

# 牛乳铁蛋白肽的研究现状与应用前景

李忠清<sup>1,2,3</sup>, 王亮<sup>1,3,\*</sup>

(1.中国科学院新疆理化技术研究所, 新疆 乌鲁木齐 830011;

2.新疆金牛生物有限公司, 新疆 乌鲁木齐 830026); 3.中国科学院研究生院, 北京 100039)

**摘 要:** 牛乳铁蛋白肽是牛乳铁蛋白在胃蛋白酶水解作用下释放出的一种含 25 个氨基酸残基的短肽, 具有广泛而高效的抑菌活性, 是一种新型的抗菌肽, 在医药、食品添加剂乃至饲料业有着巨大的开发潜质。对其结构、理化性质、生物学功能、作用机制及应用前景进行详细论述, 并对乳铁蛋白肽的衍生肽的研究及策略进行探讨。

**关键词:** 牛乳铁蛋白肽; 抗菌肽; 衍生肽

## Current Status and Future Prospects of Bovine Lactoferricin

LI Zhong-qing<sup>1,2,3</sup>, WANG Liang<sup>1,3,\*</sup>

(1. Xinjiang Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Ürümqi 830011, China; 2. Xinjiang Jinniu Biology Co. Ltd., Ürümqi 830026, China; 3. Graduate University, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

**Abstract:** Bovine lactoferricin (LfcinB) is a 25-residue peptide with highly effective, broad-spectrum antimicrobial generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. LfcinB has revealed huge potential in the medicinal, food additive, and feed industries as a new type of antimicrobial peptide. This review presents its important structural features, physicochemical properties, biological function, mechanism of action and future prospects in detail. In addition, the recent advances in the research on its derivatives are also summarized.

**Key words:** LfcinB; antibacterial peptide; derivative

中图分类号: TS201.21

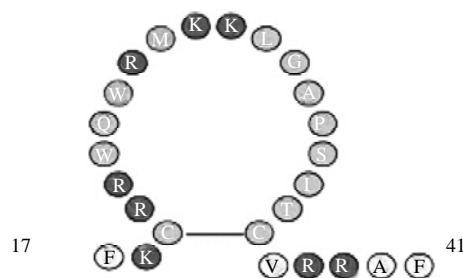
文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)13-0369-05

乳铁蛋白是 Groves 于 1960 首先从牛乳中分离获得<sup>[1]</sup>, 由于其与铁结合形成红色的复合物, 故始称为红蛋白。乳铁蛋白(lactoferrin, LF)是一种分子质量为 70~80kD 的糖蛋白, 据报道, 乳铁蛋白存在于人和多种哺乳动物(如牛、山羊、小鼠等)的乳汁中, 除乳腺组织以外, 还广泛存在于唾液、泪液、精液等外分泌液或血浆、中性粒细胞中<sup>[2-4]</sup>。它不仅参与铁的转运, 而且具有抗微生物、抗氧化、抗癌、调节免疫系统功能及促细胞生长、分化等功能。乳铁蛋白肽(Lfcin)是乳铁蛋白在胃蛋白酶水解作用下释放出的一种含 25 个氨基酸残基的短肽, 在水溶液中呈双亲性的反向  $\beta$ - 折叠结构, 具有广谱抗菌、抗病毒、免疫调节等作用<sup>[5-6]</sup>。经研究<sup>[7]</sup>, 不同动物的 Lfcin, 例如在人源、鼠源、牛源和羊源的乳铁蛋白肽中, 牛乳铁蛋白肽(LfcinB)活性是最高的, 这也是人们将研究重点移至 LfcinB 及其衍生物的原因, 即希望能够从 LfcinB 及其衍生物中得到抗生素的替代品。

