热处理对牛乳铁蛋白促成骨细胞增殖活性影响

刘 猛，杜 明*，孔莹莹，徐伟丽，宋 微，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：从新生SD大鼠乳鼠中提取成骨细胞后，采用MTT法进行细胞增殖实验，比较不同加热处理条件对乳铁蛋白(Lf)促成骨细胞增殖活性的影响。结果表明：未加热乳铁蛋白能显著促进成骨细胞增殖，且在50～500μg/mL范围内呈剂量依赖关系；在24、48、72h不同时间节点上LF对成骨细胞的作用有所差异。与未加热乳铁蛋白相比，65℃/30min和72℃/10s加热处理对乳铁蛋白的活性影响较小；85℃/10min和95℃/10min处理后乳铁蛋白的促成骨活性下降，而且与低质量浓度的实验组相比，热处理对高质量浓度的乳铁蛋白实验组影响较大。

关键词：牛乳；乳铁蛋白；成骨细胞；热处理；增殖

Influence of Heat Treatment on the Osteoblast-promoting Activity of Bovine Lactoferrin

LIU Meng, DU Ming*, KONG Ying-ying, XU Wei-li, SONG Wei, ZHANG Lan-wei
(School of Food Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China)

Abstract: Lactoferrin is a bioactive protein with multiple functions, which, however, are negatively impacted by heat treatment. In the present work, osteoblasts of newborn SD rats were subjected to proliferation tests by MTT method to compare the influence of different heat treatment conditions on the oteoblast-promoting activity of bovine lctoferrin. The results of this study showed that when not subjected to heat treatment, lactoferrin had an evident proliferation-promoting effect on rat osteoblasts in a dose-dependent manner in the range of 50 to 500 μg/mL. Moreover, lactoferrin had different effects on the proliferation of osteoblast at different incubation time of 24, 48 h and 72 h. Compared with the native lactoferrin, the treatments of 65 ℃/30 min and 72 ℃/10 s had only litte effects on the osteoblast-promoting activity of lactoferrin. However, 85 ℃/10 min and 95 ℃/10 min inhibited its activity. The heat treament effect on the the osteoblast-promoting activity of lactoferrin at higher concentrations was greater than at lower concentrations.

Key words: bovine milk; lactoferrin; osteoblast; heat treatment; proliferation
中图分类号：TS201.2 文献标志码：A 文章编号：1002-6630(2013)09-0301-04
doi:10.7506/spkx1002-6630-201309061

乳铁蛋白(Lf)又称乳铁传递蛋白，主要存在于哺乳动物的各种外分泌物中，如乳汁、泪液或唾液等[1]。Lf可以作为一种铁强化剂调控铁的生物利用率，此外，Lf还具有多种其他生物功能，例如抗菌、抗病毒和抗氧化作用，参与机体免疫调节，增强机体抗病能力[2]等。近期，乳铁蛋白被发现具有促骨生长的功效[3-4]。诸多研究表明，Lf既能刺激成骨细胞(osteoblast，OB)增殖，促进成骨细胞增殖与分化、也能抑制破骨细胞生长与活性、诱导破骨细胞(osteoclast，OC)凋亡[5-6]。体内研究表明，乳铁蛋白在骨生长和代谢中起到一定的生理作用，能促进骨骼生长[7]。在乳品加工业中，热处理是最为常见的操作单元，然而迄今为止，热处理对乳铁蛋白活性的影响研究主要集中在抗菌活性等方面。热处理对乳铁蛋白成骨作用的影响报道很少，本实验主要研究热处理(温度和时间)对乳铁蛋白成骨活性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

SD大鼠乳鼠(72h以内)由哈尔滨医科大学第二附属医院提供。

乳铁蛋白(＞94%)、Ⅱ型胶原酶、MTT 美国Sigma公司；α-MEM培养基、胎牛血清 美国Hyclone公司；胰蛋白酶-EDTA消化液 Solarbio公司；二甲基亚砜(DMSO)、巴比妥钠 美国Gibco公司。

