,Wang Hui 等<sup>[11]</sup>和 WANG Xue-mei 等<sup>[12]</sup>分别利用巨噬细胞 Ana-1 细胞模型研究了弓形虫诱导 HMGB1 释放作用,以及 LPS 对细胞的毒性及损伤作用。

本试验提取了嗜水气单胞菌菌体表面的脂多糖(LPS),并创新地利用巨噬细胞 Ana-1 模型对其毒性进行评价。菌体表面 LPS 进行提取纯化采用改良的热酚水法<sup>[13-14]</sup>、酶解法<sup>[15]</sup>与醇沉法<sup>[16]</sup>,并测算 LPS 产率,检测所得纯化 LPS 样品中蛋白质与核酸含量,利用 SDS-PAGE 电泳分析纯度。建立巨噬细胞 Ana-1 模型,通过细胞活力、胞内  $Ca^{2+}$  水平变化以及电镜观察,比较纯化 LPS 样品与 LPS 标准品对巨噬细胞 Ana-1 的损伤情况,判定纯化 LPS 样品的毒性和生物活性,为后续提取与检测方法的开发提供技术支持。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

#### 1.1.1 材料与试剂

嗜水气单胞菌菌株(*Aeromonas hydrophila* subsp. *hy-*

**基金项目:**国家自然科学基金面上科学基金项目(编号:31601535, 31271945, 31371792);江苏省自然科学基金青年基金项目(编号:BK20160459);江苏省高校自然科学研究面上项目(编号:16KJB550008);2017 国家级大学生创新训练项目(编号:201711117042Z);2017 年度江苏省扬州大学研究生实践创新计划(编号:SJCX17\_0631)

**作者简介:**蒋栋磊,男,扬州大学讲师,博士。

**通信作者:**方维明(1965—),男,扬州大学教授,博士。

E-mail: wmfang@yzu.edu.cn

**收稿日期:**2017-08-31

*drosophila* ATCC 7966 chromosome): 由扬州某市场的草鱼样品分离得到;

巨噬细胞 Ana-1: 中科院上海细胞库;

LPS 标准品、DNase I、RNase A、蛋白酶 K: 美国 Sigma 公司;

胰酶消化液、Fluo-4 AM (5 mmol/L) 钙离子荧光探针、CCK-8 试剂盒: 碧云天生物技术有限公司。

### 1.1.2 主要仪器设备

单人双面净化工作台: SW-CJ-1F 型, 苏州净化设备有限公司;

高压蒸气灭菌锅: SX-500 型, 日本 TOMMY 公司;

台式高速冷冻离心机: Sorvall ST 16R 型, 美国 Thermo Fisher 公司;

冷冻干燥机: Alpha 1-2LD PoLus 型, 德国 Martin Christ 公司;

CO<sub>2</sub> 恒温培养箱: 3111 型, 美国 Thermo Fisher 公司;

荧光显微镜: IX51 型, 日本 Olympus 公司;

酶标仪: Infinite 200 PRO 型, 瑞士 Tecan 公司;

核酸蛋白测定仪: BioPhotometer plus 型, 德国 Eppendorf 公司;

场发射扫描电镜: S-4800 型, 日本日立公司。

## 1.2 试验方法

1.2.1 菌体培养 参照文献[17]。将冻存的嗜水气单胞菌菌株置室温下解冻, 划线于 AHM 琼脂培养基, 28 °C 培养 24 h, 挑取单菌落接入 LB 培养基, 28 °C 摇床培养 12 h 后, 8 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体, 沉淀依次用生理盐水与无菌蒸馏水洗涤 1 次后, 收集沉淀称重, 用 3 倍质量无菌蒸馏水重悬(即 1 g 菌体加入 3 mL 蒸馏水), 得到菌悬液。

