

家蚕抗核型多角体病毒的研究进展

吕鹏^①, 潘晔^{①②}, 王鹏^①, 周阳^①, 马上上^①, 姚勤^①, 陈克平^{①②*}

① 江苏大学生命科学研究院, 镇江 212013;

② 江苏大学食品与生物工程学院, 镇江 212013

* 联系人, E-mail: kpchen@ujs.edu.cn

2014-09-01 收稿, 2014-11-12 接受, 2015-04-16 网络版发表

国家重点基础研究发展计划(2012CB114604)、国家自然科学基金(31272507, 31301919)和江苏省普通高校研究生科研创新计划(KYXX0010)资助

摘要 家蚕核型多角体病毒(*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus, BmNPV)病是世界养蚕业一种重大的传染疾病, 该病引起的蚕茧损失占蚕病引起损失总数的60%以上, 长期以来对这种病毒病的防治还没有很好的解决方法. 各国研究人员在寻找抗性基因、阐述抗性机制以及通过传统育种或者转基因构建抗BmNPV家蚕等方面进行了很好的尝试, 也取得了一定的成果. 本文将最新的家蚕抗BmNPV的研究结果进行归纳和整理, 尝试对其可能的分子机制进行探讨, 并对现有的研究结果进行深入挖掘, 希望有助于家蚕抗病分子机制的深入研究.

关键词

家蚕
核型多角体病毒
抗性
遗传分析
SSH
蛋白质组
免疫反应

昆虫与脊椎动物相比缺少获得性免疫系统, 但其拥有与哺乳动物类似的固有免疫系统, 并且也已经成为固有免疫研究的良好模型. 此外, 昆虫还进化出了一些特殊的方式来应对外源微生物的入侵^[1~7]. 昆虫对于细菌和真菌的感染研究得较为深入, 近年来对病毒的免疫机制研究也取得了一些进展, 但了解还比较有限. 家蚕是重要的经济昆虫. 随着家蚕基因组的公布和基因组精细图的完善, 家蚕也越来越成为一种重要的模式昆虫^[8~10]. 家蚕核型多角体病毒(*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus, BmNPV)是一种基因组为128 kb左右的双链环状DNA病毒, 家蚕感染BmNPV后表现为体躯肿胀, 最后化脓而死, 整个过程十分剧烈且迅速, 传染性极强. 家蚕核型多角体病毒病(俗称血液型脓病)一直是养蚕业危害最严重的病害, 引起的蚕茧损失占蚕病引起损失的60%以上^[11], 尤其是在世界热带和温带地区以及我国夏秋蚕期, 该病影响尤为严重, 目前还没有较好的方法和药物可以对该病毒病进行控制.

20世纪50~60年代对BmNPV的发病机制有过一

些争论^[11], 日本学者首先提出了BmNPV的“病毒自生论”, 认为家蚕基因组的突变形成含有病毒原的基因组, 在一定条件下诱发开始合成病毒粒子, 这一理论也得到了其他学者的支持. 我国研究人员在进一步研究人工诱发BmNPV发病机制过程中, 提出极端环境或人工诱发使得家蚕处于一种应激状态从而感染微量病毒后发病的结论, 从而打破了病毒自生论的论断, 提出了科学的养蚕防病措施, 拉开了家蚕BmNPV抗性研究的新纪元. 从BmNPV抗性家蚕的筛选, 到家蚕抗BmNPV分子机制的研究逐渐深入, 其中尤以陈克平研究组的研究最为广泛. 本文将目前对家蚕抗BmNPV的研究进行总结, 对RNA、蛋白等水平的研究结果进行梳理, 并探讨其可能的分子机制.

1 家蚕对BmNPV的水平抗性

在人们逐渐统一BmNPV发病机制的认识后, 家蚕对BmNPV的抗性研究逐渐展开. 人们的生产实践和研究表明家蚕对BmNPV的感受性受到多种内外部

引用格式: 吕鹏, 潘晔, 王鹏, 等. 家蚕抗核型多角体病毒的研究进展. 科学通报, 2015, 60: 1285-1297

Lü P, Pan Y, Wang P, et al. Progress in understanding resistance of *Bombyx mori* to nucleopolyhedrovirus (in Chinese). Chin Sci Bull, 2015, 60: 1285-1297, doi: 10.1360/N972015-00228

因素的影响^[11~13].

(i) 发育抗性. 同一品种的家蚕在幼虫不同发育龄期所表现出的对BmNPV的抗性是不同的. 一般来说, 稚蚕对BmNPV的抗性最弱, 抗性随龄期增长而变强; 同一龄期起蚕的抗病能力较弱, 食桑叶后逐渐增强; 四龄眠前一天会出现一个抗性突然下降的阶段.

(ii) 温度. 家蚕的胚胎发育环境与发育状态明显影响胚后状态, 胚胎发育期(催青期)温度过高, 则幼虫对BmNPV的抗性会显著降低. 而如果在稚蚕期也在不适合的温度中生长, 在三龄时BmNPV对家蚕的半致死剂量(LD₅₀)也会成倍提高.

(iii) 桑叶质量. 不同的桑叶质量也会影响家蚕对BmNPV的感染性. 通常来说, 相同条件下, 三龄起蚕食用极嫩叶的发病率与对照相比明显升高; 桑叶中如果还原糖含量高则会降低BmNPV的发病率.

(iv) 光照. 光照条件不仅能够影响家蚕生长发育和眠性变化, 而且跟BmNPV的感受性也相关. 全暗条件下饲养的家蚕对BmNPV的感受性明显高于全明条件下的家蚕, 这可能与家蚕中肠的红色荧光蛋白有关.

2 家蚕对BmNPV的遗传抗性

在BmNPV发病机制确认的基础上, 家蚕对BmNPV抗性的认识逐渐达成共识, 即家蚕对BmNPV的感受性虽然受多种内外部因素影响, 但最主要的还是由遗传因素决定的.

2.1 抗BmNPV家蚕资源的发现和鉴定

日本学者荒武义信^[14]对日本生产性品种“秋光×龙白”的F₁蚕蛹进行病毒注射, 从中筛选残存个体, 经过8代选择育成了一株对BmNPV的抗病品系, 其 $-\log LD_{50}$ 达到4.28, 比未选育品系的6.28提高了2个数量级. 1982年, 张远能等人^[15]选取了33个有代表性的家蚕品种对6种家蚕主要蚕病的抗性进行了研究, 发现了5种对BmNPV抗性极强的家蚕品种, 同时还发现有一些品种兼抗多种病害.

20世纪80年代末, 陈克平等人^[16]对家蚕抗BmNPV品种进行了更大范围的筛选. 对我国家蚕种质资源库中344个家蚕品种进行了抗BmNPV测试, 用品种数占总品种数的百分率作为Y轴, $-\log LC_{50}$ 作为X轴作出了调查图, 结果表明, 不同品种家蚕对

BmNPV的抗性存在差异, 呈现出正态分布, 推测一定有对BmNPV高抗性的家蚕品系存在. 随后其对鉴定出的20种抗性品种进行继续筛选和重复鉴定, 获得一个高抗性品系NB^[17], 其半致死剂量LC₅₀达到 6.39×10^8 , 比感性品种306高了近1000倍. 而对接种病毒后的家蚕血淋巴和中肠中的病毒DNA聚合酶的荧光定量分析表明, 病毒在抗性家蚕NB体内出现过低水平的复制, 但随后便被抑制, 表明病毒能够进入抗性家蚕的体内, 但是抗性家蚕存在某种机制使得病毒的复制被终止^[18].

