

龙安迎, 姜传恒, 杨倩, 等. 重组抗菌肽 BMAP27-LL37 对牛无绿藻的抗藻活性研究 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (12): 110-115.

LONG A Y, JIANG C H, YANG Q, et al. Antialgal activity of recombinant antimicrobial peptide BMAP27-LL37 against *Prototheca bovis* [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (12): 110-115.

## 重组抗菌肽 BMAP27-LL37 对牛无绿藻的抗藻活性研究

龙安迎<sup>1,2#</sup>, 姜传恒<sup>1,2#</sup>, 杨倩<sup>1,2</sup>, 胡秀秀<sup>2,3</sup>, 尹艺涵<sup>1,2</sup>, 胡长敏<sup>1\*</sup>, 陈洁<sup>2\*</sup>

(1. 华中农业大学动物医学院, 湖北 武汉 430070;

2. 武汉市农业科学院畜牧兽医研究所, 湖北 武汉 430208;

3. 长江大学动物科学学院, 湖北 荆州 434025)

**摘要:** 旨在针对牛无绿藻对大多数抗生素不敏感的痛点, 开发抗菌肽, 为牛无绿藻感染导致的奶牛乳腺炎提供潜在治疗方案。通过构建 pET-32a-BMAP27-LL37 重组质粒, 经 IPTG 诱导表达后获得重组抗菌肽 BMAP27-LL37; 通过体外抑菌试验、最小抑菌浓度测定, 评价该抗菌肽对牛无绿藻的体外抑制效果; 建立小鼠牛无绿藻乳腺炎模型, 通过乳腺组织 HE 染色、乳腺组织菌落计数和白细胞介素 1 $\beta$ 、白细胞介素 6 及肿瘤坏死因子  $\alpha$  的 mRNA 表达量测定, 评价该抗菌肽在小鼠牛无绿藻乳腺炎的治疗效果。结果: 体外试验中, 重组抗菌肽 BMAP27-LL37 抑菌圈直径达 4.0 cm, 最小抑菌浓度为 3.875  $\mu$ g/mL, 表明其在体外对牛无绿藻具有良好的抑制作用。在小鼠试验中, 重组抗菌肽 BMAP27-LL37 治疗组的小鼠乳腺组织 HE 染色切片显示, 乳导管及腺泡周围结缔组织增生的病理变化程度显著弱于未治疗的感染组; 治疗组乳腺组织菌落计数极显著低于感染组 ( $P < 0.01$ ); 实时荧光定量 PCR 结果显示, 治疗组小鼠乳腺组织中炎症因子白细胞介素 1 $\beta$  和白细胞介素 6 的 mRNA 表达量较感染组均显著下降 ( $P < 0.05$ )。综上, 本研究表明重组抗菌肽 BMAP27-LL37 在体内外均有良好的抑藻效果, 有望为牛无绿藻奶牛乳腺炎的治疗提供新思路。

**关键词:** 牛无绿藻; 抗菌肽; BMAP27-LL37; 抑藻活性

中图分类号: S852.4 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)12-0110-06

### Antialgal activity of recombinant antimicrobial peptide BMAP27-LL37 against *Prototheca bovis*

LONG Anying<sup>1,2#</sup>, JIANG Chuanheng<sup>1,2#</sup>, YANG Qian<sup>1,2</sup>, HU Xiuxiu<sup>2,3</sup>, YIN Yihan<sup>1,2</sup>,

HU Changmin<sup>1\*</sup>, CHEN Jie<sup>2\*</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Wuhan Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430208, China;

3. College of Animal Science, Yangtze University, Jingzhou 434025, China)

**Abstract:** The objective of this study was to investigate a potential therapeutic strategy for mastitis in dairy cows caused by *Prototheca bovis*, a pathogen resistant to most conventional antibiotics. The recombinant antimicrobial peptide BMAP27-LL37 was expressed by constructing the recombinant plasmid pET-32a-BMAP27-LL37 and inducing it with IPTG. The *in vitro* antialgal activity of BMAP27-LL37 against *P. bovis* was evaluated using agar well diffusion and minimum inhibitory concentration (MIC) assays. Furthermore, a murine model of *P. bovis*-induced mastitis was established to assess the *in vivo* therapeutic efficacy. Finally, histopathological changes in mammary tissues were examined using hematoxylin and eosin (HE) staining, the bacterial load was quantified by colony-forming unit (CFU) counts, and the mRNA expression levels of key inflammatory cytokines were measured via quantitative real-time PCR. The results showed that, *in vitro*, BMAP27-LL37 exhibited a distinct inhibition zone with a diameter of 4.0 cm and an MIC value of 3.875  $\mu$ g/mL, indicating strong antialgal activity against *P. bovis*. *In vivo*, HE staining showed that the mice treated with BMAP27-LL37 displayed significantly reduced pathological alterations, including decreased connective tissue hyperplasia around mammary ducts and acini, compared with the untreated infected controls.

