

纪林春,李悦,包红朵,等. 肠道高黏附性噬菌体对小鼠沙门氏菌感染的预防作用[J]. 江苏农业学报,2025,41(9):1844-1851.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2025.09.019

肠道高黏附性噬菌体对小鼠沙门氏菌感染的预防作用

纪林春¹, 李悦², 包红朵², 卢河东¹, 王冉²

(1.淮阴工学院生命科学与食品工程学院,江苏淮安 223001; 2.江苏省农业科学院农产品质量安全与营养研究所,江苏南京 210014)

摘要: 为研究高黏附性噬菌体对小鼠沙门氏菌感染的预防作用,本研究筛选到1株高黏附性噬菌体 vB_SpuM_PA1-27。通过建立小鼠沙门氏菌感染模型,设置空白对照组、噬菌体对照组、沙门氏菌感染组和噬菌体预防组研究高黏附性噬菌体 vB_SpuM_PA1-27 对预防小鼠沙门氏菌感染的作用。结果显示,噬菌体预防组小鼠各肠段中均能检测到噬菌体分布,其中结肠中丰度最高,小鼠粪便中沙门氏菌载量显著降低($P<0.05$),未出现小鼠死亡。与沙门氏菌感染组比较,噬菌体预处理显著降低了小鼠脾脏指数($P<0.05$)以及结肠 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ mRNA 表达水平($P<0.05$),显著提高了空肠绒毛长度($P<0.05$)、结肠长度($P<0.05$)和 $MUC2$ mRNA 表达水平($P<0.05$)。结果表明,高黏附性噬菌体能减轻沙门氏菌感染对小鼠的危害程度,保护小鼠肠道健康、减少小鼠死亡。本研究结果为高黏附性噬菌体在预防动物细菌感染方面的应用提供了重要数据参考。

关键词: 高黏附性噬菌体; 肠道健康; 感染模型; 沙门氏菌; 小鼠

中图分类号: Q939.48 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2025)09-1844-08

The preventive effect of a gut-adherent bacteriophage against *Salmonella* infection in mice

Ji Linchun¹, Li Yue², Bao Hongduo², Lu Hedong¹, Wang Ran²

(1.School of Life Science and Food Engineering, Huaiyin Institute of Technology, Huai'an 223001, China; 2.Institute of Food Safety and Nutrition, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: In order to study the preventive effect of adherent bacteriophages against *Salmonella* infection in mice, a gut-adherent bacteriophage vB_SpuM_PA1-27 was isolated. By establishing a murine *Salmonella* infection model, this study investigated the preventive effect of vB_SpuM_PA1-27 against *Salmonella* infection through four experimental groups: blank control, bacteriophage control, *Salmonella*-infected group, and bacteriophage prevention group. The results demonstrated that in the bacteriophage prevention group, vB_SpuM_PA1-27 was detectable throughout all intestinal segments, with the highest abundance in colon. Concurrently, *Salmonella* loads in fecal samples were significantly reduced ($P<0.05$), and no mortality occurred in mice. Compared with the *Salmonella*-infected group, phage pretreatment significantly reduced the spleen index ($P<0.05$) and mRNA expression levels of $TNF-\alpha$ and $IL-1\beta$ in colon ($P<0.05$), and significantly increased

jejunal villus length ($P<0.05$), colon length ($P<0.05$), and $MUC2$ mRNA expression ($P<0.05$). The results indicated that vB_SpuM_PA1-27 could mitigate *Salmonella*-induced pathogenic impacts in mice, preserve intestinal health and reduce mortality. These findings can provide an important data reference for the application of adherent bacteriophages in the prevention of bacterial infection in animals.

收稿日期:2024-12-07

基金项目:江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(24)1015];国家自然科学基金面上项目[32273095]

作者简介:纪林春(1998-),男,安徽淮南人,硕士研究生,研究方向为噬菌体。(E-mail)335099984@qq.com

通讯作者:卢河东,(E-mail)luhd100@163.com;王冉,(E-mail)ranwang@jaas.ac.cn

Key words: adherent bacteriophages; intestinal health; infection model; *Salmonella*; mice

沙门氏菌是养殖场主要的细菌感染病原菌,导致种鸡和肉鸡疾病以及食品安全问题。噬菌体具有高度的特异性^[1]、良好的安全性^[2]、独特的作用机制^[3],可用于潜在的肠道净化,沙门氏菌感染预防和控制。

肠道黏膜表面覆盖有一层黏液,主要由杯状细胞分泌的黏蛋白构成^[4]。黏液层作为一种选择性过滤屏障,可保护肠上皮免受机械应力和生物攻击,并参与免疫调节以及维持肠道微生物稳态^[5-6]。研究表明,肠道黏液层中分泌的黏蛋白 MUC2 的岩藻糖残基会与噬菌体衣壳表面的 HOC 蛋白结合,致使噬菌体在肠道黏液中富集和定植,形成一层噬菌体黏液层(BAM)^[7-8]。同时,噬菌体的黏附可促进肠上皮细胞分泌更多黏蛋白,形成一种正反馈机制,进一步提高噬菌体在肠道黏膜上的浓度^[7]。因此,噬菌体在黏液层形成了一层天然的免疫屏障,抵御致病菌入侵^[8]。

