

## 论著

## 重组人乳铁蛋白抗氧化活性研究

戴亚妮<sup>1</sup>,于添<sup>1</sup>,朱松<sup>2</sup>,杨雪珍<sup>1</sup>,王建武<sup>1</sup>,马奇明<sup>1</sup>,李玥<sup>3</sup>

(1. 无锡科捷诺生物科技有限责任公司,江苏 无锡 214145; 2. 江南大学 食品科学与技术国家重点实验室,江苏 无锡 214122; 3. 江南大学食品学院,江苏 无锡 214122)

**摘要:**目的 考察重组人乳铁蛋白自身及其在奶粉中的抗氧化活性。方法 通过二苯代苦味肟基(DPPH)自由基抑制率、羟基自由基抑制率、超氧阴离子自由基抑制率、还原能力和抑制大鼠肝脏体外脂质过氧化等试验评价重组人乳铁蛋白和牛乳铁蛋白的体外抗氧化性能。结果 重组人乳铁蛋白和牛乳铁蛋白的浓度与 DPPH 自由基抑制率、抑制羟基自由基能力、抑制超氧阴离子自由基能力和还原能力之间呈明显剂量-效应关系,且差异有统计学意义( $P < 0.05$ );样本和浓度之间没有交互作用,重组人乳铁蛋白和牛乳铁蛋白在不同浓度下所得值的趋势相同。重组人乳铁蛋白和牛乳铁蛋白在对大鼠肝组织匀浆抗氧化性影响差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),不同浓度乳铁蛋白之间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 重组人乳铁蛋白和牛乳铁蛋白具有一定的抗氧化活性,可以添加到保健品或者化妆品中作为天然抗氧化剂。

**关键词:**重组人乳铁蛋白;牛乳铁蛋白;抗氧化活性

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2017)03-0251-06

DOI:10.13590/j.cjfh.2017.03.001

## Study on the antioxidant activity of recombinant human lactoferrin

DAI Ya-ni<sup>1</sup>, YU Tian<sup>1</sup>, ZHU Song<sup>2</sup>, YANG Xue-zhen<sup>1</sup>, WANG Jian-wu<sup>1</sup>, MA Qi-ming<sup>1</sup>, LI Yue<sup>3</sup>

(1. Wuxi KGBIO Technology Company Limited, Jiangsu Wuxi 214145, China; 2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Jiangsu Wuxi 214122, China; 3. College of Food Sciences, Jiangnan University, Jiangsu Wuxi 214122, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the antioxidant activity of recombinant human lactoferrin (rhLF). **Methods** The 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl free radical (DPPH) inhibiting rate, hydroxyl free radical inhibiting rate, superoxide anion radical inhibiting rate, reducing capacity and inhibiting of lipid peroxidation in rat liver were tested to evaluate the antioxidant activity of rhLF and bovine lactoferrin (bLF) in vitro. **Results** The concentration of rhLF and bLF were correlated with the inhibiting rate of 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl free radical, hydroxyl free radical, superoxide anion radical and reducing capacity. There was significantly dose-response relationship and the difference had statistical significance ( $P < 0.05$ ). There was no interaction between sample and concentration, the trend of the value was the same in different concentrations of rhLF and bLF. Antioxidant effect of rhLF and bLF had significant difference in rat liver homogenate, different concentrations of rhLF and bLF had significant difference ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Bovine lactoferrin and rhLF have antioxidant activity, and could be added to health food or cosmetics as a natural antioxidant.

**Key words:** Recombinant human lactoferrin; bovine lactoferrin; antioxidant activity

乳铁蛋白(lactoferrin, LF)是一种多功能蛋白,属于转铁蛋白家族,具有抗菌、抗病毒和抗氧化等

特性<sup>[1]</sup>。由于牛乳中乳铁蛋白的含量极低(20~200 mg/L),致使其分离纯化效率低,成本较高。制备1 t牛乳铁蛋白大约需要14 000 t牛奶。而基因工程动物来源的人乳铁蛋白的表达量远高于牛源乳铁蛋白,能达到平均3.0 g/L,利用基因工程技术生产的重组人乳铁蛋白克服了表达量低的问题<sup>[2]</sup>,通过进一步理化特性、糖基化修饰、体内体外生物学活性研究发现,重组人乳铁蛋白和牛乳铁蛋白具有实质等同性,本研究主要针对重组人乳铁蛋白的体外抗氧化活性。