收稿日期：2013-04-12
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金项目；中央高校基本科研业务基金项目(HIT.BRETⅢ.201231)
作者简介：刘猛(1988—)，男，硕士研究生，研究方向为食品科学。E-mail：quanyechami@sina.com
*通信作者：杜明(1977—)，男，教授，博士，研究方向为乳品科学。E-mail：duming@hit.edu.cn

倒置式生物显微镜 日本Nikon公司；Eon型酶标仪 美国BioTek公司；HEPA class 100型细胞培养箱 美国Thermo公司。

1.2 方法

1.2.1 成骨细胞分离鉴定

从新生SD大鼠乳鼠中提取成骨细胞，通过形态观察、HE 染色、碱性磷酸酶染色及矿化结节染色来鉴定成骨细胞[8]。

1.2.2 实验分组及热处理

样品分组：Lf低质量浓度组(50μg/mL)、中质量浓度组(100μg/mL)、高质量浓度组(500μg/mL)。热处理条件：62～65℃处理 30min、72℃处理 10s、85℃处理10min以及95℃处理10min。以未经加热的乳铁蛋白(Native-Lf)为对照。

1.2.3 MTT法测定成骨细胞增殖

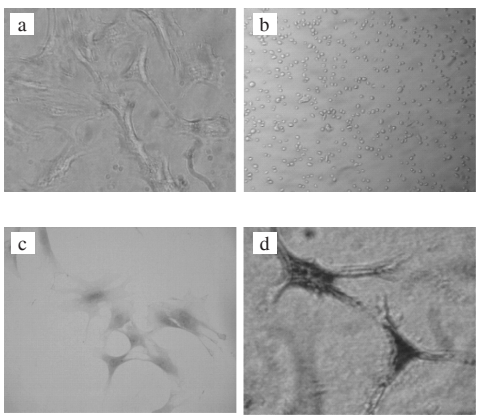
调节细胞质量浓度为每孔1×10^5个/mL接种于96孔培养板中，每孔加入100μL细胞悬液。细胞贴壁后，弃培养液，每孔再加入95μL培养液以及5μL样品溶液。测定前4h，加10μL 0.5mg/mL MTT(pH7.2 0.01mol/L PBS配制)，培养箱中孵育4h。弃去培养液，每孔加150μL DMSO，振荡10min使结晶溶解。波长490nm 处测定OD_{490nm}[9]。

1.2.4 统计学分析及绘图

数据采用 Origin8.0软件进行计算绘图。采用SPSS 17.0统计软件，One-way ANOVA进行显著性检验。数据以$\bar{x}\pm s$表示，$P<0.05$为显著性差异，$P<0.01$为极显著性差异。

2 结果与分析

2.1 成骨细胞的鉴定



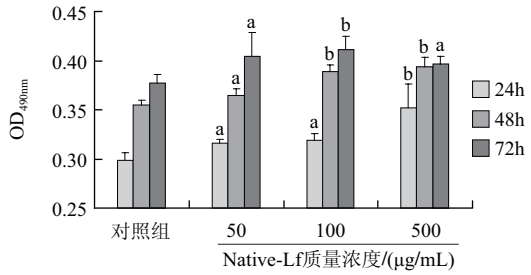
a. 成骨细胞(×250)；b. 传代后(×100)；
c. HE染色(×400)；d. ALP染色(×250)。

图1 SD大鼠乳鼠成骨细胞分离与鉴定

Fig.1 Isolation and identification of osteoblasts from newborn SD rats

倒置显微镜观察成骨细胞，以不规则形、长梭形、三角形为主，相邻细胞彼此贴靠，边界难以分清，结果如图1a所示，HE染色、碱性磷酸酶染色、矿化结节染色分别如图1b～d所示，这些染色结果均表明分离的细胞具有成骨细胞的所有特征[8]。