BAM 模型已在体外试验中被证实,但目前对其在体内的情况知之甚少。因此,本研究拟筛选对肠道黏蛋白有较高黏附性的噬菌体,明确其对小鼠沙门氏菌感染的预防和保护作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

黏液蛋白 Type III,购自 Sigma 公司;动物组织/细胞总 RNA 快速提取试剂盒,购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司;一步式去除 gRNA 和 cDNA 合成试剂盒,购自北京全式金生物有限公司;LB 肉汤,购自青岛海博生物科技有限公司。

1.2 主要仪器

荧光定量 PCR 仪,美国 Roche Diagnostic 公司产品;5810R 高速离心机,德国 Eppendorf 股份公司产品;-80 °C 超低温冰箱,德国 Thermo Scientific 公司产品。

1.3 试验动物和菌株

42~56 d 日龄无特定病原体级 C57BL/6J 雌性小鼠,购自扬州大学比较医学中心[生产许可证号:SYXK(苏)2022-0044]。小鼠在由江苏省农业科学院动物护理和伦理委员会(SYXK 2015-0020)批准的特定无病原体条件下饲养。鼠伤寒

沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*) LT2 由本实验室保藏。所用噬菌体为前期从污水中分离纯化得到,对鼠伤寒沙门氏菌 LT2 有良好的裂解效果。

1.4 试验方法

1.4.1 肠道高黏附性噬菌体的筛选 参考 Barr 等^[8]建立的方法,将 1%(重量体积比)黏液蛋白溶解于磷酸盐缓冲液(PBS),取 1 mL 涂布于 LB 琼脂平板上晾干。分别将 5 mL 相同效价(1×10^2 PFU/mL)的 14 株噬菌体(1-1、1-2、1-3、1-7、1-11、1-16E、1-22、1-25、1-26、1-27、1-28、1-31、1-32、1-33)悬液加入黏液蛋白平板,在 37 °C 条件下使用轨道摇床摇动 30 min。随后,倒出噬菌体悬液并吸去多余液体,晾干后向每个平板中加入含有沙门氏菌 LT2 的半固体培养基(含 0.6% 琼脂粉),37 °C 过夜培养。黏附噬菌体的数量根据噬菌斑计算,黏附性最强的噬菌体用于后续试验。

1.4.2 动物试验分组及处理 32 只小鼠以标准饮食适应饲喂 7 d 后,随机分为 4 组,每组 8 只,试验处理设置见表 1。试验期间,每日观察小鼠精神状态、粪便形态,记录体重变化和饮水情况。试验结束后将小鼠颈椎脱臼处死,解剖采集脾脏、肝脏、空肠、回肠、结肠等组织样品备用。

1.4.3 小鼠粪便中沙门氏菌载量 在试验第 14 d,收集小鼠新鲜粪便颗粒,在无菌 PBS 中匀浆(1 g 粪便使用 9 mL PBS)。连续稀释 100 倍后,涂布于 BS 琼脂平板,37 °C 培养 24 h 后计数菌落,以确定粪便中沙门氏菌的数量。

1.4.4 小鼠脏器器官指数及结肠长度测定 取小鼠的脾脏、肝脏,小心地剔除器官周围多余的脂肪和筋膜,使用电子天平精确称量器官的重量,计算器官指数。器官指数 = 器官重量(mg)/体重(g)。测量并记录小鼠结肠长度。

1.4.5 小鼠肠道形态结构 从每只小鼠空肠、回肠以及结肠的相同部位,取 0.5 cm 肠段放入预先准备好的 4% 多聚甲醛固定液中,24 h 后利用乙醇梯度溶液脱水,用石蜡包埋后切片,采用苏木精-伊红染色,采用中性树胶封片,在光学显微镜下观察各段肠黏膜形态结构,并利用软件 Image J 测量绒毛长度和隐窝深度。

表 1 试验分组及处理设置

Table 1 Experimental grouping and experimental treatment

组别	试验处理
空白对照组	正常饲喂 7 d 后,每日灌胃 200 μ L 生理盐水至 14 d
噬菌体对照组	饮水中添加 1×10^8 PFU/mL 噬菌体,饲喂 7 d 后,每日灌胃 200 μ L 生理盐水至 14 d
沙门氏菌感染组	正常饲喂 7 d 后,每日灌胃 200 μ L 沙门氏菌 LT2(1×10^8 CFU/ μ L) 至 14 d
噬菌体预防组	饮水中添加 1×10^8 PFU/mL 噬菌体至第 7 d 后,每日灌胃 200 μ L 沙门氏菌(1×10^8 CFU/ μ L)LT2 至 14 d

