

悉生蚕的研究与应用

朵建英, 王荫槐, 魏 强

(中国医学科学院, 北京协和医学院, 医学实验动物研究所, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室,
国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室, 北京 100021)

【摘要】 悉生蚕是指蚕体内外栖息的其他生物体是已知的蚕, 不仅培育方法较哺乳动物简单, 且彻底克服蚕的季节性和地域性饲育限制, 为蚕在实验动物科学中的广泛应用打下基础。随着现代生物技术的发展, 悉生蚕作为生物反应发生器或转基因工程动物的应用已逐步进入实用化研究阶段。

【关键词】 悉生蚕; 实验动物; 生物反应器; 应用

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)08-0068-06

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.008.016

Research and Application of Gnotobiotic Silkworm

DUO Jian-ying, WANG Yin-huai, WEI Qiang

(Key Laboratory of Human Diseases Comparative Medicine, Ministry of Health; Institute of Medical Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences; Key Laboratory of Human Diseases Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine; Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

【Abstract】 The silkworm with no unknown organisms living in or outside its body called gnotobiotic silkworm. The foster methods of gnotobiotic silkworm is much easier than that of mammal ones, and completely overcome seasonal and regional breeding limits. Gnotobiotic silkworm lay the foundation for its wide application in laboratory animal science. With the development of modern biotechnology, study on the application of gnotobiotic silkworm as a bioreactor generator or genetic engineering animal has been gradually developed into the practical stage.

【Key words】 Gnotobiotic silkworm; Laboratory animal; Bioreactor generator; Application

蚕是重要而独特的经济昆虫, 至今已被人类驯化利用长达 5000 余年。家蚕人工饲料饲育^[1, 2]方法的研究成功, 使家蚕的应用摆脱小作坊的生产形式实现工业化生产。悉生蚕的出现更是打开了家蚕作为实验动物进行科学研究、生物材料研制的广阔前景, 逐步在生命科学的各个领域发挥不可替代的重要作用。

1 悉生蚕饲育方法的研究

上世纪 60 年代初, 日本科学家率先研发出蚕人工饲料后于 1962 年饲育成功无菌蚕 (germ-free silkworm, 简称 GF 蚕), 后由松原藤好总结创建了独特的松原 KIT 方式全龄化人工饲料工厂化无菌饲育技术体系^[1, 3]。随后我国引进该技术, 通过消化吸收与创新, 在人工饲料无菌养蚕的研究方面取得

[基金项目] 科技重大专项 - 艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治, 项目号 2012ZX10004 - 501。

[作者简介] 朵建英 (1984 -), 女, 硕士, 技师, 从事悉生动物研究工作。

[通讯作者] 魏强, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 实验动物病毒学。E-mail: weiqiang0430@sohu.com。

长足进展^[1-4]。但以上养蚕方法中的“无菌”主要是指用于孵化蚕蚁的蚕卵及人工饲料的无菌化处理,其饲养过程虽有在无菌室或无菌箱中进行的,但是为了适应工业化大批量生产的需求,环境空气洁净度并没有达到隔离环境要求的级别,严格来说只能算是已知菌蚕(gnotobiotic silkworm,简称GN蚕)或无特定病原体蚕(specific pathogen free silkworm,简称SPF蚕)。

王荫槐等^[5]在1999年利用隔离系统首次饲养成功GF蚕,结果显示GF蚕的成活率和结茧率均较普通蚕高,蛹成活率在90%以上,为GF蚕作为实验动物的研究及应用提供了参考。