收稿日期: 2025-02-11; 修回日期: 2025-11-06

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32273087); 武汉市科技特派员“产学研”专项 (2024111203060844)

第一作者: 龙安迎, 男, 硕士研究生; 姜传恒, 男, 硕士研究生。#为共同第一作者。

\*通信作者: 胡长敏, 博士, 教授, 研究方向为动物疾病的精准防控与创新型诊断产品研发转化, hcm@mail.hzau.edu.cn; 陈洁, 博士, 正高级兽医师, 主要从事畜禽疫病防控技术研究, chen\_jie\_999@163.com。

The CFU counts in the mammary tissues from the treatment group were markedly lower than those from the infection group ( $P < 0.01$ ). Moreover, the qRT-PCR analysis revealed that the mRNA expression levels of the pro-inflammatory cytokines interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and interleukin-6 (IL-6) were significantly downregulated in the treatment group compared with the infection group ( $P < 0.05$ ). In conclusion, this study demonstrated that the recombinant antimicrobial peptide BMAP27-LL37 exhibited potent *in vitro* and *in vivo* inhibitory activity against *P. bovis*. These findings provided novel insights into the potential application of BMAP27-LL37 as a therapeutic agent for *P. bovis*-induced bovine mastitis.

**Keywords:** *Prototheca bovis*; antimicrobial peptides; BMAP27-LL37; antifungal activity

奶牛乳腺炎是制约奶牛养殖业持续健康发展的常见疾病,造成经济损失的同时还会影响公共卫生安全。奶牛乳腺炎的病因复杂,其最主要原因是病原微生物感染。牛无绿藻(*Prototheca bovis*)在1952年被首次确定为奶牛乳腺炎的病原微生物<sup>[1]</sup>。牛无绿藻是绿藻目、绿藻科、无绿藻属的一种无叶绿素的酵母样藻类,其在温暖、湿润的环境和动物肠道内等广泛存在<sup>[2]</sup>,经其感染后奶牛会出现产奶量下降、乳汁呈水样等症状。近年,由牛无绿藻所引起的奶牛乳腺炎在世界上被广泛关注,在厄瓜多尔<sup>[3]</sup>、日本<sup>[4]</sup>、波兰<sup>[5]</sup>、巴西<sup>[6]</sup>等国家均出现过牛无绿藻性奶牛乳腺炎的报道,在我国北京<sup>[7]</sup>、湖北<sup>[8-9]</sup>、江苏<sup>[10]</sup>等地也有病例出现。

牛无绿藻性奶牛乳腺炎的治疗是困扰养牛业的世经难题,该病原对 $\beta$ -内酰胺类、大环内酯类等常用抗生素并不敏感<sup>[11]</sup>,目前临床上尚无特效药物可有效治疗该病,奶牛一旦感染很难治愈,给奶牛养殖和生鲜乳质量安全造成较大威胁,因此迫切需要新的治疗方法。抗菌肽具有安全性高、毒副作用小等优势,在抗菌、抗病毒方面具有良好的生物活性<sup>[12]</sup>,是防治病原体的有效生物制剂<sup>[13]</sup>,但是天然抗菌肽存在易水解、溶血性高、稳定性差等弊端<sup>[14]</sup>,限制了其临床应用,因此对天然抗菌肽进行优化设计及重组是近几年的研究热点。有研究表明,抗菌肽化合物培西加南(Pexiganan)、人乳铁蛋白衍生肽(h-Lf1-11)、人源抗菌肽(LL-37)、天蚕素B(cecropin B)均在体外试验中抑制牛无绿藻活性<sup>[15]</sup>,初步表明抗菌肽有望应用于临床治疗牛无绿藻性奶牛乳腺炎。本研究开发一种重组抗菌肽并通过体内外试验来研究其抑藻效果,进一步为牛无绿藻性奶牛乳腺炎的高效防控提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒、菌株及试验动物