1.4.6 小鼠各肠段中噬菌体的分布 取小鼠空肠、回肠和结肠,纵向剪开去除内容物,称重后剪碎,按照 1:4(重量体积比)加入噬菌体保存液(SM 缓冲液)匀浆,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,连续稀释到适宜浓度,通过双层平板法测定噬菌体数量。

1.4.7 小鼠结肠基因表达水平 取冻存的小鼠结肠组织,使用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,使用分光光度计测定 RNA 的浓度和纯度。反转录合成 cDNA,采用 SYBR Green 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)测定小鼠结肠组织中主要分泌型黏蛋白编码基因(*MUC2*)、紧密连接蛋白关键编码基因(*Occludin*、*ZO-1*)、炎症细胞因子基因(*TNF- α* 、*IL- β*) mRNA 的表达水平。引物由擎科生物科技股份有限公司合成,引物序列见表 2。反应体系(20.0 μ L):2 \times HQ SYBR qPCR Mix 10.0 μ L,上下游引物各 0.4 μ L,cDNA 2.0 μ L,ddH₂O 7.2 μ L。PCR 循环条件设置:95 $^{\circ}$ C 30 s;95 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环。以 *β -actin* 为内参基因,基因相对表达量结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算获得。

表 2 目的基因引物序列

Table 2 Primer sequences of target genes

目的基因	引物序列(5'→3')	参考文献
<i>MUC2</i>	F:GTGGCTGCGTGCCTAGTCCT	[9]
	R:AGGCCGGCCCGAGAGTAGAC	
<i>Occludin</i>	F:ACGGCAGCACCTACCTCAA	[9]
	R:GGCGAAGAAGCAGATGAG	
<i>ZO-1</i>	F:CCACTGCCTACACCACCATCTC	[10]
	R:CGTGTCCTACTGGGTCCTTCAT	
<i>TNF-α</i>	F:GGTGACCAGGCTGTCCGTACA	[11]
	R:TACAGTCAGGCTCCCGTGGG	
<i>IL-β</i>	F:TCCAGGATGAGGACATGAGCAC	[11]
	R:GAACGTCACACACCAGCAGGTTA	
<i>β-actin</i>	F:CAGCCAGCCATGGATGATGA	[10]
	R:ACCAACCATCACACCCTGAT	

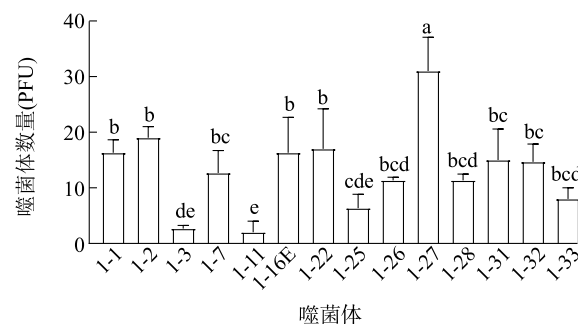
1.5 数据处理与分析

数据经 Excel 2022 初步处理后,采用 SPSS 22.0 进行单因素方差(One-Way ANOVA)分析,结果采用“平均值 \pm 标准差”表示,利用 ANOVA 检验分析不同处理间的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 高黏附性噬菌体的筛选

本研究采用 Barr 等^[8]建立的噬菌体对黏液蛋白黏附能力的测定方法,对实验室保存的 14 株沙门氏菌噬菌体进行了筛选,结果如图 1 所示。14 株噬菌体对肠道黏蛋白的黏附性能有较大差异,这可能与噬菌体上与黏蛋白结合的配体不同有关。在相同的效价条件下,噬菌体 1-27 黏附到黏液蛋白琼脂平板的数量最高,显著高于其他噬菌体($P < 0.05$)。基于这一结果,我们选择噬菌体 1-27 用于后续试验,并将噬菌体重新命名为 vB_SpuM_PA1-27。



不同小写字母表示组间差异显著($P < 0.05$)。

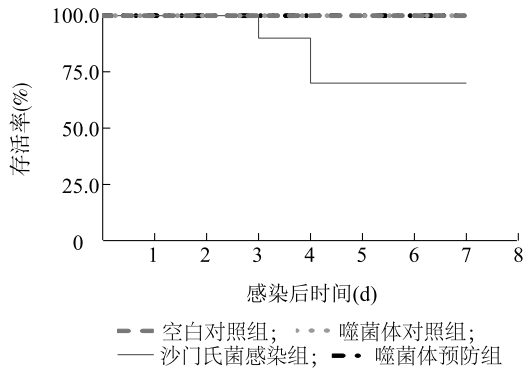
图 1 黏液蛋白高黏附性噬菌体的筛选

Fig.1 Screening of phages with high adhesion to mucin

2.2 噬菌体 vB_SpuM_PA1-27 预处理对沙门氏菌感染小鼠存活率和体重的影响

本试验采用鼠伤寒沙门氏菌 LT2 建立了 C57BL/6J 小鼠感染模型。如图 2 所示,在灌胃给予小鼠沙门氏菌后第 3 d,沙门氏菌感染组小鼠开始出

现死亡,至第4 d存活率降低至62.5%。空白对照组、噬菌体对照组以及噬菌体预防组小鼠健康,均未观察到小鼠死亡的现象。



空白对照组、噬菌体对照组、沙门氏菌感染组、噬菌体预防组见表1。

图2 噬菌体 vB_SpuM_PA1-27 预处理对沙门氏菌感染小鼠存活率的影响

Fig.2 Effects of phage vB_SpuM_PA1-27 pretreatment on survival rate of mice infected with *Salmonella*

