

乳铁蛋白分子结构及其抗菌机制

朱艳萍 滕达 田子罡 白雪晶 杨雅麟 王建华

(中国农业科学院饲料研究所基因室 农业部饲料生物技术重点实验室 北京 100081)

摘要: 乳铁蛋白是一种单体糖蛋白,是哺乳动物非特异性免疫系统的第一道防线,具有防御微生物感染的功能。分析了乳铁蛋白氨基酸组成、多肽链折叠、铁结合结构、分子表面特性等与抗菌有关的分子结构。综述了乳铁蛋白抗微生物活性的作用机制,包括限制 Fe^{3+} 利用,抑制细菌生物膜形成,与负电性生物大分子结合,降解细菌毒力因子以及阻止细菌入侵等。

关键词: 乳铁蛋白 分子结构 抗菌机制

Molecular Structure and Antibacterial Mechanism of Lactoferrin

Zhu Yanping Teng Da Tian Zigang Bai Xuejing Yang Yalin Wang Jianhua

(Key Laboratory of Feed Biotechnology, The Ministry of Agriculture; Gene Engineering

Laboratory, Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: Lactoferrin is a monomeric glycoprotein, which has been considered as the first line defense protein of mammalian non-specific immune system and involves in protection against microbial infection. Lf's antibacterial-related molecular structure, including the amino acid sequence, polypeptide fold, iron binding structure and surface properties were summarized. The antibacterial mechanism was reviewed, including its structure, deprivation of iron, influence of biofilm formation, interaction with macromolecular with negative charge, degradation virulence factors of bacterial and inhibition of bacterial invasion.

Key words: Lactoferrin Molecular structure Antibacterial mechanism

乳铁蛋白(lactoferrin, LF)属转铁蛋白家族成员,是哺乳动物体内一种重要的非血红素铁结合糖蛋白^[1]。LF主要由嗜中性粒细胞分泌,广泛存在于乳汁、泪液、唾液、汗液、胰液、胆汁、精液等内外分泌液中^[2]。LF分子量约80 kD,其高级结构由一条多肽链折叠形成的两个结构相似的球状叶组成。由于具抗炎反应、免疫调节和铁离子结合功能,LF被认为是一种天然免疫因子和广谱抗菌剂^[3]。LF具有抗革兰氏阳性菌(G^+)和革兰氏阴性菌(G^-)的活性,其抗菌机制曾被认为主要与铁结合能力有关。此外,大量体外试验提出了基于LF与细菌表面相互作用的多种抗菌机制。

1 乳铁蛋白的分子结构

1.1 氨基酸组成

乳铁蛋白多肽链约由700个氨基酸组成,一般

含2~4条多聚糖侧链。多肽链氨基酸组成中Arg和Lys含量较高,除含有少量Cys,几乎不含其它含硫氨基酸^[4]。不同物种来源乳铁蛋白氨基酸序列同源性高,分析9个物种(人、牛、野牛、骆驼、山羊、绵羊、马、小鼠和猪)LF氨基酸序列^[5]发现,人、小鼠和牛的同源性较高。其中,人和小鼠同源性达70%,人和牛的达69%,小鼠和牛的达63%。

1.2 结构域

LF二级结构主要由 α -螺旋和 β -折叠交替排列组成, α -螺旋多于 β -折叠^[6]。X射线所测人LF溶液和晶体三维结构^[4]显示,在二级结构基础上折叠形成的高级结构是两个极其相似且对称的球状叶,即N-叶(1~333)和C-叶(345~691);两叶序列同源性约40%,这可能是生物进化中基因重复复制所致^[7]。N-叶和C-叶均由两个 α/β 亚结

收稿日期:2010-02-04

基金项目:国家自然科学基金项目(30972125, 30771574, 30810303084) 北京市自然科学基金项目(5062031, 5093030)

