

利用家蚕核型多角体病毒多角体蛋白序列提高人表皮细胞生长因子表达水平

李跃东, 王星洋, 李硕豪, 吴小锋*

浙江大学 动物科学学院, 浙江 杭州 310058

李跃东, 王星洋, 李硕豪, 吴小锋. 利用家蚕核型多角体病毒多角体蛋白序列提高人表皮细胞生长因子表达水平[J]. 生物工程学报, 2024, 40(11): 4211-4218.

LI Yuedong, WANG Xingyang, LI Shuohao, WU Xiaofeng. Enhancing the expression level of human epidermal growth factor using the polyhedrin protein sequence of BmNPV[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(11): 4211-4218.

摘要: 人表皮细胞生长因子(human epidermal growth factor, hEGF)可用于治疗外科创伤(烧伤、烫伤)、修复组织、滋润皮肤、美容养颜等,但目前存在表达量低、价格昂贵等缺点。为了提高hEGF的表达水平、降低生产成本,本研究使用家蚕杆状病毒表达载体系统,利用多角体蛋白超高水平表达的现象,使用部分多角体蛋白序列与密码子优化后的hEGF融合进行表达,并将多个hEGF基因进行了串联表达,构建了N端融合不同多角体蛋白部分序列的多种融合表达载体。结果表明,通过上述策略,hEGF的蛋白表达水平显著提高,其中融合多角体N末端蛋白25个或者35个氨基酸编码序列、3个密码子优化后hEGF串联的表达载体表达水平最高。

关键词: 家蚕; 杆状病毒; 多角体蛋白序列; 融合表达

Enhancing the expression level of human epidermal growth factor using the polyhedrin protein sequence of BmNPV

LI Yuedong, WANG Xingyang, LI Shuohao, WU Xiaofeng*

College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China

Abstract: Human epidermal growth factor (hEGF) can be applied in the treatment of surgical trauma (burns, scalds), tissue repair, skin moisturizing, beauty, skincare, etc. However, the low expression and high cost limit the application of hEGF. In order to improve the expression level

资助项目: 政府间科技合作重点研发项目(2022YFE0124400); 国家自然科学基金(32172793)

This work was supported by the Key Research and Development Project for Intergovernmental Technology Cooperation (2022YFE0124400) and the National Natural Science Foundation of China (32172793).

*Corresponding author. E-mail: wuxiaofeng@zju.edu.cn

Received: 2024-04-26; Accepted: 2024-07-29; Published online: 2024-09-05

of hEGF and reduce the production cost, considering the high expression of polyhedrin, this study fused a partial sequence of polyhedrin with *hEGF* and expressed the fused sequence by using a silkworm baculovirus expression vector system. In view of the small molecular weight of hEGF, we connected *hEGF* genes in series and optimized the codons to construct multiple fusion expression vectors by fusing different partial sequences of polyhedrin at the N-terminus. The results showed that through the above strategy, the protein expression level of hEGF was significantly increased. The expression vector containing three concatenated *hEGF* genes with optimized codons and fused with the sequence encoding 25 or 35 residues at the N-terminus of polyhedrin showed the highest expression level.

Keywords: silkworm; baculovirus; polyhedrin; fusion expression

人表皮细胞生长因子(human epidermal growth factor, hEGF)最早由 Gregory 在 1975 年于人尿液中发现并鉴定^[1], 它是由 53 个氨基酸组成的小分子多肽, 分子量约为 6.2 kDa。hEGF 能调节和促进表皮细胞的生长和增殖, 修复皮肤组织。临床上可用于治疗外科创伤(烧伤、烫伤等)^[2-3]、皮肤溃疡^[4]、消化道溃疡^[5]、角膜损伤^[6]、进行组织修复等^[7]。除此之外, hEGF 作为一种有丝分裂原, 可通过促进表皮细胞增殖、分化和迁移, 进而加快细胞新陈代谢, 达到滋润皮肤和延缓衰老的目的, 因而被化妆品和医美行业广泛使用^[8], 被称为“美丽因子”。

