

家蚕核转录因子 NF- κ B 对不同细胞系中免疫相关基因表达的调控分析

徐佳卉, 刘华伟, 孙小桐, 唐章晨, 黄敏, 赵萍*

西南大学 西部(重庆)科学城种质创制大科学中心, 重庆 400715

徐佳卉, 刘华伟, 孙小桐, 唐章晨, 黄敏, 赵萍. 家蚕核转录因子 NF- κ B 对不同细胞系中免疫相关基因表达的调控分析[J]. 生物工程学报, 2024, 40(10): 3649-3665.

XU Jiahui, LIU Huawei, SUN Xiaotong, TANG Zhangchen, HUANG Min, ZHAO Ping. NF- κ B transcription factors regulate the expression of immunity-related genes in different cell lines of silkworm (*Bombyx mori*)[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(10): 3649-3665.

摘要: 昆虫 Toll 和免疫缺陷(immune deficiency, IMD)信号通路在进化上非常保守, 主要通过核转录因子 κ B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B)调节抗菌肽等免疫相关基因的表达。然而, 关于家蚕 NF- κ B 转录因子 Rels 和 Relish 对抗菌肽等免疫相关基因表达调控的差异目前尚未见系统报道。本研究克隆了家蚕 *BmRelA*、*BmRelB* 和 *BmRelish1* 基因, 并构建了它们的真核细胞过表达载体。将重组载体分别转染家蚕 BmE 和 BmN 细胞后, 利用实时荧光定量 PCR (real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)检测了抗菌肽及免疫相关基因的表达变化。结果表明, 家蚕抗菌肽基因 *Defensin2* 和 *Gloverin2* 的表达主要受 Relish1 调控, *Moricin* 的表达主要受 RelA 和 RelB 调控, 其他抗菌肽的表达则受二者共同调控。此外, 家蚕肽聚糖识别蛋白(peptidoglycan recognition proteins, PGRPs)、 β -1,3-葡聚糖识别蛋白(β -1,3-glucan recognition proteins, β GRPs)、溶菌酶(lysozymes, Lys)、类溶菌酶蛋白(lysozyme and lysozyme-like proteins, LLPs)、一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)等蛋白的编码基因均响应 Rels 和 Relish 的诱导, 在不同细胞系中不同程度上调表达, 提示这些分子的表达也受到 Toll 或 IMD 通路的调节。相比于果蝇 Toll 和 IMD 信号通路转录因子对抗菌肽基因表达调控具有特异性, 本研究发现家蚕 Rels 和 Relish1 对抗菌肽基因表达的调控模式更为复杂, 为进一步解析昆虫 Toll 和 IMD 通路的效应机制和反馈机制提供了实验依据。
关键词: 家蚕先天免疫; 核转录因子 κ B 转录因子; 抗菌肽; 转录调控

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFD1201600); 国家自然科学基金(32200394); 中央高校基本科研业务费专项资金资助(SWU-KQ22008); 重庆市研究生科研创新项目(CYS21142)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFD1201600), the National Natural Science Foundation of China (32200394), the Fundamental Research Funds for the Central Universities, China (SWU-KQ22008), and the Chongqing Graduate Student Research Innovation Project (CYS21142).

*Corresponding author. E-mail: zhaop@swu.edu.cn

Received: 2024-02-03; Accepted: 2024-05-07; Published online: 2024-05-21

NF- κ B transcription factors regulate the expression of immunity-related genes in different cell lines of silkworm (*Bombyx mori*)

XU Jiahui, LIU Huawei, SUN Xiaotong, TANG Zhangchen, HUANG Min, ZHAO Ping*

Integrative Science Center of Germplasm Creation in Western China (Chongqing) Science City, Biological Science Research Center, Academy for Advanced Interdisciplinary Studies, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: The Toll and immune deficiency (IMD) signaling pathways in insects are highly conserved in evolution and regulate the expression of antimicrobial peptides (AMPs) and other immune-related genes mainly through nuclear factor-kappa B (NF- κ B) transcription factors. However, the differences of NF- κ B transcription factors RelA and RelB in the expression regulation of AMPs and other immune-related genes in silkworm (*Bombyx mori*) have not been systematically reported. In this study, the *BmRelA*, *BmRelB* and *BmRelish1* genes were cloned and their eukaryotic cell overexpression vectors were constructed. After the recombinant vectors were transfected into BmE and BmN cells, the expression of AMPs and immune-related genes was detected by real-time fluorescence quantitative PCR. The results showed that the expression of AMP genes *Defensin2* and *Gloverin2* was mainly regulated by Relish, the expression of *Moricin* was mainly regulated by RelA and RelB, and the expression of other AMP genes was jointly regulated by both. In addition, the expression levels of peptidoglycan recognition proteins (PGRPs), β -1,3-glucan recognition proteins (β GRPs), lysozymes (Lys) and lysozyme-like proteins (LLPs), and nitric oxide synthase (NOS) were up-regulated to varying degrees in different cell lines in response to RelA, RelB and Relish1, suggesting that the expression of these immune-molecules was also regulated by Toll or IMD pathways in silkworm. Compared with the regulatory specificity of transcription factors in *Drosophila* Toll and IMD signaling pathways on the expression of AMPs, this study found that the regulatory patterns of RelA and Relish1 on the expression of AMPs in silkworm are more complex, which provides an experimental basis for further analysis of the effect mechanism and feedback mechanism of Toll and IMD pathways in insects.

Keywords: innate immunity of silkworm; nuclear factor-kappa B(NF- κ B) transcription factor; antimicrobial peptides; transcriptional regulation

在长期的进化过程中,昆虫形成了一套有效的防御机制来抵御外界威胁,其防御体系主要包括坚硬的体壁和复杂的先天免疫系统(innate immune system)。昆虫的先天免疫包括细胞免疫(cellular immunity)和体液免疫(humoral immunity),二者共同发挥抵御细菌、真菌和病

毒等外源微生物入侵的功能^[1]。体液免疫是在昆虫的免疫相关组织中,通过对不同外源微生物进行识别,引起一系列级联反应,促进效应分子的产生来杀灭外源物的过程。昆虫体液免疫是由多种类型的分子参与的快速防御过程。根据这些分子在免疫反应中发挥功能的不同,

可以分为病原识别分子、信号传递分子、信号转导分子和效应分子。其中, Toll 途径和免疫缺陷(immune deficiency, IMD)途径是昆虫主要的体液免疫调节途径。

在昆虫 Toll 和 IMD 免疫途径中, 肽聚糖识别蛋白(peptidoglycan recognition protein, PGRP)和 β -1,3-葡聚糖识别蛋白(β -1,3-glucan recognition protein, β GRP)等模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)通过识别及结合病原体激活下游信号因子^[2]。在 Toll 通路中, PRR 识别病原体后, 引起胞外丝氨酸蛋白酶水解级联反应, 切割活化细胞因子样多肽(Spätzle, Spz)^[3]。随后, 活化的 Spz 结合 Toll 受体激活胞内信号级联, 促使核转录因子(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)进入细胞核, 调控抗菌肽的表达^[4-5]。在 IMD 通路中, PGRP-LE 辅助 PGRP-LC 受体特异识别并结合细菌表面的二氨基庚二酸型肽聚糖(DAP-type Peptidoglycan, DAP-PGN)^[6], 进而将信号转导到胞内, 促使 IMD 募集 FADD、Dredd 形成信号复合体, 通过复杂的胞内信号反应, 另一类核转录因子——Relish 分子最终被磷酸化, Relish 的 C 端部分留在细胞质中, 活性 N 端部分则转移到细胞核内启动抗菌肽(antibacterial peptide, AMPs)等基因的转录^[7-9]。

昆虫 Toll 和 IMD 途径都是通过调控 AMPs 的表达来杀死病原体。AMPs 是一类普遍存在于昆虫体内的小分子量蛋白, 最早在鳞翅目昆虫中被发现, 其稳定的理化功能和广谱抗菌等特点决定了它在昆虫先天免疫防御系统中起着重要的作用^[10]。研究表明, 家蚕体内的 AMPs 包括 7 个家族: Attacin、Cecropin、Defensin、Enbocin、Gloverin、Moricin 和 Lebocin 家族^[11]。在不同 NF- κ B 转录因子的调控下, 大部分 AMPs 以前体的形式由脂肪体表达合成并分泌到血淋巴中, 通过蛋白水解产生活性 AMPs,

因其带有正电荷可以靶向带负电荷的微生物膜并嵌入其脂质疏水区域, 破坏膜的稳定性从而杀死病原微生物^[12]。在不同昆虫中, AMPs 诱导调控的具体机制存在差异。在烟草天蛾中鉴定到的 86 个 AMPs 中, 大部分 AMPs 都含有一个或多个预测的 NF- κ B 结合位点^[13]; 在黄粉虫中, 抑制性 kappa B 激酶 β (inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta, IKK β)参与激活 AMPs 响应大肠杆菌入侵的 IMD 信号通路^[14]; 仅在埃及伊蚊中鉴定到的抗菌肽基因 *Gambicin*, 同时受 Toll、IMD 和 JAK/STAT 信号通路的调控^[15]。在昆虫中, 病原侵染后机体通过激活不同的 Rel/NF- κ B 家族成员引起不同抗菌肽基因的表达, 其中 Toll 通路主要激活转录因子 Dorsal 和 Dif, IMD 通路主要激活转录因子 Relish。家蚕主要通过 Toll 和 IMD 两条免疫信号转导途径, 调控多种抗菌肽, 共同抵御外界病原体的入侵。目前家蚕 Toll 和 IMD 下游信号通路的 NF- κ B 类转录因子已被报道, 其中家蚕 *Rel* 基因与果蝇 *Dorsal/Dif* 同源, 家蚕 *Relish* 基因与果蝇 *Relish* 属同源基因, 它们分别参与调控 Toll 和 IMD 信号通路^[16]。