作者简介:朱艳萍,女,硕士研究生,从事功能蛋白表达研究;E-mail: yanpingzhu1983@163.com

通讯作者:王建华,男,研究员,博士生导师,主要从事微生物学和生物技术研究;E-mail: wangjianhua@mail.caas.net.cn

构域组成,称为 N1、N2、C1、C2 亚结构域,N1 与 N2、C1 与 C2 亚结构域之间深裂隙为 Fe^{3+} 结合位点。N-叶和 C-叶之间由一条约含 10 - 15 个氨基酸残基且对蛋白酶敏感的 α -螺旋连接。人乳铁蛋白(hLF)连接区(334 - 344)对 N-叶和 C-叶铁结合结构域的开闭起重要作用,具稳定铁结合结构的作用。N-叶和 C-叶间无共价键连接,主要依赖两叶间疏水作用维持空间结构稳定性。这种由两个球状叶 4 个结构域构成的分子结构是转铁蛋白家族成员分子动力学特点的结构基础^[4]。

1.3 铁结合结构域

LF 位于 N-叶和 C-叶的 Fe^{3+} 结合配基是高度保守的,均由 2 个酪氨酸、1 个精氨酸和 1 个组氨酸残基以及 CO_3^{2-} 离子组成。例如,Tyr92,Tyr192,Asp60 和 His253 组成位于 LF N-叶的 Fe^{3+} 结合配基。在铁结合过程中,配基提供 3 个负电荷中和 Fe^{3+} 的正电荷;Arg121 和 N 端的第 5 个 α 螺旋所带正电荷中和协同结合的 CO_3^{2-} 所带负电荷(图 1)^[8],从而起到稳定铁结合作用,配位体发生突变会削弱乳铁蛋白的铁结合能力。当 Fe^{3+} 进入 LF 亚结构域裂隙内部时,此区域闭合,分子结构趋于紧密。晶体学结构分析发现,当铁饱和乳铁蛋白(Holo-LF)释放 Fe^{3+} 时,两叶发生相对旋转,暴露出铁结合位点,同时位于铁结合位点后的 2 个碱性氨基酸残基 Arg210 和 Lys310 参与调节 Fe^{3+} 的释放^[8]。LF 释放 Fe^{3+} 受环境 pH 影响,低 pH 值能使 CO_3^{2-} 质子化,阴离子质子化弱化了配基 Tyr,His 等对 Fe^{3+} 的结合作用,从而实现通过 pH 调节控制 Fe^{3+} 释放^[9]。LF 除了结合 Fe^{3+} 外,还能与 Ga^{3+} , Al^{3+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} 及镧系金属结合,但是缔结常数远低于铁缔合常数^[8]。

LF 构象随铁饱和状态不同而变。X-射线晶体衍射^[8]发现,铁不饱和人乳铁蛋白(Apo-hLF)存在多种构象,一种构象中 N2 亚结构域相对于 N1 亚结构域转动 54° ,C2 亚结构域相对于 C1 亚结构域转动 18° ;另一种构象中则分别转动 55° 和 27° 。这种构象差异非 hLF 特有,不同物种 Apo-LF 构象间也有差异,马 Apo-LF 两叶都处于闭合状态^[10],而骆驼 Apo-LF 两叶都处于开放状态^[11]。这可能由于 LF

构象细微差异引起的能量变化所造成,这种能量变化帮助实现铁结合结构域的开或闭。同时 LF 分子构象的变化仅是亚结构域相互移动,并不影响分子表面特性,不会破坏其表面的一些大分子结合位点。

1.4 分子表面特性

LF 分子等电点 pI 较高约为 9,具较强阳离子性,是 LF 能结合不同类型细胞及阴离子的主要原因。晶体结构分析显示^[8],LF 分子表面正电荷浓度很高且不均匀,有 3 个显著的正电荷富集区域:N 端 1 - 7 个氨基酸残基,第 1 个 α -螺旋(13 - 30 氨基酸残基)和两球状叶连接区域的 α -螺旋附近(图 2)。从图 2 可看出正电荷多分布于 N 端区域第 1 个 α -螺旋上,N 叶第 1 个螺旋的 12 - 31 个氨基酸残基构成主要的抗菌功能区,也是 Lactoferricin(Lfcin)的抗菌功能域^[12]。所有 LF 的这一段螺旋都含有 5 - 6 个碱性残基,其构象不受 Fe^{3+} 饱和度影响。此外,N 叶 1 - 5 个氨基酸残基暴露在分子表面,正电荷密度高,与邻近 C-叶末端 α -螺旋一起构成 DNA, LPS, 肝素,葡胺聚糖等大分子结合位点^[8]。例如,LF 可与细菌细胞表面蛋白如肺炎链球菌表面蛋白 PspA 结合。另推测,LF 蛋白水解酶活性位点位于分子表面 Ser 残基上且靠近 Lys,但不同物种 LF 的这一功能区域是不同的。

