**1引言**

家蚕（Bombyx mori.），属于昆虫纲鳞翅目（Lepidoptera），是以桑叶为食的昆虫，因而又名桑蚕。家蚕是中国古代栖息于桑树的原始蚕驯化而来进行吐丝结茧的经济昆虫，一直以来都受到生产和研究的重点关注。

家蚕是完全变态昆虫，一生要经过卵、幼虫、蛹和成虫四个形态以及生理完全不同的发育阶段。卵期是胚胎发生、发育成型的时期，幼虫期是摄食为体内合成丝蛋白，吐丝结茧积蓄能量的时期，蛹期是由幼虫向成虫转化的过渡时期，成虫期是雌雄交配，授精，产卵，繁殖后代的生殖时期。

家蚕刚孵化的幼虫称为蚁蚕，其摄食桑叶后体色转青白，体重和体积增大至一定阶段后幼虫停止食桑并开始蜕皮，这种家蚕幼虫静止不动的蜕皮时期称为，眠。家蚕幼虫每眠一次即增加一龄，蛹期和成虫期不以龄期计算。

家蚕的丝腺是其体内合成丝蛋白及其将丝蛋白加工成丝吐出体外的特殊器官，丝腺的形态以及健康与否同家蚕吐丝结茧能力直接相关，因而家蚕丝腺的研究在工业上都受到重视。

**1.1家蚕丝腺的生长发育特征**

家蚕是三胚层动物，其胚胎在受精卵产下后的25℃中保存，经26-30 h，分化出外胚层，中胚层，之后再分化出内胚层。在胚胎缩短期，气门陷入时，第4胚节的下唇突起基部凹陷成两个小孔，随胚子发育而伸长形成两条细管。当两个下唇突起愈合成下唇时，两条小管的前端合成吐丝管。胚子反转期后，丝腺继续延伸而曲屈，这就是家蚕丝腺在胚胎期的形成过程。

丝腺在蚕卵孵化前，在胚胎期经历约10次细胞分裂，并且在产卵后8天，即己四期左右发育出完整的丝腺组织。（Dhawan et al.，1984.）幼虫期的丝腺增大，并非有丝分裂增长，为丝腺发育过程中，细胞核不断分支，细胞增大的结果。（Perdrix et al.，1979；Goldsmith et al.，1984；Xin et al.，2015.）

家蚕到五龄后期开始吐丝结茧、最后化蛹成蛾，完成幼虫到成虫的转变。丝腺是家蚕体内合成以及分泌丝蛋白的特化器官，直接决定了产丝量，而茧丝的用途十分广泛，不仅是珍贵的纺织原料，用于服饰的制造，其在丝蛋白美容、生物医疗材料领域也具有十分重要的作用（刘永成 等，1998；Jin et al.，2004；Kim et al.，2010； 陈瑞婷，2017.）。所以丝腺作为泌丝的唯一器官，不仅在生物研究上具有重要地位，在经济上也发挥了重要作用。

**1.1.1丝腺的结构与功能**

丝腺从形态和功能上分区，可以分为吐丝部、前部丝腺（ASG）、中部丝腺（MSG）和后部丝腺（PSG）四个区域。吐丝部又分为吐丝管、榨丝区、共通区和菲氏腺。前部丝腺是连接吐丝管而左右对称的两条输丝管其没有合成和分泌的作用，只作为丝物质流经的导管。中部丝腺接在前部丝腺之后，熟蚕时是整个丝腺最粗大的部分。经过两个弯曲，它被分为前区、中区、后区三个部分。后部丝腺有许多扭曲，在五龄盛食期后可长达170-200mm。（向仲怀，2005.）

家蚕幼虫老熟后吐丝结茧，化蛹变态是它的本性，但有些蚕不能正常吐丝结茧，上蔟数天后死于蔟中，极少数则变态成为裸蛹。（胡文波，2017.）科研工作者通过切片观察发现，家蚕不能正常结茧主要是中部丝腺发生病变，丝物质异常，呈现出液泡状而无法凝聚成为结晶。