研究表明, 家蚕基因组中单个 *Rel* 基因通过选择性剪接产生了 2 种不同转录形式的果蝇 *Dorsal* 同源物, 分别为 BmRelA 和 BmRelB。在氨基酸序列上, BmRelB 蛋白仅在 N 端比 BmRelA 少 52 个氨基酸残基, 其他氨基酸序列则与 BmRelA 蛋白完全相同。这 2 种 BmRel 都能参与抗菌肽基因的激活, 其中 BmRelB 对 *Attacin* 基因的激活作用很强, 对其他基因的激活作用较弱; 而 BmRelA 对 *Lebocin4* 基因的激活作用很强, 对 *Attacin* 和 *Lebocin3* 基因的激活作用较弱^[17]。与 *Rel* 基因类似, 家蚕 *Relish* 基因也通过选择性剪接产生了 2 种不同转录形式的果蝇 *Relish* 同源物, 分别为 BmRelish1 和

BmRelish2。其中, BmRelish1 蛋白具有一个核因子 κ B 抑制蛋白(inhibitor of NF- κ B, I κ B)样结构域, 除了 Rel 同源结构域(rel homology domain, RHD)、核定位信号(nuclear localization signal, NLS)以及富含酸性和疏水性氨基酸(acidic and hydrophobic amino acid, AHAA)的区域外, 还具有 5 个锚蛋白重复序列(ankyrin repeat, ANK), 而 BmRelish2 蛋白缺乏 AHAA 和锚蛋白重复序列。BmRelish1 以非活性形式存在于细胞质中, 在内切蛋白酶水解切除 C 端包含锚蛋白重复序列的区域后被激活^[18]。BmRelish2 被证明可以抑制 BmRelish1 对 *CecB1* 抗菌肽基因的激活表达, 表明 BmRelish2 作为抑制 BmRelish1 活性形式的显性负因子发挥作用^[18]。在果蝇中, Toll 途径转录因子 Dorsal 和 Dif 主要调控抗菌肽 drosomycin、defensin 和 metchnikowin 等的表达, 而 IMD 途径转录因子 Relish 则主要调控双翅肽抗菌肽 dipterin、attacin 和 cecropin 等的表达^[19-22]。家蚕的 *Rel* 基因和 *Relish* 基因都能特异结合抗菌肽调控序列的 κ B-like 元件, 激活不同抗菌肽基因表达^[23]。但家蚕 NF- κ B 转录因子 Rel 和 Relish 对不同抗菌肽基因表达调控的差异仍不清楚。本研究在细胞水平上探究了家蚕 Toll 和 IMD 通路转录因子对抗菌肽等免疫相关基因表达调控的差异。由于 BmRelish2 不能激活抗菌肽的表达, 而是作为 BmRelish1 活性形式的负调节因子发挥作用^[18], 因此本研究主要关注了家蚕 Rels (BmRelA, BmRelB)和 BmRelish1。通过在家蚕 BmE 和 BmN 细胞中分别过表达转录因子 Rels (BmRelA, BmRelB)和 BmRelish1, 定量 PCR 检测抗菌肽基因及免疫相关基因的表达变化, 分析家蚕 Toll 和 IMD 通路转录因子 Rels 和 Relish 对免疫相关基因调控的异同点, 为进一步探究昆虫抗菌肽等免疫相关基因的表达调

控提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

家蚕胚胎细胞系(BmE-SWU1)、家蚕卵巢细胞系(BmN-SWU1)、pSL1180-Hr3-A4P-EGFP SV40 (pSL1180-EGFP)细胞过表达载体由西南大学前沿交叉学科研究院生物研究中心保存并提供。胎牛血清和 Grace 昆虫培养基、Trizol 试剂、蛋白质预染 Maker 购自赛默飞世尔科技有限公司; X-tremeGENE HP DNA 细胞转染试剂购自罗氏(Roche)公司; 限制性内切酶 *Bgl* II、*Bam*H I、*Not* I、*PspOM* I 和 T4 DNA 连接酶购自纽英伦生物技术有限公司; HiFi *Taq* DNA 聚合酶、EasyPure PCR 纯化试剂盒、Trans1-T1 感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司; 胶回收试剂盒购自 Omega Bio-Tek 公司; 超纯质粒提取试剂盒购自 Qiagen 公司; 反转录试剂盒购自 TaKaRa 公司; 荧光定量试剂购自苏州近岸蛋白质科技股份有限公司; 实时荧光定量 PCR 仪购自耶拿分析仪器股份公司; RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、anti-Tubulin 抗体和 anti-Myc 标签抗体购自上海碧云天生物科技股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 NF- κ B 分子的系统进化分析

为了更好地探究家蚕 NF- κ B 转录因子在昆虫中的进化关系, 从 GenBank 数据库中下载果蝇、烟草天蛾、赤拟谷盗、意蜂等 10 种昆虫的 NF- κ B 转录因子蛋白序列, 利用最大似然法构建系统进化树。

1.2.2 引物设计和合成

利用 primer premier 5.0 设计用于 NF- κ B 转录因子过表达载体构建和相关基因表达检测的引物。引物合成及测序均由华大基因科技有限

公司完成。引物序列见表 1。

1.2.3 细胞过表达载体构建

参考先前的研究^[17-18], 设计家蚕 NF- κ B 转录因子 RelA、RelB 和 Relish1 截短克隆引物(添加限制性内切酶识别位点和 Myc 标签序列, 见表 1)。取 5 龄第 3 天家蚕幼虫脂肪体, 液氮研磨后用 Trizol 法提取总 RNA, 按照反转录试剂盒说明书合成 cDNA。以上述 cDNA 为模板, 利用 HiFi *Taq* DNA 聚合酶进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 50 μ L, 运行程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 50 s, 27 个循环; 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min, 16 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分离, 切取含有目的条带的胶块后利用试剂盒进行回收纯化。将目的片段和 pSL1180-Hr3-A4P-EGFP SV40 质粒在 37 $^{\circ}$ C 酶切过夜, 随后分别利用 PCR 纯化试剂盒和胶回收试剂盒回收酶切过的目的片段和线性载体。目的片段与线性载体连接后转化到 Trans1-T1 感受态细胞中, 涂布到含有氨苄青霉素抗性的平板上, 筛选阳性克隆。将测序正确的克隆扩大培养, 使用超纯质粒提取试剂盒抽提质粒, 命名为 pSL1180-RelA、pSL1180-RelB 和 pSL1180-Relish1, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.4 细胞转染

复苏冻存的细胞系后, 27 $^{\circ}$ C 恒温培养,

每 2 d 更换 1 次培养基, 待细胞长满 80% 以上再进行传代培养。将 BmE 细胞和 BmN 细胞分别接种于 6 孔板中, 于 27 $^{\circ}$ C 用无血清培养基培养 24 h 后, 按照转染试剂操作说明分别将 2 μ g pSL1180-EGFP、pSL1180-RelA、pSL1180-RelB 和 pSL1180-Relish1 质粒转染到 2 种细胞系, 细胞转染效率为 65%–75%。其中, 转染 pSL1180-EGFP 质粒的细胞为对照组, 转染 pSL1180-RelA、pSL1180-RelB 或 pSL1180-Relish1 质粒的细胞为实验组。

1.2.5 总 RNA 提取和 RT-qPCR 检测

转染 48 h 后, 用 Trizol 法提取各培养孔细胞的总 RNA, 按照反转录试剂盒说明书合成 cDNA。利用设计的转录因子及免疫相关基因荧光定量 PCR 引物, 以细胞 cDNA 为模板, 进行 RT-qPCR 检测, 反应体系为 20 μ L (SYBR 预混液 10 μ L, 10 μ mol/L 上、下游引物各 0.8 μ L, 模板 2 μ L, ddH₂O 6.4 μ L); 运行程序: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 3 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。每个样品进行 3 次重复试验, 以家蚕真核翻译起始因子 4A 基因(SilkDB3.0 登录号: BGIBMGA003186)为内参基因, 收集目的基因和内参基因的 C_t 值, 采用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 方法计算目的基因的相对表达量。利用 GraphPad Prism 8.0 对所得数据作图。通过单因素方差分析(one-way ANOVA)和 Tukey's 检验对数据进行显著性分析。在 Tukey's 检验中,

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

Names	Sequences (5'→3')	Purpose
OERelA-F	GAAGATCTATGGAGCAGAACTCATCTCTGAAGAGGATCTGGACATCGGCGG AGACGCCGGT	Eukaryotic expression of BmRelA
OERelA-R	TTGCGCCGCTCACAGCAGGAGGTCGCTTGTGGAGA	
OERelB-F	GAAGATCTATGGAGCAGAACTCATCTCTGAAGAGGATCTGGCGAGTCAATC CGCGCCCCCG	Eukaryotic expression of BmRelB
OERelish1-F	CGGGATCCATGGAGCAGAACTCATCTCTGAAGAGGATCTGTCTACAACCTGC CAGTGATCA	Eukaryotic expression of BmRelish1

(待续)

(续表 1)

