

乳铁蛋白体外和体内铁结合能力的研究

卢蓉蓉¹, 孙震¹, 许时婴²

(1. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214036)

2. 食品科学与安全教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘要: 采用超滤—离子交换色谱法制备的乳铁蛋白的铁结合能力为 87.7%, 铁饱和度为 15.1%。当 pH 值为 7.5, NaHCO_3 浓度为 100 mmol/L 时, 铁结合能力最强。采用低强度的巴氏杀菌可以保持乳铁蛋白的铁结合性能。SD 大鼠的动物试验表明, 50 $\mu\text{g/g} \cdot \text{d}$ 和 250 $\mu\text{g/g} \cdot \text{d}$ 的乳铁蛋白剂量具有显著的升高血红蛋白浓度的作用。乳铁蛋白改善缺铁性贫血的最小有效作用剂量为 50 $\mu\text{g/g} \cdot \text{d}$ 。

关键词: 乳铁蛋白; 铁结合能力

Iron-Binding Capacity of Lactoferrin *in vitro* and *in vivo*

LU Rong-rong¹, SUN Zhen¹, XU Shi-ying²

(1. School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

2. Key Laboratory of Food Science and Safety; Ministry of Education, Wuxi 214036, China)

Abstract: The iron-binding capacity of lactoferrin was 87.7% produced by ultrafiltration and strong cation exchange chromatography. Its iron saturation point was 15.1%. Lactoferrin exhibited the strongest iron binding capacity at pH 7.5 and 100 mmol/L of bicarbonate. *In vivo* study with SD rats showed that LF could significantly increase the concentration of hemoglobin at doses 50 $\mu\text{g/g} \cdot \text{d}$ and 250 $\mu\text{g/g} \cdot \text{d}$. The low marginal dose level of LF was 50 $\mu\text{g/g} \cdot \text{d}$.

Key words lactoferrin; iron-binding capacity

中图分类号: 0623.736

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)05-0113-06

铁是人体需要量最大, 而又最容易发生代谢障碍的微量元素。缺铁性贫血 (Iron Deficiency Anemia, 简称 IDA) 是一种最常见的贫血性疾病, 是世界各国普遍关注的问题。铁剂是治疗铁缺乏症的特效药物。

一般认为高铁盐在肠道中的水解物几乎不被吸收, 而亚铁盐则以低分子状态存在, 较易吸收。普通口服铁剂由于铁离子对粘膜的刺激, 胃肠道副作用较大^[1]。70 年代, 国外出现了多糖铁的制剂。由于是有机化合物, 以分子形式吸收, 而无解离的铁离子所致的胃肠道刺激性, 国内也有临床报道^[2]。近几年来不断出现的“右旋糖酐铁片”、“贫血康”等不同剂型的铁剂, 是目前临床效果比较好的补铁剂^[3]。

乳铁蛋白 (Lactoferrin, 以下简称 LF) 是存在于外分泌液中的一种铁结合性糖蛋白。虽然人们已经认识了 LF 的很多生物活性功能, 但关于 LF 的铁结合功能仍存在一些争议。争议一方认为, 亚铁盐 (如硫酸亚铁) 比其它含铁物质更容易被吸收, 而 LF 结合的是高价铁离子,

离解系数很小, 因此不容易被机体吸收; 另一方认为当机体缺铁时, 在哺乳动物 (如人体和类猿猴等动物体) 的肠粘膜细胞表面能形成特殊的 LF 接受体^[4~6], 它能使吸收率提高 5~7 倍。天然的 LF 铁饱和度很低, 具有高度的铁亲和性。即使 LF 结合的是高价铁离子, 它仍是一种理想的铁载体, 能增强铁的生物利用率, 对铁通过十二指肠粘膜的传输具有重要作用, 可防止和治疗缺铁性贫血^[7]。两种观点的差异可能是由于实验条件例如铁剂量、铁的饱和度、LF 的来源、实验动物的种类以及饲料成分等导致的^[8]。

