

# 乳铁蛋白理化性质及其成骨作用研究进展

孔莹莹, 杜明\*, 刘猛, 张兰威

(哈尔滨工业大学食品科学与工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150090)

**摘要:** 乳铁蛋白是一种具有抗菌、免疫调节等多功能性的铁结合糖蛋白, 主要存在于哺乳动物乳汁中。近年来, 乳铁蛋白在促进骨生长方面的功能逐渐成为研究热点。本文主要综述乳铁蛋白的结构、理化性质及其对成骨细胞、破骨细胞的作用、骨生长的影响及机制等方面的研究进展, 并展望乳铁蛋白作为骨效应分子的应用前景及仍需解决的问题。

**关键词:** 乳铁蛋白; 理化性质; 成骨细胞; 破骨细胞; 成骨作用

## Research Progress in Physio-chemical Characteristics and Osteogenic Activity of Lactoferrin

KONG Ying-ying, DU Ming\*, LIU Meng, ZHANG Lan-wei

(School of Food Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China)

**Abstract:** Lactoferrin is an iron-binding glycoprotein that is a pleiotropic factor with potent anti-microbial and immunomodulatory activity. It mainly exists in mammalian milk. In recent years, the function of lactoferrin in promoting bone growth has gradually become a hot topic of research. In this review we focus on the most recent progress in research on the structure, physical and chemical characteristics of lactoferrin and its effect and mechanism of action on osteoblast, osteoclast and bone growth. Further prospects for its applications as a factor that influences osteoblast and osteoclast and yet-to-be-solved problems are discussed as well.

**Key words:** lactoferrin; physio-chemical characteristics; osteoblast; osteoclast; osteogenesis

中图分类号: TS252.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)21-0318-05

1939年Sorensen等<sup>[1]</sup>从牛乳中分离得到的一种蛋白质与铁结合形成复合物, 后期研究发现这种复合物在 $Fe^{3+}$ 存在的条件下呈红色, 与血清铁结合蛋白铁传递蛋白(transferrin, Tf)类似, 所以被命名为乳传递蛋白或乳铁蛋白(lactoferrin, Lf), 也称“红蛋白”。从1960年<sup>[2-3]</sup>人乳和牛乳中Lf第一次被分离纯化至今, 国内外就Lf的结构和功能进行了许多研究。Lf是一种分子质量在80kD左右的铁结合多功能糖蛋白, 有抗菌<sup>[4]</sup>、抗病毒<sup>[5]</sup>、促进铁吸收<sup>[6]</sup>、调节免疫<sup>[7]</sup>等作用。近年来研究发现, Lf对骨的生长代谢也起着重要作用, Lf的这种功能也逐渐引起了广大学者的关注。

## 1 Lf概述

### 1.1 Lf分布及含量

Lf并非乳所特有, 它还存在于一些外分泌物中, 不同生物体分泌物中Lf含量如表1所示。

由表1可知, 乳中Lf含量最高, 其中人初乳中Lf含量高达7mg/mL, 骆驼乳中Lf含量仅次于人初乳。泪液、精

液、子宫分泌物、滑液等分泌物中也含有少量的Lf。Lf也存在于次级嗜中性颗粒中, Lf含量为 $15\mu g/10^6$ 嗜中性颗粒。

表1 生物体中不同分泌液中Lf质量浓度

Table 1 Different concentrations of lactoferrin in different organism secretions

| 生物分泌物 | Lf质量浓度/( $\mu g/mL$ )     |
|-------|---------------------------|
| 乳     |                           |
| 骆驼    | 2~6 <sup>[8]</sup>        |
| 人     | 1~5 <sup>[9]</sup>        |
| 猪、马   | 0.2~2.0 <sup>[8]</sup>    |
| 奶牛    | 0.1~0.4 <sup>[10]</sup>   |
| 山羊、绵羊 | 0.02~0.2 <sup>[8]</sup>   |
| 兔、狗、鼠 | <0.05 <sup>[9]</sup>      |
| 精液    | 400~1900 <sup>[11]</sup>  |
| 子宫分泌物 | 500~1000 <sup>[8]</sup>   |
| 鼻分泌物  | 100~200 <sup>[8]</sup>    |
| 血液    | 0.01~3.5 <sup>[12]</sup>  |
| 滑液    | 10~80 <sup>[9]</sup>      |
| 羊水    | 2~32 <sup>[8,12]</sup>    |
| 唾液    | 5~11 <sup>[8,11]</sup>    |
| 尿液    | 1~1.5 <sup>[8]</sup>      |
| 人初乳   | >7 <sup>[12]</sup>        |
| 人常乳   | 1~3 <sup>[12]</sup>       |
| 泪液    | 0.5~2.2 <sup>[8,12]</sup> |

