网络出版时间:2025-09-10 DOI:10.13207/j.jnwafu.2026.03.012

天蚕素酵母菌体微胶囊制备及其在肠炎防治中的应用

曹颖[1],蔡畅[1],杜丽宏[1],张婷婷[2],朱宇飞[3,4],
麻啸涛[3,4],杨小军[1],魏泽辉[1],徐坤[1]

(1 西北农林科技大学 动物科技学院,陕西 杨凌 712100;2 山西大学 合成生物学学院,山西 太原 030006;
3 山西大禹生物工程股份有限公司,山西 运城 044000;4 大禹生物(西安)产业发展研究院,陕西 西安 710000)

[摘 要] 【目的】开发天蚕素(cecropin)酵母菌体微胶囊(yeast-cell microcapsules,YCM),用于肠炎的防治,为"减抗"和"替抗"提供新策略。【方法】以酿酒酵母为载体,构建可表达天蚕素的真核表达载体,并通过醋酸锂转化法制备天蚕素 YCM。利用荧光显微镜观察天蚕素-EGFP 融合蛋白的表达;通过体外抑菌试验、胃肠液耐受性试验、肠道滞留时间试验检测天蚕素 YCM 的体外抑菌活性、对胃肠液耐受性及在肠道中的滞留时间。构建结肠炎小鼠模型,饲喂天蚕素 YCM 7 d 后评估天蚕素 YCM 对结肠长度和组织结构的影响,并通过 16S rDNA 测序分析天蚕素 YCM 对肠道菌群的影响。【结果】成功构建了 8 种天蚕素真核表达载体,并制备了具有分泌天蚕素能力的 YCM。体外试验表明,天蚕素 YCM 对常见肠道致病菌具有抑菌活性,且在模拟胃肠液中表现出良好的耐受性。体内试验显示,天蚕素 YCM 可在小鼠肠道中滞留至少 14 d,并可显著改善结肠炎小鼠的肠黏膜损伤程度,增大结肠长度,维持肠道菌群稳态。【结论】研制了天蚕素酵母菌体微胶囊,其在防治肠炎方面具有明显效果。

[关键词] 抗菌肽;天蚕素;酵母菌体微胶囊;肠炎;肠道菌群
[中图分类号] S816.73 [文献标志码] A [文章编号] 1671-9387(2026)03-0112-09

Preparation of cecropin-secreting yeast-cell microcapsules and its application in the prevention and treatment of enteritis

CAO Ying[1],CAI Chang[1],DU Lihong[1],ZHANG Tingting[2],ZHU Yufei[3,4],
MA Xiaotao[3,4],YANG Xiaojun[1],WEI Zehui[1],XU Kun[1]

(1 *College of Animal Science and Technology,Northwest A&F University,Yangling,Shaanxi* 712100,*China*;
2 *College of Synthetic Biology,Shanxi University,Taiyuan,Shanxi* 030006,*China*;3 *Shanxi Dayu Bioengineering Co.,Ltd,Yuncheng,Shanxi* 044000,*China*;4 *Dayu Bioengineering (Xi'an) Industrial Development Research Institute,Xi'an,Shaanxi* 710000,*China*)

Abstract:【Objective】The study aims to develop yeast-cell microcapsules (YCM) based on cecropin for the prevention and treatment of enteritis,to provide new strategies for reduction and replacement of antibiotics.【Method】Using *Saccharomyces cerevisiae* as the carrier,eukaryotic expression vectors for cecropin secretion were constructed,and cecropin YCM was prepared by the lithium acetate transformation method. The expression of the cecropin-EGFP fusion protein was observed via fluorescence microscopy. The *in vitro* antibacterial activity,gastrointestinal fluid tolerance,and intestinal residence time of cecropin

[收稿日期] 2024-10-21 [修回日期] 2024-12-10
[基金项目] 陕西省重点研发计划项目(2024NC-YBXM-098,2021NY-027);大禹生物研发项目(DYSW2021-023)
[作者简介] 曹颖(2002—),女,甘肃酒泉人,在读硕士,主要从事酵母基因工程技术研究。E-mail:caoying@nwafu.edu.cn
[通信作者] 徐坤(1974—),男,河南周口人,副教授,博士生导师,主要从事基因编辑技术创新与应用研究。
E-mail:xukunas@nwafu.edu.cn

YCM were assessed through corresponding tests. A colitis mouse model was established, and after 7 days of cecropin YCM feeding, the effects of cecropin YCM on colon length and tissue structure were evaluated. The impact of cecropin YCM on the gut microbiota was analyzed through 16S rDNA sequencing.【Result】Eight types of eukaryotic expression vectors for cecropin were successfully constructed, and YCM capable of secreting cecropin was prepared. *In vitro* tests demonstrated that cecropin YCM exhibited significant antimicrobial activity against common intestinal pathogens and showed good tolerance in simulated gastrointestinal fluids. *In vivo* tests revealed that cecropin YCM could stay in the mouse intestine for at least 14 days, significantly reduce the degree of intestinal mucosal damage, increase colon length, and maintain gut microbiota homeostasis in colitis mice.【Conclusion】The cecropin-based yeast-cell microcapsules were developed in this study, which have significant effect on the prevention and treatment of enteritis.

Key words: antimicrobial peptides; cecropin; yeast-cell microcapsules; enteritis; intestinal microbiota

抗生素常被用于预防和治疗各类致病菌感染。在饲料中添加抗生素可以有效减少诸如肠炎等疫病带来的损失，然而随着抗生素的滥用，病菌的耐药性问题日益严重[1]。因此，农业农村部印发了《全国兽用抗菌药使用减量化行动方案（2021－2025 年）》，我国进入“减抗”和“替抗”的新阶段。抗菌肽（antimicrobial peptides，AMPs）是一种具有抗菌活性的小分子多肽，拥有独特的抑菌机制和广谱抑菌效果[2]，是自然防御系统的关键组成部分[3]，具有良好的“替抗”应用前景[4]。天蚕素（cecropin）是一类动物来源的抗菌肽，最早从惜古比天蚕（Hyalophora cecropia）中提取分离[5]。天蚕素存在 2 个由铰链连接的 α 螺旋，可以整合到细菌的细胞膜中，与细胞膜相互作用，从而起到杀菌的作用[6]。因此，与常见兽用抗生素相比，天蚕素更不易产生耐药性[7]。目前，天蚕素大致被分为 A、B、C、D 和 E 等 5 个家族[8]，其中天蚕素 AD（cecropin AD，CAD）融合肽和天蚕素 B（cecropin B，CB）是目前应用最广泛、研究最透彻的天蚕素[9-10]。但其仍存在生产成本高、稳定性较差等缺点，因此仍需对其进行改进和优化[11]。

酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）是一类遗传背景清晰、安全性高的益生菌，被广泛应用于食品、饲料等领域[12-13]。酿酒酵母由于对胃肠道环境具有较强的适应能力，并且其细胞壁可以激活肠道黏膜免疫系统和调节肠道菌群稳态，因此常被用作抗原递送载体和小分子药物等的口服保护剂[14]。为了进一步提升天蚕素的稳定性并维持肠道菌群稳态，本研究制备了多种具有天蚕素分泌能力的酵母菌体微胶囊（yeast-cell microcapsules，YCM），并考察其对肠炎的防治作用，以期为开发基于 YCM 的新型饲料添加剂提供理论和技术基础，为“替抗”和动物肠炎防治提供新思路。

1　材料与方法

1.1　材　料

1.1.1　质粒与菌种　重组质粒 pUC57-CAD-CB，由上海生工生物工程有限公司合成；重组质粒 JMB440-ADH1-α factor、JMB440-GAP-α factor、JMB84-CMV-T2A-EGFP 及大肠杆菌（菌株 CVCC1504）、鸡白痢沙门氏菌（菌株 CVCC519）、金黄色葡萄球菌（菌株 CVCC1882），均由山西大禹生物工程股份有限公司提供；酿酒酵母菌株 JMY31、大肠杆菌感受态细胞 DH5α，由西北农林科技大学羊遗传改良与生物育种创新团队保存。

1.1.2　试剂与仪器　LB、YPD 和孟加拉红培养基，均购自海博生物技术有限公司。酵母转化所用试剂、模拟胃肠液配制试剂及酵母质粒提取试剂盒，均购自索莱宝科技有限公司。DSS，购自翌圣生物科技股份有限公司。氨基酸缺失混合物 DO Supplement(-Leu)、限制性内切酶 *Xba* Ⅰ和 *Bam*H Ⅰ、高保真 DNA 聚合酶，均购自宝生物工程（大连）有限公司。质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒，均购自 Omega Bio-Tek 公司。T4 连接酶、伊红染液和苏木素染液，均购自赛维尔生物科技有限公司。

PCR 扩增仪、凝胶成像仪，Bio-Rad 公司。荧光显微镜，奥林巴斯集团。紫外可见分光光度计，岛津企业管理（中国）有限公司。高速离心机、微量紫外分光光度计，Thermo Fisher 公司。真空冷冻干燥机，宁波新芝冻干设备股份有限公司。

1.2　方　法

1.2.1　天蚕素基因合成及真核表达载体构建　依照酿酒酵母密码子的偏好性，对 *CAD* 和 *CB* 基因进行密码子优化，交由上海生工生物工程有限公司采

用化学法进行合成,并将其克隆至 pUC57 载体中得到 pUC57-CAD-CB 质粒。以 pUC57-CAD-CB 质粒为模板,使用 CAD-F/CAD-R 和 CB-F/CB-R 引物(表 1)对 *CAD* 和 *CB* 片段进行 PCR 扩增。对 *CAD*、*CB* 片段和载体 JMB440-ADH1-α factor、JMB440-GAP-α factor 同时进行 *Eco*R Ⅰ和 *Xba* Ⅰ双酶切,产物连接后得到 JMB440-ADH1-α factor-CAD、JMB440-ADH1-α factor-CB、JMB440-GAP-α factor-CAD 和 JMB440-GAP-α factor-CB 等 4 个天蚕素真核表达载体(图 1)。对 4 个天蚕素真核表达载体进行 *Sac* Ⅰ和 *Bam*H Ⅰ双酶切鉴定,并交由西安擎科泽西生物科技有限责任公司进行测序。

以 JMB84-CMV-T2A-EGFP 为模板,使用 EGFP-F/EGFP-R 引物(表 1)PCR 扩增 EGFP 片段,将其与前述 4 个天蚕素真核表达载体使用 *Xba* Ⅰ和 *Bam*H Ⅰ酶切后进行连接,得到 JMB440-ADH1-α factor-CAD-EGFP、JMB440-ADH1-α factor-CB-EGFP、JMB440-GAP-α factor-CAD-EGFP 和 JMB440-GAP-α factor-CB-EGFP 等 4 个天蚕素-EGFP 融合表达载体(图谱见图 1)。对 4 个天蚕素-EGFP 融合表达载体进行 *Eco*R Ⅰ和 *Bam*H Ⅰ双酶切鉴定,并交由西安擎科泽西生物科技有限责任公司进行测序。

表 1 本试验所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列(5′→3′) Primer sequence (5′→3′)	引物名称 Primer name	引物序列(5′→3′) Primer sequence (5′→3′)
CAD-F	ACAGAATTCAAGTGGAAACTATTCAA-AAAGATAGAAAAGGTT	CB-R	GCCTCTAGAACCTCGAGCGG
CAD-R	ACATCTAGACTTTGCGAGCGCG	EGFP-F	TGCTCTAGAGTGAGCAAGGGCGAG
CB-F	CGCGAATTCAACTTCAACAAGATCTT	EGFP-R	CGGGATCCTTACTTGTACAGCTCGTCCA

