

王 欣, 范洋洋, 陈 晨, 等. 家蚕 bmo-miR-34 对 *BmE74* 基因表达的调控[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(1): 51-57.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2016.01.008

家蚕 bmo-miR-34 对 *BmE74* 基因表达的调控

王 欣^{1,2}, 范洋洋^{1,2}, 陈 晨^{1,2}, 谢雨辰^{1,2}, 蒋 涛^{1,2}, 汪生鹏^{1,2}, 沈兴家^{1,2}

(1. 江苏科技大学生物技术学院江苏省蚕桑生物学与生物技术重点实验室, 江苏 镇江 212018; 2. 中国农业科学院蚕业研究所, 江苏 镇江 212018)

摘要: 为了研究家蚕 bmo-miR-34 (一类高度保守的 miRNA) 对 *E74* 基因 (*BmE74*) 的表达调控作用, 首先利用生物信息学软件 RNAhybrid 和 RNA22 进行结合位点预测, 然后从家蚕丝腺组织中克隆了 bmo-miR-34 前体序列, 分别构建 bmo-miR-34 表达载体和靶基因 *BmE74* 3'UTR 重组表达载体, 利用双报告基因荧光检测系统在细胞水平研究 bmo-miR-34 对 *BmE74* 基因的转录后调控作用。生物信息学预测结果表明, *BmE74* 3'UTR 具有 bmo-miR-34 潜在结合位点; 体外转染试验结果显示, 与对照相比, 转染 bmo-miR-34 重组质粒的细胞荧光素酶活性极显著下调 ($P < 0.01$), 但是当加入人工合成的 bmo-miR-34 抑制物后荧光素酶活性显著上调 ($P < 0.01$)。说明 bmo-miR-34 对 *BmE74* 的转录后表达具有抑制作用。

关键词: miR-34; 家蚕; *BmE74* 基因; 表达调控

中图分类号: S881.2; Q78

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2016)01-0051-07

Expression regulation of *BmE74* gene by bmo-miR-34 in *Bombyx mori*

WANG Xin^{1,2}, FAN Yang-yang^{1,2}, CHEN Chen^{1,2}, XIE Yu-chen^{1,2}, JIANG Tao^{1,2}, WANG Sheng-peng^{1,2}, SHEN Xing-jia^{1,2}

(1. Jiangsu Key Laboratory of Sericultural Biology and Biotechnology, School of Biotechnology, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang 212018, China; 2. Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018, China)

Abstract: In order to study the expression regulation of bmo-miR-34 (a highly conserved miRNA) on *BmE74* gene in *Bombyx mori*, bioinformatics softwares RNAhybrid and RNA22 were used to identify the binding site in *BmE74* 3'UTR. Precursor bmo-miR-34 sequence was cloned afterwards, and bmo-miR-34 recombinant expression vector and *E74* 3'UTR expression vector were constructed for transient expression assay. Dual-luciferase reporter gene system was applied to detect the role of bmo-miR-34 in the posttranscriptional regulation of *BmE74* gene at the cellular level. The predicted results of bioinformatics showed that there were bmo-miR-34 potential binding sites on *E74* 3'UTR. The results of transfection experiments *in vitro* revealed that compared with the control group the luciferase activity was significantly decreased in the BmN cells co-transfected with bmo-miR-34 recombinant plasmid ($P < 0.01$), and ascended distinctly after transfected with synthetic bmo-miR-34 inhibitor ($P < 0.01$). It is indicated that bmo-miR-34 inhibits *E74* gene posttranscriptional expression.

Key words: miR-34; *Bombyx mori*; *BmE74* gene; expression regulation

收稿日期: 2015-04-09

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31172266/C1703); 江苏省普通高校研究生科研创新计划项目 (CXZZ12_0726)

作者简介: 王 欣 (1984-), 女, 河北唐山人, 博士研究生, 主要从事家蚕分子生物学研究。(Tel) 0511-85601052; (E-mail) wang7xin23@yeah.net

通讯作者: 沈兴家, (Tel) 0511-85601052; (E-mail) shenxjsri@163.com

家蚕是一种经典的生物学、遗传学模式昆虫, 近年来已有家蚕 miRNAs 方面的研究报道, 包括 miRNAs 的鉴定、表达谱分析以及功能预测等^[1-6]。到 2014 年 6 月为止, miRBase (<http://www.mirbase>).

