

转染突变型 Notch3 基因对线粒体融合蛋白-2 表达及下游信号通路的影响

袁梅, 夏健, 黄清, 周琳, 周芝文, 后颖, 杨期东
中南大学湘雅医院神经内科, 湖南省长沙市 410008

摘要: **目的** 探讨 Notch3 基因突变后对线粒体融合蛋白-2 (mfn-2) 的表达及其下游信号通路的影响, 从而进一步阐明伴皮质下梗死和白质脑病的常染色体显性遗传性脑动脉病 (CADASIL) 的病理机制。 **方法** 利用脂质体法将 Notch3 野生型重组表达质粒 (pcDNA3.1-Notch3)、突变型重组表达质粒 (pcDNA3.1-Notch3-R90C) 以及 pcDNA3.1 空载质粒分别瞬时转染到人主动脉平滑肌细胞中并培养。Real-time PCR 及 western-blot 检测各组 Notch3 的表达; Real-time PCR 检测各组 mfn-2、bcl-2、survivin 基因 mRNA 的表达; Western-blot 检测各组 mfn-2 蛋白的表达; AV/PI 双标法检测各组细胞凋亡情况。 **结果** 与空载质粒组和野生型组比较, 转染突变型 Notch3 基因组中 mfn-2 表达水平明显增加 ($P < 0.05$)、bcl-2 和 survivin 基因表达下调 ($P < 0.05$) 以及细胞凋亡明显增加 ($P < 0.05$)。 **结论** Notch3 基因突变后引起的 mfn2 表达上调及下游凋亡调控基因表达失衡可能是 CADASIL 发病的重要病理机制。

关键词: 伴皮质下梗死和白质脑病的常染色体显性遗传性脑动脉病; Notch3 基因; 线粒体融合蛋白-2; 凋亡

Mutations in Notch3 gene influence expression of Mfn-2 and regulation of specific signaling pathways

YUAN Mei, XIA Jian, HUNG Qing, ZHOU Lin, ZHOU Zhi-Wen, HOU Ying, YANG Qi-Dong. Department of Neurology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China (Corresponding author: YANG Qi-Dong, Email: xyyqd@hotmail.com)

Abstract: Objective Cerebral artosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL) is associated with mutations in the Notch3 gene but the causal mechanisms of the disorder remain unclear. This study explored the effects of Notch3 gene mutations on mitochondrial fusion protein 2, bcl-2 and survivin, which may help to further elucidate the pathophysiological mechanisms of CADASIL. **Methods** Human aortic vascular smooth muscle cells (HVSVC) were transiently transfected with wild-type Notch3, mutation-type Notch3-R90C and empty pcDNA3.1 vector according to the Lipofectamine 2000 method. In order to verify the transfection efficiency, real-time PCR and Western blot were used to detect the expression levels of Notch3. The relative gene expression of survivin and bcl-2 was measured using reverse transcription followed by real-time PCR, and the protein expression level of mfn-2 was also examined by Western blot. Moreover, the rate of apoptosis was detected by fluorescein annexin V-FITC/PI double labeling in the three groups. **Results** Compared with the other two groups, the expression levels of mfn2 mRNA and protein were significantly higher in the mutation-type group ($P < 0.05$). A significant down-regulation in bcl-2 and survivin mRNA expression levels was also found in the mutation-type group ($P < 0.05$). Moreover, Annexin V/PI double staining assay showed the apoptosis rate significantly increased in the mutation-type group ($P < 0.05$). **Conclusions** Notch3 gene mutation-mediated up-regulation of mfn2 and down-regulation of bcl-2 and survivin may be an essential pathomechanism of CADASIL.