从天然途径获取 1 mg hEGF 需要 500 L 人尿, 目前 hEGF 主要获取自人源细胞、酵母和大肠杆菌。通过人源细胞获取 hEGF 成本高昂、产量低, 难以满足市场需求。大肠杆菌表达系统无法实现蛋白表达的复杂修饰, 形成二硫键的能力有限, 因此表达的 hEGF 蛋白二级结构与天然 hEGF 相差较远, 其生物学活性不及真核表达系统或哺乳动物来源的 hEGF, 而且容易形成包涵体。酵母表达系统是目前最有效的生产 hEGF 蛋白的系统, 但只表达了 hEGF N 端的 51 个氨基酸而非完整的 hEGF, 且表达量较低、成本较高^[9]。杆状病毒表达载体系统具有相对较完善的蛋白翻译后加工修饰功能, 如二

硫键的形成等, 能较大幅度地保持外源蛋白原有的结构和生物学活性^[10]。根据已有报道, 杆状病毒表达载体系统可表达具有活性的 hEGF 蛋白, 但表达量较低^[11-12]。

本研究利用家蚕杆状病毒多角体蛋白超高水平表达的现象, 根据本课题组之前的研究结果^[13], 探索将多角体部分序列与 *hEGF* 进行融合表达来提高重组蛋白的表达水平, 并结合密码子优化(使用偏好密码子)与串联表达(因 hEGF 分子量较小)策略, 实现重组 hEGF 的高水平表达, 从而降低重组 hEGF 相应产品的生产成本和价格, 以推动重组 hEGF 的产业化发展。

1 材料与方法

1.1 材料

家蚕 BmN 细胞、大肠杆菌 DH10Bac 化学感受态细胞、改造后的一系列 pFastBac 载体、含有人表皮细胞生长因子 *hEGF* 基因的质粒均由本实验室保存, LipoInsectTM 昆虫细胞转染试剂购自上海碧云天生物技术股份有限公司, Anti-6×His tag[®] 抗体购自 Abcam 公司, 15%电泳预制胶、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 购自生工生物工程(上海)股份有限公司, 引物合成由北京擎科生物科技股份有限公司完成, 测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.2 人表皮细胞生长因子相关基因的克隆

以实验室之前构建的含有 *hEGF* (密码子未优化)和 *hEGF-bias* [根据家蚕核型多角体病毒 (*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus, BmNPV)多角体蛋白基因序列密码子使用频率优化为偏好密码子]的质粒作为 PCR 模板^[13], 使用 SnapGene Viewer 软件设计 PCR 所需引物, 分别克隆 *hEGF* 和 *hEGF-bias* 基因。本研究使用的引物序列见表 1。反应体系为: 2×Fast Pfu Master Mix 10 μL, 1 μg/μL 模板质粒 1 μL, 10 μmol/L 正、反向引物各 1 μL, ddH₂O 7 μL, 总体积为 20 μL。PCR 反应程序为: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 20 s, 30 个循环; 72 °C 5 min; 4 °C 保存。PCR 结束后使用 1%的琼脂糖凝胶进行电泳, 并切胶回收 PCR 片段, 连接到 T 载体上, 转化大肠杆菌 DH5α 化学感受态细胞, 在含有氨苄青霉素和卡那霉素的平板上事先涂上异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG)和 5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-半乳糖苷 (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside, X-Gal), 将适量菌液均匀

涂抹在平板上, 待长出菌落后, 挑取白色阳性菌落进行扩大培养, 进行 PCR 验证和测序。重组 T 载体分别记为 T-*hEGF* 和 T-*hEGF-bias*。

1.3 *hEGF* 和 *hEGF-bias* 串联基因的克隆

PCR 后基因的 3'端带有 *Bam*H I 识别序列, 5'端带有 *Bgl* II 识别序列, 利用 *Bgl* II 和 *Bam*H I 同尾酶的性质, 将前一个基因的 3'端和后一个基因的 5'端相连, 实现基因串联的目的。2 个 *hEGF/hEGF-bias* 基因串联后的重组载体命名为 T-2*hEGF* 和 T-2*hEGF-bias*, T-2*hEGF-NT* 和 T-2*hEGF-bias-NT* 为不含终止密码子 TAA 的中间载体, 3 个 *hEGF/hEGF-bias* 基因序列串联的重组载体命名为 T-3*hEGF* 和 T-3*hEGF-bias*。

1.4 含有多角体蛋白编码序列的 pFastBac 载体的构建

以 BmNPV 基因组为模板, 分别克隆包含多角体启动子以及编码 BmNPV 多角体蛋白 N 端 5、10、15、25、35、50、100、150、200、245 个氨基酸编码序列, 分别插入 pFastBac 载体 *Sna*B I 和 *Bam*H I 位点, 构建了 10 种类型的 pFastBac 载体。将上述串联个数为 1 的 *hEGF/*