org/)数据库已登录家蚕前体 miRNAs 487 个和成熟体 miRNAs 563 个。miRNAs 具有高度保守性,且与家蚕的重要功能有着密切的关系。miR-34 家族是一类高度保守的 miRNA 家族,在已测序的 33 种不同动物中已发现 54 个 miR-34 家族基因^[7]。miR-34 基因的同源序列中,80%位于基因间隔区,其余位于蛋白质编码基因的内含子区或者 3'非编码区^[7]。miR-34 在不同物种之间的基因同源性很高,前体序列的同源性为 38.89%,成熟体序列的同源性为 68.00%^[8]。

近年来越来越多的 miRNAs 被发现可能参与机体衰老的调控,其中 miR-34 与衰老的关系已成为研究的热点之一^[9]。Nan 等^[10]发现 miR-34 在果蝇中可抑制衰老相关疾病的发生,果蝇 miR-34 的缺失会加剧大脑衰老、诱发迟发性大脑变性,甚至缩短寿命,使生存率急剧下降,而 miR-34 的上调则会减轻由致命性多聚谷氨酰胺疾病蛋白引发的神经退行性病变,延长寿命。而且 miR-34 通过发病转录抑制因子 Eip74EF (Ecdysone-induced protein 74EF) 的参与完成与衰老有关的过程。Eip74EF 是一种重要的 ETS (E-twenty six) 域转录因子,主要参与类固醇激素通路。依赖 miRNAs 通路来沉默与发育相关的基因是研究疾病、衰老等相关过程的重要途径之一,而 miR-34 正是该通路的一个关键 miRNA。

E74 基因最早在果蝇^[11]、伊蚊^[12]、烟草天蛾^[13]中发现。其编码蛋白质的 N 末端在 2 种选择性剪切作用下形成 *E74A* 和 *E74B*;C 末端是 DNA 结合的 ETS 域,并且从线虫到哺乳动物均高度保守。果蝇 *DmE74* 功能缺失的突变在化蛹前期和蛹发育期是致命的^[14]。Sekimoto 等^[15]研究发现家蚕 *E74* 基因 (*BmE74*) 有 2 个亚型, *BmE74A* 和 *BmE74B*,二者编码相同的 C 末端 DNA 结合 Ets 域 (E-twenty six, Ets) 和不同的亚型特殊性 N 末端。两个 *BmE74* 亚型的发育表达谱和它们对 20-E (20-羟基- β -蜕皮甾酮) 的反馈作用表明,两种亚型参与家蚕前部丝腺 (ASG) 蜕皮激素级联控制的程序性细胞死亡。因此研究 *E74* 基因的转录后调控有助于深入了解家蚕生长发育和蚕丝蛋白表达调控的分子机制。

虽然越来越多的家蚕 miRNAs 功能被报道,但对高度保守的 miR-34 在家蚕中的功能尚未见研究

报道。我们利用生物信息学方法预测家蚕 miR-34 (*bmo-miR-34*) 与靶基因 *BmE74* 的结合位点,然后克隆 *bmo-miR-34* 前体序列和 *BmE74* 3'UTR 序列,分别构建 *bmo-miR-34* 表达载体和报告基因 *E74* 3'UTR 融合表达载体,利用双报告基因荧光检测系统和人工合成 *bmo-miR-34* 抑制物在细胞水平研究 *bmo-miR-34* 对 *BmE74* 的转录调控作用。

1 材料与方法

1.1 材料及主要试剂

家蚕品种 P50,由中国农业科学院蚕业研究所提供; *Escherichia coli* DH10B 菌株、昆虫 BmN 细胞系、重组表达载体质粒 pcDNA3.0 [*ie1-egfp-SV40*] 和 pGL3.0 [*A3-luc-SV40*] 均由农业部蚕桑遗传与改良重点实验室保存。

