

• 综述 •

乳铁蛋白在口腔领域的研究进展

周恬 康娜*

(广西医科大学附属口腔医院重点实验室 广西 南宁 530021)

[摘要] 乳铁蛋白是一种具有多种生理功能的非血红素铁结合性糖蛋白,在抗炎、抗菌、抗病毒、抗肿瘤以及免疫调节方面均有重要作用。乳铁蛋白能促进骨骼生长,在生理浓度下能有效刺激成骨细胞增殖和分化,抑制破骨细胞形成。本文对乳铁蛋白在口腔领域的研究进展进行综述,以期对乳铁蛋白有较全面地了解。

[关键词] 乳铁蛋白 正畸 牙周病 口腔 骨吸收

[文献标识码] A **[文章编号]** 1671—7651(2019)08—0730—04

[doi] 10.13701/j.cnki.kqxyj.2019.08.002

Research Progress of Lactoferrin in Stomatology Medical Domain. ZHOU Tian, KANG Na*. *State Key Laboratory of Oral Diseases, Affiliated Stomatological Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China.*

[Abstract] Lactoferrin is a non-heme and iron-binding glycoprotein with various physiological functions, which plays an important role in anti-inflammatory, anti-bacterial, anti-viral, anti-tumor, and immune regulation. Lactoferrin can promote bone growth, effectively stimulate the proliferation and differentiation of osteoblasts and inhibit the formation of osteoclasts under physiological concentrations. In this article, the research progress of lactoferrin in stomatology medical domain is reviewed in order to give a comprehensive understanding of lactoferrin.

[Key words] lactoferrin orthodontics periodontal disease oral cavity bone resorption

乳铁蛋白(lactoferrin, LF)是一种分子量为70000~80000的糖蛋白,由689个氨基酸残基组成。LF于1960年首先由Groves^[1]从牛乳中分离获得。它由哺乳动物外分泌腺的上皮细胞分泌,广泛存在于乳汁、唾液、汗液等外分泌液或血浆、中性粒细胞中,属于转铁蛋白家族^[2]。研究表明,LF具有抗微生物、免疫调节和抗炎等多种功能^[3]。此外,LF能够促进骨形成及抑制骨吸收,可以作为一种新型骨生长因子,通过调节骨的生长代谢从而促进骨骼的生长。随着分离精制技术不断完善,其制作工艺主要有离子交换色谱法、亲和色谱法、固定化单系抗体法和超滤法。安全性方面,Yamauchi等^[4]进行了大鼠急性口毒性及遗传毒性实验,各项组织病理学检查均未发现异常。在细菌反向突变实验中,牛源性LF没有展示出任何诱变潜能,证明牛源性LF具有良好的食用安全性^[5]。由于LF兼具抗菌和多种生物学功能,现已广泛应用于食品、医疗等领域^[6]。

1 乳铁蛋白在口腔领域的应用

1.1 乳铁蛋白与口外骨缺损修复 口腔颌面部外伤、肿瘤、炎症等均可能导致严重的颌骨缺损,目前多采用自体骨、异

体骨和人工合成骨移植进行修复,但是由于供体部位的缺损、来源有限以及不可避免的高并发症发生率等原因,利用组织工程学原理治疗骨缺损已成为该领域的研究热点。近年来,多项研究结果已经证实,LF具有体外和体内的骨合成代谢活性。LF诱导成骨细胞样细胞的增殖和分化,抑制体外破骨细胞的生成。LF在成骨细胞样细胞中的有丝分裂作用主要由低密度脂蛋白受体蛋白-1介导,牛源性LF和人源性LF在骨细胞中的作用类似^[7]。王卒平等^[8]通过体外培养关节炎软骨组织的关节软骨细胞,在实验组细胞培养液中加入不同浓度的人源性LF,结果显示人源性LF对人关节软骨细胞的增殖具有促进作用,且具有显著的浓度依赖性。Calvani等^[9]术后应用浸泡牛源性LF的无菌纱布布对比传统手术治疗,首次证明了牛源性LF对双膦酸盐相关的颌骨坏死有修复效果,可以显著缩短伤口的愈合时间。Li等^[10]研究发现,当牛源性LF口服给药的剂量为每天85 mg/kg,可以促进兔模型胫骨牵张成骨后的骨再生,牛源性LF不仅促进了牵张成骨早期的骨形成,而且促进了后期的骨固定化。此外,当使用牛源性LF治疗时,骨保护素(osteoprotegerin, OPG)/核因子-κB受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor κB ligand, RANKL)/核因子-κB受体活化因子(receptor activator of nuclear factor κB, RANK)通路可能是在牵张成骨中增加骨形成和减少骨吸收的主要机制。这一观点Hou等^[11]在后续研究中也予以证