收稿日期: 2011-09-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(31101316); 教育部“新世纪优秀人才计划”项目(NCET-11-0796); 黑龙江省博士后研究人员落户黑龙江科研启动基金项目; 中央高校基本科研业务费专项(HIT.BRETIII.201231)

作者简介: 孔莹莹(1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品科学。E-mail: kongyingying1769@126.com

\*通信作者: 杜明(1977—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为乳品科学。E-mail: duming121@163.com

## 1.2 Lf结构

目前所知的不同来源的Lf都是由690个左右的氨基酸组成的单一多肽链。目前来源于人、鼠、牛、马、猪、山羊、绵羊、水牛和骆驼乳中的Lf氨基酸序列已被报导,其中人乳铁蛋白(human lactoferrin, hLf)和牛乳铁蛋白(bovine lactoferrin, bLf)氨基酸序列同源性约为69%,二者也是目前研究较多的Lf。来源不同的Lf,其氨基酸序列也不同,但研究发现这些来源不同的Lf序列都具有两个显著的特点,Lf的双重内部序列是重复的,以及Lf高度碱性的特点。由于内部序列的重复性,N端和C端的氨基酸序列有约40%是一致的;高碱性特点对于Lf的生物活性则是非常重要的<sup>[13]</sup>。

Lf的单一多肽链折叠成两个基本相等的叶(N-叶和C-叶),两个叶之间由一段10~15个氨基酸残基组成的肽相连,在每一个叶中,都含有两个 $\alpha/\beta$ 结构域,分别是N1、N2、C1、C2,每一个叶中含有一个裂缝,是铁结合部位。每个Lf可结合两分子Fe和两分子 $\text{HCO}_3^-$ 或者 $\text{CO}_3^{2-}$ 。来源不同的Lf都具有糖基化的特点,只是来源不同的Lf糖基化位点的数目和位置不同。如鼠、人、奶牛Lf分别含有1、3、5个N端糖基化位点<sup>[13]</sup>。Lf的糖基化是否对其结构或者功能有影响,现在仍未了解,但已证实Lf结合糖链的数目和位置对Lf的折叠没有影响。目前来源于人乳<sup>[14]</sup>、牛乳<sup>[15]</sup>、骆驼乳<sup>[16]</sup>、马乳<sup>[17]</sup>等的Lf的三级结构已经确定下来。

## 1.3 Lf理化特点

### 1.3.1 Lf的铁亲和性

Lf对铁的亲和力非常的大(大约是血清中Tf的260倍),亲和常数大约是 $10^{20}$ 。但天然bLf铁离子饱和度只有15%~20%,呈橙红色,其颜色深浅与铁离子饱和度有关。铁饱和度在5%以下的为脱铁乳铁蛋白(apo-lactoferrin, apo-Lf),铁饱和时称铁饱和乳铁蛋白(holo-lactoferrin, holo-Lf),母乳中的Lf基本上都是apo-Lf<sup>[9]</sup>。除了 $\text{Fe}^{3+}$ 外其他的阳离子从小的三价离子如 $\text{Ga}^{3+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$ ,三价过渡金属离子如 $\text{Mn}^{3+}$ 、 $\text{Co}^{3+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 到较大离子镧系元素都可以结合到Lf的 $\text{Fe}^{3+}$ 结合部位,但它们的结合能力都比铁的弱<sup>[18]</sup>。此外Lf结合其他金属离子可改变Lf最大吸收波长。

### 1.3.2 Lf的热稳定性

对于Lf的热稳定性,研究者也进行了大量的研究。早在1977年,Rüegg等<sup>[19]</sup>研究发现bLf在pH值为6.6时,温度为65~69℃时开始失活。Abe等<sup>[20]</sup>研究发现牛apo-Lf在pH值为4.0,温度90℃加热5min,Lf的铁结合能力、抗原活性、抑菌性能几乎无变化,可对其进行大批量灭菌;70℃预热3min,然后UHT杀菌(130℃,2s),铁结合能力只损失了3%;还发现在酸性条件下Lf较耐热,

