

牛乳中活性蛋白生物学功能研究进展

包晓宇^{1,2}, 陈美霞¹, 王加启¹, 郑楠^{1,*}

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 农业部奶及奶制品质量安全控制重点实验室, 农业部奶产品质量安全风险评估实验室(北京), 农业部奶及奶制品质量监督检验测试中心(北京), 动物营养学国家重点实验室, 北京 100193;

2. 华中农业大学动物科学技术学院, 湖北 武汉 430070)

摘要: 牛乳以及牛初乳被认为是天然活性成分最重要的来源, 具有很高的营养价值。牛乳中活性蛋白的多功能特性已经得到广泛的表征, 其生物学特性越来越受关注。酪蛋白和乳清蛋白是牛乳中两个主要的蛋白组, 其完整的分子结构及众多的生物活性肽在幼龄动物及人体内发挥着不同的生理功能。本文对牛乳中主要活性蛋白的生物学功能进行了综述。

关键词: 活性乳蛋白; 乳铁蛋白; α -乳白蛋白; β -乳球蛋白; 生物学功能

Advances in Bioactive Functions of Milk Proteins

BAO Xiaoyu^{1,2}, CHEN Meixia¹, WANG Jiaqi¹, ZHENG Nan^{1,*}

(1. Key Laboratory of Quality and Safety Control for Milk and Dairy Products, Ministry of Agriculture, Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Dairy Products, Ministry of Agriculture, Milk and Dairy Product Inspection Center, Ministry of Agriculture, State Key Laboratory of Animal Nutrition, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China;

2. College of Animal Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Milk and colostrum are recognized as an important source of natural bioactive substances with high nutritional and functional values. Casein and whey protein are the major proteins in milk and together with numerous bioactive peptides derived from them play significant physiological roles in young animals and human beings, and their biological properties have been of increasing research interest. The functions of several major bioactive milk proteins are summarized in this review.

Key words: bioactive milk proteins; lactoferrin; α -lactalbumin; β -lactoglobulin; biological function

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201719049

中图分类号: TS252.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2017)19-0315-10

引文格式:

包晓宇, 陈美霞, 王加启, 等. 牛乳中活性蛋白生物学功能研究进展[J]. 食品科学, 2017, 38(19): 315-324. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201719049. <http://www.spkx.net.cn>

BAO Xiaoyu, CHEN Meixia, WANG Jiaqi, et al. Advances in bioactive functions of milk proteins[J]. Food Science, 2017, 38(19): 315-324. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201719049. <http://www.spkx.net.cn>

正常牛乳中约含3.5%蛋白质, 其中酪蛋白约占80%, 乳清蛋白约占20%。牛乳酪蛋白可分为 α -酪蛋白、 β -酪蛋白和 κ -酪蛋白。酪蛋白含有丰富的氨基酸、钙、磷和多种微量元素, 具有较高的营养价值。据研究报道, 部分酪蛋白成分具有生物活性, 也是极好的生物活性肽来源^[1]。牛乳清中含有多种蛋白质, 如 α -乳白蛋白(α -lactalbumin, α -La)、

β -乳球蛋白(β -lactoglobulin, β -Lg)、免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)、乳铁蛋白(lactoferrin, Lf)、乳过氧化物酶(lactoperoxidase, LPO)及糖巨肽(glycomacropeptide, GMP)等多种生物活性蛋白。随着乳源活性蛋白研究与产品开发的兴起, 进一步提升乳源蛋白产品的营养功能, 提高其附加值及开发利用具有重要意义。

收稿日期: 2016-09-01

基金项目: 中国农业科学院科技创新工程项目(ASTIP-IAS12); 公益性行业(农业)科研专项(201403071); 奶产品质量安全风险评估专项(GJFP2016008)

作者简介: 包晓宇(1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向为牛乳质量与安全。E-mail: baoxy_hzau@126.com

*通信作者: 郑楠(1980—), 女, 副研究员, 博士, 研究方向为牛乳质量与安全风险评估。E-mail: jiaqiwang@vip.163.com

1 牛乳中活性蛋白的性质和功能

1.1 乳铁蛋白

1.1.1 Lf的性质

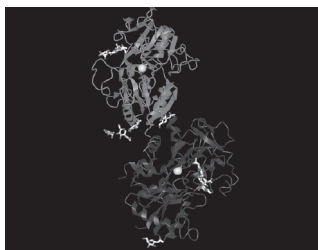


图1 BLf结构^[2]

Fig. 1 Structure of BLf^[2]

Lf主要是由乳腺上皮细胞表达和分泌的一种非血红素铁结合糖蛋白, 属转铁蛋白家族成员, 分子质量约为80 kD。牛初乳中Lf的质量浓度约为1.5 g/L, 常乳中质量浓度只有0.1 g/L。牛乳Lf (bovine Lf, BLf) 的多肽链由703个氨基酸残基组成, 与人乳中的Lf的氨基酸顺序具有高达69%的同源性。BLf的二级结构以 α -螺旋和 β -折叠结构为主, 且前者多于后者; 其多肽链上结合两条糖链。铁离子饱和的Lf的结构图如图1^[2]所示。来源不同的Lf都具有糖基化的特点, 只是糖基化位点的位置和数目不同, 但Lf结合糖链的数目和位置并不影响Lf肽链的折叠^[2]。Lf有较高的等电点 (约9.0), 具有很强的阳离子性质, 能与带负电分子如DNA、肝磷脂、黏多糖等结合, 也能与许多细菌和病毒的表面、酸性分子相结合, 如牛乳体系中的免疫球蛋白A (IgA)、酪蛋白、溶菌酶、 β -Lg以及一些糖蛋白, 这些特性使得Lf具有多种生理功能^[3-4]。Abe等^[5]研究Lf稳定性与pH值和温度之间的关系, 发现在中性或碱性条件下, 70 °C加热处理15~30 min, Lf会完全降解; 高于80 °C即开始发生凝胶; 在酸性条件下Lf则非常稳定, 在pH值为4.0, 温度90 °C加热5 min, Lf的铁结合能力、抗原活性、抑菌性能几乎无变化; pH值在2~3之间, 温度高达100~120 °C时加热5 min, Lf虽有部分降解, 但其抑菌作用增强。

1.1.2 Lf的功能

1.1.2.1 参与机体铁代谢

铁是人体必需的一种微量元素, 在机体氧的转运、交换和组织呼吸等过程中具有重要的营养和生理功能。Lf是一种能够与铁结合的糖蛋白, 除了其2个特定的整合位点可以结合铁离子, 在其他位点也可以吸附铁离子, 有稳定还原态铁离子的作用^[6]。Lf具有很强的铁亲和能力, 亲和常数大约是1 020, 约为血清中转铁蛋白的260倍。人的小肠黏膜细胞表面有特殊乳铁蛋白受体 (Lf receptor, LfR) 与Lf结合, 当Lf到达肠道后, 识别并特异结合细胞表面LfR, 进入细胞内部释放 Fe^{3+} 。Lf通

过提高 Fe^{3+} 在肝脏的储备, 改善机体铁代谢状况, 改善贫血。有研究报道, 婴幼儿配方中加Lf可以促进肠道对铁的吸收, 提高机体铁含量^[7]。柴灵莺等^[8]也研究发现, 在饮食模式相同的情况下, 配方奶粉和铁剂摄入量接近时, Lf常规剂量的补充可显著提高血红蛋白水平, 降低贫血检出率。

1.1.2.2 广谱抗菌作用

1972年, Bullen^[9]首先提出Lf具有抑菌作用。Lf具有广谱的抗菌感染活性, 其抑菌谱包括革兰氏阳性菌 (Gram-positive bacterium, G^+)、革兰氏阴性菌 (Gram-negative bacterium, G^-)、好氧菌、厌氧菌和酵母。一些抗菌肽如乳铁蛋白肽Bf (18~36) 和乳铁蛋白肽f (268~284) 可以通过胃蛋白酶的作用得到。Lf及其衍生物的抗菌活性主要的机制为直接的“铁剥夺”和间接性的“膜渗透”两种机制联合及第3种机制——阻止微生物附着在上皮细胞或肠上皮细胞上。

“铁剥夺”机制认为吸附铁离子的特性是Lf可以抑制微生物生长的关键。Lf通过整合铁离子以及静电结合铁离子来与细菌竞争结合铁离子, 从而抑制微生物的生长。有研究发现, 铁离子饱和和Lf可抑制阪崎肠杆菌的生长而铁离子饱和Lf却没有这种能力^[10]。卢蓉蓉等^[11]通过制备不同铁离子饱和度的Lf研究其对大肠杆菌的抑菌直径, 铁饱和度上升至30.3%, 抑菌活性下降; 完全饱和的Lf在测试的浓度范围内没有抑菌能力。另有综述报道 (图2), 当发生感染的时候, 宿主细胞和细菌会激烈地争夺铁离子, 宿主细胞合成分泌Lf捕获铁离子, 但细菌会分泌亲和性更强的铁载体蛋白质 (siderophore, SP) 与宿主细胞争夺铁离子, 针对此, 宿主细胞还会分泌可以结合SP的蛋白质 (lipocalin 2, Lcn2), 以阻止细菌获取铁离子, 进而抑制细菌的生长^[12]。