Names	Sequences (5'→3')	Purpose
OERelish1-R	TTGGGCCCTACAGTTCTCTTAGTAGCTGTTTCA	
Relish1-F	TTCCAGCAGATCCCCACAA	RT-qPCR
Relish1-R	GAAGATGACTTTCCGAGCAA	
Rels-F	GACAAGAAGGCCATGAGCGA	RT-qPCR
Rels-R	ACCTGCTTGTGCACGTA	
eIF4a-F	TTCGTAAGGCTCTTCTCGT	RT-qPCR
eIF4a-R	CAAAGTTGATAGCAATCCCT	
Glov2-F	TGTGTTAACGCAGAAGTTTACG	RT-qPCR
Glov2-R	GTAACCAGCTTTTCCAAAGAGG	
Mor-F	TGTGGCAATGTCTCTGGTGT	RT-qPCR
Mor-R	GCTTCTTTTCTTCGGTTTCAA	
CecA-F	CCAAAGACGCATTTAGCTTG	RT-qPCR
CecA-R	ACTCGGTCACTCTGAGAAAAG	
CecB-F	CTATCCTTCGTCTTCGCTCT	RT-qPCR
CecB-R	ATAGCTTTAGCCGAACCGAG	
Att1-F	CTGAGCCTGACCGGGAC	RT-qPCR
Att1-R	AGGTCGTGGTTGTTATTGTG	
Leb-F	CGTTTAACCCCAAGCCAATA	RT-qPCR
Leb-R	TGCACTCCGAAATCTTTTGT	
Den2-F	TGAGCCGTGTACGAGTGA	RT-qPCR
Den2-R	GAAACAGCCTTTGGGATT	
Spz1-F	TCGAAGACTCGTACGAACTATG	RT-qPCR
Spz1-R	TAAACTTCTGAACGCATTTTCGG	
PGRP-S1-F	TAAAAAGCAATGGGACGGTTTG	RT-qPCR
PGRP-S1-R	ATGTGGTTGGTCTGGATATTCC	
PGRP-S2-F	TCAAGGACTTGGGCTATTCATT	RT-qPCR
PGRP-S2-R	CACAGGCTAAAAAGTCTTGGAC	
PGRP-S5-F	TCATAGGTATTCATGCTGGACC	RT-qPCR
PGRP-S5-R	GTCATAGCCTGATTGTGTCCTA	
βGRP3-F	GTCTTCAGCAAGAACTGTACG	RT-qPCR
βGRP3-R	AGCCATAATTGTTCCTTTGAGC	
βGRP2-F	ACCACTTCTACATAACGCTAGG	RT-qPCR
βGRP2-R	ATTAAAGTTGGCTGACTCCACC	
Lys-F	GACTACGGATTGTTCCAGATCA	RT-qPCR
Lys-R	CTTAGTGATGTCGTCAGTCAGG	
LLP2-F	GATGATTTACAATGCGCTTTGC	RT-qPCR
LLP2-R	ATATACGACCCAGGCAAGAAAA	
LLP3-F	CATTGAAAAGTGCCAGACTGG	RT-qPCR
LLP3-R	AGCTGTTGTCCGATTTTAGGTA	
NOS1-F	AACTATTTTCGGACACGCTTTC	RT-qPCR
NOS1-R	AAACAAACGTTGCTAAGAGGTC	
NOS2-F	TTGAAGGGTAGTACAACAGACG	RT-qPCR
NOS2-R	GTTACAGAAATTCGGGTAAGCG	

如果两组之间的均值差异显著,则会用不同的字母标记这两组,通常用 a、b、c、d 等字母进行标记;如果两组之间的均值差异不显著,则会用相同的字母标记这两组。

1.2.6 Western blotting (WB)检测转录因子的过表达

转染 48 h 后,用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,再利用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定总蛋白浓度。取 20 μ g 细胞总蛋白质进行 12% 的 SDS-PAGE 电泳,并转到聚偏氟乙烯(poly vinylidene fluoride, PVDF)膜。用含有 5% 脱脂奶粉的 TBST (150 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 0.05% Tween-20)将 PVDF 膜在 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h。随后依次用 anti-Myc 标签抗体(抗体稀释比例

1:5 000)和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(抗体稀释比例 1:10 000)在 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。每次孵育后用 TBST 洗涤 3 次,每次 10 min。最后,在膜上加适量的超敏增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)显色液,曝光并拍照记录,以检测转录因子的过表达情况。

2 结果与分析

2.1 NF- κ B 分子的系统进化分析

为了探究家蚕 NF- κ B 分子在昆虫中的进化关系,将家蚕 NF- κ B 转录因子与果蝇、烟草天蛾等 10 种模式昆虫的 NF- κ B 转录因子进行系统进化分析(图 1)。与果蝇类似,家蚕中的 NF- κ B 转录因子在进化上主要分为 2 类:Rel 型和 Relish

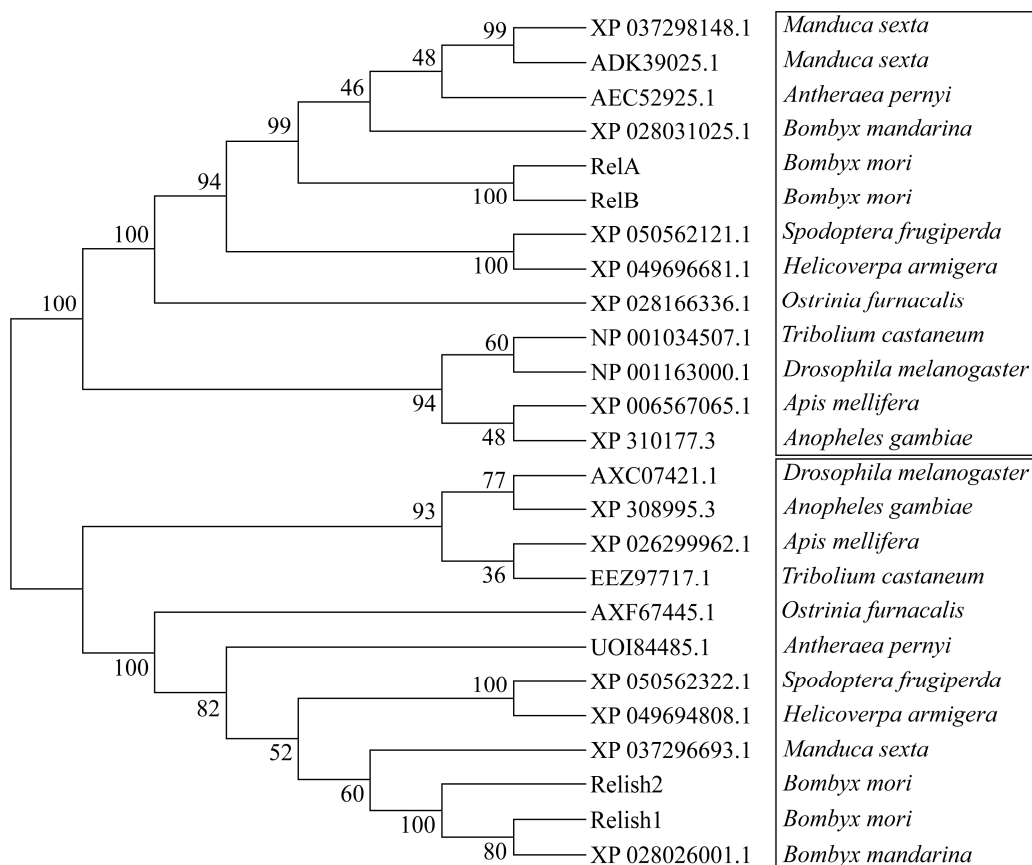


图 1 昆虫 NF- κ B 转录因子的系统发育分析

Figure 1 Phylogenetic analysis of NF- κ B transcription factors in insects.

型, 两者均与鳞翅目的柞蚕、烟草天蛾等昆虫进化关系较近, 与意蜂等昆虫亲缘关系较远。家蚕 *Rel* 型和 *Relish* 型转录因子都具有 2 种不同的剪接变体形式, 其中 *RelA* 和 *RelB* 在进化上完全聚为一支, 提示其可能发挥相同的功能; *Relish1* 和 *Relish2* 在进化上分为 2 支, 提示其功能可能有所差异。

2.2 家蚕 *Rel*s 和 *Relish1* 的细胞过表达分析

将过表达载体 pSL1180-EGFP、pSL1180-*RelA*、pSL1180-*RelB* 和 pSL1180-*Relish1* 分别转染到 BmE 和 BmN 细胞中, 48 h 后收集细胞。利用 Trizol 法和 RIPA 裂解液分别提取细胞的总 RNA 和总

蛋白, 并进行 RT-qPCR 和 WB 检测。RT-qPCR 结果显示, 在 BmE 和 BmN 细胞中, 与转染 pSL1180-EGFP 相比, 转染 pSL1180-*RelA*、pSL1180-*RelB* 和 pSL1180-*Relish1* 后 NF- κ B 转录因子 *RelA*、*RelB* 和 *Relish1* 的表达水平都显著增加(图 2A、2B)。进一步利用 anti-Myc 标签抗体对两种细胞中转录因子的蛋白表达进行了检测。WB 结果显示, 与对照组相比, NF- κ B 转录因子 *RelA*、*RelB* 和 *Relish1* 蛋白在 BmE 和 BmN 细胞中的表达也显著增加(图 2C、2D)。这表明, 家蚕 NF- κ B 转录因子 *RelA*、*RelB* 和 *Relish1* 在 BmE 和 BmN 细胞中被成功过表达。