在中性和碱性条件下则发生浑浊和凝胶化。而Paulsson等<sup>[21]</sup>研究发现Lf在酸性条件下更敏感,Sreedhara等<sup>[22]</sup>研究发现pH2.0~8.0 bLf变性温度随pH值减小而降低,在pH2.0~3.0 Lf更容易变性,且bLf的变性是不可逆的。研究发现巴氏杀菌对bLf结构及抗菌活性基本上没影响<sup>[23]</sup>,而UHT杀菌会使bLf失去抗菌活性<sup>[24]</sup>,但137℃ 8s处理的Lf对单核细胞增殖作用几乎没发生变化<sup>[25]</sup>。Sui<sup>[26]</sup>、Brisson<sup>[27]</sup>等在中性pH值条件下研究发现Lf热稳定性 $\text{apo-Lf} < \text{N-Lf} < \text{holo-Lf}$ ,究其原因可能是由于铁饱和和有助于Lf二硫化物结合在一起,防止蛋白聚合。Lf热力学稳定性受环境因素如pH值、盐类和乳清蛋白等的影响。所以对于实际应用中加热处理Lf的工艺参数仍需确定。

### 1.3.3 其他特点

目前所知的Lf都具有较高的等电点( $\text{pI} \approx 9.0$ ),具有强阳离子性质,能与其他许多不同类型细胞和酸性分子相结合,如在牛乳体系中,它会与如免疫球蛋白A、酪蛋白、溶菌酶、 $\beta$ -乳球蛋白以及一些糖蛋白等相互作用。

从干酪中发现的几种蛋白酶(凝乳酶、胃蛋白酶)对天然Lf和热变性Lf有水解作用,牛乳中的蛋白酶如纤溶酶、组织蛋白酶对Lf也有作用<sup>[28]</sup>。研究发现摄食的bLf在胃肠道中并不会完全被降解,有些仍会以如包含乳铁蛋白素(Lfcin)等形式呈现<sup>[29]</sup>,摄食的bLf一般也不会被吸收在血液中<sup>[30]</sup>。

## 2 Lf成骨作用

Lf的成骨作用相关研究主要分为两类,一类是采用体内实验的方式考察Lf对骨骼生长的直接促进作用;另一类是采用体外实验的方式考察Lf对成骨细胞增殖、分化促进作用以及对破骨细胞的抑制作用等。

### 2.1 Lf对骨生长的作用

局部注射Lf是常用体内实验研究Lf对骨影响的方法。Cornish<sup>[31]</sup>向成年鼠右侧颅骨连续注射Lf 5d后,显微照相后发现注射Lf的颅骨片段新骨形成明显增加,且新骨形成与Lf呈剂量依赖关系。动态组织形态学指数评估显示骨矿物叠积率和骨形成率明显增加。

近些年来,有研究学者运用实验体摄食Lf模型研究Lf防止骨质流失的作用。Malet等<sup>[32]</sup>利用去除卵巢(ovariectomized, OVX)C3H/HeN鼠模型来模拟绝经后由于雌性激素不足而引起的骨质流失,实验发现bLf的摄入可阻止骨密度的减小,且摄食bLf对骨形态的促进作用与其免疫调节作用相偶联,表明摄食bLf不仅能直接作用于骨细胞而且能通过部分免疫学调节功能起间接作用。Blais<sup>[33]</sup>与Guo<sup>[34]</sup>等研究发现bLf的摄入可显著提高12周OVX鼠骨密度和骨强度,防止骨量的减少,并呈剂量依赖型。