## 1 LfcinB 的结构特征

### 1.1 LfcinB 的一级结构特征



黑色.带正电荷氨基酸; 灰色.其他氨基酸。

图 1 LfcinB 一级结构<sup>[10]</sup>

Fig.1 Primary structure of LfcinB

LfcinB 来源于牛乳铁蛋白 N 端的第 17~41 位氨基

收稿日期: 2010-10-12

基金项目: 新疆维吾尔自治区高新技术研究与发展计划项目(200611104)

作者简介: 李忠清(1982—), 男, 硕士研究生, 研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail: lizhongqing\_lzq@sina.com

\* 通信作者: 王亮(1966—), 男, 研究员, 博士, 研究方向为生物工程。E-mail: wangliang\_2004wl@163.com

酸, 由 25 个氨基酸残基组成, 氨基酸顺序为: FKCRRWQWRM KKLGA PSITC VRRFAF, 见图 1<sup>[10]</sup>。LfcinB 包括 5 个色氨酸、3 个赖氨酸和多个芳香族氨基酸残基, 具有强碱性,  $pI > 12$ , 分子质量为 3kD 左右, 其中的 2 个 Cys 通过形成分子内二硫键使 LfcinB 分子呈不完全的桶状, 见图 1。但研究表明, 二硫键在抗菌过程中作用不大, 被破坏后 LfcinB 的抗菌活性并不减弱<sup>[8]</sup>。

## 1.2 空间结构

LfcinB 在乳铁蛋白分子中呈  $\alpha$ -螺旋结构, 当解离下来后  $\alpha$ -螺旋结构消失, 转变成以  $\beta$ -折叠为主的双亲性结构, 其中几乎所有的亲水性基团排列在 LfcinB  $\beta$ -折叠的一侧, 而另一侧聚集了疏水性基团, 这种结构上的改变导致其两性分子更易靠近细胞膜, 从而解释了 LfcinB 抗菌活性明显强于乳铁蛋白的原因。如图 2<sup>[11]</sup>所示, LfcinB 晶体结构和在溶液中结构的不同主要在于两个色氨酸残基在肽链中的方向不同, 在溶液中, 它们是在双亲性分子的同侧; 而在晶体结构中, 它们位于分子两侧, 第 8 位色氨酸面向溶液, 第 6 位色氨酸面向肽的核心。这两个肽残基取向的不同被认为是两者抗菌活性不同的主要原因<sup>[9]</sup>。目前, 对于 LfcinB 的空间结构研究进展迅速, 已经得出其在乳铁蛋白晶体结构和溶液中的结构, 这为进一步研究其结构与功能之间的关系奠定了基础。

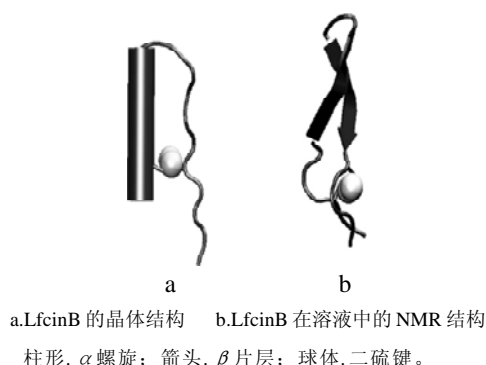


图 2 LfcinB 三级结构<sup>[11]</sup>

Fig.2 Tertiary structure of LfcinB<sup>[11]</sup>

## 2 LfcinB 的理化特征

LfcinB 由 25 个氨基酸组成, 分子质量为 3kD 左右, 其中包括 5 个精氨酸、3 个赖氨酸、2 个色氨酸、2 个苯丙氨酸、2 个半胱氨酸和其他氨基酸。由于富含大量的碱性氨基酸,  $pI > 12$ , 在 pH7 时, 净电荷数  $> 7$ , 具有较强的阳离子特征, 水溶性好, 在水溶液中呈现反平行  $\beta$ -折叠结构。在第 6 位和第 8 位为色氨酸, 它们对杀菌活性至关重要。此外, 由于分子中有两个半胱氨酸形成二硫键, 有抵抗胰蛋白酶和胃蛋白酶水解的能力<sup>[6,8]</sup>。