Key words: cerebral artosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy; Notch3 gene; mitochondria fusion protein 2; apoptosis

伴皮质下梗死和白质脑病的常染色体显性遗传性脑动脉病 (cerebral artosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy, CADASIL) 是 Notch3 基因突变所致的一种罕见的非动脉

收稿日期: 2012-02-20; 修回日期: 2012-03-29

作者简介: 袁梅 (1982-), 女, 在读博士研究生, 硕士, 主要从事脑血管病的研究。

通讯作者: 杨期东, 男, 教授, 硕士, 博士生导师, 主要从事脑血管病的研究。

硬化、非淀粉样变的遗传性脑动脉病。迄今为止，关于 CADASIL 的发病机制仍不清楚，分子遗传学及病理学的研究表明该病的发病与 Notch3 基因突变连锁的平滑肌退行性变尤其是细胞凋亡密切相关。线粒体融合蛋白 2 (mfn2) 是近年来发现的促进血管平滑肌细胞凋亡的重要因子。因此，本研究的目的在于探讨转染外源性突变型 Notch3 基因对人主动脉血管平滑肌细胞 mfn2 的表达及其下游凋亡信号通路的影响，从而进一步阐明 CADASIL 的病理生理机制。

1 材料与方法

1.1 材料

除流式细胞仪检测需在中南大学湘雅医院血液科实验室进行外，其它所有仪器设备均由中南大学湘雅医院神经内科实验室提供。

主要试剂有兔 Notch3 抗体 (Cell Signaling 公司, USA, 90 kD) ; 鼠 mfn-2 抗体 (santa cruz 公司, USA, 80 kD) ; 鼠 GAPDH 抗体 (37 kD) 以及相应山羊抗兔和山羊抗鼠二抗 (武汉博士德生物公司) ; Trizol (Invitrogen 公司) ; RevertAid™ H Minus First Strand cDNA 合成试剂盒、Deoxyribonuclease I (DNase I) 和 RiboLock™ Ribonuclease 抑制剂均购自 Fermentas 公司) ; SYBR GreenPCR Master Mix (ABI 公司) ; 人主动脉平滑肌细胞 (HVSMC) (ATCC 公司, USA) ; Lipofectamine™ 2000 脂质体 (Invitrogen 公司) ; ECL 化学发光试剂盒与细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒 (碧云天公司) ; Annexin V-FITC & PI 凋亡检测试剂盒 (美国 ADL 公司) 。

1.2 方法

1.2.1 引物设计合成 根据 Genebank 数据库查出物种为人的 Notch3、Bcl-2、survivin、mfn-2 和 GAPDH 序列，运用 Primer3 进行引物设计，所有引物均由上海生工合成。引物序列如下：

基因	引物序列	长度 (bp)
Notch3	上游 5-tgaagacagctcccactact-3	180
	下游 5-acgtcgtctctcacgttate-3	
Bcl-2	上游 5-tgaagacagctcccactact-3	180
	下游 5-acgtcgtctctcacgttate-3	
mfn-2	上游 5-ctctgtacttggtggacgatt-3	181
	下游 5-caagccatctatcatgtcct-3	
survivin	上游 5-gtgtttcttctgttcaagg-3	200
	下游 5-ataaaccttgggaagtgtg-3	
GAPDH	上游 5-caatgaccccttcattgacc-3	106
	下游 5-gacaagcttcctgtctcag-3	

1.2.2 重组表达质粒构建及抽提 从 pubmed gene 数据库中查出 Notch3 模板基因序列编号 NM-000435.2 (CDS 区全长序列:77 ~ 7042 bp) ,应用 genscript 公司的全基因合成法及长引物 PCR 法构建 pcDNA3.1-Notch3 野生型重组表达质粒 (wil, 即正常 Notch3 基因过表达组)。pcDNA3.1-Notch3 突变型重组质粒构建方法与野生型基本相同。目前报道的最常见的引起 CADASIL 发病的 Notch3 基因突变位置是 3 号外显子 R90C (C344T)^[1] ,因此，将 Notch3 基因序列第 344 位点处的 C 碱基改为 T 碱基即可构建突变型 pcDNA3.1-Notch3-R90C 重组表达质粒。质粒空载组为 pcDNA3.1。质粒构建后通过酶切和测序的方法验证，均由 genscript 公司测序鉴定，测序结果用 NCBI 的 BLAST 验证。根据 QIAGEN 公司质粒抽提试剂盒操作说明进行质粒 DNA 大量抽提，-20℃ 保存用于细胞转染。

