



乳杆菌降低家蚕抗菌肽表达

徐淑雅¹, 武晓丽², 魏亚鹏¹, 何丽华¹, 董德纲², 徐 锋^{1,*}

(1. 南昌大学, 江西中德联合研究所, 南昌 330047; 2. 江西中医药大学基础医学院, 南昌 330004)

摘要:【目的】探究乳杆菌 *Lactobacillus* 对家蚕 *Bombyx mori* 抗菌肽基因转录水平的影响。【方法】用 2×10^8 CFU/mL 植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum* FLPL028、鼠李糖乳杆菌 *L. rhamnosus* FLRH956 和罗伊氏乳杆菌 *L. reuteri* FLRE589 悬液喷涂桑叶 ($20 \mu\text{L}/\text{cm}^2$) 饲喂家蚕 1 龄幼虫, 对 5 龄幼虫进行 RNAref 转录组测序并用 2×10^6 CFU/mL 的黏质沙雷氏菌 *Serratia marcescens* 悬液喷涂桑叶 ($20 \mu\text{L}/\text{cm}^2$) 饲喂, 计算家蚕结茧前死亡率; 将植物乳杆菌 FLPL028、鼠李糖乳杆菌 FLRH956 和罗伊氏乳杆菌 FLRE589 分别与黏质沙雷氏菌孵育 4 h 统计黏质沙雷氏菌活菌数; 对家蚕 5 龄幼虫中 *LOC101742127*, *glv1*, *glv2*, *CecA*, *LOC101739681*, *CecD*, *Attacin1*, *Leb3* 和 *Lzm* (抗菌肽基因), *LOC692824* (凝集素基因), *PGRP-S1* 和 *LOC101738493* (Toll/Imd 信号通路相关基因) 及 *Pi3k60*, *MAPK* 和 *Ras2* (PI3K 和 MAPK 信号通路相关基因) 等免疫相关基因表达量进行 qPCR 检测。【结果】与对照组比, 家蚕 1 龄幼虫分别饲喂植物乳杆菌 FLPL028、鼠李糖乳杆菌 FLRH956 和罗伊氏乳杆菌 FLRE589 后, 5 龄幼虫中 *Moricin*, *glv4-like* 和 *glv2* 等大多数抗菌肽基因的转录水平显著下降, 其中 *Moricin* 的转录水平下降最多; 凝集素基因 *CTL10*, *CTL19* 和 *LOC101736606* 及 Toll/Imd 信号通路相关基因 *PGRP-S2*, *LOC101738325* 和 *LOC101738493* 的转录水平下降, PI3K 和 MAPK 信号通路相关基因 *Pi3k60* 和 *MAPK* 的转录水平分别提高约 2.4 和 2.1 倍。但上述 3 种乳杆菌都对黏质沙雷氏菌具有拮抗作用, 将模型组 (只饲喂黏质沙雷氏菌) 家蚕的死亡率从 83% 降低到 35% 以下, 其中罗伊氏乳杆菌 FLRE589 对黏质沙雷氏菌的拮抗作用最好, 只引起 18.1% 的家蚕 5 龄幼虫死亡率。*LOC101742127*, *glv1*, *glv2*, *CecA*, *LOC101739681*, *CecD*, *Attacin1*, *Leb3*, *Lzm*, *LOC692824*, *LOC101738493*, *PGRP-S1*, *Pi3k60*, *MAPK* 和 *Ras2* 的表达量变化趋势与 RNAref 转录组测序结果的基本一致。这 3 种乳杆菌的发酵上清能有效杀死黏质沙雷氏菌, 降低黏质沙雷氏菌的活菌数。【结论】乳杆菌抑制家蚕抗菌肽和 Toll/Imd 免疫通路相关基因的表达, 虽然降低了先天性免疫应答, 但有利于乳杆菌与家蚕和睦相处, 另外还可以通过激活 PI3K 和 MAPK 信号通路提高家蚕获得性免疫, 此发现有助于更加全面认识蚕免疫系统, 为养蚕业防治疾病提供新的策略。

关键词: 家蚕; 抗菌肽; 乳杆菌; RNAref 转录组测序; 黏质沙雷氏菌

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2025)04-0375-11

Lactobacillus reduces antimicrobial peptide expression in *Bombyx mori*

XU Shu-Ya¹, WU Xiao-Li², WEI Ya-Peng¹, HE Li-Hua¹, DONG De-Gang², XU Feng^{1,*} (1. Jiangxi-OAI Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China; 2. College of Basic Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

Abstract: 【Aim】To explore the effect of *Lactobacillus* on the transcription level of antimicrobial peptide genes in *Bombyx mori*. 【Methods】After spraying the suspension (2×10^8 CFU/mL) of *Lactobacillus plantarum* FLPL028, *L. rhamnosus* FLRH956 and *L. reuteri* FLRE589 to the mulberry leaves ($20 \mu\text{L}/\text{cm}^2$)

to feed the 1st instar larvae of *B. mori*, the RNAref transcriptome sequencing of the 5th instar larvae was performed and the mortality rate before cocooning of *B. mori* after feeding the 5th instar larvae with the mulberry leaves sprayed with the suspension (2×10^6 CFU/mL, $20 \mu\text{L}/\text{cm}^2$) of *Serratia marcescens* was calculated. The numbers of viable bacteria of *S. marcescens* were counted at 4 h after incubation with *L. plantarum* FLPL028, *L. rhamnosus* FLRH956 and *L. reuteri* FLRE589, respectively. The expression levels of immune-related genes including *LOC101742127*, *glv1*, *glv2*, *CecA*, *LOC101739681*, *CecD*, *Attacin1*, *Leb3* and *Lzm* (antimicrobial peptide genes), *LOC692824* (lectin gene), *PGRP-S1* and *LOC101738493* (Toll/Imd signaling pathway-related genes), and *Pi3k60*, *MAPK* and *Ras2* (PI3K and MAPK signaling pathway-related genes) in the 5th instar larvae of *B. mori* were detected by qPCR. 【Results】After the 1st instar larvae of *B. mori* were fed with *L. plantarum* FLPL028, *L. rhamnosus* FLRH956 and *L. reuteri* FLRE589, respectively, the transcription levels of most antimicrobial peptide genes, including *Moricin*, *glv4-like* and *glv2*, were significantly decreased in the 5th instar larvae, and that of *Moricin* decreased the most, as compared with those of the control group. After the 1st instar larvae of *B. mori* were fed with *L. plantarum* FLPL028, *L. rhamnosus* FLRH956 and *L. reuteri* FLRE589, respectively, the transcription levels of lectin genes such as *CTL10*, *CTL19* and *LOC101736606*, and Toll/Imd signaling pathway-related genes *PGRP-S2*, *LOC101738325* and *LOC101738493* in the 5th instar larvae decreased, and those of PI3K and MAPK signaling pathway-related genes *Pi3k60* and *MAPK* were increased by about 2.4- and 2.1-fold, respectively, as compared with those of the control group. However, the above three species of *Lactobacillus* had antagonistic effects on *S. marcescens*, and reduced the mortality rate of *B. mori* in the model group (only fed with *S. marcescens*) from 83% to less than 35%, among them *L. reuteri* FLRE589 had the best antagonistic effect on *S. marcescens*, causing only 18.1% mortality rate of the 5th instar larvae of *B. mori*. The basic change trends of the expression levels of *LOC101742127*, *glv1*, *glv2*, *CecA*, *LOC101739681*, *CecD*, *Attacin1*, *Leb3*, *Lzm*, *LOC692824*, *LOC101738493*, *PGRP-S1*, *Pi3k60*, *MAPK* and *Ras2* were consistent with those of RNAref transcriptome sequencing results. The supernatant of the fermentation of these three species of *Lactobacillus* could effectively kill *S. marcescens* and reduce the number of viable bacteria of *S. marcescens*. 【Conclusion】*Lactobacilli* inhibits the expression of antimicrobial peptide genes and Toll/Imd immune pathway-related genes in *B. mori*, reduces the innate immune response of *B. mori*, but is conducive to the harmony between *Lactobacilli* and *B. mori*. In addition, *Lactobacilli* can also improve the acquired immunity of *B. mori* by activating the PI3K and MAPK signaling pathways. This finding will help to understand the immune system of *B. mori* more comprehensively and provide a new strategy for the prevention and control of diseases in *B. mori* industry.

