



李新宇, 马卫华, 李立新, 申晋山, 杜亚丽, 龙登隆, 张琪, 刘晋佳, 王春梅, 兰俊, 冯宇佳, 姜玉锁. 中华蜜蜂 *PLA2* 基因的生物信息学分析及响应高温胁迫的表达模式 [J]. 环境昆虫学报, 2020, 42 (5): 1060–1067.

中华蜜蜂 *PLA2* 基因的生物信息学分析及响应高温胁迫的表达模式

李新宇¹, 马卫华², 李立新², 申晋山², 杜亚丽¹, 龙登隆¹,
张琪¹, 刘晋佳¹, 王春梅¹, 兰俊¹, 冯宇佳¹, 姜玉锁^{1*}

(1. 山西农业大学动物科技学院, 山西太谷 030801; 2. 山西农业大学 (山西省农业科学院园艺研究所), 山西太原 030800)

摘要: 磷脂酶 A2 (PLA2) 对细胞膜流动性、膜蛋白活性等细胞生理功能有重要调节作用。高温等环境压力对细胞的生理代谢有较大的影响, 其在生物体抗逆过程中的调控作用一直备受关注。本研究以中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* PLA2 基因序列为基础, 对其蛋白结构进行预测, 分析该基因在不同温度和高温不同胁迫时间下的表达差异, 以揭示该基因在中华蜜蜂抗高温过程中的生理功能。结果显示, 中华蜜蜂 PLA2 基因包含 745 bp 的开放阅读框, 编码 169 个氨基酸, 蛋白分子量为 19.3 kDa, 无跨膜结构, 不属于膜蛋白。氨基酸同源序列比对结果显示, 中华蜜蜂 PLA2 序列与蜜蜂科昆虫的相似性最高, 与其他膜翅目昆虫的相似性存在差异。qRT-PCR 结果显示, PLA2 基因在 35℃、40℃ 和 45℃ 处理下的表达量较高, 较高的温度能诱导该基因表达的增加。同时, PLA2 基因的表达受高温胁迫时间的影响, 较长时间的高温胁迫导致 PLA2 基因的表达增加。本研究结果表明 PLA2 在中华蜜蜂应对高温胁迫时发挥重要生理功能。

关键词: 中华蜜蜂; PLA2; 高温胁迫; 表达模式

中图分类号: Q968.1; S433

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2020) 05-1060-08

Bioinformatics analysis of *PLA2* gene and expression characteristics in high temperature stress in *Apis cerana cerana*

LI Xin-Yu¹, MA Wei-Hua², LI Li-Xin², SHEN Jin-Shan², DU Ya-Li¹, LONG Deng-Long¹, ZHANG Qi¹, LIU Jin-Jia¹, WANG Chun-Mei¹, LAN Jun¹, FENG Yu-Jia¹, JIANG Yu-Suo^{1*} (1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi Province, China; 2. Shaixi Agricultural University, Horticulture Institute, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030800, Shanxi Province, China)

Abstract: PLA2 plays an important role in regulating the cell physiological functions such as cell membrane fluidity and membrane protein activity. Environmental stress such as high temperature has a great influence on the physiological metabolism of cells, and its regulation in the process of anti-reverse organisms has been receiving much attention. According to the PLA2 gene sequence of *Apis cerana cerana*, the protein structure was predicted, and its expression difference at different temperature and different high temperature stress time was analyzed to reveal the physiology of this gene in the process of *Apis cerana*

基金项目: 现代农业产业技术 (蜜蜂) 体系建设 (CARS-44-KXJ23); 山西省农业科学院农业科技创新基金 (YCX2018203); 山西省高等教育振兴计划暨 1331 工程

作者简介: 李新宇, 男, 博士, 研究方向为蜜蜂生物学, E-mail: lixinyu0019@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence: 姜玉锁, 男, 教授, 研究方向为蜜蜂生物学, E-mail: jiangys-001@163.com

收稿日期 Received: 2019-10-14; 接受日期 Accepted: 2019-12-13

cerana against high temperature. *PLA2* gene of *A. cerana cerana* contained 745 bp open reading frame encoding 169 amino acids with a molecular weight of 19.3 kDa, no transmembrane structure, and no membrane protein. The amino acid homologous sequence alignment showed that the *PLA2* sequence had the highest similarity with the honeybee insects, and the similarity with other Hymenoptera insects. The results of qRT-PCR showed that the expression of *PLA2* was higher at 35, 40 and 45°C, and higher temperature could induce the increase of the expression of the gene. At the same time, the expression of *PLA2* was affected by the time of high temperature stress, and the long-term high temperature stress caused the expression of *PLA2* gene to increase. The results showed that *PLA2* played important physiological functions in *Apis cerana cerana* in response to high temperature stress.