pMD[®] 18-T、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、*Ex Taq*[®] 酶、PrimeScript[®] RT-PCR Kit、RNAiso Plus 和 DNA marker 均购自宝生物工程(大连)有限公司;质粒提取试剂盒购自生工生物工程(上海)有限公司;TC-100 购自 Applichem 公司;胎牛血清购自 Gibco 公司;转染试剂盒 UCallM PerFect[™] 购自药科美公司;双报告基因荧光素酶检测试剂盒购自 Promega 公司;miRNA inhibitors 由百奥迈科生物技术有限公司合成;其他化学试剂均为分析纯,购自国药集团或生工生物工程(上海)有限公司;所有 PCR 引物合成与 DNA 测序由生工生物工程(上海)有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 按照文献[15]设计反转录引物 (RT Primer):在通用茎环结构序列后面加上 *bmo-miR-34* 的 3'端 6 个反向互补序列;PCR 引物的设计:正向引物为 *bmo-miR-34* 序列的前 14 个碱基,并在该序列前加上 4 个碱基使 T_m 值为 68 °C,反向引物为 miRNA 通用引物;利用 Oligo 6.0 设计 *bmo-pri-miR-34* 和 *BmE74* 3'UTR 的引物(表 1)。

1.2.2 生物信息学预测 据从 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) 中获得 *BmE74* 基因的 mRNA 序列,并在家蚕基因组数据库中进行全基因组比对,获得该基因的 3'UTR 序列。从 miRBase 数据库中获得 *bmo-miR-34* 序列,利用靶基因预测软件 RNAhybrid 和 RNA22 预测 *BmE74* 基因上可能存在的 *bmo-miR-34* 靶位点。

表 1 引物序列

Table 1 List of primer sequences

引物名称	引物序列 (5'-3')
RT Primer	CTCGTATCCACTGCAGGCTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCAACCA
Forward Primer	ggggTGGCAGTGTGTTAG
Reverse Primer	GTGCAGGCTCCGAGGT
pri-miR-34-F	cccaagcttAGTTATGTTAGATGTTGCTCC
pri-miR-34-R	cgggatccCCTGAAAAATAGAAGAACAAA
E74-3'UTR-F	gggctctagaCGCCTCGTCTACCAGTTTCGT
E74-3'UTR-R	ggcgccggcCGTTGGCAGTATTTATTCAGTA

未划线小写字母表示保护碱基的位置,下划线标记部分 caagctt、gggatcc、tctaga 和 ggccggc 分别为 *Hind* III、*Bam* H I、*Xba* I、*Fse* I 限制性酶切位点。

1.2.3 bmo-miR-34 的克隆与鉴定 提取 5 龄 3 d 家蚕幼虫的丝腺组织总 RNA,以 miRNAs 反转录引物 (RT Primer) 合成的 cDNA 为模板进行 PCR。反应条件:94 °C 5 min;94 °C 30 s,68 °C 25 s,72 °C 30 s,共 34 个循环;72 °C 10 min。PCR 产物经 4% 琼脂糖凝胶电泳检测,以 DL 2000 作为 Marker,回收 70 bp 片段;连接 pMD18-T 载体,16 °C 连接过夜后转化至 *E. coli* DH10B;提取重组质粒 pMD18-T-miR-34,进行酶切电泳和测序鉴定。

1.2.4 重组表达质粒的构建 重组载体 T-pri-miR-34 和 pcDNA3.0 [*iel-egfp*-SV40] 分别用 *Hind* III 和 *Bam* H I 进行双酶切,将目的片段回收后连接到线性化的 pcDNA3.0 [*iel-egfp*-SV40] 上,构建重组表达载体 pcDNA3.0 [*iel-egfp*-pri-miR-34-SV40]。重组载体 T-E74-3' UTR 和 pGL3.0 [*A3-luc*-SV40] 分别用 *Xba* I 和 *Fse* I 进行双酶切,将目的片段回收后连接到线性化的 pGL3.0 [*A3-luc*-SV40] 上,构建重组表达载体 pGL3.0 [*A3-luc*-E74-3'-UTR-SV40]。