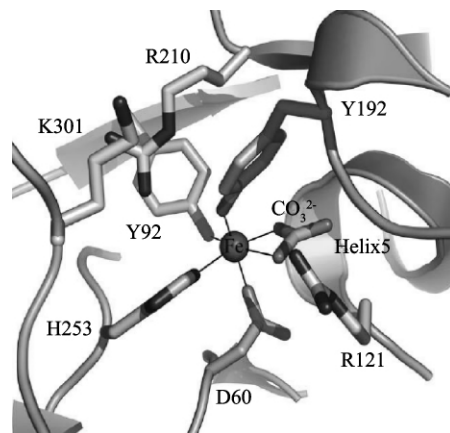
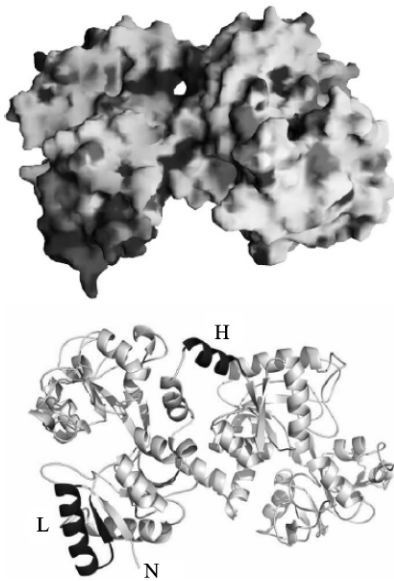


图 1 hLF N-叶铁结合位点,Tyr92、Tyr192、Asp60 和 His253 组成铁结合配基,Arg121 和 N 端的第 5 个 α 螺旋有助于稳定协同结合的 CO_3^{2-} 。同时位于铁结合位点后的两个碱性氨基酸残基 Arg210 和 Lys310 参与调节 Fe^{3+} 的释放

图 1 乳铁蛋白铁结合位点示意图^[8]



上半部分显示 LF 立体空间构象, 下半部分显示与空间构象相对应的多肽链构象。正电荷最密集区域为 N-末端, L 表示抗菌肽 Lactoferricin 的功能域, H 为两叶间的连接区

图 2 乳铁蛋白表面电荷分布图^[8]

1.5 糖基化

LF 是一种糖蛋白, 糖基共价结合在 Asn-X-Thr/Ser (X 为任意氨基酸) 的天冬酰胺残基上, 形成 2-4 条 N-连接型糖链。不同物种乳铁蛋白潜在和实测的糖基化位点和数目有差异^[8]。例如小鼠 LF 只有 1 个潜在糖基化位点 Asn476, 人乳铁蛋白有 3 个糖基化位点 Asn137、Asn478 和 Asn623, 而牛、山羊、绵羊乳铁蛋白则含 5 个糖基化位点, 分别为 Asn233、Asn281、Asn368、Asn476 和 Asn545。某些位点糖基化反应是受限制的, 如 hLF 一般只使用 Asn137 和 Asn478 这两个糖基化位点^[13], 牛乳铁蛋白中 Asn281 未被使用^[14]。大多数糖基化位点暴露在分子表面, 糖链残基除了和肽链部分形成少量氢键外, 几乎不影响蛋白质结构。糖基化与否并不影响铁的结合和释放, 热稳定性以及 CD 谱图等特征^[8]。但骆驼 LF 糖基化直接影响它的结构和铁结合能力, 这是因为 Asn518 位于骆驼 C-叶铁结合位点处, 此位点又是糖基化位点, 此位点一旦糖基化就会抑制铁结合结构域闭合, 造成铁结合能力下降^[11]。乳铁蛋白中糖链功能尚不十分明确, 可能参

