

# 家蚕凋亡蛋白抑制因子 (BmIAP) 基因真核表达与功能分析

易华山<sup>1,2</sup>, 马鲜平<sup>1</sup>, 潘敏慧<sup>2,\*</sup>, 鲁成<sup>2,\*</sup>

(1. 西南大学荣昌校区动物医学系, 重庆 402460; 2. 家蚕基因组生物学国家重点实验室, 重庆 400715)

**摘要:**【目的】家蚕 *Bombyx mori* 凋亡蛋白抑制因子 (BmIAP) 是在家蚕中发现的一个凋亡蛋白抑制因子 (IAP)。本研究旨在验证家蚕 BmIAP 蛋白在家蚕细胞内的功能特征, 以进一步研究 BmIAP 在家蚕细胞凋亡中的作用。【方法】对构建的瞬时表达载体 PIZ/V5-BmIAP-dsRed, 应用脂质体转染家蚕 BmN-SWU1 细胞; 应用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 分析 *BmIAP* mRNA 及蛋白表达水平; 通过 150 ng/mL 放线菌素 D 诱导家蚕 BmN-SWU1 细胞 12, 18 和 24 h, 应用免疫荧光及实时荧光定量 PCR 方法, 分析 BmIAP 瞬时表达与细胞凋亡的关系。【结果】构建的瞬时表达载体 PIZ/V5-BmIAP-dsRed 能在家蚕 BmN-SWU1 细胞表达 BmIAP 蛋白, 其 *BmIAP* mRNA 表达水平上调近 45 倍, 融合蛋白约为 60 kD; *BmIAP* 基因瞬时表达 72 h 后, BmIAP 能显著抑制放线菌素 D 诱导 12 h 时的家蚕 BmN-SWU1 细胞凋亡。【结论】BmIAP 蛋白在家蚕细胞中能抑制家蚕细胞凋亡, 是家蚕的一种凋亡蛋白抑制因子。

**关键词:** 家蚕; 细胞凋亡; 凋亡蛋白抑制因子; 真核表达; 瞬时表达

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2017)01-0018-06

## Eukaryotic expression and function analysis of *Bombyx mori* inhibitor of apoptosis protein (BmIAP) gene

YI Hua-Shan<sup>1,2</sup>, MA Xian-Ping<sup>1</sup>, PAN Min-Hui<sup>2,\*</sup>, LU Cheng<sup>2,\*</sup> (1. Department of Animal Medicine, Rongchang Campus of Southwest University, Rongchang, Chongqing 402460, China; 2. State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, Chongqing 400715, China)

**Abstract:** 【Aim】*Bombyx mori* inhibitor of apoptosis protein (BmIAP) has been found in the silkworm, *B. mori*, and characterized as a protein of the IAP (inhibitor of apoptosis protein) family. This study aims to verify its function as a suppressor of apoptosis in *B. mori* cells, so as to further study the roles of BmIAP in cell apoptosis. 【Methods】The transient expression vector named PIZ/V5-BmIAP-dsRed was transfected in the BmN-SWU1 cells of *B. mori* by liposome, and the mRNA and protein expression levels of *BmIAP* gene were evaluated by real-time quantitative PCR and Western blot analysis, respectively. The BmN-SWU1 cells were induced by 150 ng/mL actinomycin D for 12, 18 and 24 h, and the relationship between BmIAP protein and cell apoptosis was assayed by immunofluorescence and real-time quantitative PCR methods. 【Results】The PIZ/V5-BmIAP-dsRed vector effectively expressed BmIAP fusion protein of about 60 kD, and the mRNA expression level of *BmIAP* was up-regulated 45-fold in BmN-SWU1 cells of *B. mori*. After *BmIAP* was transiently expressed for 72 h using PIZ/V5-BmIAP-dsRed vector in the BmN-SWU1 cells, BmIAP significantly inhibited the apoptosis in the BmN-SWU1 cells at 12 h after induction by actinomycin D. 【Conclusion】BmIAP can inhibit apoptosis in *B. mori* cells and is one of the inhibitor of apoptosis proteins in *B. mori*.

