

乳铁蛋白体外抗氧化性的研究

李 婷^{1,2}, 王彩云², 闫序东², 云战友^{2*}

(1. 内蒙古农业大学食品科学与工程学院, 内蒙古 呼和浩特 010018;

2. 内蒙古伊利实业集团股份有限公司技术中心, 内蒙古 呼和浩特 010080)

摘 要: 目的: 研究乳铁蛋白的抗氧化活性。方法: 利用分光光度法测定乳铁蛋白的脂质过氧化抑制率、羟自由基($\cdot\text{OH}$)清除率和DPPH自由基清除率。结果: 乳铁蛋白对各种自由基的作用能力由大到小为: 脂质过氧化抑制率 $>$ 羟自由基清除率 $>$ DPPH自由基清除率。结论: 乳铁蛋白对上述3种自由基有明显的清除作用, 初步判断是由于乳铁蛋白结合上述反应所需铁离子从而起到抑制作用。

关键词: 乳铁蛋白; 脂质过氧化; 羟自由基清除活性; DPPH自由基清除活性

Antioxidant Activity of Lactoferrin *in vitro*

LI Ting^{1,2}, WANG Cai-yun², YAN Xu-dong², YUN Zhan-you^{2*}

(1. College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China;

2. Inner Mongolia Yili Industrial Group Corporation Technology Center, Hohhot 010080, China)

Abstract: The *in vitro* antioxidant activity of lactoferrin was evaluated by spectrophotometrically measuring its lipid peroxidation inhibitory activity and scavenging capacities against hydroxyl and DPPH free radicals. Lactoferrin had obvious lipid peroxidation inhibitory activity and scavenging activities against hydroxyl and DPPH free radicals. in the following decreasing order: lipid peroxidation $>$ hydroxyl free radical $>$ DPPH free radical. The free radical scavenging mechanism may be due to the interaction between lactoferrin and iron ion, which is necessary for reaction systems.

Key words: lactoferrin; anti-lipid peroxidation activity; hydroxyl radical scavenging activity; DPPH radical scavenging activity
中图分类号: TS252 文献标识码: A 文章编号: 1002-6630(2012)21-0111-03

乳铁蛋白是一种具有多种生理功能的天然活性糖蛋白, 最先发现于乳汁中, 但也广泛存在于人体的乳汁、唾液、泪液、胆汁、血浆、黏膜以及生殖器的分泌物中^[1]。人们对乳铁蛋白及其水解产物乳铁蛋白活性多肽进行了深入研究, 发现他们具有多种生理功能, 如广谱抗细菌感染的作用、调节体内铁的平衡、调节骨髓细胞的生成、促进正常细胞的生长、抑制肿瘤细胞的生长以及预防及治疗肿瘤等^[2]。

自由基是一类含有未配对电子的基团、分子或原子, 它们是由机体内正常细胞和病态细胞产生的, 或者是由外部因素导致的^[3]。它们在低浓度下维持生物正常的生理活动, 而在过剩的情况下, 就会对机体造成损伤, 破坏大分子物质, 如蛋白质、多肽、DNA等, 进一步导致动脉粥样硬化、癌症等一系列疾病^[4]。可通过补充抗氧化剂清除自由基, 而人工合成的抗氧化剂被认为长期使用会引发肝损伤和癌症, 具有毒副作用^[5-6]。因此, 寻找天然高效低毒的抗氧化剂已成为食品和生物医学领域重要的研究方向。目前有关乳铁蛋白抗氧化性的报道大多是研究乳铁蛋白对脂质过氧化的抑制作

用, 而其综合抗氧化性的研究未见报道。因此, 本实验初步研究乳铁蛋白的抗氧化活性, 以期乳铁蛋白在天然抗氧化保健产品领域的开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

乳铁蛋白(纯度大于90%) 新西兰恒天然乳品公司; 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 美国Sigma公司; 硫代巴比妥酸(TBA)、卵磷脂 美国Alfa Aesar公司; 抗坏血酸 天津市风船化学试剂科技有限公司; 氯化亚铁、三氯乙酸(TCA)、硫酸亚铁、水杨酸、双氧水、乙醇等均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

TV-1810紫外-可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司; LSHZ-300 型冷冻水浴恒温振荡器 太仓市试验设备厂。

收稿日期: 2011-09-26

作者简介: 李婷(1986—), 女, 硕士, 研究方向为乳品加工。E-mail: liting860216@163.com

*通信作者: 云战友(1964—), 男, 教授, 博士, 研究方向为生物工程。E-mail: yzy@yili.com

1.3 方法

1.3.1 对 Fe^{2+} -VC 诱导的脂质过氧化抑制作用的测定^[7]