1.2.2 LPS 粗提取 参照文献[13]。菌悬液反复冻融 5 次后, 与等体积 90% 苯酚混合, 68 °C 恒温水浴振荡 1 h, 冰浴至 4 °C, 4 000 r/min 冷冻离心 20 min。收集上清, 下层酚相加等体积无菌蒸馏水重复洗涤 1 次, 合并 2 次上清于透析袋中, 蒸馏水透析至 FeCl<sub>3</sub> 检测无酚试剂反应出现。透析所得溶液经真空冷冻干燥处理 24 h, 即制得 LPS 粗样。

1.2.3 LPS 的纯化 参照文献[14~16]的方法, 并加以改良。10 mL Tris-HCl (100 mmol/L, pH 8.0) 溶解 LPS 粗样, 加终浓度 20 mg/mL DNase I 与 10 mg/mL RNase A, 37 °C 酶解 2 h 后, 加终浓度 20 mg/mL 蛋白酶 K, 57 °C 处理 1 h, 趁热加入 5 mL 水饱和苯酚, 混匀, 4 000 r/min 离心 30 min, 吸取上清于透析袋中, 蒸馏水透析 48 h 后, 溶液真空冷冻干燥 24 h。冻干产物置于氯仿/甲醇(体积比 2:1) 混合液中充分混匀, 12 000 r/min 离心 20 min, 弃上清并晾干沉淀。10 mL 蒸馏水溶解沉淀后真空冷冻干燥 24 h, 即得到纯化 LPS 样品, 于 -20 °C 保存备用。

### 1.2.4 LPS 中物质的测定

(1) 蛋白质含量测定: 5 mL 蒸馏水溶解纯化 LPS 样品, 用核酸蛋白测定仪检测样品中蛋白质含量, 检测波长 280 nm, 读数稳定后读取结果, 重复 3 次。

(2) 核酸含量测定: 5 mL 蒸馏水溶解纯化 LPS 样品, 用

核酸蛋白测定仪检测样品中核酸含量, 检测波长 260 nm, 读数稳定后读取结果, 重复 3 次。

1.2.5 LPS 纯度分析 采用 SDS-PAGE 法, 浓缩胶 3%, 分离胶 10%, 上样电泳后银染色, 进行纯度分析。

### 1.2.6 LPS 样品对 Ana-1 细胞影响检测

(1) CCK-8 检测细胞活力: 于 1 000 r/min 离心 4 min, 收集对数生长期细胞, 用无血清培养液重悬后转移至 96 孔板中(约 5 000 个/孔)于 37 °C 培养 12 h。分别加入终浓度为 5 μmol/L 的 LPS 标准品与纯化 LPS 样品, 并设置不含 LPS 的空白对照组, 每组 3 个重复。37 °C 处理 3 h 后每孔加入培养液总体积 10% (10 μL) 的 CCK-8, 37 °C 孵育 1 h, 测定其在 450 nm 处吸光度, 根据式(1)计算细胞活力。

$$C = \frac{A_1}{A_2} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

C——细胞活力, %;

A<sub>1</sub>——加药组 450 nm 处吸光度;

A<sub>2</sub>——空白对照组 450 nm 处吸光度。

(2) 细胞内 Ca<sup>2+</sup> 水平的检测: 收集对数生长期细胞, 无血清培养液重悬后转移至 24 孔板中, 37 °C 培养 12 h 后, 用 0.1 mol/L PBS 洗涤细胞 3 次, 每孔加入终浓度 3 μmol/L 的 Fluo-4 AM 探针, 37 °C 培养 1 h 后, 用 0.1 mol/L PBS 洗涤细胞 3 次, 再孵育 30 min 以确保细胞内 Fluo-4 AM 转变为 Fluo-4。随后分别加入终浓度为 5 μg/mL 的 LPS 标准品与纯化 LPS 样品, 37 °C 处理 3 h, 每组 3 个平行, 空白对照组不添加 LPS。使用 IX51 荧光显微镜观察拍照, 酶标仪检测荧光, 检测激发波长为 455 nm, 发射波长为 515 nm<sup>[18]</sup>。