**Key words:** *Bombyx mori*; apoptosis; inhibitor of apoptosis protein (IAP); eukaryotic expression;

基金项目: 西南大学博士基金 (SWU114062); 中央高校基本业务费专项资金 (XDJK2015C032)

作者简介: 易华山, 男, 1980 年 11 月生, 甘肃临夏人, 博士, 讲师, 研究方向为细胞遗传与细胞工程, E-mail: dyxyihuashan@swu.edu.cn

\* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: pmh047@126.com; lucheng@swu.edu.cn

收稿日期 Received: 2016-09-08; 接受日期 Accepted: 2016-12-15

## transient expression

凋亡蛋白抑制因子(inhibitor of apoptosis proteins, IAPs)是一类高度保守的内源性抗细胞凋亡因子家族,主要通过抑制 Caspase 活性和参与调节核因子 NF- $\kappa$ B 等而抑制细胞凋亡(apoptosis)(许杨和赵晓航, 2010; Simone and Domagoj, 2012)。细胞凋亡对维持体内器官、组织及细胞数量的相对平衡与内环境的稳定起着决定性作用,在动物的发育、器官分化和抵抗环境胁迫中发挥重要作用(Thornberry and Lazebnik, 1998; Simone and Domagoj, 2012; 宋娟等, 2014)。在正常的细胞中, IAP 通常与 Caspase 结合而抑制 Caspases 活性,使凋亡 Caspase 以非活性的酶原形式存在(Silke and Meier, 2013)。但在肿瘤细胞内高表达 IAPs 成为肿瘤细胞抗细胞凋亡的关键分子,细胞凋亡调控异常与肿瘤细胞耐药密切相关, IAPs 也已成为肿瘤靶向治疗的靶点进而成为研究热点(许杨和赵晓航, 2010; Simone and Domagoj, 2012)。

IAPs 广泛存在于病毒、细菌、酵母、昆虫和哺乳动物中,其至少含有一个 BIR(baculovirus inhibitory repeat)结构域,直接同 Caspases 结合并抑制它们的活性(Thornberry and Lazebnik, 1998; Simone and Domagoj, 2012)。IAP 蛋白也能与活化的 Caspase 的 IAP 结合基序(IAP binding motif, IBMs)结合,抑制 Caspase3/7/9 的催化活性而阻断细胞凋亡进程(Thornberry and Lazebnik, 1998; Simone and Domagoj, 2012)。放线菌素 D (actinomycin D, Act D)是一种 DNA 损伤试剂,与 DNA 结合,抑制细胞 RNA 和蛋白质的合成。大量研究表明, Act D 是一种有效诱导细胞凋亡的诱导剂,在昆虫细胞中能迅速引起大量的细胞凋亡而广泛用于细胞凋亡研究(Lindell, 1976; Kumarswamy and Chandna, 2010)。本研究通过在家蚕 *Bombyx mori* 细胞中瞬时表达 BmIAP 蛋白,应用放线菌素 D 诱导家蚕细胞凋亡,研究 BmIAP 基因的表达特征及抗凋亡功能。

家蚕是鳞翅目昆虫研究的典型模式生物,是支撑蚕丝产业的生物基础,同时也是开发新一代生物反应器和新型昆虫产业的材料(Xia *et al.*, 2014)。本研究对家蚕 BmIAP 基因进行了瞬时表达与抗凋亡特性研究,为阐释家蚕 BmIAP 基因在家蚕细胞凋亡中的调控机制以及其在家蚕变态发育过程中的调控作用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 质粒、细胞与动物:** PIZ/V5-BmIAP-dsRed 载体由易华山博士构建(易华山, 2014), PIZ/V5-dsRed 载体由本实验室保存;家蚕胚胎细胞系: BmN-SWU1(Pan *et al.*, 2010)于 27℃ 培养箱中用含有 10% 的胎牛血清(PAA)的 TC-100 昆虫细胞培养基(Invitrogen; Carlsbad, CA, USA)(Summers and Smith, 1987)培养。

**1.1.2 主要试剂:** 放线菌素 D (A4262, Sigma); Caspase 抑制剂(G5961, Promega);兔源 Anti-PFP 抗体(ab62341, Abcam);脂质体(0409705001, Roche);荧光定量 PCR 试剂盒(RR037A),购自大连宝生物公司;超纯质粒提取试剂盒(QIAGEN, 12145);细胞凋亡-Hoechst33258 染色试剂盒(C0003),PMSF(ST506),辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG,均购自碧云天生物公司;蛋白 Marker(DM201, 全式金);细胞培养瓶和细胞培养板均购自美国 Corning 公司;其余试剂均购自上海生工生物工程股份有限公司。