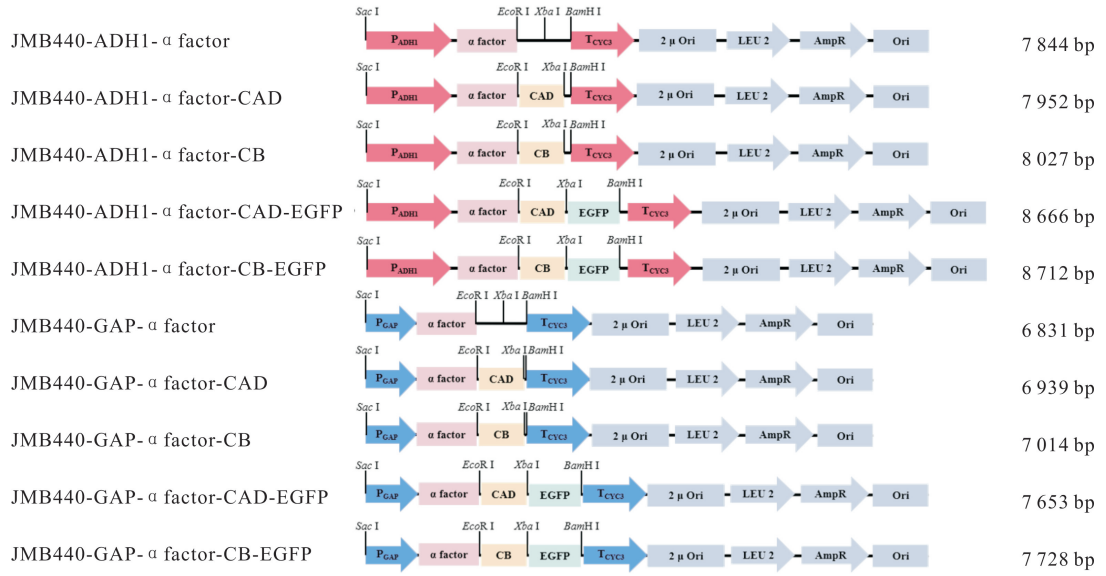


图 1 天蚕素 CAD 和 CB 真核表达载体图谱

Fig. 1 Schematic diagram of cecropin CAD/CB eukaryotic expression vectors

1.2.2 天蚕素 YCM 制备 利用醋酸锂转化法(PEG-LiAc)将构建好的 8 个表达载体和 JMB440-ADH1-α factor、JMB440-GAP-α factor 转化酿酒酵母 JMY31,在 SD-Leu 平板中 30 ℃培养 48 h 后,挑取单克隆于 SD-Leu 液体培养基中,培养至 600 nm 处吸光度(OD_{600})约为 1.0,以 JMY31 作为阴性对照。取少量菌液连续 10 倍梯度稀释 5 个梯度,每个梯度取 10 μL 在 SD-Leu 平板上点板培养,观察其生长状况,确定菌落表型。其余酵母菌液提取质粒后交由上海生工生物工程有限公司进行 Sanger 测序。所制备的 YCM 命名及转化质粒见表 2。

1.2.3 JMY31-ACADE/ACBE 和 JMY31-GCADE/GCBE 表达检测 为了进一步优化 CAD 和 CB 的表达水平,本研究使用带有 ADH1 和 GAP 启动子的载体分别表达 CAD、CB 的 EGFP 融合蛋白,并进行荧光观察。用 EGFP 表达盒验证载体在酵母中的

表达。挑取酵母 JMY31-ACADE、JMY31-ACBE、JMY31-GCADE、JMY31-GCBE 单菌落于 5 mL SD-Leu 液体培养基，200 r/min 30 ℃过夜培养，按照体积比 1∶50 的比例接种到新鲜培养基中继续培养至 OD_{600} 约为 1.0。培养物 5 000 r/min 离心 10 min，收集菌体沉淀，用预冷的 PBS 清洗 2 遍后，取 1 滴菌液置于玻片上用荧光显微镜观察，比较天蚕素 YCM 表达情况。

表 2　本研究所制备菌株

Table 2　Strains prepared in this study

菌株 Strains	转化质粒 Transformed plasmids	菌株 Strains	转化质粒 Transformed plasmids
JMY31-A	JMB440-ADH1-α factor	JMY31-G	JMB440-GAP-α factor
JMY31-ACAD	JMB440-ADH1-α factor-CAD	JMY31-GCAD	JMB440-GAP-α factor-CAD
JMY31-ACB	JMB440-ADH1-α factor-CB	JMY31-GCB	JMB440-GAP-α factor-CB
JMY31-ACADE	JMB440-ADH1-α factor-CAD-EGFP	JMY31-GCADE	JMB440-GAP-α factor-CAD-EGFP
JMY31-ACBE	JMB440-ADH1-α factor-CB-EGFP	JMY31-GCBE	JMB440-GAP-α factor-CB-EGFP

1.2.4　*天蚕素 YCM 体外抑菌活性检测*　为了证明前期制备的天蚕素 YCM 具有分泌天蚕素的能力并且对常见肠道致病菌具有抑制效果，本研究以大肠杆菌、鸡白痢沙门氏菌、金黄色葡萄球菌 3 种常见肠道致病菌作为指示菌，对 JMY31-GCAD、JMY31-GCB 和 JMY31-G 的发酵液进行体外抑菌试验。挑取重组酵母 JMY31-G、JMY31-GCAD、JMY31-GCB 单菌落于 10 mL SD-Leu 培养基，30 ℃ 下 200 r/min 振荡培养 36 h，3 000 r/min 离心 5 min 收集上清液，－80 ℃预冷冻 12 h，放入真空冷冻干燥机冻干 24 h。用 200 μL 水复溶上清液冻干样品，进行牛津杯试验，检测天蚕素 YCM 体外抑菌效果。试验设 10 mg/mL 氨苄青霉素溶液处理为阳性对照组（positive control，PC）、无菌水处理为阴性对照组（negative control，NC）。

1.2.5　*YCM 胃肠液耐受试验*　为了探究天蚕素 YCM 在胃肠道环境中的生存能力，本研究进行了 YCM 胃肠液耐受试验。按照中国药典通则 0921 附注制备人工胃液（simulated gastric fluid，SGF）和人工肠液（simulated intestinal fluid，SIF）并用孔径 0.22 μm 的过滤器过滤除菌。以 JMY31 酵母作为天蚕素 YCM 的代表，接种 JMY31 酵母单克隆于 10 mL YPD 培养基中，在 30 ℃ 下 250 r/min 的摇床中培养 10 h。取 1 mL 菌液在 3 000 r/min 条件下离心 2 min，沉淀用 ddH_2O 清洗 2 次，然后向其中分别加入 5 mL 预热的 PBS、SGF 和 SIF，于 37 ℃、250 r/min 条件下温育 4 h。取 SGF 处理后的样品 1 mL，3 000 r/min 离心 10 min 后使用无菌水重悬，再次 3 000 r/min 离心 10 min 后向其中加入 1 mL 37 ℃ 预热的 SIF，于 37 ℃、250 r/min 继续温育 4 h。将上述 4 组样品连续 10 倍梯度稀释后（10^{-1}～10^{-5}）涂布于 YPD 固体培养基，30 ℃培养 48 h 后观察菌落生长情况，统计存活菌落数，计算存活率：存活率＝（处理组存活菌落数/PBS 组存活菌落数）×100％。

1.2.6　*天蚕素 YCM 肠道滞留时间检测*　为了测试天蚕素 YCM 在肠道中的滞留时间，本研究对天蚕素 YCM 进行了肠道滞留试验。取健康的 C57 小鼠 5 只，采集粪便后混样，用 PBS 重悬稀释之后涂布于孟加拉红平板，置于 30 ℃恒温培养箱培养 72 h，观察是否有菌落生长。C57 小鼠按照 1.0×10^9 CFU/（d·只）的剂量连续灌胃天蚕素 YCM 3 d，分别在 3，5，7 和 14 d 收集小鼠粪便后混样，置于 30 ℃恒温培养箱培养 72 h，观察是否有酿酒酵母生长。