脂质体磷酸盐缓冲液(PBS)分散系(lecithin liposome system, LLS)制备: 580mg 卵磷脂溶解于580mL PBS(10mmol/L, pH7.4), 冰浴振荡。

测定方法: 于样品管中依次加入1mL LLS、100 μL 400 $\mu\text{mol/L}$ FeCl_2 、100 μL 400 $\mu\text{mol/L}$ 抗坏血酸和1mL样品(或水), 充分混匀, 避光37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴30min, 再加入0.5mL 20% TCA、1.3mL 0.8% TBA, 于100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴30min, 迅速冷却以5000 $\times g$ 离心10min, 取上清液在535nm 波长处测定吸光度。

$$\text{抑制率}/\% = \frac{A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{空白}}} \times 100 \quad (1)$$

式中: $A_{\text{样品}}$ 为样品吸光度; $A_{\text{空白}}$ 为蒸馏水吸光度(用蒸馏水代替样品)。

1.3.2 对羟自由基($\cdot\text{OH}$)清除作用的测定^[8]

在Smimoff等^[9]报道的方法的基础上进行改进, 在试管中依次加入6mmol/L FeSO_4 溶液2mL、不同质量浓度乳铁蛋白溶液2mL、6mmol/L H_2O_2 溶液2mL, 摇匀, 静置15min, 再加入6mmol/L 水杨酸溶液2mL, 摇匀, 静置30min后于510nm 波长处测定吸光度, 清除率按式(2)计算^[10]。

$$\text{清除率}/\% = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}\right) \times 100 \quad (2)$$

式中: A_i 为样品吸光度; A_j 为用蒸馏水代替水杨酸时测得某浓度乳铁蛋白的吸光度; A_0 为用水代替乳铁蛋白时测得空白对照吸光度。

1.3.3 对DPPH自由基清除作用的测定^[11-12]

在实验组(A_i)依次加入3mL 0.1mmol/L DPPH的乙醇溶液、1.5mL试样; 空白对照组(A_0)加入3mL 0.1mmol/L DPPH的乙醇溶液、1.5mL蒸馏水; 样品对照组(A_j)加入3mL乙醇溶液、1.5mL试样; 然后立即混匀37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴30min后测定混合溶液在波长525nm处的吸光度, 清除率按式(3)计算。

$$\text{清除率}/\% = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}\right) \times 100 \quad (3)$$

2 结果与分析

2.1 乳铁蛋白对 Fe^{2+} -VC 诱导的脂质过氧化的抑制作用

脂质过氧化是动脉粥样硬化的病因之一, 其最终产物丙二醛(MDA), 可使膜蛋白、酶发生交联反应, 使膜通透性增加, 导致细胞膜结构、功能和代谢发生变化, 对人体危害极大^[13]。研究以卵磷脂溶液为脂质过氧化体系, 测定乳铁蛋白对脂质过氧化的抑制作用, 结果见图1。

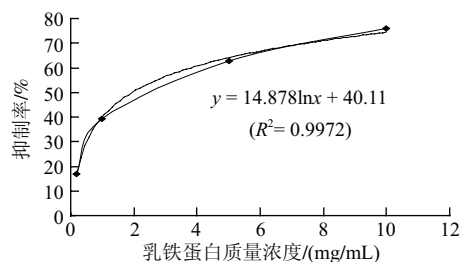


图1 乳铁蛋白抗脂质过氧化的能力

Fig.1 Anti-lipid peroxidation activity of lactoferrin

由图1可知, 乳铁蛋白对脂质过氧化体系有抑制作用, 且抑制作用随乳铁蛋白质量浓度的增大而增强。根据公式可以得出 $\text{IC}_{50} \approx 1.9\text{mg/mL}$, 即抑制率为50%时所需乳铁蛋白质量浓度为1.9mg/mL。

2.2 乳铁蛋白对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用

$\cdot\text{OH}$ 是已知的最强氧化剂, 几乎能和所有的细胞成分发生反应, 且反应速度很快。它可导致机体组织脂质过氧化, 蛋白质解聚、聚合, 核酸断裂和多糖裂解等生化过程, 引发组织细胞病变, 并且 $\cdot\text{OH}$ 会引起DNA的损伤或调节细胞凋亡相关基因而诱导细胞凋亡^[14]。减少此类自由基, 即可达到抗衰老、防心血管疾病、抗癌的作用。以常用抗坏血酸为参照, 测定提取物对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用, 结果见图2、3。