Key words: *Apis cerana cerana*; *PLA2*; high-temperature stress; expression pattern

磷脂酶 A2 (*PLA2*) 于动物各组织的细胞膜及线粒体膜上广泛分布, 其作用底物主要是磷脂, 可将其分解为溶血磷脂和脂肪酸 (Owen *et al.*, 1990; Kelley *et al.*, 1992)。磷脂是细胞膜和细胞器膜的重要组成部分, 因此, *PLA2* 能对细胞膜的流动性、膜蛋白活性等细胞生理功能产生重要的影响, 同时水解磷脂会产生脂肪酸, 它是许多重要代谢途径的参与者 (Keiji *et al.*, 2000; Macphee, 2001)。因此, *PLA2* 对于脂类代谢调节以及生物膜功能有重要意义。根据作用部位、钙离子依赖性, 可将 *PLA2* 分为 4 类: 分泌型、胞质型、不依赖 Ca^{2+} 型和 PAF (血小板激活因子) - *PLA2* (陈莉延等, 2000; 林芳等, 2001)。近些年来, 已有人对蜜蜂 *PLA2* 的基因结构、酶活性, 蛋白晶体结构等方面进行了一系列研究。Scott 等人 (1990) 首先应用 X 衍射方法获得了意大利蜜蜂 *PLA2* 的晶体结构, 确定了意大利蜜蜂 *PLA2* 的 5 个二硫键位置、 Ca^{2+} 结合位点和酶活性中心等。随后 Li 等人 (2005) 对意大利蜜蜂 *PLA2* 基因进行了研究, 克隆了该基因, 结果显示其核苷酸序列全长 405 bp, 编码 134 个氨基酸残基, 分子量为 14.7 kDa, 并包含 4 个外显子和 3 个内含子。而沈立荣等 (2002, 2004) 又对 *PLA2* 的生物活性进行了探究, Western blot 分析结果表明表达产物与天然 *PLA2* 具有相同的生物学活性。

细胞膜的动力学特性对于生物体是至关重要的, 细胞膜的完整性保证了神经系统能正常发挥其功能 (Sens and Plastino, 2015; Repasky and Black, 2015)。温度的升高, 使得细胞膜内的饱和脂肪酸比例升高, 不饱和脂肪酸比例下降, 这导致细胞膜流动性下降, 细胞的相关生理功能受到影响 (Rensing and Ruoff, 2002; Mark Rütgers *et al.*, 2017)。研究发现在高温作用下, 昆虫体内

会产生热激蛋白抵御高温压力 (Garrido *et al.*, 2012), 而一些热休克蛋白则能够激活 *PLA2*, 导致细胞膜 *PLA2* 活性增加, 促进水解反应, 扰乱细胞膜代谢和神经信号传递, 使得虫体遭受损伤 (Mahalka *et al.*, 2011)。因此, 高温引起蜜蜂脂质和脂肪酸的代谢紊乱, 进而影响细胞膜代谢和神经信号传递, 这可能是蜜蜂高温下死亡的重要原因 (Coggins *et al.*, 2011)。这说明高温下 *PLA2* 的表达增加是机体对高温胁迫响应的重要标志。

中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 作为我国本土蜂种, 在维持我国生态环境平衡中发挥着至关重要的作用 (Zhang *et al.*, 2014), 与引入品种西方蜜蜂相比, 具有嗅觉灵敏、善于采集零星蜜源、抗逆性和抗螨能力强等优点 (曾志将等, 2002; 杨冠煌等, 2005)。对中华蜜蜂 *PLA2* 基因进行相关生物信息学分析, 并测定其在不同温度及高温不同胁迫时间下的表达模式, 以期揭示 *PLA2* 在中华蜜蜂应对高温胁迫时的生理功能, 同时为蜜蜂耐热性的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

样品采自山西农业大学动物科技学院实验蜂场饲养的中华蜜蜂。试验蜂群选取条件: 群势较强、健康无病、无自然分蜂趋势, 共 3 群。每群各选取 1 ~ 2 张老熟的封盖子脾, 在 34°C 和 RH 75% 的条件下孵育。待幼蜂出房后, 用标记颜料 (无毒、无味) 在幼蜂背部标记, 分两次标记, 每次每群标记 500 头, 之后将这些标记的幼蜂放回原来的蜂群, 在第 20 天时进行采样。

高温处理时, 将蜜蜂放置在扎有小孔的 15 mL 离心管中, 每管放置 1 头蜜蜂, 迅速将其放入恒

温恒湿箱中, 温湿度设置为: RH 30%, 温度分别为 25℃、30℃、35℃、40℃和 45℃。2 h 后立即将每组随机选择的 30 头蜜蜂迅速投入液氮中, 随后于 -80℃保存备用。在高温 45℃, RH 30% 条件下分别处理 0.5 h、1 h、1.5 h 和 2 h, 其中, 0 h 处理的蜜蜂直接采自蜂箱中, 处理后, 立即将每组随机选择的 30 头蜜蜂迅速投入液氮中, -80℃保存备用。

1.2 主要试剂与仪器

Trizol 试剂盒 (Ambion), PrimeScript™ RT-PCR reagent Kit 试剂盒 (TaKaRa), SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒 (TaKaRa); 氯仿、异丙醇、无水乙醇等常规试剂均购自武汉博士德生物工程有限公司。