出现不结茧蚕的原因主要有以下三个：一是丝腺的畸形或者异常发育，包括吐丝管或者丝腺的畸形，例如吐丝管畸形产生闭塞或局部丝腺细胞退化大量丝物质堆积使丝腺壁膨大破裂；丝腺发育异常，例如Nd蚕的后部丝腺退化，完全不吐丝或者吐极少丝就变态为裸蛹；丝腺生长不良，在正常家蚕体内，到5龄期，丝腺约增长50倍，而不吐丝蚕只有10倍的增长量；丝腺上器官的分布减少，因为气管分布很少，则供氧不足影响丝物质的产生和分泌；腺细胞核不发达，正常蚕5龄期丝腺细胞核分支占腺细胞的大部分，而不吐丝蚕则核分支极少，影响丝蛋白的合成。二是生理原因，包括神经麻痹、激素失调、化学物质刺激等。三是受到脓病、微粒子病等病原微生物的感染；蔟中环境不良；人为操作不当引起蚕体机械损伤等。（冯丽春 等，2015）

**1.1.2丝腺的退化（幼虫-蛹的丝腺退化）**

**1.1.3 丝腺发育异常模型（基因筛选的丝腺退化品系、不同品系的丝腺形态区别、吐丝困难的异同点、Nd/Nd-sD/ p25）**

家蚕的生长一般要经过吐丝、结茧、将丝腺中的蛋白排出而化为蚕蛹，最后羽化成为成虫蚕蛾。但是1951年Nakano从欧洲品系的家蚕中发现了结出的茧为薄皮茧，或者直接裸露化蛹的Nd裸蛹突变体，其吐出丝的丝胶含量超过99%。（Nakano et al.，1951；Iijima et al.，1972；梅兴林 等，2011.）而在正常结茧家蚕所吐出的丝中，丝素作为高分子量的不溶性纤维蛋白，丝胶作为低分子量的可溶性球状蛋白，两者含量各占70-80%和20-30%。（何秀玲 等，2010.）经过形态学观察，Nd突变体后部丝腺明显缩短，而中部丝腺与正常品系相比，并未有显著差异。（刘春 等，2010.）分子遗传学上研究表明，Nd基因位于第25连锁群上，与丝素重链基因紧密连锁。（Takei et al.，1984；Hyodo et al.，1980.）Nd突变体产生的丝素蛋白与正常的丝素蛋白相比，只存在丝素重链蛋白（Fib-H）而没有丝素轻链蛋白（Fib-L），H与L链无法形成正常结合的二硫键，因此Nd突变体的后部丝腺无法正常分泌丝素蛋白。而Nd突变体的中部丝腺正常分泌丝胶蛋白（Ser），故而产生了丝胶含量超99%的丝胶茧以及大部分无法结茧的裸蛹。（杨晓博 等，2009.）

Nd（2）突变体与Nd突变体相似，能分泌一层薄丝胶，但无法形成茧型。其基因与Nd突变体相似，也位于第25连锁群上，与丝素重链基因紧密连锁。（Takei et al.，1984；Hyodo et al.，1980.）同时，Takei等在研究中发现，Nd（2）突变体的后部丝腺短小，但其丝腺细胞数与正常泌丝家蚕相比，并未有显著差异，并且其中部丝腺细胞数量也与正常泌丝家蚕相似；在其后部丝腺腺腔中检测到少量丝素重链蛋白基因，无丝素轻链蛋白，但是轻链蛋白的mRNA存在于在后部丝腺细胞内，因而推断其基因突变可能与后部丝腺功能退化相关。（Takei et al.，1984；梅兴林 等，2011.）

Nd-s突变体可以结丝胶茧，其与另一突变体Nd-sD拥有等位基因，与丝素轻链基因位于第14连锁群上紧密连锁，（GAMO et al.，1972.）有研究推断其突变是由丝素轻链的突变引起的。（Takei et al.，1984；梅兴林 等，2011.）

Nd-sD突变体是经化学诱变产生，后选育出纯合子品种进行研究。已知Nd-sD与Nd（2）位于不同连锁群，但二者纯合突变体的表情与Nd（2）纯和突变体的表型相似，即产生很薄的丝胶茧，丝素含量不到正常分泌水平的1%。该突变体后部丝腺发育不良严重，但是中部丝腺发育未见显著差异。其后部丝腺分泌少量的丝素蛋白只含有丝素重链以及P25，不含丝素轻链。（Takei et al.，1987；Mori et al.，1995；梅兴林 等，2011.）