表 1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')
hEGF-TEV-F	<u>GGATCCGAAAACCTGTATTTTCAGGGCAATAGTGAC</u> TCTGAATGTCCCCTGTCCCAC (<i>Bam</i> H I, TEV)
hEGF-TEV-R	<u>AAGCTTTTAGTGATGGTGATGGTGATG</u> (<i>Hind</i> III, 6×His)
hEGF-bias-TEV-F	<u>GGATCCGAAAACCTGTATTTTCAGGGCAACAGCGAC</u> AGCGAGTGCCCCCTCAGCCAC (<i>Bam</i> H I, TEV)
hEGF-Bgl-F	<u>AGATCTGAAAACCTGTATTTTCAGGGC</u> (<i>Bgl</i> II, TEV)
hEGF+8-R	<u>AAGCTTGAGGACAGGGATCCCTTAGTGATGGTGATGGTGATG</u> (<i>Hind</i> III, <i>Bam</i> H I, 6×His)
hEGF+8-NT-R	<u>AAGCTTGAGGACAGGGATCCGTGATGGTGATGGTGATG</u> (<i>Hind</i> III, <i>Bam</i> H I, 6×His)
M13-F	CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG
M13-R	AGCGGATAACAATTCACACAGG
HTB-F	TTCTAGTGGTTGGCTACGTA
HTB-R	ATTATGATCCCTAGTACTTCTCGACAAGC

The underline represents the restriction endonuclease recognition sequence, the double underline represents the TEV (tobacco etch virus) protease recognition sequence, and the wavy line represents the 6×His sequence.

hEGF-bias 序列分别插入上述 10 种 pFastBac 载体中, 共获得 20 种重组载体; 串联个数为 2 和 3 的 *hEGF/hEGF-bias* 序列分别插入改造后的部分 pFastBac 载体中(5-100), 共获得 28 种重组载体。实现了 *hEGF/hEGF-bias* 与 BmNPV 多角体蛋白部分序列的融合, 2 个或者 3 个 *hEGF/hEGF-bias* 串联后的序列另外插入商业化的原始 pFastBacHT B 载体中, 共获得 4 种重组载体。转化后取适量菌液均匀涂抹在含有氨基青霉素和庆大霉素的平板上, 待长出菌落后, 挑取菌落扩大培养, 进行 PCR 验证、酶切验证和测序验证。获得的重组 pFastBac 载体分别记为 pE5-pE245、pEb5-pEb245、p2EH、p2E5-p2E100、p2EbH、p2Eb5-p2Eb100、p3EH、p3E5-p3E100、p3EbH、p3Eb5-p3Eb100, 共 52 种重组 pFastBac 载体(p: 重组质粒载体, E: *hEGF*, Eb: *hEGF-bias*, H: 商业化原始 pFastBacHT B 载体, 5-245: 改造后融合有不同多角体蛋白氨基酸数目的 pFastBac 载体)。重组 pFastBac 载体结构示意图如图 1 所示。

1.5 重组 Bacmid 的获取

将通过验证的重组 pFastBac 载体转化入大

肠杆菌 DH10Bac 化学感受态细胞中, 加入 LB 培养基后 37 °C 摇床培养至少 4 h, 取 2-10 μL 菌液均匀涂抹在含有卡那霉素、庆大霉素、四环素的平板上, 平板事先涂抹均匀 IPTG 和 X-Gal, 置于 37 °C 培养, 挑取白色阳性菌斑扩大培养, 使用 M13 通用引物进行菌液 PCR 验证, 检测目的基因是否成功发生转座插入到 Bacmid 质粒中, 重组 Bacmid 验证无误后提取质粒 4 °C 保存备用。重组 Bacmid 分别记为 BacE5-BacE245、BacEb5-BacEb245、Bac2EH、Bac2E5-Bac2E100、Bac2EbH、Bac2Eb5-Bac2Eb100、Bac3EH、Bac3E5-Bac3E100、Bac3EbH、Bac3Eb5-Bac3Eb100 (与重组 pFastBac 载体对应), 共 52 种重组 Bacmid 表达载体。