AB-9902 型触摸式 PCR 仪 (AB), 7500FAST 型荧光定量 PCR 仪 (ABI), ND-4000 核酸蛋白测定仪, (Nanodrop) Universal Hood II 核酸蛋白成像仪 (BIO-RAD), 5810R 高速冷冻离心机 (Eppendorf)。

1.3 提取 RNA 和 cDNA 第一链的合成

样品液氮研磨后, 使用 Trizol 试剂盒提取各样品总 RNA, 在 1.5% 琼脂糖凝胶上监测每种样品的 RNA 降解和污染情况。使用核酸蛋白测定仪测定提取 RNA 的浓度。再根据 PrimeScript™ RT-PCR reagent Kit 试剂盒, 将 RNA 反转录为 cDNA 模板。

1.4 引物设计

以东方蜜蜂全基因组测序数据为基础, 通过 Blast 比对筛选出中华蜜蜂 *PLA2* 基因, 根据所得序列的 CDS 区使用 Primer 3 软件设计 RT-qPCR 引物。

β -actin 用作内标, 引物由通用生物系统 (安徽) 公司合成。

表 1 RT-qPCR 引物序列
Table 1 Primer sequence of RT-qPCR

基因 Gene	引物序列 Primer sequence	用途 Purpose
<i>PLA2</i>	F: TCGTTCTCGGATCCTTGTTTC R: TTATCCGTTTCCTCCAACCTCG	qRT-PCR
β -actin	F: ACTACGGCCGAACGTGAAAT R: GGAAAAGAGCCTCGGGACAA	qRT-PCR

1.5 荧光定量 PCR 反应

将反转录合成的 cDNA 模板稀释 5 倍后, 使用 SYBR Premix Ex Taq™ II 试剂盒进行实时荧光定量 PCR 实验。反应体系总体积为 20 μ L, 含 cDNA 模板 2 μ L, SYBR Premix Ex Taq™ II (2 $\times$) 10 μ L, ROX Reference Dye II (50 $\times$) 0.4 μ L, 上、下游引物各 0.8 μ L, ddH₂O 6 μ L。qRT-PCR 热循环程序如下: 95℃预变性 30 s, 95℃变性 5 s, 60℃退火及延伸 34 s, 45 个循环。每个组织样本重复测定 3 次。

1.6 序列分析

利用各类生物信息学软件对中华蜜蜂 *PLA2* 的序列进行预测分析, 所用各软件如表 2。

表 2 生物信息学分析所用软件
Table 2 Software for bioinformatic and phylogenetic analyses

序列性质 Sequence properties	工具 Tool	网址/软件 Website/Software
同源序列比对	NCBI 数据库	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/
蛋白理化性质	protparam	http://web.expasy.org/protparam/
信号肽结构预测	SignalP 4.1	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
跨膜区预测	TMHMM 2.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/
糖基化位点预测	NetNGlyc 1.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/
磷酸化位点预测	NetPhos 3.1	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/
蛋白二级结构预测	predictprotein	https://www.predictprotein.org/
蛋白三级结构预测	Swiss model	http://swissmodel.expasy.org/interactive
进化树构建	MEGA 6	MEGA version 6

1.7 数据统计与分析

荧光定量 PCR 中, 根据标准曲线以及荧光曲线的 Ct 值, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行数据分析。运用 SPSS 21.0 软件中的 Kruskal-Wallis H 进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 中华蜜蜂 *PLA2* 编码蛋白分析

对中华蜜蜂 *PLA2* 基因序列进行分析后发现, *PLA2* 开放阅读框 (ORF) 全长 745 bp, 编码 169 个氨基酸, 分子量为 19.3 kDa 包含 20 种常见氨基酸, 其中 Gly 和 Leu 含量最高 (8.9%), Gln 含量最低 (1.8%), 等电点为 7.01, 脂溶指数为 64.02, 平均亲水力为 -0.502, 不稳定系数为 23.67, 说明中华蜜蜂 *PLA2* 蛋白结构稳定。

2.2 中华蜜蜂 *PLA2* 的信号肽、跨膜结构、糖基化位点、磷酸化位点预测

中华蜜蜂 *PLA2* 信号肽及跨膜结构预测结果显示其 1~20 位氨基酸的 S 值均大于阈值 0.5, 表明其信号肽区域为第 1~20 位氨基酸的片段 (图 1)。中华蜜蜂 *PLA2* 各氨基酸的预测值均大于阈值 1, 表明中华蜜蜂 *PLA2* 无跨膜结构域, 其不属于膜蛋白 (图 2)。中华蜜蜂 *PLA2* 蛋白糖基化位点预测结果表明, 该蛋白 Thr⁶² 的 O 糖基潜力值为 0.517, 高于阈值 0.5, 说明中华蜜蜂 *PLA2* 存在 O 糖基化位点, 但未预测到带相应的 N 糖基化位点 (图 3)。中华蜜蜂 *PLA2* 蛋白磷酸化位点预测结果表明: 中华蜜蜂 *PLA2* 存在磷酸化位点, 且出现在