### 1.2 瞬时表达质粒转染家蚕细胞

当家蚕 BmN-SWU1 细胞在细胞培养瓶生长到一定密度(90%)后,将细胞传至放有 24 孔圆口盖玻片(爬片, Fisher 公司)的细胞培养板中。PIZ/V5-BmIAP-dsRed 和 PIZ/V5-dsRed 超纯质粒各 800 ng 与 2  $\mu$ L 脂质体在无抗生素的细胞培养基中孵育 30 min,转染 BmN-SWU1 细胞;对转染后 48 h 和 72 h 的 BmN-SWU1 细胞进行荧光显微镜(BX51, Olympus)观察(易华山, 2014)。

### 1.3 qRT-PCR 检测 BmIAP 基因瞬时表达

实时荧光定量 PCR 检测以家蚕 *Actin 4* 为内参基因,定量引物为 SW22934-F 和 SW22934-R; BmIAP (GenBank 登录号: AY155274.1)定量引物 QRT-PCR-IAP-F 和 qRT-PCR-IAP-R, 扩增大小为 180 bp(表 1);以转染 PIZ/V5-BmIAP-dsRed 和 PIZ/V5-dsRed 超纯质粒 48 和 72 h 后的 BmN-SWU1 细胞分别提取细胞总 RNA,反转录合成 cDNA,以内参基因和 BmIAP 基因定量引物进行 QRT-PCR 检测分析,每个基因做 3 个生物学重复。检测体系(15  $\mu$ L):

表 1 本研究所用引物  
Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列(5' - 3') Primer sequence	引物用途 Use of primers
QRT-PCR-IAP-F	CCCAGTGTCCCTTTGTAC	
QRT-PCR-IAP-R	ATCTCGGCCAGTCTTG	实时荧光定量 PCR
SW22934-F	TTCGTA CTGGCTCTTCTCGT	Real-time PCR
SW22934-R	CAAAGTTGATAGCAATTCCCT	

ddH<sub>2</sub>O 4.5 μL; SYBR 7.5 μL; 上下游引物各 1 μL; cDNA 1 μL; 运行程序: 95°C 30 s; 95°C 5 s, 60°C 30 s, 40 轮循环, 具体操作参照易华山(2014)进行。

#### 1.4 瞬时表达产物的 Western blot 分析

取分别转染 PIZ/V5-BmIAP-dsRed 和 PIZ/V5-dsRed 48 和 72 h 后的 BmN-SWU1 细胞提取细胞总蛋白, 经 SDS-PAGE 电泳后转移至 PVDF 膜上, 封闭后, 一抗 Anti-RFP 兔单抗(1:5 000, v/v)孵育, 或兔 Tubulin 单抗, 37°C 2 h, 再经 HRP 标记羊抗兔 IgG 二抗(1:5 000, v/v)孵育 1 h, 化学发光显影操作步骤以碧云天试剂盒操作说明进行, 最后使用 ECL kit 显色成像进行 Western blot 分析(易华山, 2014)。

#### 1.5 放线菌素 D 诱导与 BmIAP 表达特征

当家蚕 BmN-SWU1 细胞在细胞培养瓶生长到一定密度(90%)后, 用 150 ng/mL 的放线菌素 D (Sigma) 诱导家蚕细胞凋亡, 同时以放线菌素 D 溶解剂 DMSO (C6164, Sigma) 及含终浓度为 20 μmol/L Caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK (G5961, Promega) 处理细胞组作为对照(潘敏慧等, 2008; Yi *et al.*, 2014), 分别对诱导后的 12, 18 和 24 h 的 BmN-SWU1 细胞进行 qRT-PCR, 分析 *BmIAP* 基因表达特征。