由于天然低饱和度的 LF 能够强烈地螯合环境中的铁而成为 Fe-LF 复合体, 如果在动物体中确实存在特异性的 LF 接受体, LF 就有可能比亚铁离子更容易被吸收。本文首先在体外研究了环境因素对铁结合能力的影响, 并通过体内试验分析机体对 Fe-LF 的吸收效果, 评价 LF 改善贫血的功能和确定其最小有效作用剂量。

收稿日期: 2005-02-28

作者简介: 卢蓉蓉 (1970-), 女, 副教授, 博士, 主要从事乳品科学与技术的研究。



1 材料与方法

1.1 材料

健康、雄性、初断乳、SD(Sprague Dawley)大鼠, 体重50~60g, 合格证号SCXK(苏)2002-0016, 南京江浦动物实验中心提供。

LF: 牛初乳经冷冻离心机脱脂, 分离去除酪蛋白; 微滤后采用分步超滤^[9]。采用pH7.7, 10mmol/L的磷酸缓冲液为起始缓冲液, 采用强阳离子交换色谱, NaCl 分步洗脱, 收集红色的洗脱组分, 冷冻干燥后即成为LF产品。

右旋糖酐铁: 仙竹牌, 江西华太药业有限公司生产, 医药准字XF19990316。

常规饲料: 铁含量200mg/kg(原子吸收法), 其中的铁为硫酸亚铁, 南京安立默科技有限公司动物饲料厂提供。

低铁饲料: 自制, 配方见表1^[10]。铁含量5mg/kg。

表1 低铁饲料配方
Table 1 Formula of iron-deficient diets

成分	含量(%)	成分	含量(%)
葡萄糖	49.38	氯化钾	0.50
酪蛋白	20.00	碘盐	0.50
玉米粉	15.00	混合微量元素 ^a	0.27
明胶	5.00	氯化胆碱	0.15
玉米油	5.00	混合维生素 ^b	0.10
磷酸二氢钠	2.00	蛋氨酸	0.10
碳酸钙	2.00		

注: a. 混合微量元素(/100g): $MgSO_4 \cdot H_2O$ 73.816g; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 19.657g; $MnSO_4 \cdot H_2O$ 5.733g; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.7315g; KIO_3 0.0625g。

b. 混合维生素(/100g): 维生素A(50万IU/g)1.00g; 维生素D₃(20万IU/g)0.75g; α -醋酸生育酚(含25%VE的明胶)12.50g; 维生素K 0.04g; 盐酸硫胺素0.30g; 核黄素0.30g; 维生素B₆ 0.30g; 泛酸钙0.60g; 尼克酸3.00g; 叶酸0.10g; 维生素B₁₂ 2.00g; 蔗糖 79.11g。

1.2 主要设备

Sepectr AA 220原子吸收分析仪 美国Varian 公司;
HITACHI 7170A 全自动生物化学分析仪 日本日立公司。

1.3 方法

1.3.1 铁结合能力的测定

参考Chen的方法, 并进行了适当的改进^[11]。

将纯化后的LF溶于pH7.5, 5mmol/L的Tris-HCl缓冲液(含0.15mol/L NaCl)中, 配制成2%(W/W)的LF溶液。取0.9ml此溶液, 与0.1ml新鲜配制的0.1mol/L的NaHCO₃溶液混合, 并与1.0ml的0.6mmol/L的Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O的(含0.01mol/L的HCl)溶液混合。在25℃下反应10min, 于465nm处测定吸光值A。

因为1%(W/W)铁饱和的LF(Fe-LF)的A₄₆₅为0.57^[12], 则有:

$$\text{铁结合能力} = \frac{A}{0.57} \times 100\%$$

1.3.2 铁饱和度的测定^[12]