## 2.2 Lf对成骨细胞的作用

已有诸多报导生理质量浓度下Lf可作为骨组织的生长因子。Lf可促进成骨细胞(osteoblast, OB)和成骨样细胞增殖并促进OB分化以及抑制OB凋亡。

### 2.2.1 Lf促进成骨/样细胞增殖分化

Cornish等<sup>[35]</sup>发现Lf在生理质量浓度(1~100 $\mu$ g/mL)下可促进鼠成骨样细胞胸苷含量增加,即促进成骨样细胞的有丝分裂,并成剂量依赖关系;同时还发现在同样的质量浓度范围内Lf也可刺激人成骨性细胞系SaOS-2、基质细胞系ST2的增殖,以及促进软骨细胞增殖。Grey等<sup>[36]</sup>质量也发现bLf和重组hLf可增加鼠前体OB DNA合成,促进OB增殖并呈剂量依赖型。去糖基化、holo-Lf、apo-Lf和其他一些Lf小片段仍保持着成骨活性,当用大小和铁离子相似的阳离子代替铁离子时,Lf仍有成骨活性。而且Lf的C端片段比N端片段的成骨活性高<sup>[37]</sup>。研究还发现Lf在100 $\mu$ g/mL及以上质量浓度时会促进鼠前体OB分化,增加骨小节数及骨矿化区域且Lf促进OB分化所需的质量浓度是促进OB增殖所需质量浓度的10倍<sup>[35]</sup>。Takayama等<sup>[38]</sup>利用嵌入Lf胶原蛋白膜镀在人成骨样细胞系MG63,可提高碱性磷酸酶活性和骨钙素量,证实Lf有作为成骨生长因子应用于骨组织工程学的潜质。

### 2.2.2 Lf抑制成骨/样细胞凋亡

研究者对Lf对OB凋亡的影响也进行了研究。Cornish等<sup>[35]</sup>利用脱氧核苷酸转移酶介导的脱氧尿苷酸末端标记法(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end labeling, TUNEL)分析显示Lf在1~10 $\mu$ g/mL内可降低鼠成骨前体样细胞凋亡,抑制OB凋亡率达50%~70%,并呈剂量依赖型。Locklin等<sup>[39]</sup>用Lf处理鼠成骨样细胞(2T3)或骨细胞(MLOY4)1h,再加入依托泊苷来测细胞凋亡情况,研究表明Lf和依托泊苷处理细胞24h后可减少由于依托泊苷而引起的OB和骨细胞凋亡率达60%。以上说明Lf不仅可促进OB增殖还可抑制OB凋亡,作为OB存活因子。

### 2.2.3 Lf对成骨细胞作用机制

Lf可与低密度脂蛋白相关受体蛋白1(low density lipoprotein receptor-related proteins 1, LRP1)<sup>[40]</sup>和2(low density lipoprotein receptor-related proteins 2, LRP2)<sup>[41]</sup>结合,其中LRP1、LRP2均属内吞受体LRP家族中多样性配体成员,存在于OB中,但只有几种类型的成骨样细胞可表达LRP1和LRP2。Grey等<sup>[36]</sup>等研究发现新生鼠颅盖骨成骨前体细胞、人成骨细胞系SaOS-2、鼠成骨细胞系UMR-106、鼠科成骨细胞系MC3T3E1、鼠科基质细胞系ST2中均表达LRP1,另外Swiss 3T3成纤维细胞系也表达LRP1;鼠成骨前体细胞、鼠成骨细胞系UMR-106、鼠科成骨细胞系MC3T3E1、鼠科间质细胞系ST2和人肾脏细胞系HEK293均表达LRP2,但人成骨细胞系SaOS-2和鼠

科成纤维细胞系Swiss 3T3均不表达LRP2。

已证实Lf通过成骨样细胞的内吞作用进入胞内,且成骨样细胞对Lf的内吞作用是由LRP1或LRP2所介导的。还发现LRP1是Lf有丝分裂的受体。

研究发现Lf可诱导成骨样细胞<sup>[42]</sup>和软骨细胞<sup>[43]</sup>细胞外信号调节激酶1/2(extracellular signal-regulated kinase 1/2, ERK1/2又称p42/44MAPK)的磷酸化,激活SaOS-2细胞中ERK1/2通路,对鼠前体成骨样细胞用PD98059或U0126(抑制ERK1/2通路)预处理,发现Lf对OB有丝分裂的促进作用受到抑制<sup>[36]</sup>,其中ERK1/2通路的磷酸化或激活可促进细胞增殖和存活<sup>[44]</sup>,这些说明Lf可通过对ERK1/2的作用来调节对成骨样细胞和骨细胞的增殖和存活。但Lf对ERK1/2通路的激活受到抑制时,Lf仍能促进OB存活<sup>[45]</sup>,这表明Lf促进OB存活与其促进OB增殖的分子机制是根本不同的,它们被细胞膜上不同受体所调节。