1.6 Bacmid 的转染、重组病毒的获取

按照 LipoInsect™ 昆虫细胞转染试剂说明书进行重组 Bacmid 的转染, 转染后约 96 h 家蚕 BmN 细胞出现明显感染, 收集上清液记为 P0 代重组病毒。重组病毒分别记为 VE5-VE245、VEb5-VEb245、V2EH、V2E5-V2E100、V2EbH、V2Eb5-V2Eb100、V3EH、V3E5-V3E100、V3EbH、V3Eb5-V3Eb100 (与重组 pFastBac 载体和重组 Bacmid 对应), 共 52 种重组杆状病毒。

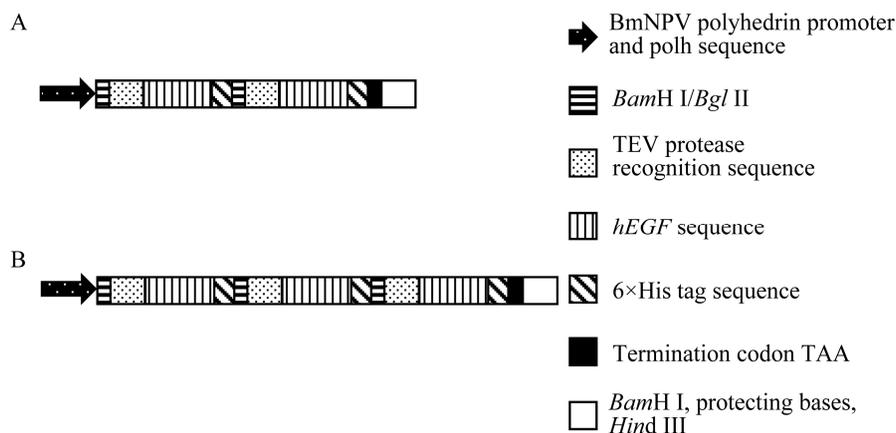


图 1 *hEGF* 插入 pFastBac 载体后重组 pFastBac 载体结构示意图 A: 2 个 *hEGF* 串联. B: 3 个 *hEGF* 串联
Figure 1 Schematic diagram of the recombinant pFastBac vector structure after *hEGF* inserted into pFastBac vector. A: Two *hEGFs* in series. B: Three *hEGFs* are connected in series.

1.7 蛋白表达分析

收集感染后的细胞裂解制样,进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析。使用 15% 的电泳预制胶,上样量为 5 μ L。SDS-PAGE 的条件为 70 V、2 h 30 min,若不进行 Western blotting 检测,则 SDS-PAGE 后直接使用考马斯亮蓝染色 2 h,之后使用蒸馏水反复漂洗凝胶脱色,漂洗干净后即可进行观察拍照;若进行 Western blotting 检测,转膜条件为 100 mA、1 h,之后使用 5% 的脱脂奶粉(TBST 溶液溶解配制)封闭 2 h,一抗(鼠抗 6 \times His 抗体)孵育 1 h (脱脂奶配制,稀释 2 000 倍),TBST 溶液漂洗聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜,每次至少 10 min,漂洗 3 次,二抗(HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG)孵育 1 h (TBST 溶液配制,稀释 10 000 倍),TBST 溶液漂洗 PVDF 膜,每次至少 10 min,漂洗 3 次,最后使用增强型 ECL 化学发光检测试剂盒(enhanced ECL chemiluminescent substrate kit)显影拍照。

2 结果与分析

2.1 *hEGF* 相关基因的克隆与验证

hEGF 含有 53 个氨基酸,对应 DNA 碱基长度为 162 bp,加上添加的 TEV 蛋白酶切位点序列、6 \times His 序列、限制性核酸内切酶酶切位点序列,所以经 PCR 后单个 *hEGF* 和 *hEGF-bias* 长度为 213 bp。琼脂糖凝胶电泳结果如图 2 所示。多个基因序列串联后,*2hEGF* 和 *2hEGF-bias* 大小为 431 bp,*3hEGF* 和 *3hEGF-bias* 大小为 635 bp,*hEGF* 串联后的重组 T 载体使用 M13 通用引物进行 PCR 验证,PCR 产物理论大小比基因序列大约 100 bp,结果如图 3 和图 4 所示,PCR 产物大小符合预期。上述所有通过 PCR 验证的重组 T 载体测序结果正确。连接 pFastBac 载体后使用自行设计的载体通用引物(HTB-F、