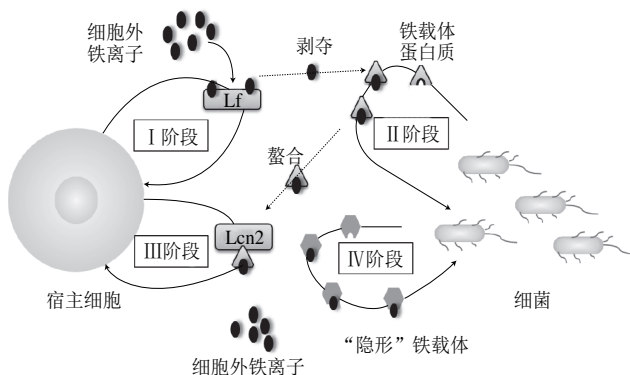


图2 宿主细胞和细菌在感染发生中的铁离子争夺^[12]

Fig. 2 A fierce battle of iron acquisition between host and bacterial pathogens during infection^[12]

“膜渗透”机制认为在生理pH值条件下, 带正电的Lf与带负电的细胞成分有很强的亲和性, 进而增强了细胞膜的通透性。 G^- 的细胞壁只有一层较薄的肽聚糖

层, 细胞壁和细胞膜中含有较多的带负电的成分(如磷酸脂质体和脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)), 容易与带正电的Lf结合, 破坏细胞膜的生理功能, 使微生物裂解死亡。 G^+ 的细胞壁主要成分是肽聚糖, 壁厚且结构紧密, 起到屏障Lf破坏其细胞膜的作用。研究Lf对不同微生物的抑菌效果, 发现Lf对大肠杆菌和沙门氏菌的最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)为2.5 $\mu\text{g/mL}$, 对枯草芽孢杆菌和蜡状芽孢杆菌的MIC为10 $\mu\text{g/mL}$, 对白色葡萄球菌和四联球菌的MIC为10 $\mu\text{g/mL}$, 反映出Lf对不同微生物的抑菌活性是不同的, 天然Lf对 G^- 的抑菌效果比 G^+ 强^[11]。

1.1.2.3 抗病毒活性

Lf抗病毒活性的首次提出是在1985年, Lu Linghai等^[13]研究发现Lf可以影响接种了Friend病毒复合体的小鼠的骨髓细胞生成。此后的研究报导了Lf对巨细胞病毒、单纯性疱疹病毒、人免疫缺陷病毒、丙肝病毒、轮状病毒、脊髓灰质炎病毒及呼吸道合胞体病毒等的抗病毒作用, 并阐明Lf抗病毒作用机理主要是作用在病毒感染的早期, 通过切断病毒与细胞表面的病毒颗粒受体(如糖胺多糖、低密度脂蛋白等)的识别或直接结合到病毒上阻止病毒进入宿主细胞, 也有研究报道提出Lf对乙肝病毒、副流感病毒、甲病毒、人乳头状瘤病毒、腺病毒、甲型流感病毒、乙脑病毒(日本脑炎病毒)的抗病毒作用^[14-15]。郑瑛^[16]研究发现Lf具有抗EB病毒感染和抑制EB病毒感染性炎症反应的功能, 并阐明了其作用机制。Lf在机体内有广泛的抗病毒活性, 其口服后的抗病毒活性也有广泛的研究。Lf在机体胃肠道和系统免疫调控中发挥的抗病毒活性可能对其抗病毒机理有重要作用^[17]。

Lf抗病毒活性的特点是: 1) 主要作用于病毒感染的早期, 或病毒对宿主细胞的黏附阶段, 干扰病毒与细胞的识别和结合, 阻止病毒侵入细胞; 2) 天然的、正确折叠的Lf具有较好的抗病毒活性; 3) Lf抗病毒活性与其铁离子饱和度无关; 4) Lf对多种病毒均具有抑制作用; 5) Lf的抗病毒作用效果有剂量依赖性。

1.1.2.4 抗氧化作用

Lf抗氧化作用的机制主要是其能螯合易引起氧化损伤的 Fe^{3+} 。游离 Fe^{3+} 参与氧自由基反应, 将超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)氧化为 O_2 和 Fe^{2+} , Fe^{2+} 又将 H_2O_2 还原为羟自由基($\cdot\text{OH}$)、 OH^- 和 Fe^{3+} 。游离 Fe^{3+} 和氧结合能催化自由基反应, 可产生活性很强的 $\cdot\text{OH}$ 和其他氧化剂。Lf可结合 Fe^{3+} , 抑制铁诱导脂质过氧化过程硫代巴比妥酸和丙二醛的生成, 阻断氧自由基的生成^[18]。李婷等^[19]研究发现, Lf对脂质过氧化、羟自由基和1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)自由基都有明显的清除作用。有研究报道, 大脑中Lf只在小神经胶质细胞中合成, 铁离子浓度增加可促进其合成释

放Lf, 不同铁离子饱和度的Lf通过增加线粒体的跨膜电位, 提高Cu/Zn过氧化物歧化酶的活性以及促进Bcl-2基因的表达实现其神经保护作用, 减轻氧化损伤, 且保护作用与Lf螯合铁离子的饱和度无关^[20]。最新研究用荧光素血管造影术评估氩激光对小鼠脉络膜新生血管的损伤, 外源腹膜内注射Lf使得Lf基因被敲除的小鼠的损伤体积减小26%, 使由于Lf基因被敲除而损伤严重的小鼠的比例从16%降到2%, 表明内源性Lf可以减少野生型小鼠脉络膜新生血管的损伤, 外源注射Lf可以减轻基因被敲除的小鼠脉络膜新生血管损伤^[21]。另外, BLf能降解酵母中tRNA, 具有核糖核酸酶活性且能抑制超氧离子形成。所有这些都抑制人体内自由基对动脉血管壁弹性蛋白的破坏, 达到预防动脉粥样硬化和冠心病目的^[18]。

1.1.2.5 调节机体免疫力

嗜中性粒细胞是含Lf最多的细胞, 血清中Lf主要是由嗜中性粒细胞释放。当机体受感染时, 嗜中性粒细胞释放Lf, 通过“铁剥夺”机制和“膜渗透”机制抑制微生物对机体的感染。Lf的免疫性能影响先天和后天的免疫, 研究发现口服BLf可能影响小鼠的黏膜和系统免疫反应^[22]。有研究报道, 小鼠口服BLf后其远端小肠IgA和IgM水平上调, 各种促炎症因子、阳性的B细胞、 CD4^+ 细胞、 CD8^+ 细胞、T细胞的水平都提高, 表明BLf能促进远端小肠IgA表达水平升高, 也具有控制炎症发生和发展的作用^[23]。对于半乳糖胺、四氯化碳以及LPS引起的肝炎, 口服BLf可以降低血清天冬氨酸转氨酶的含量, 提高小肠白细胞介素(interleukin, IL)-11的表达量, 对小肠起到一定的保护作用^[24]。Lf还可与LPS结合, 具有免疫调节功能, LPS和Lf可结合形成复合物, 在巨噬细胞中诱导产生炎症介质, 也可以阻碍LPS和单核细胞CD14-受体的结合, 从而抑制免疫系统细胞的增殖和分化, 抑制后续炎症反应^[24]。 G^- 菌感染可引起子宫内膜炎, 因为机体的Toll样受体(toll-like receptor, TLR)可接受 G^- 菌的细胞壁主要成分LPS的刺激, 从而引发一系列炎症反应, 而Lf可以通过下调核转录因子- κB (nuclear factor of kappa B, NF- κB)信号通路来抑制LPS引起的小鼠子宫内膜炎, 可以作为子宫内膜炎的治疗药物^[25]。此外, 在嗜中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴球等各种免疫细胞表面都存在LfR, Lf对抗体生成、T细胞成熟、淋巴细胞中自然杀伤细胞都具有调节作用^[26]。孙振刚等^[27]报道, Lf可通过抑制前炎症细胞因子的产生、上调抗炎细胞因子来调节免疫反应。李娜^[28]研究发现, Lf通过细胞因子的相互协同作用, 多途径地增强大鼠的细胞免疫和体液免疫应答, 完成其对免疫的调节作用。有研究报道, 铁离子饱和的Lf增加了红细胞和巨噬细胞中氧自由基的产生, 提高了巨噬细胞的吞噬能力以及巨噬细胞中存活蛋白和TLR的表达^[29]。这些对宿主细胞有利, 而对病原微生物不利。