2.2 抗性遗传规律的研究

从20世纪80年代, 学术界陆续开始研究家蚕抵抗BmNPV的遗传规律. 日本学者Watanabe等人^[19]经过研究普遍认为, 杂种一代(F₁)对BmNPV的抵抗性受母本影响较大, 存在杂种优势现象, 受多基因控制. 印度学者Zafar等人^[20]用他们的抗性家蚕进行的研究表明, 对BmNPV的抗性由一个主效基因和多个位于Z染色体的微效基因控制. 在中国, 1982年孟智启^[21]研究表明, 家蚕对NPV病毒经口感染的抵抗性遗传方式, 是受一对主效显性基因和若干微效基因控制的. 这种抵抗性的遗传父本大于母本, 有偏父遗传现象, F₁代的抗病性表现出杂种优势, 有超显性现象. 陈克平等人^[17]在1996年的研究表明, 家蚕品系间存在抗性差异, 幼虫期的攻毒发病率与全龄虫蛹率成极显著的负相关, 抗性对感性呈不完全显性, 这是由2对以上基因控制的, 至少有1对为主效基因, 再一次证明有偏父遗传现象. 2013年, Feng等人^[22]对BmNPV抗性家蚕NB进行了系统筛选, 并对遗传规律进行了重新分析, 发现抗性表现出单基因控制的遗传规律, 这可能跟抗性品种经过多年的不断筛选, 主效基因作用更加明显, 微效基因作用被弱化有关.

2.3 抗BmNPV分子标记的筛选

2002年, Yao等人^[23]利用150个RAPD (Random amplified polymorphism DNA)随机引物对抗性亲本NB, 感性亲本306亲本以及正反交的F₁代和各回交代BC₁, BC₂, BC₃, BC₄, BC₅个体进行筛选, 获得一个在抗性个体中能够扩增出一条约700 bp特异性条带的引物OPA-18, 通过F₂分离群体的进一步验证证实这个标记与抗病基因连锁, 是一个有效的分子标记.

2004年Liu等人^[24]用500个随机引物对NB, 306和

近等基因系BC₈进行了扩增,发现有461个有扩增产物,其中458个在3个品系中的扩增产物带型基本相同,有3个引物出现多态性,在NB和BC₈群体中出现而在306中缺失.经过进一步的回交代个体材料的验证,发现其中标记OPF-07₂₀₂₃在回交代中也得到了验证.2013年Feng等人^[25]用重新筛选选育到的BmNPV抗性家蚕NB,对OPF-07转换的SCAR标记(序列编号:AY380833)进行了验证,发现此标记在NB与306的F₂群体中表现出3:1,在BC₁中表现出1:1的比例,表明此标记与抗性基因紧密连锁.

3 家蚕抗BmNPV相关基因/蛋白的筛选

目前虽然获得了一些与家蚕抗BmNPV相关的分子标记的信息,但是还很有限,所以通过分子标记和图位克隆的方法定位抗性基因还有一些难度,但是不同的研究小组还是通过一系列组学研究方法获得了与家蚕抗BmNPV相关的基因/蛋白信息.其中陈克平研究组利用选育到的家蚕抗BmNPV品系NB和感性品系306构建了近等基因系BC₈,成为高通量组学方法筛选家蚕抗BmNPV相关基因/蛋白的良好材料,因为近等基因系BC₈既有306的遗传背景又具有NB的抗BmNPV特性,缩小了与NB的遗传背景差异,所以如果在NB,BC₈中表达或高表达,在306中不表达或低表达的基因或蛋白就可以被认为是与抗病毒相关.

3.1 RNA水平抗BmNPV相关基因的筛选

徐家萍^[26]利用荧光差异展示PCR技术(Fluorescent differential display PCR, FDD-PCR)展开了对家蚕抗BmNPV相关基因的筛选工作.通过分别对添毒和不添毒的NB,306和BC₈家蚕的中肠和血淋巴样本的mRNA表达情况分析,在血淋巴样本中发现了18个差异片段,在中肠中发现了35个差异带,通过Northern blot方法进一步验证,发现了2个在NB和BC₈表达水平较高,在306表达较低,在添毒区表达水平又高于非添毒区的条带,经过测序比对确定为家蚕核糖体S3A基因(*Bms3a*)^[27].S3A蛋白被认为能够与Bcl-2共同作用抑制PARP的活性从而抑制细胞凋亡,细胞凋亡正是宿主对抗病毒感染的一种重要机制,所以猜测BmNPV感染促使BmS3A发生高表达,促进了被感染的宿主细胞的凋亡,从而抑制了病毒的复制.另一个为家蚕肌动蛋白抑制蛋白抑制因子2(suppressor of profiling 2, sop2)^[28].

2013年高路等(数据未发布)又利用抑制性消减杂交方法(suppression subtractive hybridization, SSH)分析了BC₈和306在添毒后中肠的mRNA表达差异,发现在BC₈库中高表达在306中低表达的,能通过数据库比对上的序列有17条,通过测序比对发现其中有一个为家蚕泛素连接酶E2,还有一个为唾液酸结合免疫球蛋白样凝集素(sialic acid binding Ig-like lectin, siglecs),这是目前所有的研究中发现的唯一一种参与家蚕抗BmNPV的模式识别分子.2007年,日本学者Iwanaga等人^[29]利用SSH方法分析了家蚕细胞在感染BmNPV后的差异表达基因,发现其中有7个基因表达上调(etrA, Fasciclin I precursor, Cdk7, citrate synthase, corkscrew protein, proteasome 26S subunit和BAAB01012899)和4个表达下调基因(RNA polymerase II, Dm-LD46360 homolog, ferritin lower subunit 和 NRPG0148).Bao等人^[30,31]也利用SSH方法分析了BmNPV抗性家蚕品系KN与感性家蚕306在经口感染BmNPV 12 h后,中肠和脂肪体的差异基因表达情况,获得了一系列表达上调的基因(表S1).

2010年,Sagisaka等人^[32]利用基因芯片技术(DNA microarray)分析了家蚕细胞在感染BmNPV 12 h后的基因表达情况,发现只有少数基因出现了显著性的表达上调,分别是*BmEts*和*BmToll10-3*.2013年,Zhou等人^[33]利用芯片技术对家蚕抗BmNPV的差异表达基因进行了分析,利用已知的22987个核苷酸探针我们对添毒12 h后的家蚕BC₈和306中肠的基因表达进行了检测,结果发现92个差异基因.通过NB,BC₈和306的荧光定量PCR进一步分析,发现了10个在添毒后发生上调的基因,包括2种蛋白转运体:氨基酸转运蛋白(amino acid transporter, AAT)和钾离子偶联的氨基酸转运蛋白(K⁺-coupled amino acid transporter, KAAT).

3.2 蛋白质水平抗BmNPV相关蛋白的筛选

在对NB,BC₈和306模型的蛋白质组分析中,发现NB和BC₈添毒后的血淋巴中β-N-乙酰葡萄糖胺酶2(beta-N-acetylglucosaminidase 2, GlcNAcase 2)表达升高^[34],经过进一步酶活测定确定在添毒后的抗性家蚕中β-N-乙酰葡萄糖胺酶2活性显著升高,推测该酶的高表达干扰了BV病毒GP64蛋白的N葡聚糖糖基化,从而影响了BV的二次感染^[35].随后赵远^[36]同样

利用二维电泳的方法先后分别分析了NB, BC₈与306未添毒、添毒后24, 48以及72 h的中肠、血淋巴和脂肪体的表达差异蛋白, 进一步丰富了对参与家蚕抗BmNPV的相关蛋白的认识, 也进一步在蛋白质水平验证了mRNA水平的结果. 比如丝氨酸蛋白酶以及丝氨酸蛋白酶抑制剂在mRNA表达水平与蛋白表达水平相一致, 而这些酶与昆虫一种特异性免疫应答——酚氧化酶级联反应紧密相关, 表明这种免疫机制在家蚕抗病毒中起着重要的作用. Qin等人^[37]利用遗传学原理, 组配杂交F₁代正反交群体, 从蛋白质组学水平分析了亲本和F₁代差异表达蛋白, 发现了在正反交F₁群体中与抗性亲本NB表达同样升高的蛋白, 如caspase-1和serine proteinase等, 进一步证实细胞凋亡和酚氧化酶原级联反应在家蚕抗病毒的过程中起到一定作用.