#### 1.6 原位免疫荧光观察

将生长良好的 BmN-SWU1 细胞铺于含爬片的 24 孔细胞培养板, 分别转染 PIZ/V5-BmIAP-dsRed 和 PIZ/V5-dsRed 72 h 后, 吸去细胞培养基, 按易华山(2014)进行 Hoechst33258 染色, 制片、封片并在正置荧光显微镜观察并摄像分析; *BmIAP* 基因瞬时表达后经 150 ng/mL 放线菌素 D 诱导 12, 18 和 24 h 的 BmN-SWU1 细胞进行 Hoechst 染色, 进行荧光显微镜(OLYMPUS, BX51)观察, 并按 Yi 等(2014)对 Hoechst33258 染色的细胞, 随机选取 3 个视野, 统计学分析 BmIAP 瞬时表达对放线菌素 D 诱导的家蚕 BmN-SWU1 细胞凋亡的影响。

#### 1.7 数据分析

以家蚕 BmIAP 基因在家蚕 BmN-SWU1 细胞中

的表达量为基准, 研究该基因在瞬时表达及放线菌素 D 诱导条件下的表达情况, 利用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法进行数据分析(Livak and Schmittgen, 2001), 再把数据导入 GraphPad Prism 5, 作图分析。

## 2 结果

### 2.1 BmIAP 蛋白在家蚕 BmN-SWU1 细胞中的瞬时表达

超纯质粒 PIZ/V5-BmIAP-dsRed 和 PIZ/V5-dsRed 转染家蚕 BmN-SWU1 细胞转染 48 h 后, 在荧光显微镜下观察转染重组质粒 PIZ/V5-dsRed 和 PIZ/V5-BmIAP-dsRed 的家蚕 BmN-SWU1 细胞, 都能在绿色激发光下观察到强而发亮的红色荧光, 表明 BmIAP 可与 dsRed 在家蚕 BmN-SWU1 细胞中融合表达(图 1)。

### 2.2 家蚕 BmN-SWU1 细胞中 BmIAP mRNA 及蛋白表达分析

分别在 PIZ/V5-BmIAP-dsRed 和 PIZ/V5-dsRed 质粒转染家蚕 BmN-SWU1 细胞 48 h 和 72 h 后, 进行 qRT-PCR 和 Western blot 分析家蚕 *BmIAP* mRNA 及其编码蛋白的表达特征。结果表明, 在家蚕 BmN-SWU1 细胞中 PIZ/V5-BmIAP-dsRed 载体瞬时表达 48 h 和 72 h 后 *BmIAP* mRNA 表达水平比 PIZ/V5-dsRed 对照组显著上调(分别为 >27 倍和 >45 倍)(图 2: A)。分别对瞬时表达 dsRed 蛋白(48 h), BmIAP 蛋白 48 h 和 72 h 的家蚕 BmN-SWU1 细胞提取细胞总蛋白进行 Western blot 分析, 结果表明, 有一条约 25 kD 的 dsRed 蛋白条带, 约 60 kD 的 dsRed-BmIAP 融合蛋白条带及大于 60 kD 非特异性蛋白条带(图 2: B)。

### 2.3 放线菌素 D 诱导与家蚕 BmIAP mRNA 的表达特征

应用放线菌素 D 诱导家蚕 BmN-SWU1 细胞凋亡, 分别对诱导 12, 18 和 24 h 后的 BmN-SWU1 细胞及对照组细胞 *BmIAP* 基因的表达特征进行 qRT-