理论上, 1个LF分子可以结合2个Fe³⁺^[13]。自制LF的相对分子质量为80400。100%饱和度的LF中铁的含量为1.40μg/mg LF(55.85 × 2/80000)。用原子吸收分光光度法测定待测样品中铁的含量C_{Fe}(μg/mg 样品)。铁饱和度根据下式计算:

$$\text{铁饱和度} = \frac{C_{Fe}}{1.40} \times 100\%$$

1.3.3 铁完全饱和LF(Fe-LF)的制备^[12]

配制2%(W/W)自制LF溶液, 取0.9ml该溶液, 加至0.1ml现配的0.1mol/L NaHCO₃溶液中, 加入1.0ml的0.6mmol/L的(NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O溶液, 反应1h, 离心去除沉淀, 经去离子水透析48h, 冷冻干燥备用。原子吸收法测定, Fe-LF中Fe含量为1.42μg/mg。

1.3.4 LF改善缺铁性贫血功能性评价实验设计

1.3.4.1 实验动物的剂量分组

分为以下六组:

- 高剂量组(250μg LF/(g·d));
- 中剂量组(50μg LF/(g·d));
- 低剂量组(10μg LF/(g·d));
- 阳性对照组(250μg右旋糖酐铁/(g·d));
- 低铁饲料喂养组(贫血模型对照组);
- 常规饲料喂养组(阴性对照组)。

A、B、C为三个LF受试物剂量组, 每组剂量相差5倍。阳性对照组D组采用目前临床应用效果优于硫酸亚铁, 尤其是胃肠道反应比硫酸亚铁小很多的右旋糖酐铁^{[7][24]}, 剂量与A组相同。E组始终进食低铁饲料, F组始终进食常规饲料。

1.3.4.2 建立缺铁性贫血大鼠模型^[10]

选用健康雄性初断乳SD大鼠, 在实验环境(恒温25℃)下适应3~5d后喂饲低铁饲料及去离子水, 自由进食, 采用不锈钢笼及塑料饮水罐, 试验过程中避免铁污染。自第3周开始每周选取部分大鼠, 尾静脉采血测定血红蛋白(Hb)浓度, 直至多数动物Hb浓度低于90g/L。采取眼眶静脉丛采血法, 肝素抗凝, 测定全部大鼠的血液学指标及体重。

1.3.4.3 恢复试验

选取Hb浓度低于90g/L的大鼠作为试验动物, 根据贫血大鼠Hb浓度水平和体重将其随机分为A~E 6个组, 每组10只。LF剂量组和阳性对照组均继续喂饲低铁饲料, 同时各组每天早晨经口灌胃分别给予不同剂量



的LF和右旋糖酐铁,中途每间隔1周采尾血监测Hb浓度。E组和F组喂服去离子水。4周后,全部大鼠眼眶动脉采血,肝素抗凝,测定各项血液学指标。

1.3.4.4 结果判定^[10]

测定血红蛋白、红细胞压积、血清铁、血清运铁蛋白饱和度、红细胞内游离原卟啉等血液学指标。用方差分析进行数据统计。

受试物组与模型对照组比较,血红蛋白浓度升高具有显著性差异($p < 0.05$),且前后升高幅度达到10g/L以上,判定该受试物有升高血红蛋白作用,试验结果为阳性。若受试物组血红蛋白升高接近正常水平,则说明该受试物具有较强的升高血红蛋白的作用。

三项指标阳性(其中一项必须为血红蛋白,且其升高幅度达到10g/L以上),即可判定该受试物具有改善缺铁性贫血的作用。

1.3.5 血液指标的测定方法^[10]

2 结果与讨论

2.1 自制LF样品的铁结合能力与铁饱和度

理论上,1个LF分子可以结合2个 Fe^{3+} 。因此1g完全缺铁(铁饱和度=0)的LF可结合1.4mg Fe^{3+} ,即0.025mmol Fe^{3+} 。因此2%浓度的LF溶液加入等体积0.6mmol/L的 $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (等体积混合后,LF和 Fe^{3+} 的浓度都减半), Fe^{3+} 稍有过量,可以使LF完全饱和。