收稿日期:2017-03-13

基金项目:国家科技重大专项转基因生物新品种培育项目(2012ZX08014002);江苏省自然科学基金项目(BK20160206)

作者简介:戴亚妮 女 中级工程师 研究方向为新药质量控制和功能性学 E-mail:daiyani2004@126.com

通信作者:李玥 女 教授 研究方向为食品生物大分子结构及功能特性 E-mail:liyue@jiangnan.edu.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

SPF级昆明种雄性大白鼠10只,体质量(120.0±2.0)g,购自上海思瑞达生物科技有限公司[许可证号:SCXK(沪)2005-0008]。实验动物在江南大学实验动物中心SPF级动物房[许可证号:SCXK(苏)2012-0002]内单笼饲养,室温20~22℃,相对湿度46%~50%。

#### 1.1.2 主要仪器与试剂

UV-1100型紫外可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司)、DF-101S集热式磁力加热搅拌器、电热恒温鼓风干燥箱、旋转蒸发仪、磁力搅拌器、真空干燥箱、分析天平。

重组人乳铁蛋白冻干粉(无锡科捷诺生物科技有限责任公司,20150925),纯度>95%;牛乳铁蛋白(LKT L0209),二苯代苦味肼基(DPPH, CAS-1898-66-4)自由基均购自美国Sigma;丙二醛测定试剂盒(南京建成生物工程研究所, A003-1);无水乙醇、硫酸亚铁(FeSO<sub>4</sub>)、水杨酸、过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、邻苯三酚、铁氰化钾。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 抑制DPPH自由基能力测定方法<sup>[3]</sup>

取不同浓度(2、4、6、8、10 mg/ml)重组人乳铁蛋白和牛乳铁蛋白溶液2 ml,加入等体积0.1 mmol/L DPPH溶液(用无水乙醇配制),混匀后在室温下避光反应30 min,于517 nm下测定吸光度A<sub>i</sub>。空白对照组为2 ml样品液加上2 ml无水乙醇,测定517 nm处吸光值A<sub>j</sub>。模型对照组为2 ml DPPH溶液加上2 ml无水乙醇,测定517 nm处吸光值A<sub>0</sub>。平行测定3次取平均值。样品对DPPH自由基抑制率的计算公式为:

$$\text{抑制率} = [1 - (A_i - A_j) / A_0] \times 100\%$$

#### 1.2.2 抑制羟基自由基能力测定方法<sup>[4]</sup>

本试验采用Fenton反应体系检测不同浓度乳铁蛋白样品抑制羟基自由基的效果,反应体系中含9 mmol/L FeSO<sub>4</sub>、9 mmol/L水杨酸(用无水乙醇配制)和不同浓度(2、4、6、8、10 mg/ml)的重组人乳铁蛋白和牛乳铁蛋白溶液,其体积都为1 ml。以蒸馏水为参比,加入H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>启动反应,37℃反应30 min,在510 nm处测量反应体系的吸光度A<sub>x</sub>。将蛋白溶液换成水,测定模型对照组的吸光度A<sub>0</sub>。考虑到蛋白本身的吸光度值,以等体积(1 ml)9 mmol/L FeSO<sub>4</sub>、9 mmol/L水杨酸-乙醇、不同浓度的蛋白溶液和蒸馏水的混合物作为蛋白的本底吸收值A<sub>x0</sub>。平行测定3次取平均值。样品对羟基自由基抑制率

的计算公式为:

$$\text{抑制率} = [1 - (A_x - A_{x0}) / A_0] \times 100\%$$

#### 1.2.3 抑制超氧阴离子能力测定方法<sup>[5]</sup>

取4.5 ml Tris-HCl缓冲液(50 mmol/L, pH=8.2)和4.2 ml蒸馏水混匀,25℃水浴下保温20 min,取出后立即加入25℃预热过的3 mmol/L邻苯三酚1 ml(以10 mmol/L HCl配制,空白调零管为10 mmol/L HCl代替邻苯三酚HCl溶液),迅速摇匀,倒入比色皿(光径为1 cm),在325 nm处每隔30 s测定一次吸光值,线性范围内每分钟吸光值的增加值即为邻苯三酚的自氧化速率(A<sub>1</sub>)。