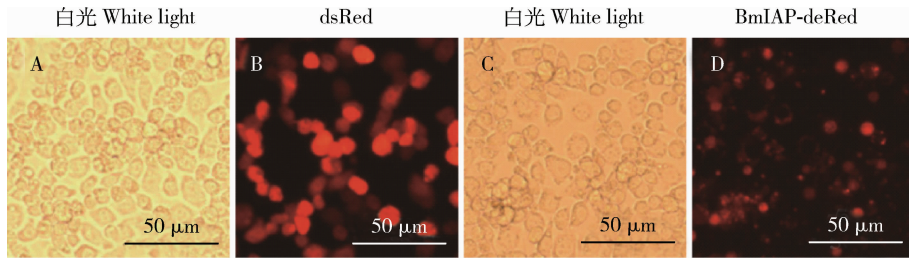


图1 荧光显微镜观察在家蚕 BmN-SWU1 细胞中瞬时表达 BmIAP

Fig. 1 Observation of transiently expressed BmIAP in BmN-SWU1 cells of *Bombyx mori* under fluorescent microscope  
家蚕 BmN-SWU1 细胞中分别转染 PIZ/V5-dsRed 质粒(A 和 B)和 PIZ/V5-BmIAP-dsRed 质粒(C 和 D)48 h 后,荧光显微镜观察瞬时表达 dsRed (A 和 B)和 BmIAP-dsRed (C 和 D)的 BmN-SWU1 细胞;A 和 C 为白光照片,B 和 D 为绿光照片。*B. mori* BmN-SWU1 cells were transfected with plasmids PIZ/V5-dsRed (A and B) and PIZ/V5-BmIAP-dsRed (C and D), and the transiently expressed PIZ/V5-dsRed (A and B) or PIZ/V5-BmIAP-dsRed (C and D) in BmN-SWU1 cells was observed at 48 h post transfection under fluorescent microscope. Cells (A and C) were detected with white light, while the cells (B and D) with green light by fluorescent microscopy.

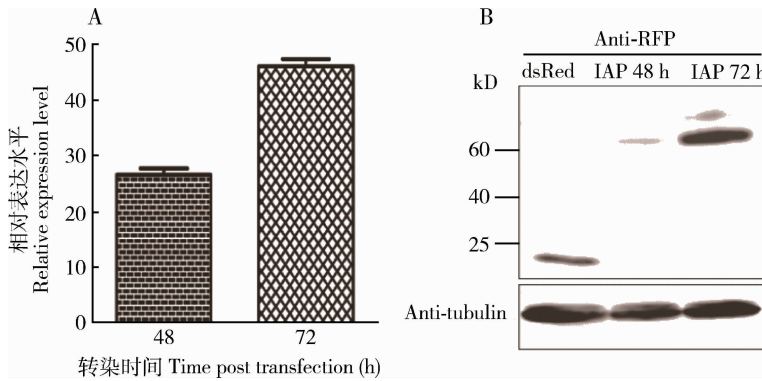


图2 BmIAP 在家蚕 BmN-SWU1 细胞内瞬时表达

Fig. 2 Transient expression of BmIAP in BmN-SWU1 cells of *Bombyx mori*

A: 瞬时表达 48 h 和 72 h 后,qRT-PCR 分析 *BmIAP* mRNA 表达 *BmIAP* mRNA expression analysis using qRT-PCR at 48 h and 72 h post expression; B: 用抗体 RFP 免疫印迹检测瞬时表达的 BmIAP 蛋白 Expression of BmIAP analyzed by immunoblotting using anti-RFP mAb. 误差线表示 3 次重复实验统计学差异;Tubulin 蛋白抗体作为内参。Statistical differences are determined by Student's *t*-test based on three independent experiments. Anti-tubulin was used as a loading control.

PCR 分析,根据  $C_T (\Delta \Delta C_T)$  值方法,对照组表达量可视 1。结果表明,放线菌素 D 诱导家蚕 BmN-SWU1 细胞凋亡后,*BmIAP* 基因的表达量在诱导后的 12, 18 和 24 h 显著下调(图 3)。

## 2.4 瞬时表达 BmIAP 蛋白抑制 ActD 诱导的 BmN-SWU1 细胞凋亡

PIZ/V5-BmIAP-dsRed 或 PIZ/V5-dsRed 质粒转染 BmN-SWU1 细胞 72 h 后,分别用 150 ng/mL 放线菌素 D 诱导 BmN-SWU1 细胞 12, 18 和 24 h 后, Hoechst33258 染色,应用荧光显微镜摄像并分析 BmIAP 瞬时表达的 BmN-SWU1 细胞凋亡细胞核数目。结果表明,BmIAP 瞬时表达的 BmN-SWU1 细胞中细胞核形态正常,瞬时表达 dsRed 蛋白的 BmN-SWU1 细胞核均发生破碎,呈明显的凋亡小体;泛

Caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK 处理组 BmN-SWU1 细胞核形态正常,如图 4(A) 所示。统计分析表明,放线菌素 D 诱导 12, 18 和 24 h 时,BmIAP 瞬时表达的 BmN-SWU1 细胞凋亡细胞核数目均小于 dsRed 组,其中放线菌素 D 诱导 12 h 时差异显著( $0.01 < P < 0.05$ ),诱导 18 h 和 24 h 时差异不显著( $P > 0.05$ ),如图 4(B) 所示。