1.2.7　*天蚕素 YCM 对小鼠结肠炎的影响*　为了进一步验证天蚕素 YCM 对小鼠结肠炎的影响，本研究对硫酸葡聚糖钠盐溶液（dextran sulfate sodium salt，DSS）诱导的结肠炎模型小鼠进行了饲喂试验。将 25 只 6 周龄雌性小鼠随机分为 NC 组（饲喂无菌水）、PBS 组（饲喂 PBS）、JMY31 组（饲喂 JM31）、CAD 组（饲喂 JMY31-GCAD）和 CB 组（饲喂 JMY31-GCB）。除 NC 组小鼠外其他 4 组小鼠自由饮用 20 g/L DSS 7 d，构建小鼠结肠炎模型。从第 8 天开始，按照分组给小鼠连续饲喂给药 7 d，给药剂量为 1×10^8 CFU/（d·只）。其间连续 14 d 检测小鼠的体质量，并观察小鼠状态。第 14 天结束，禁食禁水 1 d 采集小鼠肠道粪便，交由广东美格基因科技有限公司进行 16S rDNA 测序，探究天蚕素 YCM 对结肠炎小鼠肠道菌群稳态的影响。对小鼠进行安乐死后采集结肠组织，测量其长度，并进行 HE 染色切片观察。

2　结果与分析

2.1　真核表达载体的构建与鉴定

本研究构建获得了 JMB440-ADH1-α factor-CAD、JMB440-ADH1-α factor-CB、JMB440-GAP-α

factor-CAD 和 JMB440-GAP-α factor-CB 等 4 个天蚕素真核表达载体及 JMB440-ADH1-α factor-CAD-EGFP、JMB440-ADH1-α factor-CB-EGFP、JMB440-GAP-α factor-CAD-EGFP 和 JMB440-GAP-α factor-CB-EGFP 等 4 个天蚕素-EGFP 融合表达载体，酶切鉴定产生条带均符合预期。对所得载体进行 Sanger 测序后经 Snap Gene6.0.2 同图谱比对后未见突变，确认 8 个真核表达载体均构建成功。

2.2 天蚕素 YCM 的制备与鉴定

将 8 个真核表达载体和 2 个原载体分别使用醋酸锂转化法转入酿酒酵母，得到 8 株分泌天蚕素的 YCM 和 2 株阴性对照酵母。通过 SD-Leu 平板进行表型鉴定，结果表明 10 株酵母均能够在缺少亮氨酸的平板上正常生长，且酿酒酵母 JMY31 不能在缺少亮氨酸的平板中正常生长(图 2)，表型符合预期结果，表明天蚕素 YCM 构建成功。

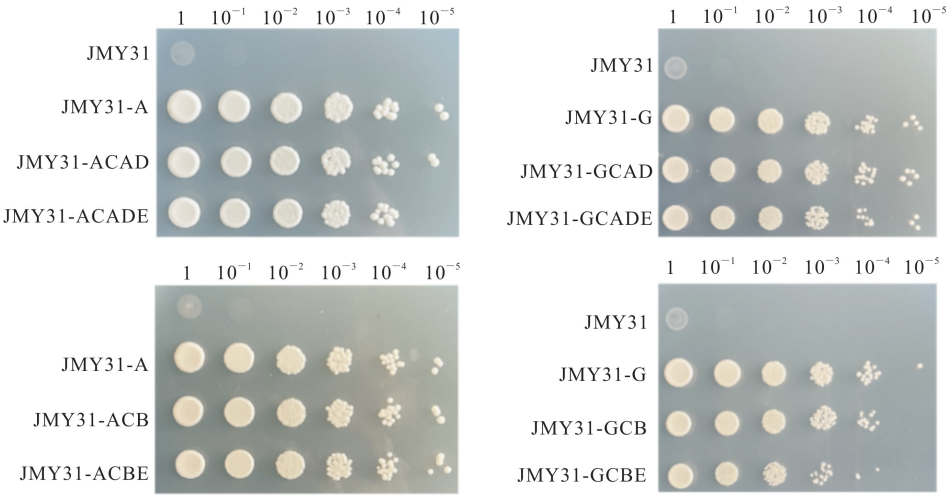


图 2 天蚕素 YCM 表型鉴定

Fig. 2 Phenotypic identification of cecropin YCM

2.3 JMY31-ACADE/ACBE 和 JMY31-GCADE/GCBE 表达检测

由图 3 可知，在酵母数量基本相同的情况下，GAP 启动子组(JMY31-GCADE 和 JMY31-GCBE)的重组酵母荧光亮度较 ADH1 启动子组(JMY31-ACADE 和 JMY31-ACBE)的重组酵母更强，表明 GAP 启动子对融合蛋白的表达较 ADH1 启动子更高效。因此选择含有 GAP 启动子的菌株进行后续研究，以提高融合蛋白的表达水平。