1.2.5 BmN 细胞的转染 将 pcDNA3.0 [*iel-egfp*-SV40]、pGL3.0 [*A3-luc*-E74-3'-UTR-SV40]、pcDNA3.0 [*iel-egfp*-pri-miR-34-SV40]、bmo-miR-34 inhibitor 和内参质粒 pRL-CMV 分成 3 组分别进行体外转染实验。第 1 组:pGL3.0 [*A3-luc*-E74-3'-UTR-SV40]、pcDNA3.0 [*iel-egfp*-SV40] 和 pRL-CMV 3 种质粒;第 2 组:pGL3.0 [*A3-luc*-E74-3'-UTR-SV40]、pcDNA3.0 [*iel-egfp*-pri-miR-34-SV40] 和 pRL-CMV 3 种质粒;第 3 组:pGL3.0 [*A3-luc*-E74-3'-UTR-SV40]、pcDNA3.0 [*iel-egfp*-pri-miR-34-SV40]、bmo-miR-34 inhibitor 和 pRL-CMV 4 种质粒。每组中的质粒浓度稀释至 200 ng/μl 并按 1:1 的比例混合。

将密度为 1 ml $1.0 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^6$ 细胞的 BmN 细胞接种到 12 孔培养板中,27 °C 培养过夜。转染参考文献[16]、[17]的方法进行,将 3 μl 上述质粒混合物和 5 μl Cellfectin reagent 分别加入到 50 μl 无血清 TC-100 培养基中配置转染液,轻轻混匀后室温孵育 20 min。转染前吸去 12 孔细胞培养板中带血清的完全培养基,并用无血清 TC-100 培养基轻轻清洗细胞 2 次。将温育后的转染液加入到清洗过的 BmN 细胞中,27 °C 转染 5 h 后除去转染液,加入完全培养基 27 °C 继续培养,48 h 后进行荧光素酶活性检测。

1.2.5 荧光素酶活性检测 荧光素酶活性的检测按照 Promega 试剂盒双荧光素酶报告基因分析系统操作手册进行。转染 48 h 后,吸去细胞培养孔中的培养液,每孔中加入 250 μl 1×Passive Lysis Buffer (1×PLB),使细胞充分裂解,将细胞裂解液转到 1.5 ml 离心管中,12 000 r/min 离心 30 s,吸取上清至新的 1.5 ml 离心管中。取 4 μl 细胞裂解液加入含有 20 μl Luciferase Assay Reagent II (LAR II) 的检测管中混匀,检测管放入 Promega 荧光素酶检测仪 (20/20 n Luminometer, Turner BioSystems) 中检测萤火虫荧光强度。加入 20 μl Stop&Glo™,检测海参荧光素酶活性,记录数据进行统计分析。

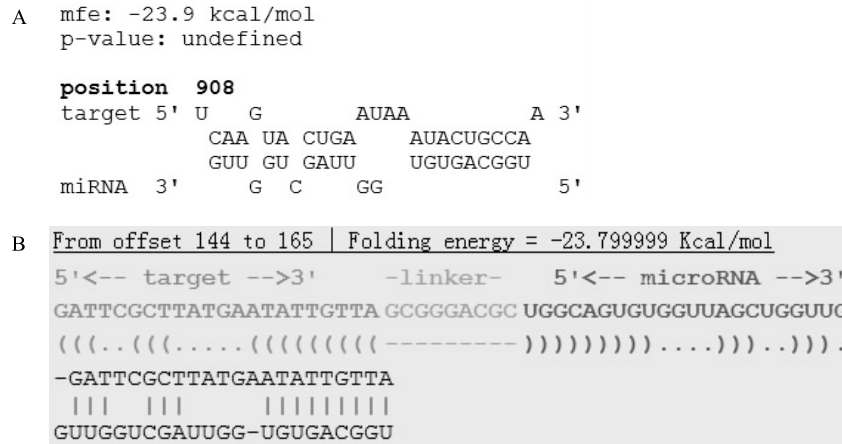
2 结果

2.1 bmo-miR-34 与 *BmE74* 基因结合位点的预测

通过 NCBI 查找家蚕 *E74* 的 mRNA 序列 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001043979.1),获得全长 3 335 bp 的核酸,其中编码序列 (CDS) 全长 2 424 bp, protein ID = “NP_001037444.1”,除去 poly A signal,获得 *E74* 基因的

3'UTR 序列。通过 miRBase 数据库获取家蚕 bmo-miR-34 序列 (http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0004975)。利用生物信息学预测软件 RNAhybrid^[12-13] 和 RNA22^[14] 进行靶位点的预

测,并将二者的预测结果结合起来,根据最小折叠自由能(MFE)的高低以及在种子区 2~8 个碱基互补配对的情况,筛选 *E74* 3'UTR 的家蚕 bmo-miR-34 结合位点(116~137 bp)(图 1)。