丝氨酸 Ser、苏氨酸 Thr 以及酪氨酸 Tyr 这 3 种氨基酸残基上。其共包含 13 个磷酸化位点, 包括 Ser⁷、Ser¹⁶、Thr¹⁷、Thr⁴¹、Ser⁷⁷、Ser⁸¹、Thr⁸⁶、Ser⁹⁵、Thr¹⁰¹、Tyr¹⁰³、Ser¹¹⁵、Tyr¹⁵¹、Thr¹⁵² (图 4)。

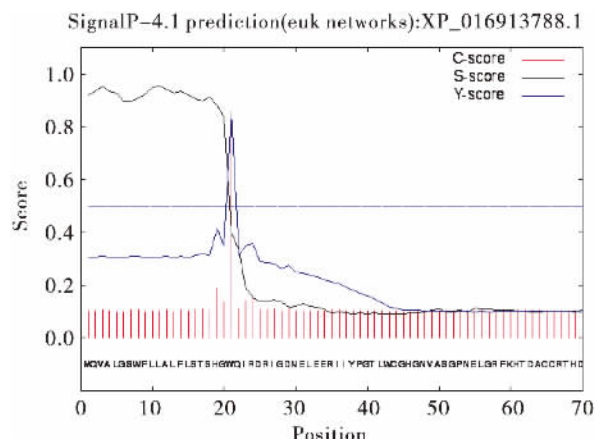


图 1 中华蜜蜂 *PLA2* 信号肽结构的预测

Fig. 1 Predicted signal peptide of AcerPLA2

2.3 中华蜜蜂 *PLA2* 蛋白二级结构和三级结构

中华蜜蜂 *PLA2* 蛋白二级结构的预测结果显示: 中华蜜蜂 *PLA2* 的二级结构由 α 螺旋 (helices)、股 (strand) 和环 (loops) 3 种结构组成, 所占比例分别为 11.83%、21.89% 和 66.27%。中华蜜蜂 *PLA2* 的三级结构中主要的结构有 α 螺旋和 β 折叠 (图 5)。

2.4 中华蜜蜂 *PLA2* 的进化树分析

系统进化树结果表明, 中华蜜蜂 *PLA2* 序列与蜜蜂科昆虫的相似性最高。而中华蜜蜂 *PLA2* 与其他膜翅目昆虫的相似性存在差异, 表明其具有较高的变异性 (图 6)。