1.1.2.6 抗癌作用

Lf可预防和治疗多种肿瘤,鲜少报道过其能导致严重不良反应,是一种具有实用价值的抗肿瘤药物,它既能作为抗肿瘤药用于多种肿瘤的治疗,也能作为免疫调节剂应用于肿瘤的辅助治疗,Lf有望成为新一代的抗肿瘤药物。

Lf抗肿瘤的主要机制:1)破坏肿瘤细胞膜;2)引起细胞凋亡;3)阻断细胞周期;4)促进细胞免疫反应^[30]。Sakai等^[31]研究表明,胃蛋白酶消化的BLf可能是通过激活肿瘤细胞里c-Jun氨基末端激酶/应激活蛋白激酶导致口腔癌细胞的凋亡,从而抑制肿瘤细胞的生长,起到抑制口腔鳞癌细胞增殖的作用。目前的实验研究发现,BLf在兔子结肠癌、食道癌、肺癌和膀胱癌的起始后期具有显著抑制作用^[32]。灌胃法处理小鼠时发现BLf可以提高局部和系统的免疫水平,进而抑制结肠癌26细胞的迁移。Kuhara等^[33]对BLf及其水解产物对结肠癌26细胞在肺部的侵染进行了研究,也发现BLf对肿瘤细胞的迁移具有显著抑制作用;口服BLf增加了脾脏和外周血中CD4⁺细胞、CD8⁺细胞和去唾液酸的GM1⁺细胞含量;BLf也能提高其抵抗小鼠淋巴细胞Yac-1和结肠癌26细胞毒性的能力;并且在小肠中,CD4⁺和CD8⁺上皮细胞含量显著增加,同时IL-18的含量也增加。这些结果表明口服的BLf及其胃蛋白酶水解产物可能是由于肠上皮细胞中IL-18的含量增加而增强了细胞免疫,进而抑制肿瘤细胞的迁移。李洪波等^[34]也对Lf与肿瘤的关系研究作了综述,阐明Lf能够有效抑制多种肿瘤。

1.1.2.7 促进肠道健康

肠道健康涉及到肠道上皮细胞及干细胞等的正常形态和功能,以及肠道微生物区系的稳定等。肠上皮细胞直接与肠道内容物及外界环境接触,具有吸收营养物质、对毒素等有害物质的物理及化学屏障作用。当肠道上皮发生变化,肠道黏膜形态和结构会发生改变,黏膜萎缩、绒毛缩短,变成扁平状甚至会有损伤断裂,隐窝深度加深,导致肠道吸收能力下降。肠道上皮细胞作为肠道免疫屏障的重要组成部分,与肠道淋巴组织共同发挥免疫作用。而当肠道发生损伤时,肠道黏膜屏障和免疫屏障遭到破坏,机体可以通过多种方式调节肠道上皮细胞的增殖及分化,起到损伤修复作用。郭婧等^[35]研究Lf对大鼠空肠上皮细胞株IEC-6细胞(小肠隐窝上皮细胞)活性的作用时发现,在体外BLf可以通过调节细胞周期从G1期(也称为G0期,细胞周期中DNA合成预备期或复制前期)向S期(细胞周期中的间期,即DNA合成期)转化,从而促进IEC-6细胞的活性及增殖能力。用小鼠模型研究BLf对肠道细胞的生长和分化作用时发现,BLf增加了小鼠空肠绒毛长度以及几种小肠刷状缘细胞膜酶的表达活性,并且BLf处理人结肠腺癌细胞Caco-2细胞

后,促进Caco-2细胞的分化,Cdck2的表达下调,TAF1的表达上调,这些蛋白参与细胞增殖和分化相关的基因表达调控,而这些调控过程都能抑制Caco-2细胞的自发性凋亡,此外,研究发现Lf在体外也可促进肠上皮细胞的分化^[36]。Reznikov等^[37]用含BLf的配方饲喂不食用初乳的新生仔猪,发现BLf能使仔猪肠道隐窝细胞增殖,隐窝深度和面积也会增大,并且隐窝细胞中的 β -连环蛋白基因mRNA的表达增多,表明Wnt信号通路可能介导BLf对肠道细胞增殖的作用。仔猪粪便中可以检出完整分子结构的BLf,表明BLf有一定程度的抗消化性,可能通过与肠道上皮细胞的直接接触影响肠道细胞的增殖。也有研究报道,饲料中添加Lf可以改善小肠形态学,刺激断奶仔猪肠道有益菌的生长,降低有害菌繁殖,从而改善肠道功能,具有提高仔猪生长性能的作用^[38-39]。此外,Lf可作为急性腹泻患者脱水以及细菌病因学的指示物^[40],持续监测Lf和钙卫蛋白可用于早期诊断溃疡性结肠炎疾病中切除直肠后结肠袋炎,对临床诊断和治疗具有重要意义^[41]。魏秀秀等^[42]研究发现,一定剂量的Lf(10 mg/(kg·d))对肠道中的益生菌和常驻共生菌的生长具有显著的促进作用,而对肠杆菌、肠球菌等细菌均有一定的抑制作用。

1.1.2.8 成骨作用

Lf成骨作用的机制主要有:1)防止骨质流失,增强骨密度和骨强度;2)BLf对骨形态的促进作用与免疫调节作用相偶联;3)促进成骨细胞和成骨样细胞增殖和分化;4)抑制成骨细胞及成骨样细胞凋亡;5)抑制破骨细胞的生成^[2]。有研究表明,Lf可阻止去除卵巢(ovariectomized, OVX)的C3H/He N鼠的骨密度的减小,可以缓解OVX SD大鼠的创伤性骨关节炎^[43],这可能与Lf对软骨下骨密度和结构以及覆盖软骨存在保护作用及其能降低基质金属蛋白酶13和抗酒石酸酸性磷酸酶表达水平间接相关^[44]。另外有研究报道,与牵张成骨技术相比,BLf处理具有更好的效果,它可以促进新西兰大白兔胫骨强度,并能加快牵张成骨处理的大白兔的骨愈合^[45]。刘猛等^[46]在研究热处理对Lf的成骨作用的影响时发现,未加热Lf能显著促进成骨细胞增殖($P<0.05$),85℃/10 min和95℃/10 min处理后Lf的促成骨活性下降。另外,也有研究表明,Lf可以促进人成骨肉瘤细胞Saos-2细胞的黏附、增殖和成骨分化^[47],对成骨具有重要意义。

1.1.2.9 其他作用

除了以上提到的生物学功能,Lf及乳铁蛋白肽还具有多种重要的生物学功能,需要深入研究探讨。有研究表明,Lf可以促进人牙周膜细胞增殖和迁移分化^[48]。Lf具有抗寄生虫活性,铁离子饱和的Lf处理红细胞和巨噬细胞48 h后,检测到存活蛋白、TLR-4、TLR-9以及看家

基因*GAPDH*的表达上调,表明Lf可能是通过调控TLR信号通路来抵抗微生物,激活免疫调节作用,已知Lf是通过TLR-4信号通路激活巨噬细胞^[49],而TLR-9信号通路与疟原虫有关,因此,Lf激活TLR信号通路可以起到抗寄生虫作用。Lf还可作为药物佐剂^[50-51]。此外,在作为载体和药物靶向治疗方面,Lf也有不可忽视的重要作用。Lf在癌变组织中会过表达,而LIR和Tf受体均可介导Lf进入细胞发挥作用,且这些受体在各种组织中都有分布,因此可以通过提供选择性靶向配体与特定细胞表面受体结合起到靶向治疗的作用^[52]。目前国内外研究的Lf修饰的靶向载药系统主要有纳米脂质载体和高分子囊泡^[53-54]等,研究涉及到大脑肿瘤、中枢神经系统相关疾病、肝脏肿瘤和肺肿瘤等^[55]。

1.2 β -乳球蛋白

1.2.1 β -Lg的性质

β -Lg是由乳腺上皮细胞合成分泌的一种特有乳清蛋白,是乳清蛋白的主要成分,约占乳清蛋白的50%,在牛初乳中质量浓度约为8.0 g/L,常乳中约为3.3 g/L。牛乳中 β -Lg的分子质量约为18.4 kD,等电点约为5.3,由162个氨基酸残基组成,支链氨基酸含量较高,具有与脂肪酸结合的肽段,每个单体含有一个半胱氨酸(cysteine, Cys) 121自由硫氢基和两个二硫键(Cys 66-Cys 160和Cys 106-Cys 199)。 β -Lg的二级结构以 α -螺旋和 β -折叠结构为主,还包括47%的无序结构^[56]。其三级结构结构紧密,单体呈球形。 β -Lg的结构如图3^[57]所示。一般情况下, β -Lg有A、B、C、D、E、H、I、J、W共9种亚型,其中以A和B亚型为主。A和B两种亚型仅在64位(缬氨酸A-丙氨酸B)和118位(天冬氨酸A-甘氨酸B)上有差异。