## 3 LfcinB 及其衍生肽的生物学活性

### 3.1 抗菌功能的广谱高效性

传统抗生素通过对微生物生长或生存的某一处或两处关键部位的抑制或阻遏来达到杀菌或抑菌作用, 如青霉素是通过抑制革兰氏阳性菌肽聚糖合成酶的抑制来达到抗菌作用。细菌只要改变一种作用位点就足以抵抗此类抗生素的攻击。而 LfcinB 及其衍生肽则通过静电作用与细菌细胞膜相互作用, 穿透细菌细胞膜杀死细菌, 极大地减少了细菌产生耐药性的可能<sup>[12]</sup>。正因为如此, LfcinB 及其衍生肽既可杀灭或抑制革兰氏阳性菌, 又可杀灭或抑制革兰氏阴性菌, Gifford 等<sup>[12]</sup>总结了其可对 10 种革兰氏阴性菌、21 种革兰氏阳性菌、11 种真菌以及 5 种病毒具有抑制作用, 其广谱抗菌特性、高效性及低毒性是传统抗生素所无法比拟的, 这也是目前关于此领域成为热点的原因之一。从 20 世纪 80、90 年代至今, 人们对于乳铁蛋白及其衍生物的研究从未间断, 对其生物功能的多样性、改良衍生物功能的高效性、空间结构、作用机制及其在异源生物中的表达都进行了细致深入的研究, 并取得了突破性的进展。

### 3.2 抑制病毒的作用

除了有广谱的抗细菌和真菌的作用外, LfcinB 在体外也具有一定的抗病毒的活性, 但较乳铁蛋白的活性低。在体外, 乳铁蛋白能够降低不同病毒的感染性, 主要是抑制病毒对细胞的感染, 对病毒感染过的细胞作用不大。抗病毒的作用机制并不清楚, 但很可能是因为乳铁蛋白能够与病毒颗粒表面的带负电的分子发生静电作用从而抑制了病毒与细胞的相互作用, 降低了病毒的感染率, 而不是与细胞表面的相互作用。例如丙型肝炎病毒、轮状病毒属、脊髓灰质炎病毒、单纯疱疹病毒和人类免疫缺陷病毒。对丙型肝炎病毒的研究显示, 在体外, 乳铁蛋白能够与病毒的 E1- 和 E2- 包被蛋白相互作用, 在体内, 与 E2- 包被蛋白相互作用, 从而抑制丙型肝炎病毒对宿主细胞的感染<sup>[13]</sup>。此外 LfcinB 与细胞表面的病毒受体或其受体相互作用可能是其抗病毒作用的机制。例如, LfcinB 与硫酸肝素类蛋白聚糖 (HSPGs) 相互作用, 抑制病毒感染。因为部分病毒首先是与 HSPGs 接触, 然后再与宿主细胞表面受体相互作用, 感染宿主细胞<sup>[14]</sup>。LfcinB 虽然具有广谱的抗细菌和真菌作用, 但抗病毒活性却差强人意。此外, Andersen 等<sup>[15]</sup>研究发现, LfcinB 与阿昔洛韦联合使用, 能增强阿昔洛韦的抗病毒作用。另外, 有研究表明, LfcinB 可以作为功能载体, 与某些具有特殊生物学功能的物质连接, 将这些功能性物质带入细胞执行其特殊的生物学功能<sup>[16]</sup>。因此可以利用其这一特性, 用 LfcinB 载着一些