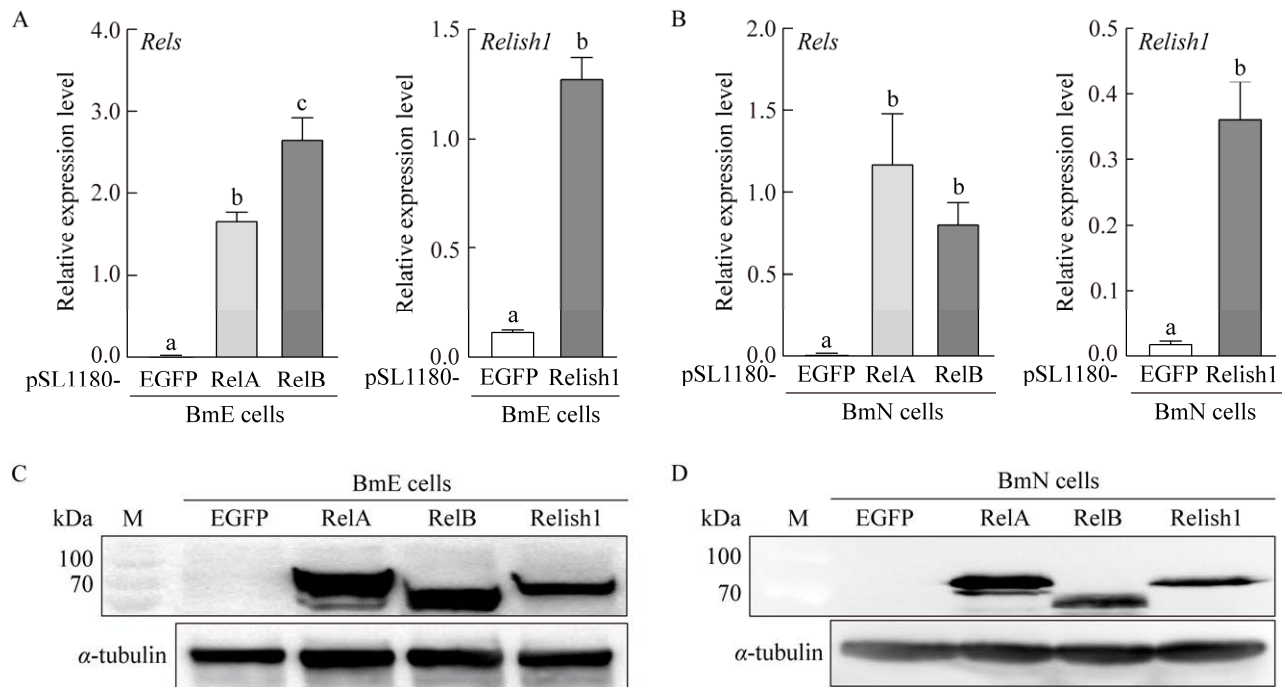


图 2 家蚕 BmE 和 BmN 细胞中 *Rels* 和 *Relish1* 的过表达水平检测 RT-qPCR (A、B) 和 WB (C、D) 分析转染后 BmE 和 BmN 细胞中转录因子 *Rels* 和 *Relish1* 的表达。将转录因子 *Rels* 和 *Relish1* 的过表达载体分别转染到 BmE 和 BmN 细胞中。使用 anti-Myc 标签抗体作为一抗。不同的字母表示显著差异 ($P < 0.05$)

Figure 2 Detection of overexpression levels of *Rels* and *Relish1* in silkworm BmE and BmN cells. Real-time quantitative polymerase chain reaction (A, B) and Western blotting (C, D) analysis of transcription factors *Rels* and *Relish1* expression in transfected BmE and BmN cells. Overexpression vectors of transcription factors *Rels* and *Relish1* were transfected into BmE and BmN cells, respectively. Anti-Myc tag antibody was used as the primary antibody. Significant differences were indicated by different letters ($P < 0.05$).

2.3 过表达 *Rels* 和 *Relish1* 后抗菌肽基因的表达分析

NF- κ B 转录因子是昆虫天然免疫中调节抗菌肽基因表达的重要分子。为了分析家蚕 NF- κ B 转录因子对抗菌肽基因表达的影响,在过表达 *Rels* 和 *Relish1* 后利用 RT-qPCR 检测了 BmE 和 BmN 细胞中多种类型抗菌肽基因的表达变化。

在 BmE 细胞中,与对照组相比,*Attacin1* (*Att1*) 的相对表达水平在过表达 *Rels* 和 *Relish1* 后没有明显变化;*CecropinA* (*CecA*)、*CecropinB* (*CecB*)、*Defensin2* (*Def2*)和 *Gloverin2* (*Glv2*)的相对表达水平仅在过表达 *Relish1* 后显著增加;*Lebocin* (*Leb*)的相对表达水平在过表达 *Rels* 和 *Relish1* 后都显著增加,其中过表达 *RelA* 和 *Relish1* 后其增加更为显著;*Moricin* (*Mor*)的相对表达水平仅在过表达 *RelA* 后被显著上调(图 3A)。

在 BmN 细胞中,与对照组相比,*Att1* 的相对表达水平在过表达 *RelA* 和 *Relish1* 后显著上调;*CecA*、*CecB* 和 *Def2* 的相对表达水平均在过表达 *RelB* 和 *Relish1* 后显著增加,但 *CecA* 的相对表达水平在过表达 *RelA* 后也显著增加;*Glv2* 的相对表达水平仅在过表达 *Relish1* 显著上调;*Leb* 的相对表达水平在过表达 *Rels* 和 *Relish1* 后均显著上调,但过表达 *Rels* 的上调作用强于过表达 *Relish1*;*Mor* 的相对表达水平仅在过表达 *RelA* 后显著上调(图 3B)。

这表明,家蚕 *RelA*、*RelB* 和 *Relish1* 在调控抗菌肽基因表达的水平 and 种类上有所不同,并且在家蚕不同细胞系中其调控程度也存在差异。

2.4 过表达 *Rels* 和 *Relish1* 后免疫通路上游基因的表达分析

在病原入侵后,昆虫通过免疫识别、信号传递、信号转导和效应发生达到清除病原的目的。NF- κ B 转录因子在促进抗菌肽基因表达的同时,也可能通过反馈调节影响免疫通路上游

基因的表达。因此,本研究在过表达 *Rels* 和 *Relish1* 后利用 RT-qPCR 检测了 BmE 和 BmN 细胞中多个免疫通路上游基因的表达变化。

在 BmE 细胞中,与对照组相比,细胞因子配体(*Spätzle1*, *Spz1*)的相对表达水平仅在过表达 *Rels* 后显著上调,其中过表达 *RelA* 后其增加更为显著; β -1,3-葡聚糖识别蛋白 β *GRP2* 的相对表达水平仅在过表达 *Relish1* 后显著上调,而 β *GRP3* 的相对表达水平仅在过表达 *Rels* 后显著增加;肽聚糖识别蛋白 *PGRP-S1* 的相对表达水平在过表达 *Rels* 和 *Relish1* 后无明显变化,*PGRP-S2* 和 *PGRP-S5* 的相对表达水平在过表达 *Rels* 和 *Relish1* 后显著上调,且它们均对过表达 *RelA* 的响应更高(图 4A)。

在 BmN 细胞中,与对照组相比,*Spz1* 的相对表达水平也仅在过表达 *Rels* 后显著上调; β *GRP2* 的相对表达水平在过表达 *RelA* 和 *Relish1* 后显著上调,而 β *GRP3* 的相对表达水平仅在过表达 *RelB* 后显著增加;*PGRP-S1* 的相对表达水平在过表达 *Relish1* 后显著增加,*PGRP-S2* 的相对表达水平仅在过表达 *Rels* 后显著上调,其中过表达 *RelA* 后其增加更为显著,*PGRP-S5* 的相对表达水平在过表达 *Rels* 和 *Relish1* 后显著上调,且在过表达 *RelA* 和 *Relish1* 后上调更显著(图 4B)。

这表明,家蚕免疫通路上游部分基因的表达也受到下游转录因子 *RelA*、*RelB* 或 *Relish1* 的调节,这可能形成了一种反馈调节环,在免疫防御中发挥重要作用。

2.5 过表达 *Rels* 和 *Relish1* 后其他免疫相关基因的表达分析

溶菌酶(lysozyme, *Lys*)和类溶菌酶蛋白(lysozyme-like protein, *LLP*)是昆虫血淋巴中的抗菌因子,溶菌酶是通过水解细菌细胞壁来杀死外源病原体,而类溶菌酶蛋白的抗菌活性可能是通过抑制细菌细胞膜的功能来达到的。一氧