**1.2家蚕丝蛋白分泌特征**

构成家蚕丝腺的前、中、后三个部分细胞数量各不相同，每条丝腺由大约1000个细胞构成。其中，构成前部丝腺的约为200个细胞，构成中部丝腺的约为250-255个细胞，而后部丝腺则由约500-525个细胞构成。不同品种的家蚕，其丝腺细胞数目也略有差异。（Perdrix et al.，1979；冯丽春 等，2015.）西南大学胡文波等人研究裸蛹突变体Nd和正常泌丝结茧品系大造的丝腺差异时，提出丝腺细胞数量可能与家蚕合成和分泌蛋白有直接联系。（Hu et al.，2019.）

**1.2.1 丝蛋白合成及分泌**

家蚕泌丝营茧时经由吐丝部吐出的丝纤维蛋白是由丝素蛋白和丝胶蛋白组合而成的复合蛋白。作为连接吐丝部的部分，由中部丝腺产生的丝胶蛋白和后部丝腺产生的丝素蛋白都需要运送至前部丝腺，所以前部丝腺被认为具有加工液体蛋白并运送至吐丝部分泌出体外的功能。（Valluzzi et al.，1999；Chang et al.，2015.）至今为止被广泛接受的观点是，液体丝蛋白转化为固体丝的过程中，受离子、剪切、pH等因素的影响，从无规则卷曲或者螺旋向β-折叠转变。Zhou等人的研究表明从后部丝腺到前部丝腺，除钙以外，金属元素均有所增加。（Zhou et al.，2005.）剪切可以增加折叠β-片层结构。（Xie et al.，2006.）pH也在蛋白构象变化中扮演了重要角色。（Terry et al.，2004.）但是前部丝腺使液体丝蛋白转变为固体丝的机制尚未明确。（Chang et al.，2015.）

丝腺可以分为前（ASG）、中（MSG）、后（PSG）三个部分，其中的中部丝腺又可以分为三个部分，分别是中部丝腺前部（MSG-A），主要表达Ser1丝胶蛋白；中部丝腺中部（MSG-M）、中部丝腺后部（MSG-P），主要表达Ser2和Ser3丝胶蛋白。幼虫期中部丝腺对后部丝腺运送蛋白进行加工的功能已被广泛认同，但中部丝腺三个部分各自具体的功能和生理机制还尚未清楚。(Li et al.，2015.)后部丝腺合成和分泌丝素蛋白，丝素蛋白分泌到腺腔内经中部丝腺，丝胶蛋白对其进行加工包裹，流入具有导管作用的前部丝腺，最后挤压成丝从吐丝部分泌到体外。因为后部丝腺合成的丝素蛋白是工业上常用的材料，所以目前对后部丝腺的研究最多。丝腺器官的高速发育期一般是从五龄第3天开始，短时间内合成大量丝蛋白，到五龄末期排出体外吐丝结茧。（唐杰，2007； 陈瑞婷，2017.）

**1.2.2 丝蛋白分泌的调控基因**

生物体进行生命活动的过程中，有许多蛋白酶的参与。蛋白酶是催化肽键水解的酶类，参与肽的消化、其他酶的活化、细胞周期以及分化和自噬等等。（Rosenthal et al.，1999.）根据负责蛋白水解的基团来划分，至少分为六类蛋白酶，包括丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶、谷氨酸蛋白酶、苏氨酸蛋白酶以及金属基质蛋白酶。其中，半胱氨酸蛋白酶（Cysteine proteases），简称CPs（Jair et al.，2018.）是一类主要负责分解代谢以及蛋白质加工的酶，不仅广泛存在于动物体内，还存在于植物和微生物中，参与细胞内和细胞外蛋白质降解以及重塑等过程。（Barrett et al.，1981；Chapman et al.，1997；Yamamoto et al.，1999.）组织蛋白酶是溶酶体蛋白水解酶，大部分的组织蛋白酶，如组织蛋白酶B、C、F、H、K、L、O、S、V、X、W等都是半胱氨酸蛋白酶家族中的成员。（Pan et al.，2020.）

1990年，Takashi等人在家蚕的蚕卵中提取并且纯化了一种组织蛋白酶L样-半胱氨酸蛋白酶，他们将这种组织蛋白酶命名为BCP（Bombyx mori Cysteine Protease）。（Takashi et al.，1981；Kageyama et al.，1990.）BCP类似于哺乳动物体内的溶酶体酶，组织蛋白酶L，属于木瓜蛋白超家族。在幼虫卵巢内只积累并不表现出活性，但是在胚胎发生过程中对卵黄蛋白降解起到重要作用。（Yamamoto et al.，1999.）在接下来的研究中，BCP被发现也存在于家蚕的脂肪体、血液等部位。（Takahashi et al.，1992；Yamamoto et al.，2000.）1993年，Sumida等人在家蚕预蛹期的退化丝腺中检测到了另一种组织蛋白酶L样-半胱氨酸蛋白酶，并且发现它在试管内对丝素蛋白有水解活性，因而将它命名为丝素蛋白酶（Fibroinase）。（Sumida et al.，1993. Guo et al.，2019）

BCPI(Kurata et al.，2001.)