与 LF 与细菌毒素结合位点的识别或与细胞膜上信号接触及其它活性有关。

2 LF 的抗菌机制

LF 发挥抗菌功能主要与其分子结构特性有关。结合 Fe^{3+} 限制细菌生长曾被认为是 LF 的一种重要抗菌机制。然而, 体外试验提出了与 LF 分子表面特性相关的更多抗菌机制, 如与负电性的生物大分子结合或是发挥蛋白水解酶活性降解细菌黏附蛋白等。

2.1 限制 Fe^{3+} 的利用

LF 对铁离子高度亲和性是其发挥抑菌作用的基础。铁是大多数细菌生长所必需的金属离子, LF 通过螯合 Fe^{3+} 限制细菌对 Fe^{3+} 的利用, 抑制 *Streptococcus mutans*, *Vibrio cholerae* 等菌生长^[3]。LF 能抑制致病菌 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* 生长, 且抑菌作用受铁饱和状态影响^[15]。Griffiths 等^[16]通过体外抑菌试验证明缺铁 LF 和铁饱和度 66% LF 可显著抑制 *E. coli* 0157: H7 的生长, 而铁饱和度 98% LF 则无明显抑菌活性。人 hLF 多以不饱和形式存在, 能结合 Fe^{3+} , 经结合 Fe^{3+} 使机体内 Fe^{3+} 维持在细菌生长所需浓度水平以下, 防御细菌感染。但这种依赖螯合 Fe^{3+} 的抑菌作用并不绝对有效, 有的细菌可通过其它途径解除缺 Fe^{3+} 限制。如革兰氏阴性菌 *Salmonella* spp.、*Klebsiella* spp. 和 *Neisseria* spp. 等通过表达铁载体蛋白, 与 LF 竞争性结合 Fe^{3+} , 满足自身需要^[17]。此外, *Neisseria meningitidis* 和 *Haemophilus influenzae* 可在外膜上表达特异的 LF 受体, 通过内化 Holo-LF, 提高获得 Fe^{3+} 的能力; 但此类 LF 受体种属特异性高^[18]。

2.2 抑制细菌生物膜的形成

生物膜是指一些病原细菌通过自身分泌大分子多聚物, 吸附营养物质、代谢产物以及细菌裂解产物等物质, 与邻近的菌体形成有组织的细菌群体。形成生物膜的细菌能够对抗机体免疫防御系统, 并对抗生素产生抗性。生物膜的形成与营养成分、温度、渗透压、pH、铁离子浓度等环境信号有关。

Weinberg^[19]认为在细菌生物膜形成的起始黏附、发展和成熟 3 个阶段均需 Fe^{3+} 介导。Singh 等^[20]发现, 高浓度 Fe^{3+} 能减缓 *Pseudomonas aerugi-*

nosa 的蹭行性运动,使子代细胞停留在分化位点,有助于细菌间黏附形成生物膜;当 *Pseudomonas aeruginosa* 和 Apo-LF 共培养时,随着代数增加,自由移动的细胞逐渐增多,不利于细菌凝集。Apo-LF 能通过螯合 Fe^{3+} ,降低环境中 Fe^{3+} 浓度,阻止细菌的粘附和生物膜形成。将 *Pseudomonas aeruginosa* 和 LF 共同孵育,降低了该菌对 H_2O_2 和妥布拉霉素的抗性。

囊性纤维病(cystic fibrosis, CF)是由 *P. aeruginosa* 在肺部集群生长形成生物膜所引起的气管性疾病,据报道在 CF 病人体内,LF 含量比正常状态下高许多倍,但由于患者气管和痰中含大量 Fe^{3+} ($6.3 \times 10^{-5} \text{ M}$),使 hLF ($1 \times 10^{-5} \text{ M}$) 处于饱和状态,妨碍 LF 发挥抑菌作用^[21, 22]。但也有研究发现^[23]牙周炎病人唾液中 Fe^{3+} 浓度 $< 0.1 \mu\text{mol/L}$ 时,患者口腔中 *Streptococcus mutans* 更易发生细胞凝集,形成生物膜;当 Fe^{3+} 浓度 $> 1 \mu\text{mol/L}$ 时,会抑制 *S. mutans* 凝集和生物膜形成。