目前各研究小组通过多种高通量组学方法获得了一些家蚕抗BmNPV的差异表达基因和蛋白, 这些不同方法获得的数据可以相互验证、相互补充. 比如无论是在蛋白水平还是在mRNA水平, 家蚕胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶(trypsin-like serine protease)、家蚕丝氨酸蛋白酶抑制剂5 (Bmserpin-5)和家蚕胰凝乳蛋白酶抑制剂CI-8A (Chymotrypsin inhibitor CI-8A)在添毒后抗性家蚕的中肠和脂肪体表达都显著性升高, 而在感性品系中则没有, 表明与这些因子相关的酚氧化酶级联途径在家蚕抗BmNPV的过程中确实起了作用; 在以有机试剂提取总蛋白的蛋白质组方法中, 对于膜蛋白的检测存在缺陷, RNA水平的检测能对差异膜蛋白的分析起到很好的补充作用, 而膜蛋白通常参与细胞活动中多种重要生物学功能. 目前筛选到的可能与家蚕抗BmNPV相关的膜蛋白, 如siglecs, 氨基酸转运蛋白等就是在RNA水平筛选到的.

由于各个研究小组所使用的抗性家蚕的材料不同, 以及研究和处理方法的不同, 得到了许多差异基因/蛋白, 下面对这些分子做一些梳理归纳(表1)和可能机制的探讨.

4 家蚕抗BmNPV的可能途径和机制

4.1 家蚕抗BmNPV的免疫途径

昆虫同脊椎动物一样拥有高效的先天免疫系统来应对外源微生物的侵染, 家蚕作为一种重要的模

式昆虫, 其对于外源微生物侵染的先天免疫情况及免疫分子也有了系统的研究, 家蚕对于外源微生物的免疫清除分为识别(recognition)、调节(modulation)、信号传导(signaling)和效应(effection)4个阶段^[38]. Iwanaga等人^[29]和Sagisaka等人^[32]在RNA水平的研究表明, 只有很少的家蚕基因的表达显著升高或降低来应答BmNPV的感染, 所以利用抗性家蚕筛选到的差异表达的基因/蛋白就显得很重要.

(i) 识别分子. 在先天免疫中凝集素家族(lectin family)的C型凝集素分子(C-type lectins)是一种免疫识别分子, 而到目前为止在家蚕抗BmNPV研究中仅发现了一种可能发挥模式识别功能的分子Siglec. Siglec属于一种I型膜蛋白家族, 其胞外区有一个Ig样结构域用来与唾液酸化的糖配体结合, 可以识别病原体. 同时其胞内区多含有免疫受体酪氨酸抑制基序(immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs, ITIM)和免疫受体酪氨酸抑制样基序, 可以通过召集或者激活酪氨酸磷酸酶SHP-1和SHP-2来释放抑制信号; 胞内不含有 ITIM结构的人siglec-14和siglec-H则可以和DAP12(death associated protein 12)结合发挥信号转导的作用^[39,40], 而家蚕死亡相关蛋白(Death associated protein, BmDAP)^[41]在添毒后的抗性家蚕中出现高表达. 另外凝集素通常被认为在体内能够直接触发酚氧化酶级联反应^[42,43].

(ii) 调节分子. 蛋白酶及相应的抑制剂广泛存在于所有生物中, 蛋白酶参与了多种蛋白水解级联反应, 是昆虫天然免疫过程中调节酚氧化酶原级联和黑化的关键分子. 蛋白酶抑制剂则负责对过度的级联反应进行调节从而避免对宿主组织的伤害, 同时蛋白酶抑制剂还能抑制入侵微生物产生的蛋白酶, 从而起到保护宿主的作用^[44]. 家蚕Trypsin-like serine protease, Bmserpin-5和家蚕Chymotrypsin inhibitor CI-8A在添毒后抗性家蚕的中肠和脂肪体表达都显著性升高, 这在RNA和蛋白水平同时得到验证. Trypsin-like serine protease是一种Clip结构域丝氨酸蛋白酶, 这类蛋白酶被认为是一种参与先天免疫的重要蛋白酶家族^[45]. 其结构特征为在N端具有一个Clip结构域, 在SP结构域的活性位点具有H, D和S三联体特征序列. 其能通过剪切羧基端的一些特殊氨基酸从而活化proPO^[46]. 一些实验室也证实在昆虫里胰凝乳蛋白酶(Chymotrypsin)也是proPO的激活因子, 所以Chymotrypsin inhibitor CI-8A也应该是家蚕针对

BmNPV的酚氧化酶原级联反应中的一个重要调节因子^[47~49]。

Serpins是一种结构高度保守的蛋白家族,它可以扮演一个自杀底物的角色将其C端的活性中心螺旋(reactive center loop, RCL)插入蛋白酶活性位点,从而引起一个构象变化形成一个共价复合体,破坏蛋白酶的活性^[50],通过抑制丝氨酸蛋白酶(Serine protease)的活化从而调节酚氧化酶级联反应。另外,丝氨酸蛋白酶1 (BmSP-1), BmSP-33, BmSERPIN-2, BmSERPIN-7, BmSERPIN-33和丝氨酸羧肽酶(serine carboxypeptidase)也有可能参与到这条级联反应的调控网络中。此外,在添毒后抗性家蚕中有一种推测的磷脂酶A2 (Predicted phospholipase A2)也出现特异性高表达,而磷脂酶A2能释放出溶血卵磷脂这种强生物去垢剂从而直接激活酚氧化酶原^[51],所以推测家蚕抗BmNPV的过程可能存在多种途径引起家蚕体内的酚氧化酶原级联反应。

(iii) 信号转导。免疫信号转导是将对外源病原体的识别信号放大并与效应因子转录激活作用相连接的过程,目前发现的昆虫对病毒的应答主要有3种信号转导通路: Toll, Imd和Jak-STAT^[52]。

对于家蚕抗BmNPV所涉及的信号转导途径有在芯片分析中发现的感染BmNPV后的细胞中, BmToll10-3的表达发生了显著的上调。哺乳动物的Toll样受体9 (Toll like receptor 9, TLR9)可以识别AcMNPV的双链DNA基因组并诱导产生抗病毒的干扰素^[53],所以猜测BmToll10-3可能也参与了家蚕抗BmNPV的信号转导过程,并通过信号转导促使抗菌肽和一些抗病毒分子的合成。Zhang等人^[54]研究发现,在细胞水平BmNPV的感染能够上调BmSTAT的表达,暗示家蚕JAK/STAT途径对BmNPV感染有应答,但是过表达BmSTAT并没能明显提高细胞对病毒的抵抗能力,这可能与其在细胞水平进行实验缺乏相关下游因子有关。

(iv) 效应因子。效应因子通常是在一系列的免疫识别、调节和信号转导后产生的能消灭侵染微生物的分子,这些分子直接作用于酚氧化酶以来的黑化作用、消灭感染的微生物、细胞凋亡以及其他免疫相关机制。

经口感染的BmNPV随食物进入蚕体,在家蚕极碱性的肠道pH中多角体解离,病毒释放并吸附到肠道柱状上皮细胞进入感染周期,所以消化液就成为

家蚕抵抗病毒感染的第一道防线。消化液内存在一些有助于消化的酶类,而这些酶可能天然就具有抗病毒活性,从20世纪80年代开始,科学家们就从家蚕的消化液内分离鉴定出了多种具有抗病毒活性的分子: 家蚕还原型辅酶Ⅱ氧化还原酶(NADPH-oxidoreductase-like, BmNOX)^[55]、家蚕脂肪酶(Bmlipase-1)^[56]、家蚕丝氨酸蛋白酶2 (BmSP-2)^[57]和多种形式红色荧光蛋白(RFPs)^[58~61]等。之前的研究证实,这些蛋白都是中肠特异性表达,在体外具有强力抗BmNPV活性,且不受病毒感染的诱导而组成性的表达。而从现有的蛋白质组和SSH结果来看,在给抗性家蚕添毒后, BmNOX, BmSP-2, Bmlipase-1和脱植基叶绿素A结合蛋白前体(chlorophyllide a binding protein)都呈现出高表达,脱植基叶绿素A结合蛋白能在光照条件下与来自桑叶中的脱植基叶绿素A合成具有强力抗病毒活性的红色荧光蛋白^[59]。Jiang等人^[62]通过转基因的方法将Bmlipase-1转入感性家蚕体内,使得转基因家蚕品种的存活率提高了33%,确定了这种内源性蛋白的抗BmNPV活性。现在普遍认为,这些分子可能通过破坏BmNPV的囊膜结构从而阻断病毒与中肠上皮细胞的吸附和融合。此外,在家蚕天然免疫中发挥重要作用的免疫球蛋白样蛋白(hemolin),血淋巴蛋白(hymolymph protein)也都在添毒后的抗性家蚕体内出现高表达。