2 GN蚕作为实验动物的应用

GN蚕的生物背景清楚、饲养与实验操作容易、成本低廉、单批实验成活率高,可一次性提供遗传背景一致的500个左右的实验个体,十分适合作为实验动物进行应用和研究。

2.1 进行蚕病研究

早在100年前巴斯德就通过解剖蚕体发现了蚕病与其体内微生物有关系,并在后来的GF蚕上得到验证。Cappellosza S等利用人工饲料饲养无菌蚕幼虫鉴定出*Enterococcus mundtii*(蒙氏肠球菌)是蚕软化病的病原体,继之对该细菌的致病机制、感染途径、预防措施等方面进行了研究^[6],研究表明*Enterococcus mundtii*属于蚕消化道细菌,从消化道感染身体其他组织;通过对卵表面进行消毒可以消除母体垂直传播;饲料中的桑叶粉可能是其传染源,这些研究结果在人类该病原菌的流行病学方面可能起到一定的提示作用。利用GN蚕人们对*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus(BmNPV,蚕多角体病毒)对蚕的感染机制和特征有了更进一步的了解,发现一种神经诱导的分化相关蛋白BmGDAP1,在病毒感染早期的识别和免疫应答阶段发挥很大作用^[7]。

2.2 建立感染模型对致病菌的致病性进行研究

日本研究人员用GN蚕幼虫建立致病菌感染模型研究致病菌对人类的感染机制,观察到金黄色葡萄球菌在幼虫中肠表面的大量增殖,及其在幼虫体液和组织中的存在,并发现大肠杆菌的植入能降低金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌和霍乱弧菌对幼虫的致死率^[8]。感染不同基因突变型致病菌后的家蚕模型和小鼠模型同样对致病菌的致病基因或毒力决

定因子具有筛选作用,致病基因或因子缺失突变的菌株对家蚕的毒性降低^[9,10],通过将突变菌株细胞培养的上清液注射到幼虫血淋巴中,可以对致病菌内外毒素的致死剂量进行定量研究^[11]。近年建立的GN蚕模型更是将金黄色葡萄球菌致病因子的研究准确到了细胞壁表面蛋白和各种调节蛋白水平^[12]。

2.3 利用感染模型对抗菌药物进行评价

家蚕具有体型小、易操作、实验周期短的特点,用家蚕替代哺乳动物用于新药研发早期阶段药物毒性、有效性及体内吸收分布的研究是可行并有价值的。

在研究恶唑烷酮类药物对金黄色葡萄球菌的抗菌效果时,不同组药物的半数有效剂量(ED₅₀)在家蚕幼虫和啮齿类动物模型中具有相似的趋势^[13]。给予家蚕和小鼠相同的细胞毒化合物后,发现化合物在家蚕和小鼠体内致死剂量相似,代谢途径相同,都是与细胞色素P450反应后与羟化物结合,最后排泄^[14],还可以在家蚕饲料中掺入荧光标记化合物,通过观察荧光进一步追踪外源化合物在家蚕体内的吸收和分布^[15],最终证实了家蚕作为候选药物特别是新型抗菌药物早期研发阶段评价模型的可行性。利用新型隐球菌感染蚕模型,成功评价了抗真菌药物两性霉素B、氟胞嘧啶、氟康唑和酮康唑对新型隐球菌的治疗效果^[16]。

2.4 GN蚕进行生理、毒理学及放射学的研究

蚕作为实验动物在遗传育种、昆虫变态、昆虫激素传递、性别控制等方面已有很多研究。GF蚕的出现扩大和提高了其作为实验动物的应用范围和研究水平。Fujii T等^[17]的研究证明性别转录相关因子参与家蚕性信息素偏好的转变,这种因子在昆虫两性性外激素偏好的选择及交配行为发生中起重要作用。增进博之等^[18]人以GF蚕作为实验动物,测定了单一或混合金属引起的蚕的毒性反应、重金属的体内分布、消长及其向蚕后代转移残留金属的分布关系。Kyeong Ryong Lee等^[19]人将家蚕血淋巴加入辐射处理后的细胞发现,本应出现上调表达的细胞内质网伴侣蛋白(除irp94)和膜蛋白出现了明显的下调,说明蚕血淋巴中含有一种可以调节ER蛋白在辐射处理后下调表达的因子。

3 GN作为生物反应发生器及其在转基因方面的应用

家蚕生物反应发生器的研究和开发主要以家

蚕核型多角体病毒 (*Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus, BmNPV) 表达系统为主, 以 BmNPV 为载体, 以外源基因替换或部分替代多角体蛋白基因, 从而使重组 BmNPV 在蚕体细胞内大量表达外源蛋白^[20], 其表达量高, 产物天然性质好^[21]。近年来研究较多的蚕丝绢细胞表达系统有其独有的优越性, 将外源基因置于丝心蛋白启动子调控下, 利用丝腺细胞表达外源基因, 外源基因能完整的表达并分泌到丝腺中, 表达量高于 BmNPV 表达系统十几倍, 且目的蛋白纯度高、无需进行繁琐的下游浓缩和提纯处理^[22]。