2.3 与表面正电荷相关的杀菌作用

如上所述,LF 通过铁结合发挥的抑菌作用能随环境中 Fe^{3+} 浓度增高而解除,但 hLF 还具有直接杀菌活性,LF 可与细菌表面分子非特异性结合,封闭细菌细胞膜上重要的通道位点,阻断营养物质和细菌毒性蛋白的运送,抑制细菌的合成代谢,导致菌体死亡。 G^- 外膜上脂多糖(LPS)的释放被认为是最为重要的抗菌分子机制之一。细菌 LPS 为构成 G^- 细胞外膜的主要成分。LF 与细菌细胞外膜上的孔道蛋白结合,诱导 LPS 释放,LPS 的释放增加了细胞外膜对疏水分子的通透性,有利于溶菌酶和其他抗菌分子进入细胞发挥杀菌作用^[24]。LF 可能通过两条途径来影响 LPS 的释放,第一条途径是通过 N 叶正电荷簇与致病菌细胞外膜 LPS 分子的脂质体 A 结合,直接发挥作用^[25]。另一途径与 LF 和 LPS 竞争性螯合 Ca^{2+} 有关^[26],LPS 与 Ca^{2+} 结合后能稳定外膜空间结构,当 LF 与 Ca^{2+} 结合后,外膜结构稳定性被打破,导致 LPS 释放。Rossi 等^[27]试验发现 LF 不需与细菌直接作用,只是通过结合 Ca^{2+} ,就能导致 G^- 释放大 LPS。Ellison 等^[26]观察到当 Apo-bLF 在不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 PBS 中时,能介导浓度依赖方式的 LPS 释放,当向 PBS 中加入 Ca^{2+} 和

Mg^{2+} 时,LF 则不能显著促进 LPS 的释放。而 Ca^{2+} 与 bLF 的结合具有特异性, Ca^{2+} 在热变性和化学变性过程中对 LF 结构起显著稳定作用,因为 Ca^{2+} 能够与 bLF 两条糖链上的唾液酸残基结合^[27]。

LF 的晶体结构显示其正电荷主要分布于 N-叶,推测 N-叶是发挥杀菌作用的主要功能区域。LF 对 G^+ 的杀菌机理与阳离子抗菌肽^[28]和两亲性抗菌肽^[29]的作用机理相似,即阳离子性氨基酸残基与膜上带负电性的磷壁酸通过静电相互作用结合,两亲性的氨基酸残基打破了细菌内膜的非极性环境,造成膜通透性发生改变,使菌体内容物外泄而致死^[30]。

2.4 与蛋白水解酶活性相关的抗菌作用

最新研究发现 LF 具蛋白水解酶活性,为阐释 LF 抗菌作用提供了新思路。Plaut 等^[31]发现当 *H. influenzae* 在以人乳为惟一营养源的环境中生长时,hLF 能降解 *H. influenzae* IgA1 蛋白酶。Hendrixson 等^[32]证实 hLF 的 N-叶具有与丝氨酸蛋白酶相似的蛋白水解酶活性,不仅能水解 IgA 蛋白酶,还能水解 Hap 黏附素,切割位点可能位于蛋白的 Arg-富集区。