1.2.3 细胞培养及瞬时转染 HVSMC 培养在含 12% 胎牛血清的改良型 RPMI1640 培养基中 (含双抗) 培养、传代。计数板计数后接种于在 6 孔培养板中 (5 × 10⁵ /孔) ,37℃ ,5% CO₂ 培养箱中培养，当细胞融合度达 80% ~ 90% 时开始瞬时转染。实验共分为三组：①转染 pcDNA3.1 空载质粒组：每孔加入 pcDNA3.1 质粒 4 μg，Lipofectamine 2000 脂质体 10 μl/孔，无血清培养基 OMEM 500 μl/孔培养 6 h 后，更换 12% FBS 1640 完全培养基。②转染野生型组：将 pcDNA3.1-Notch3 质粒 4 μg 按照上述方法转染。③转染突变型组：将 pcDNA3.1-Notch3-R90C 质粒 4 μg 按照上述方法转染。每组转染 3 个复孔，进行 3 次独立实验，转染步骤参照 Lipofectamine™ 2000 说明书。细胞转染 72 h 后收获细胞，用于提取 RNA 以及蛋白。

1.2.4 real-time PCR 检测 mnf2 及凋亡相关基因 mRNA 的表达 按照 Trizol 说明书操作步骤提取总 RNA 并测定记录各组浓度。根据第一链 cDNA 逆转录合成试剂盒说明书合成 cDNA，各组反应体系中加入的总 RNA 量均为 2 μg。合成模板 cDNA 后运用荧光染料法进行 Real-time PCR 检测。根据实验中 Notch3、mfn2、Bcl-2、survivin、和内参 GAPDH 的 Ct 值、ΔCt 值计算 ΔΔCt 值以及 2-ΔΔCt (RQ) ,从而得到目的基因 mRNA 相对含量。

1.2.5 Western blot 检测目的基因 mnf2 蛋白的表达 按照细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒提取各组细胞蛋白，并计算记录各组浓度。取 30 μg 细

胞裂解液与 $5 \times$ 上样缓冲液混合 (体积比 4: 1), 在 PCR 以上 99°C 变性 10 min 之后上样, 行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。垂直电泳将蛋白转移至 PVDF 膜上, 甲醇固定, 在含 5% 脱脂奶粉的封闭液 4°C 过夜。一抗稀释度为 1: 1000, 室温孵育 2 h, 二抗稀释度为 1: 1000, 室温孵育 2 h 后用 ECL 化学发光试剂盒处理并暗室显影。以 GAPDH 为内参照。图像运用 Quantitative one 软件进行分析, 用 mfn2 与 GAPDH 蛋白条带的积分密度比值表示相对蛋白水平。

1.2.6 Annexin V/PI 双标法检测细胞凋亡 细胞转染 72 h 后收获三组细胞, 按照 Annexin V/PI 说明书弃培养液, PBS 洗涤、胰酶消化细胞, 收集离心后细胞并予以 PBS 重悬洗涤后, 每组取 1×10^6 个细胞加入 100 μl Annexin V 标记液在暗处室温下孵育 15 min, 再在每份标本中加入 10 μl PI。加入冷的

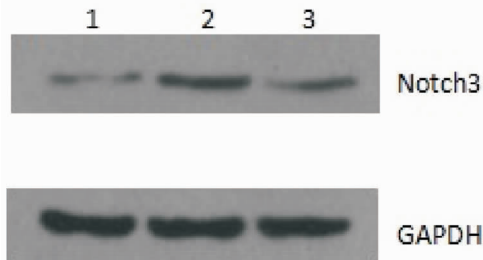


图 1 western-blot 检测各组 Notch3 蛋白表达情况。1 为转染空载质粒组; 2 为转染野生型质粒组; 3 为转染突变型质粒组。

2.2 mfn-2 蛋白及 mRNA 的表达

Western blot 和荧光半定量 PCR 分别检测各转染组 mfn2 蛋白和 mRNA 的表达水平, 以 GAPDH 为内参。mfn2 蛋白和 mRNA 表达水平在突变组明显增高, 而过表达 Notch3 基因的野生型组 mfn2 表达较低。突变组

