

乳铁蛋白的理化性质及其重组表达系统的研究进展

庞晓楠^{1,3}, 弘笑³, 魏璇², 陈喜文⁴, 刘佳², 陈德富^{1,3}

1. 药物化学生物学国家重点实验室(南开大学), 天津 300071;
2. 上海科技大学免疫化学研究所, 上海 201210;
3. 南开大学生命科学学院遗传学和细胞生物学系, 天津 300071;
4. 南开大学生命科学学院生物化学与分子生物学系, 天津 300071

摘要: 乳铁蛋白(Lactoferrin, Lf)是分子量大小约为 80 kDa 的铁离子结合糖蛋白, 是转铁蛋白(Transferrin, Tf)家族的成员之一。其理化性质独特, 具有抑菌、抗病毒、抗癌、免疫调节、调节铁离子的吸收等诸多生物学功能。获得高产且有生物活性的重组乳铁蛋白, 并用于临床治疗, 一直是研究热点。随着基因工程技术的发展, 已获得多个可表达重组乳铁蛋白的表达系统。本文对乳铁蛋白的理化性质、生物学活性、临床研究以及目前的重组表达系统进行综述, 以期对乳铁蛋白的临床应用提供参考。

关键词: 乳铁蛋白; 抑菌; 抗病毒; 免疫调节; 重组表达系统

Research progress in physicochemical characteristics of lactoferrin and its recombinant expression systems

Xiaonan Pang^{1,3}, Xiao Hong³, Xuan Wei², Xiwen Chen⁴, Jia Liu², Defu Chen^{1,3}

1. State Key Laboratory of Medicinal Chemical Biology (Nankai University), Tianjin 300071, China;
2. Shanghai Institute for Advanced Immunochemical Studies, ShanghaiTech University, Shanghai, 201210, China;
3. Department of Genetics and Cell Biology, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China;
4. Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China

Abstract: Lactoferrin is an iron-binding glycoprotein with a molecular weight of about 80 kDa that belongs to the transferrin family. Due to its unique physical and chemical properties, lactoferrin has a variety of biological functions including antibacterial, antiviral, anticancer, immunomodulatory activities and regulation of iron absorption. High-yield production of recombinant lactoferrin with biological activity and its application in clinical treatment have been a hot topic for long time. With the development of genetic engineering techniques, various expression systems have been developed to produce recombinant lactoferrin. In this review, we summarize physicochemical characteristics, biological activities, clinical studies and current recombinant expression systems of lactoferrin, in order to provide references for its clinical application.

收稿日期: 2015-04-09; 修回日期: 2015-07-29

基金项目: 药物化学生物学国家重点实验室开放基金(编号: 201503017)、天津市应用基础与前沿技术重点研究计划重点项目(编号: 112JCZDJC22900)和创新人才培养基金(编号: J1103503)资助

作者简介: 庞晓楠, 博士研究生, 专业方向: 分子遗传学。Tel: 022-23508270; E-mail: fightingnk@163.com

通讯作者: 刘佳, 副研究员, 研究方向: 生物化学。E-mail: liujia@shanghaitech.edu.cn

陈德富, 教授, 博士生导师, 研究方向: 分子遗传学。E-mail: chendefu@nankai.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.15-146

网络出版时间: 2015-8-25 8:50:43

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20150825.0850.002.html>

Keywords: lactoferrin; antibacterial; antiviral; immunomodulatory; recombinant expression system

乳铁蛋白(Lactoferrin, Lf)是一种分子量约为 80 kDa 的铁结合糖蛋白, 普遍存在于哺乳动物的乳汁中^[1], 1960 年从人乳汁中成功分离^[2]。除了乳汁外, 乳铁蛋白也分布于眼泪、胆汁、唾液等外分泌液中^[3, 4]。乳铁蛋白具有促进肠道铁的吸收^[5]、广谱抑菌^[6]、抗病毒^[7, 8]、抗癌^[9]、免疫调节^[10]、抗氧化^[11]、在体外促进小肠上皮细胞增殖^[12]等诸多生物学功能, 同时也可以作为肉类的保鲜剂^[13]及婴儿配方奶粉、酸奶和动物饲料的添加剂^[14]。乳铁蛋白的多种生物学功能决定了其广阔的应用前景, 因此将乳铁蛋白制成适宜剂型的生物药物一直是研究的热点^[15]。本文从乳铁蛋白的分子结构、理化性质、生物学功能、临床研究以及不同表达系统这些方面对乳铁蛋白及其表达系统的研究进展进行了综述。

1 乳铁蛋白概述

1.1 铁转运蛋白家族

哺乳动物体内两种主要的运铁蛋白分别为转铁蛋白和乳铁蛋白, 乳铁蛋白和转铁蛋白(Transferrin, Tf)在结构上有 40% 的同源性^[16, 17], 与血清转铁蛋白、卵转铁蛋白和黑素转铁蛋白归属于非血红素铁转运蛋白家族^[4]。哺乳动物细胞主要通过血清转铁蛋白受体介导的细胞内摄入获得铁离子^[18]。在转运体内存在游离铁离子时, 乳铁蛋白和转铁蛋白具有相互补充的作用。转铁蛋白可以用于维持血液、淋巴液、脑脊髓液中的铁离子平衡, 乳铁蛋白主要存在于眼泪、唾液、胃肠道分泌液、鼻粘膜分泌物、支气管粘液等外分泌液中^[19]。

1.2 乳铁蛋白的分子结构

乳铁蛋白是一条具有 703 个氨基酸残基的多肽链, 该链折叠成两个基本对称且高度同源的叶片状结构(N-叶和 C-叶)^[4]。研究表明这一结构可能是在进化过程中由于基因重叠形成的(图 1)^[20]。N-叶结构包含了氨基酸 1~332, C-叶结构包含了氨基酸 344~703, 两个结构通过铰链区进行连接, 大小均约为 40 kDa。N-叶和 C-叶又可以被对应的分为 N1、N2 区和 C1、C2 区^[21], N 叶与 C 叶相比携带更高的正电荷^[22]。N-叶结构被证实与提高乳铁蛋白的抗菌

活性有关, C-叶结构可以在胃病、糖尿病和角膜损伤的治疗中发挥作用^[21]。乳铁蛋白具有两个金属离子结合位点, 每个位点含有两个酪氨酸、一个天冬氨酸和一个组氨酸^[21], 能够可逆性结合一个 Fe^{3+} 离子和一个 CO_3^{2-} 离子^[16]。由于乳铁蛋白与铁离子的复合物呈红色, 因此也被称为“红蛋白”^[23]。

1.3 乳铁蛋白的理化性质

乳铁蛋白与铁离子的亲和力很高, 是转铁蛋白的 250~300 倍。根据乳铁蛋白结合铁离子个数的差异, 可以将其分为 3 种类型: 缺铁型、铁半饱和型和铁饱和型^[24]。不同类型的乳铁蛋白具有不同的抗巴氏杀菌热变性的能力, 其中铁饱和型抗性最强, 缺铁型抗性最弱^[25]。乳铁蛋白不仅可以结合 Fe^{3+} 离子和 Fe^{2+} 离子, 还可以与 Cu^{2+} 离子、 Mn^{2+} 离子、 Zn^{2+} 离子结合^[26]。