大肠杆菌DH5 $\alpha$ 、BL21(DE3)及临床分离并保存的牛无绿藻菌株均为本实验室保存,表达载体

pET-32a由本实验室保存。8~9周龄雌性SPF级KM小鼠12只,购自华中农业大学实验动物中心,伦理编号:HZAUMO-2023-0215。

### 1.2 主要试剂

沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA)、沙氏葡萄糖液体培养基(SDB)购自青岛海博生物技术有限公司;胰蛋白胨、酵母浸出物购自OXOID公司;琼脂、氨苄西林、Tris、咪唑购自Biofoxx公司;1 $\times$ PBS购自Cytiva公司;Ex Taq、DNA Marker购自宝日生物有限公司;EcoR I、Xho I、T4 DNA连接酶购自NEB公司;HiScript III RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper)、AceQ qPCR SYBR Green Master Mix购自南京诺唯赞生物科技有限公司;蛋白Marker购自赛默飞公司;DNA凝胶电泳回收试剂盒购自OMEGA公司;质粒小提试剂盒购自天根公司;Pexiganan购自上海鸿肽生物科技有限公司。

### 1.3 抗菌肽生信分析、选择与表达

选取牛源性抗菌肽BMAP-27(PDB:2KET\_A)与人源性抗菌肽LL-37(PDB:7SAY\_F),根据密码子偏好性进行基因序列优化,并通过使用重叠延伸PCR扩增目的片段,构建新的融合抗菌肽,引物信息见表1。第一轮PCR反应体系:Ex Taq Mix 25  $\mu$ L, Seq1 2  $\mu$ L, Seq2 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 21  $\mu$ L;PCR反应程序:95  $^{\circ}$ C 5min;95  $^{\circ}$ C 30s,70  $^{\circ}$ C 30s,72  $^{\circ}$ C 30s,35次循环;72  $^{\circ}$ C 5min。第二轮PCR反应体系:Ex Taq Mix 25  $\mu$ L, Seq1 2  $\mu$ L, Seq3 2  $\mu$ L,第一轮PCR产物 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 19  $\mu$ L;反应程序:95  $^{\circ}$ C 5min;95  $^{\circ}$ C 30s,72  $^{\circ}$ C 30s,72  $^{\circ}$ C 30s,35次循环;72  $^{\circ}$ C 5min。构建完成后对其理化性质进行分析,包括氨基酸数量、分子量、理论等电点等;使用软件SOPM和ProtScale分析抗菌肽。通过构建重组pET-32a-BMAP27-LL37质粒,将其转化至大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞中诱导表达BMAP27-LL37,经镍柱亲和层析纯化和SDS-PAGE检测,获得纯化的重组抗菌肽。

表 1 BMAP27-LL37 PCR 引物

引物	序列 (5'→3')
Seq1	CGGAATTCGGCCGCTTCAAACGCTTTCGCAAAAAATTTAAAAAACTGTTCAAAAAACTGAGCCCGGTGATTCCGCTGCTGCACCTGGGC
Seq2	GCGCTGCACAATGCGTTTAAATTCCTTTGCCAATTTTTTCTTTGCTTTTTCGCAAAA AAAATCGCCAGCAGGCCAGGTGCAGCAGCGGAAT
Seq3	CCGCTCGAGGCTTTCGCTGCGCGGCACCAGGTTGCGCAGGAAATCTTTAATG CGCTGCACAATGCGTTTAAA

## 1.4 牛津杯法药物敏感性试验

将牛无绿藻菌液培养至  $OD_{600\text{ nm}}$  值为 2, 吸取 100  $\mu\text{L}$  的牛无绿藻菌液接种于 SDA 培养基上涂布均匀; 使用无菌眼科镊夹取 3 个牛津杯分别放置于 3 个 SDA 培养基上均匀分布; 取 100  $\mu\text{L}$  抗菌肽溶液 (BMAP27-LL37 浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Pexiganan 浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 以及 100  $\mu\text{L}$  无菌 ddH<sub>2</sub>O 分别加入至 3 个牛津杯中; 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 24~48 h; 观察并测定抑藻圈直径。