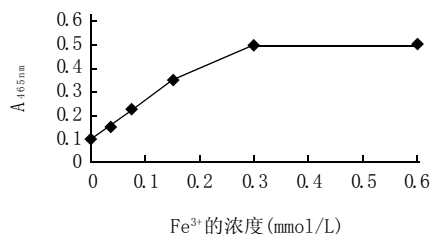


图1 铁结合能力的测定

Fig.1 Determination of iron binding capacity

图1显示,随着 Fe^{3+} 浓度的增加,LF的 A_{465} 值线性增加,LF逐渐被饱和。当 Fe^{3+} 增加到0.3mmol/L以后, A_{465} 保持0.5左右不变,计算可得自制LF样品的铁结合能力为87.7%(0.5/0.57)。

从图1可知,未加 Fe^{3+} 时, $A_{465}=0.09$ 。此时表现出的铁结合能力应该来自于自制的LF天然结合的铁离子,可以认为它反映了天然LF的铁饱和度。计算可得自制LF的饱和度为15.8%。原子吸收法测定样品的铁含量为211.4 $\mu\text{g/g}$,计算可得铁饱和度为15.1%。比较两种方法的测定结果(表2),两者基本相同。

2.2 影响铁结合能力的环境因素

表2 两种方法测定的铁饱和度

Table 2 Determination of iron saturation by two methods

测定方法	铁饱和度(%)
分光光度法	15.8
原子吸收法	15.1

2.2.1 pH对铁结合能力的影响

将样品溶解在pH5.5~8.5的50mmol/L的 Na_2HPO_4 -柠檬酸或甘氨酸-NaOH缓冲液中。图2显示在中性和偏碱性的条件下,LF的铁结合能力比较高。当pH为7.5时,铁结合能力最强。当pH低于6.5时,铁结合能力显著下降。

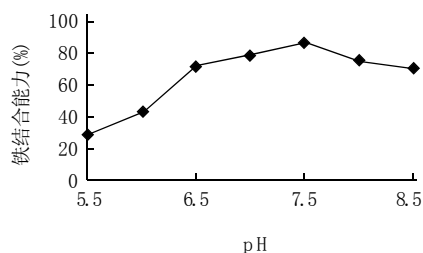


图2 不同pH对铁结合能力的影响

Fig.2 Effect of pH value on iron binding capacity

LF的铁结合位点位于N-叶和C-叶的内部缝隙处。铁离子与4个氨基酸残基相连,两叶的铁配位体是相同的。这4个氨基酸为1个天冬氨酸(Asp),1个组氨酸(His),两个酪氨酸(Tyr)^[13]。由于Asp是酸性氨基酸,当环境pH偏碱性时,Asp带有大量的负电荷,Tyr在碱性条件下也可离解出一个酚羟基。高的净电荷引起分子间强烈静电斥力导致蛋白质分子结构的充分展开,促使LF环状结构的打开,暴露出铁结合位点,有利于LF结合带正电荷的 Fe^{3+} 。因此,中性和偏碱性的环境pH有助于LF铁结合能力的提高。

来自血清的运铁蛋白(或称转铁蛋白,Transferrin,简称Tf)与LF的晶体结构、铁结合位点都很相似。图2显示,在pH5.5时,LF的铁结合能力为28.3%。在相同的条件下,Tf却几乎丧失了铁结合能力。在生理pH下,LF与铁生成复合物的生成常数是Tf的260倍,而从LF-Fe复合物中去除铁的速度比Tf-Fe慢100倍^[14,15]。可以认为,这种强结合力使金属离子和蛋白质之间生成的复合物构象特别稳定。