图3 β -Lg天然结构^[57]

Fig. 3 Natural structure of β -Lg^[57]

在鲜牛乳中, β -Lg是由天然的单体和二聚体形式共存。蛋白质浓度不同,单体和二聚体的比例也会变化。牛乳中 β -Lg聚合体的出现是蛋白聚合行为的结果,主要是通过二硫键的形式结合,也有通过非共价键发生聚合,如氢键和静电作用力等。在中性pH值条件下,温度是影响 β -Lg聚合的一个主要因素。有研究表明,室温条件下,溶液状态的 β -Lg是以天然单体和二聚体存在;

当温度在70~80℃时,疏水性基团和自由巯基暴露, β -Lg单体与非天然二聚体的转化极其活跃;当温度超过130~140℃, β -Lg发生不可逆的变性,二级结构改变,此时 β -Lg极易发生聚合^[58]。pH值影响 β -Lg聚合状态的机理为,在pH值约为5.3时, β -Lg先形成低聚物,继而慢慢延伸扩大形成大分子聚合物。 β -Lg高聚物易被消化,而形成高聚物的中间产物则具有较强的耐消化特性^[59]。发生变性聚集的同时, β -Lg的抗原表位会被掩盖,从而能导致其致敏性降低^[60]。

1.2.2 β -Lg的功能

1.2.2.1 与维生素、脂类及多酚类物质等结合并有抗氧化作用

β -Lg是牛乳中乳清蛋白的主要成分,具有多个结合位点,对维生素、脂肪酸及多酚类等生物活性物质都具有亲和性,是食品蛋白中被研究最广泛的配体结合蛋白之一。叶酸是最稳定的水溶性维生素, β -Lg结合叶酸的浓度约为 $4.3 \times 10^5 \mu\text{mol/L}$,并且 β -Lg与叶酸结合后可有效增强其光稳定性^[61]。据报道,脂溶性VA、VD、VE和VK都可以与 β -Lg结合形成蛋白质-维生素复合体, β -Lg也可延缓VA和VE等的氧化降解^[62]。 β -Lg内源性结合的脂肪酸主要有棕榈酸、油酸、豆蔻酸和丁酸,其内部的疏水孔穴是最主要的脂肪酸结合位点,它可以使脂肪酸碳链延展至蛋白分子的中心区域。除了结合脂肪酸, β -Lg还可以延缓二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)的氧化降解,起到良好的保护作用^[63]。 β -Lg可溶性强,具有很强的凝胶和乳化功能,能与VA等脂溶性维生素和脂肪酸结合,可作为辅助性配料用于乳制品等食品工业,改善产品的风味、质构,促进营养物质的吸收^[64]。王磊等^[65]报道 β -Lg具有多个配体结合位点,可结合脂肪酸、维生素、磷脂、多酚类化合物等多种物质,也可同时结合叶酸、白藜芦醇和VE,生成蛋白质-多配体复合物。张捷^[66]研究也发现, β -Lg与配体结合后形成的复合物对配体具有保护作用,这种保护效果在 β -Lg-单配体复合物、 β -Lg-二配体复合物和 β -Lg-三配体复合物中均有体现。 β -Lg不仅仅能够结合脂溶性小分子物质,而且能够促进这些物质的吸收^[67]。

1.2.2.2 生物活性肽前体

生物活性肽是源于蛋白质的具有多重生物活性的化合物,对机体功能或状况产生积极影响。牛乳蛋白被认为是生物活性肽的最重要的来源。 β -Lg是生物活性肽的极好来源,这些肽的生物活性非常广泛,如抗菌、免疫调节、抗氧化、降血压、降低胆固醇及抗癌等^[65]。其中有很多具有抑制血管紧张素转换酶(angiotensin converting enzyme, ACE)活性的功能短肽。有学者研究发现,未水解的 β -Lg抑制ACE的指数小于10%,而胰蛋白酶水解处理后增加了多肽组分,抑制ACE的指数增

加到84.3%，表明水解可以释放生物活性肽。水解 β -Lg产生的7肽f (142~148)对ACE的半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC_{50})为42.6 μ mol/L，是目前研究较多的 β -Lg源ACE抑制肽^[68]。 β -Lg f (142~148)包含脯氨酸残基，其被认为有助于提高ACE抑制肽的功能^[69]。此外，Pihlanto-leppälä等^[70]用胃蛋白酶、胰蛋白酶、胰凝乳酶、胰酶、弹性蛋白酶和羧肽酶消化 β -Lg后，通过反相高效液相色谱法(reversed phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC)分离出几种ACE抑制肽：f (22~25)、f (32~40)、f (81~83)、f (94~100)、f (106~111)和f (142~146)。在这些生物活性肽中，降血压肽(f (142~145))对SHR大鼠具有显著的降血压活性^[71]，胰蛋白酶肽(f (71~75))对小鼠具有降低胆固醇的作用^[72]，降血压肽(f (102~105))对SHR大鼠具有改善动脉的作用^[73]。

1.3 α -乳白蛋白

1.3.1 α -La的性质

α -La是乳清蛋白中含量次于 β -Lg的蛋白，约占乳清蛋白的20%，在牛初乳中质量浓度约为3.0 g/L，在常乳中的质量浓度约为1.2 g/L。 α -La由乳腺上皮细胞粗面内质网合成，分子质量约为14.2 kD，等电点为pH 4.2~4.5。牛乳中的 α -La由123个氨基酸残基组成，与人乳 α -La有约74%的氨基酸是相同的；二级结构中无序结构占多数，约为60%， α -螺旋约占20%， β -折叠约占14%；三级结构与溶菌酶相似，是结构紧密的球蛋白。其结构如图4所示。

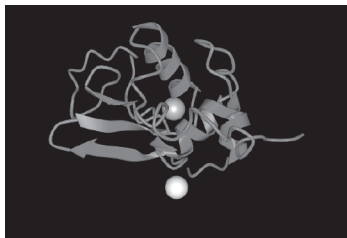


图4 结合金属离子的 α -La的结构^[74]
Fig. 4 Crystal structure of holo- α -La^[74]

α -La为金属结合蛋白，Noyelle等^[75]研究 α -La对不同金属离子(Ca^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Sr^{2+})的结合参数发现，当结合参数增加时， α -La结合 Ca^{2+} 的能力增强，结合 Zn^{2+} 的能力减弱， Mg^{2+} 与 α -La结合的情况不同于一贯认为的与 Ca^{2+} 相似，而是与 Zn^{2+} 相似。每个 α -La分子上有两个 Ca^{2+} 结合位点，一个为强结合位点，一个为弱结合位点^[76]，除去 Ca^{2+} 后， α -La的三级结构的稳定性降低，特别是热稳定性降低^[77]。 α -La还可与油酸及亚油酸结合，与其结合后， α -La的结构会发生改变，主要表现为其三级结构的破坏， β -转角和无规卷曲更多地转变为 β -折叠，疏水性片段和疏水性氨基酸暴露出来^[78]。

1.3.2 α -La的功能

1.3.2.1 在乳腺中促进乳糖合成

α -La在乳腺中合成。产乳动物中， α -La的编码基因是一个潜在的数量性状遗传位点， α -La的表达量是和泌乳起始紧密相关的。 α -La在乳腺中乳糖的生物合成上起着辅酶的作用，控制着乳中乳糖的含量，是泌乳的一个重要调节因子^[79]。乳腺分泌性上皮细胞通过乳糖合成酶合成乳糖， α -La和 β -1,4-半乳糖苷转移酶两种蛋白是乳糖合成酶的两个辅酶， α -La的浓度与乳蛋白、乳脂和乳糖的浓度有关，乳糖的分泌通过渗透压的影响进而对泌乳产生影响^[80]。为研究 α -La对泌乳的影响，用基因工程手段敲除小鼠 α -La的编码基因后，乳汁变得黏稠，乳糖缺失，子代小鼠不能依靠乳汁存活，这表明必须有乳糖合成酶存在才可以合成乳糖，并且乳糖对于泌乳具有重要作用；转基因手段敲入人的 α -La基因，其转录和翻译表达量都远高于小鼠 α -La基因的表达量，表明基因的位点效应对 α -La基因的表达没有负面影响，而影响其表达的数量效应^[81]。杨芳(小)等^[82]研究发现，不同折叠状态的 α -La发挥不同的生物学功能，天然结构的蛋白具有调节乳糖合成的功能；熔球态结构更易于形成淀粉样纤维；而中等酸度条件下的折叠中间态可能参与有益生物学功能的形成。