已发现成骨样细胞对Lf的内吞作用与Lf对ERK1/2信号通路的激活作用是相互独立的,LRP1所介导的内吞作用与它所介导的ERK1/2信号通路是独立的。

Lf对成骨样细胞ERK1/2通路的影响已有报导,但Lf对成骨样细胞细胞外信号调节激酶5(extracellular-regulated kinase 5, ERK5)通路的影响却未见报导,但在研究前者过程中,使用的抑制剂PD98059和U0126不仅对ERK1/2有抑制作用而且对ERK5也起抑制作用<sup>[46]</sup>,由此推断,Lf很可能对ERK5通路起作用。另外Brandl等<sup>[43]</sup>还发现Lf对软骨细胞p38MAPK(p38 mitogen activated protein kinase, p38丝裂素活化蛋白激酶)通路有激活作用,其中p38MAPK通路可调节骨细胞的凋亡。

Lf对OB作用机制的研究仍在进行中,Cornish等<sup>[47]</sup>用Lf处理人OB发现胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF1)mRNA表达上升,Wnt通路抑制因子(dickkopf-1, DKK1)表达下降。Naot等<sup>[48]</sup>检测经Lf处理的成骨样细胞MC3T3-E1,发现白细胞介素-6(interleukin 6, IL-6)、前列腺素内过氧化物合酶2(prostaglandin-endoperoxide synthase 2, Ptg2)和转录因子激活T细胞核因子(nuclear factor of activated T cells-1, NFATc1)转录水平短暂的增加,且与Lf呈剂量依赖型。对人和鼠OB培养中同样发现Lf处理后,前列腺素E2(prostaglandin E2, PGE2)水平升高、环氧化酶2(cyclooxygenase 2, COX-2)和NFATc1活性。还发现抑制COX-2或NFATc1的活性将阻止Lf对OB的促有丝分裂作用。Lf对OB有丝分裂中相关因子的作用有非常重要的意义,Lf对OB分化的促进作用机制仍需继续探究。

### 2.3 Lf对破骨细胞的作用

Lf能抑制破骨细胞(osteoclast, OC)生成,但对成熟OC没有作用。

#### 2.3.1 Lf抑制破骨细胞生成



Cornish等<sup>[35]</sup>对鼠骨髓培养发现, Lf可抑制OC生成, 并呈剂量依赖关系, 当Lf质量浓度为100 $\mu$ g/mL时可完全抑制OC生成, 并能抑制核激活因子受体配体(receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand, RANKL)的表达。Lorget等<sup>[49]</sup>研究发现兔子混合骨细胞(包含OB、OC及间质细胞)培养中, bLf能抑制骨重吸收活性。Naot等<sup>[37]</sup>还发现hLf N端可有效降低OC生成, 且N叶比C叶和完整Lf具有更高的抑制OC生成能力, 并呈剂量关系。然而Morita等<sup>[50]</sup>研究发现Lf对骨吸收的抑制作用很小, 与Cornish等<sup>[35]</sup>研究结果不同, 可能是由于实验所用的Lf纯度不同, 样品中含有其他对OC起作用的活性成分的量不同而引起的<sup>[51]</sup>。

但Lf对分离出的成熟OC重吸收活性没有影响。Cornish等<sup>[35]</sup>新生鼠(2d)颅骨组织培养实验前注射<sup>45</sup>Ca, 4d后切割颅骨检测<sup>45</sup>Ca释放, 发现Lf对成熟OC活性无影响。上述研究表明Lf虽不影响已完全分化OC吸收骨的能力, 但可通过减少前体细胞转化成OC数量来抑制骨的重吸收。

### 2.3.2 Lf对破骨细胞作用机制

研究发现Lf不仅可直接作用于OC来抑制其生成, 而且还可能通过调节其他细胞如OB来调节与OC相关的一些蛋白表达起间接作用。研究发现Lf能抑制鼠巨噬细胞系RAW264.7细胞中RANKL所引起的OC生成, 且加入LRP1抑制剂RAP后并不能改变这种抑制作用, 表明Lf起到这种抑制作用所涉及的受体不是LRP1<sup>[52]</sup>。肖晖等<sup>[53]</sup>研究发现bLf呈时间和剂量依赖性地刺激大鼠成骨细胞骨保护素(osteoprotegerin, OPG)mRNA的表达, 抑制RANKL mRNA的表达, 从而使RANKL/OPG mRNA比值降低。由此推断Lf可能是通过调节OB RANKL/RANK/OPG抑制OC介导的骨吸收。