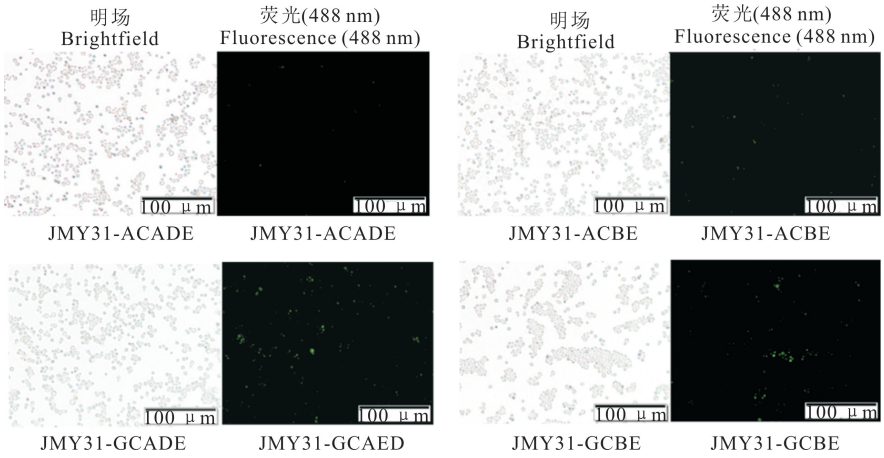


图 3 ADH1 和 GAP 启动子对天蚕素 YCM 表达的影响

Fig. 3 Effects of ADH1 and GAP promoters on cecropin YCM expression

2.4 天蚕素 YCM 的体外抑菌活性

试验结果表明，JMY31 酵母自身(JMY31-G 处理)对 3 种指示菌均具有一定的抑菌活性，当其与 CAD 或 CB 协同作用时抑菌活性明显增强(表 3)。

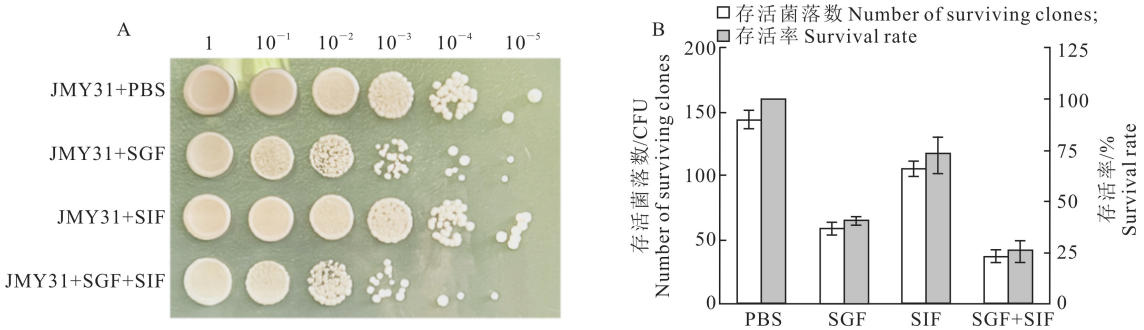
表 3　天蚕素 YCM 的抑菌效果检测

Table 3　Detection of antibacterial effect of cecropin YCM

处理 Treatments	抑菌圈直径/mm Inhibition zone diameter			占阳性对照抑菌圈直径比例/% Ratio of inhibition zone diameter to that of PC		
	大肠杆菌 *E. coli*	鸡白痢沙门氏菌 *S. pullorum*	金黄色葡萄球菌 *S. aureus*	大肠杆菌 *E. coli*	鸡白痢沙门氏菌 *S. pullorum*	金黄色葡萄球菌 *S. aureus*
JMY31-GCAD	27.08	24.93	29.89	61.05	146.13	87.96
JMY31-GCB	31.39	21.72	31.72	70.78	127.32	93.35
JMY31-G	22.53	19.33	26.35	50.80	113.31	77.55
阳性对照 PC	44.35	17.06	33.98	—	—	—
阴性对照 NC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

2.5　天蚕素 YCM 的体外胃肠液耐受性

如图 4-A 所示，SGF、SIF 和 SGF＋SIF 对酿酒酵母的生长存在一定的抑制作用，但酿酒酵母仍可以在其中存活。以 PBS 组为对照，通过梯度稀释计数，得出酿酒酵母在模拟胃液、模拟肠液和模拟胃肠液共同处理后的存活数，结果（图 4-B）表明，SGF、SIF 和 SGF＋SIF 处理 YCM 的存活菌落数显著低于 PBS 组（144 CFU）；SGF 处理组的平均存活菌落数为 59 CFU，低于 SIF 处理组的 105.7 CFU，推测这主要是由于模拟胃液的强酸性环境对酵母微胶囊的生长产生了抑制作用；SGF＋SIF 组存活菌落数最低，为 37.7 CFU。以 PBS 组为对照，计算得出酿酒酵母在模拟胃液中的存活率为 40.9%，在模拟肠液中的存活率为 73.3%，在模拟胃肠液中的存活率为 26.2%（图 4-B）。结果表明，YCM 对于胃肠道环境具有一定的耐受性，这提示天蚕素 YCM 可能对胃肠道环境具有一定的耐受性。



A. YCM 在模拟胃肠液中的耐受情况；B. SGF、SIF、SGF＋SIF 和 PBS 存活菌落数及存活率。

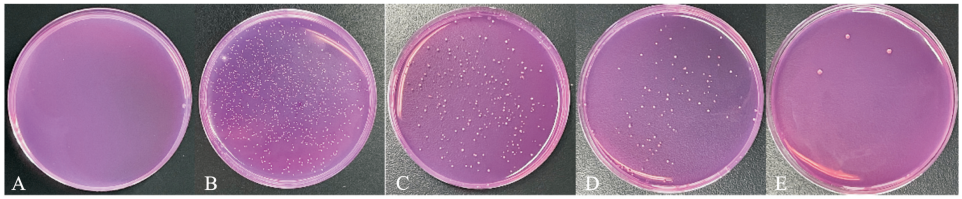
A. YCM tolerance in SGF and SIF; B. The number of surviving colonies and survival rates in SGF, SIF, SGF＋SIF, and PBS.

图 4　YCM 在模拟胃肠液中的耐受性评估

Fig. 4　Tolerance assessment of cecropin YCM in simulated gastrointestinal fluids

2.6　YCM 的肠道滞留时间

如图 5 所示，在灌胃天蚕素 YCM 前 2 天小鼠粪便中未检测到酿酒酵母，表明小鼠肠道内不存在食物来源的酵母菌；灌胃 YCM 后，小鼠粪便中可检测到酿酒酵母，但随着时间的推移，粪便中酿酒酵母数量逐渐减少，在第 14 天时仅能检测到少量酿酒酵母。结果表明，酿酒酵母可以在肠道内滞留至少 14 d，有充足的时间在动物胃肠道内发挥功效。



A. 灌胃 YCM 前 2 d 粪样；B～E. 分别为灌胃 YCM 3，5，7 和 14 d 粪样。

A. Fecal samples collected 2 days prior to gavage with YCM; B－E. Fecal samples collected on days 3, 5, 7, and 14 after gavage with YCM, respectively.

图 5　YCM 体内滞留时间评估

Fig. 5　Assessment of *in vivo* retention time of YCM

2.7 天蚕素 YCM 对小鼠结肠炎的缓解作用

试验结果表明,前 7 天,除 NC 组外其他组小鼠体质量逐渐下降(图 6),并出现活动量下降、腹泻等症状,说明结肠炎小鼠模型构建成功。口服天蚕素 YCM 后,JMY31 组、CAD 组、CB 组小鼠体质量均有所增长,而 PBS 组小鼠体质量持续下降,并有 2 只死亡。结肠长度测量结果(表 4)表明,PBS 组小鼠结肠长度明显缩短,平均长度仅 6.17 cm;JMY31 组、CAD 组、CB 组小鼠结肠平均长度较 PBS 组明显增加,且更接近于 NC 组,说明在饲喂天蚕素 YCM 后肠道炎症得到了一定程度的缓解。结肠组织切片 HE 染色结果(图 7)显示,NC 组小鼠的结肠黏膜杯状细胞及腺体隐窝结构完整,且排列整齐,没有炎性细胞浸润;PBS 组小鼠结肠黏膜杯状细胞丢失,腺体隐窝结构破坏,伴有炎性细胞浸润;与 PBS 组相比,JMY31、CAD、CB组小鼠的结肠黏膜损伤有一定程度减轻,腺体隐窝排列趋于整齐,上皮结构较完整,炎性细胞浸润减轻。结果表明,天蚕素 YCM 对小鼠肠道炎症具有一定的改善和治疗效果。