3.1 生产基因工程疫苗

家蚕生物反应器能高水平表达抗原蛋白, 且表达产物活性高。Higashihashi 等^[23]将带乙型肝炎抗原的 M 蛋白基因克隆到转移载体上, 再与野生型病毒共转染获得重组病毒, 以重组病毒感染家蚕幼虫, 可获得高水平表达的 HBsAg, 达 (400 ~ 500) $\mu\text{g}/\text{蚕}$ 。周耐明等^[24]利用重组的 BmNPV 在家蚕幼虫及蛹中高效表达了具有生理活性的 HBsAg, 幼虫表达量为 750 $\mu\text{g}/\text{蚕}$, 蛹为 690 $\mu\text{g}/\text{蛹}$, 主要表达产物以糖基化形式存在, 浮力密度为 1.2 g/mL, 与病人血清中的 HBsAg 水平一致。于涟^[25]等在家蚕中表达了传染性法氏囊病病毒的主要宿主保护性抗原蛋白 Vp2, 动物实验表明该蛋白 Vp2 有良好的免疫原性。构建同时携带 3 个甲型 H1N1 流感病毒基因的重组蚕杆状病毒, 在蚕体内装配出甲型 H1N1 流感病毒样颗粒^[26]; 构建含有犬细小病毒衣壳结构蛋白 VP2 的重组蚕杆状病毒, 在蚕和蚕蛹中表达出保留了 VP2 特异免疫活性或狂犬病毒特异免疫活性的病毒样颗粒^[27], 多种病毒的保护性抗原基因在家蚕 BmNPV 表达系统中的成功表达, 为基因工程病毒亚单位疫苗的研发提供了新的途径。

3.2 表达各种医用蛋白

通过基因融合的方法, 将大肠杆菌的 asp 基因在家蚕杆状病毒中表达, 其活性高达 5940 U/mg, 为利用家蚕生物反应器高效生产该蛋白打下基础^[28]。利用 Bac-to-Bac 表达系统能够获得含有人瘦素蛋白基因及人生长素基因的重组杆状病毒, 并且目的蛋白能在家蚕细胞及幼虫体内表达^[29,30]。通过构建基于 piggyBac 的中部丝腺特异表达载体, 利用家蚕丝腺生物反应器表达人干扰素- ω (huIFN- ω), 该重组蛋白 huIFN- ω 具有一定的抗细胞增殖活性^[31]。家蚕丝腺生物反应器表达人胰岛样生长因

子 (hIGF-I), 在 G0 代转基因家蚕的蚕茧中 hIGF-I 的表达量约 756 ng/g^[32]。2004 年我国利用家蚕生物反应器生产人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (hGM-CSF) 等生物制品的方法, 获得国家技术发明奖。该项目成功构建线性化^[33]家蚕杆状病毒载体, 以家蚕蛹作为“生物反应器”高效表达人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (hGM-CSF) 等 60 余种医用蛋白质, 建立了家蚕“生物反应器”生物制药的技术平台^[34]。使用 GN 蚕彻底解决了生物制品生产受季节限制、蚕蛹冷冻保存影响产量、产品易受微生物 (包括蚕病病原体) 污染^[35]等诸多问题, 为提高生物制药的质量和产量提供了新的途径。