Lf调节OC分化和活性作用机制仍未了解, 虽已证实Lf可直接作用影响OC, 但也不能排除Lf通过OB或其他细胞来调节与OC生成相关的一些蛋白表达起间接作用。调节Lf对OC起抑制作用的相关受体也未被确认出来。

## 3 结 语

Lf促进OB增殖分化、抑制OB凋亡, 且能抑制OC生成, 对骨生长和重塑有着重要的作用。利用局部注射模型研究表明bLf对骨的促进作用较胰岛素、糊精、降血钙素、肾上腺髓质素等对骨的促进作用强。以上结果为Lf作为骨生长因子提供了强有力的证据。

Lf对于促进婴幼儿骨骼成长和减缓绝经妇女骨质流失以及改善老年人骨质疏松都有重要的意义, 且常见Lf如bLf与hLf来源于乳, 是安全的食品原料, 美国食品药品监督管理局(FDA)批准bLf作为营养补充剂添加到食品中。

因此Lf可作为功能性食品成分添加于婴幼儿奶粉或者老年人保健品中, 还可作为治疗骨质疏松症的辅助成分, 或应用于临床。但Lf对破骨细胞的作用机制仍未了解, 其对成骨细胞的作用机制也只是初步探究, 且Lf应用于生产时, 常见的热处理单元操作会对Lf的活性产生影响, 所以研究Lf对成骨、破骨细胞的作用机制, 探究其中涉及的信号通路及相关因子的变化, 以及研究热处理对Lf成骨作用的影响对其未来开发成对骨合成代谢起作用的药物或营养物质是非常重要的。上述问题的阐明对于乳铁蛋白生物活性机制的推测及其相关产品的开发与利用具有重要的科学意义。

## 参考文献:

- [1] SORENSEN M, SORENSEN S. The proteins in whey[J]. CR Trav Lab Carlsberg, 1939, 23(7): 55-99.
- [2] MONTREUIL J, TONNELAT J, MULLET S. Preparation and properties of the lactosiderophilin (lactotransferrine) of human milk[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1960, 45(3): 413-421.
- [3] GROVES M L. The isolation of a red protein from milk[J]. Journal of the American Chemical Society, 1960, 82(13): 3345-3350.
- [4] FARNAUD S, EVANS R W. Lactoferrin: a multifunctional protein with antimicrobial properties[J]. Mol Immunol, 2003, 40(7): 395-405.
- [5] BELJAARS L, van der STRATE B W, BAKKER H I, et al. Inhibition of cytomegalovirus infection by lactoferrin *in vitro* and *in vivo*[J]. Antiviral Res, 2004, 63(3): 197-208.
- [6] KAWAKAMI H, HIRATSUKA M, DOSAKO S. Effects of iron-saturated lactoferrin on iron absorption[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1988, 52(4): 903-908.
- [7] ACTOR J K, HWANG S A, KRUEL M L. Lactoferrin as a natural immune modulator[J]. Curr Pharm Des, 2009, 15(17): 1956-1973.
- [8] KONUSPAYEVA G, LOISEAU G, LEVIEUX D, et al. Lactoferrin and immunoglobulin content in camel milk from bactrian, dromedary and hybrids in kazakhstan[J]. Journal of Camelid Sciences, 2008, 1: 54-62.
- [9] TENG C T. Lactoferrin gene expression and regulation: an overview[J]. Biochem Cell Biol, 2002, 80(1): 7-16.
- [10] WAKABAYASHI H, YAMAUCHI K, TAKASE M. Lactoferrin research, technology and applications[J]. International Dairy Journal, 2006, 16(11): 1241-1251.
- [11] STEIJNS J M, van HOOIJDONK A. Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin[J]. British Journal of Nutrition, 2000, 84: 11-17.
- [12] LEVAY P F, VILJOEN M. Lactoferrin: a general review[J]. Haematologica, 1995, 80(3): 252-267.
- [13] BAKER E N, BAKER H M. A structural framework for understanding the multifunctional character of lactoferrin[J]. Biochimie, 2009, 91(1): 3-10.
- [14] ANDERSON B F, BAKER H M, NORRIS G E, et al. Structure of human lactoferrin: crystallographic structure analysis and refinement at 2.8 angstrom resolution[J]. J Mol Biol, 1989, 209(4): 711-734.
- [15] MOORE S A, ANDERSON B F, GROOM C R, et al. Three-dimensional structure of diferric bovine lactoferrin at 2.8 angstrom resolution[J]. Journal of Molecular Biology, 1997, 274(2): 222-236.
- [16] KHAN J A, KUMAR P, PARAMASIVAM M, et al. Camel lactoferrin, a transferrin-cum-lactoferrin: crystal structure of camel apolactoferrin at 2.6 angstrom resolution and structural basis of its dual role[J]. Journal of Molecular Biology, 2001, 309(3): 751-761.