各处理组小鼠的体重变化如图3所示。沙门氏菌感染导致小鼠体重下降,灌胃第3 d(试验开始第10 d)开始,沙门氏菌感染组小鼠体重显著低于空白组($P < 0.05$)。噬菌体预防组小鼠在灌胃沙门氏菌后体重有所下降,但与空白对照组相比差异不显著($P > 0.05$)。

表3 噬菌体 vB_SpuM_PA1-27 预处理对小鼠粪便中沙门氏菌载量的影响

Table 3 Effects of phage vB_SpuM_PA1-27 pretreatment on the load of *Salmonella* in mouse feces

指标	空白对照组	噬菌体对照组	沙门氏菌感染组	噬菌体预防组
沙门氏菌载量的对数	3.66±0.07c	1.07±0.35d	8.07±0.12a	6.56±0.28b

空白对照组、噬菌体对照组、沙门氏菌感染组、噬菌体预防组见表1。数据后不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

2.4 噬菌体 vB_SpuM_PA1-27 预处理对小鼠脏器器官指数的影响

沙门氏菌感染导致小鼠脾脏肿大,由表4可知,与空白对照组相比,沙门氏菌感染组小鼠脾脏指数

表4 噬菌体 vB_SpuM_PA1-27 预处理对小鼠器官指数的影响

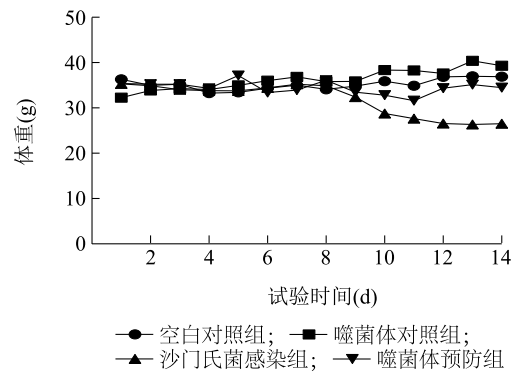
Table 4 Effects of phage vB_SpuM_PA1-27 pretreatment on organ index in mice

指标	空白对照组	噬菌体对照组	沙门氏菌感染组	噬菌体预防组
脾脏指数	4.12±0.85b	4.25±0.87b	8.20±2.57a	4.05±0.66b
肝脏指数	4.50±0.19a	4.49±0.33a	4.54±0.51a	4.28±0.59a

空白对照组、噬菌体对照组、沙门氏菌感染组、噬菌体预防组见表1。同一行数据后不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

2.5 噬菌体 vB_SpuM_PA1-27 应用后在小鼠各肠段的分布

如表5所示,噬菌体预防组小鼠在处理第14 d,



空白对照组、噬菌体对照组、沙门氏菌感染组、噬菌体预防组见表1。

图3 噬菌体 vB_SpuM_PA1-27 预处理对沙门氏菌感染小鼠体重的影响

Fig.3 Effects of phage vB_SpuM_PA1-27 pretreatment on body weight of mice infected with *Salmonella*

2.3 噬菌体 vB_SpuM_PA1-27 预处理对小鼠粪便中沙门氏菌载量的影响

由表3可知,在灌胃6 d后,沙门氏菌感染组小鼠粪便中沙门氏菌的载量大幅增加,与之相比,噬菌体 vB_SpuM_PA1-27 预处理显著降低了小鼠粪便中沙门氏菌的载量($P < 0.05$)。

显著升高($P < 0.05$)。噬菌体 vB_SpuM_PA1-27 预处理可明显改善沙门氏菌导致的小鼠脾脏肿大,与沙门氏菌感染组相比脾脏指数显著降低($P < 0.05$)。

空肠、回肠和结肠中仍能检测到与噬菌体对照组数量相近的噬菌体,且在结肠中丰度最高为 1.05×10^5 PFU/g。

表 5 噬菌体 vB_SpuM_PA1-27 在小鼠各肠段的分布情况

Table 5 Distribution of phage vB_SpuM_PA1-27 in each intestinal segment of mice

肠段	噬菌体数量 (PFU/g)			
	空白对照组	噬菌体对照组	沙门氏菌感染组	噬菌体预防组
空肠	0	3.50×10^3	0	2.50×10^3
回肠	0	4.50×10^4	0	5.00×10^4
结肠	0	2.10×10^5	0	1.05×10^5