Key words: *Bombyx mori*; antimicrobial peptides; *Lactobacillus*; RNAref transcriptome sequencing; *Serratia marcescens*

家蚕 *Bombyx mori* 是全球丝绸生产的主要来源,其健康养殖对蚕业经济至关重要,然而,家蚕在养殖过程中易受到细菌、真菌和病毒等病原体的侵害,导致疾病的发生。家蚕疾病主要包括细菌性、真菌性和病毒性疾病,由黏质沙雷氏菌 *Serratia marcescens*、浓黄拟曲霉 *Aspergillus flavus*、家蚕微孢子虫 *Nosema bombycis*、家蚕核型多角体病毒 (*B. mori* nucleopolyhedrovirus, BmNPV) 等引起,这些疾病不仅影响家蚕的生长和丝茧质量,还可能导致家

蚕的大量死亡(苏韵, 2021; 徐微, 2021)。家蚕作为无脊椎动物,主要依赖先天免疫系统来抵御病原体的入侵,但 Jiang(2021)阐明家蚕还可以通过激活多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)、PI3K/AKT 和 MAPK 等通路,提高获得性免疫能力,抵御病毒的入侵。唐芬芬等(2023)还发现家蚕感染病毒后能产生特异性抗体,为后续感染提供保护。另外家蚕的免疫还受到环境因素、营养状态和发育阶段的影响(刘原, 2016)。

近年来,随着分子生物学技术的发展,对家蚕免疫系统的研究取得了显著进展。家蚕的免疫系统主要包括血淋巴、脂肪体、肠道和表皮等组织 (Qiu *et al.*, 2023)。血淋巴中含有多种免疫活性分子,如抗菌肽、凝集素和酶等,脂肪体是蚕体内最大的免疫器官,类似于脊椎动物的肝脏和脾脏,负责合成和分泌免疫分子,肠道作为与外界环境直接接触的界面,其微生物群落的平衡对蚕的免疫状态有着重要影响。家蚕的免疫系统通过识别和清除病原体、调节炎症反应、修复受损组织等多种机制来保护蚕免受病原体的侵害 (陈康康和吕志强, 2014)。其中,模式识别受体 (如 Toll 样受体) 和免疫信号通路 (如 Toll/I κ B 信号通路) 在识别病原体和激活免疫反应中发挥关键作用。家蚕的免疫反应受到精细的调控,以确保有效的防御同时避免过度的免疫反应,包括转录因子、microRNA 和长非编码 RNA 在内的多种调控因子参与了免疫基因的表达调控。

抗菌肽是昆虫先天免疫系统的关键成分,同样对蚕的疾病防御和生存具有至关重要的作用 (覃玥等, 2015)。抗菌肽广泛存在于家蚕的血淋巴、脂肪体和肠道等组织中,根据其结构和来源,家蚕的抗菌肽可被归纳为 6 个蛋白质家族即天蚕素、Attacin、Lebocin、Moricin、葛佬素及 Defensin,而且这些抗菌肽基因可以通过不等交换产生多拷贝基因家族,并且可能存在强免疫诱导模式,其独特的氨基酸序列和空间结构,赋予其强大的抗菌活性,主要功能是抵御病原体的侵袭,包括细菌、真菌和病毒,同时也参与调节家蚕的免疫反应,影响炎症反应和细胞凋亡等过程。抗菌肽在家蚕感染病原体后通常表达量会增加,其表达量变化已被证明与病原体感染密切相关,使抗菌肽成为疾病早期诊断的潜在生物标志物 (Liu *et al.*, 2008)。

益生菌作为一种能够调节宿主肠道微生物平衡、增强宿主免疫力的活微生物,在家蚕疾病防治中展现出良好的应用前景 (Tiwari *et al.*, 2022)。通常益生菌在宿主肠道内发挥作用,促进营养物质的吸收,抑制有害微生物的生长,增强宿主的免疫力 (Ding *et al.*, 2021)。益生菌在家蚕疾病防治中主要通过竞争性排斥,产生抗菌物质,调节免疫反应和维护肠道微生物平衡等方法提高家蚕对疾病的抵抗力,多项研究表明,益生菌可以显著提高家蚕对多种疾病的抵抗力 (Li *et al.*, 2024)。益生菌可以诱导包括人在内的很多宿主产生抗菌肽 (Sevillano *et al.*, 2023),但对能否诱导家蚕产生抗菌肽的研究却很

少,故缺乏直接证据表明益生菌能够诱导家蚕产生抗菌肽,但根据益生菌与宿主免疫系统相互作用的一般原理,可以推测益生菌有可能通过其分泌的代谢产物或直接与家蚕的免疫细胞相互作用,从而影响家蚕抗菌肽的产生,这需要进行进一步的实验研究来验证。抗菌肽是蚕先天免疫系统中的重要效应分子,对蚕的疾病防御和生存具有重要作用,深入研究益生菌与蚕抗菌肽之间的关联,将为家蚕疾病的防治提供新的策略,有助于推动蚕业的可持续发展。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum* FLPL028,鼠李糖乳杆菌 *L. rhamnosus* FLRH956,罗伊氏乳杆菌 *L. reuteri* FLRE589 和黏质沙雷氏菌 *Serratia marcescens* FSMA02 均为南昌大学中德联合研究院筛选并保存。

1.2 实验动物

家蚕 872 × 871 购自山东省广通蚕种有限公司。

1.3 主要试剂

Trizol RNA Extraction Kit 试剂盒、反转录试剂盒、qPCR 试剂盒均购自 TaKaRa; MRS 购买于索莱宝公司,桑叶品种为豫 711,琼脂糖购买于 GIBCO Invitrogen,其他试剂均为国产分析纯。

1.4 菌株培养、收集和悬浮液制备

植物乳杆菌 FLPL028、鼠李糖乳杆菌 FLRH956 和罗伊氏乳杆菌 FLRE589 参照 Izaguirre 等 (2021) 的方法,活化后分别按照 1% 接菌量,接入 500 mL MRS 液体培养基,37 °C 厌氧培养 18 h 后,5 000 r/min 室温离心 4 min,收集菌体沉淀,并用无菌生理盐水离心洗涤 3 次,用生理盐水重悬至 2×10^8 CFU/mL 备用。

黏质沙雷氏菌参照 Izaguirre 等 (2021) 方法,活化后,按照 5% 接菌量,接入 500 mL LB 液体培养基,160 r/min 30 °C 条件下培养 72 h,5 000 r/min 室温离心 4 min,收集菌体沉淀,并用无菌生理盐水离心洗涤 3 次,用生理盐水重悬至 2×10^6 CFU/mL 备用。

1.5 乳杆菌饲喂家蚕以及拮抗黏质沙雷氏菌感染的检测

家蚕蚕种 872 × 871 购自山东省广通蚕种有限公司。将蚕卵在人工培养箱中在 25 °C、相对湿度 80% 和光周期 12L: 12D 条件下孵育。当 20% 的卵表面有小黑点时,用黑色遮光板遮光 2 d 左右,以保

