

抗菌肽 Lactoferricin 生物学功能及其应用研究进展

冯兴军², 王建华^{1*}, 单安山²

(1. 中国农业科学院饲料研究所, 北京 100081; 2. 东北农业大学动物营养研究所, 哈尔滨 150030)

摘要:概述了乳铁蛋白活性多肽(lactoferricin)所具有的广谱抗菌、抗寄生虫、抗病毒、抗癌、抗氧化等多种生物学活性,讨论了 lactoferricin 的制备方法,并对 lactoferricin 作为饲料添加剂的应用前景作了初步探讨。

关键词:lactoferricin; 抗菌肽; 生物学功能; 饲料添加剂

中图分类号:Q516; R978.1

Advances on the Bio-activities of Lactoferricin and its Application

FENG Xing-jun², WANG Jian-hua^{1*}, SHAN An-shan²

(1. Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

2. Animal Nutrition Research Institute, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract Lfcin, the active center of lactoferrin, is generated by pepsin cleavage from the N-terminal part of lactoferrin. The structure and the biological functions of Lfcin, including the antibacterial, antiparasites, antiviral, and antioxidant effect were reviewed. The preparation of lactoferricin and its potential application as feed additive were also discussed.

Key words lactoferricin; antimicrobial peptides; biological functions; feed additives

抗菌肽是宿主防御系统产生的一类对抗外界病原体感染的肽类物质,是宿主免疫防御系统的重要组成部分。抗菌肽抗菌广谱,对病毒、寄生虫、癌细胞均有抑制作用。由于传统抗生素的应用带来的耐药性、药物残留等问题,对抗生素肽的研究开发已成为世界上研究抗生素新产品的前沿性课题。

自从 Boman 等人在昆虫中发现第一种抗菌肽以来,已从动物不同组织中分离并鉴定出 100 多种抗菌肽。乳铁蛋白活性多肽(Lactoferricin, 简称为 Lfcin)是近年来发现的一种新型抗菌肽。Lfcin 具有多种生理活性,是乳铁蛋白活性中心,具有抑菌杀菌、抗癌、调节免疫、抗病毒等多种乳铁蛋白所具有的生物学功能。Hiroaki 等^[1]在研究酸性条件下乳铁蛋白(LF)的热稳定性时发现,经热处理后 LF 发生明显的降解,但抑菌活性却强于未经热处理的

LF,于是推测在 LF 加热降解后产生了抑菌活性强于 LF 的多肽。Tomita 等^[2]研究了牛 LF 经蛋白酶降解后产生的多肽的抗菌作用,结果表明,猪胰蛋白酶水解所得小分子多肽抗菌活性显著提高,具有广谱抗菌活性,能抑制多种 G⁺ 和 G⁻ 细菌生长,其中包括对 LF 具有抗性的菌株,水解多肽的活性至少为 LF 的 8 倍。Bellamy 等^[3]在牛 LF 酶解产物中分离得到一段 N 端多肽,其抗菌活性比 LF 强 400 多倍,将其命名为 Lactoferricin(简称为 Lfcin),此后,相继在人、小鼠、山羊和猪^[4]等动物 LF 中发现 Lfcin 同源物。其中,由于牛 Lfcin(LfcinB)抗菌活性最强而成为研究热点。LfcinB 来源于牛乳铁蛋白的 17-41 位 AA,由 25 个 AA 残基组成,AA 顺序为 Phe-Lys-Cys-Arg-Arg-Tip-Gln-Tip-Arg-Met-Lys-Lys-Leu-Gly-Ala-Pro-Ser-Ile-Thr-Cys-Val-Arg-Arg-Ala-Phe^[5]。对 Lfcin 作用机制已有专门论述^[6],本文侧重综述其生物学功能与应用研究。

1 LfcinB 生物学功能

收稿日期:2004-06-18

接受日期:2004-09-20

基金项目:国家 863 计划项目(2004AA246040, 2003AA241160)