基金项目 国家自然科学基金(编号:81360170)

作者简介 周恬(1992~),男,浙江湖州人,硕士在读,主要从事牙合面畸形的矫治及机理的相关研究。

* 通信作者 康娜, E-mail: kangna78@126.com

实。Gao 等^[12]通过在大鼠右侧顶骨制造一个直径 5 mm 大小的缺损,局部使用明胶凝胶结合牛源性 LF 4~12 周,与没有经过牛源性 LF 处理的大鼠颅骨骨缺损处相比,发现应用牛源性 LF 可显著促进大鼠颅骨缺损模型的骨再生。以上研究证明,LF 具有强大的体内、体外成骨活性,是一种潜力巨大的治疗骨缺损的天然活性物质。

1.2 乳铁蛋白与口腔肿瘤 新近的国内外研究发现 LF 能在实验动物中抑制肿瘤生长和转移,并在人类多种肿瘤中具有抑瘤基因的功能。LF 的抗肿瘤机制是由多种机制介导的。第一,调节免疫作用。LF 可通过调控细胞因子的生成、增加免疫细胞的数量以及增强免疫细胞的活性而改变肿瘤细胞因子环境,从而发挥抗肿瘤效应,增强宿主防御肿瘤的能力。第二,抑制血管生成。Tung 等^[13]研究牛源性 LF 通过抑制炎症和血管内皮生长因子的表达来抑制肺癌的生长,结果证明牛源性 LF 可以抑制血管内皮生长因子 mRNA 和蛋白的表达,从而调控血管生成,抑制肿瘤诱导的血管生成。第三,调控致癌物代谢酶以及清除铁^[14]。当 LF 与致癌剂同时使用时,可作为阻断剂发挥作用,通过减少某些致癌剂的活化及其诱导的基因毒性,促进致癌剂的排泄。第四,抑制肿瘤细胞增殖。Wolf 等^[15]在体外和小鼠模型中进行对照实验,评估人重组 LF 能否作为头颈部鳞状细胞癌的化疗治疗剂。结果显示在人和鼠细胞系中,人重组 LF 对鳞状细胞癌细胞增殖具有抑制作用并呈现剂量依赖性。使用流式细胞术分析,人重组 LF 诱导肿瘤细胞 G₁/G₀ 期生长阻滞,这种阻滞受到细胞周期蛋白 D1 下调的调节。在体外模型中,Luminex 数据显示人重组 LF 抑制细胞释放促炎性因子,包括白细胞介素(interleukin, IL)-8、IL-6 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α)等。人重组 LF 在细胞暴露后 4 h 内上调核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)的细胞活化。在植入头颈部鳞状细胞癌的 C3h/HeJ 小鼠中,与对照组相比,口服人重组 LF 抑制 75% 的肿瘤生长。肿瘤的免疫组织化学分析结果显示人重组 LF 处理组淋巴细胞增加高达 20 倍。当小鼠耗尽 CD3⁺ 细胞时,所有人重组 LF 诱导的肿瘤抑制都被消除。据此可知,人重组 LF 可通过直接细胞抑制来抑制头颈部鳞癌的生长。第五,诱导凋亡^[14]。研究发现,在头颈部癌细胞系中,LF 能够改变程序性细胞死亡相关基因的表达,但其诱导细胞死亡的确切机制需进一步研究。综上所述,LF 是一种具有实用价值的抗肿瘤药物,既能作为抗肿瘤药用于多种肿瘤的治疗,也能作为免疫调节剂应用于肿瘤的辅助治疗^[16]。