2.2.2 NaHCO_3 浓度对铁结合能力的影响

图3表明, NaHCO_3 浓度的增加有利于铁结合能力的增强。但当其浓度超过100mmol/L以后,这种作用就不明显了。

在LF结构中, HCO_3^- 会和一些碱性氨基酸残基(如Arg121、Lys210)连接在一起,起到一种增效阴离子的

作用,使蛋白质组分与 Fe^{3+} 的结合更加紧密。LF从环境中摄取铁的机制的第一步可能是蛋白质铁结合位点周围的氨基酸残基与 HCO_3^- 相互作用,第二步是在增效阴离子 HCO_3^- 的作用下,环境 Fe^{3+} 被吸引到铁结合位点上。因此当LF的空穴部位已经被 HCO_3^- 饱和以后,就不能体现增效作用了。100mmol/L为 HCO_3^- 的最有效浓度。

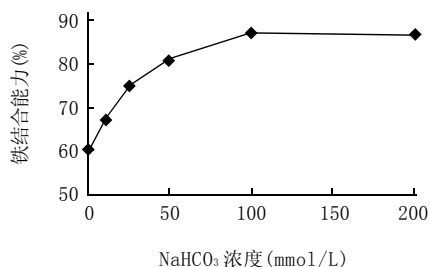


图3 NaHCO_3 浓度对铁结合能力的影响

Fig.3 Effect of NaHCO_3 concentration on iron binding capacity

2.2.3 热处理对铁结合能力的影响

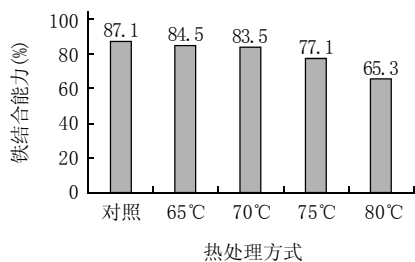


图4 热处理方式对铁结合能力的影响

Fig.4 Effect of heat treatment on iron binding capacity

在乳制品加工中,常用的热处理方式有三种:低温长时杀菌(LTLT),杀菌强度为62~65℃/30min;高温短时杀菌(HTST),杀菌强度70~80℃/15~20s;超高温瞬时杀菌(UHT),杀菌强度125~138℃/2~5s。

将配制的2% LF溶液,置于65℃、70℃下分别保温30min,75、80℃下毛细管保温20s,快速冷却至25℃,测定铁结合能力。图4反映了在70℃以下的温度加热,

LF的铁结合能力略有下降,但下降幅度不大(3%以内)。而70℃以上的热处理对LF的铁结合能力有比较大的影响。因此采用75℃以下的低强度的杀菌强度有助于保持LF的铁结合性能。

2.3 改善缺铁性贫血的功能性评价

2.3.1 实验性缺铁性贫血模型的建立

低铁饲料喂饲25d后,经尾血检测低铁组动物的Hb浓度普遍低于90g/L,即符合贫血模型要求后,测定正常组和低铁的体重和相关的血液学指标,用t检验法统计并分析数据,结果见表4。

分析表4中的数据。将低铁组和正常组进行随机分组时,两组的体重没有差别。但经过25d的初期喂养后,低铁组的体重明显低于正常组体重。这充分体现了铁在幼龄鼠营养和机体生长中的作用。

血红蛋白(Hb)浓度是判断贫血与否的一个简单、直观、首选的指标。初期喂养后,Hb浓度下降到81.9g/L,处于中度贫血状态,符合贫血模型Hb浓度低于90g/L的设计要求^[10]。

经过低铁饲料的喂养后,模型组的血清铁含量低于10.74μmol/L、血清运铁蛋白饱和度低于15%,均下降到贫血的诊断标准。红细胞压积等血液学指标都显著低于对照组($p < 0.05$)。这说明动物体内的储存铁已经处于比较严重的匮乏状态。至此,贫血模型的建立已经完成。