特殊的蛋白酶抑制剂、反义核酸等生物功能性物质进入细胞,发挥更为强大、更多选择性的生物学功能。

### 3.3 抑制肿瘤细胞的作用

LfcinB具有一定的抗肿瘤作用,在它的浓度不影响正常细胞功能时能够抵抗大量的细胞系包括白血病、癌细胞系<sup>[17]</sup>。LfcinB是一种阳离子肽,将瘤细胞作为攻击的靶细胞是因为这些细胞在正常细胞基础上所产生的变化,例如瘤细胞暴露丝氨酸磷脂、带负电荷的首基以及在瘤细胞上失去了磷脂的不对称性<sup>[18]</sup>,其可通过与上述肿瘤细胞表面的电负性分子的相互作用与肿瘤细胞结合,击穿瘤细胞膜从而启动细胞凋亡途径最终达到使瘤细胞凋亡的目的。

有研究显示,细胞表面的电负性分子如硫酸类肝素、硫酸软骨素等可增强其细胞毒性<sup>[19-20]</sup>。但Bodil等<sup>[21]</sup>最近研究显示,硫酸类肝素、硫酸软骨素等电负性的大分子会抑制LfcinB及阳离子抗菌肽的抗肿瘤活性,这主要是因为硫酸类肝素、硫酸软骨素等分子过大,与LfcinB或阳离子肽结合而阻碍了其与细胞膜的接触,降低了其抗肿瘤活性。两者研究结果相悖,具体机制有待于进一步的研究。

Mader等<sup>[17]</sup>通过对LfcinB的抗肿瘤作用机制的研究,认为可能是LfcinB进入肿瘤细胞后诱导活性氧的产生,切冬酶-2活化后破坏了线立体的跨膜电位,伴随切冬酶-3,9的活化,引发癌细胞的凋亡。Mader等<sup>[22]</sup>在LfcinB诱发Jurkat T-leukemia的细胞凋亡中发现,LfcinB诱发肿瘤细胞的凋亡与细胞的通透性和线立体相关,LfcinB先于线立体的去极化进入细胞,当用脂质体融合技术对Jurkat T-leukemia和正常细胞进行LfcinB处理时,两者都发生了凋亡,但当用LfcinB处理这两种细胞,只有Jurkat T-leukemia发生凋亡。这说明凋亡与细胞的通透性有关。另外,在实验中还发现,LfcinB能与纯化的线立体迅速结合,并引起跨膜电位的丧失和细胞色素C的释放。这也就说明凋亡确与线立体相关。

至于LfcinB启动细胞凋亡途径的完整机理目前不甚了解,还有待于进一步的研究。但其在抗肿瘤作用方面的活性已经引起了国内外的广泛关注,对于其作用机制的研究也开展得有声有色,LfcinB在临床上的应用将为时不远了。

## 4 LfcinB及其衍生肽作用机制

LfcinB及其衍生肽的抗菌机制目前还不十分清楚,但近些年的研究进展很快,形成了不少假说。有人认为可能与乳铁蛋白相似,形成跨膜通道,增加了细胞膜的通透性,导致细菌细胞的死亡;或者是其结合在细胞膜上,阻碍了膜的流动性或膜的形成,最终导致细菌细胞的死亡<sup>[23-25]</sup>。对于前一种看法,由于LfcinB及其

衍生肽的分子链太短,还不能形成头尾相连的跨膜结构;对于后一种看法,还没有足够的实验证据。也有人指出,LfcinB及其衍生肽还有大量的正电荷,进入细胞后,能与带负电的生物大分子相互作用,如DNA、RNA、带负电荷的一些胞内分子等,影响细胞的正常功能,最终导致细胞的死亡<sup>[26-27]</sup>。Haukland等<sup>[27]</sup>在研究中发现,用LfcinB处理细胞,发现LfcinB停留在膜上的很少,而是迅速的穿过细胞膜进入细胞质中。这也就从LfcinB的作用位置上支持了上面假设。至于LfcinB的确切的作用机制,还有待于进一步的研究。