HTB-R)进行 PCR 验证,PCR 产物理论大小为(基因大小+融合多角体蛋白基因大小+100) bp,其中 *2hEGF* 连接 pFastBac 系列载体后的 PCR 验证结果如图 5 所示,条带迁移率呈现梯度下降,大小符合理论预期,测序结果证实目的条带正确插入到 pFastBac 载体中。

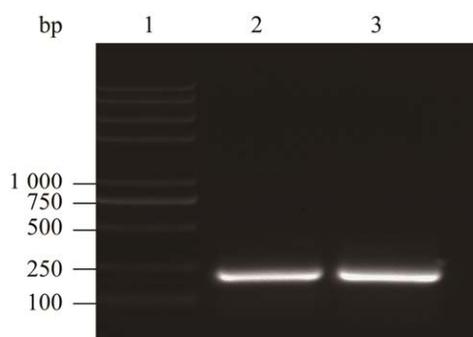


图 2 *hEGF* 和 *hEGF-bias* PCR 扩增后电泳结果图
Figure 2 Electrophoretic results of *hEGF* and *hEGF-bias* after PCR amplification. Lane 1: DNA marker; Lane 2: *hEGF*; Lane 3: *hEGF-bias*.

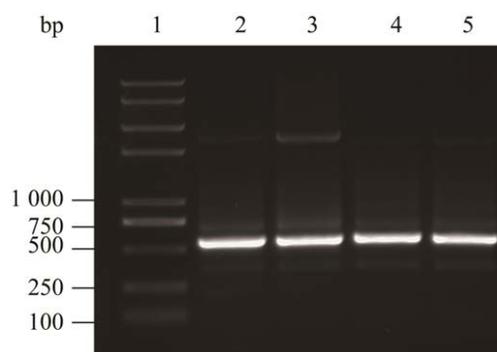


图 3 T-*2hEGF*、T-*2hEGF-NT*、T-*2hEGF-bias*、T-*2hEGF-bias-NT* 重组 T 载体的 PCR 验证
Figure 3 PCR validation of T-*2hEGF*, T-*2hEGF-NT*, T-*2hEGF-bias* and T-*2hEGF-bias-NT* recombinant T vectors using M13 universal primers. NT is an intermediate vector without the termination codon TAA. Lane 1: DNA marker; Lane 2: T-*2hEGF*; Lane 3: T-*2hEGF-NT*; Lane 4: T-*2hEGF-bias*; Lane 5: T-*2hEGF-bias-NT*.

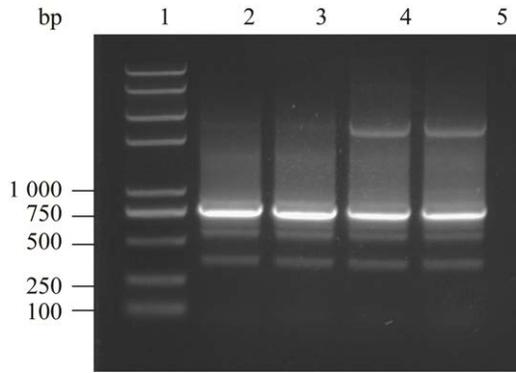


图4 T-3hEGF、T-3hEGF-bias 重组T载体的PCR验证

Figure 4 PCR validation of T-3hEGF and T-3hEGF-bias recombinant T vectors, amplified using M13 universal primers. Lane 1: DNA marker; Lane 2, 3: T-3hEGF; Lane 4, 5: T-3hEGF-bias.

2.2 人表皮细胞生长因子的蛋白表达检测

不同形式的重组人表皮细胞生长因子的蛋白分子量预测结果如表2所示,第1列表示重组hEGF融合的多角体蛋白的氨基酸长度,第2-4列分别表示1-3个hEGF串联后融合不同氨基酸长度多角体蛋白后的分子量。图6为2个hEGF串联表达后的Western blotting检测结果,从图中可以看出hEGF均得到了成功表达,说明表达载体构建成功,从图中还可以发现条带迁移率呈现梯度下降趋势,但是除了V2E100外,其余重组蛋白的大小与理论计算值相比偏小,可能是小分子量的重组蛋白发生了降解所致。图7展示了hEGF表达水平相对较高的重组杆状病毒感染细胞后的SDS-PAGE检测结果,从图中可以看出V3Eb25和V3Eb35表达水平相对较高,有较明显的特异性条带(三角形所示),说明蛋白表达水平较高。由此可见,通过密码子优化和串联融合多角体蛋白序列表达策略确实可以提高重组hEGF的蛋白表达水平。