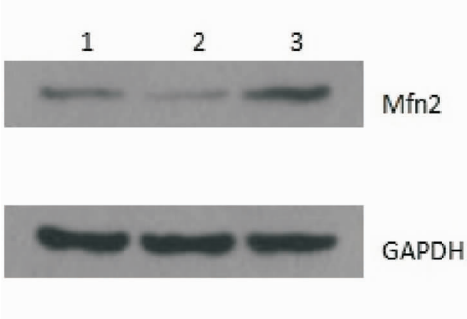


图 3 western-blot 检测各组 mfn2 蛋白表达情况; 1 为转染空载质粒组; 2 为转染野生型质粒组; 3 为转染突变型质粒组。

$1 \times$ 结合缓冲液 400 μl , 15 min 内进行流式检测。每组重复 3 次, 取平均值, 结果用 Cellquest 软件分析。

1.3 统计学处理

计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 实验数据采用 SPSS 13.0 统计软件进行处理。组间计量资料的比较采用 t 检验并进行方差齐性检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转染效率检测结果

通过 real-time PCR 和 western-blot 检测空载质粒组 (作为对照组, con)、野生型组 (wil) 和突变型组 (mut) 结果发现后两组 Notch3 mRNA 及蛋白表达明显增高, 野生型组和突变组分别与空白载体组比较, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明转染成功, 见图 1、图 2。

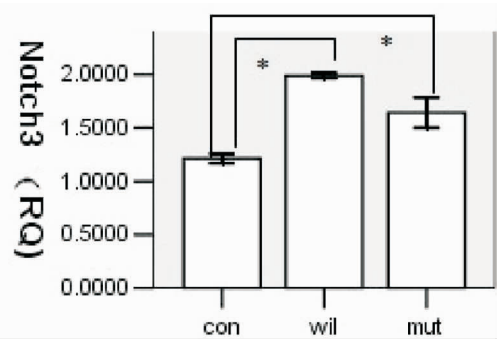


图 2 各组 Notch3 mRNA 的表达情况。con 为对照组; wil 为野生组; mut 为突变型组。* 代表 $P < 0.05$ 。

和野生型组 mfn2 表达比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 而空载质粒组与野生型组 mfn2 表达比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 这表明 Notch3 基因突变后可能促进 mfn2 的表达, 而未发生突变的 Notch3 过表达后可能抑制 mfn2 的表达, 见图 3、图 4。

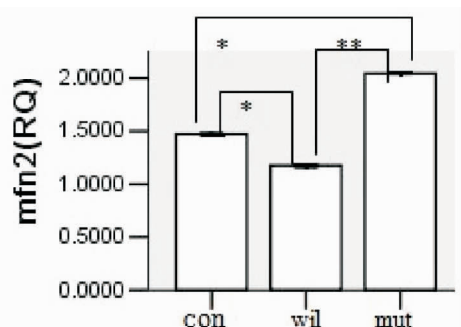


图 4 各组 Notch3 mRNA 的表达情况。con 为对照组; wil 为野生组; mut 为突变型组。* 代表 $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2.3 凋亡相关基因 mRNA 的表达

运用 real-time PCR 对转染各组进行 bcl-2 及 survivin 基因 mRNA 表达水平检测,以 GAPDH 为内参照。结果如图 5 所示,与其它两组进行比较,转染突变型质粒组 bcl-2 及 survivin 基因 mRNA 表达

水平较低,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。这表明 Notch3 基因突变后可能通过下调 bcl-2 及 survivin 等抑制凋亡的基因的表达水平来促进凋亡的发生。