2.2 Native-Lf对成骨细胞增殖的影响



a.表示在相同时间点，与对照组相比差异显著($P<0.05$)；b.表示在相同时间点，与对照组相比差异极显著($P<0.01$)。下同。

图2 未经过热处理的Lf对成骨细胞增殖的促进作用

Fig.2 Osteoblast-promoting activity of lactoferrin without heat treatment

Native-Lf对成骨细胞增殖作用影响如图2所示，Native-Lf低质量浓度组(50μg/mL)在24、48、72h对成骨细胞增殖具有显著的促进作用；中质量浓度组(100μg/mL)作用细胞24h能显著性促进成骨细胞增殖，48h和72h能极显著促进细胞增殖；高质量浓度组(500μg/mL)在24h和48h能极显著促进细胞增殖，在72h时显著促进成骨细胞增殖。在一定质量浓度范围内，Native-Lf对成骨细胞增殖作用呈剂量依赖关系，这与文献[5,10]报道具有一致性。但24～72h不同时间点表现出的趋势略有不同，24h条件下，高质量浓度 Native-Lf活性最高，与中质量浓度和低质量浓度组差异显著；48h中质量浓度和高质量浓度组Native-Lf活性显著高于低质量浓度组；72h条件下，中质量浓度的活性显著高于低质量浓度组和高质量浓度组。整体上看，随着作用时间的延长，Native-Lf的最佳作用质量浓度有一定的下降趋势。

2.3 不同温度热处理对乳铁蛋白成骨细胞增殖的影响

2.3.1 65℃加热处理Lf对成骨细胞增殖作用影响

Lf经过65℃加热处理30min，对成骨细胞作用结果如图3所示。24h，质量浓度在50～500μg/mL时能显著促进成骨细胞增殖；48h和72h，低质量浓度组可显著促进成骨细胞增殖，在Lf为100μg/mL时能极显著促进成骨细胞增殖。高质量浓度组在48h和72h相对于对照组，有少量增加，但差异不显著。这些结果说明65℃/30min对Lf的活性影响在50～100μg/mL范围内几乎无显著影响，对于高质量浓度组有一定的影响。研究表明，这4种加热参数对于乳铁蛋白热聚集的诱导作用是不同的，随着加热强度的提高，乳铁蛋白的热聚集作用增强。高质量浓度时，

Lf热聚集的趋势相应增强，相应地Lf的生理活性受影响也较为明显。

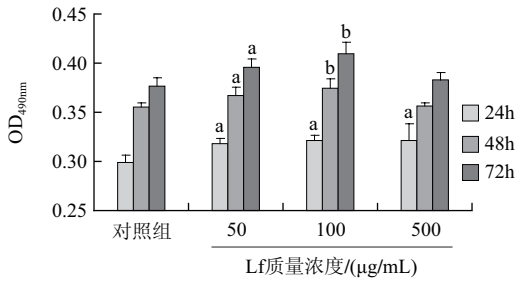


图 3 65℃/30min处理的Lf对成骨细胞增殖的影响

Fig.3 Effect of 65 ℃/30 min on the osteoblast-promoting activity of lactoferrin

2.3.2 72℃加热处理Lf对成骨细胞增殖作用影响

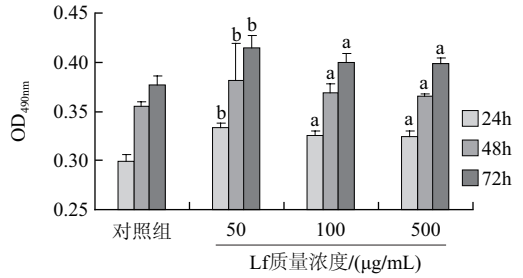


图 4 72 ℃/10s处理LF对成骨细胞增殖的影响

Fig.4 Effect of 72 ℃/10 s on the osteoblast-promoting activity of lactoferrin

Lf经72℃加热处理10s，对成骨细胞增殖作用结果如图4所示。在各个时间点条件下，各质量浓度组均可显著促进成骨细胞增殖，而且低质量浓度组(50μg/mL)显著高于中质量浓度组(100μg/mL)和高质量浓度组(500μg/mL)。整体趋势与未经加热处理的Lf相差不大，这说明72℃/10s对Lf的活性影响相对较小，尤其对于质量浓度较低的情况影响较小。