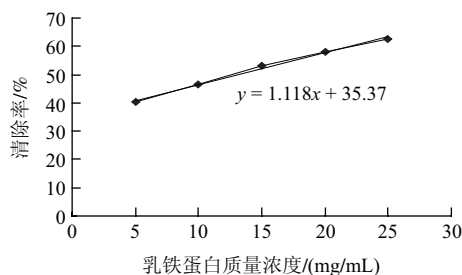


图2 乳铁蛋白对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用

Fig.2 Scavenging effect of lactoferrin against hydroxyl free radicals

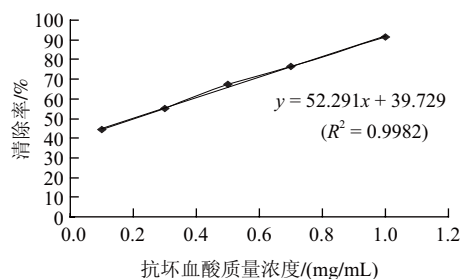


图3 抗坏血酸对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用

Fig.3 Scavenging effect of ascorbic acid against hydroxyl free radicals

由图2、3可知, 随着乳铁蛋白溶液质量浓度的升高, 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力越强, 乳铁蛋白的 $\text{IC}_{50} \approx 13.1\text{mg/mL}$, 而抗坏血酸的 $\text{IC}_{50} \approx 0.2\text{mg/mL}$, IC_{50} 值越低, 表明清除 $\cdot\text{OH}$ 的能力越强, 可见, 乳铁蛋白虽然有一定的清除 $\cdot\text{OH}$ 的能力, 但是在相同的用量下, 乳铁蛋白对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力要低于抗坏血酸。

2.3 乳铁蛋白对DPPH自由基的清除作用

2.3.1 DPPH的吸收光谱

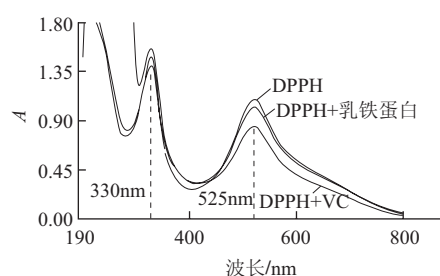


图4 DPPH的吸收光谱

Fig.4 Absorption spectrum of DPPH

由图4可知, 有机自由基DPPH溶液有两个特征吸收峰330nm和525nm, 加入常用食品抗氧化剂抗坏血酸溶液和乳铁蛋白溶液后, 两个吸收峰皆降低, 但525nm吸收的降低较显著, 所以本实验选用可见光525nm的吸收来表示DPPH自由基含量的变化。这与Larrauri等^[15]报道DPPH吸收峰在波长517nm有差异, 可能是由于溶解DPPH时所用溶剂不同(溶剂为无水甲醇, 本实验所用溶剂为无水乙醇), 从而导致差异的产生。

2.3.2 乳铁蛋白及抗坏血酸对DPPH自由基的清除作用

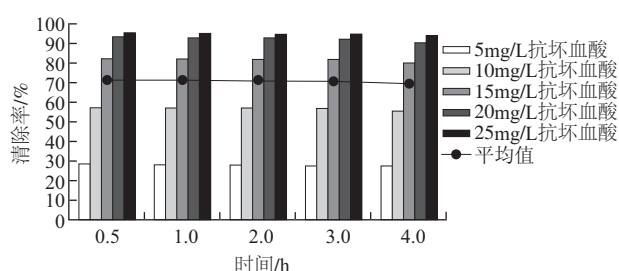


图5 抗坏血酸与DPPH自由基清除率的关系

Fig.5 Relationship between ascorbic acid concentration and DPPH radical scavenging rate

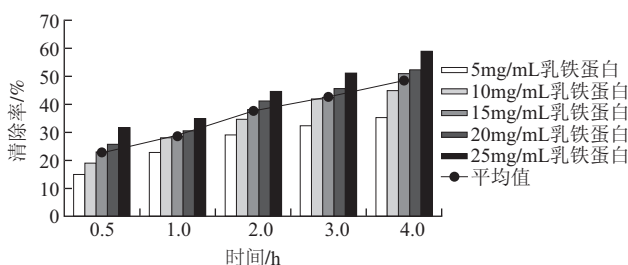


图6 乳铁蛋白质量浓度与DPPH自由基清除率的关系

Fig.6 The relationship between lactoferrin concentration and DPPH radical scavenging rate

由图5、6可知, 随着乳铁蛋白和抗坏血酸质量浓度的增加, 其对DPPH自由基的清除能力也随之增强, 但乳铁蛋白在质量浓度为15mg/mL、反应时间为4h时其对DPPH自由基的清除率达到50.93%, 而抗坏血酸质量浓度为0.01mg/mL、反应时间为0.5h时其对DPPH的清除率就