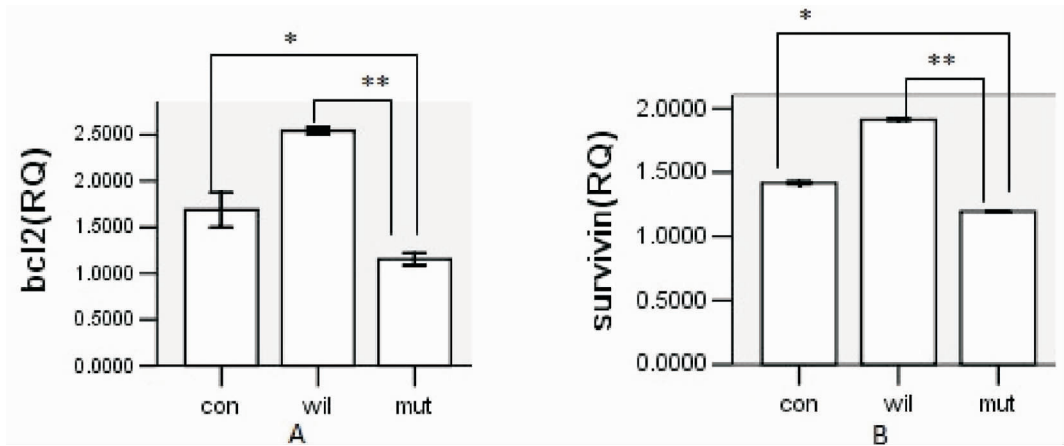


图 5 real-time PCR 检测各组 bcl-2 及 survivin mRNA 相对值。A 为 bcl-2 基因;B 为 survivin 基因。* 表示 $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2.4 转染各组凋亡率情况

细胞转染 72 h 后,转染 pcDNA3.1 空载质粒组、Notch3 野生型组以及突变组的凋亡百分率分别为 $(2.98 \pm 0.13)\%$ 、 $(3.09 \pm 0.15)\%$ 和 $(10.10 \pm 0.35)\%$ 。转染突变型质粒组与另外两组相比较其

凋亡率明显增加,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);而野生型组和质粒空载组相比较凋亡率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。这说明 Notch3 基因突变后可以增加人主动脉平滑肌细胞的凋亡,从而影响其功能,见图 6。

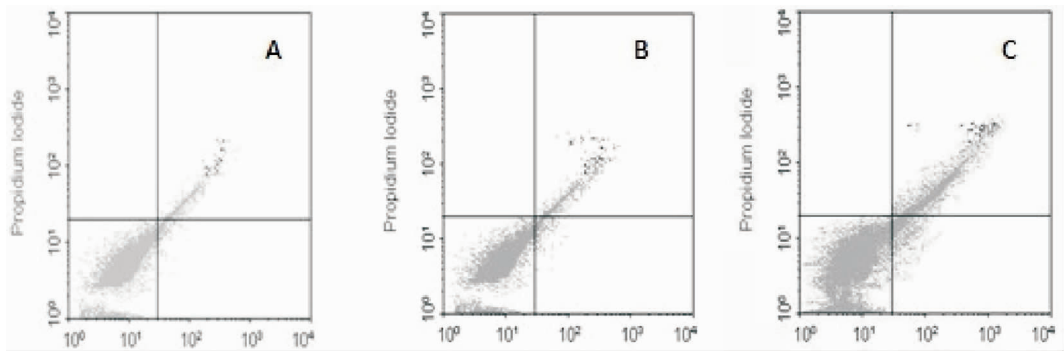


图 6 Annexin V/PI 染色后流式细胞仪检测的各组凋亡情况图;A 为转染空载质粒组;B 为转染野生型质粒组;C 为转染突变型质粒组。

3 讨论

CADASIL 的发病年龄在 30 ~ 40 岁,一般有家族史,男女发病率无差异。临床表现多样,主要表现为以下四个方面:①伴或不伴先兆的偏头痛;②

反复短暂性脑缺血发作和缺血性卒中;③进行性阶梯性进展的皮质下痴呆和认知功能障碍;④情感障碍。该病亦可出现其它神经系统表现及其以外其他器官系统损害。影像学检查可见双侧大脑皮层

下白质广泛受累和基底节区的腔隙性梗死病灶,弓状纤维不受累。脑组织病理学检查发现广泛的皮质下中央灰质多发腔隙性梗死和白质脱髓鞘性病灶,主要累及 200 ~ 400 μm 的微小动脉。特征性病理改变:血管平滑肌细胞(VSMCs)退行性变和丢失、嗜银颗粒(GOM)及 Notch3 受体外侧结构域(N3ECD)过度沉积。