关于乳铁蛋白的热稳定性, 研究发现, 72℃ 保温 20 s 或 135℃ 保温 8 s 的热处理几乎不影响乳铁蛋白的铁结合能力^[27], 但若在两种温度下处理的时间延长则会降低铁结合能力。85℃ 保温 10 min 的热处理强度也不会影响乳铁蛋白的抑菌活性。另外, 有研究表明在 pH2.0 或者 3.0 的条件下, 120℃ 处理 5 min 后, 乳铁蛋白发生降解但是降解产物的抑菌活性比处理前要高^[28]。这一实验结果使人们发现了乳铁蛋白活性多肽的存在。乳铁蛋白对革兰阳性菌和革兰阴性菌都有抑菌效果, 但是对革兰阴性菌的作用比较强。乳铁蛋白的铁饱和度与抑菌性呈负相关。环境 pH 值变化影响乳铁蛋白对革兰阳性菌的抑制

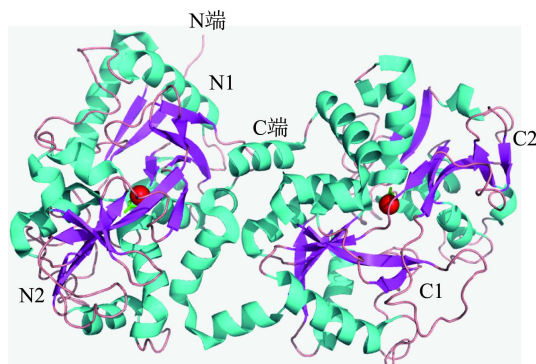


图 1 乳铁蛋白的分子结构

α -螺旋和 β -折叠分别用蓝色和紫色表示, Fe^{3+} 离子用红色球体表示, CO_3^{2-} 离子用蓝色球棍模型表示。

作用,对革兰阴性菌影响不大,当 pH 为 7.5~8.0 时抑菌效果最佳。乳铁蛋白经过 70℃ 以下的巴氏杀菌后抑菌活性没有影响;HCO₃⁻ 浓度增加,有利于增强其抑菌性^[29]。

1.4 乳铁蛋白的糖基化和配基作用

人乳铁蛋白中存在 3 个可以被糖基化的位点,分别是位于 N-叶第 138 位的天冬酰胺酸残基、C-叶第 479 位和 624 位的天冬酰胺酸残基。在这 3 个位点中,位于 138 位和 479 位的天冬酰胺酸残基优先被糖基化,第 624 位的天冬酰胺酸残基的糖基化情况受到第 479 位天冬酰胺糖基化的限制^[30]。

乳铁蛋白可以和多种小分子或生物大分子结合,如 DNA、脂多糖、肝素、氨基葡聚糖以及两性电解质等^[31, 32]。乳铁蛋白能够与特定 DNA 序列高效特异性结合^[33, 34],作为转录因子参与基因的转录调控^[35],正向调节某些细胞因子(如白介素-1)和生长因子(如转化生长因子 TGF-β)的表达^[36]。

2 乳铁蛋白的生物学功能与临床研究

乳铁蛋白作用的靶细胞和特异性的受体是乳铁蛋白发挥多种生物学功能的前提。乳铁蛋白受体分布在小肠、肝脏、单核细胞、淋巴细胞、血小板、纤维原细胞、骨、脑组织中^[37]。不同种类的受体介导乳铁蛋白发挥不同的生物学功能,如肠道内的乳铁蛋白受体主要参与促进肠道内铁离子的吸收,肝脏和单核细胞表面的乳铁蛋白受体参与抗炎免疫调节,淋巴细胞的乳铁蛋白受体有助于淋巴细胞的成熟。

2.1 促进肠道内铁的吸收

乳铁蛋白主要在小肠中运送铁离子,对哺乳动物从小肠中吸收铁离子起到至关重要的作用。Cox 等^[38]将成人小肠组织切片与人乳铁蛋白、血清转铁蛋白和鸡卵转铁蛋白一起孵育,仅有人乳铁蛋白可将铁离子转移至十二指肠黏膜细胞中,由此首次发现人肠道中存在乳铁蛋白受体。当携带铁离子的乳铁蛋白到达肠道后,即与细胞表面的受体特异性结合,通过内吞作用进入细胞内并释放 Fe³⁺ 离子^[37]。机体对铁吸收的调节机制是负反馈调节,当细胞内缺乏铁时,细胞表面的乳铁蛋白受体增多,以增加乳铁蛋白与受体结合的概率。

2.2 抑菌

乳铁蛋白最早被发现并广泛研究的生物学功能是它的抑菌能力。乳铁蛋白具有广谱的抗革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和真菌的能力,可以有效抑制大肠杆菌、伤寒沙门杆菌、链球菌、嗜肺军团菌、金黄色葡萄球菌的生长^[39, 40]。临床上给予患者乳铁蛋白口服治疗后,减少了胃肠道细菌的感染,但不影响乳酸杆菌和双歧杆菌的生长^[41, 42]。Drago-Serrano 等^[43]对感染鼠伤寒沙门氏菌的大鼠喂饲不同剂量牛乳铁蛋白,发现牛乳铁蛋白可减少大鼠体内鼠伤寒沙门氏菌的数量,并且增强其外周血中 IgG、IgM 及小肠中 IgA 的生成。

通常认为,乳铁蛋白是通过螯合铁离子,竞争性地剥夺细菌生长所需要的铁元素,从而抑制细菌的生长^[42]。还有研究表明,乳铁蛋白能与脂质 A 结合,促使脂质 A 从革兰氏阴性菌的细胞壁上剥离出来,最终导致细菌死亡^[40, 44]。乳铁蛋白的 N-末端有一段编码乳铁素(Lactoferricin, LFcin)的序列^[45],而乳铁素是一种具有天然抗菌活性的抗菌肽。Bellamy 等^[46]在对牛乳铁蛋白的蛋白酶水解物的抗菌性进行研究后发现,水解得到的多肽具有强于完整乳铁蛋白 20~400 倍的抗菌活性。

2.3 抗病毒

乳铁蛋白可以帮助机体抵御多种病毒的感染^[47]。由轮状病毒、肠道病毒和腺病毒引起的肠道感染都可以用乳铁蛋白进行治疗,在感染发生初期,乳铁蛋白可以抑制腺病毒的复制^[48],阻止病毒吸附于靶细胞上从而防止感染;而且在病毒进入靶细胞后,仍然有抗病毒效果,但具体机理目前尚不清楚。在研究引起感染性腹泻的诺如病毒时发现,乳铁蛋白可以减轻细胞毒素的损伤、降低病毒细胞的数量、阻止病毒与细胞的粘附、抑制病毒的复制并增加抗病毒细胞因子的表达,从而杀灭诺如病毒^[49]。乳铁蛋白可以抑制 HIV-1 逆转录酶和剪接酶的活性^[50],阻止 HIV 病毒感染细胞。除此之外,乳铁蛋白还可以抵御 HSV-1^[50, 51]、HCMV^[52]、HCV^[53]等病毒对机体的入侵。也有观点认为,乳铁蛋白并无直接的抗病毒效果,而是间接地通过调节免疫系统的抗病毒反应以达到抗病毒的目的。

2.4 抗癌

近年来,乳铁蛋白的抗癌作用已经被广泛报道。给啮齿类动物口服牛乳铁蛋白,可以抑制由化学方法诱导的肿瘤的形成^[17]。临床试验证实乳铁蛋白可以抑制肿瘤的发生和发展^[54],口服重组人乳铁蛋白可以抑制扁平鳞状上皮癌细胞的生长^[55]。Mckeown 等^[56]研究发现乳铁蛋白对口腔鳞癌的治疗作用存在剂量依赖现象,其对口腔鳞癌细胞增殖的抑制作用随着乳铁蛋白的浓度增大和作用时间的延长而增强。牛乳铁蛋白可以通过诱导口腔癌细胞的凋亡来抑制肿瘤细胞的生长^[57]。将肿瘤小鼠用重组人乳铁蛋白处理,与对照组相比抑制肿瘤生长的比例达 60%,并且使一些抗癌细胞因子如 IL-18 的水平增高,激活 NK 细胞和某些淋巴细胞的活性^[58]。