取4.5 ml Tris-HCl缓冲液和不同浓度(2、4、6、8、10 mg/ml)蛋白溶液4.2 ml混匀,其他步骤同上,线性范围内每分钟吸光值的增加值即为加样品后邻苯三酚的自氧化速率(A<sub>2</sub>)。平行测定3次。样品对超氧阴离子自由基抑制率的计算公式为:

$$\text{抑制率} = (A_1 - A_2) / A_1 \times 100\%$$

#### 1.2.4 还原能力测定方法<sup>[6]</sup>

反应体系为2 ml不同浓度(1、2、4、6、8、10 mg/ml)蛋白样品,2 ml 0.2 mol/L磷酸盐缓冲液(pH=6.6),2 ml 1%铁氰化钾溶液,在50℃水浴中反应20 min后,再加入2 ml 10%三氯乙酸溶液。取2 ml反应液,分别加入2 ml去离子水和0.4 ml 0.1%三氯化铁溶液,10 min后于700 nm下测定吸光值。

#### 1.2.5 抑制大鼠肝脏体外脂质过氧化试验<sup>[7]</sup>

在温育条件下,组织匀浆发生自氧化反应产生氧自由基,进而攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸,诱导脂质过氧化反应,产生脂质过氧化物。脂质过氧化反应不仅促使活性氧向脂质分解产物转化,而且还经链式或支链式反应途径,增强活性氧作用,因此初始的一个活性氧能够诱导产生大量脂质分解产物,其中一部分分解产物有害,能导致细胞损伤,甚至死亡;因此,通过检测不同处理匀浆中丙二醛的产生量判断组织内脂质过氧化的程度和细胞损伤的程度。

取0.2 ml 10%肝脏匀浆液和0.1 ml不同浓度(2、4、6、8、10 mg/ml)蛋白样品溶液,于试管中混匀,接着于37℃反应1 h,冰浴冷却,然后参照丙二醛检测试剂盒方法<sup>[7]</sup>测定吸光值(532 nm),并计算丙二醛含量。对照组以等体积生理盐水代替样品溶液。

### 1.3 统计学分析

数据以平均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ )的形式表示,用Excel软件对组间差异进行方差分析,以P<0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 重组人乳铁蛋白和牛乳铁蛋白抑制 DPPH 自由基能力

DPPH 法是一种快速、简便、灵敏、可行的评价天然抗氧化剂抗氧化活性的方法,在国内外应用广泛。DPPH 自由基抑制作用的原理为 DPPH 自由基是一种具有稳定的未配对电子的化合物,在 517 nm 处有一强吸收,使其乙醇溶液呈深紫色,而当存在自由基抑制剂时,由于单电子的配对作用而使吸收逐渐消失褪色,褪色程度与其接受的电子数量成比例关系。由表 1 可知,不同浓度的重组人乳铁蛋白和牛乳铁蛋白样品对 DPPH 自由基

表 1 重组人乳铁蛋白和牛乳铁蛋白抑制 DPPH 自由基能力 ( $\bar{x} \pm s, n = 3, \%$ )

Table 1 RhLF and bLF inhibition ability of DPPH free radical

| 项目      | 浓度/(mg/ml)   |              |              |              |              |
|---------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|         | 2            | 4            | 6            | 8            | 10           |
| 重组人乳铁蛋白 | 15.98 ± 0.14 | 23.87 ± 1.02 | 32.85 ± 0.68 | 40.75 ± 1.70 | 49.85 ± 0.65 |
| 牛乳铁蛋白   | 20.99 ± 0.21 | 32.24 ± 0.98 | 38.35 ± 1.56 | 41.77 ± 0.78 | 52.57 ± 0.97 |

表 2 重组人乳铁蛋白和牛乳铁蛋白抑制 DPPH 自由基能力方差分析

Table 2 Variance analysis of rhLF and bLF inhibition ability of DPPH free radical

| 差异源 | SS       | df | MS     | F      | P                        | F <sub>crit</sub> |
|-----|----------|----|--------|--------|--------------------------|-------------------|
| 样本  | 153.68   | 1  | 153.68 | 104.24 | 2.23 × 10 <sup>-9</sup>  | 4.35              |
| 列   | 3 738.94 | 4  | 934.74 | 634.03 | 9.39 × 10 <sup>-21</sup> | 2.87              |
| 交互  | 47.27    | 4  | 11.82  | 8.02   | 5.01 × 10 <sup>-4</sup>  | 2.87              |
| 内部  | 29.49    | 20 | 1.47   | —      | —                        | —                 |
| 合计  | 3 969.38 | 29 | —      | —      | —                        | —                 |