*通讯作者 Tel: 86-10-62145735; E-mail: wangjianhua@mail.caas.net.cn

1.1 抑菌与杀菌

Lfcin 抗菌广谱,包括许多 G^+ 和 G^- 病原菌,例如大肠杆菌、肠炎沙门氏菌、绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌、产气荚膜梭菌等,与牛乳铁蛋白相比,LfcinB 的抗菌活性提高了 400 多倍^[5]。除对原核细胞作用外,LfcinB 对真核微生物如霉菌、酵母也具有抑制作用。实验表明,LfcinB 及其衍生物能够抑制培养基中毛癣菌 (*Trichophyton*)、白色念珠菌 (*Candida albicans*) 等真菌病原体的繁殖,抑制其菌丝生长,口服 LfcinB 能够改善动物感染毛癣菌病状,缩短治愈时间^[7,8]。LfcinB 对包括真菌在内的微生物均有抑制作用,除个别 G^+ 外,生长在 1% 蛋白胨培养基或 Sabouraud 葡萄糖培养基的真菌、 G^+ 和 G^- 在较低 LfcinB 浓度下不能生长, MIC 为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 左右^[9]。Bellamy 等^[5]研究了 28 种菌株对 LfcinB 的敏感性,所选待测菌株包括 G^+ 和 G^- 杆菌和球菌、专性需氧菌、兼性厌氧菌和专性厌氧菌,测定了在蛋白胨基础培养基(细菌蛋白胨 10 g/L)和 YPG 培养基(细菌蛋白胨 10 g/L;酵母浸膏 0.5 g/L;葡萄糖 10 g/L)上 LfcinB 的有效抑菌质量浓度,结果表明,随菌株和培养基变化,有效抑菌质量浓度范围为 0.6 ~ 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$,并发现 G^+ 对 LfcinB 比 G^- 更为敏感。

Lfcin 抗菌活性受多种因素影响。Lfcin 属阳离子型抗菌肽,靠静电作用与微生物质膜结合,在这一过程中离子性反应起着至关重要的作用。因此,影响 Lfcin 与质膜间离子性反应的因素就可能影响 Lfcin 的抗菌活性,例如提高溶液中 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等阳离子的离子强度、增加 Tris、Hepes、PIPES 缓冲液浓度,都会显著降低 Lfcin 抗菌效果。此外,培养基、菌株不同对 Lfcin 的抗菌活性也有一定影响^[5,10]。

1.2 抗寄生虫

Turchany 等^[11]研究发现,LfcinB 和 LfcinH 能够抑制贾第鞭毛虫的生长,杀死培养基中的贾第鞭毛虫。与 LF 相比,虽然 LfcinB 和 LfcinH 不能与 Fe^{3+} 结合,但 Fe^{3+} 能够减弱 LfcinB 和 LfcinH 对贾第鞭毛虫的抑制作用;Turchany 等^[12]通过进一步研究证实, Fe^{3+} 能够抑制 LF 或 Lfcin 与贾第鞭毛虫的结合,表明 Lfcin 对贾第鞭毛虫的抑制作用不仅与贾第鞭毛虫的铁利用有关。

Tanaka 等^[13]研究发现,LfcinB 对体外环境下的鼠弓形体 (*Toxoplasma gondii*) 具抑制作用。Omata 等^[14]进一步实验发现,小鼠胚胎细胞与经 LfcinB 处理后弓形体的孢子共同培养,细胞存活率显著高于

对照组;此外,将 LfcinB 处理的兔肝艾美尔球菌 (*Eimeria stiedai*) 的合子感染体外培养的兔肝脏细胞,也得到了相同的结果。实验表明,LfcinB 可有效减弱弓形体、兔肝艾美尔球菌等病原虫对宿主细胞的感染力。对于感染弓形体的小鼠,每天饲喂 5.0 mg 或皮下注射 0.1 mg LfcinB 实验组小鼠无一死亡,而对照组死亡率达 80%,同时,两处理组小鼠脑组织中感染的寄生虫量也明显低于对照组,结果表明 LfcinB 能有效抵制弓形体对小鼠的侵染。

1.3 抗病毒

LfcinB 可降低细胞巨化病毒和 HIV^[15]、疱疹 1 型和 2 型病毒^[16]、腺病毒^[17]、轮状病毒^[18]、脊髓灰质炎病毒和猫嵌杯样病毒^[19]等对宿主细胞的感染力,抑制病毒颗粒复制,如通过结合细胞膜硫酸乙酰肝素 (HS) 封闭疱疹病毒的结合受体,抑制疱疹病毒对细胞的感染,通过封闭 CXCR4 或 CCR5 受体抑制 HIV 对宿主细胞的吸附,最新研究认为 Lfcin 所带正电荷、疏水基团和环状结构等因素都与其抗病毒“吸附-封闭”机制^[19,20]有关。