## 1.5 最小抑菌浓度 (MIC) 法药物敏感性试验

将牛无绿藻菌液培养至  $OD_{600\text{ nm}}$  值为 2, 调整菌液浓度为  $1 \times 10^6$  CFU/mL, 吸取 100  $\mu\text{L}$  的牛无绿藻菌液接种于 96 孔板中; 将抗菌肽 BMAP27-LL37 溶液稀释为 31.000、15.500、7.750、3.875、1.938、0.969  $\mu\text{g}/\text{mL}$  这 6 个浓度梯度; 分别吸取 6 个浓度梯度的抗菌肽溶液 100  $\mu\text{L}$  于 96 孔培养板上, 每个浓度梯度设 3 个重复孔, 同时设置阴性对照孔; 将 96 孔培养板置于 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养 48 h; 观察抗菌肽对牛无绿藻菌液的 MIC。

## 1.6 抗菌肽对牛无绿藻的体内试验

将 12 只产后 5~7 d 的 KM 小鼠平均分成 3 组, 空白组、感染组和抗菌肽治疗组, 每组 4 只。小鼠麻醉后, 仰卧位固定, 第 5 对乳腺消毒后用眼科剪减去乳尖, 空白组不做灌注处理, 剩余 2 组灌注 50  $\mu\text{L}$  浓度为  $1 \times 10^6$  CFU/mL 的牛无绿藻悬液。24 h 后, 抗菌肽 BMAP27-LL37 治疗组按照 0.2 mL/20 g 的剂量腹腔注射浓度为 0.78  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的抗菌肽。48 h 后, 所有小鼠脱颈处死, 采集乳腺组织, 取一部分组织进行匀浆, 通过平板计数法计算各组乳腺组织中细菌载量; 利用实时荧光定量 PCR 法检测乳腺组织中白细胞介素 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 和白细胞介素 6 (IL-6) 的水平。另一部分乳腺在 4% 多聚甲醛溶液固定后制成组织切片, HE 染色后观察乳腺组织病理学变化。

## 1.7 数据统计与分析

结果以“平均值  $\pm$  标准差”形式来表示, 利用 GraphPad Prism 9.0 软件对试验数据进行统计学分析 (One-way ANOVA) 并进行数据处理,  $P < 0.05$  视为具统计学意义。

## 2 结果

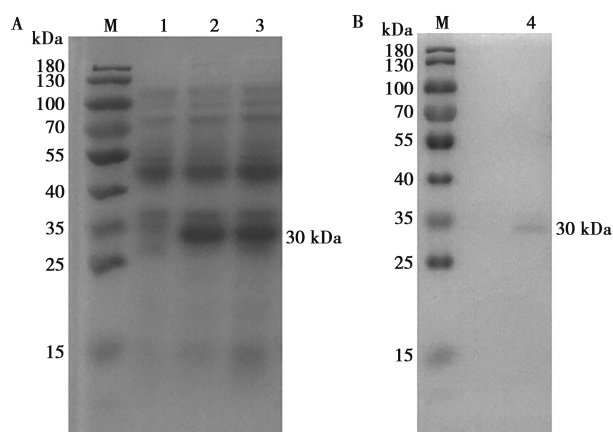
### 2.1 抗菌肽生信分析

选择 BMAP-27 和 LL37 构建重组抗菌肽, 其抗菌肽序列为: GRFKRFRKKF KKLFKKLSPV IPLLHLGLLG DFFRKSKEKI GKEFKRIVQR IKDFLRNLVPRTES。对其理化性质进行分析, 氨基酸数量为 64, 预测分子质量为 7 758.46 Da, 理论等电点为 11.61, 不稳定系数为 22.53, 大肠杆菌半衰期 (体内) 大于 10 h 等。结果该抗菌肽较为稳定, 预测可以经大肠杆菌表达。

使用在线软件 SOPM Secondary Structure Prediction 分析抗菌肽 BMAP27-LL37 二级结构, 其主要为  $\alpha$  螺旋结构。利用 ProtScale 进行抗菌肽的亲水和疏水性分析, 结果显示其具有两性, 提示有较好的抑菌效果。

### 2.2 重组抗菌肽的表达与纯化

由图 1 可知, IPTG 诱导后在 30 kDa 附近处出现诱导目的条带, 条带大小与预期大小相符。重组抗菌肽在最佳表达条件下诱导后, 经低温高压破碎菌体, 在上清液和沉淀中均检测到目的条带。