注:SS 表示离均差平方和,代表数据的总变异;df 表示自由度;MS 表示平均的离均差平方和,即均方;F 表示方差分析求出的统计量;P 值根据 F 值而得;F<sub>crit</sub> 表示 F 值的标准,即 F 值大于 crit 时表示差异有统计学意义,P < 0.05;—表示该项不统计

### 2.2 重组人乳铁蛋白和牛乳铁蛋白抑制羟基自由基能力

在耗氧生物代谢过程中,羟基自由基是氧化性最强的氧自由基,可以与大部分生物大分子发生各种化学反应,其化学反应速率常数较高,会造成膜脂、蛋白质和核酸的氧化损伤,使细胞衰老、死亡并

表 3 重组人乳铁蛋白和牛乳铁蛋白抑制羟基自由基能力 ( $\bar{x} \pm s, n = 3, \%$ )

Table 3 RhLF and bLF inhibition ability of hydroxyl radicals

| 项目      | 浓度/(mg/ml)   |              |              |              |              |
|---------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|         | 2            | 4            | 6            | 8            | 10           |
| 重组人乳铁蛋白 | 12.94 ± 0.17 | 23.79 ± 0.17 | 29.93 ± 0.82 | 34.56 ± 0.34 | 44.92 ± 0.48 |
| 牛乳铁蛋白   | 15.14 ± 0.20 | 27.53 ± 0.60 | 34.80 ± 0.19 | 45.33 ± 1.11 | 50.80 ± 1.31 |

### 2.3 重组人乳铁蛋白和牛乳铁蛋白抑制超氧阴离子能力

超氧阴离子自由基性质虽不活泼,却可通过歧化反应等途径产生 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和羟基自由基,是生物体系中自由基的来源。人体内的超氧阴离子自由基一旦与羟基结合,其产物会对细胞 DNA 造成损

的抑制能力不同,随着样品浓度的增加,对 DPPH 自由基抑制率也逐渐增加,浓度与抑制率之间呈剂量-效应关系,但在相同的浓度下,牛乳铁蛋白的抑制率要高于重组人乳铁蛋白,如在 10 mg/ml 浓度下,牛乳铁蛋白的 DPPH 自由基抑制率为 52.57%,而重组人乳铁蛋白为 49.85%。表 2 方差分析结果表明,重组人乳铁蛋白和牛乳铁蛋白在抑制 DPPH 自由基能力方面差异有统计学意义(P < 0.05);不同浓度乳铁蛋白之间差异有统计学意义(P < 0.05);样本和浓度之间没有交互作用,说明重组人乳铁蛋白和牛乳铁蛋白在不同浓度下所得值的趋势相同。

导致机体病变,危害性较大。研究<sup>[8]</sup>表明,能促使 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 产生羟基自由基的体系有烟酰胺腺嘌呤二核苷酸-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 体系、Fenton 反应体系、抗坏血酸-Cu<sup>2+</sup> 体系、还原性谷胱甘肽-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 体系、邻菲罗啉-抗坏血酸-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 体系等。由表 3 可知,重组人乳铁蛋白和牛乳铁蛋白具有较好的抑制羟基自由基的能力,且随着浓度的增加,对羟基自由基的抑制能力也逐渐增强,呈现良好的剂量-效应关系,但在相同的浓度下,牛乳铁蛋白的抑制率要略高于重组人乳铁蛋白,如在 10 mg/ml 浓度下,牛乳铁蛋白的羟基自由基抑制率为 50.80%,而重组人乳铁蛋白为 44.92%。表 4 方差分析结果表明,重组人乳铁蛋白和牛乳铁蛋白在抑制羟基自由基能力方面差异有统计学意义(P < 0.05);不同浓度乳铁蛋白之间差异有统计学意义(P < 0.05);同时考虑不同样品和不同浓度两个因素时,所得结果之间差异有统计学意义(P < 0.05)。

坏,使人体正常机能遭到破坏。不仅超氧阴离子自由基自身通过化学反应产生毒害作用,其衍生的自由基也具有细胞毒性,会对细胞 DNA 和细胞膜造成损伤。由表 5 可知,在 2 ~ 10 mg/ml 浓度范围内,随着蛋白溶液浓度的增加,抑制超氧阴离子能力也逐渐增强,蛋白浓度与超氧阴离子自由基