G^- 能够通过 III 型分泌系统分泌毒蛋白侵入宿主细胞,Therease 等^[33]发现 hLF 能削弱 *Shigella* 和 Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) 模式菌分泌毒蛋白的能力。用 LF 处理 *Shigella*,能促使 III 型分泌系统分泌的侵袭质粒抗原 IpaB 和 IpaC 的释放和降解,这两种蛋白能够形成复合物介导 *Shigella* 侵入宿主。LF 还能通过降解 *E. coli* 分泌的毒蛋白 EspA, EspB, EspC,阻止 *E. coli* 对 HEp2 细胞的黏附。推测 LF 可能通过两个步骤抑制 III 型分泌系统分泌的毒蛋白毒性的发挥。首先 LF 刺激细菌分泌毒性抗原,LF 结合细菌外膜 LPS 的脂质体 A 部分,使膜结构缺乏弹性,影响与细菌分泌毒素相关的针形蛋白复合物在外膜上的锚定,造成毒性抗原释放。第二步 LF 发挥蛋白水解酶作用,降解毒力蛋白。但是发现在 *Shigella* 中,一旦形成 IpaBC 复合体便会对 LF 水解作用产生抗性,可能 LF 只能在复合体形成前发挥作用。

Massucci 等^[34]用体外合成的底物验证 LF 的蛋白水解酶活性时发现,LF 的催化常数(kcat)比胰蛋白酶的低很多个数量级,并能与丝氨酸蛋白酶亲和

层析柱相结合的 LF 不超过 10%。尽管进行了大量试验和分子动力学分析,仍不能确定 LF 的蛋白水解酶活性位点以及其作用的天然底物。总之,由于 LF 水解底物的催化常数很低,又缺乏有关催化位点的几何学正确定位,需要更多更深入的研究以确定 LF 蛋白水解酶活性及其生物学意义。

2.5 抑制细菌对宿主的侵袭

许多黏膜病原菌不仅能附着在宿主细胞上,还能避开宿主防御系统侵入上皮细胞生存和繁殖。细菌分泌的侵袭素与宿主整联蛋白受体结合是介导细菌入侵的主要途径。Apo-LF 和 Holo-LF 能与宿主细胞和细菌结合^[35],掩盖了宿主整联蛋白和细菌侵袭素的互作位点,从而阻止 *E. coli* HB101 (pRI203) 进入 HeLa 细胞。Di Biase 等^[36]发现 bLfcin 在不影响 *Yersinia enterocolitica* 对 HEp-2 细胞附着的情况下,使其侵袭能力降低了 10 倍。

糖胺聚糖 (glycosaminoglycans, GAGs) 是细胞间质重要组成部分,可与核心蛋白结合形成蛋白聚糖,能与胞外基质中纤连蛋白结合,形成的异源二聚体糖蛋白具有多个配体结合结构域,可与肝素、纤维蛋白等多种配体结合。同时纤连蛋白作为配体能与 $\alpha_5\beta_1$ 整联蛋白的受体结合,介导微生物的黏附反应。bLfcin 与肝素结合,瓦解了 GAGs、纤连蛋白和整联蛋白间配体-受体复合物的形成,而它们之间互作有助于 *Yersinia enterocolitica* 分泌的 YadA 蛋白发挥黏附作用。bLfcin 与 GAGs 结合还能降低细菌侵袭素和宿主整联蛋白的亲合性,并抑制整联蛋白受体的聚集,阻断了由受体聚集产生的内化信号的传递,从而导致细菌只能在宿主细胞上黏附而无法有效地内化。

Rose 等^[37]报道了不同的抗细菌侵入机制,*A. actinomycetemcomitans* 能分泌一种自主转运蛋白 Aae,有助于细菌与上皮细胞的结合和入侵,hLF 能切割此蛋白,致其失活。也有认为 LF 能结合在特定 DNA 序列上,激活相关基因转录,通过调节基因表达引起对细菌内化起关键作用的细胞骨架的重排^[38]。

3 总结

综上所述,乳铁蛋白通过铁结合,抑制细菌生物膜形成,破坏细胞膜稳定性,降解细菌毒力蛋白,防

止致病菌入侵等多种方式发挥其广谱抗菌作用。但大多数抗菌机制的阐明在很大程度上受制于体外试验条件的影响,如 LF 饱和度、环境 pH、温度、缓冲液离子强度以及微生物自身结构特点和对铁的依赖程度等,由于体内环境复杂多变,推测 LF 可能通过多种途径发挥作用。LF 抗菌机理的充分揭示有待更多更深入的研究。