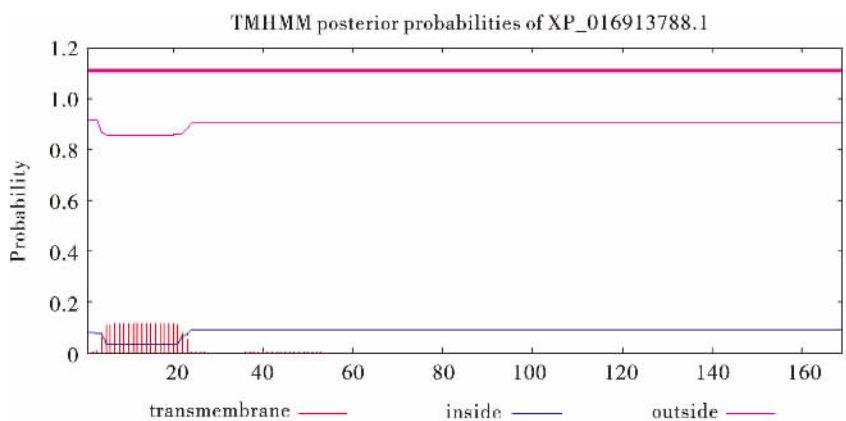


图 2 中华蜜蜂 *PLA2* 跨膜结构的预测

Fig. 2 Predicted transmembrane regions of AcerPLA2

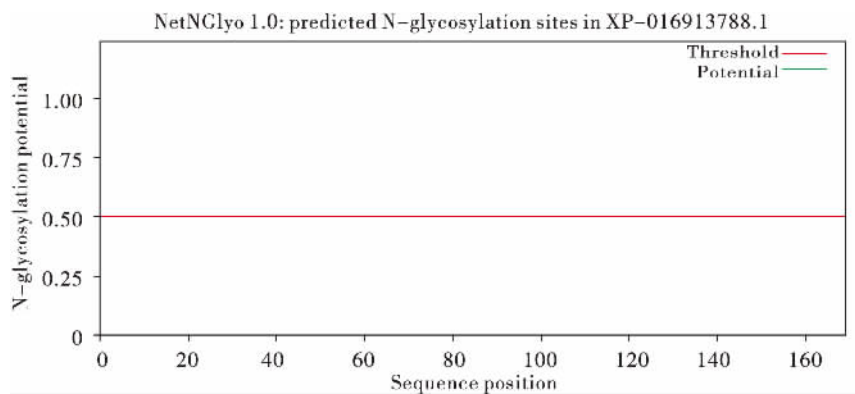


图3 中华蜜蜂 PLA2 糖基化位点的预测

Fig. 3 Predicted glycosylation of AcerPLA2

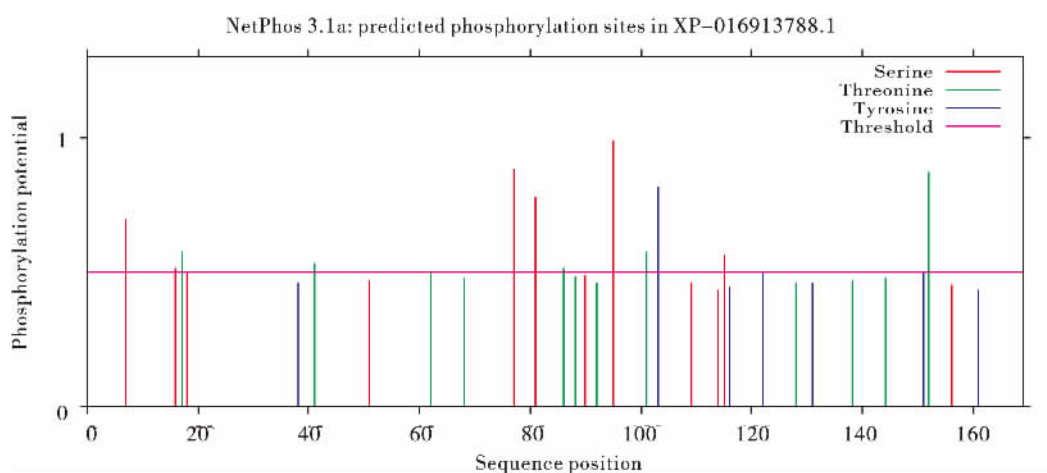


图4 中华蜜蜂 PLA2 磷酸化位点的预测

Fig. 4 Predicted phosphorylation sites of AcerPLA2

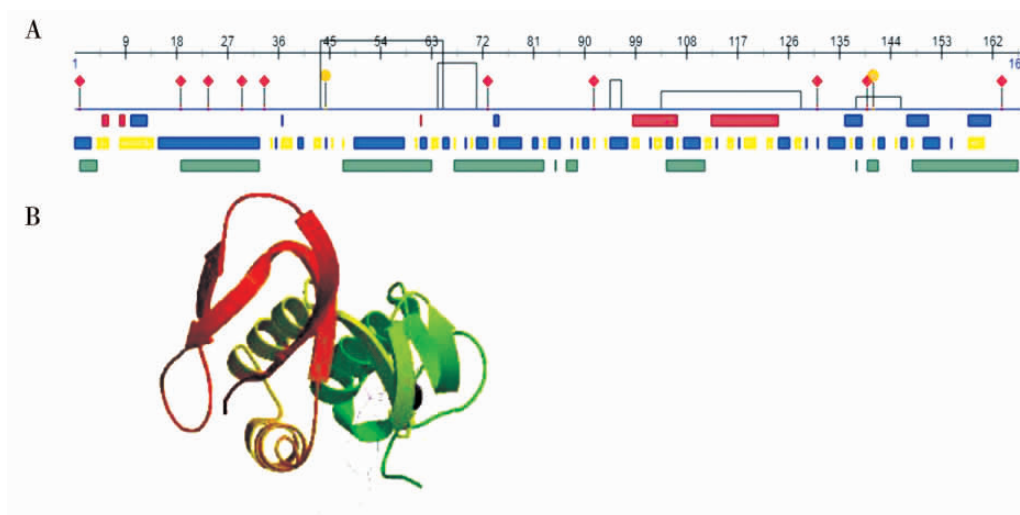


图5 中华蜜蜂 PLA2 二级结构和三级结构的预测

Fig. 5 Predicted secondary and tertiary structure of AcerPLA2

注: A, 中华蜜蜂 PLA2 的二级结构; B, 中华蜜蜂 PLA2 的三级结构。Note: A, secondary structure of AcerPLA2; B, tertiary structure of the AcerPLA2.

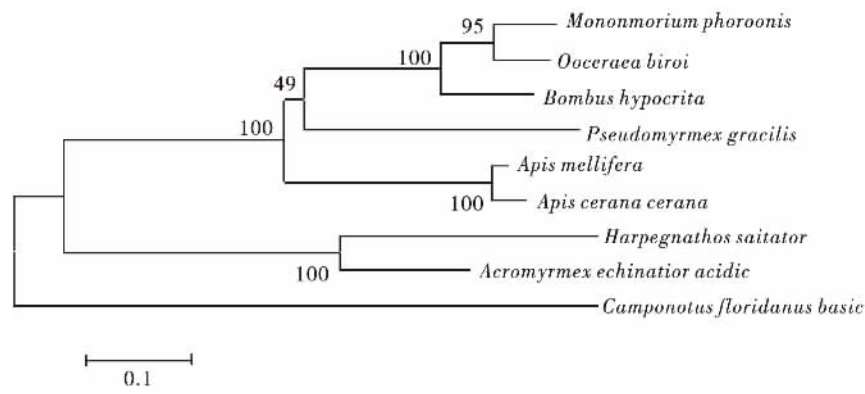


图 6 不同昆虫 PLA2 氨基酸序列所构建的系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree of PLA2 from different insect species based on amino acid sequences