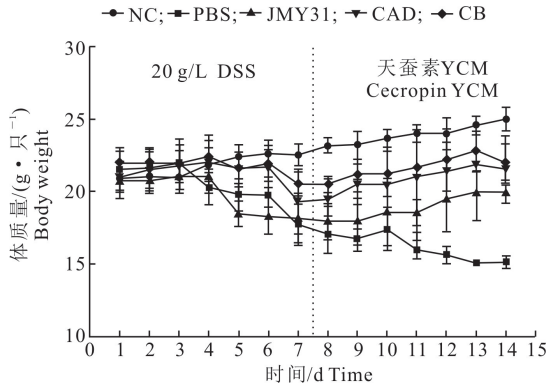


图 6 天蚕素 YCM 对小鼠体质量的影响

Fig. 6 Effects of cecropin YCM on body weight in mice

表 4 天蚕素 YCM 对结肠炎小鼠结肠长度的影响

Table 4 Effects of cecropin YCM on colon length in colitis mice cm

组别 Groups	结肠长度 Colon length					
	样本 1 Sample 1	样本 2 Sample 2	样本 3 Sample 3	样本 4 Sample 4	样本 5 Sample 5	平均值 Average value
NC	8.2	8.1	8.2	8.4	9.0	8.38
PBS	7.1	5.0	6.4	—	—	6.17
JMY31	6.2	9.1	7.1	6.0	7.2	7.12
CAD	7.2	8.0	8.1	7.2	7.3	7.56
CB	7.3	7.2	8.3	7.0	6.2	7.20

注:—. 表示小鼠死亡。

Note: —. Indicates the death of mouse.

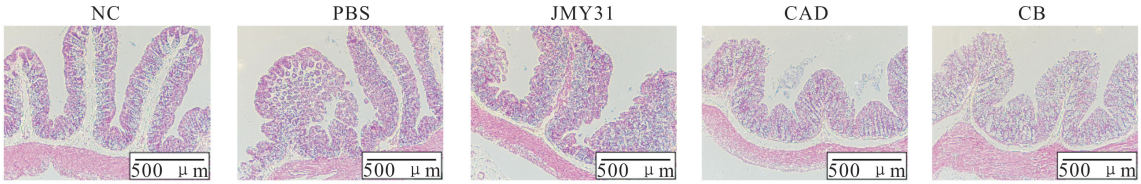


图 7 天蚕素 YCM 对小鼠结肠组织结构的影响

Fig. 7 Effects of cecropin YCM on colon tissue structure in mice

2.8 天蚕素 YCM 对结肠炎小鼠肠道菌群的影响

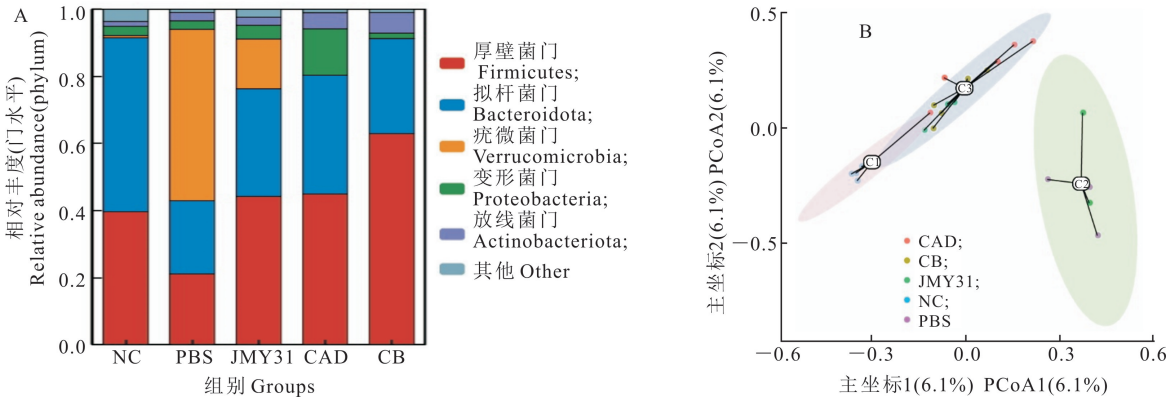
试验结果(图 8-A)显示,相较于 NC 组,PBS 组小鼠肠道菌群中拟杆菌门(Bacteroidetes)和厚壁菌门(Firmicutes)细菌所占比例降低,而疣微菌门(Verrucomicrobia)细菌所占比例明显升高,表明肠道菌群稳态被破坏;JMY31、CAD 和 CB 组对这一趋势具有明显的改善作用,其中 CAD 组与 NC 组菌群组成更为相似。通过 Bray-Curtis 算法计算距离矩阵,并对 5 组样本进行 PCoA 聚类分析,结果(图 8-B)显示,5 组样本被分为 C1、C2 和 C3 等 3 类,其中 C1 和 C3 距离较近,包含了 JMY31 组的 3 个样本和 NC、CAD、CB 组的全部样本;C2 与 C1 和 C3 距离较远,包含了未经治疗的 PBS 组和 JMY 组的 2 个样本。上述结果表明,天蚕素 YCM 具有一定的维持肠道菌群稳态的作用。

3 讨论与结论

3.1 天蚕素作为饲料添加剂应用的意义

天蚕素是目前发现最早、研究最为透彻的动物来源抗菌肽,早在 1992 年就有研究阐述了其通过在细菌细胞膜上形成离子通道后改变膜通透性的抑菌机制[15]。天蚕素对细菌、真菌、病毒和肿瘤细胞均

有抑制效果，被认为是抗生素的理想替代品[16]。研究人员对天蚕素的表达、分离纯化和应用均进行了较为深入的研究[17-18]。然而，其天然含量极少，人工合成和重组表达的生产成本高且作为一个短肽难以在胃肠道环境中长期稳定存在[19]。这些问题极大地限制了其作为饲料添加剂在养殖业中的大规模应用。酿酒酵母因具有安全性好、表达强度高、生产成本低且便于进行遗传改造等特点，被广泛应用于食品生产、药物蛋白生产等领域。与原核生物表达系统相比，酿酒酵母具有较为完整的蛋白翻译后修饰和分泌能力，在表达异源蛋白方面表现出极大的优势。在前期的研究中，酿酒酵母被用作天蚕素、片球菌素等抗菌肽的重组表达平台[20-21]。酿酒酵母具有适应胃肠道环境、便于蛋白分泌表达、细胞壁可作为抑菌剂和免疫佐剂的特点，有望成为一种优秀的天蚕素保护剂和分泌源[22-23]。在饲料中添加酿酒酵母培养物还能够起到提高动物抵抗力、增大动物采食量和增强饲料适口性的作用[24]。本研究采用酿酒酵母作为天蚕素的分泌源及保护剂制备 YCM。通过荧光观察，证实天蚕素可以在酿酒酵母细胞中正常表达。为了进一步优化其表达效果，本研究比较了 2 种不同启动子的表达情况，最终选择表达水平较高的 GAP 启动子表达天蚕素。体外胃肠液耐受试验和体内肠道滞留试验结果均表明，天蚕素 YCM 对复杂的胃肠道环境具有良好的适应能力，为 YCM 分泌天蚕素并发挥抗菌作用提供了充足的时间。在进行胃肠液耐受性测试时，由于本研究制备的所有天蚕素 YCM 均以 JMY31 作为递送载体和母本，因此仅对 JMY31 进行了胃肠液耐受性评估，后续研究应补充天蚕素 YCM 对胃肠液耐受性的评估。总之，YCM 可以经口服后在肠道原位分泌天蚕素。本研究策略既省去了生产天蚕素过程中的分离纯化成本，还延长了其在动物肠道内的作用时间，具有一定的生产应用前景。