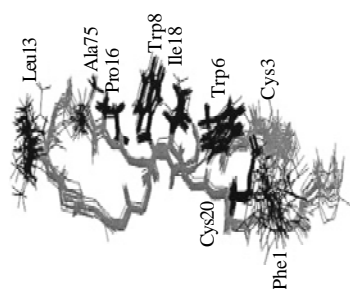
## 5 耐药性的问题

LfcinB在抗菌、抗病毒、抗肿瘤等方面有着广阔诱人的前景,人们对它的研究也进入了一个空前阶段,仿佛只要将其及其衍生物研究透彻,就能从目前的困境中解脱出来,如病原菌的耐药问题、肿瘤的免疫逃逸问题等。但此时更应该保持清醒,不应将LfcinB作为救命稻草。LfcinB虽然有很多优点,但也有自己的缺点,它是一种短肽,在体内很容易被降解。除此之外,Ørian等<sup>[28]</sup>研究发现,LfcinB可能诱发金黄色葡萄球菌的耐药性,但耐药机制目前还不是很清楚。

LfcinB在耐药性方面的问题目前研究较少,对产生耐药性的机制、耐药菌的恢复变性等方面还不甚清楚,但该方面的工作是非常重要的,这对LfcinB的开发和在实际生产中的应用起着决定性的作用。

## 6 LfcinB及其衍生肽的研究

LfcinB的广谱抗菌活性以及其抗病毒、抗肿瘤等作用引起了人们广泛的关注,人们试图对肽链中氨基酸进行改良得到活性更高的衍生物。LfcinB是一种双亲性的阳离子肽,它的活性与其双亲性密切相关,从它的溶液的三维结构可以看出(图3)<sup>[29]</sup>,Phe1、Cys3、Trp6、Trp8、Leu13、Ala15、Pro16、Ile18和Cys20组成了非常重要的疏水表面,位于分子 $\beta$ -片层的一侧。分子中的亲水性的氨基酸则位于 $\beta$ -片层的另一侧,主要是带正电荷的Lys、Arg。Morten等<sup>[30]</sup>对LfcinB的1~15位氨基酸短肽(LFB)进行了研究,发现它具有与LfcinB相似的活性。为了进一步确定短肽中各个氨基酸的重要性,他们做了丙氨酸扫描实验,即丙氨酸逐个替换LFB中的氨基酸。Trp6、Trp8的替换引起了LFB活性的大幅下降,Arg5、Met10的替换也引起了活性的下降,Cys3、Gln7、Gly14的替换则引起了活性的上升。Tore等<sup>[31]</sup>随后对15残基的LFB进行了色氨酸替换研究,在W3,14和W4,10显示了高活性,3、4、10、14等为潜在可选择的替换位点,对其进一步的替换研究可能得到高活性的衍生物。

图3 LfcinB的疏水核心<sup>[30]</sup>Fig.3 Hydrophobic core of LfcinB<sup>[30]</sup>

国内的一些研究机构也对 LfcinB 及其衍生肽进行了相关的研究,如:易俊波等<sup>[32]</sup>、马凤龙等<sup>[33]</sup>、邢芳芳等<sup>[34]</sup>、郭东华等<sup>[35]</sup>分别对 LfcinB 进行了表达,所得产物均具有较强的杀菌活性;张锦霞等<sup>[36]</sup>构建了 LfcinB 的质粒并直接注入处于稳定泌乳期的奶山羊和奶牛乳腺组织,以琼脂板溶圈法检测奶样抑菌活性,结果显示,注射后 3~48h,奶样有明显抑菌活性,其中 3~9h 抑菌活性最高;冯永潜等<sup>[37]</sup>表达了牛乳铁多肽(Lactoferricin B),并初步检测其不同变异的体外抗菌活性;史芳芳等<sup>[38]</sup>对 LfcinB 一级结构进行了选择性的位点突变,并通过毕赤酵母对 LfcinB 的衍生物进行了表达,经鉴定其产物具有较为理想的抗菌活性。