表4 重组人乳铁蛋白和牛乳铁蛋白抑制羟基自由基能力方差分析

Table 4 Variance analysis of rhLF and bLF inhibition ability of hydroxyl radicals

| 差异源 | SS       | df | MS       | F        | P                      | F crit |
|-----|----------|----|----------|----------|------------------------|--------|
| 样本  | 179.34   | 1  | 179.34   | 266.73   | $4.96 \times 10^{-13}$ | 4.35   |
| 列   | 4 220.62 | 4  | 1 055.15 | 1 569.32 | $1.15 \times 10^{-24}$ | 2.87   |
| 交互  | 26.81    | 4  | 6.70     | 9.97     | $1.32 \times 10^{-4}$  | 2.87   |
| 内部  | 13.45    | 20 | 0.67     | —        | —                      | —      |
| 合计  | 4 440.22 | 29 | —        | —        | —                      | —      |

注:SS表示离均差平方和,代表数据的总变异;df表示自由度;MS表示平均的离均差平方和,即均方;F表示方差分析求出的统计量;P值根据F值得;F crit表示F值的标准,即F值大于crit时表示差异有统计学意义, $P < 0.05$ ;—表示该项不统计

表5 重组人乳铁蛋白和牛乳铁蛋白抑制超氧阴离子自由基能力( $\bar{x} \pm s, n=3, \%$ )

Table 5 RhLF and bLF inhibition ability of superoxide anion radical

| 项目      | 浓度/(mg/ml)      |                  |                  |                  |                  |
|---------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|         | 2               | 4                | 6                | 8                | 10               |
| 重组人乳铁蛋白 | $9.43 \pm 0.27$ | $14.96 \pm 0.05$ | $24.03 \pm 0.02$ | $31.98 \pm 0.12$ | $41.26 \pm 0.23$ |
| 牛乳铁蛋白   | $9.45 \pm 0.08$ | $15.09 \pm 0.10$ | $25.07 \pm 0.12$ | $32.44 \pm 0.14$ | $44.19 \pm 0.11$ |

表6 重组人乳铁蛋白和牛乳铁蛋白抑制超氧阴离子自由基能力方差分析

Table 6 Variance analysis of rhLF and bLF inhibition ability of superoxide anion radical

| 差异源 | SS       | df | MS       | F         | P                      | F crit |
|-----|----------|----|----------|-----------|------------------------|--------|
| 样本  | 6.29     | 1  | 6.29     | 205.00    | $5.66 \times 10^{-12}$ | 4.35   |
| 列   | 4 246.36 | 4  | 1 061.59 | 34 583.24 | $4.38 \times 10^{-38}$ | 2.87   |
| 交互  | 8.61     | 4  | 2.15     | 70.10     | $1.77 \times 10^{-11}$ | 2.87   |
| 内部  | 0.61     | 20 | 0.03     | —         | —                      | —      |
| 合计  | 4 261.88 | 29 | —        | —         | —                      | —      |

注:SS表示离均差平方和,代表数据的总变异;df表示自由度;MS表示平均的离均差平方和,即均方;F表示方差分析求出的统计量;P值根据F值得;F crit表示F值的标准,即F值大于crit时表示差异有统计学意义, $P < 0.05$ ;—表示该项不统计

## 2.4 重组人乳铁蛋白和牛乳铁蛋白的还原能力

还原能力是抗氧化物质提供电子能力的重要指标,还原能力强的样品是良好的电子供体,可以

抑制率之间呈剂量-效应关系,但在相同浓度下,牛乳铁蛋白的抑制率要略高于重组人乳铁蛋白,如在10 mg/ml浓度下,牛乳铁蛋白的超氧阴离子自由基抑制率为44.19%,而重组人乳铁蛋白为41.26%。表6方差分析结果表明,重组人乳铁蛋白和牛乳铁蛋白在抑制超氧阴离子能力方面差异有统计学意义( $P < 0.05$ );不同浓度乳铁蛋白之间差异有统计学意义( $P < 0.05$ );同时考虑不同样品和不同浓度两个因素时,所得结果之间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

通过提供电子使自由基变为稳定的物质,以中断自由基的连锁反应。有研究<sup>[6]</sup>已证实抗氧化活性同还原能力之间呈正相关关系。通常认为样品在波长700 nm处的吸光值越大,其还原能力越强。由表7可知,重组人乳铁蛋白和牛乳铁蛋白的浓度与还原能力之间呈较明显的剂量-效应关系,同一浓度下,两者之间的还原能力基本相当。表8方差分析结果表明,重组人乳铁蛋白和牛乳铁蛋白在还原能力方面差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),而重组人乳铁蛋白和牛乳铁蛋白之间差异无统计学意义( $P > 0.05$ );不同浓度乳铁蛋白之间差异有统计学意义( $P < 0.05$ );样本和浓度之间没有交互作用,说明重组人乳铁蛋白和牛乳铁蛋白在不同浓度下所得值的趋势相同。