A. 小鼠肠道菌群组成；B. 小鼠肠道菌群分型。

A. Gut microbiota composition in mice; B. Gut microbiota typing in mice.

图 8　天蚕素 YCM 对结肠炎小鼠肠道菌群的影响

Fig. 8　Effects of cecropin YCM on gut microbiota in colitis mice

3.2　天蚕素对肠炎防治的意义

肠道是动物的消化和吸收器官，以结肠炎为代表的肠道炎症往往会极大地影响动物的生产性能[24]。研究表明，在饲料中添加抗菌肽制剂可以有效调节断奶仔猪的肠道菌群，促进其肠道健康[25]。天蚕素 YCM 经口服可直达肠道并在肠道中长期存活，因此将 YCM 用作饲料添加剂有望成为治疗结肠炎等肠道炎症的新方法。体外抑菌试验结果表明，酵母本身可能就对致病性大肠杆菌、鸡白痢沙门氏菌和金黄色葡萄球菌等具有一定的抑菌效果，分泌表达天蚕素的 YCM 抑菌效果比空酵母更好。体内试验结果表明，饲喂天蚕素 YCM 的炎症模型小鼠的结肠长度和肠道结构完整性得到了明显改善，表明天蚕素 YCM 对肠炎具有一定的治疗效果。此外，前人研究表明，肠炎会导致厚壁菌门丰度降低，拟杆菌门丰度也会发生明显的变化[26]。本研究中，16S rDNA 测序结果显示，相较于 NC 组小鼠，炎症模型小鼠厚壁菌门和拟杆菌门的丰度大幅降低，肠道菌群稳态被打破。但在饲喂天蚕素 YCM 后，厚壁菌门和拟杆菌门的丰度得到了明显提升，这提示饲喂天蚕素 YCM 后小鼠肠道中的有益菌在逐渐增加，肠道菌群稳态在逐渐恢复平衡，表明天蚕素 YCM 在维持动物肠道菌群稳定性方面发挥了重要作用。因此，天蚕素 YCM 可作为一种长效、低成本的饲料添加剂，有望在不久的将来应用于动物肠炎的防治。

致 谢:

感谢西北农林科技大学基因编辑科教平台、羊遗传改良与生物育种创新团队和动物营养与健康养殖创新团队对本研究提供的支持;感谢山西大学合成生物学学院、山西大禹生物工程股份有限公司和大禹生物(西安)产业发展研究院对本研究的关注和支持。

[参考文献]

[1] AHMED S K, HUSSEIN S, QURBANI K, et al. Antimicrobial resistance: impacts, challenges, and future prospects[J]. Journal of Medicine, Surgery, and Public Health, 2024, 2: 100081.

[2] LUO Y, SONG Y Z. Mechanism of antimicrobial peptides: antimicrobial, anti-inflammatory and antibiofilm activities[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(21): 11401.

[3] 邵长轩,王梦成,王袁梦雪,等. 抗酶解抗菌肽的研究进展[J]. 生物工程学报,2024,40(12):4396-4407.
SHAO Z X, WANG M C, WANG Y M X, et al. Research progress in anti-enzymatic antimicrobial peptides[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(12): 4396-4407.

[4] DWIVEDI M, PARMAR M D, MUKHERJEE D, et al. Biochemistry, mechanistic intricacies, and therapeutic potential of antimicrobial peptides: an alternative to traditional antibiotics[J]. Current Medicinal Chemistry, 2024, 31(37): 6110-6139.

[5] ANDRÄ J, BERNINGHAUSEN O, LEIPPE M. Cecropins, antibacterial peptides from insects and mammals, are potently fungicidal against *Candida albicans*[J]. Medical Microbiology and Immunology, 2001, 189(3): 169-173.

[6] DURELL S R, RAGHUNATHAN G, GUY H R. Modeling the ion channel structure of cecropin[J]. Biophysical Journal, 1992, 63(6): 1623-1631.

[7] MOORE A J, BEAZLEY W D, BIBBY M C, et al. Antimicrobial activity of cecropins[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1996, 37(6): 1077-1089.

[8] PENG J, WU Z Y, LIU W W, et al. Antimicrobial functional divergence of the cecropin antibacterial peptide gene family in *Musca domestica*[J]. Parasites & Vectors, 2019, 12(1): 537.

[9] WU S D, ZHANG F R, HUANG Z M, et al. Effects of the antimicrobial peptide cecropin AD on performance and intestinal health in weaned piglets challenged with *Escherichia coli*[J]. Peptides, 2012, 35(2): 225-230.

[10] WANG J R, MA K, RUAN M S, et al. A novel cecropin B-derived peptide with antibacterial and potential anti-inflammatory properties[J]. Peer J, 2018, 6: e5369.

[11] RODRIGUES G, SOUZA SANTOS L, FRANCO O L. Antimicrobial peptides controlling resistant bacteria in animal production[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 874153.

[12] HELAL F, EL-BADAWI A, EL-NAGGAR S, et al. Probiotics role of *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus subtilis* in improving the health status of rabbits' gastrointestinal tract[J]. Bulletin of the National Research Centre, 2021, 45(1): 66.

[13] 李宏彪,梁晓琳,周景文. 酿酒酵母基因编辑技术研究进展[J]. 生物工程学报,2021,37(3):950-965.
LI H B, LIANG X L, ZHOU J W. Progress in gene editing technologies for *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(3): 950-965.

[14] SANTOVITO E, GRECO D, LOGRIECO A F, et al. Eubiotics for food security at farm level: yeast cell wall products and their antimicrobial potential against pathogenic bacteria[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2018, 15(9): 531-537.

[15] 牛军波,薛林贵,吴娟丽,等. 天蚕素 AD 在毕赤酵母中的多拷贝整合表达及表达条件优化[J]. 微生物学通报,2020,47(5):1441-1451.
NIU J B, XUE L G, WU J L, et al. Multicopy integrative expression and optimization of cecropin AD expression in *Pichia pastoris*[J]. Microbiology China, 2020, 47(5): 1441-1451.

[16] CHENG J H, AHMAT M, GUO H N, et al. Expression, purification and characterization of a novel hybrid peptide CLP with excellent antibacterial activity[J]. Molecules, 2021, 26(23): 7142.

[17] ZHANG M, SHAN Y L, GAO H T, et al. Expression of a recombinant hybrid antimicrobial peptide Magainin Ⅱ-cecropin B in the Mycelium of the medicinal fungus *Cordyceps militaris* and its validation in mice[J]. Microbial Cell Factories, 2018, 17(1): 18.