3.3 改善丝素性能

蚕丝在食品、医药、化工等领域有较广泛的应用^[36]。使用基因工程技术, 用其他丝素蛋白基因置换或部分置换家蚕丝素蛋白基因或将外源基因置于丝素蛋白基因下游构建的转基因蚕可以突破传统育种的限制, 获得具有优良丝质的家蚕新品种^[37-39]。此外, 通过基因打靶的技术将外源基因导入家蚕得到完全表达外源基因的转基因蚕的思路受到人们的重视。这种技术一旦成熟, 人们获得会吐蜘蛛丝^[40]、蓖麻蚕丝、樟蚕丝、天蚕丝的转基因家蚕^[41], 这些以前产量稀少的材料就不再难以获得了。利用 GN 蚕代替普通蚕进行“蚕丝”的生产, 不但可以实现全年化生产, 还可以通过改变 GN 蚕饲料大大改善“蚕丝”性能, 此外, 无菌技术的使用还利于转基因蚕的保种和繁殖扩增。

4 GN 蚕蚕体各组织器官的作用

家蚕浑身是宝, 虽已被人类驯化利用长达 5 000 余年, 但尚远未研究开发殆尽。

4.1 作为轻工业或生物科技原材料

利用 GF 蚕生产的无菌蚕丝色泽白亮、纤度细而韧度强, 并能实现全年工厂化生产, 大大推动了蚕丝产业的发展^[42,43]。印度柞蚕丝作为心脏组织工程中支架材料的使用已经得到认可^[44], 蚕丝中提取的丝胶蛋白已经被作为一种伤口敷料^[45]和一种美容剂的添加剂^[46]得到使用。

4.2 作为药物或药物添加剂

蚕血淋巴作为药物添加剂的抗衰老作用得到证实^[47], 蚕茧提取物具有抗氧化和降血脂的作用, 对高血脂和动脉粥样硬化疗效显著^[48]。蚕粉能减少糖尿病小鼠小丘脑加压素的产生^[49], 可能作为治

疗糖尿病,特别是糖尿病神经病变的辅助添加剂。含超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的蚕粉能引起肝癌小鼠自然杀伤细胞(NK cell)活性增强、脾细胞增殖,对肝癌细胞起到显著抑制作用,可以作为一种安全的能激活NK细胞和免疫系统的肿瘤抑制剂^[50]。

4.3 作为中药材的使用

蚕衣、僵蚕、僵蛹、蚕沙和蛹虫草等作为传统中药材使用时,既没有药材标准,更没有良好的生产环境,产品质量没有保证。如果用GF蚕来生产蚕衣、僵蚕、僵蛹、蚕沙和蛹虫草,可有效控制杂菌的污染,提高中药材生产质量,保证用药安全有效。

冬虫夏草是我国十分名贵的中药材,人工栽培的蛹虫草或北虫草与其在营养成分、有效物质成分等方面很相似^[51,52],虽然可在一定程度上代替稀有的冬虫夏草作为药品或保健品进行使用,但其不具备药材学上完整的“虫草”外形特征,由于“虫”的缺失,一方面可能导致“草”生长过程中与宿主相互作用产生的某些物质,如抗体等的缺失,另一方面也是导致虫草无性培育时菌株质量连年下降的重要原因之一。

利用GF蚕幼虫代替蝙蝠蛾幼虫接种虫草菌进行冬虫夏草的人工培育可以为人们提供一个深入研究冬虫夏草形成、培育与有效物质药理活性的良好素材。冬虫夏草是一种真菌与昆虫的结合体,虫体感染过程中是否有其他真菌的参与,各种菌所起的作用是什么,在什么时期起作用等问题还尚不明,GF蚕幼虫感染虫草菌模型能很好的解决这一问题。同时,GF蚕虫草的培育成功还可以为高纯度虫草菌的分离纯化,及高质量、无污染虫草产品的获得提供可靠的途径。

5 小结与展望

GN蚕排除了其他微生物对宿主的影响,为蚕病致病菌致病机制的研究提供了良好的实验动物,同时使用GN蚕作为实验动物可一次获得500个左右遗传背景一致的实验个体,且体型小、便于操作、成本低廉、容易分离器官和血淋巴,荧光化合物的使用证实了化合物在蚕体和小鼠体内代谢途径的一致性,这些特点使GN蚕替代哺乳动物作为新药研发早期阶段,特别是合成化合物量很少的情况下,评价化合物毒性、治疗效果的有效模型提供了可行性。