证幼虫一次孵化出来。然后将其分为 8 组,每组 60 头家蚕。对照组用生理盐水按照 20 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 喷涂桑叶,模型组在家蚕 5 龄幼虫时,按照 20 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 用 2×10^6 CFU/mL 的黏质沙雷氏菌悬液喷涂桑叶。植物乳杆菌 FLPL028 组、鼠李糖乳杆菌 FLRH956 组和罗伊氏乳杆菌 FLRE589 组分别按照 20 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 用 2×10^8 CFU/mL 的植物乳杆菌 FLPL028、鼠李糖乳杆菌 FLRH956 和罗伊氏乳杆菌 FLRE589 悬液喷涂桑叶饲喂 1 龄幼虫。植物乳杆菌 FLPL028 拮抗组、鼠李糖乳杆菌 FLRH956 拮抗组和罗伊氏乳杆菌 FLRE589 拮抗组,按照 20 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 用 2×10^8 CFU/mL 的植物乳杆菌 FLPL028、鼠李糖乳杆菌 FLRH956 和罗伊氏乳杆菌 FLRE589 悬液喷涂桑叶饲喂 1–4 龄幼虫,到 5 龄幼虫时改为以含 2×10^6 CFU/mL 的黏质沙雷氏菌及 2×10^8 CFU/mL 植物乳杆菌 FLPL028、鼠李糖乳杆菌 FLRH956 和罗伊氏乳杆菌 FLRE589 悬液按照按照 20 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 喷涂桑叶饲喂。每日观察家蚕状态,并在结茧前统计家蚕死亡数量,计算死亡率。各组试验重复 3 次。

1.6 RNAREF 转录组测序检测乳杆菌对家蚕基因转录的影响

取 1.5 节植物乳杆菌 FLPL028 组、鼠李糖乳杆菌 FLRH956 组、罗伊氏乳杆菌 FLRE589 组和对照

组这 4 组 5 龄幼虫,每组 30 头,按照 Zhu 等(2023)的方法,分别提取总 RNA,并送交华大基因有限公司进行 RNAREF 转录组测序。测序平台为 BGISEQ,使用分析软件 HISAT 和 Bowtie2 与 NCBI 里的 GCF014905235.1 Bmori 2016v1.0 进行比对,进行基因表达、新转录本预测及注释、单核苷酸多态性(single-nucleotide polymorphism, SNP)检测,并从基因表达结果中筛选出样品间差异表达基因,筛选标准为: $P \leq 0.05$ (FDR 校正)。

1.7 qPCR 检测

在 GenBank 里查找抗菌肽、凝集素、Toll/Imd、PI3K 和 MAPK 信号通路等免疫相关基因的 cDNA 序列,以 *RpL3* 为内参基因,设计合成引物(表 1)。取 1.5 节植物乳杆菌 FLPL028 组、鼠李糖乳杆菌 FLRH956 组、罗伊氏乳杆菌 FLRE589 组和对照组这 4 组家蚕 5 龄幼虫,每组 30 头,每组 3 次重复。参照廉添添等(2024)的方法,在 5 龄第 3 天幼虫时分别提取总 RNA,并反转录成 cDNA,进行 qPCR 检测,PCR 反应体系: $2 \times \text{PCR Mix}$ 15 μL ,上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μL , ddH₂O 补齐到 30 μL 。反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 40 个循环。根据“归一法”计算目的基因相对表达量(宫英杰等, 2025)。

表 1 引物信息
Table 1 Primer information

基因 Genes	基因 ID Gene ID	正向引物序列(5′–3′) Forward primer sequences	反向引物序列(5′–3′) Reverse primer sequences
<i>LOC101742127</i>	101742127	CAGGCTGATCCGAAAATTCC	CCTTGATTCCCACGGTTACG
<i>glv1</i>	692475	ATCTATTCCAACCTCTTCTATCCG	CTCCACAACCCCTCAAACCC
<i>glv2</i>	692527	ATCAATTCAAATCTCTTTTATATCT	AGCCACCGTCTAGACCCTA
<i>CecA</i>	693029	CGTATTTTGAGCTTCGTCTTCG	TTTTCTAAGGATTTCGTTGC
<i>LOC101739681</i>	101739681	ATCCTTCGTCTTCGCTCTGG	CCTATGGCTTTAGCCGAACC
<i>CecD</i>	692369	TCGTTTTTCGTGTTGCTATTG	CAAGGTGTCGACTGCTGGAG
<i>Attacin1</i>	692555	CATCAACCGGAATGACTACTCG	GGCGTATCAAACCTCTTGAAGC
<i>Leb3</i>	100146108	CTGTTCCAACGCTTCCTCC	GCCGCAATTCTTCTTGATCC
<i>Lzm</i>	693015	CTGAAGCCAAAACGTTACAG	CGACCAGACATACCCAGTTCC
<i>LOC692824</i>	692824	ACATTGAAGACACCGGATTCC	ACCACCACTCTCTTAGTCCAGG
<i>LOC101738493</i>	101738493	TGCCTCAGCTAAAGACACTCG	GCGACCAACAAATGCTCC
<i>PGRP-S1</i>	692372	AATATCCAGACCAACCACATGG	ATGAATGCCACTCCGATGG
<i>Pi3k60</i>	100158253	GCTGGAAAACCACTCCTTCG	GAGCAACCACGTCTCACTGC
<i>MAPK</i>	692467	CACGCCATCTAACATGACACC	TCTTTGACTTGCCTGCTAACC
<i>Ras2</i>	692542	AATTGGACATCTTGACACAGC	TCCTCCCTGCTTTGACTCG
<i>RpL3</i>	692658	CAAATTCATTGACACCTCGTCC	TCTTGAGTGTAACCATGAATGC

1.8 乳杆菌拮抗黏质沙雷氏菌

按照 1.4 节方法分别制备植物乳杆菌 FLPL028、鼠李糖乳杆菌 FLRH956 和罗伊氏乳杆菌 FLRE589 的液体培养基,离心收集发酵上清,并过滤除菌,各取 10 mL 分别加入到 40 mL 含新鲜黏质沙雷氏菌 LB 液体培养基(10^6 CFU/mL)中,160 r/min 30 ℃ 条件下孵育 4 h,以 10 mL MRS 液体培养基作为对照,进行黏质沙雷氏菌 1 mL 菌液内的活菌数计数,分析植物乳杆菌 FLPL028,鼠李糖乳杆菌 FLRH956,罗伊氏乳杆菌 FLRE589 发酵上清对黏质沙雷氏菌的拮抗作用。

1.9 数据分析

运用 SPSS 软件执行单样本 *t* 检验 (one-sample *t*-test) 分析各处理组与对照组间的统计学差异。图形展示经由 GraphPad Prism 9 软件完成,所有的实验都进行了 3 次。

2 结果

2.1 RNAref 转录组学检测乳杆菌对家蚕基因转录的影响

与对照组比较,罗伊氏乳杆菌 FLRE589 饲喂组差异表达基因数量最少(453 个),植物乳杆菌 FLPL028 和鼠李糖乳杆菌 FLRH956 饲喂组差异表达基因数量基本一样(分别为 1 064 和 1 101 个),3 种乳杆菌饲喂差异表达基因合计 1 715 个(图 1)。这些差异表达基因涉及家蚕的生长发育、蚕丝形成以及免疫系统等方面。抗菌肽基因转录水平普遍下调($P < 0.05$)(表 2)。在乳杆菌的影响下,凝集素基因