1.3 乳铁蛋白与龋病 龋病作为一种慢性细菌感染性疾病,可引发全身多部位、多器官、系统性疾病,严重危害人的全身健康与生存质量。龋病是由多种因素作用所致,主要包括细菌、口腔环境、宿主和时间。唾液中含有包括 LF 在内的种类丰富的抗菌蛋白,可有效抑制口腔微生物生长。LF 是一种唾液抗菌铁结合糖蛋白,可保护口腔免受多种病原微生物的侵害,包括龋齿的病原体——变形链球菌。此外,它还显示出对抗其他产酸微生物的生物活性,并调节牙菌斑生

物膜的聚集和发展,从而影响龋易感性。研究发现,LF 抑制革兰阳性细菌的作用机制是由于其正电荷与带负电荷的细菌表面结合,导致细胞壁上的负电荷减少,从而有利于溶菌酶与细菌细胞壁的肽聚糖相接触以发挥酶促作用,酶解肽聚糖。Fine 等^[17]已充分证明唾液 LF 在体外对变形链球菌发挥杀菌活性,受试者唾液中的 LF 直接地(通过其强碱性 N 末端区域直接与细菌相互作用)和间接地(通过夺取细菌生长所需的铁离子),具有直接杀死变异链球菌和其他早期形成的革兰阳性产酸细菌的能力。郝高峰等^[18]以儿童为研究对象,通过测定高龋组和无龋组唾液总蛋白和 LF 含量,发现高龋组总蛋白含量显著低于无龋组,LF 的百分含量显著高于无龋组,差异有统计学意义。证明唾液蛋白与乳牙患龋密切相关,唾液 LF 可能是其中一种重要的成分。另外一项关于唾液 LF 与儿童龋的关系研究显示,儿童早期龋与低浓度唾液 LF 有关,唾液 LF 的减少可能是儿童龋齿的危险因素^[19]。以上研究说明,LF 在乳牙龋病发生、发展过程中可能起重要作用。

1.4 乳铁蛋白与牙周病 革兰阴性厌氧杆菌如牙龈卟啉单胞菌是牙周炎的主要致病菌,其细菌外膜成分脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是引起牙槽骨吸收的主要因子。Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)主要表达于髓系单核细胞,部分表达于牙周膜细胞,是第一个被发现的哺乳动物的 Toll 样受体,它可以通过经典的病原相关分子模式(pathogen association molecular pattern, PAMP)识别 LPS,启动免疫炎症反应^[20]。LPS 与 TLR4 通过二聚作用激活 NF- κ B 信号传导通路,释放下游炎症因子如 TNF- α 和 IL-1 β 、IL-6 等引起牙周组织炎症^[21]。近年来,越来越多的研究发现 LF 通过干扰 LPS 引发的 TLR4 免疫反应,可以抑制 LPS 毒性,限制 TLR4 下游信号传导通路中 NF- κ B、肿瘤坏死因子受体相关因子 6(tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, TRAF6)、核因子- κ B 抑制蛋白(inhibitory nuclear factor-kappa B alpha, I κ B α)和 I κ B 激酶 β (inhibit kappa B kinase beta, IKK β)等因子的活性,从而抑制 LPS 引发的炎症损害^[22],避免骨吸收。Yamano 等^[23]证明口服牛源性 LF 可以抑制鼠牙周组织细胞分泌 TNF- α 和调节破骨细胞 RANKL/OPG 的平衡来抑制 LPS 诱导的牙周组织的破坏。而 Ishikado 等^[24]以牙周病患者为研究对象,通过口服牛脂体乳铁蛋白(liposome bovine lactoferrin, L-bLF)进行治疗,其以大豆磷脂酰胆碱为原料,以片剂形式(每日 180 mg bLF)给 12 例不同部位、牙周探诊深度(periodontal depth, PD)超过 3 mm 的受试者服用 4 周的 L-bLF,随后研究人员对 PD>4 mm 的 5 例受试者中 51 个位点进行了单核细胞化学活性蛋白-1(monocyte chemotactic protein 1, MCP-1)水平等的评估。结果发现补充 L-bLF 的患者 PD 和 MCP-1 水平显著降低。以上研究进一步证明了口服牛源性 LF 作为一种新型治疗手段,可以有效控制牙周组织炎症。牛源性 LF 对牙龈卟啉单胞菌及生物膜的形成具有抑制作用,能有效控制免疫炎症反应,避免骨吸收。