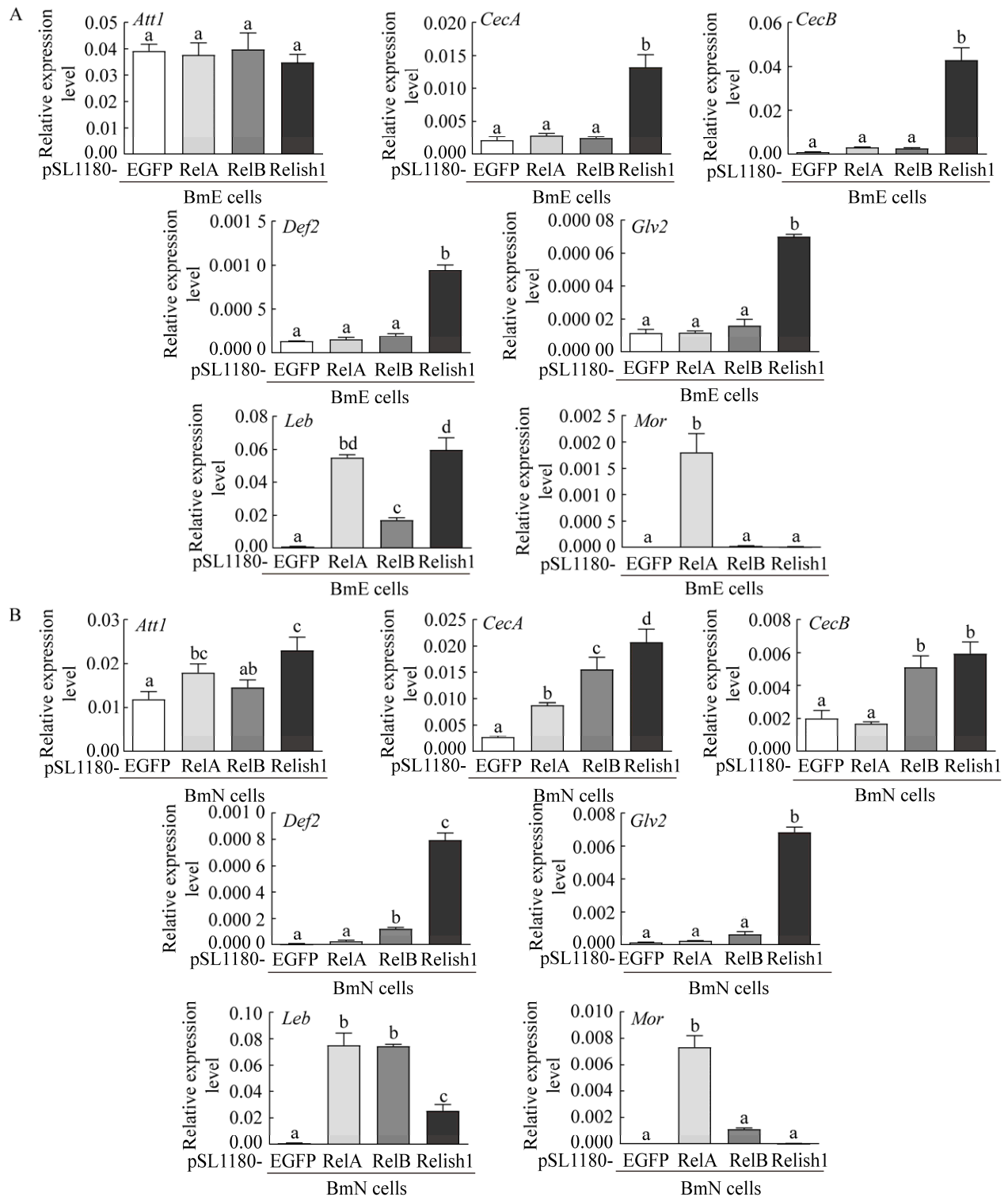


图3 过表达 *RelA* 和 *Relish1* 后家蚕 BmE (A)和 BmN (B)细胞中抗菌肽基因的表达检测 不同的字母表示显著差异($P < 0.05$)

Figure 3 Detection of antimicrobial peptide genes (AMPs) expression in BmE (A) and BmN cells after overexpression of *RelA* and *Relish1*. Significant differences were indicated by different letters ($P < 0.05$).

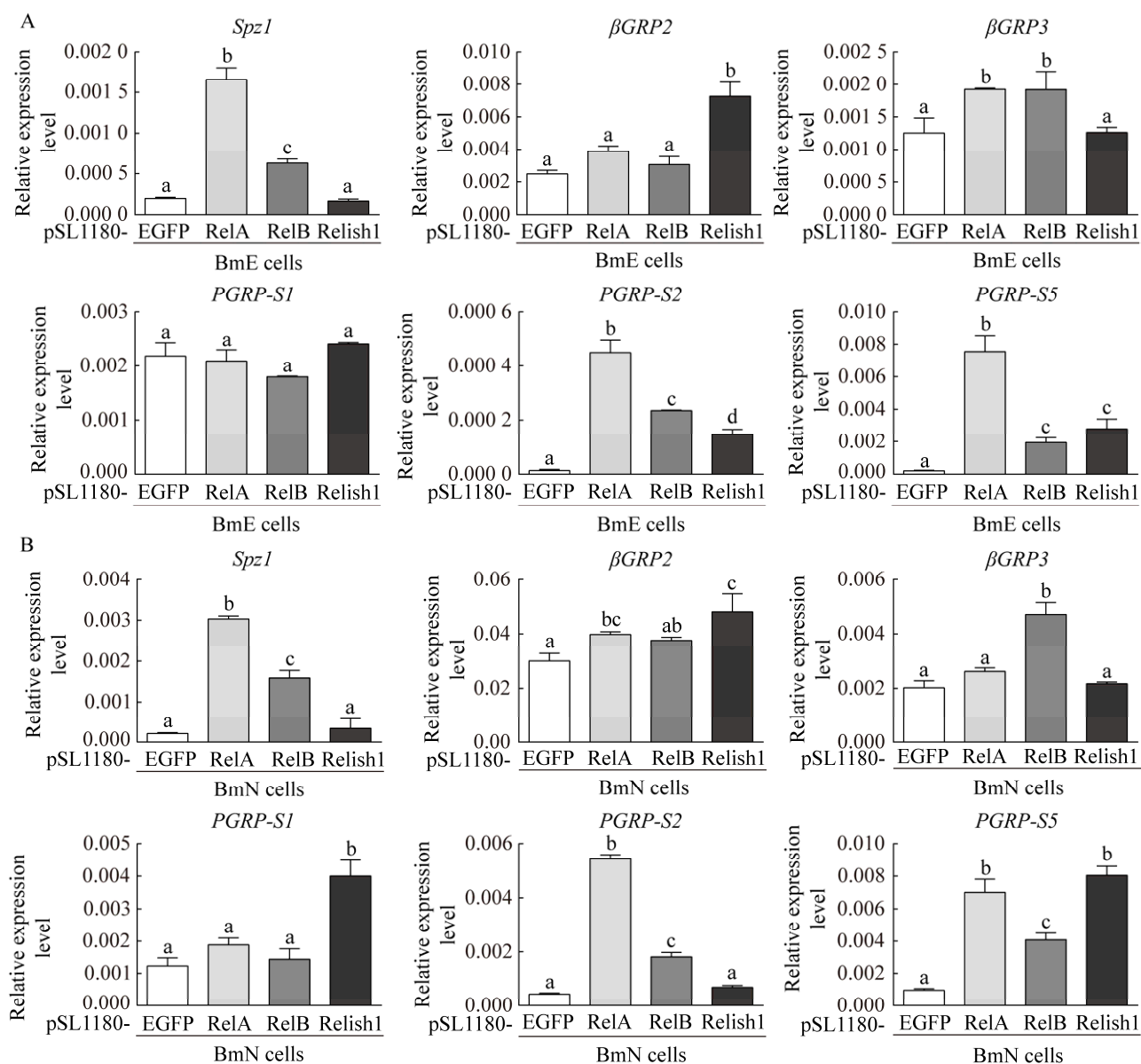


图4 过表达 *Rel*s 和 *Relish1* 后家蚕 BmE (A)和 BmN (B)细胞中免疫通路上游基因的表达检测 不同的字母表示显著差异($P < 0.05$)

Figure 4 Detection of the expression of upstream genes of immune pathway in BmE (A) and BmN (B) cells after overexpression of *Rel*s and *Relish1*. Significant differences were indicated by different letters ($P < 0.05$).

化氮(nitric oxide, NO)作为一种重要的信息分子,参与调节昆虫免疫反应。一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)基因催化 L-精氨酸生成 NO。因此,本研究探究了过表达 *Rel*s 和 *Relish1* 对 *Lys*、*LLP* 和 *NOS* 基因表达的影响。

在 BmE 细胞中,与对照组相比,*Lys* 和 *LLP2* 的相对表达水平仅在过表达 *Relish1* 后显著增加, *LLP3* 的相对表达水平在过表达 *Rel*s 和 *Relish1* 后没有明显变化; *NOS1* 的相对表达水平仅在过表达 *RelA* 后显著增加, *NOS2* 的相对

表达水平在过表达 *RelB* 和 *Relish1* 后显著增加(图 5A)。在 BmN 细胞中, 与对照组相比, *Lys* 的相对表达水平仅在过表达 *RelS* 后显著上调, 其中过表达 *RelA* 后其增加更为显著; *LLP2* 的相对表达水平在过表达 *RelS* 和 *Relish1* 后均显著增加, 且在过表达 *Relish1* 后上调更显著;

LLP3 的相对表达水平仅在过表达 *RelS* 后显著增加; *NOS1* 的相对表达水平仅在过表达 *RelA* 后显著增加, *NOS2* 的相对表达水平在过表达 *RelS* 和 *Relish1* 后显著增加(图 5B)。这提示家蚕 *RelS* 和 *Relish1* 转录因子可能参与调控 *Lys*、*LLP* 和 *NOS* 基因的表达。