也是显著下调表达($P < 0.05$)(表 3)。同样在识别病原体 and 激活免疫反应中发挥关键作用的 Toll/Imd 通路,也被 3 种乳杆菌抑制了活性,如参与免疫识别激活的 Toll 受体、肽聚糖识别蛋白和葡聚糖肽聚糖识别蛋白基因等都显著下调($P < 0.05$)(表 4)。表 5 显示 3 种乳杆菌都显著提高了 PI3K 信号通路的关键酶磷脂酰肌醇 3-激酶的转录水平,涉及 MAPK 通路上下游的 RAS 蛋白、MAP 激酶-erk 激酶、钙调蛋白样蛋白和热激动蛋白基因等也都显著上调($P < 0.05$)。

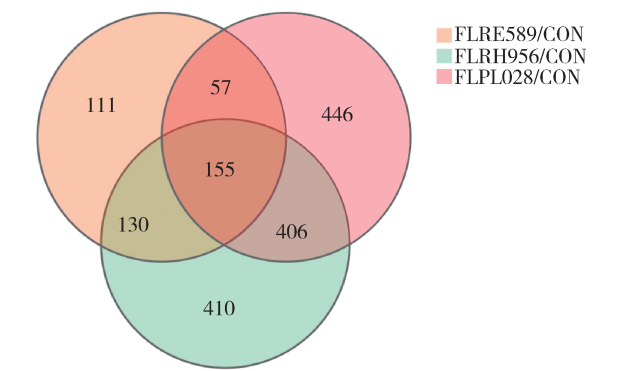


图 1 3 种乳杆菌饲喂家蚕 1 龄幼虫后 5 龄幼虫转录组中的差异表达基因数量
Fig. 1 Numbers of differentially expressed genes in the transcriptomes of the 5th instar larvae after feeding the 1st instar larvae of *Bombyx mori* with three species of *Lactobacillus*
CON: 对照组(生理盐水) Control group (saline); FLRE589: 罗伊氏乳杆菌 FLRE589 *L. reuteri* FLRE589; FLPL028: 植物乳杆菌 FLPL028 *L. plantarum* FLPL028; FLRH956: 鼠李糖乳杆菌 FLRH956 *L. rhamnosus* FLRH956. 下同。The same below.

表 2 植物乳杆菌 FLPL028、鼠李糖乳杆菌 FLRH956 和罗伊氏乳杆菌 FLRE589 饲喂家蚕 1 龄幼虫后 5 龄幼虫转录组中部分下调的抗菌肽基因

Table 2 Some antimicrobial peptide genes down-regulated in the transcriptomes of the 5th instar larvae after feeding the 1st instar larvae of <i>Bombyx mori</i> with <i>Lactobacillus plantarum</i> FLPL028, <i>L. rhamnosus</i> FLRH956 and <i>L. reuteri</i> FLRE589						
基因 Genes	基因 ID Gene ID	log ₂ (FLRE589/CON)	log ₂ (FLPL028/CON)	log ₂ (FLRH956/CON)	log ₂ (EXP/CON)	<i>P</i> 值 <i>P</i> -value (EXP/CON)
LOC101742127	101742127	-1.86507	-3.08746	-4.67242	-3.01044	1.27×10^{-10}
Moricin	692365	-1.84011	-2.59819	-2.042336	-2.24605	1.46×10^{-34}
glv1	692475	-3.78419	-2.87698	-1.49915	-2.46989	2.76×10^{-4}
glv2	692527	-2.61590	-3.44874	-1.77098	-2.55278	3.91×10^{-13}
glv4-like	692477	-0.58157	-2.18563	-1.61599	-1.43576	4.35×10^{-6}
LOC119629768	119629768	-0.36168	-0.95259	-1.36348	-0.81474	1.67×10^{-3}
LOC101739821	101739821	-0.88506	-1.772589	-1.43155	-1.62103	2.00×10^{-11}

续表 2 Table 2 continued

基因 Genes	基因 ID Gene ID	log ₂ (FLRE589/CON)	log ₂ (FLPL028/CON)	log ₂ (FLRH956/CON)	log ₂ (EXP/CON)	P 值
						P-value (EXP/CON)
CecA	693029	− 0. 67103	− 0. 62421	− 1. 14267	− 0. 91436	2. 94 × 10 ^{−8}
LOC101743336	101743336	− 1. 32060	− 1. 38677	− 1. 52323	− 1. 5307	9. 87 × 10 ^{−49}
LOC101739681	101739681	− 0. 44325	− 1. 43686	− 1. 40082	− 1. 18143	3. 03 × 10 ^{−7}
CECB1	693028	− 0. 75730	− 1. 35515	− 1. 21626	− 1. 29541	3. 77 × 10 ^{−17}
LOC101739958	101739958	− 1. 22614	− 1. 29649	− 1. 76074	− 1. 62061	3. 44 × 10 ^{−24}
CecD	692369	− 1. 81062	− 1. 34475	− 1. 47886	− 1. 79042	2. 99 × 10 ^{−19}
LOC101743224	101743224	− 1. 15496	− 1. 55972	− 1. 29112	− 1. 41611	5. 90 × 10 ^{−35}
Attacin1	692555	− 1. 146432	− 1. 16787	− 1. 18756	− 1. 25764	1. 61 × 10 ^{−39}
Leb3	100146108	− 1. 078296	− 1. 64649	− 1. 17296	− 1. 36501	1. 10 × 10 ^{−19}
Lzm	693015	− 1. 51950	− 1. 25983	− 0. 86199	− 1. 20965	9. 55 × 10 ^{−9}
LOC101738343	101738343	− 0. 30468	− 0. 77307	− 0. 81569	− 0. 73969	1. 20 × 10 ^{−7}
LOC101738212	101738212	− 0. 38702	− 2. 08746	− 1. 44361	− 1. 40051	3. 75 × 10 ^{−4}

EXP/CON: 3 种乳杆菌处理组基因转录水平与对照组基因转录水平的平均比值 Average ratios of gene transcription levels in the treatment groups with three species of *Lactobacillus* to those in the control group; FLRE589/CON: 罗伊氏乳杆菌 FLRE589 处理组基因转录水平与对照组基因转录水平的比值 Ratios of gene transcription levels in *L. reuteri* FLRE589-treated group to those in the control group; FLPL028/CON: 植物乳杆菌 FLPL028 处理组基因转录水平与对照组基因转录水平的比值 Ratios of gene transcription levels in *L. plantarum* FLPL028-treated group to those in the control group; FLRH956/CON: 鼠李糖乳杆菌 FLRH956 处理组基因转录水平与对照组基因转录水平的比值 Ratios of gene transcription levels in *L. rhamnosus* FLRH956-treated group to those in the control group. 表 3-5 同。The same for Tables 3-5.

表 3 植物乳杆菌 FLPL028、鼠李糖乳杆菌 FLRH956 和罗伊氏乳杆菌 FLRE589 饲喂家蚕 1 龄幼虫后 5 龄幼虫转录组中部分下调的凝集素基因
Table 3 Some lectin genes down-regulated in the transcriptomes of the 5th instar larvae after feeding the 1st instar larvae of *Bombyx mori* with *Lactobacillus plantarum* FLPL028, *L. rhamnosus* FLRH956 and *L. reuteri* FLRE589

基因 Genes	基因 ID Gene ID	log ₂ (FLRE589/CON)	log ₂ (FLPL028/CON)	log ₂ (FLRH956/CON)	log ₂ (EXP/CON)	<i>P</i> 值
						<i>P</i> -value (EXP/CON)
<i>LOC692824</i>	692824	−0.70302	−0.73697	−0.84388	−1.06334	4.90 × 10 ^{−5}
<i>CTL5</i>	692946	−0.21181	−1.33065	−0.53374	−0.87733	8.10 × 10 ^{−4}
<i>CTL10</i>	778489	−1.12173	−1.57483	−1.06743	−1.30202	1.68 × 10 ^{−17}
<i>CTL19</i>	100329157	−0.96425	−0.96425	−1.178250	−1.22602	1.87 × 10 ^{−24}
<i>LOC101736606</i>	101736606	−2.15200	−2.15200	−1.27753	−1.92299	1.30 × 10 ^{−8}