1.5 牛乳铁蛋白与正畸 牙移动是由正畸力下的牙及牙周组织改建所形成的。正畸力下,牙周组织及炎性细胞会释放 IL-1 β 、IL-6、前列腺素 E2(prostaglandin E2, PGE2)及 TNF- α 等炎性细胞因子。炎性因子促进压力侧牙周膜内 RANKL 表达的增加和 OPG 的减少,从而使破骨细胞分化成熟,骨组织改建活跃^[25]。但是在正畸治疗中,由于青少年患者依从性较差、牙齿错位以及复杂矫治器的阻挡,保持良好的口腔卫生相对困难。细菌滋生致使牙周组织释放炎性因子,在炎症的影响下,正畸力作用于牙齿可能会造成附着丧失,导致牙周组织破坏。Inubushi 等^[26]通过细胞实验证明,牛源性 LF 能抑制 LPS/TLR4/TNF- α 通路导致的 RANKL 表达升高,OPG 表达降低,但无法抑制正畸力下环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)/PGE2 通路引起的骨吸收^[26]。结合口服牛源性 LF 成功改善牙周炎患者牙周组织炎症的人体试验,推测牛源性 LF 在一定程度上,似乎能够有效地控制正畸环境下的牙周组织炎症,而同时不妨碍正畸力下的牙槽骨改建。LF 可为今后有效控制正畸牙周组织炎症提供新的临床思路,使牙周组织炎症这一正畸治疗中最为常见及严重的并发症得到有效的预防、控制和治疗。

1.6 乳铁蛋白在口腔其他领域的应用 LF 在抗病毒感染方面有很大的作用,一项关于疱疹性口炎的研究结果表明,LF 抑制单纯疱疹病毒主要由其 N 端发挥作用,乳铁蛋白 C 端(345~689)和 N 端(1~280)两大片段可抑制 I 型单纯疱疹病毒感染^[27]。低分子质量片段中,位于 N 端 222~230 和 264~269 两个小肽能有效抗 I 型单纯疱疹病毒的感染。此外,牛源性 LF 的抗炎活性可能有助于改善老年人在口腔护理方面的状况。口腔护理是预防肺炎的一个重要方面^[28],然而,对于需要护理的老年人来说,口腔护理是有限制的。牛源性 LF 的临床应用将有助于减少其并发症。

2 结论和展望

近年来随着人民生活水平的不断提升,人们对保健食品的关注越来越多。LF 依靠其独特的生理特性,广泛应用于食品、化妆品、医疗卫生、畜牧等行业。由于 LF 为牛初乳中的天然蛋白质,可作为新一代疗效性食品的功能组分,防治口腔疾病。因此,牛乳中 LF 在口腔领域的开发利用具有重要意义和广阔的开发前景。