## 3 讨论

真核表达的蛋白具有表达水平高、翻译后可进行加工修饰等优点,包括糖基化、磷酸化、酰基化、适当的折叠以及蛋白水解,使表达蛋白的抗原性、结构与功能等生物活性均与天然蛋白具有相似的特点

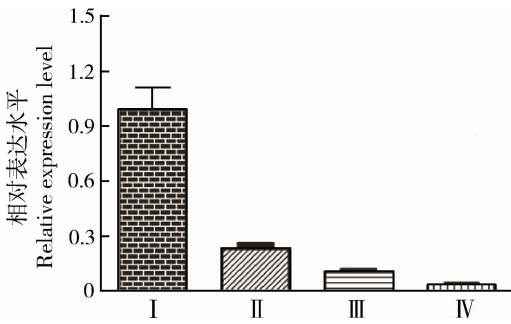


图3 qRT-PCR分析放线菌素D诱导与*BmIAP*表达特征  
Fig. 3 mRNA expression analysis of *BmIAP* gene post exposure to actinomycin D

I: 对照组(含20  $\mu\text{mol/L}$  Caspase抑制剂Z-VAD-FMK的DMSO溶液) Control group (DMSO solution containing 20  $\mu\text{mol/L}$  Z-VAD-FMK, the Caspase inhibitor); II, III, IV: 放线菌素D分别诱导12, 18和24 h的处理组 Treatment groups at 12, 18 and 24 h after induction by actinomycin D, respectively. 在150 ng/mL放线菌素D诱导家蚕BmN-SWU1细胞12, 18和24 h后,应用qRT-PCR分析*BmIAP*表达。数据表示3次重复实验的平均值 $\pm$ 标准误,用Student *t* 测验进行差异显著性分析。qRT-PCR analysis was used to analyze the expression of *BmIAP* at 12, 18 and 24 h after the BmN-SWU1 cells were exposed to 150 ng/mL actinomycin D. Data are mean  $\pm$  SE. Statistical differences are determined by Student's *t*-test based on three independent experiments.

(Sun *et al.*, 2006; Mena and Kamen, 2011)。在本研究中,我们构建的真核表达载体PIZ/V5-BmIAP-dsRed含有*OpIE2*增强子,以保证所插入的目的基因在家蚕细胞中高效表达,其中*BmIAP* mRNA的表达上调45倍,蛋白含量可达1 mg/L。实验结果表明,PIZ/V5-BmIAP-dsRed载体可用于高效表达家蚕BmIAP蛋白,为家蚕BmIAP蛋白在家蚕细胞中的功能研究奠定了基础。

放线菌素D是一种DNA损伤试剂,已证明在多种鳞翅目细胞系中能强烈而迅速地诱导细胞凋亡而作为常用的诱导凋亡的化学诱导剂,研究表明,150 ng/mL Act D能诱导家蚕细胞凋亡(Honig and Rabinovitz, 1965; Perry and Kelley, 1970; Lindell, 1976; Kumarswamy and Chandna, 2010)。IAPs家族成员能在果蝇和哺乳动物中特异地抑制Caspase的活性,BmIAP也能特异地抑制哺乳动物的Caspase-9活性而认为其可能抑制家蚕凋亡途径中的起始Caspase(Huang *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2004; Portt *et al.*, 2011)。本研究中,在家蚕细胞中瞬时表达IAP蛋白72 h的家蚕细胞能显著抑制放线菌素D诱导的细胞凋亡,表明BmIAP瞬时表达可