M. 蛋白 Marker; 1. 未诱导; 2. 诱导后上清液; 3. 诱导后沉淀; 4. 纯化后重组蛋白 BMAP27-LL37。

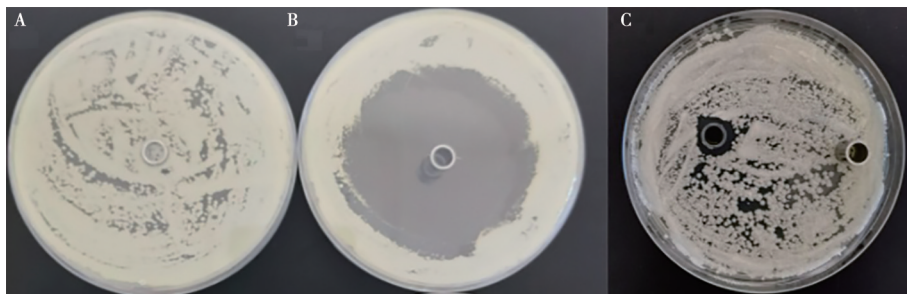
图 1 重组蛋白 BMAP27-LL37 的 SDS-PAGE 电泳分析

### 2.3 抗菌肽对牛无绿藻的体外试验

在 SDA 平板上接种牛无绿藻, 放置牛津杯, 添加 2 种抗菌肽溶液, 结果如图 2 所示, 重组抗菌肽

BMAP27-LL37 抑藻圈直径为 4.0 cm, Pexiganan 抑藻圈直径为 1.0 cm。使用 96 孔板对  $1 \times 10^6$  CFU/mL 的

牛无绿藻进行 MIC 药物敏感性试验, 重组抗菌肽 BMAP27-LL37 的 MIC 为  $3.875 \mu\text{g/mL}$ 。



A. ddH<sub>2</sub>O; B. 重组抗菌肽 BMAP27-LL37; C. Pexiganan。

图 2 重组抗菌肽 BMAP27-LL37 对牛无绿藻体外抑制效果

### 2.4 小鼠乳腺组织 HE 染色

如图 3 所示, 空白组的小鼠乳腺腺泡结构完整, 腺泡细胞形态完整, 无病理变化, 腺泡直径约为  $60 \sim 80 \mu\text{m}$ 。与空白组相比, 感染组的小鼠乳腺组织病理切片中乳腺腺泡结构破坏, 乳腺腺泡上皮细胞大量坏死脱落, 乳导管及腺泡周围结缔组织增生, 腺泡内充

满炎性细胞, 腺泡肿胀, 直径约为  $120 \sim 150 \mu\text{m}$ 。抗菌肽治疗组的乳导管和腺泡周围结缔组织增生的病理变化程度低于感染组, 腺泡组织结构部分恢复, 直径约为  $80 \sim 100 \mu\text{m}$ , 且炎性细胞数量较感染组有所减少。

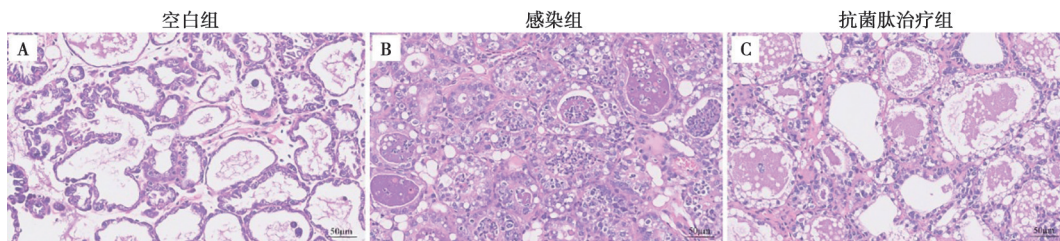


图 3 小鼠乳腺组织 HE 染色 (标尺 =  $50 \mu\text{m}$ )

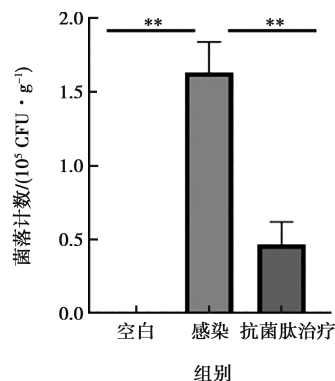
### 2.5 小鼠乳腺组织菌落计数

将小鼠乳腺组织研磨后, 经梯度稀释, 接种于培养基上进行菌落计数, 计数结果如图 4 所示, 空白组的菌落计数为 0, 感染组的菌落计数达到  $1.6 \times 10^5$  CFU/g, 而抗菌肽治疗组小鼠乳腺组织菌落计数为  $4 \times 10^4$  CFU/g, 极显著低于感染组 ( $P < 0.01$ ), 提示重组抗菌肽 BMAP27-LL37 能有效降低乳腺组织中牛无绿藻的增殖。