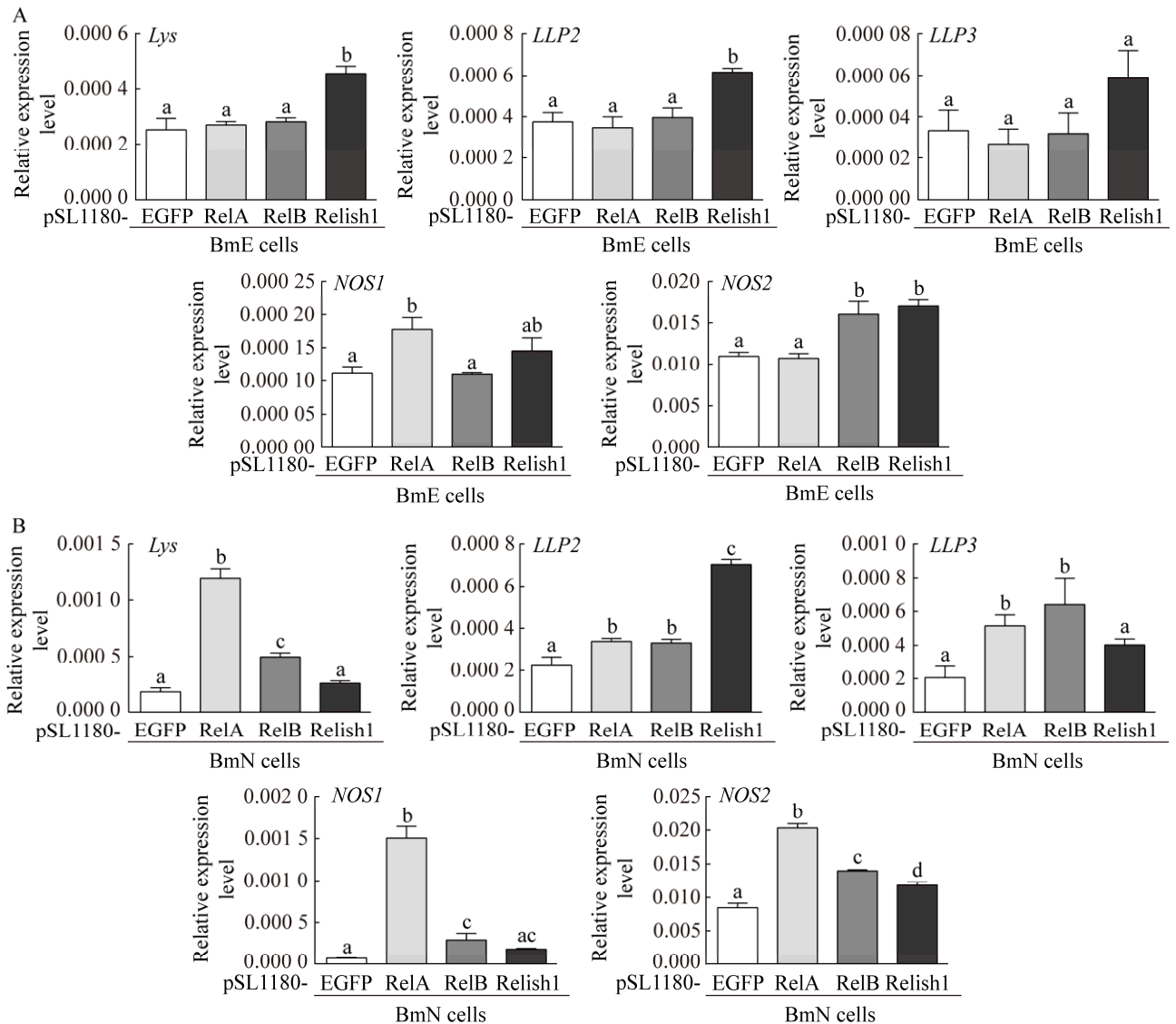


图 5 过表达 *RelS* 和 *Relish1* 后 BmE (A)和 BmN (B)细胞中溶菌酶、类溶菌酶蛋白和一氧化氮合酶基因的表达分析 不同的字母表示显著差异($P<0.05$)

Figure 5 Expression analysis of lysozyme, lysozyme-like proteins, and nitric oxide synthase genes in BmE (A) and BmN (B) cells after overexpression of *RelS* and *Relish1*. Significant differences were indicated by different letters ($P<0.05$).

3 讨论与结论

NF- κ B 核转录因子是细胞内一种关键的调控分子,参与先天免疫、细胞凋亡、自噬等生理过程^[24]。目前在哺乳动物中鉴定到 NF- κ B1 (p105/p50)、NF- κ B2 (p100/p52)、RelA、RelB 和 c-Rel 这 5 种 NF- κ B 家族成员。在昆虫中鉴定到 3 种 NF- κ B 成员,根据其分子激活机制,可将其分为: Dorsal-Dif 型、Relish 型和 NF- κ B 转录因子^[25]。Dorsal、Dif 与哺乳动物 Rel 蛋白同源,Relish 与哺乳动物 p100 和 p105 蛋白同源,它们分别是昆虫 Toll 和 IMD 信号通路的转录因子。目前 Dorsal/Dif 和 Relish 调控果蝇抗菌肽转录表达的分子机制研究较为深入清楚^[7,26-27]。随着越来越多的抗菌肽种类被鉴定发现,家蚕作为鳞翅目的重要模式昆虫,解析其 Toll 和 IMD 通路对抗菌肽基因的调控可以丰富昆虫免疫调控网络,对提升经济昆虫的免疫力以及鳞翅目害虫防治具有一定的指导意义。

目前在家蚕中鉴定到 2 种 NF- κ B 转录因子,Rel (RelA/RelB)和 Relish (Relish1/Relish2),二者均有 2 种剪接形式,其中家蚕 Rels 与果蝇 Dorsal 为同源蛋白,激活 Toll 信号通路,家蚕 Relish 与果蝇 Relish 同源,激活 IMD 信号通路^[28-29]。在昆虫中,Toll 和 IMD 信号通路是 AMPs 转录表达的主要调控方式。在进化发育分析中,家蚕 RelA/B 聚为一支,Relish1/2 分为两小支,提示其功能可能具有差异。研究表明 RelA/B 均可以正调控 AMPs 表达,发挥促进 AMPs 表达的功能^[17]。与 Relish1 相比,Relish2 在 C 端少了 ANK 重复序列,研究表明 BmRelish2 实际上发挥负调控作用,即抑制 AMPs 的表达^[16]。

在本研究中,家蚕 BmE 和 BmN 细胞系中过表达 *BmRels* 或 *BmRelish1* 能够不同程度地上调 AMPs、溶菌酶和 NOS 等免疫相关基因的转

录水平,表明 *BmRels* 和 *BmRelish1* 在家蚕免疫防御中发挥着重要功能,也反映了 NF- κ B 转录因子在昆虫进化上的功能保守性。

本研究检测了 6 种不同类型的抗菌肽基因在过表达 *BmRels* 和 *BmRelish1* 后的表达变化,结果显示家蚕 *CecA*、*CecB*、*Leb* 和 *Att1* 均可被 Rels 和 Relish1 诱导上调,表明这些抗菌肽基因可以同时受 Toll 和 IMD 信号通路的调控。然而在果蝇中,抗菌肽 Att 和 Cec 主要由 IMD 信号通路激活表达。在家蚕中,*Def2* 仅被 Relish1 诱导上调,显示其可能受 IMD 信号通路调控,而 *DmDef* 主要受到果蝇 Toll 通路的调控^[22]。*Att1* 在 BmN 细胞中可被 Rels 和 Relish1 诱导上调,但在 BmE 细胞中则无显著变化。推测这可能与 *Att1* 在 BmN 和 BmE 细胞中本底表达水平不同有关,也可能受 BmE 细胞分化繁殖的影响,后续对 *Att1* 启动子调控区的分析将有助于理解这种调控差异。以上结果表明家蚕 *Def2* 和 *Glv2* 主要受到 Relish 调控,*Mor* 主要受到 Rels 调控,其他抗菌肽基因则受到二者的共同调控。抗菌肽基因的调控机制在不同昆虫间存在差异,其表达水平和种类主要由 NF- κ B 转录因子决定,提示了 Toll、IMD 信号通路对抗菌肽基因的调控差异。在分子水平上,这种调控差异可能与不同抗菌肽基因启动子区与 NF- κ B 转录因子结合的序列差异有关^[16]。此外也可能受到免疫应答时的模式识别受体种类、其他免疫效应分子的反馈调控、细胞系的不同等因素影响。

在昆虫的先天免疫中,当病原体入侵时会被体内的模式识别蛋白识别,进而激活下游的免疫反应。目前已经报道多种模式识别蛋白,其中肽聚糖识别蛋白 PGRP 和 β -葡聚糖识别蛋白 β GRPs 是重要的模式识别蛋白家族。根据转录本长度可将 PGRP 分为短的 PGRP-S 和长的 PGRP-L 这两种类型,家蚕基因组中分别存在