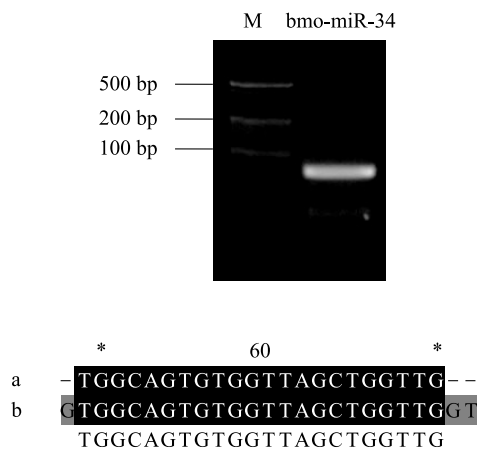
A:RNAhybrid 软件预测结果;B:RNA22 软件预测结果。

图 1 bmo-miR-34 与 *E74* 基因 3'UTR 的结合位点

Fig.1 Binding site of bmo-miR-34 with *E74* 3'UTR

2.2 bmo-miR-34 的克隆鉴定

以 5 龄 3 d 家蚕幼虫的丝腺组织总 RNA 为模板,以 bmo-miR-34 的茎环引物进行反转录 PCR,结果显示目的条带大小为 60~80 bp,片段大小正确。将目的片段回收测序,比对结果显示与 NCBI 中的序列一致(图 2),表明 bmo-miR-34 克隆正确。



M: Marker; a: MiRBase 数据库 bmo-miR-34 序列; b: bmo-miR-34 克隆测序结果。

图 2 bmo-miR-34 的 RT-PCR 鉴定及测序结果

Fig.2 RT-PCR and sequencing of bmo-miR-34

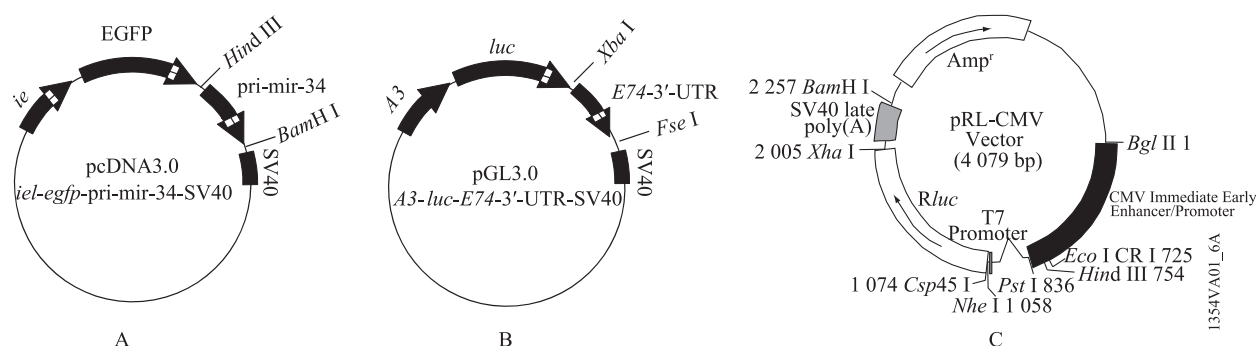
2.3 构建的重组表达质粒

为了研究 bmo-miR-34 对 *BmE74* 基因的转录后调控作用,将 pri-miR-34 克隆到由 *ie1* 启动子驱动的 *EGFP* 基因载体 pcDNA3.0 [*ie1-egfp-SV40*] 中,构建了 bmo-miR-34 的表达载体 pcDNA3.0 [*ie1-egfp-pri-miR-34-SV40*];将 *BmE74* 3'-UTR 序列克隆到由 *A3* 启动子驱动的 *luc* 基因载体 pGL3.0 [*A3-luc-FMBP-1-3'-UTR-SV40*] 上,构建了报告载体 pGL3.0 [*A3-luc-E74-3'-UTR-SV40*](图 3)。