2.3.3 85℃加热处理Lf对成骨细胞增殖作用影响

Lf经85℃加热处理10min，对成骨细胞增殖作用如图5所示。24h时，低质量浓度组可极显著促进细胞增殖，中质量浓度组与对照组差异显著，高质量浓度组则极显著抑制细胞增殖；48h时，Lf在中低质量浓度时与对照组差异不显著，在高质量浓度时则极显著抑制成骨细胞增殖；72h，低质量浓度组可极显著促进细胞增殖，中质量浓度组时与对照组相比无显著差异，高质量浓度组则显著性抑制成骨细胞增殖。这些结果表明，85℃/10min对Lf活性影响较大，整体上呈下降趋势，在高质量浓度组影响较大。而且在不同时间点，活性表现不同，分析可能是由于Lf对调控成骨细胞增殖的信号通路调控作用不同造成的[11-12]。

成骨细胞的生长分化主要由以丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)细胞信号转导通路介导。主要包括ERK、JNK和p38MAPK 3个亚通路。有研究报导了Lf调控成骨细胞p42/44MAPK等信号转导通路促进成骨细胞分化增殖，并明显地抑制成骨细胞凋亡[12]。因此，有本研究结果推测，Lf对这些信号通路的调控可能发生在不同的阶段，由此造成了上述现象。

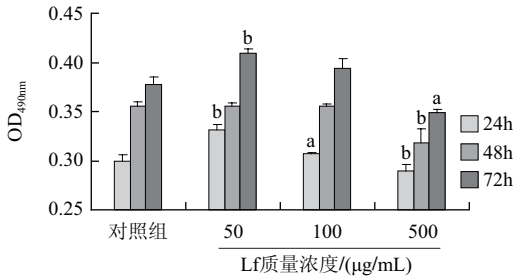


图 5 85℃/10min处理Lf对成骨细胞增殖的影响

Fig.5 Effect of 85 ℃/10 min on the osteoblast-promoting activity of lactoferrin

2.3.4 95℃加热处理Lf对成骨细胞增殖作用影响

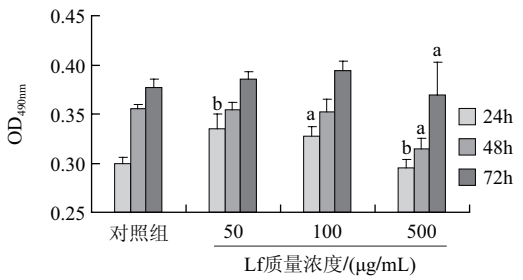


图 6 95℃/10min处理Lf对成骨细胞增殖的影响

Fig.6 Effect of 95 ℃/10 min on the osteoblast-promoting activity of lactoferrin

Lf经95℃加热处理10min，对成骨细胞增殖作用如图6所示。24h时，低、中质量浓度组的Lf可显著性促进成骨细胞增殖，高质量浓度组(500μg/mL)则极显著性抑制成骨细胞增殖；48h与72h时，中低质量浓度组与对照组无显著差异，高质量浓度组显著性抑制成骨细胞增殖；这说明95℃加热处理10min对乳铁蛋白的活性具有明显影响，趋势与85℃/10min处理组相似。

Rüegg等[13]研究发现在pH值为6.6时，Lf在65～69℃时开始失活。研究发现Lf的T_m随pH值减小而降低，当体系pH值由7.0降至3.0时，牛乳乳铁蛋白(bLf)的T_m由70℃变化为39℃，且bLf的变性是不可逆的。程金波等[14]研究发现不同的温度与时间的热处理方式组合可以显著的影响乳中Lf的活性。有研究表明，巴氏杀菌对bLf结构及抗菌活性基本上没影响[15]。另外，蛋白质的结构决定其功能。Lf发挥功能过程中可能以骨桥蛋白(OPN)作为运转载