(3) Ana-1 细胞损伤的电镜观察: 将 Ana-1 细胞经终浓度为 5 μg/mL 的 LPS 处理 3 h 后, 收集细胞, 琼脂包裹切片加入 2.5% 的戊二醛中固定 4 h, 保存于 4 °C 冰箱中。然后用 0.1 mol/L 的 PBS 清洗 3 次, 每次 15 min。按照 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100% 的乙醇梯度脱水, 每次 15 min, 然后用含无水硫酸钠的 100% 乙醇再脱水 15 min。将样品放入 CO<sub>2</sub> 临界点干燥 45 min, 取出黏贴在样板上准备镀膜, 利用 S-4800 型场发射扫描电镜进行观察。

1.2.7 数据处理 所有数据设有 3 个平行, 结果以均数 ± 标准差 ( $\bar{X} \pm SD$ ) 表示。各试验组数据的统计学处理采用单因素方差分析 (one-way ANOVA)。统计分析采用 SPSS 19.0 软件。

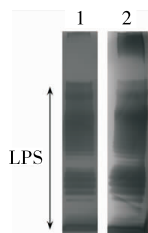
## 2 结果与分析

### 2.1 LPS 提取与纯化结果

1.2 L 的 LB 培养基培养 24 h, 收集菌体湿重为 6.22 g, 提取纯化后得到 LPS 共 76.1 mg, LPS 平均产率为 1.22%。测得的蛋白浓度为 232.87 mg/L, 核酸浓度为 120.51 mg/L, 计算得出纯化后 LPS 中蛋白质占 1.53%, 核酸占 0.79%, 提取纯度较高, 为下一步 LPS 毒性及生物活性检测减少干扰。

### 2.2 LPS 纯度

由图1可知, 纯化LPS样品的主要条带清晰, 大部分条



1. LPS 标准品 2. 纯化 LPS 样品

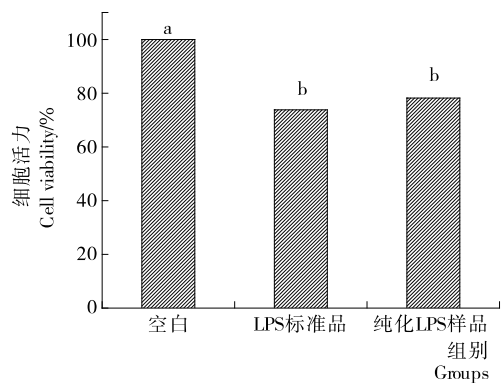
图 1 纯化后的 LPS SDS-PAGE 电泳图

Figure 1 SDS-PAGE electrophoretogram of Purified LPS

带位置与标准品条带位置相同,均可以判定是 LPS 条带,说明纯化 LPS 结构完整,纯度较高。然而,泳道 2 顶端存在杂带,说明纯化 LPS 样品中仍有大分子杂质残留,结合 2.1 结果分析,杂带可能是残留蛋白质。

### 2.3 LPS 对 Ana-1 细胞活力的影响

由图 2 可知,当终浓度为  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$  时,LPS 标准品与纯化 LPS 样品均能够显著抑制 Ana-1 细胞的活力。与空白组相比,LPS 标准品组细胞活力降低了 24.83%,纯化 LPS 样品组细胞活力降低了 21.20%。与纯化 LPS 样品比较,LPS 标准品对 Ana-1 细胞的活力抑制效果更强,但两组间无显著性差异( $P>0.05$ )。

不同字母表示组间具有统计学差异( $P<0.05$ )图 2 LPS( $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ )对巨噬细胞 Ana-1 活力的影响Figure 2 Effects of  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$  LPS on cell viability of Ana-1