2.3.2 血红蛋白浓度的动态分析

根据Hb浓度的变化可以大致判断机体内铁恢复的情况。图5显示了不同的试验组在恢复试验过程中Hb浓度的变化趋势。阴性对照组的Hb浓度在130.5~134.3g/L之间波动,处在正常值的范围内。模型对照组由于缺乏铁的补充,Hb浓度继续下降,4周后几乎接近重度贫血状态。

三个LF受试物组对Hb浓度的改善的程度也不相同。低剂量组在1周内没有改善作用,甚至不能抑制Hb浓度继续下降的趋势。2周后使Hb浓度略有回升,4周内回升幅度始终很有限。在试验周期内,低剂量LF

表4 低铁组和正常组大鼠的比较
Table 4 Comparison of iron-deficient rats with control group

	正常组	低铁组	显著性 ^b	正常值	贫血标准
初始体重(g)	67.60±5.21	65.40±4.87	—		
模型体重	153±9	136±14	+		
红细胞($\times 10^{12}/\text{L}$)	9.1±0.6	5.6±0.7	+	7.2~9.6	
红细胞压积(HCT)	0.42±0.05	0.26±0.04	+	0.39~0.53	
Hb(g/L)	131.7±12.4	81.9±8.7	+	120~175	< 90
血清铁(μmol/L)	16.74±1.34	8.74±1.07	+	9~29	<10.74
血清总铁结合量(μmol/L)	50.42±4.85	64.98±5.93	+	45~72	>64.44
血清运铁蛋白饱和度(%) ^a	33.20	13.45		20~55	< 15

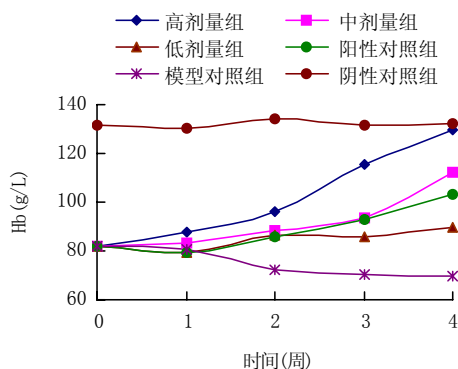
注: a. 以平均值计算; b. 在 $\alpha=0.05$ 水平上比较。

“—”表示没有显著性差异;“+”表示有显著性差异。



表5 贫血恢复试验血液学指标
Table 5 Haematological indexes for IDA cure

组别	高剂量组	中剂量组	低剂量组	阳性对照组	模型对照组	阴性对照组
红细胞($\times 10^{12}/L$)	9.0 ± 0.9	7.9 ± 0.5	6.3 ± 0.4	6.2 ± 0.6	5.5 ± 0.8	9.2 ± 0.6
红细胞压积	0.43 ± 0.06	0.38 ± 0.08	0.24 ± 0.10	0.24 ± 0.05	0.21 ± 0.09	0.41 ± 0.06
Hb(g/L)	129.5 ± 8.4	112.3 ± 9.2	89.4 ± 5.3	103.2 ± 7.6	69.8 ± 7.1	132.5 ± 1.8
血清铁($\mu\text{mol/L}$)	17.92 ± 1.90	12.45 ± 1.32	7.33 ± 1.28	13.80 ± 1.50	7.15 ± 0.75	16.23 ± 0.82
血清总铁结合量($\mu\text{mol/L}$)	51.20 ± 5.84	54.56 ± 6.67	65.16 ± 7.91	61.26 ± 6.44	75.63 ± 6.92	51.47 ± 4.96
血清运铁蛋白饱和度(%)	35.00	22.82	13.87	22.53	9.45	31.53

图5 恢复试验中血红蛋白的变化
Fig.5 Changes of hemoglobin in recovery test

不能使实验动物脱离中度贫血状态。中剂量在1周内就使Hb浓度有所上升,3周后脱离中度贫血,4周后Hb浓度达到112.3g/L,基本恢复正常。高剂量组2周后改善为轻度贫血,3周后基本恢复正常,4周后完全恢复正常值,达到阴性对照组的Hb浓度水平。