2.4 bmo-miR-34 对 *BmE74* 基因表达的调控作用

将重组质粒 pGL3.0 [*A3-luc-E74-3'-UTR-SV40*]、重组质粒 pcDNA3.0 [*ie1-egfp-pri-miR-34-SV40*]、bmo-miR-34 inhibitor 和内参质粒 pRL-CMV 分别共转染 BmN 细胞,每组进行 3 次重复。转染 BmN 细胞后 48 h 检测绿色荧光强度,结果显示转染后的 BmN 细胞均能检测到绿色荧光(图 4)。

利用萤火虫荧光强度值与海參荧光强度值的比值(*Luc/Rlu*)对数据进行校正。结果显示,转染了 bmo-miR-34 重组表达载体的 BmN 细胞(第 2 组)中 *luc* 荧光素酶活性与对照组(第 1 组)相比降低了 52.90%,差异达到极显著水平($P<0.01$)(图 5)。为



A: 重组质粒 pcDNA3.0 [*ieI-egfp-pri-mir34-SV40*]; B: 重组质粒 pGL3.0 [*A3-luc-E74-3'-UTR-SV40*]; C: 内参质粒 pRL-CMV。

图 3 重组质粒和内参质粒结构示意图

Fig.3 Diagrams of the recombinant plasmids and internal control plasmid



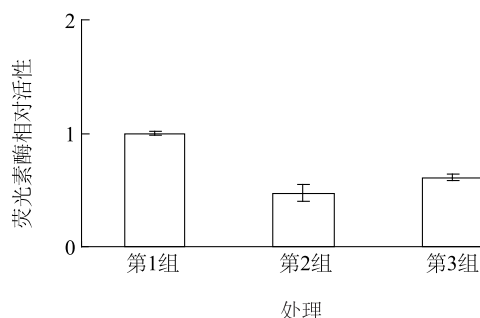
图 4 共转染重组质粒后的 BmN 细胞

Fig.4 BmN cells transfected with recombinant plasmids

了进一步验证 bmo-miR-34 对 *BmE74* 基因表达的调控作用,在 bmo-miR-34 重组表达载体与报告基因-*BmE74* 3'-UTR 重组表达载体的基础上,加入人工合成的 bmo-miR-34 抑制物共转染 BmN 细胞(第 3 组),发现 BmN 细胞 luc 荧光蛋白质表达量比第 2 组显著上调($P < 0.01$)(图 5)。由此可见,*BmE74* 3'-UTR 上存在 bmo-miR-34 的结合位点,且 bmo-miR-34 对 *BmE74* 基因的转录后表达具有显著抑制作用。

3 讨论

科学家最早在线虫中发现 miR-34 编码一段保守的 miRNA,在非脊椎动物中具有同源性^[18]。最新研究发现,miR-34s 家族在 p53 细胞调控网络中起着相当重要的作用^[19-25]。p53 是一种肿瘤抑制基因,50% 以上的恶性肿瘤与 p53 突变有关。Tazawa 等^[26]检测了 25 份结肠癌样品中的 miRNA,证明结



第 1 组: pGL3.0 [*A3-luc-E74-3'-UTR-SV40*] + pcDNA3.0 [*ieI-egfp-SV40*] + pRL-CMV; 第 2 组: pGL3.0 [*A3-luc-E74-3'-UTR-SV40*] + pcDNA3.0 [*ieI-egfp-pri-mir-34-SV40*] + pRL-CMV; 第 3 组: pGL3.0 [*A3-luc-E74-3'-UTR-SV40*] + pcDNA3.0 [*ieI-egfp-pri-mir-34-SV40*] + bmo-miR-34 inhibitor + pRL-CMV。

图 5 荧光素酶的相对活性

Fig.5 Relative activity of luciferase

肠癌中 miR-34a 与 p53 含量正相关。miR-34s 的转录不但受 p53 的直接调控,还能通过对某些 p53 活性调节基因的调控参与 p53 通路调节^[21-25]。此外,miR-34s 能够通过抑制 SIRT I (Silent information regulator1) 和 E2F3 (E2F transcription factor 3) 对 p53 活性产生正反馈调节作用^[20,26]。Yamakuchi 等^[20]发现 *SIRT1* 3'UTR 存在 miR-34a 的结合位点,通过荧光素酶试验确认其为 miR-34a 的靶序列,miR-34a 可以通过与该序列结合降解 *SIRT1* mRNA 下调细胞内 SIRT1 水平。