抗菌肽是一类由昆虫脂肪体合成的对微生物包括细菌、病毒、酵母、寄生虫甚至真菌具有防卫活性的短肽,一般150~200个氨基酸左右^[63]。研究发现,鳞翅目特有的一些抗菌肽gloverin-1, 2, 3, lebocin, attacin和lysozyme在添毒后的感性和抗性家蚕中都出现高表达,添毒后6 h出现峰值,说明这些抗菌肽具有广谱抗病毒细菌活性。而gloverin-4在感性和家蚕卵巢细胞系BmN中均没有出现高表达,只在BmNPV感染后的抗性家蚕中特异性高表达,这可能是一种针对BmNPV感染的特异性抗菌肽。有研究证实, gloverin具有抗AcMNPV的活性,且这种抗病毒活性同囊泡内容物的释放有关^[7]。进一步分析发现,这些抗菌肽基因启动子区都含有保守的κB结合位点,暗示这些基因的表达都受到NF-κB信号通路的调节。NF-κB信号通路活化过程中的IKK (IκB kinase)和IκB的磷酸化以及磷酸化的IκB的降解都与泛素化途径紧密相关: IKK蛋白被泛素化后其磷酸化IκB的活性显著增加, E2泛素连接酶介导的磷酸化IκB的快速泛素

化使得I κ B蛋白被运输到26S蛋白酶体降解,“释放”出NF- κ B进入细胞核开启核内相关分子的转录翻译^[64],而在蛋白和转录水平确实发现家蚕 Ubiquitin-conjugating enzyme E2和26S蛋白酶体在添毒后的抗性家蚕体内出现了高表达,加深了对抗菌肽释放途径的了解。

酚氧化酶酶原前体 2s (Prophenoloxidase 2s, proPO 2s)在添毒后的抗性家蚕中发生高表达^[65],这是酚氧化酶原级联反应参与了抗BmNPV过程的一个直接证据。酚氧化酶酶原(Phenoloxidase, PO)通常以其非活化状态的前体酚氧化酶酶原(prophenoloxidase, proPO)的形式存在于体内,经过丝氨酸蛋白酶等的一个复杂的酶级联反应后形成PO,PO在分子氧存在的条件下把酚类氧化成醌类毒性物质,同时PO也能通过一系列反应生成黑色素一起沉积在病原物表面,通过黑化和包裹作用消灭病原微生物^[66]。

细胞凋亡是可遗传的旨在清除损伤的、有害的细胞的一种细胞程序性死亡过程,它不仅在维持机体内环境稳定、变态发育等过程中发挥重要作用,也成为机体对病毒等侵染的一种有效策略^[67]。除了前面提到过的Bms3a, Bmcaspase-1和BmDAP,还发现了一些其他在添毒后的抗性家蚕中出现高表达的细胞凋亡相关分子:家蚕细胞色素c氧化酶(Cytochrome c oxidase)和14-3-3 ζ 。BmDAP可能与siglec结合直接引起细胞凋亡^[68,69],14-3-3 ζ 已经证实能够抑制*Bcl-2*基因表达从而促进细胞色素c从线粒体到细胞质的释放,细胞色素c的释放则能够引起caspase级联反应活化效应分子caspase-1^[70]从而最终导致细胞凋亡事件^[71],这些涉及抗病毒的细胞凋亡相关分子很有可能引起了一种主动的细胞凋亡,用以抑制病毒的扩散和复制。

自由基或自由氧簇,包括超氧离子(O²⁻)、氢氧根离子(OH⁻)和过氧化氢(H₂O₂),是体内清除入侵的病原微生物的一种重要免疫防御措施^[72]。硫醇抗氧化酶(thiol peroxidase, TP)能够清除过剩的自由基,从而防止宿主受到过剩自由基攻击而损伤^[73,74],研究发现其在添毒后的抗性和感性家蚕体内都出现高表达。在SSH中发现的谷胱甘肽转移酶(glutathione S-transferase, GST)也属于一种酶促抗氧化系统的一员,能够将H₂O₂转换为水和氧气^[75],暗示自由基反应在BmNPV感染家蚕时可能被激发,参与清除病毒的感染。

4.2 其他途径和分子

(i) 热休克蛋白。HSPs是生物体受到物理、化学、生物、精神等刺激时发生应激反应而合成的一类高度保守的蛋白质,病原微生物的侵染也能诱导HSPs的合成。作为一种分子伴侣,HSPs不仅可以在细胞应激状态下稳定细胞结构,维护细胞的正常生理功能,提高机体相应的适应能力,而且还参与一些重要的细胞生理活动,如蛋白质转位、折叠和降解。昆虫的HSPs主要分成3个家族:小热休克蛋白家族(Small HSPs, sHSPs)、HSP70和HSP90家族^[76]。BmNPV感染家蚕后,HSP类似蛋白(heat shock cognate protein),HSC70蛋白(HSP70 cognate, HSC70),HSP90和HSC70/HSP90组织蛋白(hsc70/hsp90-organizing protein, HOP)在感性和抗性家蚕体内都能出现高表达,HOP是一种不仅能与HSC70/90直接作用,成为共分子伴侣发挥作用,而且还能够调节HSP的分子伴侣活性的蛋白^[77],推测病毒可能利用这些蛋白进行转位折叠从而完成病毒的侵染周期。其中值得引起注意的是一种小热休克蛋白HSP19.5,在感染BmNPV的家蚕细胞系中不表达,只特异的在添毒后的抗性家蚕中高表达,表明它可能参与了家蚕特异性抗BmNPV的免疫应答反应。在对人类的研究中也发现一种小热休克蛋白HSP27被证实具有抗病毒活性,能够在T淋巴细胞中抑制病毒的复制^[78]。HSPs还有一个很重要的功能就是稳定微管和微丝结构,这让人联想到组学研究中在抗性添毒个体中高表达的各种肌动蛋白及与之相关的蛋白。

(ii) 肌动蛋白及相关蛋白。研究发现,肌动蛋白结合蛋白(actin binding protein)、家蚕肌动蛋白A3(Bmactin A3)、家蚕转凝蛋白(Bmtransgelin)和肌动蛋白解聚蛋白(actin-depolymerizing factor)在添毒后的抗性家蚕中会出现高表达,表明肌动蛋白和相关的一些分子都参与到了抗BmNPV的过程。AcMNPV在侵染细胞后,其p78/83蛋白可以和Arp2/3复合体相互作用加速病毒通过核孔复合体进入细胞核并开始早期病毒蛋白的表达^[79];p78/83蛋白也能促使Arp2/3复合体转入细胞核诱导核内actin的多聚化,这对于后代病毒粒子的产生和释放是必须的^[80],而AcMNPV的VP80蛋白也能在此过程中与actin相互作用而使组装好的病毒粒子移动到核外周最终形成BV和ODV^[81]。Chen等人^[82]研究表明,BmNPV的ORF67蛋

白与Bmactin A3有直接相互作用,而FDD-PCR分析中发现BmSOP2在感性家蚕中出现高表达^[28],BmSOP2就是Arp2/3复合体的一个主要成分,表明BmNPV与AcMNPV有着类似的入核、复制机制。有研究表明,actin的过表达能够干扰AcMNPV多角体的合成以及病毒的组装^[83],这有可能帮助解释肌动蛋白甚至热休克蛋白参与的这一抗病毒过程,但这个过程是如何引发的以及具体的抗病毒机制仍旧需要进一步研究。