表7 重组人乳铁蛋白和牛乳铁蛋白的还原能力( $\bar{x} \pm s, n=3, \%$ )

Table 7 Reducing capacity of rhLF and bLF

| 项目      | 浓度/(mg/ml)        |                   |                   |                   |                   |                   |
|---------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|         | 1                 | 2                 | 4                 | 6                 | 8                 | 10                |
| 重组人乳铁蛋白 | $0.025 \pm 0.003$ | $0.119 \pm 0.005$ | $0.224 \pm 0.005$ | $0.355 \pm 0.007$ | $0.422 \pm 0.029$ | $0.554 \pm 0.011$ |
| 牛乳铁蛋白   | $0.032 \pm 0.005$ | $0.115 \pm 0.009$ | $0.219 \pm 0.009$ | $0.366 \pm 0.018$ | $0.423 \pm 0.015$ | $0.549 \pm 0.009$ |

表8 重组人乳铁蛋白和牛乳铁蛋白的还原能力方差分析

Table 8 Variance analysis of reducing capacity of rhLF and bLF

| 差异源 | SS                    | df | MS                    | F      | P                      | F crit |
|-----|-----------------------|----|-----------------------|--------|------------------------|--------|
| 样本  | $4.69 \times 10^{-6}$ | 1  | $4.69 \times 10^{-6}$ | 0.02   | 0.89                   | 4.26   |
| 列   | 1.16                  | 5  | 0.23                  | 970.45 | $7.28 \times 10^{-27}$ | 2.62   |
| 交互  | $3.51 \times 10^{-4}$ | 5  | $7.03 \times 10^{-5}$ | 0.29   | 0.91                   | 2.62   |
| 内部  | $5.74 \times 10^{-3}$ | 24 | $2.39 \times 10^{-4}$ | —      | —                      | —      |
| 合计  | 1.17                  | 35 | —                     | —      | —                      | —      |

注:SS表示离均差平方和,代表数据的总变异;df表示自由度;MS表示平均的离均差平方和,即均方;F表示方差分析求出的统计量;P值根据F值得;F crit表示F值的标准,即F值大于crit时表示差异有统计学意义, $P < 0.05$ ;—表示该项不统计

### 2.5 重组人乳铁蛋白和牛乳铁蛋白抑制大鼠肝脂质体外脂质过氧化试验

由表 9 可知,重组人乳铁蛋白和牛乳铁蛋白在 2~10 mg/ml 浓度范围内,随着样品浓度的增大,抑制率逐渐增强,在 10 mg/ml 时,牛乳铁蛋白抑制率可达到 52.34%,而重组人乳铁蛋白也能达到 48.05%,表明重组人乳铁蛋白和牛乳铁蛋白对肝组织自发性丙二醛生成有明显的抑制作用,牛乳铁蛋白的抑制能力略高于重组人乳铁蛋白。表 10 方差分析结果表明,重组人乳铁蛋白和牛乳铁蛋白在对大鼠肝组织匀浆抗氧化性影响方面差异有统计学意义( $P < 0.05$ );不同浓度乳铁蛋白之间也差异有统计学意义( $P < 0.05$ );同时考虑不同样品和不同浓度两个因素时,所得结果之间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表 9 重组人乳铁蛋白和牛乳铁蛋白对大鼠肝组织匀浆抗氧化性影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 9 Antioxidant effect of rat liver homogenate of rhLF and bLF

| 组别      | 浓度 / (mg/ml) | 抑制率 / %      | 丙二醛生成量 / (nmol/mg pro) |
|---------|--------------|--------------|------------------------|
| 对照组     | —            | —            | 4.47 ± 0.13            |
|         | 10           | 52.34 ± 0.83 | 1.66 ± 0.10            |
|         | 8            | 41.80 ± 1.31 | 2.12 ± 0.12            |
| 牛乳铁蛋白   | 6            | 28.01 ± 0.32 | 2.84 ± 0.07            |
|         | 4            | 17.81 ± 1.00 | 3.44 ± 0.08            |
|         | 2            | 13.50 ± 0.96 | 3.76 ± 0.13            |
|         | 10           | 48.05 ± 0.99 | 2.01 ± 0.08            |
| 重组人乳铁蛋白 | 8            | 33.49 ± 1.00 | 2.57 ± 0.09            |
|         | 6            | 21.32 ± 0.82 | 3.23 ± 0.08            |
|         | 4            | 14.05 ± 0.76 | 3.75 ± 0.09            |
|         | 2            | 7.48 ± 0.40  | 3.95 ± 0.13            |