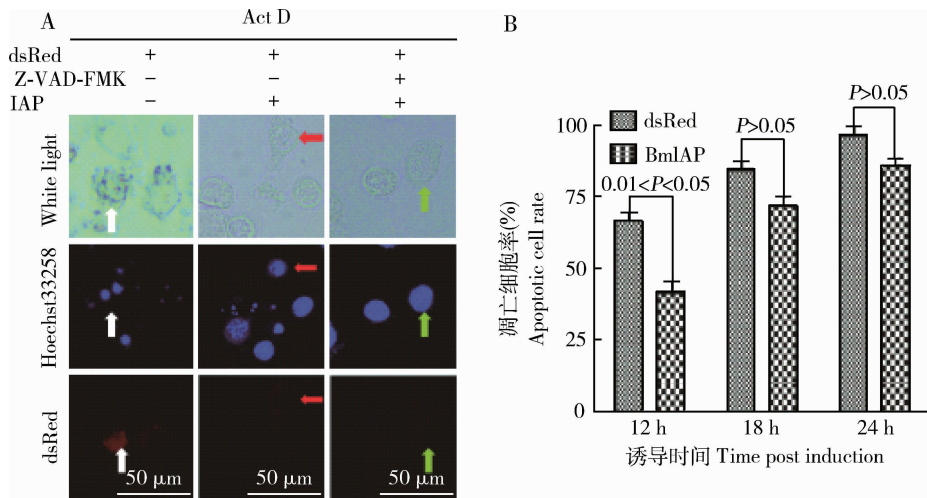


图4 BmIAP抑制放线菌素D诱导的家蚕BmN-SWU1细胞凋亡

Fig. 4 Anti-apoptosis of BmIAP in BmN-SWU1 cells of *Bombyx mori* induced by actinomycin D

A: 150 ng/mL放线菌素D处理BmN-SWU1细胞12 h后应用Hoechst 33258染细胞核(蓝色)检测细胞凋亡,用红色箭头指示BmIAP蛋白表达的细胞核,白色和绿色箭头分别指示对照组Mock(dsRed)和BmIAP加Z-VAD-FMK后的Hoechst 33258染细胞核 Apoptosis was detected by Hoechst 33258 staining (blue) at 12 h post exposure to 150 ng/mL actinomycin D. Apoptotic nuclei are indicated by red arrows, and controls (mock, dsRed) and BmIAP + Z-VAD-FMK are indicated by white and green arrows, respectively. B: 凋亡细胞百分数统计分析 Percentage of apoptosis cells. 数据为3次重复实验的平均值 $\pm$ 标准误,用Student *t* 测验进行差异显著性分析。Data are mean  $\pm$  SE. Statistical differences were determined by Student's *t*-test based on three independent experiments.

能降低或抑制内源性Caspase活性而抑制放线菌素D诱导的细胞凋亡。

有研究表明,在家蚕细胞中瞬时表达Hycu-IAP3能显著降低内源性的起始Caspase BmDronc,

表明 Hycu-IAP3 抑凋亡作用是通过降解内源性的 BmDronc 而抑制了起始 Caspase 活性(Kamita *et al.*, 1993)。对于放线菌素诱导的家蚕 BmN-SWU1 细胞凋亡过程中, *BmIAP* mRNA 表达水平显著下调 10 倍以上, 而 *BmICE-2* 和 *BmDronc* 等促凋亡基因的 mRNA 表达水平显著上调而导致家蚕细胞凋亡。本研究也表明, 瞬时表达 BmIAP 蛋白的家蚕细胞中是否也通过降低内源性起始 Caspase, BmDronc 和 BmICE-2 而抑制细胞凋亡仍需进一步研究。近年来研究发现, 某些 IAPs 成员异常表达与肿瘤发生密切相关, IAPs 也成为肿瘤治疗的潜在靶点。本研究中 *BmIAP* 基因在家蚕细胞中的瞬时表达, 是否影响家蚕细胞正常的生长发育有待进一步研究。

### 参考文献 (References)

Honig GR, Rabinovitz M, 1965. Actinomycin D: inhibition of protein synthesis unrelated to effect on template RNA synthesis. *Science*, 149(3691): 1504 - 1506.

Huang Q, Deveraux QL, Maeda S, Henning RS, Bruce DH, John CR, 2001. Cloning and characterization of an inhibitor of apoptosis protein (IAP) from *Bombyx mori*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1499(3): 191 - 198.

Kamita SG, Majima K, Maeda S, 1993. Identification and characterization of the p35 gene of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus that prevents virus-induced apoptosis. *J. Virol.*, 67(1): 455 - 463.

Kim EJ, Rhee WJ, Park TH, 2004. Inhibition of apoptosis by a *Bombyx mori* gene. *Biotechnol. Prog.*, 20(1): 324 - 329.

Kumarswamy R, Chandna S, 2010. Inhibition of microRNA-14 contributes to actinomycin-D-induced apoptosis in the Sf9 insect cell line. *Cell Biol. Int.*, 34(8): 851 - 857.

Lindell TJ, 1976. Evidence for an extranucleolar mechanism of actinomycin D action. *Nature*, 259: 347 - 350.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. *Methods*, 25(4): 402 - 408.