6个 *PGRP-S* 和 *PGRP-L* 基因^[30]。其中, *BmPGRP-S1* 和 *BmPGRP-S2* 均作为 IMD 信号通路的受体, 参与激活抗菌肽的表达; *BmPGRP-S5* 具有酰胺酶活性, 既可以激活酚氧化酶信号通路引发黑化反应, 也具有抗菌活性^[16,31-32]。本研究结果显示 *PGRP-S1* 的表达仅在过表达 *Relish1* 后显著上调, 与其参与激活 IMD 信号通路相符^[31]。推测 *Relish1* 上调 *PGRP-S1* 的表达可能构成一种正反馈调节环, 以增强免疫系统的应对能力。而 *PGRP-S2* 在过表达 *Relis* 和 *Relish1* 后均上调表达, 且对 *RelA* 的响应更为显著, 提示 *PGRP-S2* 可能主要通过 Toll 信号通路发挥作用, 然而其在免疫系统中究竟是作为传感器、调节器抑或是效应器, 仍需要进一步研究。与 *PGRP-S2* 类似, *PGRP-S5* 在过表达 *Relis* 和 *Relish1* 后均显著上调, 这可能与 *PGRP-S5* 作为效应分子, 本身具有抗菌活性相关^[33]。也有研究报道, 家蚕 *PGRP-S5* 是 AMPs 通路的负调节因子^[32], 推测 *Relis* 和 *Relish1* 上调 *PGRP-S5* 的表达可能构成一种负反馈调节环, 以达到平衡免疫反应的作用。

β GRPs 因具有保守的 β -1,3-葡聚糖结合结构域, 能广泛识别并结合细菌和真菌, 一方面激活 Toll 信号通路诱导抗菌肽的表达, 另一方面激活 PPO 信号通路促进黑色素的形成^[34]。目前在家蚕中共鉴定到 4 种 β GRPs, 它们均具有结合葡聚糖的能力, β GRP1 和 β GRP2 主要激活家蚕的细胞免疫应答^[2], β GRP3 和 β GRP4 可以响应病原菌引起体液免疫^[35-36]。本研究中, 在家蚕细胞系中过表达 *BmRelis* 或 *BmRelish1* 均不同程度地上调了 β GRP2 和 β GRP3 的表达水平, 提示家蚕细胞免疫和体液免疫间可能存在着共同的免疫应答机制。此外, 过表达 *BmRelis* 显著提高了 *Spz1* 的表达, 而 *Spz1* 对 *BmRelish* 的过表达并无明显响应, 这与 *Spz1* 作为 Toll 信号通路特异性配体的功能是一致的^[37]。这些结果表

明家蚕免疫通路上游部分基因的表达也受到下游转录因子 *RelA*、*RelB* 或 *Relish1* 的调节, 可能是维持免疫系统稳态的一种反馈调节机制。这些结果也提示昆虫 Toll、IMD 信号通路引起的抗菌肽表达也会受到 PGRPs、 β GRPs 等模式识别受体种类的影响。

在昆虫的体液免疫中, 除了抗菌肽可直接清除病原体外, 机体产生的溶菌酶 *Lys* 和类溶酶体蛋白 *LLPs* 可以通过直接作用于入侵的细菌表面从而消灭病菌。在柞蚕中, 血淋巴溶菌酶可以被大肠杆菌、真菌以及微孢子虫诱导显著上调^[38]。虽然昆虫溶菌酶的抗菌功能已得到表征, 但其表达调控机制仍缺乏了解。本研究结果显示溶菌酶 *Lys* 可以响应 *Relis* 和 *Relish1* 上调表达, 可能与昆虫 C 型溶菌酶启动子区含有类似 NF- κ B 结合位点的序列有关。这提示昆虫溶菌酶 *Lys* 在不同病原菌的刺激下可能受到 Toll、IMD 等信号通路的调控^[38]。研究显示 IMD 信号通路参与印度柞蚕中类溶酶体蛋白 *LLP1* 的表达调控^[39]。本研究发现在 *BmN* 细胞中, *BmLLP2* 主要受 *Relish1* 诱导上调, 而 *BmLLP3* 仅受 *Relis* 诱导上调, 推测二者在启动子区 NF- κ B 结合位点的数量和序列可能存在差异。然而, 昆虫不同 *LLPs* 受免疫信号通路调控的具体分子机制仍有待深入研究。

在昆虫免疫反应中, 高浓度的 NO 作为效应器, 能够杀死病原体。同时, 低浓度的 NO 作为第二信使, 能够调节昆虫体内 AMPs 的产生^[40-41]。在果蝇中, 信号分子 NO 通过激活的 IMD 途径诱导 *Diptericin* 的表达^[42]。在家蚕中共鉴定到 2 个一氧化氮合酶基因 *NOS1*、*NOS2*。研究表明在病原菌入侵时, 机体内 NOS 的表达引起 NO 的生成, 从而促进抗菌肽基因的表达。反过来 NO 也可以负调控 NOS 的表达, 并促进 IMD 途径的部分抑制因子表达, 从而使抗菌肽表达下调,

以防止过度免疫^[40]。本研究结果显示家蚕 *NOS1* 仅受 RelA 的诱导上调表达, 推测家蚕 Toll 信号通路参与调控 *NOS1* 的表达。有研究显示, 在豌豆蚜虫中 NO 可以显著上调 Toll 信号通路关键基因, 包括 *SPE*、*Spirit*、*Grass*、*Toll* 和 *ModSP*^[43], 这表明 NO 可能以未知的方式激活了 Toll 通路; 此外, 过表达 *Rels* 或 *Relish1* 均能上调家蚕 *NOS2* 表达, 提示 *NOS2* 可能在上游合成 NO, 并进一步影响 Toll 或 IMD 信号通路。然而, 在免疫应激的哺乳动物和糙海参中, JNK 通路是诱导 NOS 上调以合成 NO 的必要信号通路^[44-45]。因此, 需要进一步地研究来明确昆虫 Toll、IMD 和 JNK 通路是否调节 NO 合成和 NOS 表达。

本研究结果表明, 相比于果蝇 Toll 和 IMD 信号通路转录因子对不同抗菌肽基因表达调控的特异性, 家蚕 *Rels* 和 *Relish1* 对不同抗菌肽基因表达的调控模式更为复杂; 同时, 相比于 BmE 细胞系, 在分化程度更高的 BmN 细胞系中, 家蚕 *Rels* 和 *Relish1* 对免疫相关基因表达的调控更为显著, 表明 BmN 细胞系可能更适于开展细胞水平的家蚕免疫相关基因表达调控研究。本研究对家蚕 *Rels* 和 *Relish1* 调控模式识别蛋白、溶菌酶和一氧化氮合酶基因表达的探究也为进一步解析昆虫 Toll 和 IMD 通路的效应机制和反馈机制提供了参考。

REFERENCES

- [1] 胡杰. 家蚕 BmCaspase-8-like 的免疫负调控功能及作用机制研究[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2019. HU J. Functional characterization and mechanism studies of BmCaspase-8-like, a negative regulator of immunity in silkworm, *Bombyx mori*[D]. Chongqing: Master's Thesis of Southwest University, 2019 (in Chinese).
- [2] 许平震. 家蚕先天免疫的模式识别、信号传导和抗菌肽基因表达调控机制研究[D]. 重庆: 西南大学博士学位论文, 2010.
- [3] 彭景琨. 家蚕 JAK/STAT 通路主要相关基因及其对病毒、微孢子虫感染应答研究[D]. 苏州: 苏州大学硕士学位论文, 2012. PENG JK. Cloning of JAK/STAT pathway related major genes of silkworm, *Bombyx mori* and the response of JAK/STAT pathway on virus and microsporidian infection[D]. Suzhou: Master's Thesis of Soochow University, 2012 (in Chinese).
- [4] LEMAITRE B, HOFFMANN J. The host defense of *Drosophila melanogaster*[J]. Annual Review of Immunology, 2007, 25: 697-743.
- [5] AGGARWAL K, SILVERMAN N. Positive and negative regulation of the *Drosophila* immune response[J]. BMB Reports, 2008, 41(4): 267-277.
- [6] CHOE KM, LEE H, ANDERSON KV. *Drosophila* peptidoglycan recognition protein LC (PGRP-LC) acts as a signal-transducing innate immune receptor[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(4): 1122-1126.
- [7] LIM JH, KIM MS, KIM HE, YANO T, OSHIMA Y, AGGARWAL K, GOLDMAN WE, SILVERMAN N, KURATA S, OH BH. Structural basis for preferential recognition of diaminopimelic acid-type peptidoglycan by a subset of peptidoglycan recognition proteins[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(12): 8286-8295.
- [8] MYLLYMÄKI H, VALANNE S, RÄMET M. The *Drosophila* imd signaling pathway[J]. Journal of Immunology, 2014, 192(8): 3455-3462.
- [9] VALANNE S, KLEINO A, MYLLYMÄKI H, VUORISTO J, RÄMET M. Iap2 is required for a sustained response in the *Drosophila* imd pathway[J]. Developmental and Comparative Immunology, 2007, 31(10): 991-1001.
- [10] 时苗均. 甜菜夜蛾肠道免疫防御粘质沙雷氏菌 PS-1 的 iTRAQ 分析[D]. 广州: 华南农业大学硕士学位论文, 2017. SHI MJ. I-TRAQ analysis of intestinal immune responses against *Serratia marcescens* in *Spodoptera exigua*[D]. Guangzhou: Master's Thesis of South China Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [11] HETRU C, TROXLER L, HOFFMANN JA. *Drosophila melanogaster* antimicrobial defense[J]. The Journal of