迄今为止,关于 CADASIL 的发病机制仍不清楚。CADASIL 的病因是 Notch3 基因突变,导致的结果是小动脉平滑肌细胞的退行性变及丢失,引起小动脉结构和功能的改变,最终出现大脑皮质下白质长期的慢性脑缺血缺氧性病变以及微出血。那么基因突变又是如何引起小动脉血管平滑肌细胞退行性变以及丢失的呢?一些研究表明引起 Notch3 蛋白胞外段(由 34 个表皮样生长因子组成)第 10 ~ 12 个表皮样生长因子(EGF)氨基酸改变的 Notch3 基因突变可以影响信号转导活性(因为 EGF10 ~ 12 为配体受体结合区域),但是目前发现的 Notch3 基因突变大多数并不影响该区域的结构,因此有关于该配体受体结合异常的研究并不能完全解释 CADASIL 的发生^[2-5]。另有研究表明 CADASIL 的病理机制是由于嗜银颗粒(GOM)的毒性作用所致的,但是目前为止 GOM 的来源以及本质尚不清楚,因而也无法探讨其与 VSMCs 退变的关系。2011 年, Lewandowska 等^[6]首次提出沉积在 VSMCs 的 GOM 损伤平滑肌细胞的机制可能是 GOM 渗透到基底膜以及细胞外基质的位置,从而引起内膜厚以及细胞外基质的改变,最终导致平滑肌细胞功能的受损,但该研究也有待进一步证实。Ihalainen 等^[7]的研究表明 Notch3 蛋白的错误折叠可能引起内质网的应激从而激活折叠蛋白反应,导致活性氧簇的增加以及平滑肌细胞的损伤。尽管目前的多种学说均需进一步的研究,但鉴于 CADASIL 的病理特点,探讨平滑肌细胞功能受损是深入阐明 CADASIL 发病机制的关键。值得指出的是,一些研究表明细胞中重要的细胞器线粒体功能失调参与了 CADASIL 的发病机制。线粒体含有氧化磷酸化的重要装置,是平滑肌细胞能量代谢、信号转导的主要场所,在维持细胞正常的物质代谢中具有重要作用。任何线粒体功能的异常都会引起相应平滑肌细胞的功能改变。de la Pena 等^[8]的研究表明 CADASIL 家族中 Notch3 基因的突变影响了线粒体呼吸链复合体 I 和 V,导致线粒体功能失调。Ma-

landrini 等^[9]对 3 名无骨骼肌症状的 CADASIL 肌肉活检的研究表明 Notch3 基因突变可能影响线粒体的能量代谢。最近 Perumalsamy 等^[10]的研究表明 Notch 信号级联放大反应通过线粒体融合蛋白来调控细胞的存活。

线粒体在细胞代谢及胞内信号转导中发挥重要作用,而线粒体融合蛋白 2 (mitochondria fusion protein 2, mfn2)是维持线粒体形态结构、介导信号转导以及能量代谢重要的细胞器。mfn2 由 758 个氨基酸残基组成,位于线粒体的外膜。以前的一些研究表明 mfn2 的功能主要是介导线粒体的融合,维持线粒体的形态和功能。最新研究表明 mfn2 是一个强有力的内源性的 Ras 抑制物, Karbowski 等^[11]研究发现,几乎所有凋亡细胞中 Bcl-2 和 mfn2 是共定位的。Shen 等^[12]的研究表明 mfn2 诱导心肌细胞凋亡主要通过激活线粒体凋亡途径和抑制 Akt 磷酸化。Guo 等^[13]对正常大鼠 VSMC 的研究表明 mfn2 是决定 VSMC 凋亡的一个主要因子,其功能独立于线粒体的融合,其研究表明高表达的 mfn2 基因可以通过线粒体凋亡途径促进血管大鼠血管平滑肌细胞(rVSMC)的凋亡,且在此过程中伴随着 Bcl-2 蛋白表达的减少、Bax 蛋白表达的增加以及胱天蛋白酶(caspase)-9 的活化。此外 Shen 等^[12]在心衰所致的细胞凋亡中也发现 mfn2 表达水平增高,Bcl-2 表达水平及 PI3K/Akt 活性下降。这些研究表明 mfn2 在促进细胞凋亡的过程中起着非常重要的作用,而 Survivin 是凋亡抑制蛋白(Inhibitor of apoptosis, IAP)家族成员,是目前发现最强的凋亡抑制因子,在多种疾病的凋亡抑制过程中起到重要作用^[14-16]。