Mena JA, Kamen AA, 2011. Insect cell technology is a versatile and robust vaccine manufacturing platform. *Expert Rev. Vacc.*, 10(7): 1063 - 1081.

Pan MH, Cai XJ, Liu M, Lv J, Tang H, Tan J, Lu C, 2010. Establishment and characterization of an ovarian cell line of the silkworm, *Bombyx mori*. *Tissue Cell*, 42(1): 42 - 46.

Pan MH, Chen M, Huang SJ, Yu ZS, Cheng CG, Lu C, 2009. Cloning and protein release of cytochrome C in the apoptosis cells of silkworm, *Bombyx mori*. *Scientia Agricultura Sinica*, 42(7): 2546 - 2551. [潘敏慧, 陈默, 黄淑静, 于子舒, 成传刚, 鲁成, 2009. 家蚕细胞色素 C 基因的克隆及其蛋白在家蚕凋亡细胞中

的释放. *中国农业科学*, 42(7): 2546 - 2551]

Pan MH, Deng WK, Chen M, Zhang JY, Du J, Lu C, 2008. Inhibition of BmE-SWU1 cell apoptosis by silkworm hemolymph. *Acta Zoologica Sinica*, 54(5): 861 - 866. [潘敏慧, 邓为科, 陈默, 张金叶, 杜娟, 鲁成, 2008. 家蚕血液对 BmE-SWU1 细胞凋亡的抑制作用. *动物学报*, 54(5): 861 - 866]

Perry RP, Kelley DE, 1970. Inhibition of RNA synthesis by actinomycin D: characteristic dose-response of different RNA species. *J. Cell. Physiol.*, 76(2): 127 - 139.

Portt L, Norman G, Clapp C, 2011. Anti-apoptosis and cell survival: a review. *Biochim. Biophys. Acta*, 1813(1): 238 - 259.

Silke J, Meier P, 2013. Inhibitor of apoptosis (IAP) proteins - modulators of cell death and inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 5(2): 152 - 158.

Simone F, Domagov V, 2012. Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 11(2): 109 - 124.

Song J, Yi HS, Hu YF, He Q, Liu TH, Pan CX, Lu C, Pan MH, 2014. Advances and phylogenetic analysis of inhibitors of apoptosis protein. *Science of Sericulture*, (1): 147 - 152. [宋娟, 易华山, 户艳芬, 何倩, 刘太行, 潘彩霞, 鲁成, 潘敏慧, 2014. 细胞凋亡抑制蛋白 IAPs 的研究进展与系统进化分析. *蚕业科学*, (1): 147 - 152]

Summers MD, Smith GE, 1987. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. *Bulletin B - Texas Agricultural Experiment Station*, 40(1555): 1 - 56.

Sun YB, Li JH, Shi YH, 2006. Construction and expression of inset expression vector pIZT/V5-His harboring mIL-4. *Journal of Jilin University (Medicine Edition)*, 32(2): 194 - 195, 198. [孙延波, 李菁华, 史红艳, 2006. mIL-4 昆虫表达载体 pIZT/V5-His 的构建及其高效表达. *吉林大学学报(医学版)*, 32(2): 194 - 195, 198]

Thornberry NA, Lazebnik Y, 1998. Caspases: enemies within. *Science*, 281(5381): 1312 - 1316.

Xia Q, Li S, Feng Q, 2014. Advances in silkworm studies accelerated by the genome sequencing of *Bombyx mori*. *Annu. Rev. Entomol.*, 59(1): 513 - 536.

Xu Y, Zhao XH, 2010. IAP family and IAP-targeted cancer therapy. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, (2): 161 - 168. [许杨, 赵晓航, 2010. IAP 家族分子与肿瘤靶向治疗. *生命科学*, (2): 161 - 168]

Yi HS, 2014. Cloning and Functional Analysis of the *BmICE-2* Gene in *Bombyx mori*. PhD Dissertation, Southwest University, Chongqing. [易华山, 2014. 家蚕 *BmICE-2* 基因克隆及其功能分析. 重庆: 西南大学博士学位论文]

Yi HS, Pan CX, Pan C, Song J, Hu YF, Wang L, Pan MH, Lu C, 2014. BmICE-2 is a novel pro-apoptotic caspase involved in apoptosis in the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 445(1): 100 - 106.