注: PLA2 序列来源: 中华蜜蜂 *Apis cerana cerana*, AF321087.1; 西方蜜蜂 *Apis mellifera*, NM 001011614.1; 小峰熊蜂 *Bombus hypocrita*, JF751030.1; 毕氏卵角蚁 *Ooceraea biroi*, XM 011337410.3; 佛罗里达弓背蚁 *Camponotus floridanus*, XM 025413770.1; 小家蚁 *Monomorium pharaonis*, XM 012687703.2; 跳镰猛蚁 *Harpegnathos saltator*, XM 025307483.1; 切叶蚁 *Acromyrmex echinator*, XM 011055015.1; 细伪切叶蚁 *Pseudomyrmex gracilis*, XM 020439241.1

2.5 中华蜜蜂 PLA2 在不同温度胁迫下的表达

中华蜜蜂 PLA2 在各温度下的相对表达量显示 PLA2 mRNA 表达量受高温影响, 其中在 35℃、40℃ 和 45℃ 时表达量较高, 且在 35℃ 时表达量最高 (图 7)。

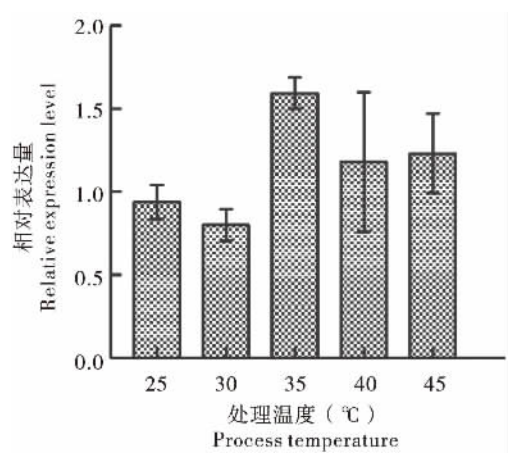


图 7 中华蜜蜂 PLA2 在不同温度胁迫时的相对表达量

Fig. 7 Relative expression levels of PLA2 mRNA in response to different temperature treatments

注: 图中数据为平均值 ± 标准误。下图同。Note: Data were mean ± SE. The same below.

2.6 中华蜜蜂 PLA2 在不同胁迫时间下的表达

中华蜜蜂 PLA2 在不同胁迫时间下的相对表达量表明 (图 8): 较长时间的胁迫能导致 PLA2 mRNA 表达量的升高, 其中在 1 h、1.5 h 和 2 h 表达量较高, 且在 1 h 达到最高的表达水平。

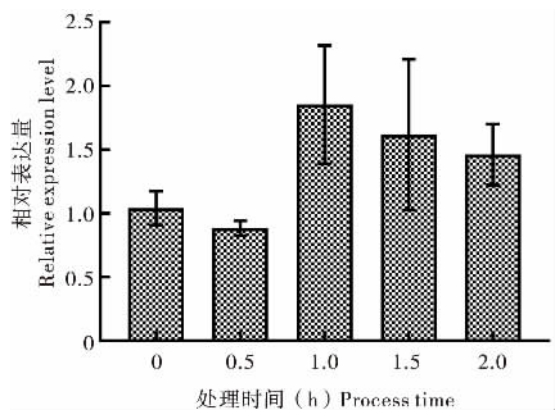


图 8 中华蜜蜂 PLA2 在不同胁迫时间下的相对表达量

Fig. 8 Relative expression levels of PLA2 mRNA in response to different process time

3 结论与讨论

PLA2 在生物界广泛分布, 人们已经从多种植物、动物、微生物中分离得到。PLA2 能影响细胞膜的流动性以及膜蛋白活性。本研究发现中华蜜蜂 PLA2 无跨膜结构域, 不属于膜蛋白, 所以 PLA2 对细胞膜的影响需要其他蛋白参与, 它们与 PLA2 协同作用。研究发现 Hsp70 在有 ATP 和 Mg^{2+} 的条件下可以在体外激活 PLA2 (Calderwood *et al.*, 1993)。通过序列比对发现中华蜜蜂 PLA2 的序列与蜜蜂科昆虫的相似性最高, 而与其他膜翅目昆虫相似性存在差异, 这可能与昆虫的生活环境和习性有关。