参考文献

- [1] Sargent PJ, Farnaud S, Evans RW. Structure/function overview of proteins involved in iron storage and transport. *Curr Med Chem*, 2005, 12(23): 2683-2693.
- [2] Jacobsen LC, Sorensen OE, Cowland JB, et al. The secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) and the secondary granule protein lactoferrin are synthesized in myelocytes, colocalize in subcellular fractions of neutrophils, and are coreleased by activated neutrophils. *J Leukoc Biol*, 2008, 83(5): 1155-1164.
- [3] Jenssen H, Hancock RE. Antimicrobial properties of lactoferrin. *Biochimie*, 2009, 91(1): 19-29.
- [4] Baker EN, Baker HM. Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62(22): 2531-2539.
- [5] Kang JF, Li XL, Zhou RY, et al. Bioinformatics analysis of lactoferrin gene for several species. *Biochem Genet*, 2008, 46(5-6): 312-322.
- [6] Gonzalez-Chavez SA, Arevalo-Gallegos S, Rascon-Cruz Q. Lactoferrin: structure, function and applications. *Int J Antimicrob Agents*, 2009, 33(4): 301.e1-8.
- [7] Teng CT, Gladwell W. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in human lactoferrin gene. *Biochem Cell Biol*, 2006, 84(3): 381-384.
- [8] Baker EN, Baker HM. A structural framework for understanding the multifunctional character of lactoferrin. *Biochimie*, 2009, 91(1): 3-10.
- [9] Baker EN, Baker HM, Kidd RD. Lactoferrin and transferrin: functional variations on a common structural framework. *Biochem Cell Biol*, 2002, 80(1): 27-34.
- [10] Kumar P, Khan JA, Yadav S, et al. Crystal structure of equine apolactoferrin at 303 K providing further evidence of closed conformations of N and C lobes. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2002, 58(2): 225-232.
- [11] Khan JA, Kumar P, Paramasivam M, et al. Camel lactoferrin, a transferrin-cum-lactoferrin: crystal structure of camel apolactoferrin at 2.6 Å resolution and structural basis of its dual role. *J Mol Biol*, 2001, 309(3): 751-761.
- [12] Gifford JL, Hunter HN, Vogel HJ. Lactoferricin: a lactoferrin-de-