1.4 抗癌

体外研究表明,LfcinB 对转化细胞具有细胞毒作用,能抑制 THP-1 人单核白血病细胞^[21]、人白血病细胞 HL-60^[22]增殖及生长发育,启动肿瘤细胞凋亡程序,增加细胞内活性氧水平,提高 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 依赖性核酸内切酶活性,导致细胞形态异常、染色体凝集、DNA 片段化、凋亡小体等细胞凋亡特征的出现,最终杀死癌细胞。此外,研究发现,小鼠皮下注射 LfcinB 能够抑制黑色素瘤细胞及淋巴瘤细胞的转移^[23]。

1.5 调节免疫与消炎

蛋白质或多肽在初生哺乳动物消化道内可以被完整吸收并转运;在正常动物或人消化道中,酶解释放的游离氨基酸经钠泵或非钠泵吸收,二肽或三肽由特异性转运载体吸收,3 肽以上的多肽很难被消化道以非特异性吸收形式进入血液。因此,口服 Lfcin (25AA) 能调节动物机体免疫分子水平、辅助杀死体内致病细菌、原虫或病毒^[7,14,24]等作用的实现方式就成为研究热点。Davidson 等^[25]报道,在小肠刷状缘细胞膜存在 LF 特异性结合受体,Lfcin 在 LF 与受体结合过程中起重要作用,人们推测 LF 和 Lfcin 可能会以受体介导形式被小肠粘膜特异性吸收,但至今未被证实。肠道淋巴细胞存在 LF 特异性结合受体,Lfcin 能与人多形核白细胞作用,促进释放对中性粒细胞具激

活作用的干扰素- γ ^[26]。由此,LfcinB作用模式依然停留在通过与消化道免疫系统作用,增强细胞免疫反应,间接提高宿主抵抗力的观点上。

1.6 抗氧化

机体内氧自由基过剩,会造成构成细胞组织的各种物质,如脂质、糖类、蛋白质、核酸等所有的大分子物质发生各种氧化反应,引起变性、交连、断裂等氧化伤害,近而导致细胞结构和功能的破坏,以及机体组织损伤和器官病变。因此,过剩的氧自由基被认为是衰老或疾病的征兆。在通常情况下,铁等金属离子能够起到催化剂的作用,加速氧自由基的产生,乳铁蛋白能够螯合铁离子,抑制铁引起的脂质氧化作用。与乳铁蛋白相比,虽然LfcinB不能结合铁离子,但体外研究表明,LfcinB同样能抑制铁离子的催化作用,阻断脂质体氧化,减少自由基生成^[27]。

2 Lfcin 的制备

乳铁蛋白分布广泛,在动物乳特别是牛初乳和乳清中含量丰富,是目前商用LF的主要来源,可以通过色谱法、超滤法、盐析、酸沉淀等方法制得。LfcinB可由LFB水解制得。美国专利^[28]利用牛LF为原料,经胃蛋白酶在酸性条件下水解后,离心,利用阳离子或疏水性亲和色谱技术分离、洗脱、脱盐、冷冻干燥制得纯度达99%以上的LfcinB,产率较其它方法有很大提高,每1000 mL亲和介质可获得3~5 g LfcinB,是生产药用Lfcin的有前途方法之一,但该方法回收率低,工艺较复杂,成本较高。

多肽化学合成技术日趋完善,利用多肽自动合成仪可以准确合成一定氨基酸顺序的多肽,该技术用于少量合成Lfcin及其多种衍生物,是研究Lfcin活性与结构的关系、明确Lfcin作用机制、调节Lfcin的功能以及开发具有特定功能与性质的Lfcin衍生物的重要方法与手段。但该方法合成的Lfcin价格十分昂贵,仅适用于实验室的小量制备。

利用基因工程生产Lfcin具有广阔的应用前景,Lfcin属于多肽,利用DNA合成仪直接合成编码Lfcin的DNA,构建表达载体,在乳腺反应器或微生物中高效表达Lfcin具可行性。但由于Lfcin抗菌广谱,宿主表达的Lfcin可能会对微生物宿主本身产生反馈性抑制作用,达不到高效表达的理想结果;因此在构建Lfcin表达体系的同时,要考虑筛选对Lfcin具有一定抗性的宿主微生物,这虽然增加了基因工程生产Lfcin的难度,但因生物技术的迅速发展,仍