2.5 抗炎和免疫调节

由于乳铁蛋白在机体的外分泌液中广泛分布,因此可以作为机体的第一道天然免疫屏障参与免疫调节。乳铁蛋白是重要的炎症反应调控因子之一^[59],是参与调节免疫系统的重要成分,能够保护机体抵抗微生物的感染,降低由大肠杆菌、传染性腹泻病毒等致病菌引起的肠道感染和消化不良等疾病的发生率,改善刚断奶小猪的生长状况^[60]。对免疫系统未发育完善的新生儿而言,富含乳铁蛋白的初乳可以帮助其激活并调节免疫系统的功能,同时促进自身免疫系统的迅速建立^[61]。口服牛乳铁蛋白增加淋巴结和脾脏中细胞的数量,提高腹腔巨嗜细胞和脾脏 NK 细胞的活性,增强 Th1 型 T 细胞 IL-12 和 IFN- γ 等细胞因子的产生^[62]。乳铁蛋白通过阻断细胞凋亡的信号通路,抑制免疫细胞的程序性细胞死亡^[61];还可以通过与抗原呈递细胞的交互作用^[61],调节 T 淋巴细胞的成熟和分化^[63]、Th1/Th2 细胞因子的平衡^[64]。

2.6 其他临床研究

乳铁蛋白已经作为婴儿配方奶粉、保健品、化妆品、饮品和牙膏的添加剂进入人们的日常生活^[4],与治疗作用相关的生物学功能也已经通过临床实验进行了研究与探索。Mizuhashi 等^[65]以 25 例正常个体和 28 例口腔干燥综合征患者作为研究对象,比较两组之间口腔分泌乳铁蛋白和嗜铬粒蛋白 A 的速度,以及这两种蛋白在分泌物总蛋白中所占的比例;结果发现病患组分泌乳铁蛋白和嗜铬粒蛋白 A 的速度

及两种蛋白所占总蛋白的比例均低于正常对照组。因此,他们推测口腔干燥综合征的发生可能与具有抗菌活性的蛋白分泌减少相关。Manzoni 等^[66]在有新生儿坏死性小肠结肠炎患病倾向的 743 名婴儿的诊疗中发现,施以牛乳铁蛋白的治疗组患病几率低于对照组。Turin 等^[67]在对一些临床实验结果综述后,初步认为乳铁蛋白可以降低新生儿感染的风险。Kozu 等^[68]对 104 名参与者进行随机双盲对照实验,发现每天口服 3 g 牛乳铁蛋白可以有效抑制腺瘤性息肉的生长。

3 乳铁蛋白的表达系统

分子生物学及基因工程技术的发展为外源基因的重组表达提供了有力的技术支持。目前,已发展出多种乳铁蛋白的表达系统,如细菌、真菌、植物、动物细胞系和哺乳动物表达系统(表 1)。

3.1 细菌

3.1.1 大肠杆菌

大肠杆菌(*Escherichia coli*)表达系统是基因工程中使用最为广泛的表达系统。由于大肠杆菌的遗传背景比较清楚,比较容易控制基因的表达,而且培养过程简单、生长速度较快、转化效率较高,可以以低成本进行目的蛋白的大规模表达,因此往往作为首选的蛋白质表达系统^[92, 93]。但是如果需要表达真核基因编码的蛋白产物,则要求翻译后进行正确的折叠或者糖基化。由于大肠杆菌的折叠机制与真核细胞存在差异,那么大肠杆菌表达系统在一定程度上存在缺陷。

在大肠杆菌中表达的乳铁蛋白已经报道的有小鼠的乳铁蛋白和牛的乳铁蛋白。从泌乳期小鼠的乳腺细胞中提取总 RNA,反转录后将小鼠乳铁蛋白 cDNA 克隆到 pET28a(+)载体上,转化到 BL21(DE3)中进行乳铁蛋白和乳铁蛋白 N 端的表达,经过镍柱纯化后得到表达量为 17 mg/L、纯度为 92.1% 的重组乳铁蛋白和表达量为 20 mg/L、纯度为 98.5% 的乳铁蛋白 N 端^[22]。在进行抗菌性实验中发现,当乳铁蛋白 N 端浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$ 时对于金黄色葡萄球菌具有 48.6% 的抗菌能力,但是浓度为 12.5 $\mu\text{mol/L}$ 的重组乳铁蛋白未检测到抗菌活性。将牛乳铁蛋白 cDNA 克隆到 pET32a(+)载体上,在大肠杆菌

表 1 乳铁蛋白不同表达系统的比较

表达系统		载体/启动子	产量	文献
细菌	大肠杆菌(<i>Escherichia coli</i>)	pET28a(+)	17 mg/L	[22]
		pET32a(+)	15.3 mg/L	[69]
	乳酸杆菌(<i>Lactobacillus</i>)	pPG612.1	9.6~12.5 mg/L	[70]
	干酪乳杆菌(<i>Lactobacillus casei</i>)	rhLF/pSD	10.6 mg/L	[71]
真菌	酿酒酵母(<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	pCGY1444	1.5~2 mg/L	[72]
	毕赤酵母(<i>Pichia pastoris</i>)	pPIC9K	1200 mg/L	[73]
		pPIC9K	40 mg/L	[74]
		pPIC9K	12 mg/L	[75]
		pPICZaA-LF	60 mg/L	[76]
	米曲霉(<i>Aspergillus oryzae</i>)	pAhLFG	25 mg/L	[77]
	构巢曲霉(<i>Aspergillus nidulans</i>)	pAL3hLFT	5 mg/L	[78]
	泡盛曲霉(<i>Aspergillus awamori</i>)	pPLF-19	2000 mg/L	[79]
转基因植物	烟草(<i>Nicotiana tabacum</i> L.)	pAM 1400	植物总蛋白的 0.6%~2.5%	[80]
		pBIOC-PSSp-Lf	叶片总重的 0.1%~0.3%	[81]
	土豆(<i>Solanum tuberosum</i>)	pPCV701hLF ;PCV702EhLF	可溶蛋白的 0.01%~0.1%	[82]
	甘薯(<i>Ipomoea batatas</i> Lam)	pLSM1	植物总蛋白的 0.32%	[83]
	水稻(<i>Oryza sativa</i>)	pAPI164	种子干重的 0.5%	[84]
动物细胞系	BHK	pNUT	20 mg/L	[85]
	CHO	pTT5	>200 mg/L	[11]
转基因动物	小鼠(<i>Mus musculus</i>)	pKUN2	0.1~36 mg/L	[86]
		bovine α S1-casein	13000 mg/L	[87]
		BAC	290~8020 mg/L	[88]
	牛(<i>Bos taurus</i>)	bovine α S1-casein	3000 mg/L	[89]
	猪(<i>Sus scrofa</i>)	pBAC-hLF-hLZ-Neo hLF BAC	6500 mg/L	[90]
	羊(<i>Capra hircus</i>)	pBC-hLF	30000 mg/L	[91]

中表达得到的目的蛋白产量为 15.3 mg/L，纯度为 90.3% 抗菌活性为 79.6% 略低于牛乳铁蛋白肽 86.9% 的抗菌活性^[69]。

3.1.2 乳酸杆菌

乳铁蛋白不会抑制对铁离子需求量较低的乳酸菌(*Lactobacillus*)的生长，反而可以促进肠道内双歧杆菌和乳酸杆菌的生长。因此用乳酸杆菌作为乳铁蛋白表达宿主具有一定的优越性。于慧等^[70]将经过密码子优化的猪乳铁蛋白成熟肽编码序列克隆到乳杆菌表达载体上，获得的重组质粒被分别转化入 4 种不同的乳杆菌中；最后均得到分子量为 73 kDa 并具有抑菌活性的表达产物。Chen 等^[71]将反转录得到的人乳铁蛋白肽基因与干酪乳杆菌质粒重组，在干酪乳杆菌中表达，得到了具有明显抑菌活性的干酪