表2 重组hEGF蛋白分子量预测表

Table 2 Prediction of molecular weight of recombinant hEGF protein

Polyhedrin length/hEGF number	E (kDa)	2E (kDa)	3E (kDa)
pFastBacHT B	9.6	19.3	27.3
5	8.6	16.7	24.7
10	9.2	17.2	25.3
15	9.8	17.8	25.8
25	11.0	19.1	27.1
35	12.2	20.3	28.3
50	14.1	22.2	30.2
100	20.0	28.0	36.0
150	26.0	-	-
200	31.8	-	-
245	36.8	-	-

E, 2E and 3E respectively represent the number of hEGF series connected. pFastBacHT. B: Commercial unmodified vector, with zero fusion of polyhedrin.

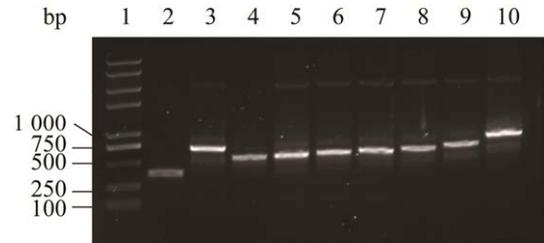


图5 p2EH、p2E5-p2E100 重组pFastBac载体的PCR验证

Figure 5 PCR validation of p2EH and p2E5-p2E100 recombinant pFastBac vectors. Lane 1: DNA marker; Lane 2: Commercialized original pFastBacHT B vector; Lane 3: p2EH; Lane 4-10: p2E5-p2E100.

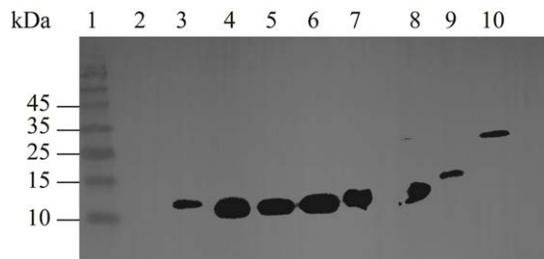


图6 V2EH、V2E5-V2E100 感染BmN细胞后蛋白表达的Western blotting检测结果

Figure 6 Western blotting analysis of protein expression in BmN cells infected with V2EH and V2E5-V2E100. Lane 1: Protein marker; Lane 2: Uninfected cells serve as negative controls; Lane 3: V2EH; Lane 4-10: V2E5-V2E100.

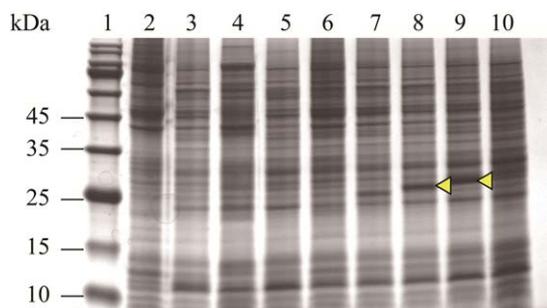


图 7 人表皮细胞生长因子表达水平较高的几种重组杆状病毒融合表达的 SDS-PAGE 结果

Figure 7 SDS-PAGE analysis of fusion expression of several recombinant baculovirus with high expression levels of human epidermal growth factor. Lane 1: Protein marker; Lane 2: Uninfected cells serve as negative controls; Lane 3: V2Eb15; Lane 4: V2Eb35; Lane 5: V2Eb50; Lane 6: V3Eb5; Lane 7: V3Eb15; Lane 8: V3Eb25; Lane 9: V3Eb35; Lane 10: V3Eb50.