- Infectious Diseases, 2003, 187(suppl 2): S327-S334.
- [12] JOO HS, FU CI, OTTO M. Bacterial strategies of resistance to antimicrobial peptides[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences, 2016, 371(1695): 20150292.
- [13] HE Y, CAO XL, LI K, HU YX, CHEN YR, BLISSARD G, KANOST MR, JIANG HB. A genome-wide analysis of antimicrobial effector genes and their transcription patterns in *Manduca sexta*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2015, 62: 23-37.
- [14] KO HJ, JANG HA, PARK KB, KIM CE, PATNAIK BB, LEE YS, HAN YS, JO YH. IKK β regulates antimicrobial innate immune responses in the yellow mealworm, *Tenebrio molitor*[J]. Developmental and Comparative Immunology, 2023, 147: 104761.
- [15] ZHANG RD, ZHU YB, PANG XJ, XIAO XP, ZHANG RL, CHENG G. Regulation of antimicrobial peptides in *Aedes aegypti* Aag2 cells[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2017, 7: 22.
- [16] 杨杰. 家蚕肽聚糖识别蛋白基因 PGRP-S2 的特性、免疫诱导表达和参与的信号通路的研究[D]. 镇江: 江苏科技大学硕士学位论文, 2015.
- YANG J. Peptidoglycan recognition protein S2 from silkworm integument: characterization, microbe-induced expression, and involvement in the immune-deficiency pathway[D]. Zhenjiang: Master's Thesis of Jiangsu University of Science and Technology, 2015 (in Chinese).
- [17] TANAKA H, YAMAMOTO M, MORIYAMA Y, YAMAO M, FURUKAWA S, SAGISAKA A, NAKAZAWA H, MORI H, YAMAKAWA M. A novel Rel protein and shortened isoform that differentially regulate antibacterial peptide genes in the silkworm *Bombyx mori*[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2005, 1730(1): 10-21.
- [18] TANAKA H, MATSUKI H, FURUKAWA S, SAGISAKA A, KOTANI E, MORI H, YAMAKAWA M. Identification and functional analysis of Relish homologs in the silkworm, *Bombyx mori*[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression, 2007, 1769(9/10): 559-568.
- [19] 程廷才, 王根洪, 李娟, 夏庆友. 昆虫抗菌肽基因表达调控机理[J]. 蚕学通讯, 2004, 24(3): 20-26.
- CHENG TC, WANG GH, LI J, XIA QY. The regulatory mechanism of expressing insect antimicrobial peptides[J]. Newsletter of Sericultural Science, 2004, 24(3): 20-26 (in Chinese).
- [20] LEMAITRE B, REICHHART JM, HOFFMANN JA. *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, 94(26): 14614-14619.
- [21] VALANNE S, WANG JH, RÄMET M. The *Drosophila* Toll signaling pathway[J]. Journal of Immunology, 2011, 186(2): 649-656.
- [22] 吴坤钟, 李荣松, 曹阳, 黄志君, 田铃. 英诺克李斯特菌感染果蝇 S2 细胞后的转录组分析[J]. 华南农业大学学报, 2020, 41(5): 17-26.
- WU KZ, LI RS, CAO Y, HUANG ZJ, TIAN L. Transcriptome analysis of *Drosophila* S2 cells infected by *Listeria innocua*[J]. Journal of South China Agricultural University, 2020, 41(5): 17-26 (in Chinese).
- [23] TANAKA H, SAGISAKA A, NAKAJIMA Y, FUJITA K, IMANISHI S, YAMAKAWA M. Correlation of differential expression of silkworm antimicrobial peptide genes with different amounts of rel family proteins and their gene transcriptional activity[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2009, 73(3): 599-606.
- [24] GILMORE TD, WOLENSKI FS. NF- κ B: where did it come from and why?[J]. Immunological Reviews, 2012, 246(1): 14-35.
- [25] SILVERMAN N, MANIATIS T. NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity[J]. Genes & Development, 2001, 15(18): 2321-2342.
- [26] SUN HY, BRISTOW BN, QU GW, WASSERMAN SA. A heterotrimeric death domain complex in Toll signaling[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(20): 12871-12876.
- [27] WU LP, ANDERSON KV. Regulated nuclear import of Rel proteins in the *Drosophila* immune response[J]. Nature, 1998, 392: 93-97.
- [28] HU WN, HE GW, WANG JJ, HU QB. The effects of destruxin A on *relish* and *rel* gene regulation to the suspected immune-related genes of silkworm[J]. Molecules, 2016, 22(1): 41.
- [29] TANAKA H, SAGISAKA A. Identification and functional analysis of pointed homologs in *Bombyx mori*[J]. Gene, 2017, 604: 22-32.
- [30] TANAKA H, ISHIBASHI J, FUJITA K, NAKAJIMA Y, SAGISAKA A, TOMIMOTO K, SUZUKI N, YOSHIYAMA M, KANEKO Y, IWASAKI T, SUNAGAWA T, YAMAJI K, ASAOKA A, MITA K, YAMAKAWA M. A genome-wide analysis of genes and gene families involved in innate immunity of

- Bombyx mori*[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, 38(12): 1087-1110.
- [31] 任美佳. 家蚕 BmPGRP-S1 与 BmPGRP-S4 功能的初步研究[D]. 镇江: 江苏大学硕士学位论文, 2019.
REN MJ. Preliminary study on the functions of BmPGRP-S1 and BmPGRP-S4 in *Bombyx mori*[D]. Zhenjiang: Master's Thesis of Jiangsu University, 2019 (in Chinese).
- [32] CHEN KK, ZHOU L, CHEN F, PENG YC, LU ZQ. Peptidoglycan recognition protein-S5 functions as a negative regulator of the antimicrobial peptide pathway in the silkworm, *Bombyx mori*[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2016, 61: 126-135.
- [33] 陈雪, 周虹, 李晓凤, 肖阳, 钟仰进, 杨婉莹. 家蚕 BmPGRP-S5 蛋白的抑菌活性及其在细胞免疫中的作用[J]. *昆虫学报*, 2020, 63(11): 1333-1344.
CHEN X, ZHOU H, LI XF, XIAO Y, ZHONG YJ, YANG WY. Antibacterial activity of BmPGRP-S5 of *Bombyx mori* and its role in cellular immunity[J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2020, 63(11): 1333-1344 (in Chinese).
- [34] ADACHI Y, ISHII M, KANNO T, TETSUI J, ISHIBASHI KI, YAMANAKA D, MIURA N, OHNO N. N-terminal (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan recognition proteins from insects recognize the difference in ultra-structures of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(14): 3498.
- [35] YOSHIDA H, OCHIAI M, ASHIDA M. β -1,3-glucan receptor and peptidoglycan receptor are present as separate entities within insect prophenoloxidase activating system[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1986, 141(3): 1177-1184.
- [36] LEE WJ, LEE JD, KRAVCHENKO VV, ULEVITCH RJ, BREY PT. Purification and molecular cloning of an inducible Gram-negative bacteria-binding protein from the silkworm, *Bombyx mori*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(15): 7888-7893.
- [37] LIU HW, XU JH, WANG LL, GUO PC, TANG ZC, SUN XT, TANG X, WANG W, WANG LY, CAO Y, XIA QY, ZHAO P. Serpin-1a and serpin-6 regulate the Toll pathway immune homeostasis by synergistically inhibiting the Spätzle-processing enzyme CLIP2 in silkworm, *Bombyx mori*[J]. *PLoS Pathogens*, 2023, 19(10): e1011740.
- [38] 宋佳. 微生物诱导柞蚕血淋巴溶菌酶基因表达及分析[D]. 沈阳: 沈阳农业大学硕士学位论文, 2013.
SONG J. Study on lysozyme gene expression and analysis from hemolymph induced by different microbes in *Antheraea pernyi*[D]. Shenyang: Master's Thesis of Shenyang Agricultural University, 2013 (in Chinese).
- [39] SATYAVATHI VV, MOHAMED AA, KUMARI S, MAMATHA DM, DUVIC B. The IMD pathway regulates lysozyme-like proteins (LLPs) in the silkworm *Antheraea mylitta*[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2018, 154: 102-108.
- [40] 王延稳. 家蚕肠道感染细菌后一氧化氮的生成及抗菌肽基因表达的变化[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2014.
WANG YW. Generation of nitric oxide assay and antimicrobial peptides genes expression after oral infection with bacteria in the silkworm, *Bombyx mori*[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2014 (in Chinese).
- [41] CHEN KK, WANG XY, WEI XY, CHEN JQ, WEI YH, JIANG HB, LU ZQ, FENG CJ. Nitric oxide-induced calcineurin A mediates antimicrobial peptide production through the IMD pathway[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 905419.
- [42] FOLEY E, O'FARRELL PH. Nitric oxide contributes to induction of innate immune responses to Gram-negative bacteria in *Drosophila*[J]. *Genes & Development*, 2003, 17(1): 115-125.
- [43] MA L, YAN XZ, ZHOU L, WANG WT, CHEN KK, HAO C, LU ZQ, QIE XT. Nitric oxide synthase is required for the pea aphid's defence against bacterial infection[J]. *Insect Molecular Biology*, 2023, 32(2): 187-199.
- [44] LI L, SAPKOTA M, KIM SW, SOH Y. Herbactin inhibits inducible nitric oxide synthase via JNK and nuclear factor- κ B in LPS-stimulated RAW_{264.7} cells[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2015, 765: 115-123.
- [45] PRANWEERAPAIBOON K, APISAWETAKAN S, NOBSATHIAN S, ITHARAT A, SOBHON P, CHAITHIRAYANON K. An ethyl-acetate fraction of *Holothuria scabra* modulates inflammation *in vitro* through inhibiting the production of nitric oxide and pro-inflammatory cytokines via NF- κ B and JNK pathways[J]. *Inflammopharmacology*, 2020, 28(4): 1027-1037.

(本文责编 郝丽芳)