高温等环境压力能激活 PLA2, 并提高其活性从而对细胞的生理代谢产生影响。因此, PLA2 是生物体遭受压力胁迫的重要标志物, 其在生物体抗逆过程中的调控作用一直受到研究者的关注。许多报道表明热刺激会导致细胞外的大量 Ca^{2+} 流入细胞内, 使得细胞内 Ca^{2+} 的浓度快速增加 (Kamano *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016; Dong *et al.*, 2017)。PLA2 的 N-末端有一钙离子结合 (CaLB) 区域, 是 Ca^{2+} 作用的部位。细胞内 Ca^{2+} 的浓度是热休克基因转录激活的关键因素, 是热激转录因子 (HSF) 与这些基因启动子中 HSE 元件结合所必需的 (Jeans *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2018; Isaković *et al.*, 2019)。 Ca^{2+} 在热休克基因中的作用进一步表明 Ca^{2+} 参与热休克基因的转录。PLA2 和热休克蛋白都表现出对 Ca^{2+} 的高度敏感性, 热休克期间细胞 Ca^{2+} 的变化对于控制具有显著调节活性的热休克蛋白的翻译后修饰具有重要的作用 (Wen *et al.*, 2015)。同时, 热休克蛋白能够通过 Ca^{2+} 浓度的增加激活 PLA2, 例如 hsp 28 通过细胞 Ca^{2+} 的增加, 激活磷脂酶 C 的配体 (Landry *et al.*, 1992)。本研究结果表明 PLA2 基因在不同温度下的表达模式存在差异, 高温能提高 PLA2 的表达水平, 中华蜜蜂 PLA2 的表达受高温胁迫的诱导, PLA2 在 25℃ 和 30℃ 处理下表达量较低, 而在 35℃、40℃ 和 45℃ 处理下表达量较高, 这说明 PLA2 能对高温胁迫做出快速的响应。本研究中高温下不同胁迫时间处理结果发现, 中华蜜蜂 PLA2 基因的表达受胁迫时间的诱导, PLA2 在高温处理 0 h 和 0.5 h 时表达量较低, 1 h 时达到最高的表达水平, 较长时间的高温胁迫可以导致 PLA2 表达增多。

PLA2 的功能除了分解细胞膜上的卵磷脂外, 还调节体内磷脂类物质平衡, PLA2 是多种脂类物质 (花生四烯酸、溶血磷脂酸) 产生的限速酶 (Yoshida *et al.*, 2010; Sinderewicz *et al.*, 2017), 由于 PLA2 可以通过其水解产物影响质膜 H^+ 转运并且改变离子通透性, 使得细胞内 Ca^{2+} 水平提升, 从而对细胞相关生理功能产生影响。相关实验发现: 细胞在遭受一些环境胁迫后会发生非即时性的死亡。由于 PLA2 可能令溶酶体膜和线粒体膜不稳定, 而不利的环境胁迫常常会激活 PLA2, 进而导致细胞延迟性死亡 (Zheng *et al.*, 2016)。高温诱导 PLA2 的活化可能是高温导致机体损伤的重要原因, 该推断还需要接下来进一步的深入研究。

参考文献 (References)

- Calderwood SK, Stevenson MA. Inducers of the heat shock response stimulate phospholipase C and phospholipase A2 activity in mammalian cells [J]. *Journal of Cellular Physiology*, 1993, 155 (2): 248–256.
- Chen LY, Liang B. Research progress of phospholipase A2 [J]. *Foreign Medical Physiology and Pathology Science and Clinical Volume*, 2000, 20 (6): 473–476. [陈莉延, 梁标. 磷脂酶 A2 的研究进展 [J]. 国外医学生理病理科学与临床分册, 2000, 20 (6): 473–476]
- Coggins BL, Collins JW, Holbrook KJ, *et al.* Antioxidant capacity, lipid peroxidation, and lipid composition changes during long-term and short-term thermal acclimation in *Daphnia* [J]. *Comp. Physiol. B*, 2017, 187 (8): 1091–1106.
- Dong Z, Zhang C, Chen Y, *et al.* Astragaloside-IV protects against heat-induced apoptosis by inhibiting excessive activation of mitochondrial Ca^{2+} uniporter [J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2017, 42 (2): 480–494.
- Garrido C, Paul C, Seigneure R, *et al.* The small heat shock proteins family: The long forgotten chaperones [J]. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2012, 44 (10): 1588–1592.
- Huang W, Li H, Cheng C, *et al.* Analysis of the transcriptome data in *Litopenaeus vannamei* reveals the immune basis and predicts the hub regulation-genes in response to high-pH stress [J]. *PLoS ONE*, 2018, 13 (12): e0207771.
- Isaković J, Gorup D, Mitrečić D. Molecular mechanisms of microglia and astrocyte-driven neurorestoration triggered by application of electromagnetic fields [J]. *Croatian Medical Journal*, 2019, 60 (2): 127–140.
- Jeans AF, Van Heusden FC, Al-Mubarak B, *et al.* Homeostatic presynaptic plasticity is specifically regulated by P/Q-type Ca^{2+} channels at mammalian hippocampal synapses [J]. *Cell Reports*, 2017, 21 (2): 341–350.
- Kamano S, Ikeda S, Sugimoto M, *et al.* The effects of calcitonin on the development of and Ca^{2+} levels in heat-shocked bovine preimplantation embryos in vitro [J]. *Journal of Reproduction and Development*, 2014, 60 (4): 317–323.
- Keiji T, Zenya I, Shigeki T, *et al.* The contribution of phospholipase A2 to the cochlear dysfunction induced by transient ischemia [J]. *Hearing Research*, 2000, 144: 1–7.
- Kelley MK, Crowl RM, Dennis EA. Renaturation of cobra venom phospholipase A2 expressed from synthetic gene in *Escherichia coli* [J]. *Biochim. Biophys. Acta*, 1992, 1118 (2): 107–115.
- Landry J, Lambert H, Zhou M, *et al.* Human hsp27 is phosphorylated at serines 78 and 82 by heat shock and mitogen-activated kinases that recognize the same amino acid motif as S6 kinase II [J]. *J. Biol. Chem*, 1992, 267: 794–803.
- Li JH, Zhang CX, Shen LR, *et al.* Expression and regulation of phospholipase A2 in venom gland of the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana* [J]. *Arch. Insect. Biochem. Physiol*, 2005, 60 (1): 1–12.