乳杆菌株。

3.2 真菌

3.2.1 酵母

酵母细胞既有原核生物繁殖快、易于培养、培养成本不高和实验过程简单等特点，又具有强有力的启动子，还可以对外源蛋白进行加工折叠和翻译后修饰，具备典型真核生物表达体系的特点^[94]。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和甲醇酵母已经成为高效表达外源蛋白的宿主系统被普遍应用。甲醇酵母包括毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、念珠酵母(*Candida bodinii*)和汉逊酵母(*H. polymorpha*)。Liang 等^[72]于 1993 年首次使用酿酒酵母作为重组人乳铁蛋白的表达宿主，得到了有生物活性并可以和铁离

子、铜离子结合的重组产物,表达量为 1.5~2 mg/L。

Jiang 等^[73]在毕赤酵母中成功地获得了重组人乳铁蛋白,表达量高达 1.2 g/L。Paramasivam 等^[74]使用 pPIC9K 载体首次在毕赤酵母中成功表达马乳铁蛋白,表达量为 40 mg/L。Wang 等^[75]优化了猪乳铁蛋白毕赤酵母表达条件,将重组猪乳铁蛋白产量提高至 12 mg/L。Li 等^[76]从西藏羊乳腺组织中获得了乳铁蛋白基因,并在毕赤酵母中进行表达,重组蛋白产量超过 60 mg/L。

3.2.2 曲霉

丝状真菌具有良好的生长特性和分泌大量胞外蛋白的能力,能够将蛋白质前体进行正确加工修饰如糖基化、形成二硫键等。其中,米曲霉(*Aspergillus oryzae*)作为重要的重组蛋白生产宿主,其安全性得到了美国食品药品监督管理局(FDA)和世界卫生组织(WHO)的认可^[95]。最早用米曲霉作为重组人乳铁蛋白表达系统的是 Ward 课题组^[77],其获得的乳铁蛋白表达量为 25 mg/L,且产生的重组蛋白与自然提取的乳铁蛋白有相同的分子大小、免疫反应性和铁离子结合能力。同年,该课题组又在构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)中表达了重组人乳铁蛋白,其产量为 5 mg/L,并有大约 30%分泌到培养基中^[78]。进一步优化表达条件,Ward 等^[79]建立了重组人乳铁蛋白表达量达 2 g/L 的泡盛曲霉(*Aspergillus awamori*)表达系统。

3.3 转基因植物

相对于微生物反应器而言,植物生物反应器有其自身优势。植物细胞中蛋白合成是采用真核生物蛋白质合成途径,表达产物能够正确折叠装配并进行糖基化修饰。而且若重组蛋白在植物可食用部分进行表达,则简化了目的蛋白的后续加工处理过程。另外,还可以通过控制转基因植株的耕种面积控制蛋白的产量和规模。选择合适的植物表达系统进行乳铁蛋白的表达不仅可以为医疗或者工业生产提供所需蛋白,还可以通过增强植物的抗病能力以达到农作物产量提高的目的^[96]。目前,利用植物表达系统生产外源蛋白仍面临着目标蛋白表达量低的问题。

3.3.1 烟草

烟草(*Nicotiana tabacum* L.)是世界上第一例转

基因植物。建立烟草的遗传转化和再生系统并不困难,且一棵植株可以产生数量可观的种子,有利于大规模生产。所以烟草已经用于表达抗体、疫苗等多种蛋白产物。但是由于烟叶中含有大量的生物碱毒素,提取方法复杂且费用高昂,因此烟草在生产药用蛋白方面有一定的局限性。

1994 年,有研究报道在烟草细胞株中表达了分子量为 43 kDa 的乳铁蛋白,且从愈伤组织中分离得到的乳铁蛋白抗菌性优于商品化的乳铁蛋白^[80]。Zhang 等^[97]将含有人乳铁蛋白的 cDNA 通过农杆菌介导方法转入烟草,使乳铁蛋白在烟草中表达。用青枯雷尔氏菌感染这些转基因烟草植株,大部分植株表现该细菌性萎蔫病症的时间都推迟了 3 周,且植株中的蛋白水平与植株对病菌的抗性呈现明显正相关。Salmon 等^[81]成功地获得了表达全长 80 kDa 乳铁蛋白的转基因烟草,在不同植株中的乳铁蛋白表达量约占叶片总蛋白的 0.1%~0.3%,且该重组乳铁蛋白具有与天然乳铁蛋白相同的受体结合能力。

3.3.2 土豆和甘薯

土豆(*Solanum tuberosum*)的生长周期短,表达量高,可以特异性的使目的蛋白在块茎中表达,有利于产物的贮存和运输。Chong 等^[82]构建了受生长素诱导的甘露碱合成酶 P2 启动子和花椰菜花叶病毒 35S 串联启动子调控的重组乳铁蛋白基因表达载体,并通过农杆菌侵染土豆叶片外植体,得到了转基因植株,其重组乳铁蛋白的表达量占其全部可溶蛋白总量的 0.01%~0.1%。这是首次在可食用植物中表达了具有生物活性的乳铁蛋白。

Min 等^[83]在甘薯(*Ipomoea batatas* Lam)顶端分生组织的愈伤组织中转染含有乳铁蛋白的 cDNA,在表达量最高的细胞株中检测到占其总蛋白量 0.32% 的乳铁蛋白。他们认为选择植物的细胞表达目的蛋白比选择完整植株更省时、更高效。

3.3.3 水稻

作为一种简单易得、过敏性低并研究较为广泛的重要粮食作物,水稻(*Oryza sativa*)也被作为重组蛋白表达系统,比如表达大豆铁蛋白^[98]、球蛋白^[98]、人血清白蛋白^[99]和乳铁蛋白^[84]。Nandi 等^[84]将全基因合成的人乳铁蛋白序列和水稻谷蛋白 1 启动子连

接, 转染到水稻细胞中, 产生的目的蛋白的量占水稻米粒干重的 0.5%, 并与天然乳铁蛋白具有相同的 N 末端序列、等电点、铁离子结合能力、抗菌活性和抗蛋白酶水解的能力。Suzuki 等^[100]对水稻表达的重组人乳铁蛋白对铁离子的结合和解离能力、抗菌能力、粘附和 Caco-2 细胞摄取能力进行了深入研究, 并比较了在高温、低 pH 值和体外消化条件下重组产物和天然人乳铁蛋白的稳定性差异, 发现二者具有相同的生物学特征及活性。

3.4 动物细胞系

用哺乳动物细胞表达系统表达目的蛋白, 可以获得与天然蛋白在结构和功能上都高度一致的表达产物, 目前使用比较广泛的是幼仓鼠肾 (Baby-hamster kidney, BHK) 和中国仓鼠卵巢 (Chinese hamster ovary, CHO) 细胞。

Stowell 等^[85]将融合了乳铁蛋白基因的 pNUT 载体转化入 BHK 细胞并进行了诱导表达, 表达量为 20 mg/L。Kruzel 等^[11]在 CHO 细胞中诱导表达的乳铁蛋白产量在 200 mg/L 以上, 而且其与天然乳铁蛋白具有一致的分子结构和氧化应激反应。但是由于细胞培养在技术和经济层面要求比较高, 且容易污染或携带人类病原体, 利用哺乳动物细胞建立大规模表达体系受到限制。