2.2 3 种乳杆菌拮抗黏质沙雷氏菌引起的家蚕灵菌败血病

模型组(CK)被黏质沙雷氏菌引发家蚕灵菌败血病,家蚕 5 龄幼虫死亡率高达 83.9%,含黏质沙雷氏菌的饲料中加入 3 种乳杆菌都能显著降低家蚕 5 龄幼虫的死亡率,其中罗伊氏乳杆菌 FLRE589 对黏质沙雷氏菌的拮抗作用最好,只引起 18.1% 的 5 龄幼虫死亡,而加入植物乳杆菌 FLPL028 和鼠李糖乳杆菌 FLRH956 导致的家蚕 5 龄幼虫死亡率分别为

28.3% 和 31.9%(图 2)。

2.3 qPCR 检测 3 种乳杆菌影响家蚕免疫相关基因表达量的变化

15 种基因表达量的变化与 RNAref 转录组测序结果的基本趋势一致(图 3),再一次验证了 3 种乳杆菌下调了抗菌肽和凝集素基因的转录水平,抑制了 Toll/Imd 通路相关基因的表达,但却激活了 PI3K 和 MAPK 信号通路相关基因的表达,可能乳杆菌是借助这些通路帮助家蚕抵抗病原菌入侵。

表 4 植物乳杆菌 FLPL028、鼠李糖乳杆菌 FLRH956 和罗伊氏乳杆菌 FLRE589 饲喂家蚕 1 龄幼虫后 5 龄幼虫转录组中部分下调的 Toll/Imd 信号通路相关基因

Table 4 Some Toll/Imd signaling pathway-related genes down-regulated in the transcriptomes of the 5th instar larvae after feeding the 1st instar larvae of <i>Bombyx mori</i> with <i>Lactobacillus plantarum</i> FLPL028, <i>L. rhamnosus</i> FLRH956 and <i>L. reuteri</i> FLRE589						
基因 Genes	基因 ID Gene ID	log ₂ (FLRE589/CON)	log ₂ (FLPL028/CON)	log ₂ (FLRH956/CON)	log ₂ (EXP/CON)	P 值 P-value (EXP /CON)
LOC101735584	101735584	-0.59999	-0.96180	-0.98774	-0.90306	2.16 × 10 ⁻¹⁶
LOC101736902	101736902	-0.18815	-0.42981	-0.72026	-0.58037	7.47 × 10 ⁻⁴
BGRP3	100188963	-0.566147	-1.68512	-1.31940	-1.1664	1.76 × 10 ⁻⁴
LOC101739182	101739182	-0.31238	-0.98728	-0.9622	-0.68854	9.45 × 10 ⁻⁷
PGRP-S1	692372	-0.89449	-1.00414	-0.86474	-0.98477	4.30 × 10 ⁻³
PGRP-S2	732851	-0.76664	-0.68588	-0.59090	-0.71362	8.30 × 10 ⁻²²
LOC101738325	101738325	-0.05092	-0.28488	-0.69316	-0.56817	3.18 × 10 ⁻⁸
LOC101738493	101738493	-0.46642	-0.72286	-0.77193	-0.73154	5.26 × 10 ⁻³

表 5 植物乳杆菌 FLPL028、鼠李糖乳杆菌 FLRH956 和罗伊氏乳杆菌 FLRE589 饲喂家蚕 1 龄幼虫后 5 龄幼虫转录组中部分上调的 PI3K 和 MAPK 信号通路相关基因

Table 5 Some PI3K and MAPK signaling pathway-related genes up-regulated in the transcriptomes of the 5th instar larvae after feeding the 1st instar larvae of <i>Bombyx mori</i> with <i>Lactobacillus plantarum</i> FLPL028, <i>L. rhamnosus</i> FLRH956 and <i>L. reuteri</i> FLRE589						
基因 Genes	基因 ID Gene ID	log ₂ (FLRE589/CON)	log ₂ (FLPL028/CON)	log ₂ (FLRH956/CON)	log ₂ (EXP/CON)	P 值 P-value (EXP/CON)
Pi3k60	100158253	0.86456	1.08548	0.61830	0.831078	2.01 × 10 ⁻⁶
MAPK	692467	0.41778	0.71400	0.48444	0.431473	6.93 × 10 ⁻³
LOC101737457	101737457	1.38633	1.22738	1.19563	1.133242	2.51 × 10 ⁻¹⁴
LOC101735832	101735832	1.10740	1.21961	0.62899	0.732544	1.86 × 10 ⁻³
LOC733093	733093	0.65317	0.57265	0.61459	0.650846	8.35 × 10 ⁻⁶
LOC101737822	101737822	0.93138	1.56259	1.20645	1.297053	2.53 × 10 ⁻⁷
LOC100037427	100037427	0.54383	0.39334	0.54900	0.402626	1.23 × 10 ⁻⁴
Ras3	692519	0.45605	0.79247	0.40573	0.555082	2.75 × 10 ⁻³
Ras2	692542	0.71502	0.76927	0.82667	0.642197	3.35 × 10 ⁻³

2.4 乳杆菌拮抗黏质沙雷氏菌

对照组黏质沙雷氏菌活菌数量经过培养后快速增加到 10 倍以上，而植物乳杆菌 FLPL028、鼠李糖乳杆菌 FLRH956 和罗伊氏乳杆菌 FLRE589 发酵上清能杀死黏质沙雷氏菌，将黏质沙雷氏菌活菌数量从 10⁶ CFU/mL 降低到 10² CFU/mL，3 种乳杆菌之间的杀黏质沙雷氏菌的效率无显著差异 ($P > 0.05$) (图 4)。

3 讨论与结论

当前有不少文献报道饲喂益生菌后提高家蚕抵

抗疾病的能力(李冠楠等, 2015; Nishida *et al.*, 2016; 韩冰等 2022)。本研究发现 3 种乳杆菌都能通过激活 PI3K 和 MAPK 信号通路,提高家蚕免疫相关基因转录水平(表 5),这与这些文献报道的结果趋于一致。但是本研究还发现天蚕素、Attacin、Lebocin、Moricin、葛佬素等抗菌肽基因都会被乳杆菌下调转录(表 2),这与致病菌感染是相反的结果。另外本研究中的 3 种乳杆菌都可以抑制 Toll/Imd 信号通路相关基因表达(表 4),降低凝集素相关基因表达(表 3)。这些对拮抗致病菌是不利的。由于目前没有相关文献报道,本研究只能独立推测该现象的生物学意义,即在漫长的生物进化过程中,益生菌

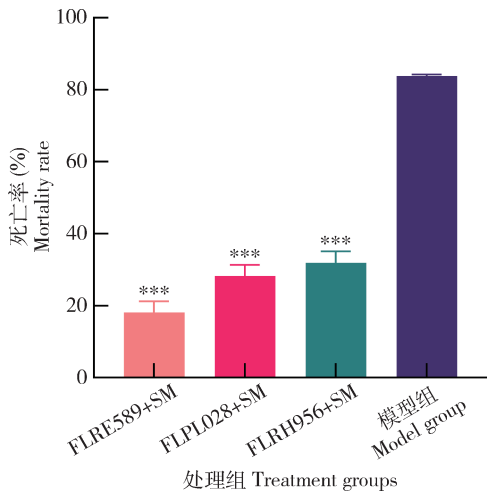


图2 植物乳杆菌 FLPL028、罗伊氏乳杆菌 FLRE589 和鼠李糖乳杆菌 FLRH956 降低黏质沙雷氏菌 导致的家蚕 5 龄幼虫死亡率

Fig. 2 *Lactobacillus plantarum* FLPL028, *L. reuteri* FLRE589 and *L. rhamnosus* FLRH956 reduce the mortality rates of the 5th instar larvae of *Bombyx mori* caused by *Serratia marcescens*