(iii) 病毒侵染过程中的细胞内环境。核性多角体病毒间虽然具有很高的相似性,但是也显示出极高的宿主特异性。家蚕的BmN细胞系在遭到AcMNPV, SeMNPV, HycuMNPV和SpltMNPV感染时就会导致rRNA的降解从而引起总蛋白合成的关闭,在其他昆虫细胞系没有这种情况^[84,85],所以认为家蚕进化出一种独特的抗病毒的机制。根据已有的结果看,BmNPV感染抗性家蚕后一些核糖体蛋白出现高表达,表明抗性家蚕应该没有采用这一策略来抵抗BmNPV的感染;如果用BmNPV去感染Sf9或者High Five细胞,发现家蚕BV病毒也不能够进入这些细胞核,可能同这些细胞系的内环境有关,降低了BV病毒GP64的膜融合活性导致BV不能进入细胞核从而导致感染失败^[85]。在前期的SSH和蛋白质组分析中发现一种同pH相关的V-ATPase在抗性家蚕出现高表达^[86],通过进一步的分析发现过表达V-ATPase c亚基的BmN细胞确实增加了抑制BmNPV复制的能力,而且此时过表达的C亚基显示在细胞质内一些特殊的结构上,且此时V-ATPase酶的酶活增加^[87]。联系到芯片分析发现的依赖于V-ATPase活性的两个转运体蛋白AAT和KAAT^[88,89],推测很有可能是内体上高表达的V-ATPase促使酶活增加导致内体pH、转运蛋白等一系列的变化,从而使得病毒不能正常地脱壳或者进入细胞核,最终引起病毒复制的失败。而在抗性家蚕添毒后高表达的Rab7很有可能是引起V-ATPase表达变化的信号分子^[90,91]。

5 家蚕抗BmNPV的RNAi研究

家蚕基因干涉和转基因技术日渐成熟,利用这种方法去解决家蚕核型多角体病毒病也成为一种可能。2004年Isobe^[92]首次将能抑制BmNPV *lef-1*的片段转入家蚕基因组使得病毒的滴度在转基因家蚕体内得到很好的控制,虽然最终家蚕还是感染病毒死亡,

但是给出了一个解决家蚕抗BmNPV新的思路。Kanginakudru等^[93]将BmNPV *ie-1*作为靶抑制基因构建了转基因家蚕,能达到40%的保护效果。Jiang等人^[94]将病毒*ie-1*, *helicase*, *gp64*和*vp39*分别作为靶抑制基因进行了转基因家蚕构建,结果发现,抑制了BmNPV *ie-1*的转基因家蚕表现出最好的抗病毒效应。Xue等人^[95]也在细胞水平构建过能够同时抑制BmNPV *ie-1*和*lef-1*的稳转细胞株,也表现出抗病毒的特性。Jiang等人^[62]通过分别转入家蚕内源性的抗病毒分子Bmlipase-1和美国白蛾和性多角体病毒(*Hyphantria cunea* NPV)*hycu-ep32*基因^[96],提高了家蚕对BmNPV的抗性。这些研究都为最终解决家蚕抗BmNPV的问题进行了很好的尝试。

6 结论与展望

目前对于家蚕抗BmNPV的遗传规律分析,各个研究小组的结论不甚相同,但是普遍认为存在主效基因的控制。2013年,陈克平研究组对早期筛选到的BmNPV高抗品系NB进行进一步研究发现,该品系对于抗BmNPV性状处于杂合状态,通过10多代的抗BmNPV系统筛选,获得一个抗BmNPV新品种,遗传分析发现表现出单基因控制的规律^[25]。2007年Asser-Kaise等人^[97]在研究苹果树蛾(*Cydia pomonella* L.)对杆状病毒昆虫杀虫剂的抗性时发现其也是由显性单基因控制,并通过图位克隆的方法将这个基因定位在Z染色体上。Yao等人^[98]利用NB品系成功育成了家蚕抗BmNPV的新产品种,并开始在安徽省部分地区进行实验饲养。2014年中国农业科学院蚕业研究所的科研人员也利用抗性家蚕品种N和传统育种方法成功培育出具有BmNPV高度抵抗性的夏秋用家蚕新品种华康2号(HK2)。

寻找抗性基因的一个有效方法是通过图位克隆的办法,目前确认的与抗BmNPV连锁的分子标记只有陈克平研究组筛选到的AY380833,这个标记位于一段768 bp的序列中,但是没有染色体定位信息。通过染色体步移技术在NB和306基因组中进行双向扩增,获得了一个近20 kb大小的片段,但仍旧没能与已知参考基因组拼接上(数据未发布)。虽然目前家蚕的精细基因组图谱已经公布,但是仍旧存在一些间隙(gap),所以这个标记可能就处于这种间隙中,当然也有可能由于NB品种的特殊性,与参考基因组存在差异而不能将这个标记在现有基因组数据库中定位。

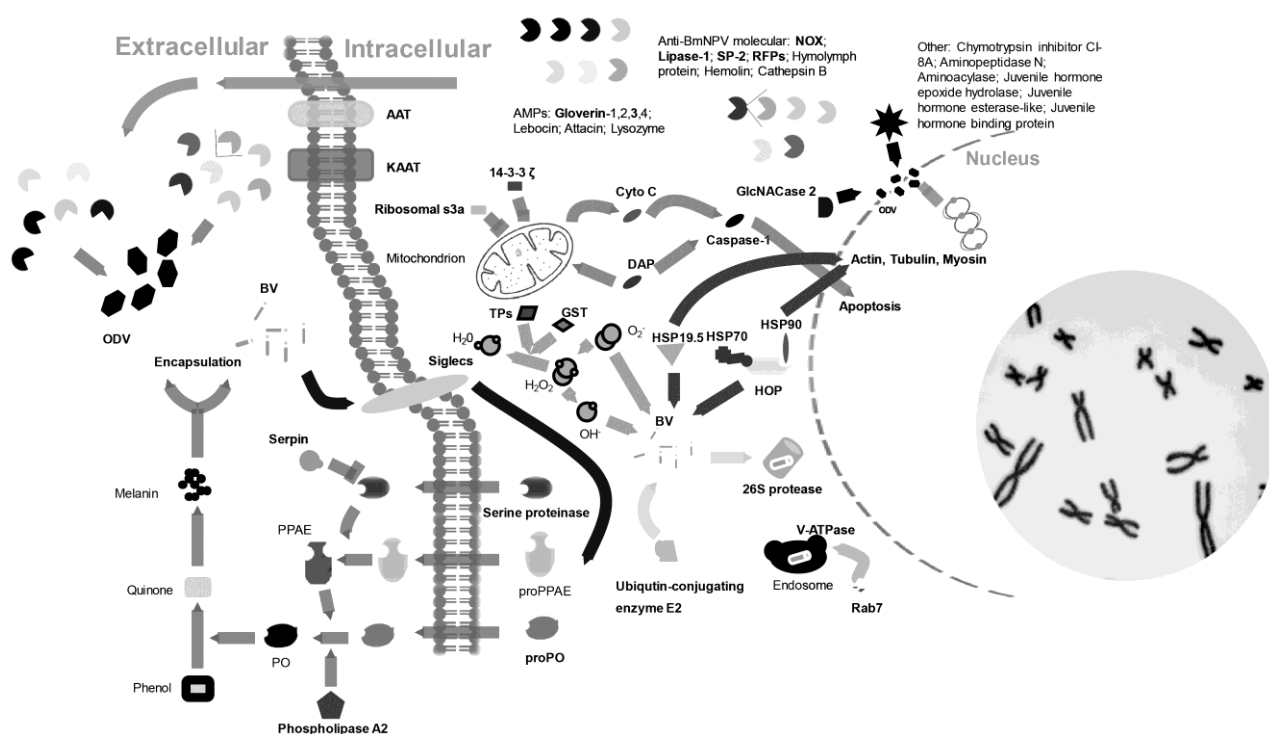


图1 可能参与家蚕抗 BmNPV 的分子和途径的概略图

Figure 1 A schematic model of molecules and pathways involved in anti-BmNPV

但是随着第2代甚至第3代测序技术的发展, 利用高通量测序技术进行SNP标记的筛选能对图位克隆寻找抗性基因带来巨大帮助。

宿主具有多种策略来对入侵的病毒进行抵抗, 而在长期的进化过程中, 病毒也进化出一些方法来躲避宿主免疫系统的围剿: 在对病毒泛素的研究中发现, 杆状病毒会利用自身编码的泛素蛋白去给宿主的一些抗菌肽贴上标签(未发布数据)。针对宿主的细胞凋亡, 病毒会利用自身编码的凋亡抑制因子(IAP)^[99]抑制宿主的细胞凋亡过程, 从而有利于病毒的复制和繁殖^[100]。所以上面分析的某些免疫途径和分子很有可能对于抵抗BmNPV的侵染是无效的, 这种抵抗是一种相互和动态的过程。