3.5 转基因哺乳动物

随着转基因技术的迅猛发展, 转基因动物早已成为表达重组蛋白的生物反应器并被广泛应用于实验研究和工业生产。世界上首例转基因哺乳动物是携带生长激素融合基因的小鼠^[101]。对于转基因哺乳动物而言, 一般首选乳腺作为外源基因的表达场所, 因为乳腺是一个外分泌器官, 其分泌的乳汁不进入体循环, 不会影响宿主本身的生理代谢反应。

3.5.1 鼠

小鼠 (*Mus musculus*) 是第一种成功表达重组乳铁蛋白的转基因动物^[86], 将乳铁蛋白的基因序列与牛 α S1 酪蛋白的调控元件融合, 在乳汁中得到了产量为 0.1~36 mg/L 的重组乳铁蛋白, 且具有与天然乳铁蛋白相同的分子量和免疫活性。Nuijens 等^[87]报道了人乳铁蛋白在转基因小鼠中的表达情况。他们用乳腺特异的表达载体, 使转基因小鼠只在泌乳期分

泌人乳铁蛋白, 分泌量达 13 g/L。在对与各种配基的结合能力、N-末端序列的测定以及 pH 依赖的铁离子释放曲线的测定后, 重组人乳铁蛋白具有与天然人乳铁蛋白一致或相似的性质。Liu 等^[88]构建了人乳铁蛋白转基因小鼠, 在小鼠乳汁中得到了分子大小为 80 kDa 的乳铁蛋白, 含量达 0.29~8.02 g/L。

3.5.2 牛

为了高效获取目的蛋白, 牛 (*Bos taurus*) 乳腺生物反应器凭借其不影响自身生理代谢、产量高、易获取、易提纯的优势, 成为较理想的目的蛋白表达系统。最早成功获得人乳铁蛋白转基因牛的是荷兰科学家, van Berkel 等^[89]用酪蛋白启动子构建转基因载体, 使人乳铁蛋白在转基因公牛和正常母牛杂交获得的子代母牛中得到很好的表达。研究重组乳铁蛋白的特性后发现, 它具有与天然乳铁蛋白相同的铁离子结合、解离能力及相同的抗菌能力。为了检测细胞毒性, Appel 等^[102]用牛乳中分离的重组乳铁蛋白连续口服饲喂 Wistar 大鼠 13 周, 未观察到毒性反应。给 7 日龄的小猪饲喂含有重组人乳铁蛋白的牛乳, 可以调节肠内微生物菌群^[103]。

3.5.3 其他

Cui 等^[90]获得了转基因猪 (*Sus scrofa*), 利用猪乳腺反应器得到的乳铁蛋白产量为 6.5 g/L。Yu 等^[91]将 3.3 kb 的人乳铁蛋白基因与 β -酪蛋白调控元件融合构建转基因山羊 (*Capra hircus*), 得到的目的蛋白在整个哺乳期内稳定表达, 产量为 30 g/L, 且具有与天然乳铁蛋白相似的分子质量、N-末端序列、等电点、免疫反应等生物学特征, 而且蛋白纯化后具有抗肿瘤活性。

4 展 望

作为一种多功能蛋白, 乳铁蛋白具有多种生物学功能和较好的稳定性, 一直是研究的热点。综合国内外研究结果, 使用转基因表达系统获得高产量的乳铁蛋白是切实可行的, 乳铁蛋白表达系统在不断丰富, 表达量也在逐渐提高。但是人们目前对乳铁蛋白的研究和开发依然不够完善, 深入探寻高效、安全、可大量生产的乳铁蛋白表达系统仍将是未来一个重要的研究方向。

乳铁蛋白的功能研究以及临床研究也是近年来的研究热点之一。乳铁蛋白可以作为婴儿配方奶粉、保健品、化妆品等的添加剂,同时也被用于脓毒症、腹泻、HIV 感染、晚期肾细胞癌、非小细胞肺癌、新生儿抗感染等疾病的治疗,但仅局限于临床实验阶段,尚未开发成可以在市场上销售的药物。因此,乳铁蛋白的转化应用依然是亟待并值得人们投入大量精力和时间来研究的问题。随着基因工程技术的发展和人们对乳铁蛋白的持续关注,我们相信在不久的将来乳铁蛋白将会作为营养品以及治疗药物进入人们的日常生活,有效地改善人们的健康状况并提升人们的生活品质。

参考文献

- [1] Vorland LH. Lactoferrin: a multifunctional glycoprotein. *APMIS*, 1999, 107(7–12): 971–981. [DOI]
- [2] Johanson B. Isolation of an iron-containing red protein from human milk. *Acta Chem Scandinav*, 1960, 14(2): 510–512. [DOI]
- [3] Lönnerdal B, Iyer S. Lactoferrin: molecular structure and biological function. *Annu Rev Nutr*, 1995, 15(1): 93–110. [DOI]
- [4] García-Montoya IA, Cendón TS, Arévalo-Gallegos S, Rascón-Cruz Q. Lactoferrin a multiple bioactive protein: an overview. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1820(3): 226–236. [DOI]
- [5] Chen K, Zhang L, Li H, Zhang Y, Xie H, Shang J, Tian WZ, Yang P, Chai LY, Mao M. Iron metabolism in infants: influence of bovine lactoferrin from iron-fortified formula. *Nutrition*, 2015, 31(2): 304–309. [DOI]
- [6] Valenti P, Berlutti F, Conte MP, Longhi C, Seganti L. Lactoferrin functions: current status and perspectives. *J Clin Gastroenterol*, 2004, 38(Suppl. 6): S127–S129. [DOI]
- [7] Wakabayashi H, Oda H, Yamauchi K, Abe F. Lactoferrin for prevention of common viral infections. *J Infect Chemother*, 2014, 20(11): 666–671. [DOI]
- [8] van der Strate BW, Beljaars L, Molema G, Harmsen MC, Meijer DK. Antiviral activities of lactoferrin. *Antiviral Res*, 2001, 52(3): 225–239. [DOI]
- [9] Zhang YL, Lima CF, Rodrigues LR. *In vitro* evaluation of bovine lactoferrin potential as an anticancer agent. *Int Dairy J*, 2015, 40: 6–15. [DOI]
- [10] de la Rosa G, Yang D, Tewary P, Varadhachary A, Oppenheim JJ. Lactoferrin acts as an alarmin to promote the recruitment and activation of APCs and antigen-specific immune responses. *J Immunol*, 2008, 180(10): 6868–6876. [DOI]
- [11] Kruzel ML, Actor JK, Zimecki M, Wise J, Ploszaj P, Mirza S, Kruzel M, Hwang SA, Ba X, Boldogh I. Novel recombinant human lactoferrin: differential activation of oxidative stress related gene expression. *J Biotechnol*, 2013, 168(4): 666–675. [DOI]
- [12] Blais A, Fan CB, Voisin T, Aattouri N, Dubarry M, Blachier F, Tomé D. Effects of lactoferrin on intestinal epithelial cell growth and differentiation: an *in vivo* and *in vitro* study. *Biometals*, 2014, 27(5): 857–874. [DOI]
- [13] Umuhumuza LC, Niu WM, Sun XL. Effect of bovine lactoferrin and casein peptide powder on microbial growth and glucose utilization by microorganisms in pork meat during storage at 4°C. *Pakistan J Nutrit*, 2011, 10(3): 208–213. [DOI]
- [14] Tamura Y. Production and application of bovine lactoferrin. *Bull-Int Dairy Federat*, 2004, (389): 64–68. [DOI]
- [15] Balcão VM, Costa CI, Matos CM, Moutinho CG, Amorim M, Pintado ME, Gomes AP, Vila MM, Teixeira JA. Nanoencapsulation of bovine lactoferrin for food and pharmaceutical applications. *Food Hydrocolloids*, 2013, 32(2): 425–431. [DOI]
- [16] Metz-Boutigue MH, Jollès J, Mazurier J, Schoentgen F, Legrand D, Spik G, Montreuil J, Jollès P. Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. *Eur J Biochem*, 1984, 145(3): 659–676. [DOI]
- [17] Bezaul J, Bhimani R, Wiprovnick J, Furmanski P. Human lactoferrin inhibits growth of solid tumors and development of experimental metastases in mice. *Cancer Res*, 1994, 54(9): 2310–2312. [DOI]
- [18] Byrne SL, Krishnamurthy D, Wessling-Resnick M. Pharmacology of iron transport. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2013, 53: 17–36. [DOI]
- [19] Weinberg ED. Human lactoferrin: a novel therapeutic with broad spectrum potential. *J Pharm Pharmacol*, 2001, 53(10): 1303–1310. [DOI]
- [20] Lambert LA, Perri H, Halbrooks PJ, Mason AB. Evolution of the transferrin family: conservation of residues associated with iron and anion binding. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2005, 142(2): 129–141. [DOI]
- [21] Sharma S, Sinha M, Kaushik S, Kaur P, Singh TP. C-lobe of lactoferrin: the whole story of the half-molecule. *Biochem Res Int*, 2013, 2013: Article ID 271641. [DOI]
- [22] Wang JR, Tian ZG, Teng D, Yang YL, Hu JC, Wang JH.