空白组仍呈上升趋势, 抗菌肽治疗组相较感染组存在下降趋势。

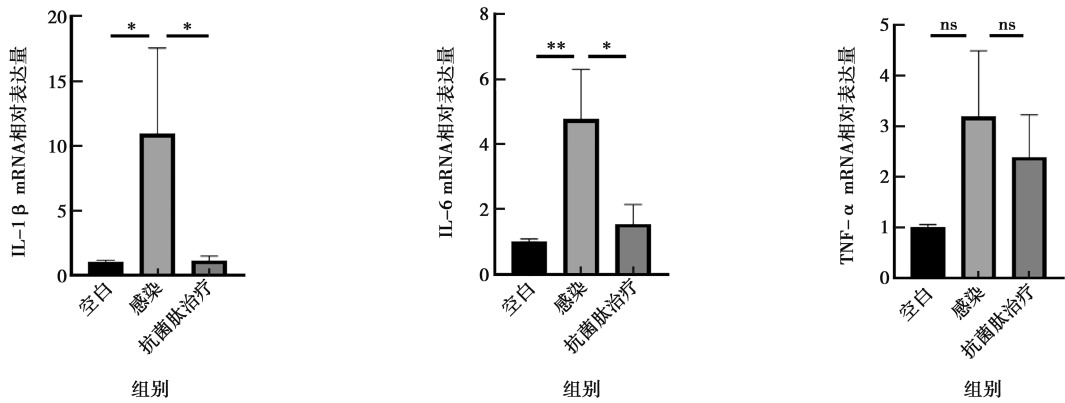
### 2.6 小鼠乳腺组织荧光定量 PCR 检测

通过对 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 IL-6 的 mRNA 水平进行检测, 利用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法对 3 种炎性因子的相对表达量进行计算。如图 5 所示, 与空白组相比, 牛无绿藻感染乳腺组织后, IL-1 $\beta$  和 IL-6 的 mRNA 水平分别为极显著和显著上升。在抗菌肽治疗后, IL-1 $\beta$  和 IL-6 的 mRNA 水平均显著下降 ( $P < 0.05$ ); 各组 TNF- $\alpha$  的 mRNA 水平没有显著差异, 但感染组相较



与感染组相比, \*\* 表示差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 下同。

图 4 小鼠乳腺组织牛无绿藻计数



与感染组相比, \* 表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), ns 表示没有显著差异 ( $P > 0.05$ )。

图5 小鼠乳腺组织炎症因子表达水平

### 3 讨论

牛无绿藻是引起奶牛乳腺炎的重要病原微生物之一,由其造成的奶牛乳腺炎已在世界上二十几个国家或地区先后报道。有研究对我国湖北省部分奶牛场中患有乳腺炎的奶牛进行病原分离鉴定,结果显示主要病原微生物为牛无绿藻、金黄色葡萄球菌、乳房链球菌,牛无绿藻的分离率可达 65%<sup>[11]</sup>;在后续研究中对牛场进行了 5 个月的跟踪检测,分离到的主要病原微生物有牛无绿藻、不动杆菌属、链球菌属、葡萄球菌属等,其分离率分别为 33.76%、25.34%、15.65%、15.65%,对混合感染病例进行统计后发现牛无绿藻几乎出现在每一例混合感染的患牛上,其单纯感染的比例为 5%<sup>[9]</sup>。牛无绿藻引起的奶牛乳腺炎严重危害了奶牛健康,发病的奶牛出现产奶量下降、乳房肿胀疼痛并且伴有体细胞数 (SCC) 显著上升等临床症状<sup>[16]</sup>,目前除早期淘汰外,没有很好的治疗方案,对全球的养殖业带来巨大的经济损失<sup>[17]</sup>。