注:—表示该项不统计

表 10 重组人乳铁蛋白和牛乳铁蛋白对大鼠肝组织匀浆抗氧化性影响方差分析  
Table 10 Variance analysis of antioxidant effect of rat liver homogenate of rhLF and bLF

| 差异源 | SS       | df | MS       | F        | P                      | F crit |
|-----|----------|----|----------|----------|------------------------|--------|
| 样本  | 253.34   | 1  | 253.34   | 216.14   | $3.48 \times 10^{-12}$ | 4.35   |
| 列   | 6 293.35 | 4  | 1 573.34 | 1 342.32 | $5.43 \times 10^{-24}$ | 2.87   |
| 交互  | 20.32    | 4  | 5.08     | 4.34     | 0.01                   | 2.87   |
| 内部  | 23.44    | 20 | 1.17     | —        | —                      | —      |
| 合计  | 6 590.47 | 29 | —        | —        | —                      | —      |

注:SS 表示离均差平方和,代表数据的总变异;df 表示自由度;MS 表示平均的离均差平方和,即均方;F 表示方差分析求出的统计量;P 值根据 F 值得;F crit 表示 F 值的标准,即 F 值大于 crit 时表示差异有统计学意义, $P < 0.05$ ;—表示该项不统计

### 3 讨论

乳铁蛋白是一种天然抗氧化剂,能防止皮肤发炎及感染,降低自由基对皮肤弹性蛋白的破坏,延缓衰老。乳铁蛋白对青少年的青春痘、粉刺等问题具有改善效果<sup>[9-10]</sup>。用于婴幼儿配方食品或者其他强化食品中,脂肪氧化受到金属离子铁、铜的催化,加入乳铁蛋白后,其抗氧化活性增强,并延长了食品货架期<sup>[11-15]</sup>。正常情况下,细胞内抗氧化防御系统使自由基的产生和清除保持一种动态平衡,不会引起机体组织细胞的损伤。但在某些特定条件下,自由基异常增多或机体组织抗氧化能力下降,造成机体内氧自由基过剩,引发脂质过氧化反应,导致 DNA 损伤、癌发生及形成与老年病有关的羰基化合物,促进多种疾病发生和机体老化。近年来,国外许多流行病学调查结果认为,机体铁储存水平升高是导致动脉粥样硬化和冠心病的一种重要危险因素。乳铁蛋白体内抗氧化的机理主要通过螯合三价铁离子,阻断氧自由基生成,抑制由铁引起的脂质氧化反应和其后的组织损伤,发挥抗氧化作用,保护机体免受金属离子诱导的氧化损伤,从而达到预防和治疗动脉粥样硬化和冠心病的目的<sup>[16-17]</sup>。

关于自由基的生物医学理论认为,正常机体内氧自由基的产生与清除处于平衡状态,当体内产生过量自由基时,会导致糖类、蛋白质、氨基酸以及脂类等物质的氧化性损伤,从而导致细胞坏死或突变。研究<sup>[18]</sup>表明,过量自由基能导致衰老、肿瘤、心脑血管疾病、免疫系统功能减退;因此,人们越来越认识到清除体内过剩自由基的重要性,清除自由基能力也被认为是一种物质抗氧化活性强弱的评判指标。

本研究发现重组人乳铁蛋白和牛乳铁蛋白的浓度与抑制 DPPH 自由基能力、抑制超氧阴离子自由基能力、抑制羟基自由基能力、还原能力之间呈明显的剂量-效应关系,且差异有统计学意义( $P < 0.05$ );样本和浓度之间没有交互作用,重组人乳铁蛋白和牛乳铁蛋白在不同浓度下所得值的趋势相同。重组人乳铁蛋白和牛乳铁蛋白在对大鼠肝组织匀浆抗氧化性影响方面差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),不同浓度乳铁蛋白之间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

天然安全的抗氧化剂已经成为食品科技研究的热门话题之一,在前期研究的基础上,本研究比较考察了重组人乳铁蛋白和牛乳铁蛋白在抗氧化活性方面差异,发现两者抗氧化活性相当,但牛乳