体[16-17]，并主要通过LRP1/2介导的细胞内吞作用进入成骨细胞[18]，这些蛋白间的相互作用也随着Lf结构的变化而变化。本小组此前的研究报道了Native-Lf的变性温度为73.1℃，当处理温度大于73.1℃时，Lf发生结构变化，与OPN和LRP1等的相互作用也将发生改变，活性也将受到影响。因此本研究中65℃/30min和72℃/10s对Lf活性影响较小，85℃/10min和95℃/10min对Lf活性的影响较大，这些热处理对Lf促成骨活性的影响程度从小到大的顺序为72℃/10s＜65℃/30min＜85℃/10min＜ 95℃/10min。

3 结 论

未经加热处理的乳铁蛋白具有良好的促进成骨细胞增殖活性，在50～500μg/mL可促进成骨细胞增殖，并呈现剂量依赖关系。一定强度的热处理将破坏乳铁蛋白的促成骨活性，随着热处理强度的提高，该活性损失程度逐渐增加。65℃/30min和72℃ 10s对Lf的活性无显著影响，85℃/10min和95℃/10min对Lf成骨活性影响显著，尤其是对高质量浓度的剂量组。不同时间点，Lf对成骨细胞增殖活性的影响表现不同。

参考文献：

[1] BAKER E N, BAKER H M. A structural framework for understanding the multifunctional character of lactoferrin[J]. Biochimie, 2009, 91(1): 3-10.

[2] FARNAUD S, EVANS R W. Lactoferrin: a multifunctional protein with antimicrobial properties[J]. Mol Immunol, 2003, 40(7): 395-405.

[3] NAOT D, GREY A, REID I R, et al. Lactoferrin: a novel bone growth factor[J]. Clin Med Res, 2005: 3(2): 93-101.

[4] CORNISH J, PALMANO K, CALLON K E, et al. Lactoferrin and bone; structure activity relationships[J]. Biochem Cell Biol, 2006, 84(3): 297-302.

[5] 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.

[6] KRUGER M C, POULSEN R C, SCHOLLUM L, et al. A comparison between acidic and basic protein fractions from whey or milk for reduction of bone loss in the ovariectomized rat[J]. International Dairy Journal, 2006, 16(10): 1149-1156.

[7] 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.

[8] 曹阳阳, 张楠楠, 李丹丹, 等. 铁饱和乳铁蛋白对大鼠成骨细胞增殖与分化的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2009, 15(10): 752-755.

[9] 王洪复. 骨细胞图谱与骨细胞体外培养技术[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2001.

[10] 肖晖, 刘宁. 乳铁蛋白对大鼠成骨细胞增殖与分化的影响[J]. 国际骨科学杂志, 2008, 29(3): 198-201.

[11] MAGDALENA C, MARLENA C K. Osteoprotegerin-receptor activator of nuclear factor-κB ligand ratio: a new approach to osteoporosis treatment[J]. Southern Medical Journal, 2004, 97(5): 506-511.

[12] 孔莹莹, 杜明, 刘猛, 等. 乳铁蛋白理化性质及其成骨作用研究进展[J]. 食品科学, 2012, 33(21): 318-322.

[13] RUEGG M. A calorimetric study of the thermal denaturation of whey proteins in simulated milk ultrafiltrate[J]. Journal of Dairy Research, 1977, 82(3): 1082-1085.

[14] 程金波, 王加启, 李珊珊, 等. 不同热处理方式对牛奶中IgG和乳铁蛋白的影响[J]. 华北农学报, 2010, 25(增刊1): 170-174.

[15] 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.

[16] AZUMA N, MAETA A, FUKUCHI K, et al. A rapid method for purifying osteopontin from bovine milk and interaction between osteopontin and other milk proteins[J]. International Dairy Journal, 2006, 16(4): 370-378.

[17] DU Ming, XU Weili, YI Huaxi, et al. Protective effects of bovine colostrum acid proteins on bone loss of ovariectomized rats and the ingredients identification [J]. Mol Nutr Food Res, 2011, 55(2): 220-228.

[18] GREY A, ZHU Q, WATSON M, et al. Lactoferrin potently inhibits osteoblast apoptosis, via an LRP1-independent pathway[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2006, 251(1): 96-102.