**1.2.3 外源蛋白转入丝腺研究现状（EGFP/蛛丝基因）**

**1.3家蚕丝腺发育的调控基因（FMBP-1/Yorkie）**

家蚕的一对丝腺

FMBP-1的表达受到microRNA Bmo-miR-2758的抑制（Wang等，2016 ）。Bmsage和Bmdimm是基本的螺旋-环-螺旋（bHLH）家族转录因子，是果蝇鼠尾草和dimm的同源物，并在家蚕幼虫的后部丝腺中特异性表达（Jones，2004年）。Bmdimm与共有的六核苷酸序列（E-box）结合，并与SGF-1（Zhao et al。，2014）和Bmsage（Zhao et al。，2015）在第五龄期末促进fib-H转录，而Bmsage不与E-box元素结合。另外，Bmsage调节胚胎早期的丝腺发育（Fox等，2013；Xin等，2015）。

我们揭示了FMBP-1通过将FMBP-1直接结合到fib-H启动子上游的-130元件上而抑制了fib-H转录，并与Bmdimm和Bmsage相互作用。

**1.3.1 bHLH基因家族（Mesp亚家族的Bmsage基因功能、发挥作用的时期与SGF1的相互作用、Bmdimm基因与其互相作用、FMBP-1作用）**

Bmsage基因在家蚕幼虫时期，主要在中部丝腺（MSG）以及后部丝腺（PSG）中表达。

**1.3.2细胞分裂**

细胞周期（cell cycle）是指细胞从一次分裂完成开始到下一次分裂所经历的全过程，分为间期（interphase）和分裂期（mitosis）。细胞在分裂间期主要完成染色体中DNA的复制和相关蛋白质的合成。

间期包括三个阶段，分别是第一间隙期（G1期）、DNA合成期（ S期）和第二间隙期（G2期）。（Payton et al.，2002.）G1期是一个生长期，主要进行RNA和蛋白质的生物合成，并且为S期的DNA合成做准备。S期是细胞增殖的关键时期，主要进行DNA的合成过程，并持续到母细胞分裂为两个子细胞为止。G2期是有丝分裂的物质准备期，合成有丝分裂所需的蛋白质和RNA分子，为分裂提供物质条件。

分裂期则分为有丝分裂前期（prophase）、中期（metaphase）、后期（anaphase）、末期（telophase）四个阶段，分裂前期染色质高度螺旋化，逐渐形成染色体；分裂中期染色体排列到细胞的赤道平面；分裂后期由于纺锤体微管活动，着丝点分裂，染色单体分开；分裂末期染色体逐渐解螺旋，母细胞最终分裂为两个子细胞。

为了确保分裂能正常进行，细胞内存在许多使分裂朝着正常方向进行的检验机制。面对诸如细胞大小调控、DNA损伤的响应、DNA复制的跟踪等问题，细胞周期调控检验点发挥其巨大作用。（Barnum et al.，2014.）

**1.3.3细胞周期基因的调控**

细胞分裂周期基因（cell division cycle gene，CDC基因）是一类产物表达具有细胞周期依赖性或者直接参与细胞周期调控的基因，主要包括Cyclin基因、CDK基因、CKI基因等。细胞周期基因表达的蛋白被称为细胞周期蛋白， 1983年Evans等人首次在海胆的胚胎中发现了特殊mRNA，这些mRNA编码3或4种特别丰富的蛋白质，但是在未受精卵中却几乎检测不到，并且每当细胞分裂时，这些蛋白质之一就会遭到破坏。因此，研究人员推测这些蛋白可能与细胞周期进行有关，并将这一类蛋白命名为细胞周期蛋白（Evans et al.，1983.）。真核生物的细胞周期主要由细胞周期蛋白（Cyclins）、细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶（CDKs）和细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子（CKIs）相互作用调控.（Said et al.，1995.）。