3 讨论与结论

本研究采用 BmNPV 多角体蛋白 N 端不同长度的氨基酸序列与 *hEGF* 进行融合表达的策略,并结合密码子优化、多个 *hEGF* 基因序列串联表达的方法,共构建了 52 种表达载体,对应产生了 52 种表达重组 hEGF 的杆状病毒。进一步通过细胞感染实验,在家蚕 BmN 细胞中表达重组 hEGF 蛋白,通过 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析共筛选出 V3Eb25 和 V3Eb35 这 2 种蛋白表达水平较高的重组杆状病毒,表明本研究提高蛋白表达水平的策略是切实可行的,蛋白表达量与之前的研究结果相比有了明显的提高^[13-14]。之前使用杆状病毒表达载体系统表达 hEGF 的研究中, hEGF 的表达水平普遍不高。赵秀玲等利用家蚕杆状病毒表达载体系统,与多角体蛋白 N 端 116 个氨基酸融合后表达,利用家蚕作为生物反应器,在家蚕细胞和幼虫中表达人表皮细胞生长因子,细胞中表达量约 $6-7 \mu\text{g}/2 \times 10^6$ 个细胞,家蚕血淋巴中的蚕血淋巴的表达量约为 $32 \mu\text{g}/\text{mL}$ ^[11];薛仁宇等通过优化 *hEGF* 密码子

为 BmNPV 偏好的密码子,获取的重组 hEGF 蛋白最终表达量为 $28.4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 蚕血淋巴和 $33.07 \mu\text{g}/\text{mL}$ 蛹血淋巴^[12];曾小群等将 3 个密码子优化后的 *hEGF* 序列串联,在家蚕虫体中表达量达到 $148.82 \mu\text{g}/\text{mL}$,在 $P_{6,9}$ 和 P_{polh} 双启动子调控下,串联 2 个和 3 个优化 *hEGF* 的表达量分别为 $148.82 \mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $153.36 \mu\text{g}/\text{mL}$ ^[13];不过仅能通过 Western blotting 的技术手段检测到 hEGF 的表达, SDS-PAGE 检测不到特异性条带,很难用于实际生产。本研究通过对 SDS-PAGE 胶进行考马斯亮蓝染色就可以观察到较明显的蛋白条带,实现了 hEGF 在杆状病毒表达载体系统中的高水平表达。本研究对于利用家蚕作为生物反应器进行大规模生产 hEGF 提供了参考,对于进一步提高 hEGF 的表达水平具有较好的借鉴意义。根据文献报道,在大肠杆菌和烟草中表达的重组人表皮细胞生长因子都是具有生物活性的^[15-16],下一步将考虑分别在 BmN 细胞和家蚕虫体中表达重组 hEGF,探索最优的蛋白纯化方法,并对纯化的 hEGF 重组蛋白进行生物功能检测分析。

REFERENCES

- [1] GREGORY H. Isolation and structure of urogastrone and its relationship to epidermal growth factor[J]. *Nature*, 1975, 257: 325-327.
- [2] 陈泽春, 李军, 陈涛. 表皮细胞生长因子联合复方多黏菌素 B 对深 II 度烧伤创面瘢痕的影响[J]. *海南医学*, 2019, 30(15): 1947-1949.
CHEN ZC, LI J, CHEN T. Effect of epidermal growth factor combined with compound polymyxin B on wound scar in patients with deep second degree burn[J]. *Hainan Medical Journal*, 2019, 30(15): 1947-1949 (in Chinese).
- [3] 韩张杰. 表皮细胞生长因子在重度烧伤伴吸入性损伤患者中的应用效果[J]. *实用临床医药杂志*, 2016, 20(11): 193-194.
HAN ZJ. Application effect of epidermal growth factor in patients with severe burn and inhalation injury[J]. *Journal of Clinical Medicine in Practice*, 2016, 20(11):