蚕生物反应器有基因工程产品“微型发酵罐”之称,GN蚕BmNPV表达系统的构建不但能有效提高外源蛋白产量,还能从根本上改善外源蛋白的质量,彻底解决产物,特别是基因工程口服药物的微生物污染问题。蚕丝绢体细胞表达系统目的蛋白产量高、产物无需进行繁琐的下游浓缩和提纯处理^[53],具有很大的开发前景,如果将转基因后的蚕卵进行人工无菌饲育,其丝绢体表达系统的遗传性状不变,但丝素性质应该会得到很大改善。

GF蚕体内外无微生物,整个生长过程无污染的特点使其作为中、西药材料,保健品、药品添加剂甚至是食品时具有普通家蚕无可比拟的优越性。传统中医学对蚕体的应用没有药材标准,GF蚕作为中药原料可提高药材质量,保证用药安全。随着人们对家蚕研究的深入,丝蛋白、丝胶蛋白越来越多的潜在价值被发掘出来,最近的研究表明,丝胶蛋白能加速乙醇通过尿的排除和在肝中的氧化作用,丝胶蛋白的水解产物还能诱导胰岛中 β 细胞的活性而增加胰岛素的分泌^[54],预示丝蛋白是一种生物调节因子,可能在解酒剂、糖尿病药物的研发方面发挥新的作用。通过对丝蛋白在提高免疫力方面作用的研究,证实其能作为一种食品中的免疫增强添加剂得到开发。运用GF蚕可以生产出无抗生素、微生物污染的丝蛋白、丝胶蛋白产品,更能简化提取工艺,提高生产效率、节约成本。

参考文献:

- [1] 张亚平. 家蚕全龄人工饲料无菌饲育技术[J]. 山东农业科学, 1997, 1: 48-49.
- [2] 沈卫德, 伊藤智夫. 日本家蚕人工饲料的实用化与普及[J]. 江苏蚕业, 1989, 4: 55-59.
- [3] 张亚平. 浅谈无菌蚕与无菌蚕饲育[J]. 中国蚕业, 2001, 22(3): 82-83.
- [4] 陈瑞英, 张传溪. 人工饲料无菌养蚕[J]. 蚕桑通报, 1993, 24(3): 43-46.
- [5] 王荫槐, 张纪叔, 刘艳玲, 等. 人工饲料培育无菌蚕初报[J]. 中国实验动物学杂志, 1999, 3(9): 164-167.
- [6] Cappellozza S, Saviane A, Tettamanti G, et al. Identification of *Enterococcus mundtii* as a pathogenic agent involved in the “flacherie” disease in *Bombyx mori* L. larvae reared on artificial diet [J]. J Invertebr Pathol, 2011, 106(3): 386-393.
- [7] Gao K, Deng X, Qian H, et al. Cloning, characterization, and expression analysis of a novel BmCDAP1 gene from silkworm, *Bombyx mori*, involved in cytoplasmic polyhedrosis virus infection [J]. Gene, 2012, 497(2): 208-213.
- [8] Kaito C, Akimitsu N, Watanabe H, et al. Silkworm larvae as an animal model of bacterial infection pathogenic to humans [J].