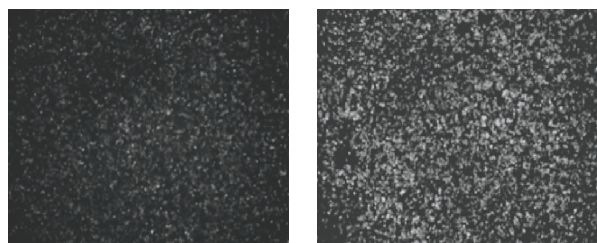
### 2.4 LPS 对细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 水平的影响

试验所使用的 Fluo-4 AM 是一种可以穿透细胞膜的荧光染料,Fluo-4 AM 进入细胞后被酶剪切形成 Fluo-4,与胞内  $\text{Ca}^{2+}$  结合,产生荧光<sup>[19]</sup>。

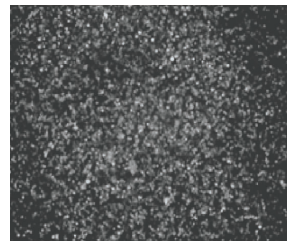
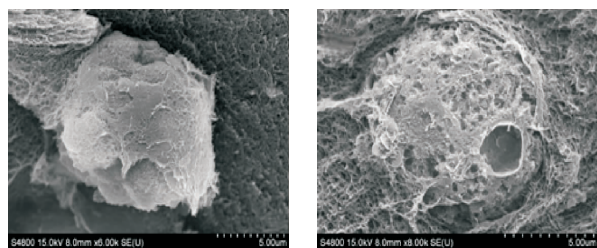
图 3 显示装载了 Fluo-4 荧光探针后,Ana-1 在荧光显微镜下的图像。图 3(a)为只装载探针的空白对照组,荧光强度弱;图 3(b)与 3(c)分别为加入 LPS 标准品和纯化 LPS 样品处理的 Ana-1 细胞,从图中可以看到较明显的荧光。结合数据分析,与空白对照组比较,LPS 标准品组相对荧光强度为  $1.92 \pm 0.12$ ,纯化 LPS 样品组为  $1.67 \pm 0.19$ 。结果表明,经 LPS 处理后,Ana-1 细胞胞内  $\text{Ca}^{2+}$  水平升高,且 LPS 标准品的作用强于纯化 LPS 样品的,但不存在显著性差异( $P>0.05$ )。

### 2.5 LPS 对 Ana-1 细胞损伤的电镜观察

由图 4(a)可知,放大 6000 倍观察正常 Ana-1 细胞形态



(a) 空白对照组

(b)  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$  LPS 标准品处理后(c)  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$  纯化 LPS 样品处理后图 3 LPS( $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ )对巨噬细胞 Ana-1 胞内  $\text{Ca}^{2+}$  水平的影响Figure 3 Effects of LPS( $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) on the  $\text{Ca}^{2+}$  levels in Ana-1 cells

(a) 空白对照组

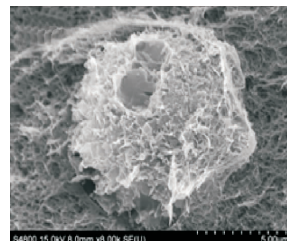
(b)  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$  LPS 标准品处理后(c)  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$  纯化 LPS 样品处理后

图 4 LPS 对 Ana-1 细胞形态的影响

Figure 4 Effects of LPS on the morphology of Ana-1 cells

饱满,表面光滑有细微绒毛状结构。图 4(b)经  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$  LPS 标准品处理 3 h 后 8 000 倍观察,Ana-1 细胞膜变得粗糙并脱落,细胞表面出现空洞,内部结构露出,形态已不完整,证明了细胞发生了较严重的破损。图 4(c)为扫描电镜放大 8 000 倍观察到的经  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$  纯化 LPS 样品处理 3 h 后的 Ana-1 细胞,细胞同样表现为破损,表面有明显的空洞,细胞膜变得粗糙。说明 LPS 可以导致小鼠巨噬细胞 Ana-1 的损伤;纯化 LPS 样品与 LPS 标准品造成的损伤类似,但纯化 LPS 样品的毒性与生物活性相对较高。