本文对FDD-PCR, SSH, 芯片分析以及蛋白质组方法得出的数据进行了分析, 探讨了参与家蚕抗BmNPV的免疫途径和相关分子, 对抗菌肽、酚氧化酶级联、细胞凋亡等可能机制有了一定认识, 但对于热休克蛋白, 肌动蛋白等等途径和分子是怎样参与到抗BmNPV的过程中还不了解。同时组学分析中还有一些数据目前还不能通过数据库鉴定, 有一些能够鉴定但是功能还未知, 这些信息还有待于数据库信息的进一步完善以及相关功能实验的验证来加深对家蚕抗BmNPV的认识, 相信转基因技术结合新出现的CRISPER/Cas9, TALEN技术对目的基因进行敲除、干涉, 会对抗病毒分子的功能验证和作用机制的研究带来帮助。

参考文献

- 1 Vernick K D, Fujioka H, Seeley D C, et al. Plasmodium gallinaceum: A refractory mechanism of ookinete killing in the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Exper Parasitol*, 1995, 80: 583–595
- 2 Lehane M. Peritrophic matrix structure and function. *Annu Rev Entomol*, 1997, 42: 525–550
- 3 Tzou P, Ohresser S, Ferrandon D, et al. Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia. *Immunity*, 2000, 13: 737–748

- 4 Levashina E A, Moita L F, Blandin S, et al. Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles Gambiae*. *Cell*, 2001, 104: 709–718
- 5 Ligoxygakis P, Pelte N, Ji C, et al. A serpin mutant links toll activation to melanization in the host defence of *Drosophila*. *EMBO J*, 2002, 21: 6330–6337
- 6 Meister M, Lagueux M. *Drosophila* blood cells. *Cell Microbiol*, 2003, 5: 573–580
- 7 Moreno-Habel D A, Biglang-awa I M, Dulce A, et al. Inactivation of the budded virus of *Autographa Californica* M nucleopolyhedrovirus by gloverin. *J Invertebrate Pathol*, 2012, 110: 92–101
- 8 Xiang Z H. Genetics and breeding for *Bombyx mori* (in Chinese). Beijing: China Agriculture Press, 1994 [向仲怀. 家蚕遗传育种学. 北京: 中国农业出版社, 1994]
- 9 Xia Q Y, Zhou Z, Lu C, et al. A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science*, 2004, 306: 1937–1940
- 10 Mita K, Kasahara M, Sasaki S, et al. The genome sequence of silkworm, *Bombyx mori*. *DNA Res*, 2004, 11: 27–35
- 11 Lü H S. Principles of Insect Immunology (in Chinese). Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 2008 [吕鸿声. 昆虫免疫学原理. 上海: 上海科学技术出版社, 2008]
- 12 Watanabe H. Resistance of the silkworm, *Bombyx mori*, to viral infections. *Agricult Ecosyst Environ*, 1986, 15: 131–139
- 13 Watanabe H, Aruga T. The effect of moult and the developmnt of nuclear polyhedrosis in the silkworm, *Bombyx mori* L. *J Insect Pathol*, 1971, 4: 72–76
- 14 Aratake Y. The different resistance between various *Bombyx mori* strains to BmNPV (in Chinese). *Jap J Sericul Sci*, 1973, 42: 230–238 [荒武义信. 家蚕不同品种抗NPV性能的差异. 日本蚕丝学杂志, 1973, 42: 230–238]
- 15 Zhang Y N, Liu S X, Huo Y M et al. Resistance identification of 6 kinds of *Bombyx mori* diseases in various silkworm strains (in Chinese). *Sci Sericul*, 1982, 8: 94–97 [张远能, 刘仕贤, 霍用梅, 等. 若干家蚕品种对六种主要蚕病的抗性鉴定. 蚕业科学, 1982, 8: 94–97]
- 16 Chen K P, Lin C Q, Wu D X, et al. Resistance of preservative *Bombyx mori* strains to nuclear polyhedrosis virus (in Chinese). *Sci Sericul*, 1991, 17: 45–46 [陈克平, 林昌麒, 吴冬秀, 等. 家蚕保存种对核型多角体病的抗性. 蚕业科学, 1991, 17: 45–46]
- 17 Chen K P, Lin C Q, Yao Q. Studies on the resistance to nuclear polyhedrosis virus (NPV) and its inheritance law in silkworm *Bombyx mori* (in Chinese). *Sci Sericul*, 1996, 22: 160–164 [陈克平, 林昌麒, 姚勤. 家蚕对核多角体病的抗性及其遗传规律的研究. 蚕业科学, 1996, 22: 160–164]
- 18 Yao Q, Gao L, Chen K P, et al. Detection of proliferation of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus in its host by fluorescence quantitative PCR. *Acta Entomol Sin*, 2005, 48: 871
- 19 Watanabe H. Genetic resistance of the silkworm, *Bombyx mori* to viral diseases. *Curr Sci*, 2002, 83: 439–446
- 20 Zafar B, Shabir A W, Malik M A, et al. A review: Disease resistance in mulberry silkworm *Bombyx mori* L. *Asian J Sci Technol*, 2013, 4: 157–166
- 21 Meng Z Q. Studies on resistant heredity law of *Bombyx mori* to *B. mori* nucleopolyhedrovirus (in Chinese). *Sci Sericul*, 1982, 8:133–138 [孟智启. 家蚕对核型多角体病毒病抵抗性遗传规律的研究. 蚕业科学, 1982, 8: 133–138]
- 22 Feng F, Hu P, Chen K P. Progress of antiviral mechanisms in the mulberry silkworm: A review. *African J Microbiol Res*, 2013, 7: 1173–1178
- 23 Yao Q, Li M, Wang Y, et al. Screening of molecular markers for NPV resistance in *Bombyx mori* L. (Lep., *Bombycidae*). *J Appl Entomol*, 2003, 127: 134–136
- 24 Liu X Y, Yao Q, Chen K P. Studies on RAPD markers for NPV resistance in silkworm (*Bombyx mori*) using RAPD method. *Jiangsu Univ (Nati Sci Ed)*, 2004, 5: 17–20
- 25 Feng F, Fu J, Hu P, et al. Genetic analysis of baculovirus resistance in lepidopteran model insect *Bombyx mori* L. *African J Biotechnol*, 2012, 11: 14417–14421
- 26 Xu J P. Studying of BmNPV resistance differential display in *Bombyx mori* and related novel genes *Bm3a* and *Bmsop2* (in Chinese). Doctor Dissertation. Zhenjiang: Jiangsu Universtiy, 2005 [徐家萍. 家蚕对BmNPV抗性差异表达及相关新基因*Bms3a*和*Bmsop2*的研究. 博士学位论文. 镇江: 江苏大学, 2005]
- 27 Xu J P, Chen K P. Identification and characterization of Bms3a in *Bombyx mori* L. *African J Biotechnol*, 2008, 7: 3424–3430
- 28 Xu J P, Chen K P, Yao Q, et al. Identification and characterization of an NPV infection-related gene Bmsop2 in *Bombyx mori* L. *J Appl Entomol*, 2005, 129: 425–431
- 29 Iwanaga M, Shimada T, Kobayashi M, et al. Identification of differentially expressed host genes in *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus infected cells by using subtractive hybridization. *Appl Entomol Zool*, 2007, 42: 151–159