## 7 应用前景

鉴于 LfcinB 生物学功能的多样性、广谱的抗菌性及高效性,预期在以下几方面会得到广泛的应用。

### 7.1 抗生素替代品

传统抗生素耐药性问题越发突出,寻找新一代抗生素的替代品已成为当务之急, LfcinB 的出现,使人们看到了希望。许多动物模型研究和临床实验已证明,自然存在的某些肽类和通过重组表达的肽类均能防止细菌和真菌引起的局部感染。利用基因工程技术表达 LfcinB,以用于临床治疗和预防某些病原微生物感染不失为具有开发价值的一个选择。目前,研究者利用动物乳腺表达系统、毕赤酵母表达系统和大肠杆菌原核表达系统成功地对 LfcinB 进行了体外表达,抗菌活性实验结果表明,表达的 LfcinB 重组蛋白具有一定的抗菌活性<sup>[33-39]</sup>。现在的 LfcinB 离开发应用还有一定的距离,在抗菌活性、药代动力学及安全性方面还需做进一步的研究。此外,如何得到高质高量的 LfcinB 产品也是问题的关键,在大肠杆菌中的表达产品多以包含体的形式表达,这给后续的处理工作带来了很大的不便,而且大肠杆菌中的表达又缺乏真核细胞的加工修饰,如糖基化等;动物乳腺表达系统则要得到表达 LfcinB 的转基因动物,操作过于繁琐,周期过长,成本过高;酵母表达系统是目前

最理想的,不但便于培养、便于基因操作、成本低、繁殖快,适合于稳定表达有功能的外源蛋白质,而且可大规模发酵,又可对真核基因产物进行翻译后加工,得到正确折叠、有活性的蛋白。但目前对 LfcinB 在酵母中的表达研究还很少,而且表达量也不够理想,不过酵母表达系统现在已经发展的相当纯熟,经过努力应该是可以克服的。LfcinB 的大规模生物反应器的生产及其在临床治疗和预防某些病原微生物感染的应用值得期待。

### 7.2 食品添加剂

LfcinB 具有以下优点:可调节机体免疫系统活性,增强对疾病的抵抗力;乳化作用,促进脂肪消化吸收;广谱的抗菌性和抗脂质氧化的作用,可用作防霉剂和抗氧化剂。此外,它不含稀有氨基酸和外源化学成分,是健康安全产品。因此,乳铁蛋白肽在绿色、环保、安全性食品添加剂防腐剂方面具有巨大的开发潜质。

### 7.3 饲料添加剂

传统抗生素在养殖业和饲料业中的普遍使用,已成为细菌抗药性、药物残留等问题的根源。目前,研发绿色高效饲料添加剂已成为全球的热潮,抗生素必将被那些有利于人体健康、环境保护和提高养殖效益的新型抗菌剂所取代。LfcinB 广泛的生物学功能和特殊的理化特性,应用在饲料工业中具有独特优势,是新型绿色饲料添加剂的最佳选择。它具有的一些优点,比如其广谱的抗细菌、病毒、真菌作用,可预防和治疗畜禽疾病;耐热性好,如作饲料添加剂,在加工过程中不易变性失活;调节免疫系统活性,可以增强家畜对疾病的抵抗力。因此,乳铁蛋白肽在开发新的绿色、环保等饲料添加剂方面具有重要应用价值,对我国畜牧业可持续发展,乃至对我国国民经济和社会发展都具有重大意义。

总之, LfcinB 在诸多领域存在着巨大的开发潜力,有待于各领域的研究者与企业一同开发。它不但可以解决人们目前生产实践中存在的一些难题,同时也会在市场化的今天带来巨大的商业价值。

## 参考文献:

- [1] JOHANSSON B. Isolation of an iron containing red protein from human milk[J]. Acta Chem Scand, 1960, 14(2): 510-512.
- [2] LEVAVA P, VILJOEN M. Lactoferrin: a general review[J]. Haematological, 1995, 80(3): 252-267.
- [3] LEVY O. Antibiotic proteins of polymorphonuclear leukocytes[J]. Eur J Haematol, 1996, 56(5): 263-277.
- [4] LONNERDAL B, LYER S. Lactoferrin: molecular structure and biological function[J]. Annu Rev Nutr, 1995, 15(1): 93-110.
- [5] TOMITA M, BELLAMY W, TAKASE M, et al. Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin[J]. J Dairy Sci, 1991, 74(12): 4137-4142.