达到57%。由此可知, 在相同的质量浓度条件下, 乳铁蛋白对DPPH自由基的清除能力要明显弱于抗坏血酸。并且, 在同一质量浓度下, 乳铁蛋白对DPPH自由基的清除率随着时间的增加明显升高, 而抗坏血酸对DPPH自由基的清除率随着时间的增加基本不变, 略有降低。这间接的说明乳铁蛋白的抗氧化性随着时间的延长逐渐凸显出来; 而抗坏血酸的抗氧化能力能够迅速表现出来, 但维持一段时间后其DPPH自由基的清除率略有降低, 导致其稳定性较差的原因可能是体系中的抗坏血酸随着时间的延长被氧化破坏^[16]。

3 结论

通过研究发现乳铁蛋白具有一定的抗氧化能力, 但在不同抗氧化体系中, 其抗氧化活性差异显著。其中, 乳铁蛋白对脂质过氧化的抑制作用、对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用、对DPPH自由基的清除作用依次增强, 其 IC_{50} 依次是1.9、13.1、15mg/mL。初步判断乳铁蛋白是由于结合铁离子从而对需要铁离子参与的反应起到一定的抑制作用, 目前对乳铁蛋白的抗氧化机理还有待进一步确认。

参考文献:

- [1] JENSSEN H, HANCOCK R E W. Antimicrobial properties of lactoferrin[J]. *Biochimie*, 2009, 91(1): 19-29.
- [2] 陈生, 袁勤生. 乳铁蛋白的研究进展[J]. *食品与药品*, 2008, 10(1): 62-66.
- [3] ZOU Chang, DU Yumin, LI Yan, et al. Preparation of Lacquer polysaccharide sulfates and their antioxidant activity *in vitro*[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2008, 73: 322-331.
- [4] LI Haiyun, HAO Zaibin, WANG Xiuli, et al. Antioxidant activities of extracts and fractions from *Lysimachis foenum graecum* Hance[J]. *Bioresearch Technology*, 2009, 100: 970-974.
- [5] RYAN L, PRESCOTT S L. Stability of the antioxidant capacity of twenty-five commercially available fruit juices subjected to an *in vitro* digestion[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2010, 45(6): 1191-1197.
- [6] JIMENEZ-ALVAREZ D, GIUFFRIDA F, VANROBAEYS F, et al. High-throughput methods to assess lipophilic and hydrophilic antioxidant capacity of food extracts *in vitro*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(10): 3470-3477.
- [7] WU Shujing, NG L T. Antioxidant and free radical scavenging activities of wild bitter melon(*Momordica charantia* Linn. var. abbreviate Ser.) in Taiwan[J]. *LWT*, 2008, 41: 323-330.
- [8] 杨方美, 王林, 胡秋辉. 鼠尾藻多糖的制备及其抗氧化活[J]. *食品科学*, 2005, 26(2): 224-227.
- [9] SMIRNOFF N, CUMBES Q J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Photochemistry*[J]. *Polysaccharides to Hydroxyl Radicals*, 1989, 28: 1057-1060.
- [10] 李俊丽, 向长萍. 南瓜水溶性多糖提取及抗氧化性能的研究[J]. *湖北农业科学*, 2006, 45(5): 611-614.
- [11] AOSHIMA H, AYABE S. Prevention of the deterioration of polyphenol-rich beverages[J]. *Food Chemistry*, 2007, 100(5): 350-355.
- [12] 杜国荣. 猕猴桃、柿、苹果果实的抗氧化能力及其抗氧化活性成分的分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2009.
- [13] YUAN Jiangfeng, ZHANG Zhiqi, FAN Zhichao, et al. Antioxidant effects and cytotoxicity of three purified polysaccharides from *Ligusticum chuanxiong* Hort[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2008, 74(4): 822-827.
- [14] 王小华, 邓斌, 张晓军, 等. 红薯叶黄酮类化合物的提取及其抗氧化活性的测定[J]. *化学与生物工程*, 2009, 26(2): 32-35.
- [15] LARRAURI J A, SÁNCHEZ-MORENO C. Effect of temperature on the free radical scavenging capacity of extracts from red and white grape pomace peels[J]. *J Agric Food Chem*, 1998, 46(7): 2694-2697.
- [16] 郑大贵, 肖竹平, 叶红德. VC硬脂酸酯和异VC硬脂酸酯乙醇溶液的稳定性研究[J]. *食品科学*, 2007, 28(3): 64-67.