[18] DEO S, TURTON K L, KAINTH T, et al. Strategies for improving antimicrobial peptide production[J]. Biotechnology Advances, 2022, 59: 107968.

[19] LAI W S, KAN S C, LIN C C, et al. Antibacterial peptide cecropinB2 production via various host and construct systems[J]. Molecules, 2016, 21(1): 103.

[20] NGUYEN T P A, NGUYEN T T M, NGUYEN N H, et al. Application of yeast surface display system in expression of recombinant pediocin PA-1 in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Folia Microbiologica, 2020, 65(6): 955-961.

[21] LIU Y N, WU Q, WU X Y, et al. Structure, preparation, modification, and bioactivities of β-glucan and mannan from yeast cell wall: a review[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 173: 445-456.

[22] YUE F, DU L H, WANG R Y, et al. In vivo protein interference: oral administration of recombinant yeast-mediated partial leptin reduction for obesity control[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 923656.

[23] CELI P, VERLHAC V, PÉREZ CALVO E, et al. Biomarkers of gastrointestinal functionality in animal nutrition and health[J]. Animal Feed Science and Technology, 2019, 250: 9-31.

[24] 张雨,陈鹏. 抗菌肽在动物养殖中的研究进展[J]. 饲料研究,2021,44(13):150-152.
ZHANG Y, CHEN P. Research progress of antimicrobial peptides produced by genetically engineered[J]. Feed Research, 2021, 44(13): 150-152.

(下转第 132 页)

tive stress and inflammation[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy,2019,112:108704.

[31] MASSART J,BEGRICHE K,HARTMAN J H,et al. Role of mitochondrial cytochrome P450 2E1 in healthy and diseased liver[J]. Cells,2022,11(2):288.

[32] ZHAO W,LUO H S,LIN Z L,et al. Wogonin mitigates acetaminophen-induced liver injury in mice through inhibition of the PI3K/AKT signaling pathway[J]. Journal of Ethnopharmacology,2024,332:118364.

[33] 代炆璋,柏兆方,何婷婷,等. 五味子丙素调控 Nrf2 信号通路改善对乙酰氨基酚诱导的小鼠肝损伤[J]. 中国中药杂志,2022,47(19):5299-5305.
DAI W Z,BAI Z F,HE T T,et al. Schisandrin C improves acetaminophen-induced liver injury in mice by regulating Nrf2 signaling pathway[J]. China Journal of Chinese Materia Medica,2022,47(19):5299-5305.

[34] YANG W P,LIANG Z X,WEN C M,et al. Silymarin protects against acute liver injury induced by acetaminophen by down-regulating the expression and activity of the CYP2E1 enzyme [J]. Molecules,2022,27(24):8855.

[35] SANTES-PALACIOS R,OLGUÍN-REYES S,HERNÁNDEZ-OJEDA S L,et al. Differential inhibition of naringenin on human and rat cytochrome P450 2E1 activity[J]. Toxicology in Vitro,2020,69:105009.

[36] WANG S Y,LIU R C,YU Q,et al. Metabolic reprogramming of macrophages during infections and cancer[J]. Cancer Letters,2019,452:14-22.

[37] JUNG K,KIM M,SO J,et al. Farnesoid X receptor activation impairs liver progenitor cell-mediated liver regeneration via the PTEN-PI3K-AKT-mTOR axis in zebrafish[J]. Hepatology,2021,74(1):397-410.

[38] LI F W,ZHAN Z J,QIAN J,et al. Naringin attenuates rat myocardial ischemia/reperfusion injury via PI3K/Akt pathway-mediated inhibition of apoptosis,oxidative stress and autophagy[J]. Experimental and Therapeutic Medicine,2021,22(2):811.

[39] BORUDE P,BHUSHAN B,GUNEWARDENA S,et al. Pleiotropic role of P53 in injury and liver regeneration after acetaminophen overdose[J]. The American Journal of Pathology,2018,188(6):1406-1418.

[40] HUO Y Z,YIN S T,YAN M Z,et al. Protective role of P53 in acetaminophen hepatotoxicity[J]. Free Radical Biology and Medicine,2017,106:111-117.

[41] WANG Z,HAO W N,HU J N,et al. Maltol improves APAP-induced hepatotoxicity by inhibiting oxidative stress and inflammation response via NF-κB and PI3K/Akt signal pathways[J]. Antioxidants,2019,8(9):395.

[42] YU Y J,ZHOU S Z,WANG Y,et al. Leonurine alleviates acetaminophen-induced acute liver injury by regulating the PI3K/AKT signaling pathway in mice[J]. International Immunopharmacology,2023,120:110375.

[43] WU J,GOU W F,WANG Z Y,et al. Discovery of the radioprotecting effect of Ecliptae Herba,its constituents and targeting P53-mediated apoptosis *in vitro* and *in vivo*[J]. Acta Pharmaceutica Sinica B,2023,13(3):1216-1230.

[44] 马笑祎,陈桐楷,肖海鹏. 柚皮素改善非酒精性脂肪性肝病的研究进展[J]. 中华糖尿病杂志,2021,13(11):1094-1097.
MA X Y,CHEN T K,XIAO H P. Research advances of naringenin in improving non-alcoholic fatty liver disease[J]. Chinese Journal of Diabetes Mellitus,2021,13(11):1094-1097.

[45] CHAI S,YANG Y B,WEI L W,et al. Luteolin rescues postmenopausal osteoporosis elicited by OVX through alleviating osteoblast pyroptosis via activating PI3K-AKT signaling[J]. Phytomedicine,2024,128:155516.

[46] FENG Z,WANG C,JIN Y,et al. Kaempferol-induced GPER upregulation attenuates atherosclerosis via the PI3K/AKT/Nrf2 pathway[J]. Pharmaceutical Biology,2021,59(1):1106-1116.

[47] WANG M,WANG B,ZHOU S S,et al. Quercetin ameliorates chicken quality by activating the PI3K/PKB/AMPK signaling pathway in broilers[J]. Frontiers in Veterinary Science,2022,9:951512.

(责任编辑:陈丽)

(上接第 120 页)

[25] 淡江华,李国柱,冯燕平,等. 不同饲料添加剂对断奶仔猪生长性能、免疫性能、肠道健康及粪便微生物的影响[J]. 动物营养学报,2024,36(9):5581-5593.
DAN J H,LI G Z,FENG Y P,et al. Effects of different feed additives on growth performance,immune performance,intestinal health and fecal microorganisms of weaned piglets[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition,2024,36(9):5581-5593.

[26] ALAM M T,AMOS G C A,MURPHY A R J,et al. Microbial imbalance in inflammatory bowel disease patients at different taxonomic levels[J]. Gut Pathogens,2020,12:1.

(责任编辑:马秋明)