SM: 黏质沙雷氏菌 *S. marcescens*; FLRE589 + SM: 罗伊氏乳杆菌拮抗组 (罗伊氏乳杆菌 FLRE589 + 黏质沙雷氏菌) Antagonistic group of *L. reuteri* (*L. reuteri* FLRE589 + *S. marcescens*); FLPL028 + SM: 植物乳杆菌拮抗组 (植物乳杆菌 FLPL028 + 黏质沙雷氏菌) Antagonistic group of *L. plantarum* (*L. plantarum* FLPL028 + *S. marcescens*); FLRH956 + SM: 鼠李糖乳杆菌拮抗组 (鼠李糖乳杆菌 FLRH956 + 黏质沙雷氏菌) Antagonistic group of *L. rhamnosus* (*L. rhamnosus* FLRH956 + *S. marcescens*); MG: 模型组 (只饲喂黏质沙雷氏菌) Model group only fed with *S. marcescens* (CK). 图4同。The same for Fig. 4. 植物乳杆菌 FLPL028、鼠李糖乳杆菌 FLRH956 和罗伊氏乳杆菌 FLRE589 饲喂家蚕 1 龄幼虫, 5 龄幼虫时饲料中添加黏质沙雷氏菌, 在结茧前计算家蚕死亡率。图中数据为平均值 ± 标准差; 柱上三星号示拮抗组与模型组间差异显著 ($P < 0.001$, 单样本 t 检验)。 *L. plantarum* FLPL028, *L. rhamnosus* FLRH956 and *L. reuteri* FLRE589 were fed to the 1st instar larvae of *B. mori*, then *S. marcescens* was added to the diets when the larvae were at the 5th instar, and the mortality rate of *B. mori* was calculated before cocooning. Data in the figure are mean ± SD. Tri-asterisk above bars indicates significant difference between the antagonistic group and the model group ($P < 0.001$, one-sample t -test). 图4同。The same for Fig. 4.

演化出降低家蚕抗菌肽表达的功能, 帮助益生菌定殖家蚕体内, 与家蚕共存后, 益生菌再通过维持正常的微生物群落、与致病菌竞争营养物质和附着位点限制致病菌的生长和定殖、促进桑叶的消化吸收和诱导免疫系统等作用从而对家蚕的健康产生有益的影响。

本研究发现乳杆菌能有效降低灵菌败血病导致的死亡率, 其中, 罗伊氏乳杆菌处理组的死亡率较对

照组显著降低, 从 83.9% 降至 18.1% (图2)。目前在家蚕养殖方面还未看到用益生菌帮助家蚕拮抗黏质沙雷氏菌的报道, 但 Blum 等 (2013) 发现补充植物乳杆菌可以帮助果蝇 *Drosophila* 抵御黏质沙雷氏菌和铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* 的感染。Gavrilova 等 (2023) 也发现植物乳杆菌 AG10 不仅在体外抑制了黏质沙雷氏菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 和大肠杆菌 *Escherichia coli* 的生长, 并在果蝇胚胎和蛹期存活模型中减轻了致病菌在体内产生的负面影响。Torres-Sánchez 等 (2021) 从人类肠道微生物中分离出芽孢杆菌可以拮抗黏质沙雷氏菌。Vahedi-Shahandashti 等 (2016, 2017) 研究发现 *L. acidophilus* ATCC 4356 和 *L. plantarum* ATCC 8014 产生的细菌素能抑制黏质沙雷氏菌的群集运动性和生物膜形成, 推测这些乳杆菌可以应用于院内感染防治方面。黏质沙雷氏菌是一种革兰氏阴性的杆状细菌, 属于肠杆菌科沙雷氏菌属, 不仅能导致家蚕灵菌败血病, 临床上也是一种条件致病菌, 广泛分布于自然环境中, 如土壤、水源和植物上, 同时也常在医院环境中发现。在正常情况下, 黏质沙雷氏菌通常不会引起健康个体的疾病, 但在机体免疫功能降低或其他有利条件下, 它可以成为机会性病原体, 造成肺炎、尿路感染、伤口感染、心内膜炎、败血症等多种类型的感染 (石翠云, 2014)。而且近年来黏质沙雷氏菌的检出率在各地医院不断上升, 耐药性问题也日益突出, 家蚕养殖和临床上都面临治疗难题。而乳杆菌作为典型的益生菌, 不论是临床医疗、畜牧养殖, 农业种植都发挥着积极的有效作用。近年来在桑蚕养殖方面, 越来越多的乳杆菌制剂应用于抵抗家蚕疾病、制备替代桑叶的人工饲料、增加蚕丝产量和质量等。本研究发现乳杆菌导致家蚕抗菌肽基因表达量下降 (表2), 说明乳杆菌不是通过抗菌肽通路到达拮抗致病菌的效果。将来可以在本研究的基础上, 以家蚕这种模式生物作为实验对象, 进一步探究益生菌在体内如何通过其他分子机制抑制致病菌。

本研究在检测抗菌肽基因表达的同时, 还发现乳杆菌可以上调热休克蛋白的转录水平。相比抗菌肽方面, 益生菌提高热休克蛋白的表达却有很多报道。Tao 等 (2006) 证明鼠李糖乳杆菌 LGG 能同时大幅提高肠上皮细胞表达热休克蛋白 Hsp25 和 Hsp72, 还诱导 MAPK 通路, 这与本研究结果基本一致。Jiang 等 (2023) 发现 *Akkermansia muciniphila* 分泌的 Amuc_2172 蛋白通过胞吞作用, 进入细胞内,