## 3 结论

本试验成功制得了纯化 LPS 样品,杂质含量少,与 LPS 标准品相比,对 Ana-1 细胞造成损伤无显著性差异( $P>0.05$ )。说明改良后的热酚水法及酶解法、氯仿/甲醇沉淀法

能够较完好地提取、纯化菌体表面 LPS,同时表明巨噬细胞 Ana-1 模型用于评价 LPS 的毒性与生物活性具有可行性,为 LPS 提取、检测方法的后续开发提供思路与技术支持。

与宋宏新等<sup>[15]</sup>、刘红亮等<sup>[16]</sup>的结果相比,本试验 LPS 产率更高,蛋白质含量更低,但纯化 LPS 样品中仍有 0.79% 的核酸残留,与宋宏新等<sup>[15]</sup>的研究结果相似。LPS 能够显著抑制 Ana-1 细胞活力并提高胞内  $Ca^{2+}$  浓度,同时经扫描电镜观察 LPS 对 Ana-1 细胞形态造成了一定程度的损伤,证实了 Wang Xue-mei 等<sup>[14]</sup>的相关研究报道结果。

为了进一步优化 LPS 提取、纯化方法,能否通过增加 DNase I 与 RNase A 酶浓度,延长消化时间来减少核酸残留有待深入研究。而巨噬细胞 Ana-1 模型的细胞活力,胞内  $Ca^{2+}$  浓度以及细胞形态变化只能说明 LPS 对细胞造成损伤,具体损伤机制尚不明确,仍需进一步研究 LPS 对细胞脱颗粒、白介素的分泌等影响,探明损伤机制。

### 参考文献

- [1] 黎柳, 谢晶. 水产品冰鲜技术的研究进展[J]. 食品与机械, 2014, 30(1): 259-262, 266.
- [2] 蔡青文, 谢晶. 微冻保鲜技术研究进展[J]. 食品与机械, 2013, 29(6): 248-252.
- [3] JANDA J M, ABBOTT S L. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2010, 23(1): 35-73.
- [4] LINDBENG A A, KAMELL A. The lipopolysaccharide of *Shigella* bacteria as a virulence factor[J]. *Rev Infect Dis*, 1991, 13(4): 279.
- [5] 朱大玲, 李爱华, 钱冬, 等. 嗜水气单胞菌毒力基因的研究进展[J]. 水生生物学报, 2004, 28(1): 80-84.
- [6] 郭闯, 王永坤. 嗜水气单胞菌研究进展[J]. 水产科学, 2003, 22(6): 48-51.
- [7] BANERJEE P, FRANZ B, BHUNIA AK. Mammalian cell-based sensor system[M]. Berlin: Springer, 2010: 21-55.
- [8] JIANG Dong-lei, FENG Dong-dong, JIANG Hui, et al. Preliminary study on An innovative, simple mast cell-based electrochemical method for detecting foodborne pathogenic bacterial quorum signaling molecules (*N*-Acyl-Homoserine-Lactones)[J].

*Biosensors & Bioelectronics*, 2017, 90: 436-442.