1.3.2.2 生物活性肽前体

与 β -Lg相似， α -La也具有抗ACE活性。有研究报告，用RP-HPLC分离 α -La水解产物，得到一些具有抗ACE活性的片段：f (50~52)、f (99~108)和f (104~108)^[70]。用马尿酸组氨酰-亮氨酸作为底物， α -乳啡肽(Tyr-Gly-Leu-Phe)四肽的 IC_{50} 为733.3 mmol/L。有学者研究表明含有Tyr-Leu组分的很多相关肽都有抗ACE活性^[83]。抑制二肽基肽酶IV(dipeptidyl peptidase-IV, DPP-IV)是2型糖尿病药物治疗的有效方法，当用多肽阵列作为筛选工具研究时发现，牛 α -La是抑制DPP-IV的活性肽前体^[84]。此外，牛 α -La可以通过抑制环氧合酶-2起到抗炎作用。Yamaguchi等^[85]通过对GK大鼠(自发2型糖尿病大鼠)的慢性给药研究 α -La对GK大鼠血糖耐受量的影响，发现 α -La使血糖水平显著降低，但胰岛素水平并没有显著改变，提高了超高分子质量形式的脂联素水平，降低了血浆中前列腺素E2的水平，表明 α -La可能是通过脂联素降低葡萄糖摄入后的血糖水平。

1.3.2.3 抗癌作用

环氧合酶-2在结肠癌早期和在疾病过程中起着至关重要的作用。研究发现，口服 α -La 3 d即可降低粪便隐血指数，第9周的时候可减少结肠癌的发生。 α -La可以降低血浆和结肠中前列腺素E2水平，表明 α -La对于结肠癌具有有效抑制作用，可能的机制为 α -La可以通过抑制环氧合酶-2进而降低前列腺素E2的水平，从而起到抑制结肠癌的作用^[86]。

牛乳中 α -La稳定的自组装结构对多种肿瘤细胞都有靶向抑制增殖作用。Mahanta等^[87]采用优化的乙醇介导的脱溶剂工序来合成平均直径300 nm的牛乳 α -La球状自组装体(spherical self-assembly of bovine α -lactalbumin, nsBLA),发现其对热、pH值及蛋白酶都很稳定,当用nsBLA处理肿瘤细胞时,通过产生活性氧造成对肿瘤细胞的细胞毒性作用,而对正常的人体细胞和小鼠体细胞的毒性作用很小。进一步研究表明,当nsBLA与叶酸结合后,其细胞毒性作用加强,这可能是通过叶酸与细胞膜上的受体结合使得组装体更易进入细胞,并且其致使肿瘤细胞死亡的机制并不是使其凋亡的机制,而是坏死样死亡机制。同时,与基于牛乳 α -La制成的抗癌剂BAMLET(bovine α -La made lethal against tumor cell)相比,自组装的牛乳 α -La具有更强的细胞毒性,对抗肿瘤细胞的杀伤力更强。张旻^[88]研究发现,去钙离子的 α -La在一定条件下部分去折叠后,能与油酸结合,形成一种能特异性诱导肿瘤细胞凋亡的复合物HAMLET(human α -La made lethal to tumor cells),而细胞毒性实验表明,油酸诱导2种 α -La形成的聚集体对人肺癌细胞A549及人白血病细胞HL60都具有显著的毒性。

1.3.2.4 其他作用

α -La是必需氨基酸——色氨酸和半胱氨酸的一个好的来源,色氨酸和半胱氨酸分别是5-羟色胺活性和谷胱甘肽的前体物质。 α -La也可以保护胃肠道黏膜。Matsumoto等^[89]用急性溃疡大鼠作为研究模型,研究发现乳清蛋白分离物(whey protein isolate, WPI),包含25%的 α -La对胃黏膜损伤也具有保护作用,主要是 α -La在起作用,且部分原因是促进内源性前列腺素的合成,与典型的抗溃疡药物Selbex具有相同的效果。有较多报道牛乳 α -La源的肽段具有免疫调节功能,Fiati等^[90]研究发现给大鼠注射 α -La源活性肽,对肺炎克雷伯菌具有直接免疫调节功能。但牛乳 α -La因其不含T细胞抗原表位,因而不具有免疫治疗作用^[91]。

1.4 牛乳中其他活性蛋白及作用

酪蛋白约占牛乳蛋白质的80%,分为 α -酪蛋白、 β -酪蛋白和 κ -酪蛋白。凝乳酶对 κ -酪蛋白(苯丙氨酸105-甲硫氨酸106)具有底物特异性,当凝乳酶作用于酪蛋白时会形成沉淀。在牛乳中酪蛋白与矿物质和柠檬酸盐等结合形成酪蛋白胶团,可以作为体外生物载体。酪蛋白不同组分显示不同的生物活性。胡文琴等^[92]研究发现,不同的酪蛋白酶解物都有抗脂质过氧化的作用。有研究发现,酪蛋白所有的亚基都可以抑制铁离子引起的花生四烯酸的过氧化,通过促进亚铁离子的自氧化从而抑制脂质的过氧化^[93]。酪蛋白经酶解可以产生抗菌肽,对 G^+ 、 G^- 菌均有一定的抑菌作用^[94]。低浓度的 β -酪啡肽-7和 β -酪啡肽-10可以抑制外周血淋巴细胞的增殖,但高

浓度时可以刺激其增殖^[95]。酪蛋白源的活性肽有类阿片肽,由于其吗啡样的行为,源自 β -酪蛋白的外源性阿片肽片段被称为 β -酪啡肽,源自 α -酪蛋白的阿片肽被称为外啡肽。这些 α -酪蛋白和 β -酪蛋白的功能性片段可作为阿片受体兴奋剂,而所有的 κ -酪蛋白片段可作为阿片受体拮抗剂。与 α -La和 β -Lg一样,酪蛋白源生物活性肽也具有抗ACE活性,是真正的抑制剂类型,不受ACE作用^[96]。Chatterton等^[97]研究报道,酪蛋白也有重要的抗炎性作用,对幼龄动物的肠道健康具有重要意义。

Ig在牛初乳中的质量浓度约为20~150 g/L,占总蛋白比例为70%~80%;在常乳中质量浓度约为0.5~1.2 g/L,占总蛋白比例降低为1~2%。在牛乳中,Ig主要包括IgG、IgM和IgA 3种。所有的Ig都由两条相同的轻链和两条相同的重链组成,这四条链通过二硫键连接,形成呈Y型的分子基本结构,分子质量约为160 kD。牛初乳和常乳中的Ig可以防止犊牛和乳腺感染病原体,对犊牛和人体内由致病菌引起的感染具有抵抗作用^[98]。Ig是牛乳和血浆中天然的抗体成分,除了对机体免疫机能等的维持和促进具有重要意义^[99]外,研究发现Ig还具有降低血浆胆固醇进而降低血压的功能^[100]。

GMP是一种C-端糖肽(f(106~169)),凝乳酶可以使其从 κ -酪蛋白分子的苯丙氨酸和蛋氨酸之间释放出来。GMP存在于乳清中,具有较好的亲水性,分子质量约为8 kD。GMP含有丰富的支链氨基酸,而蛋氨酸的含量较低,这使其成为肝脏疾病患者较好的食用成分;不含苯丙氨酸使其可以成为苯丙酮尿症患者的营养物质。GMP具有保护作用,可以抑制IL-1 β 以及细胞凋亡的诱导因子IL-1ra的作用,这些作用可以降低小鼠肠道炎症发生过程中炎症因子的产生^[101]。小鼠发生结肠炎时,GMP也能降低诱导型一氧化氮合酶和IL-1的上调表达^[102]。GMP还可以抑制一些胃肠分泌物的产生和减缓胃动力,进而调控营养物质在十二指肠的消化和吸收^[103]。GMP作为含有一定糖类的生物活性肽,对肠道菌群的调节也有一定作用,可以促进双歧杆菌的生长,促进肠道健康。

LPO是一种糖蛋白,是牛乳中含量最丰富的酶。其前体物质为含有血红素的过氧化物酶,成熟结构具有单一的催化结构域。LPO和Lf一样,具有突出的抗生素活性,对细菌、真菌和病毒具有光谱抗性^[104]。另外,LPO在 H_2O_2 存在时促进 SCN^- 和一些卤化物反应,产生一些短暂存在的氧化产物如次硫酸氢根离子,引起微生物酶和膜蛋白中巯基的氧化,起到抑制或杀死微生物的作用^[105]。

2 结 语

根据“药食同源”理论,功能性食品的开发日渐成为食品行业的热点。牛乳不仅是重要的营养物质来源,

其中所含活性蛋白及生物活性肽具有多种生物学功能,使其在功能性食品开发中占有重要地位。随着这些活性蛋白发挥作用的机制不断被阐明,应用领域和范围将不断扩大,相信在营养补充、食品和医药等方面都将有广阔的应用前景,将会对医学、食品科学及畜牧业的发展起到积极作用。

参考文献:

- [1] MICLO L, ROUX É, GENAY M, et al. Variability of hydrolysis of β -, α s1-, and α s2-Caseins by 10 strains of *Streptococcus thermophilus* and resulting bioactive peptides[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(2): 554-565. DOI:10.1021/jf202176d.
- [2] National Center for Biotechnology Information. Molecular Components in 5CRY[OL]. [2016-07-30]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/5CRY>.
- [3] 孔莹莹, 杜明, 刘猛, 等. 乳铁蛋白理化性质及其成骨作用研究进展[J]. 食品科学, 2012, 33(21): 318-322.
- [4] 侯占群, 牟德华. 乳铁蛋白及其应用研究进展[J]. 食品工程, 2006(4): 8-11. DOI:10.3969/j.issn.1673-6044.2006.04.003.
- [5] ABE H, SAITO H, MIYAKAWA H, et al. Heat stability of bovine lactoferrin at acidic pH[J]. Journal of Dairy Science, 1991, 74(1): 65-71. DOI:10.3168/jds.S0022-0302(91)78144-7.
- [6] 陈车生, 袁勤生. 乳铁蛋白的研究进展[J]. 食品与药品, 2008, 10(1): 62-66. DOI:10.3969/j.issn.1673-6044.2006.04.003.
- [7] CHEN K, ZHANG L, LI H, et al. Iron metabolism in infants: influence of bovine lactoferrin from iron-fortified formula[J]. Nutrition, 2015, 31(2): 304-309. DOI:10.1016/j.nut.2014.07.006.
- [8] 柴灵莺, 陈科, 李华, 等. 强化乳铁蛋白配方奶粉对婴儿体格及红细胞指数的影响[J]. 预防医学, 2016, 28(7): 682-686.
- [9] BULLEN J J. Iron-binding proteins in milk and resistance to *Escherichia coli* infection in infants[J]. Proceedings of the Royal Society of Medicine, 1972, 65(12): 1086.
- [10] 陆元庆, 曹笑梅, 陈婷. 乳源性抗菌肽的研究进展[J]. 江苏医药, 2016, 42(6): 686-689.
- [11] 卢蓉蓉, 许时婴, 杨瑞金, 等. 乳铁蛋白抑菌活性及机理研究[J]. 食品科学, 2008, 29(2): 238-243. DOI:10.3321/j.issn:1002-6630.2008.02.047.
- [12] WILSON B R, BOGDAN A R, MIYAZAWA M, et al. Siderophores in iron metabolism: from mechanism to therapy potential[J]. Trends in Molecular Medicine, 2016, 22(12): 1077-1090. DOI:10.1016/j.molmed.2016.10.005.
- [13] LU Linghai, BROXMEYER H E, MOORE M A, et al. Abnormalities in myelopoietic regulatory interactions with acidic isoferritins and lactoferrin in mice infected with friend virus complex: association with altered expression of Ia antigens on effector and responding cells[J]. Blood, 1985, 65(1): 91-99.
- [14] BERLUTTI F, PANTANELLA F, NATALIZI T, et al. Antiviral properties of lactoferrin: a natural immunity molecule[J]. Molecules, 2011, 16(8): 6992-7018. DOI:10.3390/molecules16086992.
- [15] 庞广昌, 胡志和, 陈庆森. 乳铁蛋白的抗病毒活性[J]. 食品科学, 2006, 27(1): 253-257. DOI:10.3321/j.issn:1002-6630.2006.01.061.
- [16] 郑瑛. 乳铁蛋白干扰EB病毒与宿主细胞的结合及抑制EB病毒感染性炎症的机制[D]. 长沙: 中南大学, 2012: 59-69. DOI:10.7666/d.y2196975.
- [17] WAKABAYASHI H, ODA H, YAMAUCHI K, et al. Lactoferrin for prevention of common viral infections[J]. Journal of Infection and Chemotherapy, 2014, 20(11): 666-671. DOI:10.1016/j.jiac.2014.08.003.
- [18] 贾洪峰, 贺稚非, 刘丽娜, 等. 乳铁蛋白及其生理功能[J]. 粮食与油脂, 2006(2): 44-47. DOI:10.3969/j.issn.1008-9578.2006.02.015.
- [19] 李婷, 王彩云, 闫序东, 等. 乳铁蛋白体外抗氧化性的研究[J]. 食品科学, 2012, 33(21): 111-113.
- [20] WANG J, BI M, LIU H, et al. The protective effect of lactoferrin on ventral mesencephalon neurons against MPP⁺ is not connected with its iron binding ability[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 10729. DOI:10.1038/srep10729.
- [21] MONTEZUMA S R, DOLEZAL L D, RAGEH A A, et al. Lactoferrin reduces chorioretinal damage in the murine laser model of choroidal neovascularization[J]. Current Eye Research, 2015, 40(9): 946-953. DOI:10.3109/02713683.2014.969808.
- [22] SFEIR R M, DUBARRY M, BOYAKA P N, et al. The mode of oral bovine lactoferrin administration influences mucosal and systemic immune responses in mice[J]. Journal of Nutrition, 2004, 134(2): 403-409.
- [23] ARCINIEGA-MARTINEZ I M, CAMPOS-RODRIGUEZ R, DRAGO-SERRANO M E, et al. Modulatory effects of oral bovine lactoferrin on the IgA response at inductor and effector sites of distal small intestine from BALB/c mice[J]. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 2015, 64(1): 57-63. DOI:10.1007/s00005-015-0358-6.
- [24] KUHARA T, TANAKA A, YAMAUCHI K, et al. Bovine lactoferrin ingestion protects against inflammation via IL-11 induction in the small intestine of mice with hepatitis[J]. British Journal of Nutrition, 2014, 111(10): 1801-1810. DOI:10.1017/S0007114513004315.
- [25] LI W, FU K, LV X, et al. Lactoferrin suppresses lipopolysaccharide-induced endometritis in mice via down-regulation of the NF- κ B pathway[J]. International Immunopharmacology, 2015, 28(1): 695-699. DOI:10.1016/j.intimp.2015.07.040.
- [26] ESTEBAN M A, RODRÍGUEZ A, CUESTA A, et al. Effects of lactoferrin on non-specific immune responses of gilthead seabream (*Sparus auratus* L.)[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2005, 18(2): 109-124. DOI:10.1016/j.fsi.2004.06.003.
- [27] 孙振刚, 武文起, 冯永强, 等. 乳铁蛋白的免疫调节作用及其在乳品中应用[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(8): 127-130; 148. DOI:10.3969/j.issn.1005-6521.2015.08.034.
- [28] 李娜. 乳铁蛋白免疫调节作用的研究[D]. 天津: 天津商业大学, 2008: 26-56. DOI:10.7666/d.y1355402.
- [29] ANAND N, KANWAR R K, DUBEY M L, et al. Effect of lactoferrin protein on red blood cells and macrophages: mechanism of parasite-host interaction[J]. Drug Design Development and Therapy, 2015, 9: 3821-3835. DOI:10.2147/DDDT.S77860.
- [30] ZHANG Y, LIMA C F, RODRIGUES L R. Anticancer effects of lactoferrin: underlying mechanisms and future trends in cancer therapy[J]. Nutrition Reviews, 2014, 72(12): 763-773. DOI:10.1111/nure.12155.
- [31] SAKAI T, BANNO Y, KATO Y, et al. Pepsin-digested bovine lactoferrin induces apoptotic cell death with JNK/SAPK activation in oral cancer cells[J]. Journal of Pharmacological Sciences, 2005, 98(1): 41-48. DOI:10.1254/jphs.FPJ04047X.
- [32] TSUDA H, SEKINE K, FUJITA K, et al. Cancer prevention by bovine lactoferrin and underlying mechanisms: a review of experimental and clinical studies[J]. Biochemistry and Cell Biology, 2002, 80(1): 131-136. DOI:10.1139/o01-239.
- [33] KUHARA T, IIGO M, ITOH T, et al. Orally administered lactoferrin exerts an antimetastatic effect and enhances production of IL-18 in the intestinal epithelium[J]. Nutrition and Cancer, 2000, 38(2): 192-199. DOI:10.1207/S15327914NC382_8.