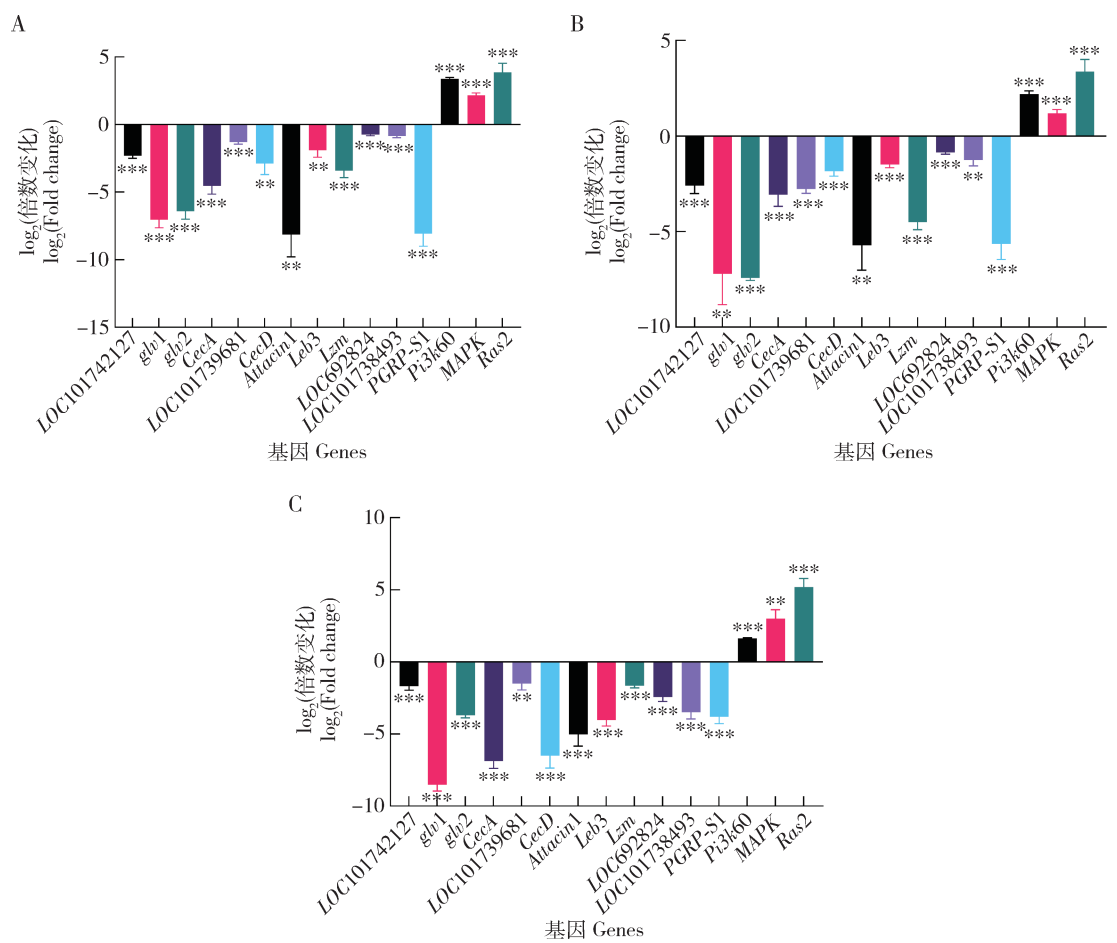


图3 qPCR 检测植物乳杆菌 FLPL028 (A)、罗伊氏乳杆菌 FLRE589 (B) 和鼠李糖乳杆菌 FLRH956 (C) 饲喂家蚕 1 龄幼虫后 5 龄幼虫中免疫相关基因的表达量

Fig. 3 Expression levels of immune-related genes in the 5th instar larvae of *Bombyx mori* after feeding the 1st instar larvae with *Lactobacillus plantarum* FLPL028 (A), *L. reuteri* FLRE589 (B) and *L. rhamnosus* FLRH956 (C) detected by qPCR

图中数据为平均值 ± 标准差; 柱上星号示与对照组(生理盐水)间差异显著 (** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$) (单样本 t 检验)。Data in the figure are mean ± SD. Asterisks above bars indicate significant differences from the control group (saline) (** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$) (one-sample t -test).

促进热休克蛋白 HSP70, 提高机体的 T 淋巴细胞的免疫活性。Petrof 等(2004)发现小鼠肠道里的益生菌通过抑制蛋白酶体, 降低核因子 κ B (nuclear factor-kappaB, NF κ B) 的表达, 却提高了热休克蛋白的表达, 从而达到降低炎症和保护细胞的作用。热激蛋白对生物个体的生长发育和抗逆性等生理过程具有重要影响。奶牛在高温环境下会增加激活热休克转录因子(heat shock transcription factor, HSF) 和热休克蛋白的表达, 以应对内部平衡, 减轻高温对哺乳奶牛的负面影响(Kim *et al.*, 2022)。家蚕作为变温动物, 对温度变化非常敏感。热休克蛋白在家蚕应对温度变化时起到保护作用, 帮助家蚕适应剧烈的环境温度变化, 克服高温或低温带来的伤害, 热激蛋白参与家蚕对多种非生物胁迫(如高温、化学物

质)和生物胁迫(如病原体感染)的应激反应, 它们可以作为分子伴侣, 帮助其他蛋白质正确折叠, 防止蛋白质聚集和变性, 从而保护细胞免受损伤。本研究发现乳杆菌可以上调热休克蛋白的转录水平, 暗示益生菌可以在家蚕的抗逆应答中扮演着重要角色, 帮助维持家蚕健康和适应环境变化。将来通过研究益生菌诱导热休克蛋白的具体作用机制, 可以为提高家蚕的抗逆性和疾病抵抗力提供新策略。

本研究的新发现补充了益生菌对家蚕抗菌肽表达等先天免疫应答的空白, 有助于了解益生菌如何定殖共生于家蚕宿主的分子机制, 为开发新的家蚕疾病预防和治疗策略、维护家蚕微生态平衡具有重要意义。未来的研究需要进一步探索致病菌和益生菌与家蚕细胞相互作用的分子机制差异, 以及如何

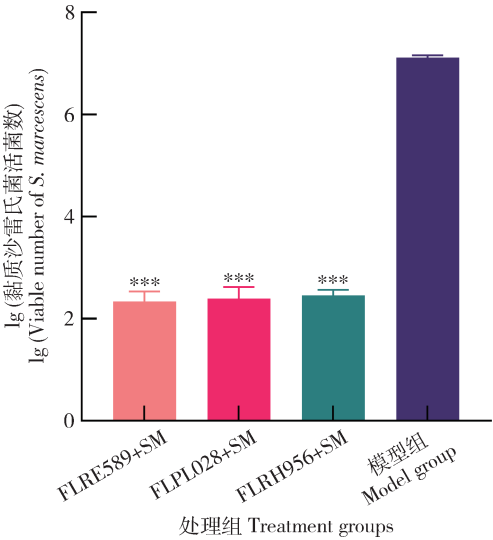


图4 植物乳杆菌 FLPL028、罗伊氏乳杆菌 FLRE589 和鼠李糖乳杆菌 FLRH956 拮抗黏质沙雷氏菌

Fig. 4 *Lactobacillus plantarum* FLPL028, *L. reuteri* FLRE589 and *L. rhamnosus* FLRH956 antagonize *Serratia marcescens*

植物乳杆菌 FLPL028、鼠李糖乳杆菌 FLRH956 和罗伊氏乳杆菌 FLRE589 分别与黏质沙雷氏菌孵育 4 h 时统计黏质沙雷氏菌活菌数。*L. plantarum* FLPL028, *L. rhamnosus* FLRH956 and *L. reuteri* FLRE589 were incubated with *S. marcescens* for 4 h, respectively, and the viable numbers of *S. marcescens* were counted.

利用这些知识来改善桑蚕养殖,提高丝绸产业的经济价值。

参考文献 (References)

Blum JE, Fischer CN, Miles J, Handelsman J, 2013. Frequent replenishment sustains the beneficial microbiome of *Drosophila melanogaster*. *mBio*, 4(6): e00860-13.

Chen KK, Lv ZQ, 2014. Peptidoglycan recognition proteins (PGRPs) in insects. *Acta Entomol. Sin.*, 57(8): 969 – 978. [陈康康, 吕志强, 2014. 昆虫肽聚糖识别蛋白研究进展. 昆虫学报, 57(8): 969 – 978]

Ding SJ, Yan WX, Ma Y, Fang J, 2021. The impact of probiotics on gut health via alternation of immune status of monogastric animals. *Anim. Nutr.*, 7(1): 24 – 30.

GavriloVA E, Kostenko V, Zadorina I, Khusnutdinova D, Yarullina D, Ezhkova A, Bogachev M, Kayumov A, Nikitina E, 2023. Repression of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* by *Lactiplantibacillus plantarum* strain AG10 in *Drosophila melanogaster* in vivo model. *Microorganisms*, 11(5): 1297.

Han B, Guo TK, Quan S, Du ZJ, 2023. Prospects of application of probiotics in stocking of tussah silkworm. *North Seric.*, 44(1): 44 – 47. [韩冰, 郭天凯, 全爽, 杜占军, 2023. 益生菌在柞蚕放养中的应用前景展望. 北方蚕业, 44(1): 44 – 47]

Izaguirre JK, Barañano L, Castañón S, Alkorta I, Quirós LM, Garbisu

C, 2021. Optimization of the bioactivation of isoflavones in soymilk by lactic acid bacteria. *Processes*, 9(6): 963.