- Cloning, expression and characterization of Kunming mice lactoferrin and its N-lobe. *Biometals*, 2010, 23(3): 523–530. [DOI]
- [23] Johansson B. Chromatographic separation of lactalbumin from human milk whey on calcium phosphate columns. *Nature*, 1958, 181(4614): 996–997. [DOI]
- [24] Nagasako Y, Saito H, Tamura Y, Shimamura S, Tomita M. Iron-binding properties of bovine lactoferrin in iron-rich solution. *J Dairy Sci*, 1993, 76(7): 1876–1881. [DOI]
- [25] Dionysius DA, Grieve PA, Milne JM. Forms of lactoferrin: their antibacterial effect on enterotoxigenic *chia coli*. *J Dairy Sci*, 1993, 76(9): 2597–2600. [DOI]
- [26] Baker HM, Anderson BF, Baker EN. Dealing with iron: common structural principles in proteins that transport iron and heme. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(7): 3579–3583. [DOI]
- [27] Mata L, Sánchez L, Headon DR, Calvo M. Thermal denaturation of human lactoferrin and its effect on the ability to bind iron. *J Agric Food Chem*, 1998, 46(10): 3964–3970. [DOI]
- [28] Bellamy W, Takase M, Wakabayashi H, Kawase K, Tomita M. Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a tent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *J Appl Bacteriol*, 1992, 73(6): 472–479. [DOI]
- [29] 邢芳芳, 印遇龙, 黄瑞林, 孔祥峰, 李铁军, 唐志如, 张友明. 重组牛乳铁蛋白素在大肠杆菌中的表达. *食品科学*, 2008, 29(4): 221–224. [DOI]
- [30] van Berkel PH, van Veen HA, Geerts ME, De Boer HA, Nuijens JH. Heterogeneity in utilization of N-glycosylation sites Asn624 and Asn138 in human lactoferrin: a study with glycosylation-site mutants. *Biochem J*, 1996, 319(Pt1): 117–122. [DOI]
- [31] Moore SA, Anderson BF, Groom CR, Haridas M, Baker EN. Three-dimensional structure of diferric bovine lactoferrin at 2.8 Å resolution. *J Mol Biol*, 1997, 274(2): 222–236. [DOI]
- [32] Adlerova L, Bartoskova A, Faldyna M. Lactoferrin: a review. *Vet Med*, 2008, 53(9): 457–468. [DOI]
- [33] Fleet JC. A new role for lactoferrin: DNA binding and transcription activation. *Nutr Rev*, 1995, 53(8): 226–227. [DOI]
- [34] He JL, Furmanski P. Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA. *Nature*, 1995, 373(6516): 721–724. [DOI]
- [35] Liao YL, Jiang RL, Lönnerdal B. Biochemical and molecular impacts of lactoferrin on small intestinal growth and development during early life. *Biochem Cell Biol*, 2012, 90(3): 476–484. [DOI]
- [36] Lönnerdal B. Infant formula and infant nutrition: bioactive proteins of human milk and implications for composition of infant formulas. *Am J Clin Nutr*, 2014, 99(3): 712S–717S. [DOI]
- [37] Suzuki YA, Lopez V, Lönnerdal B. Mammalian lactoferrin receptors: structure and function. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62(22): 2560–2575. [DOI]
- [38] Cox TM, Mazurier J, Spik G, Montreuil J, Peters TJ. Iron binding proteins and influx of iron across the duodenal brush border: Evidence for specific lactotransferrin receptors in the human intestine. *Biochim Biophys Acta*, 1979, 588(1): 120–128. [DOI]
- [39] Masson PL, Heremans JF, Prignot JJ, Wauters G. Immunohistochemical localization and bacteriostatic properties of an iron-binding protein from bronchial mucus. *Thorax*, 1966, 21(6): 538–544. [DOI]
- [40] Majerle A, Kidric J, Jerala R. Enhancement of antibacterial and lipopolysaccharide binding activities of a human lactoferrin peptide fragment by the addition of acyl chain. *J Antimicrob Chemother*, 2003, 51(5): 1159–1165. [DOI]
- [41] Teraguchi S, Wakabayashi H, Kuwata H, Yamauchi K, Tamura Y. Protection against infections by oral lactoferrin: evaluation in animal models. *Biometals*, 2004, 17(3): 231–234. [DOI]
- [42] Sherman MP, Bennett SH, Hwang FF, Yu C. Neonatal small bowel epithelia: enhancing anti-bacterial defense with lactoferrin and lactobacillus GG. *Biometals*, 2004, 17(3): 285–289. [DOI]
- [43] Drago-Serrano ME, Rivera-Aguilar V, Reséndiz-Albor AA, Campos-Rodríguez R. Lactoferrin increases both resistance to *Salmonella typhimurium* infection and the production of antibodies in mice. *Immunol Lett*, 2010, 134(1): 35–46. [DOI]
- [44] Orsi N. The antimicrobial activity of lactoferrin: current status and perspectives. *Biometals*, 2004, 17(3): 189–196. [DOI]
- [45] Arias M, McDonald LJ, Haney EF, Nazmi K, Bolscher JGM, Vogel HJ. Bovine and human lactoferricin peptides: chimeras and new cyclic analogs. *Biometals*, 2014, 27(5): 935–948. [DOI]
- [46] Bellamy W, Takase M, Yamauchi K, Wakabayashi H, Kawase K, Tomita M. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochim Biophys Acta*, 1992,