当前对牛无绿藻治疗的研究方向主要在于抗生素药物的筛选以及新药物的开发。牛无绿藻对喹诺酮类、 $\beta$ -内酰胺类、林可霉素类等常见抗生素药物不敏感,仅对制霉菌素 B、庆大霉素、卡那霉素具有一定敏感性<sup>[18-19]</sup>,但是抗菌药物在临床应用中效果并不理想;聚六亚甲基双胍 (PHMB)、二葡萄糖酸氯己定、聚维酮碘、二氯异氰尿酸钠和次氯酸钠共 6 种奶牛场常用的消毒剂可抑制牛无绿藻的生长,其中 PHMB 的抑菌和杀菌力最强, MIC<sub>90</sub> 达 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、MAC<sub>90</sub> 可达 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ <sup>[20]</sup>,但是消毒剂只能作用于环境消毒,无法应用于治疗;高溶解性聚吡咯 (Ppy) 是一种已知具有抗菌活性的分子,对无绿藻属菌株具有良好的杀藻作用<sup>[21]</sup>,在体外试验中 Ppy 在 15.625 ~

62.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  具有溶藻作用<sup>[22]</sup>,然而目前该药物缺乏体内试验,无法验证其效果及安全性; Sperotto 等<sup>[15]</sup>发现抗菌肽化合物 Pexiganan、h-Lf1-11、LL-37、cecropin B 均在体外试验中抑制牛无绿藻活性, Pexiganan 的最低抑菌浓度范围为 5 ~ 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , h-Lf1-11 的最低抑菌浓度范围为 10 ~ 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , LL-37 为 20 ~ 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , cecropin B 为 40 ~ 160  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,这一发现为治疗牛无绿藻感染和抑制其生长提供了一种有前景的新选择,但是仍缺少体内试验进行验证,距离临床应用仍有一段距离;此外刘泽虎等<sup>[23]</sup>成功利用 5-氨基酮戊酸光动力抗感染化学疗法在体外抑制牛无绿藻的生长。以上方案都为治疗牛无绿藻性奶牛乳房炎奠定了基础,但是至今还没有真正应用到临床治疗上的方案。

本研究通过构建 BMAP27 和 LL37 的重组抗菌肽,并使用原核表达系统进行表达纯化。本试验的重组抗菌肽在体外体内对牛无绿藻均有明显的抑制作用。通过牛津杯药敏试验及 MIC 药敏试验证明,本试验构建的重组抗菌肽在体外可明显抑制牛无绿藻活性,并且重组抗菌肽 BMAP27-LL37 在牛津杯药敏试验中的抑藻效果要优于抗菌肽 Pexiganan。使用重组抗菌肽 BMAP27-LL37 对感染牛无绿藻的小鼠进行腹腔注射治疗,通过组织病理切片观察、组织载菌量的计数和炎症因子变化证明:重组抗菌肽 BMAP27-LL37 对牛无绿藻对感染引起的小鼠乳腺炎具有一定程度的治疗作用,能够降低组织载菌量、下调炎症因子表达水平。

综上,本研究开发的重组抗菌肽 BMAP27-LL37 在体外和小鼠体内均有效抑制牛无绿藻增殖,虽需进一步验证其安全性和体内稳定性,但结果初步证实其可通过减少乳腺组织病理损伤发挥保护作用,为防治