不失为实现Lfcin产业化的最佳途径之一。

3 Lfcin 作为饲料添加剂的应用前景

近年来抗生素替代品的研究及对饲料安全的关注是畜牧业研究与生产的热点问题,抗菌肽由于自身的优点显示了在饲料中广泛的应用前景。Lfcin不含有稀有氨基酸和外源化学成分,是一种健康安全产品。Lfcin在动物消化道中具有良好稳定性,同时具有免疫原性小、水溶性好、广谱杀菌甚至能够杀真菌、原虫等优点,能耐受胃肠道中蛋白酶及肽酶的降解。Kuwata等^[29,30]研究指出,LF在消化道中经酶解后其活性片段没有受到破坏。Lfcin具有良好的热稳定性,特别是在酸性条件下,加热甚至是高温高压处理对其抗菌活性没有影响^[2],因此Lfcin不仅能够耐受饲料加工过程中高温高压的剧烈条件,并且可以在饲料保存过程中持续发挥其功能,保持饲料品质,延长贮存期限。Lfcin具有广谱抗菌抑菌活性,抑制或杀死发生病变的真核细胞,且对较大的离子强度和较低或较高pH有较强的抗性,并与常规抗生素通过阻断生物大分子合成的作用机制完全不同,病原菌不易对其产生耐药性,由此显示了它独特的研究和应用价值。如利用Lfcin抑菌活性,抑制产品在加工及销售中滋生的有害细菌,延长产品货架期,同时可用于饲料中起到天然防霉防腐剂的作用,抑制致病菌如大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌等,以及引起饲料霉变的多种霉菌。

Lfcin具有多种生物学功能,作为一种免疫增强剂已较广泛地应用于提高机体非特异性免疫功能。由于其价格昂贵、抗菌活性还不够理想及来源问题等不利因素,限制了其在畜牧生产中的应用,因此可以由这些角度入手,着力解决提高Lfcin生产效率,降低生产成本。此外,Lfcin在动物营养中的研究还很少。因此,应加大加快这方面的研究工作,使Lfcin尽快为绿色畜牧业发展发挥其应有的作用。

参考文献

- 1 Hiroaki A, Hitoshi S, Hiroshi M. Heat stability of bovine lactoferrin at acidic pH. *J Dairy Sci*, 1991, 74: 65-71
- 2 Tomita M, Bellamy W, Takase M, et al. Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. *J Dairy Sci*, 1991, 74(12): 4137-4142
- 3 Bellamy W, Takase M, Yamaudhim K, et al. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochem Biophys Acta*, 1992, 11(21): 130-136