空白对照组、噬菌体对照组、沙门氏菌感染组、噬菌体预防组见表 1。

2.6 噬菌体 vB_SpuM_PA1-27 预处理对沙门氏菌感染小鼠结肠长度的影响

如表 6 所示,沙门氏菌感染导致小鼠结肠炎症反应并萎缩,与空白对照组相比缩短 29.14%,差异

显著 ($P < 0.05$)。噬菌体预处理可明显改善这一现象,与沙门氏菌感染组相比,结肠长度显著增加 ($P < 0.05$),且与空白对照组相比无显著差异 ($P > 0.05$)。

表 6 噬菌体 vB_SpuM_PA1-27 预处理对沙门氏菌感染小鼠结肠长度的影响

Table 6 Effects of phage vB_SpuM_PA1-27 pretreatment on colon length in mice infected with *Salmonella*

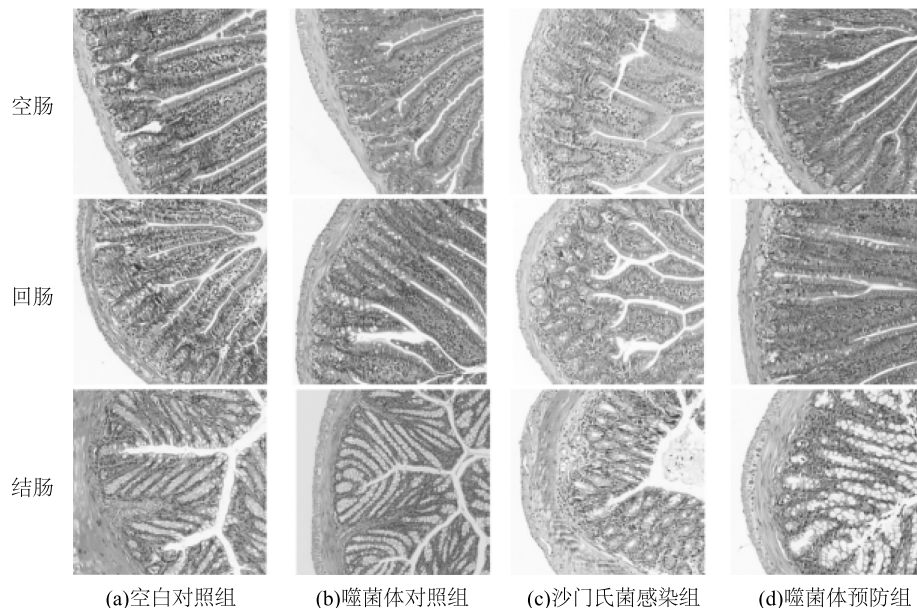
指标	空白对照组	噬菌体对照组	沙门氏菌感染组	噬菌体预防组
结肠长度 (cm)	$8.75 \pm 1.38a$	$9.28 \pm 1.38a$	$6.20 \pm 0.74b$	$8.60 \pm 0.93a$

空白对照组、噬菌体对照组、沙门氏菌感染组、噬菌体预防组见表 1。数据后不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

2.7 噬菌体 vB_SpuM_PA1-27 预处理对沙门氏菌感染小鼠肠道黏膜形态结构的影响

各处理组小鼠空肠、回肠和结肠的病理切片如图 4 所示,沙门氏菌感染导致小鼠空肠和回肠绒毛的完整性受损,部分出现断裂萎缩,排列稀疏的情况,绒毛长度较空白对照组显著降低 ($P < 0.05$),回肠隐窝深度显著增加 ($P < 0.05$)。噬菌体预防组小

鼠绒毛保持了较好的完整性和整齐度,与沙门氏菌感染组相比空肠绒毛长度显著增加 ($P < 0.05$),回肠隐窝深度显著降低 ($P < 0.05$),绒毛比显著增加 ($P < 0.05$) (表 7)。此外,沙门氏菌感染组小鼠结肠隐窝结构紊乱、萎缩,黏膜变薄,部分区域出现缺损,而噬菌体预防组小鼠结肠隐窝结构规则。



空白对照组、噬菌体对照组、沙门氏菌感染组、噬菌体预防组见表 1。

图 4 噬菌体 vB_SpuM_PA1-27 预处理对沙门氏菌感染小鼠肠道黏膜形态结构的影响 (44×)

Fig.4 Effects of phage vB_SpuM_PA1-27 pretreatment on intestinal mucosal morphology and structure of mice infected with *Salmonella* (44×)

表 7 噬菌体 vB_SpuM_PA1-27 预处理对感染小鼠肠道黏膜形态结构的影响

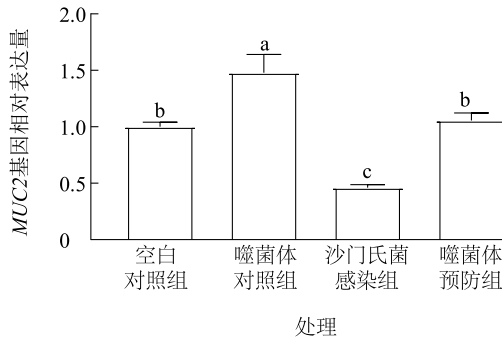
Table 7 Effects of phage vB_SpuM_PA1-27 pretreatment on intestinal mucosal morphology and structure of infected mice