除了与肿瘤抑制调控相关外,果蝇中还发现 miR-34 可能通过沉默关键靶基因对果蝇与老化相关的活性起到负调控作用^[10]。Nan 等^[10]利用靶基

因预测软件 TargetScan 找到 *Eip74EF* 基因 3' UTR 有 miR-34 的结合位,且不同果蝇品种同源 *Eip74EF* 3' UTR 上结合位点保守。*Eip74EF* 是一种类固醇激素信号通路原件,虽然这些通路原件在发育过程中起作用,但也有研究结果表明这些通路原件参与生命周期的调控 (Lifespan regulation)。家蚕 *BmE74* 两种亚型参与家蚕 ASG 蜕皮激素级联控制的程序性细胞死亡。对于家蚕来说, bmo-miR-34 就是调控关键基因 *BmE74* 转录后表达的因子之一。

通过高通量测序技术研究 bmo-miR-34 表达谱的报道有很多^[1-3,27],但尚未见从家蚕组织中克隆该 miRNA 片段的报道。本研究通过茎环引物设计,首次从 5 龄期 3 d 家蚕后部丝腺克隆 bmo-miR-34 片段,在细胞水平证明了 bmo-miR-34 对 *BmE74* 的转录后表达具有极显著抑制作用 ($P < 0.01$),并利用人工合成的 bmo-miR-34 抑制物进一步验证了 bmo-miR-34 对 *BmE74* 表达的调控作用。

miRNA 的表达具有很强的时空特异性,并与靶分子组成一个复杂的调控网络,miRNAs 与 mRNAs 间同时存在“多对一”和“一对多”的关系,从而相互协同实现特定的功能^[28]。我们利用靶基因预测软件 RNAhybrid 和 RNA22,以 *BmE74* 3' UTR 为靶序列,预测 miRBase 中的家蚕 miRNAs,筛选到 21 个可能与 *BmE74* 调控相关的 miRNAs。其中 6 个 miRNAs 位于不同的 miRNA 簇,包括 bmo-miR-34、bmo-miR-277 簇;6 个 miRNAs 属于不同的基因家族,分别为 mir-10、mir-34、mir-252、mir-276、mir-279 和 mir-2733,其中 mir-10 家族也是近年来研究较多的与肿瘤发生紧密相关的 miRNAs^[29-30]。但是这些预测结果还需要进一步的试验验证。

研究 miRNAs 和 *BmE74* 间的相互作用网络,将为理解转录和转录后水平相结合而构成的基因表达调控网络提供新的认识。或许在不久的将来,我们还会发现更多关于 miRNAs 和 Ets 转录因子之间的网络调控机制,也为探讨家蚕 miRNAs 和类固醇激素通路之间的调控机理提供新的试验数据。

参考文献:

[1] CAO J, TONG C, WU X, et al. Identification of conserved microRNAs in *Bombyx mori* (silkworm) and regulation of fibroin L chain production by microRNAs in heterologous system[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2008, 38(12): 1066-1071.

[2] LIU S P, LI D, LI Q B, et al. MicroRNAs of *Bombyx mori* identi-

fied by Solexa sequencing[J]. BMC Genomics, 2010, 11: 148.

[3] HE P A, NIE Z, CHEN J, et al. Identification and characteristics of microRNAs from *Bombyx mori* [J]. BMC Genomics, 2008, 28(9): 248.

[4] CHEN A L, XIA D G, QIU Z Y, et al. Expression of a vitelline membrane protein, *BmVMP23*, is repressed by bmo-miR-1a-3p in silkworm, *Bombyx mori* [J]. FEBS Letters, 2013, 587: 970-975.

[5] 宋 菲, 王 欣, 钱 平, 等. 家蚕 Bmo-miR-2739 对丝素重链基因 Fib-H 表达的调控作用[J]. 蚕业科学, 2014, 40(3): 404-408.

[6] JIANG J H, GE X, LI Z Q, et al. MicroRNA-281 regulates the expression of ecdysone receptor (EcR) isoform B in the silkworm, *Bombyx mori* [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2013, 43: 692-700.

[7] 高佳莉, 罗玉萍, 李思光. miR-34 基因家族的分子进化[J]. 动物学研究, 2007, 28(3): 271-278.

[8] CHANG T C, WENTZEL E A, KENT O A, et al. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis [J]. Mol Cell, 2007, 26(5): 745-752.