- 4 Strom MB, Haug BE, Rekdal Q, *et al.* Important structural features of 15-residue lactoferricin derivatives and methods for improvements of antimicrobial activity. *Biochem*, 2002, 80: 65-74
- 5 Bellamy W, Takase M, Wakabayashi H, *et al.* Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *J Appl Bacteriol*, 1992, 73 (6) : 472-479
- 6 Feng XI (冯兴军), Wang JH (王建华), Yang YL (杨雅麟), *et al.* A review of researches on the mechanism of lactoferricin action. *China Biotechnology* (中国生物工程杂志), 2004, 24 (1) : 23-26
- 7 Wakabayashi H, Uchida K, Yamauchi K, *et al.* Lactoferrin given in food facilitates dermatophytosis cure in guinea pig models. *J Antimicrob Chemother*, 2000, 46 (4) : 595-602
- 8 Wakabayashi H, Matsumoto H, Hashimoto K, *et al.* N-Acylated and D enantiomer derivatives of a nonamer core peptide of lactoferricin B showing improved antimicrobial activity. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 43 (5) : 1267-1269
- 9 Tang CH (唐传核), Cao JS (曹劲松), Peng ZY (彭志英). Recent development of lactoferrin (its active peptides and their physiological function). *China Dairy Industry* (中国乳品工业), 2000, 28 (5) : 44-47
- 10 Xu SY (许时婴), Lu RR (卢蓉蓉). Antibacterial property of lactoferricin. *J Wuxi University Light Industry* (无锡轻工大学学报), 2001, 20 (3) : 330-334
- 11 Turchany JM, Aley SB, Gillin FD. Gardicidal activity of lactoferrin and N-terminal peptides. *Infect Immun*, 1995, 63 (11) : 4550-4552
- 12 Turchany JM, McCaffery JM, Aley SB, *et al.* Ultrastructural effects of lactoferrin binding on *Giardia lamblia* trophozoites. *J Eukaryot, Microbiol*, 1997, 44 (1) : 68-72
- 13 Tanaka T, Omata Y, Saito A, *et al.* *Toxoplasma gondii*: parasiticidal effects of bovine lactoferricin against parasites. *Exp Parasitol*, 1995, 81 (4) : 614-617
- 14 Omata Y, Satake M, Maeda R, *et al.* Reduction of the infectivity of *Toxoplasma gondii* and *Eimeria stiedai* sporozoites by treatment with lactoferricin. *J Vet Med Sci*, 2001, 63 (2) : 187-190
- 15 Berkhout B, van Wamel JL, Beljaars L, *et al.* Characterization of the anti-HIV effects of native lactoferrin and other milk proteins and protein-derived peptides. *Antiviral Res*, 2002, 55 (2) : 341-355
- 16 Havard J, Jeanette HA, Lars Uhlir Hansen, *et al.* Anti-HSV activity of lactoferricin analogues is only partly related to their affinity for heparan sulfate. *Antiviral Res*, 2004, 61 (2) : 101-109
- 17 Di Biase AM, Pietrantoni A, Tinari A, *et al.* Heparin-interacting sites of bovine lactoferrin are involved in anti-adenovirus activity. *J Med Virol*, 2003, 69 (4) : 495-502
- 18 Superti F, Siciliano R, Rega B, *et al.* Involvement of bovine lactoferrin metal saturation, sialic acid and protein fragments in the inhibition of rotavirus infection. *Biochem Biophys Acta*, 2003, 1528 (2-3) : 107-115
- 19 McCann KB, Lee A, Wan J, *et al.* The effect of bovine lactoferrin and lactoferricin B on the ability of feline calicivirus (a norovirus surrogate) and poliovirus to infect cell cultures. *J Appl Microbiol*, 2003, 95 (5) : 1026-1033
- 20 Anderson JH, Jenssen H, Gutteberg TJ. Lactoferrin and lactoferricin inhibit Herpes simplex 1 and 2 infection and exhibit synergy when combined with acyclovir. *Antiviral Res*, 2003, 1796: 1-7
- 21 Yoo YC, Watanabe R, Koike Y, *et al.* Apoptosis in human leukemic cells induced by lactoferricin, a bovine milk protein-derived peptide: involvement of reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 237 (3) : 624-628
- 22 Roy MK, Kuwabara Y, Hara K, *et al.* Peptides from the N-terminal end of bovine lactoferrin induce apoptosis in human leukemic (HL-60) cells. *J Dairy Sci*, 2002, 85 (9) : 2065-2074
- 23 Yoo YC, Watanabe S, Watanabe R, *et al.* Bovine lactoferrin and Lactoferricin inhibit tumor metastasis in mice. *Adv Exp Med Biol*, 1998, 443 : 285-291
- 24 Isamida T, Tanaka T, Omata Y, *et al.* Protective effect of lactoferricin against *Toxoplasma gondii* infection in mice. *J Vet Med Sci*, 1998, 60 (2) : 241-244
- 25 Davidson LA, Lonnerdal B. Specific binding of lactoferrin to brushborder membrane: ontogeny and effect of glycan chain. *Am J Physiol*, 1988, 254 : 580-585
- 26 Shinoda I, Takase M, Fukuwatari Y, *et al.* Effects of lactoferrin and lactoferricin on the release of interleukin 8 from human polymorphonuclear leukocytes. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1996, 60 (3) : 521-523
- 27 Wakabayashi H, Matsumoto H, Hashimoto K, *et al.* Inhibition of iron/ascorbate-induced lipid peroxidation by an N-terminal peptide of bovine lactoferrin and its acylated derivatives. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1999, 63 (5) : 955-957
- 28 Tomita, Mamoru, Shimamura, *et al.* Process for large-scale production of antimicrobial peptide in high purity. United States Patent, 5317084. 1994-5-31
- 29 Kuwata H, Yip TT, Yamauchi K, *et al.* The survival of ingested lactoferrin in the gastrointestinal tract of adult mice. *Biochem J*, 1998, 334 (2) : 321-323
- 30 Kuwata H, Yamauchi K, Teraguchi S, *et al.* Functional fragments of ingested lactoferrin are resistant to proteolytic degradation in the gastrointestinal tract of adult rats. *J Nutr*, 2001, 131 (8) : 2121-2127