- rived peptide with antimicrobial , antiviral , antitumor and immunological properties. *Cell Mol Life Sci* , 2005 , 62(22) : 2588-2598.
- [13] Haridas M , Anderson BF , Baker EN. Structure of human diferric lactoferrin refined at 2.2 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* , 1995 , 51(5) : 629-646.
- [14] Moore SA , Anderson BF , Groom CR , et al. Three-dimensional structure of diferric bovine lactoferrin at 2.8 Å resolution. *J Mol Biol* , 1997 , 274(2) : 222-236.
- [15] Fine DH , Furgang D. Lactoferrin iron levels affect attachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to buccal epithelial cells. *J Periodontol* , 2002 , 73(6) : 616-623.
- [16] Griffiths EA , Duffy LC , Schanbacher FL , et al. In vitro growth responses of *Bifidobacteria* and *Enteropathogensto* bovine and human lactoferrin. *Dig Dis Sci* , 2003 , 48(7) : 1324-1332.
- [17] Shouldice SR , Skene RJ , Dougan DR , et al. Structural basis for iron binding and release by a novel class of periplasmic iron-binding proteins found in gram-negative pathogens. *J Bacteriol* , 2004 , 186(12) : 3903-3910.
- [18] Ekins A , Khan AG , Shouldice SR , et al. Lactoferrin receptors in gram-negative bacteria: insights into the iron acquisition process. *Biometals* , 2004 , 17(3) : 235-243.
- [19] Weinberg ED. Suppression of bacterial biofilm formation by iron limitation. *Med Hypotheses* , 2004 , 63(5) : 863-865.
- [20] Singh PK , Parsek MR , Greenberg EP , et al. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature* , 2002 , 417(6888) : 552-555.
- [21] Caraher EM , Gumulapurapu K , Taggart CC , et al. The effect of recombinant human lactoferrin on growth and the antibiotic susceptibility of the cystic fibrosis pathogen *Burkholderia cepacia* complex when cultured planktonically or as biofilms. *J Antimicrob Chemother* , 2007 , 60(3) : 546-554.
- [22] Rogan MP , Taggart CC , Greene CM , et al. Loss of microbicidal activity and increased formation of biofilm due to decreased lactoferrin activity in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* , 2004 , 190(7) : 1245-1253.
- [23] Berlutti F , Ajello M , Bosso P , et al. Both lactoferrin and iron influence aggregation and biofilm formation in *Streptococcus mutans*. *Biometals* , 2004 , 17(3) : 271-278.
- [24] Ellison RT , Giehl TJ. Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *J Clin Invest* , 1991 , 88(4) : 1080-1091.
- [25] Chodaczek G , Zimecki M , Lukasiwicz J , et al. Lactoferrin-mono-phosphoryl lipid A complex enhances immunity of mice to *Plesiomonas shigelloides* CNCTC 138/92. *Acta Biochim Pol* , 2008 , 55(1) : 91-96.
- [26] Ellison RT , LaForce FM , Giehl TJ , et al. Lactoferrin and transferin damage of the gram-negative outer membrane is modulated by Ca^{2+} and Mg^{2+} . *J Gen Microbiol* , 1990 , 136(7) : 1437-1446.
- [27] Rossi P , Giansanti F , Boffi A , et al. Ca^{2+} binding to bovine lactoferrin enhances protein stability and influences the release of bacterial lipopolysaccharide. *Biochem Cell Biol* , 2002 , 80(1) : 41-48.
- [28] Tian ZG , Teng D , Yang YL , et al. Multimerization and fusion expression of bovine lactoferricin derivative LfcinB15-W4 , 10 in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* , 2007 , 75(1) : 117-124.
- [29] Yang YL , Tian ZG , Teng D , et al. High-level production of a candidacidal peptide lactoferrampin in *Escherichia coli* by fusion expression. *J Biotechnol* , 2009 , 139(4) : 326-331.
- [30] Onishi J , Roy MK , Juneja LR , et al. A lactoferrin-derived peptide with cationic residues concentrated in a region of its helical structure induces necrotic cell death in a leukemic cell line (HL-60) . *J Pept Sci* , 2008 , 14(9) : 1032-1038.
- [31] Plaut AG , Qiu J , Grundy F , et al. Growth of *Haemophilus influenzae* human milk: synthesis , distribution , and activity of IgA protease as determined by study of iga⁺ and mutant iga⁻ cells. *J Infect Dis* , 1992 , 166(1) : 43-52.
- [32] Hendrixson DR , Qiu J , Shewry SC , et al. Human milk lactoferrin is a serine protease that cleaves *Haemophilus* surface proteins at arginine-rich sites. *Mol Microbiol* , 2003 , 47(3) : 607-617.
- [33] Ochoa TJ , Clearly TG. Lactoferrin disruption of bacterial type III secretion systems. *Biometals* , 2004 , 17(3) : 257-260.
- [34] Massucci MT , Giansanti F , Di Nino G , et al. Proteolytic activity of bovine lactoferrin. *Biometals* , 2004 , 17(3) : 249-255.
- [35] Longhi C , Conte MP , Seganti L , et al. Influence of lactoferrin on the entry process of *Escherichia coli* HB101 (pRI203) in HeLa cells. *Med Microbiol Immunol* , 1993 , 182(1) : 25-35.
- [36] Di Biase A M , Tinari A , Pietrantonio A , et al. Effect of bovine lactoferricin on enteropathogenic *Yersinia* adhesion and invasion in HEp-2 cells. *J Med Microbiol* , 2004 , 53(5) : 407-412.
- [37] Rose JE , Meyer DH , Fives-Taylor PM. Aae , an autotransporter involved in adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to epithelial cells. *Infect Immun* , 2003 , 71(5) : 2384-2393.
- [38] Ashida K , Sasaki H , Suzuki YA , et al. Cellular internalization of lactoferrin in intestinal epithelial cells. *Biometals* , 2004 , 17(3) : 311-315.