- [6] BELANY W, TA K, YAMAUCHI K, et al. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin[J]. *Bioc-him Biophys Acta*, 1992, 1121(1/2): 130-136.
- [7] ØYSTEIN R, JILL A, LARS H, et al. Construction and synthesis of lactoferricin derivatives with enhanced antibacterial activity[J]. *Journal of Peptide Science*, 1999, 1(5): 32-45.
- [8] VOGEL H, SEHLBLI D, JING W, et al. Towards a structure-function analysis of bovine lactoferricin and related tryptophan- and arginine-containing peptides[J]. *Biochem*, 2002, 80(1): 49-63.
- [9] HWANG P, ZHOU Ning, SHAN Xiao, et al. Three-dimensional solution structure- of lactoferricin B, an antimicrobial peptide derived from bovine lactoferrin[J]. *Biochemistry*, 1998, 37(12): 4288-4298.
- [10] BELLAMY W, TAKASE M, WAKABAYSSHI H, et al. Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin[J]. *J Appl Bacteriol*, 1992, 73(6): 472-479.
- [11] ZHOU Ning, PETER T, HANS J. Molecular dynamics simulations of bovine lactoferricin: turning a helix into a sheet[J]. *BioMetals*, 2004, 17(3): 217-223.
- [12] GIFFORD J, HUNTER H, VOGEL H. Lactoferricin: a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62(22): 2588-2598.
- [13] YI M, KANEKO S, YU D, et al. Hepatitis C virus envelope proteins bind lactoferrin[J]. *J Virol*, 1997, 71(8): 5997-6002.
- [14] LAQUERRE S, ARQNANI R, ANDERSON D, et al. Heparan sulphate proteoglycan binding by herpes simplex virus type I glycoproteins B and C, which differ in their contributions to virus attachment, penetration, and cell-to-cell spread[J]. *J Virol*, 1998, 72(7): 6119-6130.
- [15] ANDERSEN J, GUTTEBERG T J. Lactoferrin and lactoferricin inhibit herpes simplex 1 and 2 infection and exhibit synergy when combined with acyclovir[J]. *Antiviral Res*, 2003, 58(3): 209-215.
- [16] SCHWARZE S, VOCER A, AKBANI A, et al. *in vivo* protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse[J]. *Science*, 1999, 285: 1569-1572.
- [17] MADER J S, SALSMAN J, CONRAD D M, et al. Bovine lactoferricin selectively induces apoptosis in human leukemia and carcinoma cell lines[J]. *Mol Cancer Ther*, 2005, 4(4): 612-624.
- [18] FADOK V, CATHELINEAU A, DALEKE D, et al. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts[J]. *Biol Chem*, 2001, 276(2): 1071-1077.
- [19] RISSO A, ZANETTI M, GENNARO R. Cytotoxicity and apoptosis mediated by two peptides of innate immunity[J]. *Cell Immunol*, 1998, 189(2): 107-115.
- [20] SCHRODER H, BAKALOYA R, ANDRA E. The NK-lysin derived peptide NK-2 preferentially kills cancer cells with increased surface levels of negatively charged phosphatidylserine[J]. *FEBS Lett*, 2005, 579(27): 6128-6134.
- [21] BODIL F, ØYSTEYN R, UHLIN-HANSEN L. The anticancer activity of lytic peptides is inhibited by heparan sulfate on the surface of the tumor cells[J]. *BMC Cancer*, 2009, 9: 183 doi:10.1186/1471-2407-9-183.