阳性对照组在前2周内对Hb浓度的影响和低剂量组相似,后2周的趋势和中剂量组类似,但比中剂量略差。阳性对照组和高剂量LF的剂量相同。可见,在相同剂量下,右旋糖酐铁的起效比较慢,而且效果逊于LF。

根据评价方法^[10],受试物组与模型对照组相比,Hb浓度升高幅度达到10g/L以上,判定该受试物有升高血红蛋白作用。若受试物组Hb浓度升高接近正常水平,则说明该受试物具有较强的升高Hb浓度的作用。因此,中、高剂量LF都具有较强的升高Hb浓度的作用。阳性对照物具有升高Hb浓度的作用。低剂量LF不能达到改善贫血的作用。

2.3.3 贫血恢复试验血液学指标

经Hb浓度动态分析,判断有受试组起到改善贫血的作用后,处死实验动物,测定各组的相关血液学指标,结果见表5。

在 $\alpha=0.05$ 水平上分析不同剂量组(A~D)和贫血模型对照组(E)之间血液学指标的显著性(表6)。高、中剂量组的5项指标为阳性,说明这两个剂量是显著有效的。低剂量组与贫血模型对照组相比仅有2项为阳性,说明

表6 各试验组与模型组之间的显著性分析

Table 6 Significant analysis between test groups and iron-deficient group

组别	高剂量组	中剂量组	低剂量组	阳性对照组
红细胞($\times 10^{12}/L$)	+	+	—	—
红细胞压积	+	+	—	—
Hb(g/L)	+	+	+	+
血清铁($\mu\text{mol/L}$)	+	+	—	+
血清总铁结合量($\mu\text{mol/L}$)	+	+	+	+

注:“—”表示没有显著性差异,试验结果为阴性;

“+”表示有显著性差异,试验结果为阳性。

低剂量不能改善贫血。阳性对照组3项为阳性,但红细胞、红细胞压积这两项不显著,说明阳性药物可以起到改善贫血的作用,但效果比较缓慢。

动物试验表明,自制的LF的确具有改善缺铁性贫血的功能,其最小有效作用剂量为中剂量LF,即 $50 \mu\text{g/g} \cdot \text{d}$ 。而且,进一步证实动物体对LF中的高价铁的吸收很好,这意味着在动物体中很有可能存在特异性的LF接受体。

3 结论

3.1 自制LF样品的铁结合能力为87.7%,铁饱和度为15.1%。

3.2 当pH为7.5时,铁结合能力最强。 NaHCO_3 浓度为 100mmol/L 时有利于铁结合能力的增强。采用低强度的巴氏杀菌有助于保持LF的铁结合性能。

3.3 动物试验表明,中剂量组($50 \mu\text{g/g} \cdot \text{d}$)和高剂量组($250 \mu\text{g/g} \cdot \text{d}$)的LF都具有较强的升高Hb浓度的作用。低剂量($10 \mu\text{g/g} \cdot \text{d}$)LF不能达到改善贫血的作用。阳性对照物($250 \mu\text{g}$ 右旋糖酐铁/ $\text{g} \cdot \text{d}$)具有升高Hb浓度的作用,但作用缓慢,铁吸收效果稍差于LF。

3.4 对受试动物,LF改善贫血的最小有效作用剂量为 $50 \mu\text{g/g} \cdot \text{d}$ 。

参考文献:

- [1] 苏兰菊,黄雄然,王其珍.不同剂量硫酸亚铁治疗缺铁性贫血的比较[J].临床荟萃,2002,17(1):3-4.
- [2] 董智.口服铁剂的现状[J].中国医药工业杂志,1996,27(6):284-286.