肠段	指标	空白对照组	噬菌体对照组	沙门氏菌感染组	噬菌体预防组
空肠	绒毛长度 (μm)	358.35 \pm 56.36a	338.89 \pm 33.31a	288.16 \pm 56.36b	310.03 \pm 50.05a
	隐窝深度 (μm)	63.52 \pm 7.23a	67.83 \pm 11.42a	69.91 \pm 12.44a	68.42 \pm 10.73a
	绒隐比	5.64a	5.00a	4.12a	4.53a
回肠	绒毛长度 (μm)	258.18 \pm 26.06a	243.24 \pm 19.14b	225.59 \pm 18.40c	227.74 \pm 22.73c
	隐窝深度 (μm)	55.45 \pm 14.51b	56.88 \pm 6.79b	118.10 \pm 14.51a	58.51 \pm 6.52b
	绒隐比	4.66a	4.28b	1.91d	3.89c

空白对照组、噬菌体对照组、沙门氏菌感染组、噬菌体预防组见表 1。同一行数据后不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。绒隐比为绒毛长度与隐窝深度的比值。

2.8 噬菌体 vB_SpuM_PA1-27 预处理对沙门氏菌感染小鼠结肠黏膜 MUC2 mRNA 表达的影响

如图 5 所示,与空白对照组比较,沙门氏菌感染组小鼠结肠 MUC2 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。噬菌体预防组小鼠结肠黏膜 MUC2 mRNA 表达水平与空白对照组相近,与沙门氏菌感染组差异显著 ($P < 0.05$)。这表明,沙门氏菌噬菌体预处理能减轻沙门氏菌感染对小鼠的危害程度。



空白对照组、噬菌体对照组、沙门氏菌感染组、噬菌体预防组见表 1。不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

图 5 噬菌体 vB_SpuM_PA1-27 预处理对沙门氏菌感染小鼠结肠 MUC2 mRNA 表达水平的影响

Fig.5 Effects of phage vB_SpuM_PA1-27 pretreatment on the expression of MUC2 mRNA in the colon of mice infected with *Salmonella*

2.9 噬菌体 vB_SpuM_PA1-27 预处理对沙门氏菌感染小鼠结肠基因转录水平的影响

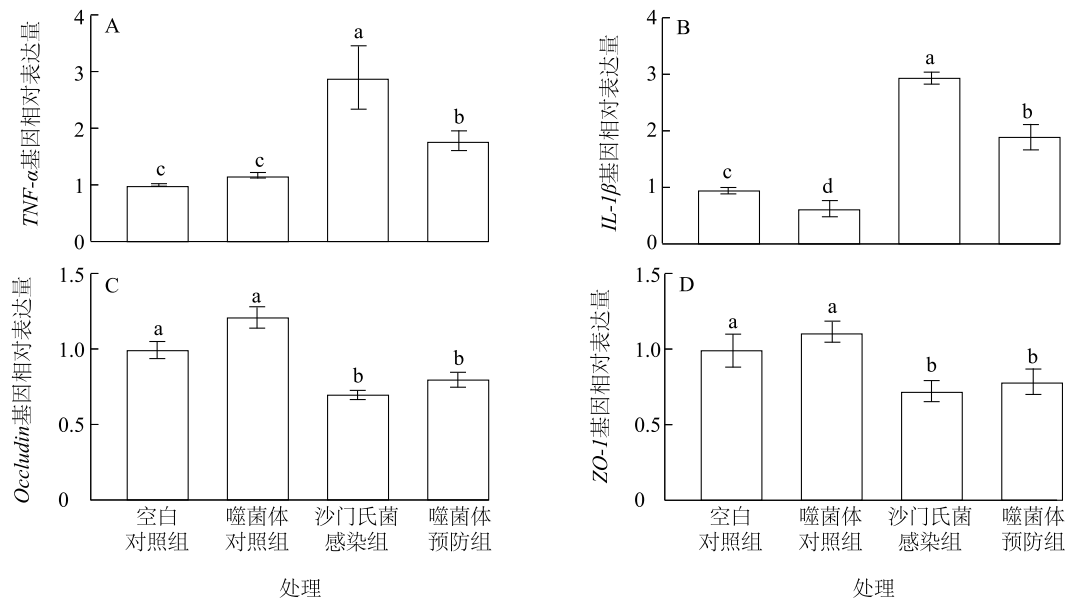
如图 6 所示,与空白对照组比较,沙门氏菌感染显著上调了结肠促炎性细胞因子基因 $TNF-\alpha$ 和 $IL-1\beta$ mRNA 的转录表达 ($P < 0.05$),同时显著下调了紧密连接蛋白关键编码基因 *Occludin* 和 *ZO-1* 的

mRNA 表达水平 ($P < 0.05$)。噬菌体 vB_SpuM_PA1-27 预处理可显著下调沙门氏菌感染诱导的 $TNF-\alpha$ 和 $IL-1\beta$ mRNA 的表达 ($P < 0.05$),但对 *Occludin* 和 *ZO-1* mRNA 的表达水平无显著影响 ($P > 0.05$)。