[9] 杨聚荣. miR-34 通过自噬作用调控衰老的机制研究[D]. 北京: 军医进修学院, 2010.

[10] NAN L, MICHAEL L, KAJIA C. The microRNA miR-34 modulates ageing and neurodegeneration in *Drosophila* [J]. Nature, 2012, 482(7386): 519-523.

[11] BURTIS K C, THUMMEL C S, JONES C W, et al. The *Drosophila* 74EF early puff contains *E74*, a complex ecdysone-inducible gene that encodes two Ets-related proteins [J]. Cell, 1990, 61: 85-99.

[12] SUN G, ZHU J, LI C, et al. Two isoforms of the early *E74* gene, an Ets transcription factor homologue, are implicated in the ecdysteroid hierarchy governing vitellogenesis of the mosquito, *Aedes aegypti* [J]. Mol Cell Endocrinol, 2002, 190: 147-157.

[13] STILWELL G E, NELSON C A, WELLER J, et al. *E74* exhibits stage-specific hormonal regulation in the epidermis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta* [J]. Dev Biol, 2003, 258: 76-90.

[14] GRAVES B J, PETERSEN J M. Specificity within the Ets family of transcription factors [J]. Adv Cancer Res, 1998, 75: 1-55.

[15] SEKIMOTO T, IWAMI M, SAKURAI S. 20-Hydroxyecdysone regulation of two isoforms of the Ets transcription factor *E74* gene in programmed cell death in the silkworm anterior silk gland [J]. Insect Molecular Biology, 2007, 16(5): 581-590.

[16] ZHAO Q L, SHEN X J, ZHU L J, et al. Characterization of Clb1 gene promoter from silkworm, *Bombyx mori* [J]. Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, 2007, 62: 875-880.

[17] HUANG Y, ZOU Q, TANG S M, et al. Computational identification and characteristics of novel microRNAs from the silkworm (*Bombyx mori* L.) [J]. Mol Biol Rep, 2010, 37: 3171-3176.

[18] HE L, HE X Y, LOWE S W, et al. MicroRNAs join the p53 network-another piece in the tumour-suppression puzzle [J]. Nat Rev Cancer, 2007, 7(11): 819-822.

- [19] CHANG T C, WENTZEL E A, KENT O A, et al. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis [J]. *Mol Cell*, 2007, 26(5): 745-752.
- [20] YAMAKUCHI M, LOWENSTEIN C J. MiR-34, SIRT1 and p53: the feedback loop[J]. *Cell Cycle*, 2009, 8(5): 712-715.
- [21] ROKHLIN O W, SCHEINKER V S, TAGHIYEV A F, et al. MicroRNA-34 mediates AR-dependent p53-induced apoptosis in prostate cancer[J]. *Cancer Biol Ther*, 2008, 7(8): 1288-1296.
- [22] PARIS R, HENRY R E, STEPHENS S J, et al. Multiple p53-independent gene silencing mechanisms define the cellular response to p53 activation[J]. *Cell Cycle*, 2008, 7(15): 2427-2433.
- [23] RAVER-SHAPIRA N, MARCIANO E, MEIRI E, et al. Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis[J]. *Mol Cell*, 2007, 26(5): 731-743.
- [24] HERMEKING H. p53 enters the microRNA world [J]. *Cancer Cell*, 2007, 12(5): 414-418.
- [25] HE L, HE X, LIM L P, et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network [J]. *Nature*, 2007, 447 (7148): 1130-1134.
- [26] TAZAWA H, TSUCHIYA N, IZUMIYA M, et al. Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(39): 15472-15477.
- [27] TONG C Z, JIN Y F, ZHANG Y Z. Computational prediction of microRNA genes in silkworm genome[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2006, 7:806-816.
- [28] SHALGI R, LIEBER D, OREN M, et al. Global and local architecture of the mammalian microRNA-transcription factor regulatory network[J]. *PLoS Comput Biol*, 2007, 3:131.
- [29] DISA T, NINA M H K, ANDERS H L, et al. The miR-10 microRNA precursor family [J]. *RNA Biology*, 2011, 8 (5): 728-734.
- [30] LUND A H. miR-10 in development and cancer[J]. *Cell Death and Differentiation*, 2010, 17:209-214.

(责任编辑:张震林)