- 30 Bao Y Y, Tang X D, Lü Z Y, et al. Gene expression profiling of resistant and susceptible *Bombyx mori* strains reveals nucleopolyhedrovirus-associated variations in host gene transcript levels. *Genomics*, 2009, 94: 138–145
- 31 Bao Y Y, Lü Z Y, Liu Z B, et al. Comparative analysis of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus responsive genes in fat body and haemocyte of *B. mori* resistant and susceptible strains. *Insect Mol Biol*, 2010, 19: 347–358
- 32 Sagisaka A, Fujita K, Nakamura Y, et al. Genome-wide analysis of host gene expression in the silkworm cells infected with *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Virus Res*, 2010, 147: 166–175
- 33 Zhou Y, Gao L, Shi H, et al. Microarray analysis of gene expression profile in resistant and susceptible *Bombyx mori* strains reveals resistance-related genes to nucleopolyhedrovirus. *Genomics*, 2013, 101: 256–262
- 34 Liu X Y. *Bombyx mori* L. nucleopolyhedrovirus (BmNPV) and proteome analysis of silkworm proteins related to BmNPV infection resistance (in Chinese). Doctor Dissertation. Zhenjiang: Jiangsu University, 2009 [刘晓勇. 家蚕核型多角体病毒与家蚕抗病毒相关的蛋白质组分析. 博士学位论文. 镇江: 江苏大学, 2009]
- 35 Liu X Y, Yao Q, Wang Y, et al. Proteomic analysis of nucleopolyhedrovirus infection resistance in the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: *Bombycidae*). *J Invertebrate Pathol*, 2010, 105: 84–90
- 36 Zhao Y. Molecular tagging and mapping in *Bombyx mori* against BmNPV and the differential protein expression profiling in the midgut tissue of silkworm infected by BmNPV (in Chinese). Doctor Dissertation. Zhenjiang: Jiangsu University, 2007 [赵远. 家蚕抗核型多角体病毒病的微卫星分子标记筛选、定位及其病毒侵染家蚕中肠组织的差异蛋白质表达图谱研究. 博士学位论文. 镇江: 江苏大学, 2007]
- 37 Qin L G, Xia H C, Shi H F, et al. Comparative proteomic analysis reveals that caspase-1 and serine protease may be involved in silkworm resistance to *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *J Proteom*, 2012, 75: 3630–3638
- 38 Tanaka H, Ishibashi J, Fujita K, et al. A genome-wide analysis of genes and gene families involved in innate immunity of *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2008, 38: 1087–1110
- 39 Angata T, Hayakawa T, Yamanaka M, et al. Discovery of siglec-14, a novel sialic acid receptor undergoing concerted evolution with siglec-5 in primates. *FASEB J*, 2006, 20: 1964–1973
- 40 Blasius A L, Colonna M. Sampling and signaling in plasmacytoid dendritic cells: The potential roles of siglec-H. *Trends Immunol*, 2006, 27: 255–260
- 41 Chi G, Gao L, Chen K P, et al. Preliminary characterization of a death-related gene in silkworm *Bombyx mori*. *African J Biotechnol*, 2009, 8: 2118–2124
- 42 Crocker P R, Paulson J C, Varki A. Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7: 255–266
- 43 Varki A, Angata T. Siglecs—the major subfamily of I-type lectins. *Glycobiology*, 2006, 16: 1R–27R
- 44 Tassanakajon A, Somboonwiwat K, Supungul P, et al. Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. *Fish Shellfish Immunol*, 2013, 34: 954–967
- 45 Jiang H, Kanost M R. The clip-domain family of serine proteinases in arthropods. *Insect Biochem Mol Biol*, 2000, 30: 95–105
- 46 Hedstrom L. Serine protease mechanism and specificity. *Chem Rev*, 2002, 102: 4501–4524
- 47 Sugumaran M, Saul S J, Ramesh N. Endogenous protease inhibitors prevent undesired activation of prophenolase in insect hemolymph. *Biochem Biophys Res Commun*, 1985, 132: 1124–1129
- 48 Saul S J, Sugumaran M. Protease mediated prophenoloxidase activation in the hemolymph of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Arch Insect Biochem Physiol*, 1987, 5: 1–11
- 49 Adamo S A. Estimating disease resistance in insects: Phenoloxidase and lysozyme-like activity and disease resistance in the cricket *Gryllus Texensis*. *J Insect Physiol*, 2004, 50: 209–216
- 50 Huntington J. Serpin structure, function and dysfunction. *J Thrombosis Haemostasis*, 2011, 9: 26–34
- 51 Shrestha S, Kim Y. Factors affecting the activation of hemolymph prophenoloxidase of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: *Noctuidae*). *J Asia-Pacific Entomol*, 2007, 10: 131–135
- 52 Bangham J, Jiggins F, Lemaitre B. Insect immunity: The post-genomic era. *Immunity*, 2006, 25: 1–5
- 53 Abe T, Hemmi H, Miyamoto H, et al. Involvement of the Toll-like receptor 9 signaling pathway in the induction of innate immunity by baculovirus. *J Virol*, 2005, 79: 2847–2858
- 54 Zhang X L, Ma H Y, Cao G L, et al. A preliminary study on the response of JAK/STAT pathway to *Bombyx mori* baculovirus infection (in Chinese). *Sci Sericul*, 2011, 4: 682–687 [张晓丽, 马焕艳, 曹广力, 等. JAK/STAT途径对家蚕杆状病毒感染应答的初探. 蚕业科学, 2011, 4: 682–687]
- 55 Selot R, Kumar V, Shukla S, et al. Identification of a soluble NADPH oxidoreductase (BmNOX) with antiviral activities in the gut juice of *bombyx mori*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2007, 71: 200–205

- 56 Ponnuvel K M, Nakazawa H, Furukawa S, et al. A lipase isolated from the silkworm *Bombyx mori* shows antiviral activity against nucleopolyhedrovirus. *J Virol*, 2003, 77: 10725–10729
- 57 Nakazawa H, Tsuneishi E, Ponnuvel K M, et al. Antiviral activity of a serine protease from the digestive juice of *Bombyx mori* larvae against nucleopolyhedrovirus. *Virology*, 2004, 321: 154–162
- 58 Hayashiya K, Nishida J, Uchida Y. The mechanism of formation of the red fluorescent protein in the digestive juice of silkworm larvae: The formation of chlorophyllide-a. *Jpn J Appl Entomol Zool*, 1976, 20: 37–43
- 59 Hayashiya K. Red fluorescent protein in the digestive juice of the silkworm larvae fed on host-plant mulberry leaves. *Entomol Exper Appl*, 1978, 24: 428–436
- 60 Sunagar S G, Lakkappan V J, Ingallhalli S S, et al. Characterization of the photochromic pigments in red fluorescent proteins purified from the gut juice of the silkworm *Bombyx mori* L. *Photochem Photobiol*, 2008, 84: 1440–1444
- 61 Sunagar S G, Savanurmth C J, Hinchigeri S B. The profiles of red fluorescent proteins with antinucleopolyhedrovirus activity in races of the silkworm *Bombyx mori*. *J Insect Physiol*, 2011, 57: 1707–1714
- 62 Jiang L, Wang G, Cheng T, et al. Resistance to *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus via overexpression of an endogenous antiviral gene in transgenic silkworms. *Arch Virol*, 2012, 157: 1323–1328
- 63 Hancock R E, Diamond G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol*, 2000, 8: 402–410
- 64 Bhoj V G, Chen Z J. Ubiquitylation in innate and adaptive immunity. *Nature*, 2009, 458: 430–437
- 65 Cai K Y, Chen K P, Liu X Y, et al. Differential expression of haemolymph proteome of resistant strain and susceptible strain for BmNPV in *Bombyx mori* L (in Chinese). *Chin J Biotech*, 2008, 24: 285–290 [蔡克亚, 陈克平, 刘晓勇, 等. 家蚕抗 BmNPV 品系与感性品系血淋巴液蛋白质组的差异分析. *生物工程学报*, 2008, 24: 285–290]
- 66 González-Santoyo I, Córdoba-Aguilar A. Phenoloxidase: A key component of the insect immune system. *Entomol Exper Appl*, 2012, 142: 1–16
- 67 Portt L, Norman G, Clapp C, et al. Anti-apoptosis and cell survival: A review. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2011, 1813: 238–259
- 68 Inbal B, Shani G, Cohen O, et al. Death-associated protein kinase-related protein 1, a novel serine/threonine kinase involved in apoptosis. *Mol Cell Biol*, 2000, 20: 1044–1054
- 69 Kawai T, Nomura F, Hoshino K, et al. Death-associated protein kinase 2 is a new calcium/calmodulin-dependent protein kinase that signals apoptosis through its catalytic activity. *Oncogene*, 1999, 18: 3471–3480
- 70 Morishima N, Okano K, Shibata T, et al. Homologous p35 proteins of baculoviruses show distinctive anti-apoptotic activities which correlate with the apoptosis-inducing activity of each virus. *FEBS Lett*, 1998, 427: 144–148
- 71 Rosenquist M. 14-3-3 proteins in apoptosis. *Bra J Med Biol Res*, 2003, 36: 403–408
- 72 Bachere E, Mialhe E, Noel D, et al. Knowledge and research prospects in marine mollusc and crustacean immunology. *Aquaculture*, 1995, 132: 17–32
- 73 Peskin A V, Low F M, Paton L N, et al. The high reactivity of peroxiredoxin 2 with H₂O₂ is not reflected in its reaction with other oxidants and thiol reagents. *J Biol Chem*, 2007, 282: 11885–11892
- 74 Rhee S G, Chae H Z, Kim K. Peroxiredoxins: A historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Rad Biol Med*, 2005, 38: 1543–1552
- 75 Yin Z, Ivanov V N, Habelhah H, et al. Glutathione s-transferase P elicits protection against H₂O₂-induced cell death via coordinated regulation of stress kinases. *Cancer Res*, 2000, 60: 4053–4057
- 76 Tachibana S I, Numata H, Goto S G. Gene expression of heat-shock proteins (*hsp23*, *hsp70* and *hsp90*) during and after larval diapause in the blow fly *Lucilia sericata*. *J Insect Physiol*, 2005, 51: 641–647
- 77 Chen S, Smith D F. HOP as an adaptor in the heat shock protein 70 (HSP70) and HSP90 chaperone machinery. *J Biol Chem*, 1998, 273: 35194–35200
- 78 Liang D, Benko Z, Agbottah E, et al. Anti-VPR activities of heat shock protein 27. *Mol Med*, 2007, 13: 229
- 79 Goley E D, Ohkawa T, Mancuso J, et al. Dynamic nuclear actin assembly by ARP2/3 complex and a baculovirus WASP-like protein. *Science*, 2006, 314: 464–467
- 80 Ohkawa T, Volkman L E, Welch M D. Actin-based motility drives baculovirus transit to the nucleus and cell surface. *J Cell Biol*, 2010, 190: 187–195
- 81 Marek M, Merten O W, Galibert L, et al. Baculovirus VP80 protein and the F-actin cytoskeleton interact and connect the viral replication factory with the nuclear periphery. *J Virol*, 2011, 85: 5350–5362