3 讨论

肠道内环境是一个由多样化的细胞、丰富的细胞产物以及庞大的微生物群落组成的复杂生态系统^[12-14]。在肠道中,噬菌体需穿越重重阻碍,才能找到并感染其宿主菌。为提高噬菌体疗法在肠道中的有效性,众多学者进行了广泛的研究和探索,如优化噬菌体的剂量、使用酸中和试剂或噬菌体包装、对噬菌体进行基因工程改造、将噬菌体与其他治疗方法(如抗生素、益生元、益生菌)联合使用等^[15-17]。2013 年, Barr 等^[8]在大量无脊椎和脊椎动物样本中发现,噬菌体在黏液层中的浓度较邻近的非黏液环境平均增加了 4.4 倍,表明黏液层可为噬菌体定植提供适宜的环境。此外,对产生黏液的 TC 细胞系(T84 和 A549)进行噬菌体预处理可显著减少病原菌附着,而对不产生黏液的细胞(Huh-7 和 MUC 的 A549 敲除株)进行噬菌体预处理对病原菌附着的影响较小,提示噬菌体黏附到黏液层可减少细胞受到病原菌侵袭。

黏蛋白是一种高度糖基化的凝胶形成蛋白,由肠道中的杯状细胞合成并分泌,是构成肠道黏液层的主要成分^[4,18]。研究表明,T4 噬菌体的 Hoc 蛋白能够通过与其糖基结合从而在黏液中富集,这一特性有助于其在复杂的肠道微环境中更有效地定位并识别宿主菌,促进其裂解^[7]。本研究首先进行体外试验,将黏液蛋白涂布于琼脂平板上筛



空白对照组、噬菌体对照组、沙门氏菌感染组、噬菌体预防组见表 1。不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

图 6 噬菌体 vB_SpuM_PA1-27 预处理对鼠伤寒沙门氏菌感染小鼠结肠基因转录水平的影响

Fig.6 Effects of phage vB_SpuM_PA1-27 pretreatment on gene transcription levels in the colon of mice infected with *Salmonella typhimurium*

选出黏附性高的噬菌体 vB_SpuM_PA1-27。

为明确体内噬菌体的杀菌效果,我们采用鼠伤寒沙门氏菌感染模型探究了噬菌体 vB_SpuM_PA1-27 在小鼠肠道中的黏附能力及预防鼠伤寒沙门氏菌引起肠道损伤的作用。结果显示,噬菌体 vB_SpuM_PA1-27 预处理 7 d 后,在小鼠各个肠段中仍可检测到其存在,在结肠中富集丰度最高,这可能与结肠黏液层相对较厚有关。Almeida 等^[19]报道,噬菌体能够黏附到彩虹鲟的初级黏液上,并在黏膜表面持续存在 7 d,抵御柱状杆菌感染。与此类似,本研究中,经噬菌体 vB_SpuM_PA1-27 预处理后,小鼠粪便中沙门氏菌载量较沙门氏菌感染组显著减少,表明噬菌体 vB_SpuM_PA1-27 具备在复杂肠道环境中精准靶向杀灭宿主菌的能力。

此外,我们进一步研究了噬菌体 vB_SpuM_PA1-27 黏附到肠道对鼠伤寒沙门氏菌引起肠道损伤的预防作用。鼠伤寒沙门氏菌是最常见的食源性致病菌之一,可通过黏附侵入到肠上皮细胞,引发局部炎症、造成细胞损伤,破坏肠道屏障功能。本研究中,小鼠感染鼠伤寒沙门氏菌后出现体重降低、脾脏肿大甚至死亡的现象。病理学组织切片分析结果显示,沙门氏菌感染导致小鼠肠道绒毛缩短、完整性受损。然而,噬菌体 vB_SpuM_PA1-27 预处理小鼠在

沙门氏菌感染后体重与空白对照组相比未发生显著变化,且无死亡发生。与沙门氏菌感染组比较,噬菌体 vB_SpuM_PA1-27 预处理显著降低了小鼠的脾脏指数,并改善了结肠损伤,表现为结肠长度增加以及结肠黏膜促炎性细胞因子基因 *TNF- α* 和 *IL-1 β* mRNA 表达水平降低。值得注意的是,噬菌体 vB_SpuM_PA1-27 预处理可显著上调 *MUC2* 基因的表达水平,这可能是其在肠道中发挥保护作用的另一重要机制。Wu 等^[7]发现,噬菌体 ϕ PNJ-6 能够通过 Hoc 蛋白的结构域与 *MUC2* 的岩藻糖残基结合,同时,噬菌体 ϕ PNJ-6 或 Hoc 蛋白诱导 HT-29 细胞 *MUC2* mRNA 和蛋白质表达水平上调。这些结果提示,噬菌体黏附与黏蛋白合成之间可能存在正反馈循环。