- Microb Pathog, 2002, 32(4): 183–190.
- [9] Kaito C, Kurokawa K, Matsumoto Y, et al. Silkworm pathogenic bacteria infection model for identification of novel virulence genes [J]. Mol Microbiol, 2005, 56(4): 934–944.
- [10] Hanaoka N, Takano Y, Shibuya K, et al. Identification of the putative protein phosphatase gene PTC1 as a virulence-related gene using a silkworm model of *Candida albicans* infection [J]. Eukaryot Cell, 2008, 7(10): 1640–1648.
- [11] Hossain MS, Hamamoto H, Matsumoto Y, et al. Use of silkworm larvae to study pathogenic bacterial toxins [J]. J Biochem, 2006, 140(3): 439–444.
- [12] Miyazaki S, Matsumoto Y, Sekimizu K, et al. Evaluation of *Staphylococcus aureus* virulence factors using a silkworm model [J]. FEMS Microbiol Lett, 2012, 326(2): 116–124.
- [13] Barman TK, Arora P, Rao M, et al. Utilization of *Bombyx mori* larvae as a surrogate animal model for evaluation of the anti-infective potential of oxazolidinones [J]. J Infect Chemother, 2008, 14(2): 166–169.
- [14] Hamamoto H, Tonoike A, Narushima K, et al. Silkworm as a model animal to evaluate drug candidate toxicity and metabolism [J]. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2009, 149(3): 334–339.
- [15] Tansil NC, Li Y, Koh LD. The use of molecular fluorescent markers to monitor absorption and distribution of xenobiotics in a silkworm model [J]. Biomaterials, 2011, 32(36): 9576–9583.
- [16] Matsumoto Y, Miyazaki S, Fukunaga DH, et al. Quantitative evaluation of cryptococcal pathogenesis and antifungal drugs using a silkworm infection model with *Cryptococcus neoformans* [J]. J Appl Microbiol, 2012, 112(1): 138–146.
- [17] Fujii T, Fujii T, Namiki S. Sex-linked transcription factor involved in a shift of sex-pheromone preference in the silkworm *Bombyx mori* [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(44): 18038–18043.
- [18] 增进博之. 关于重金属对无菌蚕毒性的研究[J]. 江苏蚕业, 1996, 3: 57–61.
- [19] Lee KR, Kim SW, Kim YK, et al. Silkworm hemolymph down-regulates the expression of endoplasmic reticulum chaperones under radiation-irradiation [J]. Int J Mol Sci, 2011, 12: 4456–4464.
- [20] Smith GE, Summers MD, Fraser MJ. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector [J]. Mol Cell Biol, 1983, 3: 2156–2165.
- [21] 崔红娟, 陈克平. 家蚕生物反应器表达外源基因[J]. 生物技术, 1999, 9(3): 31–34.
- [22] 李宏, 钱水华. 家蚕丝腺生物反应器的研究现状[J]. 北方蚕业, 2003, 24(98): 15–16.
- [23] Higashihashi N, Arai Y, Enjo T, et al. High-level expression and characterization of hepatitis B virus surface antigen in silkworm using a baculovirus vector [J]. J Virol Methods, 1991, 35(2): 159–167.
- [24] 周耐明, 张颖, 金伟, 等. 乙肝病毒 S 基因在家蚕细胞及蚕体内高表达[J]. 生物工程学报, 1995, 11(3): 211–216.
- [25] 于琰, 宋坤华, 张耀洲, 等. 家蚕表达传染性法氏囊病毒 VP2 蛋白的免疫原性初步研究(英文)[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2000, 26(1): 9–16.
- [26] 李姿林. 多基因表达家蚕生物反应器组装甲型 H1N1 流感病毒样颗粒的研究[J]. 北京农业, 2011, 3: 145–146.
- [27] Feng H, Liang M, Wang HL, et al. Recombinant canine parvovirus-like particles express foreign epitopes in silkworm pupae [J]. Vet Microbiol, 2011, 29, 154(1–2): 49–57.
- [28] 费建明, 吴岩, 占鹏飞, 等. 家蚕 BmNPV 多角体蛋白与大肠杆菌 L-天冬酰胺酶 II 的融合表达 [J]. 中国蚕业, 2011, 32(2): 29–31.
- [29] 陈蔚, 付凡, 唐顺明, 等. 利用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统在家蚕中表达人瘦素蛋白[J]. 蚕业科学, 2011, 37(2): 325–329.
- [30] 付凡, 陈蔚, 唐顺明, 等. 利用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统在家蚕中表达人生长素[J]. 蚕业科学, 2011, 37(2): 320–324.
- [31] 姚玲. 利用家蚕丝腺生物反应器表达人干扰素- ω 的研究 [D]. 生物化学与分子生物学, 2009, 45–46.
- [32] 潘兴亮. 家蚕丝腺生物反应器表达 hIGF-I 转基因分泌表达载体的构建及其应用研究 [D]. 生物化学与分子生物学, 2009, 61.
- [33] Kitts PA, Possee RD. A method for producing recombinant baculovirus expression vectors at high frequency [J]. Biotechniques, 1993, 14(5): 810–817.
- [34] 张耀洲. 家蚕生物反应器生产生物制品的方法[J]. 中国科技成果, 2007, 5: 58–59.
- [35] 贡成良, 金勇丰, 吴卫东, 等. 家蚕生物反应器表达 hGM-CSF 产业化若干问题的研究[J]. 蚕业科学, 2002, 28(3): 207–210.
- [36] 张晓丽, 黄晨. 蚕丝的综合利用及新用途的开发[J]. 安徽农业科学, 2000, 28(4): 540–542.
- [37] 黄材霆. 人工丝蛋白的研究[J]. 蚕桑通报, 32(3): 1–6.
- [38] 赵昀, 陈秀, 彭卫平, 等. 利用同源重组改变家蚕丝心蛋白重链基因[J]. 生物化学与生物物理学报, 2001, 33(1): 112–116.
- [39] 查幸福, 郑慧. 利用转基因改造蚕丝品质[J]. 四川丝绸, 2003, (3): 12–13.
- [40] 朱成钢, 金勇, 史锋, 等. 用丝心蛋白轻链基因构建转基因家蚕基因打靶载体[J]. 农业生物技术学报, 2002, 10(2): 171–175.
- [41] 李振刚, 周丛照, 唐恒立, 等. YAC 介导的天蚕丝素基向家蚕的转移—天蚕丝素基—YAC 克隆在家蚕的表达[J]. 昆虫学报, 1997, 40(1): 1–5.
- [42] 松原藤好. 无菌生物学在蚕丝生产科学中的应用和发展[J]. 江苏蚕业, 1990, 4: 72–78.
- [43] 何中琴, 钱镇海. 高质量蚕丝和其全年无菌蚕丝生产技术[J]. 国外丝绸, 1999, 6: 4–10.
- [44] Patra C, Talukdar S, Novoyatleva T. Silk protein fibroin from *Antheraea mylitta* for cardiac tissue engineering [J]. Biomaterials, 2012, 33(9): 2673–2680.