- [9] STRUSS A, PASINI P, ENSOR C M, et al. Paper strip whole cell biosensors: a portable test for the semiquantitative detection of bacterial quorum signaling molecules [J]. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(11): 4 457.
- [10] GU Wen-shu, ZHU Pei, JIANG Dong-lei, et al. A novel and simple cell-based electrochemical impedance biosensor for evaluating the combined toxicity of DON and ZEN[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2015, 70: 447-454.
- [11] WANG Hui, LI Mu-zi, LIU Jing, et al. *Toxoplasma gondii* infection induces high mobility group box 1 released from mouse macrophages[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 658.
- [12] WANG Xue-mei, ZHU Pei, PI Fu-wei, et al. A Sensitive and simple macrophage-based electrochemical biosensor for evaluating lipopolysaccharide cytotoxicity of pathogenic bacteria[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2016, 81: 349-357.
- [13] 宋宏新, 刘晓阳, 李宏. 改良热酚水法制备大肠杆菌 O157 : H7 脂多糖抗原的研究[J]. 食品科学, 2006, 27(10): 273-275.
- [14] 刘红亮, 陈学忠, 李克生, 等. 肠出血性大肠杆菌 O157 : H7 脂多糖抗原的提取鉴定及间接 ELISA 法的建立[J]. 中国人兽共患病学报, 2011, 27(7): 637-640.
- [15] TIRSOAGA A, NOVIKOV A, ADIB-CONQUY M, et al. Simple method for repurification of endotoxins for biological use [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(6): 1 803-1 808.
- [16] JR D M, GOLDBERG J B. Purification and visualization of lipopolysaccharide from Gram-negative bacteria by hot aqueous-phenol extraction[J]. *Journal of Visualized Experiments Jove*, 2012, 63: e3 916.
- [17] 谢军, 罗惠波, 边名鸿, 等. 酒曲中产香微生物的筛选及其生长特性研究[J]. 食品与机械, 2016, 32(1): 22-25, 86.
- [18] LU Jie, YUE Bao-hong, WANG Chun-mei, et al. Efficacy of RNAi-induced down-regulation of wild-type FLT3 on NF- $\kappa$ B pathway in THP-1 cell line[J]. *Life Science Journal*, 2008, 5(2): 15-20.
- [19] SHEN Zhi-hua, JIANG Xiao-fan, ZENG Chao, et al. High expression of ubiquitin-conjugating enzyme 2C (UBE2C) correlates with nasopharyngeal carcinoma progression [J]. *Bmc Cancer*, 2013, 13(1): 1-10.

(上接第 116 页)

统造型、传统的工艺表层的方式方法研究,而是应该从文化的生态大环境分析,从影响地域文化产品的价值观念、科学技术、文化传播等因素考虑,系统地构筑地域文化产品的研究和设计开发新模式。通过对长沙窑器物器型的特征进行总结和归纳,进而设计出具有湖湘地域文化特色的创意产品,将归纳的器型器物融入功能性、美学观、趣味性、生活化、艺术化来呈现最终的产品。

### 参考文献

- [1] 吴余青. 朴拙之美: 包装设计中传统文化元素的创新与应用[J]. 食品与机械, 2017, 33(8): 110-113.
- [2] 文卫民, 吴琪, 童献文. “一带一路”背景下长沙窑陶瓷文化创意产业发展探析[J]. 湖南包装, 2017, 32(3): 81-84.

- [3] 邹幸. 浅析湖湘文化对长沙窑装饰艺术影响[J]. 陶瓷科学与艺术, 2010, 44(3): 22-24.
- [4] 滕召阳. 论唐代长沙窑陶瓷玩具造型语言对现代陶艺创作的启示[D]. 株洲: 湖南工业大学, 2013: 10-20.
- [5] 罗湛英. 长沙窑陶瓷艺术解析[J]. 陶瓷科学与艺术, 2009(6): 28-30.
- [6] 代秀芳. 包装文化的美学审视[D]. 济南: 山东师范大学, 2008: 21-25.
- [7] 廖婧唯. 岳州窑青瓷日用器皿中道家美学思想探究[J]. 湖南包装, 2017, 32(1): 79-81.
- [8] 肖婷, 王建华, 王元元, 等. 绿色环保材料与技术在现代包装设计中的应用[J]. 湖南包装, 2016, 31(3): 76-78.
- [9] 李闯. 手作痕迹包装设计理念分类与发展态势分析[J]. 湖南包装, 2016, 31(2): 57-58.