中国林蛙输卵管上皮细胞的培养及其生物学特性研究

郑鑫¹, 刘景圣^{2,*}, 夏清娟¹, 昌倩宇²

(1. 吉林农业大学动物科技学院, 吉林 长春 130118,

2. 吉林农业大学食品工程学院, 吉林 长春 130118)

摘要 本实验对中国林蛙(*Rana temporaria chensinensis* David)的输卵管上皮细胞,成功地进行了原代及传代体外培养,并对输卵管上皮细胞的生物学特性进行观察、鉴定研究,建立了一种稳定的林蛙输卵管上皮细胞体外培养方法,为进一步研究其生物活性物质奠定了实验基础。

关键词: 中国林蛙; 输卵管上皮细胞; 细胞培养; 体外培养; 生物学特性

Culture of *Rana temporaria chensinensis* David Oviductal Epithelial Cell and Its Biological Characteristics

ZHENG Xin¹, LIU Jing-sheng^{2,*}, XIA Qing-juan¹, CHANG Qian-yu²

(1. College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

2. College of Food Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: *Rana temporaria chensinensis* David oviductal epithelial cell was primary cultured and subcultured *in vitro*, these cells were identified epithelial cell by using immuno-reactivity. The growth and morphous of the primary cells and subculture cells were observed by inverted optic microscope. The primary, the third and fifth subculture cells were cultured and counted, respectively. Multiplication capacity of the third subculture cells is stronger than the primary cells and the fifth subculture cells. A stable culture *in vitro* method of *Rana temporaria chensinensis* David oviductal epithelial cell was established. This culture method is the base

收稿日期 2005-10-15

*通讯作者

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30471265)

作者简介: 郑鑫(1965-), 女, 副教授, 博士, 主要从事细胞生物技术的研究所。

-
- [3] 肖红, 王恩湘. 口服右旋糖酐铁治疗缺铁性贫血的疗效[J]. 湖南医学, 2002, 5(17): 1-2.
- [4] Cox T M, Mazurier J G. Iron binding proteins and influx of iron across the duodenal brush border. Evidence for specific lactoferrin receptors in human intestine[J]. Biochim Biophys Acta, 1979, 588: 120.
- [5] Davidson L A, Lonnerdal B. Specific binding of monkey milk lactoferrin to its brush border receptor[J]. Fed Proc, 1985, 44: 1673.
- [6] Alcantara J, Padda J S, Schryvers A B. The N-linked oligosaccharides of human lactoferrin are not required for binding to bacterial lactoferrin receptors[J]. Can J Microbiol, 1992, 38: 1202-1205.
- [7] Feng M, Dose V D. Preparation of apolactoferrin with a very low iron saturation[J]. J Dairy Sci, 1995, 78(11): 2352-2357.
- [8] Lonnerdal B. Composition and physiological properties of human milk [M]. Elsevier Science Publishers, 1985.
- [9] 卢蓉蓉, 许时婴, 王璋, 等. 预分离初乳中乳铁蛋白的超滤工艺[J]. 食品与生物技术, 2002, 21(1): 67-70.
- [10] 卫生部食检所. 保健食品功能学评价评价程序和检验方法[M].
- [11] Chen J P, Wang C H H. Microfiltration affinity purification of lactoferrin and immunoglobulin G from cheese whey[J]. J Food Sci, 1991, 56(3): 701-706.
- [12] Foley A A, Bates G W. The purification of lactoferrin from human whey by batch extraction[J]. Anal Biochem, 1987, 162: 296-300.
- [13] Anderson B F. Structure of human lactoferrin crystallographic structure analysis and refinement at 2.8 Å resolution[J]. J Mol Biol, 1989, 209: 711-734.
- [14] Thomas D Y, Kenneth N R. Lactoferrin: The role of conformational changes in its iron binding and release[J]. J Am Chem Soc, 1993, 115(15): 6765-6768.
- [15] Aisen P, Leibman A. Lactoferrin and transferring: a comparative study [J]. Biochim Biophys Acta, 1972, 257: 314.