Jiang L, 2021. Insights into the antiviral pathways of the silkworm *Bombyx mori*. *Front. Immunol.*, 12: 639092.

Jiang Y, Xu YJ, Zheng C, Ye L, Jiang P, Malik S, Xu GF, Zhou Q, Zhang MM, 2023. Acetyltransferase from *Akkermansia muciniphila* blunts colorectal tumorigenesis by reprogramming tumour microenvironment. *Gut*, 72(7): 1308 – 1318.

Kim SH, Ramos SC, Valencia RA, Cho YI, Lee SS, 2022. Heat stress: Effects on rumen microbes and host physiology, and strategies to alleviate the negative impacts on lactating dairy cows. *Front. Microbiol.*, 13: 804562.

Li GN, Xia XJ, Sendegya P, He SB, Guo DD, Zhu Y, 2015. Screening and identification of silkworm probiotic *Bacillus* SWL-19 and its effect on intestinal microflora diversity. *Sci. Agric. Sin.*, 48(9): 1845 – 1853. [李冠楠, 夏雪娟, Sendegya P, 何石宝, 郭东东, 朱勇, 2015. 蚕用益生芽孢杆菌 SWL-19 的筛选鉴定及其对肠道菌群多样性的影响. 中国农业科学, 48(9): 1845 – 1853]

Li GN, Xiao Y, Leng J, Lou QN, Zhao TF, 2024. Beneficial efficacy and mode of action of probiotic *Bacillus subtilis* SWL-19 on the silkworm (*Bombyx mori* L.). *Symbiosis*, 93(1): 17 – 27.

Lian TT, Yuan HF, Sun Q, Xu YY, Liu H, 2024. Comparative study on the methods for extracting total RNA from mature rice seeds. *Hybrid Rice*, 39(4): 36 – 41. [廉添添, 袁会峰, 孙强, 许圆圆, 刘慧, 2024. 水稻成熟种子总 RNA 提取方法的比较研究. 杂交水稻, 39(4): 36 – 41]

Liu Y, 2016. The Bacteriostasis Effect of Two Species of Insect Antimicrobial Peptides Crude Extract on *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and the Agent Control Experiments on Kiwifruit Bacterial Canker. MSc Thesis, Sichuan Agricultural University, Chengdu. [刘原, 2016. 2 种昆虫抗菌肽粗提物对猕猴桃溃疡病菌抑菌作用及猕猴桃溃疡病药剂防治试验. 成都: 四川农业大学硕士学位论文]

Nishida S, Ono Y, Sekimizu K, 2016. Lactic acid bacteria activating innate immunity improve survival in bacterial infection model of silkworm. *Drug Discov. Ther.*, 10(1): 49 – 56.

Petrof EO, Kojima K, Ropeleski MJ, Musch MW, Tao Y, De Simone C, Chang EB, 2004. Probiotics inhibit nuclear factor-kappaB and induce heat shock proteins in colonic epithelial cells through proteasome inhibition. *Gastroenterology*, 127(5): 1474 – 1487.

Qin Y, An H, Gao LX, Huang XD, Zhu YJ, Chen YY, 2015. Isolation and identification on pathogens of silkworm Cepticaemia. *Hubei Agric. Sci.*, 54(18): 4529 – 4531. [覃玥, 安慧, 高丽霞, 黄小弟, 朱彦瑾, 陈岩岩, 2015. 家蚕黑胸败血病原菌的分离鉴定. 湖北农业科学, 54(18): 4529 – 4531]

Qiu JF, Cui WZ, Zhang Q, Dai TM, Liu K, Li JL, Wang YJ, Sima YH, Xu SQ, 2023. Temporal transcriptome reveals that circadian clock is involved in the dynamic regulation of immune response to bacterial infection in *Bombyx mori*. *Insect Sci.*, 30(1): 31 – 46.

Sevillano E, Lafuente I, Peña N, Cintas LM, Muñoz-Atienza E, Hernández PE, Borrero J, 2023. Evaluation of safety and probiotic

traits from a comprehensive genome-based *in silico* analysis of *Ligilactobacillus salivarius* P1CEA3, isolated from pigs and producer of nisin S. *Foods*, 13(1): 107.

Shi CY, 2014. Studies on Bacteria Culture and Feature of the Histopathological and Immunohistochemical Staining in the Wall of the Uterus of 43 Canine Pyometra Cases. MSc Thesis, Yangzhou University, Yangzhou. [石翠云, 2014. 43 例犬子宫蓄脓细菌分离及子宫壁病理组织学与免疫组化变化的研究. 扬州: 扬州大学硕士学位论文]

Su Y, 2021. Prokaryotic Expression of *Bombyx mori* BmAST-A and Its Inhibitory Effect on the Pathogenesis of *Beauveria bassiana* Infection. MSc Thesis, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang. [苏韵, 2021. 家蚕 BmAST-A 的原核表达及其对家蚕白僵病发病的抑制作用. 镇江: 江苏科技大学硕士学位论文]

Tang FF, Yang WK, Zhang ZY, Li N, Liu N, Xie K, 2023. Cloning, expressing and anti-BmNPV infection research of antimicrobial peptide *Gloverin 2* gene from *Bombyx mori*. *J. Henan Agric. Sci.*, 52(8): 135 – 141. [唐芬芬, 杨伟克, 张祖芸, 李娜, 刘娜, 谢昆, 2023. 家蚕 *Gloverin2* 克隆、高效表达及其抗核型多角体病毒感染作用研究. 河南农业科学, 52(8): 135 – 141]

Tao Y, Drabik KA, Waypa TS, Musch MW, Alverdy JC, Schneewind O, Chang EB, Petrof EO, 2006. Soluble factors from *Lactobacillus* GG activate MAPKs and induce cytoprotective heat shock proteins in intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 290(4): C1018 – C1030.

Tiwari S, Dwivedi M, Rathod S, Bahadur P, 2022. Immunomodulation and anticancer immunity: Reviewing the potential of probiotics and their delivery with macromolecular carriers. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 39(2): 97 – 120.

Torres-Sánchez A, Pardo-Cacho J, López-Moreno A, Ruiz-Moreno á, Cerk K, Aguilera M, 2021. Antimicrobial effects of potential probiotics of *Bacillus* spp. isolated from human microbiota: *In vitro* and *in silico* methods. *Microorganisms*, 9(8): 1615.

Vahedi-Shahandashti R, Kasra-Kermanshahi R, Ghadam P, 2016. The inhibitory effect of bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 and *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 on planktonic cells and biofilms of *Serratia marcescens*. *Turk. J. Med. Sci.*, 46(4): 1188 – 1196.

Vahedi-Shahandashti R, Kasra-Kermanshahi R, Shokouhfard M, Ghadam P, Feizabadi MM, Teimourian S, 2017. Antagonistic activities of some probiotic lactobacilli culture supernatant on *Serratia marcescens* swarming motility and antibiotic resistance. *Iran. J. Microbiol.*, 9(6): 348 – 355.

Xu W, 2021. Functional Characterization of *BmCaspase_8 like*, a Regulator in Silkworm Response to BmNPV Infection. MSc Thesis, Southwest University, Chongqing. [徐微, 2021. 家蚕 *BmCaspase_8 like* 应答核型多角体病毒 (BmNPV) 感染的功能研究. 重庆: 西南大学硕士学位论文]

Zhu QD, Cai YL, Xiao CP, Kong LL, Pan X, Song BC, Song ZG, 2023. RNA sequencing transcriptomics and metabolomics in three poultry breeds. *Sci. Data*, 10(1): 594.

(责任编辑：马丽萍)