参考文献

- [1] Groves ML. The isolation of a red protein from Milk2 [J]. J Am Chem Soc, 1960, 82(13): 3345-3350.
- [2] Wakabayashi H, Yamauchi K, Takase M. Lactoferrin research, technology and applications [J]. Int Dairy J, 2006, 16(11):1241-1251.
- [3] Rosa L, Cutone A, Lepanto MS, et al. Lactoferrin: a natural glycoprotein involved in iron and inflammatory homeostasis [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(9), pii: E1985.
- [4] Yamauchi K, Toida T, Nishimura S, et al. 13-week oral repeated administration toxicity study of bovine lactoferrin in rats [J]. Food Chem Toxicol, 2000, 38(6):503-512.
- [5] Yamauchi K, Toida T, Kawai A, et al. Mutagenicity of bovine lactoferrin in reverse mutation test [J]. J Toxicol Sci, 2000, 25(2):63-66.
- [6] Franco I, Pérez MD, Conesa C, et al. Effect of technological treatments on bovine lactoferrin: an overview [J]. Food Res Int, 2018, 106:173-182.
- [7] Cornish J, Palmano K, Callon KE, et al. Lactoferrin and bone: structure-activity relationships [J]. Biochem Cell Biol, 2006, 84(3):297-302.
- [8] 王辛平,刘啟蒙,张冬青,等.人乳铁蛋白对关节软骨细胞增殖和细胞外蛋白激酶表达的作用[J].重庆医学,2014,43(8):978-980.
- [9] Calvani F, Cutone A, Lepanto MS, et al. Efficacy of bovine lactoferrin in the post-surgical treatment of patients suffering from bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: an open-label study [J]. BioMetals, 2018, 31(3):445-455.
- [10] Li W, Zhu S, Hu J. Bone regeneration is promoted by orally administered bovine lactoferrin in a rabbit tibial distraction osteogenesis model [J]. Clin Orthop Relat Res, 2015, 473(7): 2383-2393.
- [11] Hou J, Xue Y, Lin Q. Bovine lactoferrin improves bone mass and microstructure in ovariectomized rats via OPG/RANKL/RANK pathway [J]. Acta Pharmacol Sin, 2012, 33(10): 1277-1284.
- [12] Gao R, Watson M, Callon KE, et al. Local application of lactoferrin promotes bone regeneration in a rat critical-sized calvarial defect model as demonstrated by micro-CT and histological analysis [J]. J Tissue Eng Regen Med, 2018, 12(1): e620-e626.
- [13] Tung YT, Chen HL, Yen CC, et al. Bovine lactoferrin inhibits lung cancer growth through suppression of both inflammation and expression of vascular endothelial growth factor [J]. J Dairy Sci, 2013, 96(4): 2095-2106.
- [14] 陈晓泓,张博恒.乳铁蛋白在肿瘤治疗中的作用机制[J].复旦学报(医学版),2010,37(1): 119-121.
- [15] Wolf JS, Li G, Varadhachary A, et al. Oral lactoferrin results in T cell-dependent tumor inhibition of head and neck squamous cell carcinoma *in vivo* [J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(5): 1601-1610.
- [16] 李一丁,赵先英,贺建,等.乳铁蛋白抗肿瘤作用及机制研究进展[J].实用癌症杂志,2012,27(6): 678-679.
- [17] Fine DH, Toruner GA, Velliyagounder K, et al. A lactoferrin single nucleotide polymorphism demonstrates biological activity that can reduce susceptibility to caries [J]. Infect Immun, 2013, 81(5): 1596-1605.
- [18] 郝高峰,林焕彩.唾液乳铁蛋白和溶菌酶含量与乳牙患龋的关系[J].中华口腔医学杂志,2009,44(2): 82-84.
- [19] Moslemi M, Sattari M, Kooshki F, et al. Relationship of salivary lactoferrin and lysozyme concentrations with early childhood caries [J]. J Dent Res Dent Clin Dent Prospects, 2015, 9(2): 109-114.
- [20] Shang L, Wang T, Tong D, et al. Prolyl hydroxylases positively regulated LPS-induced inflammation in human gingival

fibroblasts via TLR4/MyD88-mediated AKT/NF- κ B and MAPK pathways [J]. *Cell Proliferation*, 2018, 51(6): e12516.

[21] 杨俊,陈兴兴,方煌,等. LPS 对人牙周膜细胞 Toll 样受体 4 及下游炎症因子表达的影响[J]. *临床口腔医学杂志*, 2014, 30(11): 689-691.