- [34] 李洪波, 周强, 滕国新, 等. 乳铁蛋白与肿瘤关系的研究进展[J]. 食品工业科技, 2010, 31(1): 399-401. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2010.01.115.
- [35] 郭婧, 孔祥永. 牛乳铁蛋白促进空肠上皮细胞株IEC-6细胞活性的研究[J]. 中国医刊, 2016, 51(6): 85-89. DOI:10.3969/j.issn.1008-1070.2016.06.026.
- [36] BLAIS A, FAN C B, VOISIN T, et al. Effects of lactoferrin on intestinal epithelial cell growth and differentiation: an *in vivo* and *in vitro* study[J]. Biometals, 2014, 27(5): 857-874. DOI:10.1007/s10534-014-9779-7.
- [37] REZNIKOV E A, COMSTOCK S S, YI C, et al. Dietary bovine lactoferrin increases intestinal cell proliferation in neonatal piglets[J]. Journal of Nutrition, 2014, 144(9): 1401-1408. DOI:10.3945/jn.114.196568.
- [38] 安清聪, 徐娜娜, 张春勇, 等. 不同水平乳铁蛋白对滇撒配套系仔猪生产性能、小肠形态学和机体抗病能力的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2015, 46(12): 2206-2217. DOI:10.11843/j.issn.0366-6964.2015.12.012.
- [39] 李美君, 方成堃, 张凯, 等. 饲料中添加乳铁蛋白对早期断奶仔猪生长性能、肠道菌群及肠黏膜形态的影响[J]. 动物营养学报, 2012, 24(1): 111-116. DOI:10.3969/j.issn.1006-267x.2012.01.016.
- [40] LEE H M, LEE S, LEE B I, et al. Clinical significance of fecal lactoferrin and multiplex polymerase chain reaction in patients with acute diarrhea[J]. Gut and Liver, 2015, 9(5): 636-640. DOI:10.5009/gnl14106.
- [41] YAMAMOTO T, SHIMOYAMA T, BAMBA T, et al. Consecutive monitoring of fecal calprotectin and lactoferrin for the early diagnosis and prediction of pouchitis after restorative proctocolectomy for ulcerative colitis[J]. American Journal of Gastroenterology, 2015, 110(6): 881-887. DOI:10.1038/ajg.2015.129.
- [42] 魏秀秀, 陈庆森, 刘雪姬, 等. 乳铁蛋白对小鼠肠道微生物区系的影响研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(13): 333-337.
- [43] MALET A, BOURNAUD E, LAN A, et al. Bovine lactoferrin improves bone status of ovariectomized mice via immune function modulation[J]. Bone, 2011, 48(5): 1028-1035. DOI:10.1016/j.bone.2011.02.002.
- [44] 李季青, 刘一鸣, 祝颂松, 等. 乳铁蛋白对骨质疏松症大鼠创伤性骨关节炎的疗效[J]. 口腔医学研究, 2016, 32(6): 564-569. DOI:10.13701/j.cnki.kqxyj.2016.06.004.
- [45] LI W Y, ZHU S S, HU J. Bone Regeneration is promoted by orally administered bovine lactoferrin in a rabbit tibial distraction osteogenesis model[J]. Clinical Orthopaedics and Related Research, 2015, 473(7): 2383-2393. DOI:10.1007/s11999-015-4270-5.
- [46] 刘猛, 杜明, 孔莹莹, 等. 热处理对牛乳铁蛋白促成骨细胞增殖活性影响[J]. 食品科学, 2013, 34(9): 301-304. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201309061.
- [47] VANDROVCOVA M, DOUGLAS T E L, HEINEMANN S, et al. Collagen-lactoferrin fibrillar coatings enhance osteoblast proliferation and differentiation[J]. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2015, 103(2): 525-533. DOI:10.1002/jbm.a.35199.
- [48] 晋冰玉, 薛延香, 沈仁泽, 等. 乳铁蛋白对牙周膜细胞增殖迁移分化的影响[J]. 实用口腔医学杂志, 2016, 32(3): 406-411. DOI:10.3969/j.issn.1001-3733.2016.03.023.
- [49] CURRAN C S, DEMICK K P, MANSFIELD J M. Lactoferrin activates macrophages via TLR4-dependent and -independent signaling pathways[J]. Cellular Immunology, 2006, 242(1): 23-30. DOI:10.1016/j.cellimm.2006.08.006.
- [50] HWANG S A, KRUEL M L, ACTOR J K. Effects of CHO-expressed recombinant lactoferrins on mouse dendritic cell presentation and function[J]. Innate Immunity, 2015, 21(5): 553-561. DOI:10.1177/1753425914564609.
- [51] SHERMAN M P, PRITZL C J, XIA C, et al. Lactoferrin acts as an adjuvant during influenza vaccination of neonatal mice[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2015, 467(4): 1-5. DOI:10.1016/j.bbrc.2015.10.067.
- [52] MEHRA N K, MISHRA V, JAIN N K. Receptor-based targeting of therapeutics[J]. Therapeutic Delivery, 2013, 4(3): 369-394. DOI:10.4155/tde.13.6.
- [53] 唐慧娟, 张振海, 赵志英, 等. 乳铁蛋白作为药物载体的研究进展[J]. 药学报, 2015(6): 675-681.
- [54] 肖衍宇, 陈曦, 邹浪, 等. 乳铁蛋白修饰纳米脂质载体的制备及其靶向性评价[J]. 中国药理学杂志, 2013, 48(20): 1755-1760.
- [55] LI Y L, PEI Y K, SOMANI S, et al. Tumor regression following intravenous administration of lactoferrin- and lactoferricin-bearing dendriplexes[J]. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2015, 11(6): 1445-1454. DOI:10.1016/j.nano.2015.04.006.
- [56] 高学飞, 王志耕. β -乳球蛋白应用研究进展[J]. 中国乳业, 2005(5): 41-44. DOI:10.3969/j.issn.1671-4393.2005.05.014.
- [57] National Center for Biotechnology Information. Molecular components in 3NPO[OL]. [2016-07-30]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/3NPO>.
- [58] SALAMONE D, BARAÑO L, SANTOS C, et al. High level expression of bioactive recombinant human growth hormone in the milk of a cloned transgenic cow[J]. Journal of Biotechnology, 2006, 124(2): 469-472. DOI:10.1016/j.jbiotec.2006.01.005.
- [59] PERAM M R, LOVEDAY S M, YE A, et al. *In vitro* gastric digestion of heat-induced aggregates of β -lactoglobulin[J]. Journal of Dairy Science, 2013, 96(1): 63-74. DOI:10.3168/jds.2012-5896.
- [60] DOWNS M L, TAYLOR S L. Effects of thermal processing on the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) detection of milk residues in a model food matrix[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(18): 10085-10091. DOI:10.1021/jf101718f.
- [61] LIANG L, SUBIRADE M. Beta-lactoglobulin/folic acid complexes: formation, characterization, and biological implication[J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2010, 114(19): 6707-6712. DOI:10.1021/jp101096r.
- [62] HATTORI M, WATABE A, TAKAHASHI K. Beta-lactoglobulin protects beta-ionone related compounds from degradation by heating, oxidation, and irradiation[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1995, 59(12): 2295-2297. DOI:10.1271/bbb.59.2295.
- [63] ZIMET P, LIVNEY Y D. Beta-lactoglobulin and its nanocomplexes with pectin as vehicles for ω -3 polyunsaturated fatty acids[J]. Food Hydrocolloids, 2009, 23(4): 1120-1126. DOI:10.1016/j.foodhyd.2008.10.008.
- [64] JAMESON G B, ADAMS J J, CREAMER L K. Flexibility, functionality and hydrophobicity of bovine β -lactoglobulin[J]. International Dairy Journal, 2002, 12(4): 319-329. DOI:10.1016/S0958-6946(02)00028-6.
- [65] 王磊, 程昊, 倪莹宙, 等. 基于 β -乳球蛋白配体结合特性的活性成分包埋和保护研究现状[J]. 中国食品学报, 2015, 15(4): 124-129. DOI:10.16429/j.1009-7848.2015.04.017.
- [66] 张捷. 乳蛋白和三种活性成分间相互作用及对活性成分的保护作用[D]. 无锡: 江南大学, 2014: 21-45.
- [67] KUSHIBIKI S, HODATE K, KURISAKI J, et al. Effect of beta-lactoglobulin on plasma retinol and triglyceride concentrations, and fatty acid composition in calves[J]. Journal of Dairy Research, 2001, 68(4): 579-586. DOI:10.1017/S0022029901005040.
- [68] MULLALLY M M, MEISEL H, FITZGERALD R J. Identification of a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide corresponding to a tryptic fragment of bovine β -lactoglobulin[J]. FEBS Letters, 1997, 402(2/3): 99-101. DOI:10.1016/S0014-5793(96)01503-7.