- [45] Teramoto H, Kameda T, Tamada Y. Preparation of gel film from *Bombyx mori* silk sericin and its characterization as a wound dressing[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2008, 72: 3189–3196.
- [46] Padamwar MN, Pawar AP, Daithankar AV, et al. Silk sericin as a moisturizer: An in vivo study[J]. J Cosmet Dermatol, 2005, 4: 250–257.
- [47] Choi SS, Rhee WJ, Park TH. Inhibition of human cell apoptosis by silkworm hemolymph[J]. Biotechnol Prog. 2002, 18(4): 874–878.
- [48] Ali MM, Arumugam SB. Effect of crude extract of *Bombyx mori* cocoons in hyperlipidemia and atherosclerosis[J]. J Ayurveda Integr Med. 2011, 2(2): 72–78.
- [49] Kim MJ, Hong SJ, Yang J, et al. Silkworm (*Bombyx mori* L.) reduces vasopressin expression in the hypothalamus of streptozotocin-induced diabetic mice[J]. Neurol Res, 2007, 29: 72–77.
- [50] Yue WF, Deng W, Li XH, et al. Silkworm powder containing manganese superoxide dismutase regulated the immunity and inhibited the growth of Hepatoma 22 cell in mice [J]. Mol Biol Rep, 2009, 36(2): 323–328.
- [51] 黄银妹, 孙云汉, 陈万彬, 等. 冬虫夏草及其培养菌丝体中的成分分析[J], 中成药研究, 1983, (5): 25.
- [52] 龚晓健, 季晖, 卢顺高, 等. 人工虫草多糖对小鼠免疫功能的影响[J]. 中国药科大学学报, 2000, 31(1): 53–55.
- [53] 李宏, 钱水华. 家蚕丝腺生物反应器的研究现状[J]. 北方蚕业, 2003, 24: 15–16.
- [54] Jung EY, Lee HS, Lee HJ, et al. Feeding silk protein hydrolysates to C57BL/KsJ-db/db mice improves blood glucose and lipid profiles [J]. Nutr Res, 2010, 30: 783–790.

[修回日期]2012-06-05