- 193-194 (in Chinese).
- [4] 李玮, 霍静煜. 表皮细胞生长因子+地塞米松+奥硝唑的壳聚糖膜修复兔口腔溃疡的效果观察[J]. 北方药学, 2019, 16(3): 162, 188.
LI W, HUO JY. Observation on the effect of epidermal growth factor+dexamethasone+ornidazole chitosan membrane in repairing oral ulcer in rabbits[J]. Journal of North Pharmacy, 2019, 16(3): 162, 188 (in Chinese).
- [5] 黄国栋, 黄强, 李晴, 游宇, 杨治芳, 黄媛华. 消化性溃疡及其相关细胞因子的关系探讨[J]. 山东医药, 2009, 49(9): 109-110.
HUANG GD, HUANG Q, LI Q, YOU Y, YANG ZF, HUANG YH. Discussion on the relationship between peptic ulcer and related cytokines[J]. Shandong Medical Journal, 2009, 49(9): 109-110 (in Chinese).
- [6] 石成方, 赵志力. 表皮细胞生长因子冻干粉和阿维A辅助物理光疗法治疗银屑病的效果[J]. 中国医药导报, 2015, 12(32): 17-20.
SHI CF, ZHAO ZL. Effect of epidermal growth factor freeze-dry powder and Acitretin assisted NB-UVB in the treatment of psoriasis[J]. China Medical Herald, 2015, 12(32): 17-20 (in Chinese).
- [7] 耿康, 郭力. 重组人表皮细胞生长因子在创面修复中的应用[J]. 西部医学, 2012, 24(12): 2247-2249, 2252.
GENG K, GUO L. Study on recombinant human epidermal growth factor and its effect in wound repair[J]. Medical Journal of West China, 2012, 24(12): 2247-2249, 2252 (in Chinese).
- [8] 程嘉君, 高飞, 秦倩茹, 夏凤艳, 尹良鸿, 钱永常, 谢利军. 护肤生物制品辅料中重组人表皮细胞生长因子抑制剂的筛选[J]. 中国生物制品学杂志, 2019, 32(2): 181-185.
CHENG JJ, GAO F, QIN QR, XIA FY, YIN LH, QIAN YC, XIE LJ. Screening of recombinant human epidermal growth factor inhibitor in subsidiary materials of biological products for skin care[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2019, 32(2): 181-185 (in Chinese).
- [9] GEORGE-NASCIMENTO C, GYENES A, HALLORAN SM, MERRYWEATHER J, VALENZUELA P, STEIMER KS, MASIARZ FR, RANDOLPH A. Characterization of recombinant human epidermal growth factor produced in yeast[J]. Biochemistry, 1988, 27(2): 797-802.
- [10] SRIRAM S, PALHAN VB, GOPINATHAN KP. Heterologous promoter recognition leading to high-level expression of cloned foreign genes in *Bombyx mori* cell lines and larvae[J]. Gene, 1997, 190(1): 181-189.
- [11] 赵秀玲. 多角体-人表皮生长因子融合蛋白基因(Ph-EGF)在家蚕细胞和幼虫中表达的研究[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2002.
ZHAO XL. Expression of polyhedrin-hEGF fusion protein in cultured cells and larvae of *Bombyx mori*[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2002 (in Chinese).
- [12] 薛仁宇, 曹广力, 陈森, 沈卫德, 魏育红, 贡成良. 利用家蚕表达合成人表皮生长因子(EGF)及产物对胃黏膜损伤的修复作用[J]. 蚕业科学, 2007, 33(1): 67-73.
XUE RY, CAO GL, CHEN M, SHEN WD, WEI YH, GONG CL. Expression of Synthetic hEGF Gene in *Bombyx mori* and the effect of its product on acute gastric mucosa lesion[J]. Science of Sericulture, 2007, 33(1): 67-73 (in Chinese).
- [13] 曾小群, 李跃东, 吴小锋. 家蚕杆状病毒表达系统优化表达人表皮生长因子(hEGF)的研究[J]. 蚕业科学, 2022, 48(4): 317-323.
ZENG XQ, LI YD, WU XF. Optimized expression of human epidermal growth factor (hEGF) by using silkworm-baculovirus expression system[J]. Acta Sericologica Sinica, 2022, 48(4): 317-323 (in Chinese).
- [14] 郭爱芹. 家蚕杆状病毒多角体基因与外源目的基因融合表达的研究[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2009.
GUO AQ. Fusion expression of *Bombyx mori* baculovirus polyhedrin gene and foreign target gene[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2009 (in Chinese).
- [15] 吴少敏. 人表皮细胞生长因子在大肠杆菌中的高效表达及功能鉴定[D]. 广州: 华南理工大学硕士学位论文, 2016.
WU SM. High-level expression and functional identification of human epidermal growth factor in *E. coli*[D]. Guangzhou: Master's Thesis of South China University of Technology, 2016 (in Chinese).
- [16] 韦正乙. 利用烟草表达重组牛凝乳酶及人表皮生长因子的研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学博士学位论文, 2016.
WEI ZY. Utilization of tobacco for expression of recombinant bovine chymosin and human epidermal growth factor[D]. Shenyang: Doctoral Dissertation of Shenyang Agricultural University, 2016 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)