- [17] SHARMA A K, PARAMASIVAM M, SRINIVASAN A, et al. Three-dimensional structure of mare diferric lactoferrin at 2.6 angstrom resolution[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1999, 289(2): 303-317.
- [18] BAKER E N. Structure and reactivity of transferrins[J]. *Advances in Inorganic Chemistry*, 1994, 41: 389-464.
- [19] RÜEGG M, MOOR U, BLANC B. A calorimetric study of the thermal denaturation of whey proteins in simulated milk ultrafiltrate[J]. *Journal of Dairy Research*, 1977, 44(3): 509-520.
- [20] 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.
- [21] PAULSSON M, VISSER H. Heat-Induced interaction of milk proteins studied by differential scanning calorimetry[M]// VISSER H. Protein interactions. Weinheim, Germany: VCH Verlagsgesellschaft, 1992: 117-134.
- [22] SREEDHARA A, FLENGSRUD R, PRAKASH V, et al. A comparison of effects of pH on the thermal stability and conformation of caprine and bovine lactoferrin[J]. *International Dairy Journal*, 2010, 20(7): 487-494.
- [23] SÁNCHEZ L, PEIRO J M, CASTILLO H, et al. Kinetic parameters for denaturation of bovine milk lactoferrin[J]. *Journal of Food Science*, 1992, 57(4): 873-879.
- [24] PAULSSON M A, SVENSSON U, KISHORE A R, et al. Thermal behavior of bovine lactoferrin in water and its relation to bacterial interaction and antibacterial activity[J]. *Journal of Dairy Science*, 1993, 76(12): 3711-3720.
- [25] ORIA R, ISMAIL M, SÁNCHEZ L, et al. Effect of heat treatment and other milk proteins on the interaction of lactoferrin with monocytes[J]. *Journal of Dairy Research*, 1993, 60(3): 363-369.
- [26] SUI Q, ROGINSKI H, WILLIAMS R P W, et al. Effect of pulsed electric field and thermal treatment on the physicochemical properties of lactoferrin with different iron saturation levels[J]. *International Dairy Journal*, 2010, 20(10): 707-714.
- [27] BRISSON G, BRITTEN M, POULIOT Y. Heat-induced aggregation of bovine lactoferrin at neutral pH: effect of iron saturation[J]. *International Dairy Journal*, 2007, 17(6): 617-624.
- [28] DUPONT D, ARNOULD C, ROLET-REPECAUD O, et al. Determination of bovine lactoferrin concentrations in cheese with specific monoclonal antibodies[J]. *International Dairy Journal*, 2006, 16(9): 1081-1087.
- [29] 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]. *Journal of Nutrition*, 2001, 131(8): 2121-2127.
- [30] WAKABAYASHI H, KUWATA H, YAMAUCHI K, et al. No detectable transfer of dietary lactoferrin or its functional fragments to portal blood in healthy adult rats[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2004, 68(4): 853-860.
- [31] CORNISH J. Lactoferrin promotes bone growth[J]. *Biometals*, 2004, 17(3): 331-335.
- [32] 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.
- [33] BLAIS A, MALET A, MIKOGAMI T, et al. Oral bovine lactoferrin improves bone status of ovariectomized mice[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009, 296(6): E1281-E1288.
- [34] GUO H Y, JIANG L, IBRAHIM S A, et al. Orally administered lactoferrin preserves bone mass and microarchitecture in ovariectomized rats[J]. *The Journal of Nutrition*, 2009, 139(5): 958-964.
- [35] CORNISH J, CALLON K E, NAOT D, et al. Lactoferrin is a potent regulator of bone cell activity and increases bone formation *in vivo*[J]. *Endocrinology*, 2004, 145(9): 4366-4374.