铁蛋白原料在牛乳中表达有限,且价格约为1万元/kg,市场供不应求。重组人乳铁蛋白平均含量在1~3 g/L,分析纯化过程不添加任何有机物质,天然无污染,且制备成本低,用重组人乳铁蛋白代替高昂的牛乳铁蛋白作为营养强化剂添加到食品、保健食品、化妆品等具有广阔的应用前景,尽管没有任何食品安全风险,重组人乳铁蛋白获得审批仍需要一个过程。

## 参考文献

- [ 1 ] 郭长红,曹劲松.口服乳铁蛋白生理功效、保健机理及应用于食品的最新进展[J].食品科技,2005(11):86-90.
- [ 2 ] 赵建敏,王建武,孟如杰,等.转基因牛乳中重组人乳铁蛋白中试纯化工艺的建立及其活性分析[J].中国生物制品学杂志,2015,28(2):182-189.
- [ 3 ] ZHU K X,ZHOU H M,QIAN H F. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase [J]. Process Biochemistry, 2006, 41 (6): 1296-1302.
- [ 4 ] LI Y H,JIANG B,ZHANG T, et al. Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH) [J]. Food Chemistry, 2008, 106(2): 444-450.
- [ 5 ] YUAN J F,ZHANG Z Q,FAN Z C, et al. Antioxidant effects and cytotoxicity of three purified polysaccharides from Ligusticum chuanxiong Hort [J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 74 (4): 822-827.
- [ 6 ] 荣建华,李小定,谢笔钧.大豆肽体外抗氧化效果的研究[J].食品科学,2002,23(11):118-120.
- [ 7 ] ZHANG J H,ZHANG H,WANG L, et al. Antioxidant activities of the rice endosperm protein hydrolysate: identification of the active peptide [J]. European Food Research and Technology, 2009, 229(4): 709-719.
- [ 8 ] WANG W F, LUO J, YAO S D, et al. Interaction of phenolic antioxidants and hydroxyl radicals [J]. Radiation Physics and Chemistry, 1993, 42(4): 985-987.
- [ 9 ] VALENTI P, BERLUTTI F, CONTE M P, et al. Lactoferrin functions: current status and perspectives [J]. J Clin Gastroenterol, 2004, 38(6 Suppl): 127-129.
- [ 10 ] 陈连军,骆肖群,吴文育,等.复方乳铁蛋白-乳酸过氧化酶洗剂及其乳霜治疗寻常型痤疮的前瞻性研究[J].中国临床药理学杂志,2006,15(3):179-182.
- [ 11 ] 李婷,王彩云,闫序东,等.乳铁蛋白体外抗氧化性的研究[J].食品科学,2012,33(21):111-113.
- [ 12 ] 黎庆,刘建垒,景浩.卵转铁蛋白和乳铁蛋白的氧化稳定性的比较研究[J].食品工业科技,2016,37(5):91-97.
- [ 13 ] 朱松,马朝阳,艾连中,等.酶促乙酰化 EGCG 清除自由基及抗脂质过氧化活性研究[J].现代食品科技,2013,30(1):22-27.
- [ 14 ] 朱松,姜在祥,马朝阳,等.酶法制备乙酰化 EGCG 在油脂中的抗氧化性能研究[J].食品工业科技,2013,34(14):94-98.
- [ 15 ] 刘晶,苗颖,赵征.乳清蛋白肽抗氧化活性的研究进展[J].中国乳品工业,2011,39(4):31-35.
- [ 16 ] MULDER A M, CONNELLAN P A, OLIVER C J, et al. Bovine lactoferrin supplementation supports immune and antioxidant status in healthy human males [J]. Nutr Res, 2008, 28(9): 583-589.
- [ 17 ] SAFAEIAN L, JAVANMARD S H, MOLLANOORI Y, et al. Cytoprotective and antioxidant effects of human lactoferrin against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells [J]. Adv Biomed Res, 2015, 31(4): 188.
- [ 18 ] REED T T. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2011, 51(7): 1302-1319.

## · 资讯 ·

### 印度发布与食品接触冰的指南

2017年4月27日,印度食品安全标准局(FSSAI)发布了关于与食品接触冰的指南,指南中明确了任何用于保藏、贮存、运输食品及与食品接触的冰及冰块均需符合该国关于可食用冰的微生物要求,即食品标准和添加剂法规,2011(FSS)附录B中关于可食用冰的相关规定。

(摘自食品伙伴网,相关链接:<http://news.foodmate.net/2017/05/427483.html>)