- 1121(1–2): 130–136. [DOI]
- [47] Seganti L, Di Biase AM, Marchetti M, Pietrantonì A, Tinari A, Superti F. Antiviral activity of lactoferrin towards naked viruses. *Biometals*, 2004, 17(3): 295–299. [DOI]
- [48] Arnold D, Di Biase AM, Marchetti M, Pietrantonì A, Valenti P, Seganti L, Superti F. Antiadenovirus activity of milk proteins: lactoferrin prevents viral infection. *Antiviral Res*, 2002, 53(2): 153–158. [DOI]
- [49] Ishikawa H, Awano N, Fukui T, Sasaki H, Kyuwa S. The protective effects of lactoferrin against murine norovirus infection through inhibition of both viral attachment and replication. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 434(4): 791–796. [DOI]
- [50] Wong JH, Liu ZK, Law KW, Liu F, Xia LX, Wan DCC, Ng TB. A study of effects of peptide fragments of bovine and human lactoferrins on activities of three key HIV-1 enzymes. *Peptides*, 2014, 62: 183–188. [DOI]
- [51] Fujihara T, Hayashi K. Lactoferrin inhibits herpes simplex virus type-1 (HSV-1) infection to mouse cornea. *Arch Virol*, 1995, 140(8): 1469–1472. [DOI]
- [52] Hasegawa K, Motosuchi W, Tanaka S, Dosako S. Inhibition with lactoferrin of *in vitro* infection with human herpes virus. *Jpn J Med Sci Biol*, 1994, 47(2): 73–85. [DOI]
- [53] Picard-Jean F, Bouchard S, Larivée G, Bisailon M. The intracellular inhibition of HCV replication represents a novel mechanism of action by the innate immune Lactoferrin protein. *Antiviral Res*, 2014, 111: 13–22. [DOI]
- [54] Hayes TG, Falchook GF, Varadhachary GR, Smith DP, Davis LD, Dhingra HM, Hayes BP, Varadhachary A. Phase I trial of oral talactoferrin in refractory solid tumors. *Invest New Drugs*, 2006, 24(3): 233–240. [DOI]
- [55] Varadhachary A, Wolf JS, Petrak K, O'Malley BW, Spadaro M, Curcio C, Forni G, Pericle F. Oral lactoferrin inhibits growth of established tumors and potentiates conventional chemotherapy. *Int J Cancer*, 2004, 111(3): 398–403. [DOI]
- [56] McKeown ST, Lundy FT, Nelson J, Lockhart D, Irwin CR, Cowan CG, Marley JJ. The cytotoxic effects of human neutrophil peptide-1 (HNP1) and lactoferrin on oral squamous cell carcinoma (OSCC) *in vitro*. *Oral Oncol*, 2006, 42(7): 685–690. [DOI]
- [57] Sakai T, Banno Y, Kato Y, Nozawa Y, Kawaguchi M. Pepsin-digested bovine lactoferrin induces apoptotic cell death with JNK/SAPK activation in oral cancer cells. *J Pharmacol Sci*, 2005, 98(1): 41–48. [DOI]
- [58] González-Chávez SA, Arévalo-Gallegos S, Rascón-Cruz Q. Lactoferrin: structure, function and applications. *Int J Antimicrob Agents*, 2009, 33(4): 301.e1–8. [DOI]
- [59] Zhou YH, Zeng ZY, Zhang WL, Xiong W, Wu MH, Tan YX, Yi W, Xiao L, Li XL, Huang C, Cao L, Tang K, Li XY, Shen SR, Li GY. Lactotransferrin: a candidate tumor suppressor-deficient expression in human nasopharyngeal carcinoma and inhibition of NPC cell proliferation by modulating the mitogen-activated protein kinase pathway. *Int J Cancer*, 2008, 123(9): 2065–2072. [DOI]
- [60] Wang YZ, Shan TZ, Xu ZR, Feng J, Wang ZQ. Effects of the lactoferrin (LF) on the growth performance, intestinal microflora and morphology of weanling pigs. *Anim Feed Sci Technol*, 2007, 135(3–4): 263–272. [DOI]
- [61] Siqueiros-Cendón T, Arévalo-Gallegos S, Iglesias-Figueroa BF, García-Montoya IA, Salazar-Martínez J, Rascón-Cruz Q. Immunomodulatory effects of lactoferrin. *Acta Pharmacol Sin*, 2014, 35(5): 557–566. [DOI]
- [62] Tomita M, Wakabayashi H, Shin K, Yamauchi K, Yaeshima T, Iwatsuki K. Twenty-five years of research on bovine lactoferrin applications. *Biochimie*, 2009, 91(1): 52–57. [DOI]
- [63] Sfeir RM, Dubarry M, Boyaka PN, Rautureau M, Tomé D. The mode of oral bovine lactoferrin administration influences mucosal and systemic immune responses in mice. *J Nutr*, 2004, 134(2): 403–409. [DOI]
- [64] Fischer R, Debbabi H, Dubarry M, Boyaka P, Tomé D. Regulation of physiological and pathological Th1 and Th2 responses by lactoferrin. *Biochem Cell Biol*, 2006, 84(3): 303–311. [DOI]
- [65] Mizuhashi F, Koide K, Toya S, Takahashi M, Mizuhashi R, Shimomura H. Levels of the antimicrobial proteins lactoferrin and chromogranin in the saliva of individuals with oral dryness. *J Prosthet Dent*, 2015, 113(1): 35–38. [DOI]
- [66] Manzoni P, Meyer MP, Stolfi I, Rinaldi M, Cattani S, Pagni L, Romeo MG, Messner H, Decembrino L, Laforgia N, Vagnarelli F, Memo L, Bordignon L, Maule M, Gallo E, Mostert M, Quercia M, Bollani L, Pedicino R, Renzullo L, Betta P, Ferrari F, Alexander T, Magaldi R, Farina D, Mosca F, Stronati M. Bovine lactoferrin supplementation for prevention of necrotizing enterocolitis in very-low-birth-weight neonates: a randomized clinical trial. *Early Hum Dev*, 2014, 90(S1): S60–S65. [DOI]
- [67] Turin CG, Zea-Vera A, Pezo A, Cruz K, Zegarra J, Bellomo S, Cam L, Llanos R, Castañeda A, Tucto L, Ochoa TJ. Lactoferrin for prevention of neonatal sepsis.