- Lin F, Xu ZH, Xue HW. Phospholipases in signaling transduction of higher plants [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2001, 10: 990 – 1002. [林芳, 许智宏, 薛红卫. 植物信号传导中的磷脂酶 [J]. 植物学报, 2001, 10: 990 – 1002]
- Macphee CH. Lipoprotein – associated phospholipase A2: A potential new risk factor for coronary artery disease and a therapeutic target [J]. *Current Opinion in Pharmacology*, 2001, 1: 121 – 125.
- Mahalka AK, Code C, Rezaijahromi B, et al. Activation of phospholipase A2 by hsp70 *in vitro* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1808 (10): 2569 – 2572.
- Mark Rütgers, Muranaka LS, Schulz – Raffelt M, et al. Not changes in membrane fluidity but proteotoxic stress triggers heat shock protein expression in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Plant Cell and Environment*, 2017, 40 (12): 2987 – 3001.
- Owen MD, Pfaff LA, Reisman RE, et al. Phospholipase A2 in venom extracts from honey bees (*Apis mellifera* L.) of different ages [J]. *Toxicon*, 1990, 28 (7): 813 – 820.
- Rensing L, Ruoff P. Temperature effect on entrainment, phase shifting, and amplitude of circadian clocks and its molecular bases [J]. *Chronobiology International*, 2002, 19 (5): 807 – 864.
- Repasky EA, Black JD. Dynamic properties of the lymphocyte membrane-cytoskeleton: Relationship to lymphocyte activation status, signal transduction and protein kinase C [J]. *Current Topics in Membranes*, 2015, 43: 313 – 343.
- Scott DL, Otwinowski Z, Geib MH. Crystal structure of bee-venom phospholipase A2, a complex with a transition-state analogue [J]. *Science*, 1990, 250 (4987): 1563 – 1566.
- Sens P, Plastino J. Membrane tension and cytoskeleton organization in cell motility [J]. *Journal of Physics Condensed Matter*, 2015, 27 (27): 273103.
- Shen LR, Cheng JA, Zhang CX, et al. Expression of a bee-venom phospholipase A2 gene from *Apis mellifera* in *Escherichia coli* [J]. *Journal of Zhejiang University*, 2004, 30 (1): 89 – 92. [沈立荣, 程家安, 张传溪, 等. 意大利蜜蜂毒磷脂酶 A2 基因在大肠杆菌中的表达 [J]. 浙江大学学报, 2004, 30 (1): 89 – 92]
- Shen LR, Zhang CX, Cheng JA. Cloning and sequencing analysis of gene encoding hyaluronidase from the venom of *Apis mellifera* [J]. *Journal of Zhejiang University*, 2002, 28 (3): 289 – 292. [沈立荣, 张传溪, 程家安. 意大利蜜蜂毒透明质酸酶基因的克隆及序列分析 [J]. 浙江大学学报, 2002, 28 (3): 289 – 292]
- Sinderewicz E, Grycmacher K, Boruszewska D, et al. Expression of factors involved in apoptosis and cell survival is correlated with enzymes synthesizing lysophosphatidic acid and its receptors in granulosa cells originating from different types of bovine ovarian follicles [J]. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2017, 15 (1): 72.
- Wen J, Li H, Zhang Y, et al. Modification of HSP proteins and Ca^{2+} are responsible for the no – derived peroxynitrite mediated neurological damage in PC12 cell [J]. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2015, 8 (5): 4492 – 4502.
- Yang GH. Harm of introducing the western honeybee *Apis mellifera* L. to the Chinese honeybee *Apis cerana* F. and its ecological impact [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2005, 48 (3): 401 – 406. [杨冠煌. 引入西方蜜蜂对中蜂的危害及生态影响 [J]. 昆虫学报, 2005, 48 (3): 401 – 406]
- Yoshida K, Shinohara H, Haneji T, et al. Arachidonic acid inhibits osteoblast differentiation through cytosolic phospholipase A2 – dependent pathway [J]. *Oral Diseases*, 2010, 13 (1): 32 – 39.
- Zeng ZJ. Beekeeping [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2002. [曾志将. 养蜂学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.]
- Zhang X, Ren A, Li MJ, et al. Heat stress modulates mycelium growth, HSP expression, ganoderic acid biosynthesis and hyphal branching of *Ganoderma lucidum* via cytosolic Ca^{2+} [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2016, 82 (14): 4112.
- Zhang Y, Liu Y, Guo X, et al. sHsp22.6, an intronless small heat shock protein gene, is involved in stress defence and development in *Apis cerana cerana* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2014, 53: 1 – 12.
- Zheng HD, Cui DJ, Quan XJ, et al. Lp-PLA2 silencing protects against ox-LDL-induced oxidative stress and cell apoptosis via Akt/mTOR signaling pathway in human THP1 macrophages [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016, 477 (4): 1017 – 1023.