本研究成功转染野生型和突变型 Notch3 重组表达质粒,而且通过体外转染 Notch3 野生型和突变型质粒,发现 Notch3 基因发生突变后能够明显促进人主动脉平滑肌细胞 mfn2 的表达,并且能通过抑制 bcl-2、survivin 等重要抗凋亡基因的表达来促进平滑肌细胞凋亡的发生,损伤平滑肌细胞及血管的功能,最终导致 CADASIL 的发生。我们的研究与以往的研究相符合,进一步证实了 mfn2 能够促进凋亡的作用,更重要的是首次发现 Notch3 基因突变可能通过上调 mfn2 的表达以及扰乱下游凋亡相关基因的表达来促进平滑肌细胞的凋亡,本研究有利于我们进一步认识 CADASIL 的发病机制。

参 考 文 献

- [1] Yin XZ , Ding MP , Zhang BR , et al . Report of two Chinese families and a review of Mainland Chinese CADASIL patients . *J Neurol Sci* , 2009 , 279 (1-2) : 88-92 .
- [2] Haritunians T , Boulter J , Hicks C , et al . CADASIL Notch3 mutant proteins localize to the cell surface and bind ligand . *Circ Res* , 2002 , 90 (5) : 506-508 .
- [3] Karlström H , Beatus P , Dannaeus K , et al . A CADASIL-mutated Notch 3 receptor exhibits impaired intracellular trafficking and maturation but normal ligand-induced signaling . *Proc Natl Acad Sci U S A* , 2002 , 99 (26) : 17119-17124 .
- [4] Joutel A , Monet M , Domenga V , et al . Pathogenic mutations associated with cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy differently affect Jagged1 binding and Notch3 activity via the RBP/JK signaling Pathway . *Am J Hum Genet* , 2004 , 74 (2) : 338-347 .
- [5] Low WC , Santa Y , Takahashi K , et al . CADASIL-causing mutations do not alter Notch3 receptor processing and activation . *Neuroreport* , 2006 , 17 (10) : 945-949 .
- [6] Lewandowska E , Dziewulska D , Parys M , et al . Ultrastructure of granular osmiophilic material deposits (GOM) in arterioles of CADASIL patients . *Folia Neuropathol* , 2011 , 49 (3) : 174-180 .
- [7] Ihalainen S , Soliymani R , Iivanainen E , et al . Proteome analysis of cultivated vascular smooth muscle cells from a CADASIL patient . *Mol Med* , 2007 , 13 (5-6) : 305-314 .
- [8] de la Peña P , Bornstein B , del Hoyo P , et al . Mitochondrial dysfunction associated with a mutation in the Notch3 gene in a CADASIL family . *Neurology* , 2001 , 57 (7) : 1235-1238 .
- [9] Malandrini A , Albani F , Palmeri S , et al . Asymptomatic cores and paracrystalline mitochondrial inclusions in CADASIL . *Neurology* , 2002 , 59 (4) : 617-620 .
- [10] Perumalsamy LR , Nagala M , Sarin A . Notch-activated signaling cascade interacts with mitochondrial remodeling proteins to regulate cell survival . *Proc Natl Acad Sci U S A* , 2010 , 107 (15) : 6882-6887 .
- [11] Chen KH , Guo X , Ma D , et al . Dysregulation of HSG triggers vascular proliferative disorders . *Nat Cell Biol* , 2004 , 6 (9) : 872-883 .
- [12] Shen T , Zheng M , Cao C , et al . Mitofusin-2 is a major determinant of oxidative stress-mediated heart muscle cell apoptosis . *J Biol Chem* , 2007 , 282 (32) : 23354-23361 .
- [13] Guo X , Chen KH , Guo Y , et al . Mitofusin 2 triggers vascular smooth muscle cell apoptosis via mitochondrial death pathway . *Circ Res* , 2007 , 101 (11) : 1113-11122 .
- [14] Dai D , Liang Y , Xie Z , et al . Survivin deficiency induces apoptosis and cell cycle arrest in HepG2 hepatocellular carcinoma cells . *Oncol Rep* , 2012 , 27 (3) : 621-627 .
- [15] Chen B , Yuping S , Ni J . Rapamycin decreases survivin expression to induce NSCLC cell apoptosis under hypoxia through inhibiting HIF-1 α induction . *Mol Biol Rep* , 2012 , 39 (1) : 185-191 .
- [16] He HJ , Hou L , Wang JX , et al . The apoptosis inhibitor survivin prevents insect midgut from cell death during postembryonic development . *Mol Biol Rep* , 2012 , 39 (2) : 1691-1699 .