- [69] NAKAMURA Y, YAMAMOTO N, SAKAI K, et al. Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme[J]. Journal of Dairy Science, 1995, 78(6): 1253-1257. DOI:10.3168/jds.S0022-0302(95)76745-5.
- [70] PIHLANTO-LEPPÄLÄ A, KOSKINEN P, PIILOLA K, et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides[J]. Journal of Dairy Research, 2000, 67(1): 53-64. DOI:10.1017/S002202999003982.
- [71] MURAKAMI M, TONOUCHI H, TAKAHASHI R, et al. Structural analysis of a new anti-hypertensive peptide (β -lactosin B) isolated from a commercial whey product[J]. Journal of Dairy Science, 2004, 87(7): 1967-1974. DOI:10.3168/jds.S0022-0302(04)70013-2.
- [72] NAGAOKA S, YU F, MIWA K, et al. Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk β -lactoglobulin[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001, 281(1): 11-17. DOI:10.1006/bbrc.2001.4298.
- [73] SIPOLA M, FINCKENBERG P, KORPELA R, et al. Effect of long-term intake of milk products on blood pressure in hypertensive rats[J]. Journal of Dairy Research, 2002, 69(1): 103-111. DOI:10.1017/S002202990100526X.
- [74] National Center for Biotechnology Information. Molecular Components in 2G4N[OL]. [2016-07-30]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/2G4N>.
- [75] NOYELLE K, VAN DAEL H. Kinetics of conformational changes induced by the binding of various metal ions to bovine α -lactalbumin[J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 2002, 88(1): 69-76. DOI:10.1016/S0162-0134(01)00343-9.
- [76] KRONMAN M J, SINHA S K, BREW K. Characteristics of the binding of Ca^{2+} and other divalent metal ions to bovine α -lactalbumin[J]. Journal of Biological Chemistry, 1981, 256(16): 8582-8587. DOI:10.1074/jbc.M004752200.
- [77] SEGAWA T, SUGAI S. Interactions of divalent metal ions with bovine, human, and goat α -lactalbumins[J]. Journal of Biochemistry, 1983, 93(5): 1321-1328. DOI:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a134266.
- [78] ZHANG M, FANG B, ZHANG L D, et al. Structure and anti-tumor activity of bovine α -lactalbumin after binding linoleic acid[J]. Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi, 2015, 35(9): 2609-2612. DOI:10.3964/j.issn.1000-0593(2015)09-2609-04.
- [79] 刘思国, 魏影允, 胡国法, 等. 人 α -乳白蛋白在转基因小鼠乳汁中的动态表达图谱[J]. 中国科学(C辑:生命科学), 2003, 33(4): 317-322. DOI:10.3321/j.issn:1006-9259.2003.04.004.
- [80] BLECK G T, WHEELER M B, HANSEN L B, et al. Lactose synthase components in milk: concentrations of α -lactalbumin and β 1, 4-galactosyltransferase in milk of cows from several breeds at various stages of lactation[J]. Reproduction in Domestic Animals, 2009, 44(2): 241-247. DOI:10.1111/j.1439-0531.2007.01047.x.
- [81] STACEY A, SCHNIEKE A, KERR M, et al. Lactation is disrupted by α -lactalbumin deficiency and can be restored by human α -lactalbumin gene replacement in mice[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995, 92(7): 2835-2839. DOI:10.1073/pnas.92.7.2835.
- [82] 杨芳(小), 张旻, 周兵瑞, 等. α -乳白蛋白错误折叠和形成有益生物学功能的分子机制[C]//湖北省暨武汉市生物化学与分子生物学学会第八届第十七次学术年会论文汇编. 宜昌: 湖北省科学技术协会, 2007: 37.
- [83] MULLALLY M M, MEISEL H, FITZGERALD R J. Synthetic peptides corresponding to α -lactalbumin and β -lactoglobulin sequences with angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity[J]. Biological Chemistry Hoppe-Seyler, 1996, 377(4): 259-260. DOI:10.1515/bchm3.1996.377.4.259.
- [84] LACROIX I M E, LI-CHAN E C Y. Peptide array on cellulose support: a screening tool to identify peptides with dipeptidyl-peptidase IV inhibitory activity within the sequence of α -lactalbumin[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(11): 20846-20858. DOI:10.3390/ijms151120846.
- [85] YAMAGUCHI M, TAKAI S. Chronic administration of bovine milk-derived α -lactalbumin improves glucose tolerance via enhancement of adiponectin in Goto-Kakizaki rats with type 2 diabetes[J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2014, 37(3): 404-408. DOI:10.1248/bpb.b13-00762.
- [86] YAMAGUCHI M, TAKAI S, HOSONO A, et al. Bovine milk-derived α -lactalbumin inhibits colon inflammation and carcinogenesis in azoxymethane and dextran sodium sulfate-treated mice[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2014, 78(4): 672-679. DOI:10.1080/09168451.2014.890034.
- [87] MAHANTA S, PAUL S. Stable self-assembly of bovine α -lactalbumin exhibits target specific anti-proliferative activity in multiple cancer cells[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2015, 7(51): 28177-28187. DOI:10.1021/acsami.5b06076.
- [88] 张旻. α -乳白蛋白错误折叠产物诱导肿瘤细胞凋亡机制研究[D]. 武汉: 武汉大学, 2009: 2-20; 62-74.
- [89] MATSUMOTO H, SHIMOKAWA Y, USHIDA Y, et al. New biological function of bovine α -lactalbumin: protective effect against ethanol- and stress-induced gastric mucosal injury in rats[J]. Bioscience Biotechnology & Biochemistry, 2001, 65(5): 1104-1111. DOI:10.1271/bbb.65.1104.
- [90] FIAT A M, MIGLIORE-SAMOUR D, JOLLÈS P, et al. Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities[J]. Journal of Dairy Science, 1993, 76(1): 301-310. DOI:10.3168/jds.S0022-0302(93)77351-8.
- [91] MEULENBROEK L A, DEN HARTOG J C F, LEBENS A F M, et al. Characterization of T cell epitopes in bovine α -lactalbumin[J]. International Archives of Allergy and Immunology, 2014, 163(4): 292-296. DOI:10.1159/000360733.
- [92] 胡文琴, 王恬, 霍永久, 等. 酪蛋白酶解物体外抗氧化作用的研究[J]. 食品科学, 2004, 25(4): 158-162. DOI:10.3321/j.issn:1002-6630.2004.04.040.
- [93] CERVATO G, CAZZOLA R, CESTARO B. Studies on the antioxidant activity of milk caseins[J]. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 1999, 50(4): 291-296. DOI:10.1080/096374899101175.
- [94] 翟青新. 酪蛋白酶解及其产物的抑菌活性[D]. 南京: 南京农业大学, 2005: 8-24.
- [95] KAYSER H, MEISEL H. Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins[J]. FEBS Letters, 1996, 383(1/2): 18-20. DOI:10.1016/0014-5793(96)00207-4.
- [96] 姜瞻梅, 吴刚, 刘丽波, 等. 酪蛋白源降血压肽稳定性及其抑制作用机理的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(4): 249-252. DOI:10.3321/j.issn:1002-6630.2008.04.052.
- [97] CHATTERTON D E W, NGUYEN D N, BERING S B, et al. Anti-inflammatory mechanisms of bioactive milk proteins in the intestine of newborns[J]. International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2013, 45(8): 1730-1747. DOI:10.1016/j.biocel.2013.04.028.
- [98] LILJUS E M, MARNILA P. The role of colostral antibodies in prevention of microbial infections[J]. Current Opinion in Infectious Diseases, 2001, 14(3): 295-300. DOI:10.1097/00001432-200106000-00008.
- [99] PLOEGAERT T C W, TIJHAAR E, LAM T J G M, et al. Natural antibodies in bovine milk and blood plasma: variability among cows, repeatability within cows, and relation between milk and plasma titers[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2011, 144(1/2): 88-94. DOI:10.1016/j.vetimm.2011.07.008.
- [100] GARDNER C D, MESSINA M, KIAZAND A, et al. Effect of two types of soy milk and dairy milk on plasma lipids in hypercholesterolemic adults: a randomized trial[J]. Journal of the American College of Nutrition, 2007, 26(6): 669-677. DOI:10.1080/0735724.2007.10719646.
- [101] YASUDA M, KATO S, YAMANAKA N, et al. 5-HT₃ receptor antagonists ameliorate 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis by suppression of apoptosis in murine intestinal crypt cells[J]. British Journal of Pharmacology, 2013, 168(6): 1388-1400. DOI:10.1111/bph.12019.
- [102] DADDAOUA A, PUERTA V A, ZARZUELO A, et al. Bovine glycomacropeptide is anti-inflammatory in rats with hapten-induced colitis[J]. Journal of Nutrition, 2005, 135(5): 1164-1170.
- [103] YVON M, BEUCHER S, GUILLLOTEAU P, et al. Effects of caseinomacropeptide (CMP) on digestion regulation[J]. Reproduction Nutrition Development, 1994, 34(6): 527-537. DOI:10.1051/rnd:19940602.
- [104] ALMEHDAR H A, ELFAKHARANY E M, UVERSKY V N, et al. Disorder in milk proteins: structure, functional disorder, and biocidal potentials of lactoperoxidase[J]. Current Protein and Peptide Science, 2015, 16(4): 352-365. DOI:10.2174/1389203716666150316114956.
- [105] GERSON C, SABATER J, SCURI M, et al. The lactoperoxidase system functions in bacterial clearance of airways[J]. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 2000, 22(6): 665-671. DOI:10.1165/ajrcmb.22.6.3980.