噬菌体对黏液的黏附作用在自然界中普遍存在,这一特性有助于噬菌体在黏膜表面形成一层天然的免疫屏障,有效抵御致病菌的侵袭^[20-22]。具有较强黏附能力的噬菌体更有可能在肠道这一复杂且动态变化的环境中保持活性和功能,这为开发和优化肠道噬菌体疗法提供了新的思路和策略。

参考文献:

- [1] KNECHT L E, VELJKOVIC M, FIESELER L. Diversity and func-

- tion of phage encoded depolymerases[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 10:2949.
- [2] MOYE Z D, WOOLSTON J, SULAKVELIDZE A. Bacteriophage applications for food production and processing[J]. *Viruses*, 2018, 10(4):205.
- [3] 李娜,袁晓鸣,王涓,等.短尾噬菌体识别宿主机制的研究进展[J]. *微生物学报*, 2022, 62(11):4324-4335.
- [4] PAONE P, CANI P D. Mucus barrier, mucins and gut microbiota: the expected slimy partners? [J]. *Gut*, 2020, 69(12):2232-2243.
- [5] ETIENNE-MESMIN L, CHASSAING B, DESVAUX M, et al. Experimental models to study intestinal microbes-mucus interactions in health and disease[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2019, 43(5):457-489.
- [6] CORNICK S, TAWIAH A, CHADEE K. Roles and regulation of the mucus barrier in the gut[J]. *Tissue Barriers*, 2015, 3(1/2):e982426.
- [7] WU J L, FU K L, HOU C L, et al. Bacteriophage defends murine gut from *Escherichia coli* invasion via mucosal adherence[J]. *Nature Communications*, 2024, 15(1):4764.
- [8] BARR J J, AURO R, FURLAN M, et al. Bacteriophage adhering to mucus provide a non-host-derived immunity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(26):10771-10776.
- [9] 杜恩存.百里香酚和香芹酚对肉仔鸡肠上皮屏障和免疫功能的调节作用[D].北京:中国农业大学,2016.
- [10] BAO H D, XUE Y Q, ZHANG Y Y, et al. Encapsulated essential oils improve the growth performance of meat ducks by enhancing intestinal morphology, barrier function, antioxidant capacity and the cecal microbiota[J]. *Antioxidants*, 2023, 12(2):253.
- [11] 李迎迎.贝莱斯芽孢杆菌 JT3 衍生的叫啉-3-乳酸(ILA)缓解鼠伤寒沙门氏菌感染的机制研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2023.
- [12] HASEGAWA D, ISHISAKA Y, MAEDA T, et al. Prevalence and prognosis of sepsis-induced cardiomyopathy: a systematic review and meta-analysis[J]. *Journal of Intensive Care Medicine*, 2023, 38(9):797-808.
- [13] FASSARELLA M, BLAAK E E, PENDERS J, et al. Gut microbiome stability and resilience: elucidating the response to perturbations in order to modulate gut health[J]. *Gut*, 2021, 70(3):595-605.
- [14] BELDA E, VOLAND L, TREMAROLI V, et al. Impairment of gut microbial biotin metabolism and host biotin status in severe obesity: effect of biotin and prebiotic supplementation on improved metabolism[J]. *Gut*, 2022, 71(12):2463-2480.
- [15] KEEN E C. A century of phage research: bacteriophages and the shaping of modern biology[J]. *BioEssays*, 2015, 37(1):6-9.
- [16] BISWAS B, ADHYA S, WASHART P, et al. Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* [J]. *Infection and Immunity*, 2002, 70(1):204-210.
- [17] SINGH A N, SINGH A, NATH G. Evaluation of bacteriophage cocktail on urinary tract infection caused by colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* in mice model[J]. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2024, 39:41-53.
- [18] LIELEG O, VLADESCU I, RIBBECK K. Characterization of particle translocation through mucin hydrogels[J]. *Biophysical Journal*, 2010, 98(9):1782-1789.
- [19] ALMEIDA G M F, LAANTO E, ASHRAFI R, et al. Bacteriophage adherence to mucus mediates preventive protection against pathogenic bacteria[J]. *mBio*, 2019, 10(6):e01984.
- [20] GREEN S I, LIU C G, YU X, et al. Targeting of mammalian glycans enhances phage predation in the gastrointestinal tract [J]. *mBio*, 2021, 12(1):e03474.
- [21] BÄCKHED F, LEY R E, SONNENBURG J L, et al. Host-bacterial mutualism in the human intestine [J]. *Science*, 2005, 307(5717):1915-1920.
- [22] DAHLMAN S, AVELLANEDA-FRANCO L, BARR J J. Phages to shape the gut microbiota? [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2021, 68:89-95.

(责任编辑:陈海霞)