- 82 Chen H Q, Chen K P, Yao Q, et al. Characterization of a late gene, orf67 from *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. FEBS Lett, 2007, 581: 5836–5842
- 83 Volkman L, Storm K, Aivazachvili V, et al. Overexpression of actin in acmnpv-infected cells interferes with polyhedrin synthesis and polyhedra formation. Virology, 1996, 225: 369–376
- 84 Du X, Thiem S M. Responses of insect cells to baculovirus infection: Protein synthesis shutdown and apoptosis. J Virol, 1997, 71: 7866–7872
- 85 Hamajima R, Ito Y, Ichikawa H, et al. Degradation of rRNA in Bm-N cells from the silkworm *Bombyx mori* during abortive infection with heterologous nucleopolyhedroviruses. J General Virol, 2013, 94: 2102–2111
- 86 Lü P, Chen K, Yao Q, et al. Expression and localization of *Bombyx mori* V-ATPase 16 kDa subunit C. Zeitschrift für Naturforschung, 2010, 65: 119–126
- 87 Lü P, Xia H, Gao L, et al. V-ATPase is involved in silkworm defense response against *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. PLoS One, 2013, 8: e64962
- 88 Lepier A, Azuma M, Harvey W R, et al. K^+/H^+ antiport in the tobacco hornworm midgut: The K^+ -transporting component of the K^+ pump. J Exper Biol, 1994, 196: 361–373
- 89 Castagna M, Shayakul C, Trotti D, et al. Cloning and characterization of a potassium-coupled amino acid transporter. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 5395–5400
- 90 Vitelli R, Santillo M, Lattero D, et al. Role of the small GTPase Rab7 in the late endocytic pathway. J Biol Chem, 1997, 272: 4391–4397
- 91 Vonderheit A, Helenius A. Rab7 associates with early endosomes to mediate sorting and transport of semliki forest virus to late endosomes. PLoS Biol, 2005, 3: e233
- 92 Isobe R, Kojima K, Matsuyama T, et al. Use of RNAi technology to confer enhanced resistance to BmNPV on transgenic silkworms. Arch Virol, 2004, 149: 1931–1940
- 93 Kanginakudru S, Royer C, Edupalli S, et al. Targeting ie-1 gene by RNAi induces baculoviral resistance in lepidopteran cell lines and in transgenic silkworms. Insect Mol Biol, 2007, 16: 635–644
- 94 Jiang L, Zhao P, Wang G, et al. Comparison of factors that may affect the inhibitory efficacy of transgenic RNAi targeting of baculoviral genes in silkworm, *Bombyx mori*. Antivir Res, 2012, 97: 255–263
- 95 Xue R Y, Cao G L, Wang C L, et al. Inhibitory effects of cells transformed and transfected with ie-1 and lef-1 dsRNA expression elements on proliferation of Bombyx mori nucleopolyhedrovirus. Sci Sericul, 2008, 34: 250–254 [薛仁宇, 曹广力, 王崇龙, 等. *ie-1*和*lef-1*基因 dsRNA表达元件转染及转化细胞对家蚕核型多角体病毒增殖的抑制. 蚕业科学, 2008, 2: 250–254]
- 96 Jiang L, Cheng T, Zhao P, et al. Resistance to BmNPV via overexpression of an exogenous gene controlled by an inducible promoter and enhancer in transgenic silkworm, *Bombyx mori*. PLoS One, 2012, 7: e41838
- 97 Asser-Kaiser S, Fritsch E, Undorf-Spahn K, et al. Rapid emergence of baculovirus resistance in codling moth due to dominant, sex-linked inheritance. Science, 2007, 317: 1916–1918
- 98 Yao Q, Liu X Y, Tang X D, et al. Molecular markers-assisted breeding for silkworm resistant variety to BmNPV. Mol Plant Breed, 2005, 3: 537–542
- 99 Okano K, Shimada T, Mita K, et al. Comparative expressed-sequence-tag analysis of differential gene expression profiles in BmNPV-infected BmN cells. Virology, 2001, 282: 348–356
- 100 Schwarz R, Escasa S, Arif B. Inhibition of programmed cell death by baculoviruses: Potential in pest-management strategies. In: Insecticides Design Using Advanced Technologies. Heidelberg: Springer, 2007. 217–233

Progress in understanding resistance of *Bombyx mori* to nucleopolyhedrovirus

LÜ Peng¹, PAN Ye^{1,2}, WANG Peng¹, ZHOU Yang¹, MA ShangShang¹, YAO Qin¹ & CHEN KePing^{1,2}

¹ Institute of Life Sciences, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China;

² School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China

Bombyx mori nucleopolyhedrovirus (BmNPV) causes an important viral infectious disease in sericulture, and is responsible for 60% of the total cocoon production loss caused by various silkworm diseases. Horizontal resistance of silkworms to BmNPV is well known but we have identified a local line, named NB, whose LD₅₀ is more than 1000 times higher than that of susceptible strains, and that has the highest resistance to BmNPV out of 344 silkworm lines. Through 10 years of crossbreeding and systematic selective breeding using line NB, we have constructed a commercial variety of *Bombyx mori* that is highly resistant to BmNPV. These genetic studies indicate the existence of BmNPV resistance genes in silkworm, and a pair of dominant genes has been implicated. Recently, we constructed a BmNPV-resistant near-isogenic line (NIL) via interspecific hybridization and backcrossing. Using this model and molecular techniques, such as fluorescent differential display-PCR, suppression subtractive hybridization, DNA microarray and proteomic analyses, we have identified molecules involved in BmNPV resistance. This review summarizes the current research status of BmNPV resistance in silkworms and discusses molecules involved in anti-BmNPV processes.

***Bombyx mori*, nucleopolyhedrovirus, resistance, genetic analysis, SSH, proteomic, immune response**

doi: 10.1360/N972014-00228

补充材料

表 S1 涉及抗 BmNPV 免疫反应的主要基因或蛋白

本文以上补充材料见网络版 csb.scichina.com. 补充材料为作者提供的原始数据, 作者对其学术质量和内容负责.