[22] Shigemori S, Namai F, Yamamoto Y, et al. Genetically modified *Lactococcus lactis* producing a green fluorescent protein-bovine lactoferrin fusion protein suppresses proinflammatory cytokine expression in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells [J]. *J Dairy Sci*, 2017, 100(9): 7007-7015.

[23] Yamano E, Miyauchi M, Furusyo H, et al. Inhibitory effects of orally administrated liposomal bovine lactoferrin on the LPS-induced osteoclastogenesis [J]. *Lab Invest*, 2010, 90(8): 1236-1246.

[24] Ishikado A, Uesaki S, Suido H, et al. Human trial of liposomal lactoferrin supplementation for periodontal disease [J]. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33(10): 1758-1762.

[25] 王莹,王兰珠,韩博,等. 正畸力作用下压力侧 Wnt10b、RANKL 在牙周组织中的表达[J]. *口腔医学研究*, 2016, 32(3): 257-260.

[26] Inubushi T, Kawazoe A, Miyauchi M, et al. Lactoferrin inhibits infection-related osteoclastogenesis without interrupting compressive force-related osteoclastogenesis [J]. *Arch Oral Biol*, 2014, 59(2): 226-232.

[27] 凌雪萍,庞广昌,李国强. 乳铁蛋白的最新研究进展[J]. *食品科学*, 2003, 24(1): 160-163.

[28] Komatsu A, Satoh T, Wakabayashi H, et al. Effects of bovine lactoferrin to oral *Candida albicans* and *Candida glabrata* isolates recovered from the saliva in elderly people [J]. *Odontology*, 2015, 103(1): 50-55.

[收稿日期:2018-07-08] (本文编辑 关隽)

2019 年中国中部国际口腔展欢迎你的到来

享誉全国的口腔医疗行业盛会——2019 中部国际口腔展将于 11 月 30 日至 12 月 2 日在武汉国际博览中心举行。

预计本届展会展出面积达 4 万平方米,将吸引全球 30 多个国家和地区的 500 多家企业齐聚中部武汉,展示口腔医疗研发最新技术和产品以及前沿发展趋势。届时将有来自国内外的 30,000 名专业观众到场参观。中部国际口腔展是口腔医疗企业开拓中部市场、品牌建设的首选推广平台,更是一个具有创新性、可持续性、可合作性的口腔医疗学术交流与人才交流的平台。

2019 年展会招展范围涵盖口腔医疗全产业链,口腔种植、正畸、义齿加工、根管治疗、口腔影像设备、口腔预防保健依然是热门主题。民营口腔蓬勃发展,未来可期。展会纵深口腔医疗垂直平台,紧跟口腔医疗互联网+的发展趋势,专注运营提效和品牌塑造领域,助力“健康中国 2030”国家医疗健康战略。2019 年招展范围将延伸至口腔互联网服务、营销推广、运营管理、政策法规等领域,助力口腔医生以及口腔机构的品牌提升。与此同时,各领域相互渗透交叉,上下游供应链客户共同展示,实现参展价值最大化。

同期热点学术会议及培训班,汇聚国内顶级讲师,全面助力口腔医生职业提升

2019 年展会将带来 120 余场学术会,8 大主题培训班,200 余位国内外权威专家汇聚中部武汉,向学员分享丰富的临床经验和技巧,帮助临床医生掌握工作技能,提升实战能力。会议期间还将举办湖北省口腔医学会专委会换届大会,“展”与“会”联动创造高附加值平台。

2019 中国口腔医学人才供需见面会,品质升级,吸引更多学生驻足

2019 中国口腔医学人才供需见面会是武汉大学口腔医学院口腔医学人才招聘大会的延续,2019 年人才供需见面会的求职范围将从传统的口腔医生、护士等岗位延伸到口腔医院运营、管理、市场、财务等岗位,并为应届毕业生提供海外留学咨询服务,丰富学生的晋升选择。活动同期还将举办五省口腔人才创新交流活动,让人才充分展示自己。

中部国际口腔展官方网站:<http://www.cwcde.com.cn>,咨询电话:13018043369