- [22] MADER T S, RICHARDSON A, SALSMAN J, et al. Bovine lactoferricin causes apoptosis in Jurkat T-leukemia cells by sequential permeabilization of the cell membrane and targeting of mitochondria[J]. *Experimental Cell Research*, 2007, 313(12): 2634-2650.
- [23] SCHIBILI D J, VOGEL P M, HANS J. The structure of the antimicrobial active center of lactoferricin B bound to sodium dodecyl sulfate micelles[J]. *FEBS Letters*, 1999, 446(2): 213-217.
- [24] SHI Yixin, WEI Kong, NAKAYAMA K. Human lactoferrin binds and removes the hemoglobin receptor protein of the periodontopathogen *Porphyromonas gingivalis*[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(39): 30002-30008.
- [25] 赛非, 谢维, 董雪吟, 等. 抗菌肽 CMIV 末端结构对起活性的影响[J]. *中国科学*, 2000(1): 59-64.
- [26] ULVATNE H, HAUKLAND H H, OLSVIK Q, et al. Lactoferricin B causes depolarization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* ATCC 25922 and fusion of negatively charged liposomes[J]. *FEBS Letters*, 2001, 492(1/2): 62-65.
- [27] HAUKLAND H H, ULVATNE H, SANDVIK K, et al. The antimicrobial peptides lactoferricin B and magainin 2 cross over the bacterial cytoplasmic membrane and reside in the cytoplasm[J]. *FEBS Letters*, 2001, 508(3): 389-393.
- [28] ØRIAN S, HAME H, HAUKLANDA B, et al. Induced resistance to the antimicrobial peptide lactoferricin B in *Staphylococcus aureus*[J]. *FEBS Letters*, 2005, 579(16): 3421-3426.
- [29] PETER M, HWANG N, ZHOU Xishan, et al. Three-dimensional solution structure of lactoferricin B, an antimicrobial peptide derived from bovine lactoferrin[J]. *Biochemistry* 1998, 37(12): 4288-4298.
- [30] MORTEN B, STRØM B, ERIK H, et al. Important structural features of 15-residue lactoferricin derivatives and methods for improvement of antimicrobial activity[J]. *Biochemistry and Cell Biology*, 2002, 80(1): 65-74.
- [31] TORE L, TRINE S, MORTEN B, et al. Prediction of antibiotic activity and synthesis of new pentadecapeptides based on lactoferricins[J]. *J PeptideSci*, 2004, 10(6): 329-335.
- [32] 易俊波, 黄德新, 李凌云, 等. 抗菌肽牛乳铁多肽素(LfcinB)在毕赤酵母中的表达及活性鉴定[J]. *微生物学报*, 2007, 34(2): 265-269.
- [33] 马凤龙, 张瑜, 刘焕珍, 等. 牛乳素 Lfcin B 基因的合成及其在酵母菌中的表达研究[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(2): 446-448.
- [34] 邢芳芳, 印遇龙, 黄瑞林, 等. 重组牛乳铁蛋白素在大肠杆菌中的表达[J]. *食品科学*, 2008, 29(4): 221-224.
- [35] 郭东华, 孙东波, 孙斌, 等. 牛乳铁蛋白肽基因(LfcinB)的合成及其在大肠杆菌中的表达[J]. *农业生物技术学报*, 2009, 17(3): 451-454.
- [36] 张锦霞, 王铁东, 张守峰, 等. 乳铁蛋白肽基因的合成及其在动物乳腺中的表达[J]. *天然产物研究与开发*, 2006(18): 229-233.
- [37] 冯永潜, 查晓军, 翟朝阳. Lactoferricin B 基因与几种变异克隆的构建及其在酿酒酵母中的表达与鉴定[J]. *四川大学学报: 医学版*, 2007, 38(4): 578-582.
- [38] 史芳芳, 王亮, 吕自力, 等. 牛乳铁蛋白多肽的合成及抗菌活性试验[J]. *西北农业学报*, 2009, 18(1): 20-23.