牛无绿藻性乳腺炎提供了潜在治疗策略。

## 参考文献:

- [1] MÖLLER A, TRUYEN U, ROESLER U. *Prototheca zopfii* genotype 2: the causative agent of bovine protothecal mastitis [J]. *Vet Microbiol*, 2007, 120 (3/4): 370-374.
- [2] KANO R, SATOH K, YAGUCHI T, et al. Phenotypic characteristics of *Prototheca* species occurring in humans and animals [J]. *Med Mycol J*, 2022, 63 (1): 17-20.
- [3] HUILCA-IBARRA M P, VASCO-JULIO D, LEDESMA Y, et al. High prevalence of *Prototheca bovis* infection in dairy cattle with chronic mastitis in Ecuador [J]. *Vet Sci*, 2022, 9 (12): 659.
- [4] OSUMI T, KISHIMOTO Y, KANO R, et al. *Prototheca zopfii* genotypes isolated from cow barns and bovine mastitis in Japan [J]. *Vet Microbiol*, 2008, 131 (3/4): 419-423.
- [5] JAGIELSKI T, KRUKOWSKI H, BOCHNIARZ M, et al. Prevalence of *Prototheca* spp. on dairy farms in Poland - a cross-country study [J]. *Microb Biotechnol*, 2019, 12 (3): 556-566.
- [6] COSTA E O, RIBEIRO A R, MELVILLE P A, et al. Bovine mastitis due to algae of the genus *Prototheca* [J]. *Mycopathologia*, 1996, 133 (2): 85-88.
- [7] GAO J, ZHANG H Q, HE J Z, et al. Characterization of *Prototheca zopfii* associated with outbreak of bovine clinical mastitis in herd of Beijing, China [J]. *Mycopathologia*, 2012, 173 (4): 275-281.
- [8] LI J, CHEN X, JIN E, et al. A survey of *Prototheca bovis* infection in dairy farms of the Hubei Province, China [J]. *J Vet Med Sci*, 2021, 83 (8): 1248-1255.
- [9] 胡秀秀, 夏建安, 郜道玉, 等. 奶牛无绿藻乳腺炎的跟踪监测及对生产的影响分析 [J]. *动物医学进展*, 2023, 44 (11): 33-39.
- [10] 戴迪, 廖俊, 林伟东, 等. 4株奶牛源左氏无绿藻的分离与鉴定 [J]. *安徽农业科学*, 2018, 46 (1): 78-79.
- [11] 许顺鑫, 张海艳, 胡长敏, 等. 湖北省某奶牛场乳腺炎主要病原微生物的分离鉴定与药敏分析 [J]. *中国兽医杂志*, 2022, 58 (11): 1-8.
- [12] 宋雪莹, 高圣玥, 李平, 等. 抗菌肽的来源与作用机理及应用 [J]. *动物医学进展*, 2024, 45 (4): 112-115.
- [13] MARTINEZ M, GONÇALVES S, FELÍCIO M R, et al. Synergistic and antibiofilm activity of the antimicrobial peptide P5 against carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 2019, 1861 (7): 1329-1337.
- [14] 张若男, 吴迪, 高艺恬. 抗菌肽的设计与优化研究进展 [J]. *生物医学工程学杂志*, 2022, 39 (6): 1247-1253.
- [15] SPEROTTO V R, DENARDI L B, WEIBLEN C, et al. *Short communication*: algicide activity of antimicrobial peptides compounds against *Prototheca bovis* [J]. *J Dairy Sci*, 2021, 104 (3): 3554-3558.
- [16] ZAROR L, VALENZUELA K, KRUIZE J. Mastitis bovina por *Prototheca zopfii*: primer aislamiento en Chile [J]. *Arch Med Vet*, 2011, 43 (2): 173-176.
- [17] CHEN J, HU X, LI G, et al. Investigation of *Prototheca bovis* infection and its correlation with dairy herd improvement data from a dairy farm in Central China [J]. *Vet Sci*, 2024, 11 (1): 37.
- [18] 侯荣光, 刘钢, 郭晓云, 等. 奶牛无绿藻性乳房炎的研究进展 [C] //中国畜牧兽医学会家畜内科学分会第七届代表大会暨年学术研讨会论文集. 南昌: 中国畜牧兽医学会, 2011: 586-590.
- [19] 刘原志, 章强强. 无绿藻病的研究现状及我国大陆临床分离株体外药敏分析 [J]. *皮肤科学通报*, 2017, 34 (5): 622-628, 9.
- [20] FIDELIS C E, DE FREITAS LEITE R, GARCIA B L N, et al. Antimicrobial activities of polyhexamethylene biguanide against biofilm-producing *Prototheca bovis* causing bovine mastitis [J]. *J Dairy Sci*, 2023, 106 (2): 1383-1393.
- [21] ELY V L, FELIPETTO CARGNELUTTI J, SEGABINAZZI RIES A, et al. *Prototheca bovis* in goats: experimental mastitis and treatment with polypyrrole [J]. *Microb Pathog*, 2023, 174: 105950.
- [22] ELY V L, COSTA M M D, OLIVEIRA H P, et al. *In vitro* algicidal effect of polypyrrole on prototheca species isolates from bovine mastitis algicidal activity of polypyrrole on *Prototheca* spp [J]. *Med Mycol*, 2020, 58 (8): 1114-1119.
- [23] 刘泽虎, 钟燕, 智慧林, 等. 5-氨基酮戊酸光动力抗感染化学疗法对中型无绿藻抑制作用的体外研究 [J]. *浙江医学*, 2018, 40 (18): 2005-2008.