- Biomaterials*, 2014, 27(5): 1007–1016. [DOI]
- [68] Kozu T, Iinuma G, Ohashi Y, Saito Y, Akasu T, Saito D, Alexander DB, Iigo M, Kakizoe T, Tsuda H. Effect of orally administered bovine lactoferrin on the growth of adenomatous colorectal polyps in a randomized, placebo-controlled clinical trial. *Cancer Prev Res*, 2009, 2(11): 975–983. [DOI]
- [69] García-Montoya I, Salazar-Martínez J, Arévalo-Gallegos S, Sinagawa-García S, Rascón-Cruz Q. Expression and characterization of recombinant bovine lactoferrin in *E. coli*. *BioMetals*, 2013, 26(1): 113–122. [DOI]
- [70] 于慧, 姜艳平, 崔文, 武啸, 何佳, 乔薪媛, 李一经, 唐丽杰. 猪乳铁蛋白在4种重组乳杆菌中的表达及抑菌活性比较. *生物工程学报*, 2014, 30(9): 1372–1380. [DOI]
- [71] Chen HL, Lai YW, Chen CS, Chu TW, Lin W, Yen CC, Lin MF, Tu MY, Chen CM. Probiotic *Lactobacillus casei* expressing human lactoferrin elevates antibacterial activity in the gastrointestinal tract. *BioMetals*, 2010, 23(3): 543–554. [DOI]
- [72] Liang QW, Richardson T. Expression and characterization of human lactoferrin in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Agri Food Chem*, 1993, 41(10): 1800–1807. [DOI]
- [73] Jiang TM, Chen LJ, Jia SQ, Chen LS, Ma Y. High-level expression and production of human lactoferrin in *Pichia pastoris*. *Dairy Sci Technol*, 2008, 88(2): 173–181. [DOI]
- [74] Paramasivam M, Saravanan K, Uma K, Sharma S, Singh TP, Srinivasan A. Expression, purification, and characterization of equine lactoferrin in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, 2002, 26(1): 28–34. [DOI]
- [75] Wang SH, Yang TS, Lin SM, Tsai MS, Wu SC, Mao SJ. Expression, characterization, and purification of recombinant porcine lactoferrin in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, 2002, 25(1): 41–49. [DOI]
- [76] Li JB, Zhu WZ, Luo MR, Ren HH, Tang L, Liao HH, Wang Y. Molecular cloning, expression and purification of lactoferrin from Tibetan sheep mammary gland using a yeast expression system. *Protein Expr Purif*, 2015, 109: 35–39. [DOI]
- [77] Ward PP, Lo JY, Duke M, May GS, Headon DR, Conneely OM. Production of biologically active recombinant human lactoferrin in *Aspergillus oryzae*. *Nat Biotechnol*, 1992, 10(7): 784–789. [DOI]
- [78] Ward PP, May GS, Headon DR, Conneely OM. An inducible expression system for the production of human lactoferrin in *Aspergillus nidulans*. *Gene*, 1992, 122(1): 219–223. [DOI]
- [79] Ward PP, Piddington CS, Cunningham GA, Zhou XD, Wyatt RD, Conneely OM. A system for production of commercial quantities of human lactoferrin: a broad spectrum natural antibiotic. *Nat Biotechnol*, 1995, 13(5): 498–503. [DOI]
- [80] Mitra A, Zhang Z. Expression of a human rin cDNA in tobacco cells produces antibacterial protein(s). *Plant Physiol*, 1994, 106(3): 977–981. [DOI]
- [81] Salmon V, Legrand D, Slomianny MC, El Yazidi I, Spik G, Gruber V, Bournat P, Olagnier B, Mison D, Theisen M, Mérot B. Production of human lactoferrin in transgenic tobacco plants. *Protein Expr Purif*, 1998, 13(1): 127–135. [DOI]
- [82] Chong DKX, Langridge WHR. Expression of full-length bioactive antimicrobial human lactoferrin in potato plants. *Transgenic Res*, 2000, 9(1): 71–78. [DOI]
- [83] Min SR, Woo JW, Jeong WJ, Han SK, Lee YB, Liu JR. Production of human lactoferrin in transgenic cell suspension cultures of sweet potato. *Biol Plant*, 2006, 50(1): 131–134. [DOI]
- [84] Nandi S, Suzuki YA, Huang JM, Yalda D, Pham P, Wu LY, Bartley G, Huang N, Lönnnerdal B. Expression of human lactoferrin in transgenic rice grains for the application in infant formula. *Plant Sci*, 2002, 163(4): 713–722. [DOI]
- [85] Stowell KM, Rado TA, Funk WD, Tweedie JW. Expression of cloned human lactoferrin in baby-hamster kidney cells. *Biochem J*, 1991, 276 (Pt2): 349–355. [DOI]
- [86] Platenburg GJ, Kootwijk EPA, Kooiman PM, Woloshuk SL, Nuijens JH, Krimpenfort PJA, Pieper FR, de Boer HA, Strijker R. Expression of human lactoferrin in milk of transgenic mice. *Transgenic Res*, 1994, 3(2): 99–108. [DOI]
- [87] Nuijens JH, van Berkel PHC, Geerts MEJ, Hartevelt PP, de Boer HA, van Veen HA, Pieper FR. Characterization of recombinant human lactoferrin secreted in milk of transgenic mice. *J Biol Chem*, 1997, 272(13): 8802–8807. [DOI]
- [88] Liu ZL, Zhao CJ, Fan BL, Dai YP, Zhao ZH, Wang LL, Zheng M, Feng JD, Chen YZ, Duan YL, Li N. Variable expression of human lactoferrin gene in mice milk driven by its 90 kb upstream flanking sequences. *Anim Biotechnol*, 2004, 15(1): 21–31. [DOI]
- [89] van Berkel PHC, Welling MM, Geerts M, van Veen HA, Ravensbergen B, Salaheddine M, Pauwels EKJ, Pieper F, Nuijens JH, Nibbering PH. Large scale production of recombinant human lactoferrin in the milk of

- ic cows. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(5): 484–487. [DOI]
- [90] Cui D, Li J, Zhang LL, Liu S, Wen X, Li QY, Zhao YF, Hu XX, Zhang R, Li N. Generation of bi-transgenic pigs overexpressing human lactoferrin and lysozyme in milk. *Transgenic Res*, 2015, 24(2): 365–373. [DOI]
- [91] Yu HQ, Chen JQ, Sun W, Liu SG, Zhang AM, Xu XJ, Wang XB, He ZZ, Liu GH, Cheng GX. The dominant expression of functional human lactoferrin in ic cloned goats using a hybrid lactoferrin expression construct. *J Biotechnol*, 2012, 161(3): 198–205. [DOI]
- [92] Nuc P, Nuc K. Recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Postepy Biochem*, 2005, 52(4): 448–456. [DOI]
- [93] Dong XB, Tang B, Li J, Xu Q, Fang ST, Hua ZC. Expression and purification of intact and functional soybean (*Glycine max*) seed ferritin complex in *Escherichia coli*. *J Microbiol Biotechnol*, 2008, 18(2): 299–307. [DOI]
- [94] Yurimoto H. Molecular basis of methanol-inducible gene expression and its application in the methylophilic yeast *Candida boidinii*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2009, 73(4): 793–800. [DOI]
- [95] Machida M, Yamada O, Gomi K. Genomics of *Aspergillus oryzae*: learning from the history of Koji mold and exploration of its future. *DNA Res*, 2008, 15(4): 173–183. [DOI]
- [96] Stefanova G, Vlahova M, Atanassov A. Production of recombinant human lactoferrin from transgenic plants. *Biol Plant*, 2008, 52(3): 423–428. [DOI]
- [97] Zhang Z, Coyne DP, Vidaver AK, Mitra A. Expression of human lactoferrin cDNA confers resistance to *Ralstonia solanacearum* in transgenic tobacco plants. *Phytopathology*, 1998, 88(7): 730–734. [DOI]
- [98] Humphrey BD, Huang N, Klasing KC. Rice expressing lactoferrin and lysozyme has antibiotic-like properties when fed to chicks. *J Nutr*, 2002, 132(6): 1214–1218. [DOI]
- [99] He Y, Ning TT, Xie TT, Qiu QC, Zhang LP, Sun YF, Jiang DM, Fu K, Yin F, Zhang WJ, Shen L, Wang H, Li JJ, Lin QS, Sun YX, Li HZ, Zhu YG, Yang DC. Large-scale production of functional human serum albumin from transgenic rice seeds. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(47): 19078–19083. [DOI]
- [100] Suzuki YA, Kelleher SL, Yalda D, Wu LY, Huang JM, Huang N, Lönnnerdal B. Expression, characterization, and biologic activity of recombinant human lactoferrin in rice. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2003, 36(2): 190–199. [DOI]
- [101] Palmiter RD, Brinster RL, Hammer RE, Trumbauer ME, Rosenfeld MG, Birnberg NC, Evans RM. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature*, 1982, 300(5893): 611–615. [DOI]
- [102] Appel MJ, van Veen HA, Vietsch H, Salaheddine M, Nuijens JH, Ziere B, de Loos F. Sub-chronic (13-week) oral toxicity study in rats with recombinant human lactoferrin produced in the milk of transgenic cows. *Food Chem Toxicol*, 2006, 44(7): 964–973. [DOI]
- [103] Hu WP, Zhao J, Wang JW, Yu T, Wang J, Li N. Transgenic milk containing recombinant human lactoferrin modulates the intestinal flora in piglets. *Biochem Cell Biol*, 2012, 90(3): 485–496. [DOI]

(责任编辑: 张飞雄)