- [36] GREY A, BANOVIĆ T, ZHU Q, et al. The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 is a mitogenic receptor for lactoferrin in osteoblastic cells[J]. *Mol Endocrinol*, 2004, 18(9): 2268-2278.
- [37] NAOT D, GRET A, REID I R, et al. Lactoferrin: a novel bone growth factor[J]. *Clin Med Res*, 2005, 3(2): 93-101.
- [38] TAKAYAMA Y, MIZUMACHI K. Effect of lactoferrin-embedded collagen membrane on osteogenic differentiation of human osteoblast-like cells[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2009, 107(2): 191-195.
- [39] LOCKLIN R M, HULLEY P A, NAOT D, et al. Lactoferrin protects osteoblasts and osteocytes from apoptosis[J]. *Bone*, 2009, 44(Suppl 2): 317-317.
- [40] VASH B, PHUNG N, ZEIN S, et al. Three complement-type repeats of the low-density lipoprotein receptor-related protein define a common binding site for RAP, PAI-1, and lactoferrin[J]. *Blood*, 1998, 92(9): 3277-3285.
- [41] GLIEMANN J. Receptors of the low density lipoprotein (LDL) receptor family in man. Multiple functions of the large family members via interaction with complex ligands[J]. *Biol Chem*, 1998, 379(8/9): 951-964.
- [42] NAKAJIMA K, KANNO Y, NAKAMURA M, et al. Bovine milk lactoferrin induces synthesis of the angiogenic factors VEGF and FGF2 in osteoblasts via the p44/p42 MAP kinase pathway[J]. *BioMetals*, 2011, 24(5): 847-856.
- [43] BRANDL N, ZEMANN A, KAUPPE I, et al. Signal transduction and metabolism in chondrocytes is modulated by lactoferrin[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2010, 18(1): 117-125.
- [44] CHANG L, KARIN M. Mammalian MAP kinase signalling cascades[J]. *Nature*, 2001, 410: 37-40.
- [45] GREY A, ZHU Q, WATSON M, et al. Lactoferrin potently inhibits osteoblast apoptosis, via an LRP1-independent pathway[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2006, 251(1/2): 96-102.
- [46] MODY N, LEITCH J, ARMSTRONG C, et al. Effects of MAP kinase cascade inhibitors on the MKK5/ERK5 pathway[J]. *FEBS letters*, 2001, 502(1/2): 21-24.
- [47] CORNISH J, NAOT D, CHHANA A, et al. Lactoferrin, a regulator of bone: mechanisms of action[J]. *Bone*, 2008, 42(Suppl 1): 19-19.
- [48] NAOT D, CHHANA A, MATTHEWS B G, et al. Molecular mechanisms involved in the mitogenic effect of lactoferrin in osteoblasts[J]. *Bone*, 2011, 49(2): 217-224.
- [49] LORGET F, CLOUGH J, OLIVEIRA M, et al. Lactoferrin reduces *in vitro* osteoclast differentiation and resorbing activity[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 296(2): 261-266.
- [50] MORITA Y, MATSUYAMA H, SERIZAWA A, et al. Identification of angiogenin as the osteoclastic bone resorption-inhibitory factor in bovine milk[J]. *Bone*, 2008, 42(2): 380-387.
- [51] TANIGAWA K, FUJIHARA M, SAKAMOTO R, et al. Characterization of bovine angiogenin-1 and lactogenin-like protein as glycyrrhizin-binding proteins and their *in vitro* phosphorylation by C-kinase[J]. *Biol Pharm Bull*, 2001, 24(5): 443-447.
- [52] CORNISH J, NAOT D. Lactoferrin as an effector molecule in the skeleton[J]. *BioMetals*, 2010, 23(3): 425-430.
- [53] 肖晖, 刘宁. 牛源乳铁蛋白对体外培养大鼠成骨细胞RANKL和OPG mRNA表达的影响[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2008, 14(7): 463-466.