

# 胶原蛋白功能概述

王沥浩,王文慧,郭咏昕,杨 晶

(吉林农业大学 生物反应器与药物开发教育部工程研究中心,吉林 长春 130118)

**摘要:**胶原蛋白是哺乳动物体内含量最丰富的蛋白质,因其独特的理化性质和优良的生物相容性,在许多领域得到了广泛应用。为进一步开发胶原蛋白的经济价值并对其进行有效的利用,综述了胶原蛋白的类型、理化性质、生物学功能及其用途,概括了重组胶原蛋白的国内外的研究进展,并对其开发前景进行了展望。

**关键词:**胶原蛋白;性质;功能;应用;重组胶原蛋白

**中图分类号:**Q512<sup>+</sup>.6

**文献标识码:**A

**文章编号:**1002-2767(2014)03-0150-07

胶原蛋白是一种生物高分子纤维蛋白,动物结缔组织中的主要成分,也是哺乳动物体内含量最多、分布最广的功能性蛋白,占蛋白质总量的25%~30%。与组织的形成、成熟、细胞间信息的传递以及关节润滑、伤口愈合、钙化作用、血液凝固和衰老等有着密切的关系。胶原蛋白是生物科技产业最关键的原材料之一,在医学材料、化妆品、食品工业中均有广泛应用。胶原蛋白具有良好的生物相容性、可生物降解性以及生物活性,具有低抗原性、易被人体吸收、促进细胞成活与生长和促进血小板凝结等特性。它不仅可作为保健食品、美容产品、包装材料,还可以作为食品添加剂应用在肉制品改良、冷冻食品、饮料、糕点以及乳制品中。在医学领域中,胶原蛋白因具有低免疫原性、纤维的再形成性、强的机械性能和生物可降解性等优点,可制成胶原海绵、胶原膜、人工皮肤、固定化酶载体和胶囊等。该文对胶原蛋白的类型及功能进行概述,以期为其开发利用提供参考。

## 1 胶原蛋白的类型、组成与结构特点及物理化学性质

### 1.1 类型

目前,已经发现26种胶原蛋白,常见类型为I型、II型、III型、IV型和V型,大多分布在皮肤和肌腱等组织中,其中,皮肤中约85%的胶原蛋白

属于IV型。根据胶原蛋白在体内的分布和功能特点,又可将胶原分成间质胶原、基底膜胶原和细胞外周胶原<sup>[1]</sup>。胶原蛋白还是一种多糖蛋白,它含有少量的半乳糖和葡萄糖,具有很强的延伸力,不溶于水,可溶解在酸中。

### 1.2 组成与结构特点

IV型胶原蛋白含量最多、研究最透彻,占生物体胶原蛋白总量的90%左右。IV型胶原蛋白一般为白色、透明、无分支的原纤维,是由两条相同的 $\alpha 1(IV)$ 链和一条 $\alpha 2(IV)$ 链组成的异质胶原(Heterotypic Collagen)<sup>[2]</sup>。每条肽链的相对分子质量约为100 000,由1 052个氨基酸残基组成,直径约1.5 nm,长300 nm<sup>[3]</sup>。 $\alpha 1(IV)$ 和 $\alpha 2(IV)$ 肽链的螺旋区含有338个(Gly-X-Y)重复序列,X常为脯氨酸,Y常为羟脯氨酸或羟赖氨酸。因此,甘氨酸约占1/3,脯氨酸和羟脯氨酸占1/5以上,还有大量的羟赖氨酸和丙氨酸。 $\alpha$ 链中吡咯环的存在使N-C键不能自由旋转,构成左手螺旋,螺距为0.87 nm,每转一圈约有3.3个氨基酸残基。3条 $\alpha$ 链依靠侧链残基相连,最小氨基酸甘氨酸残基位于三股螺旋内侧,螺距为96 nm,每圈由36个氨基酸残基形成了原胶原(tropo collagen)分子特有的三股螺旋结构。

肽链中酸性和碱性氨基酸大都集中分布在一定的区段,使得肽链上交替出现着极性和非极性氨基酸区域。两分子可以通过极性区和非极性区的静电引力彼此聚合,处于同一轴线上的前后两个原胶原分子保持一定的距离,形成了胶原原纤维的疏区和密区,透射电镜观察可见IV型胶原的原纤维呈现67 nm的周期性横纹(称为D周期),一个I型胶原分子约长4.4个D周期,分子间的间隙为0.6 D<sup>[5]</sup>。

### 1.3 物理化学性质

**1.3.1 收缩温度** 在水溶液中引起胶原湿热收缩变性的温度称为收缩温度,其指示胶原蛋白热变性的临界温度,在提取皮胶原过程必须控制操

收稿日期:2013-10-30

基金项目:“十二五”国家高新技术研究与发展计划资助项目(863项目)(2011AA100606);生物反应器重大专项资助项目(2011AA100606);教育部博士点基金-青年教师基金资助项目(20122223120002);吉林省中医药管理局资助项目(2012162);吉林省教育厅资助项目;吉林农业大学博士启动基金资助项目(201207)

第一作者简介:王沥浩(1988-),男,吉林省长春市人,在读硕士,从事植物生物反应器研究。E-mail: 516016402@qq.com。

通讯作者:杨晶(1981-),女,吉林省吉林市人,博士,副研究员,从事植物生物反应器研究。E-mail: yangjing5122010@163.com。

作温度不高于收缩温度,以免引起胶原变性。一般来讲,陆生动物的收缩温度要高一些,为 65℃ 左右。E. Georgiou<sup>[6]</sup> 等人研究表明牛腱胶原的热变性温度为 64℃ 左右,而 J. H. Muyonga<sup>[7]</sup> 等人研究表明鲈鱼皮胶原的热变性温度只有 36℃。这可能与胶原中羟脯氨酸含量有关,羟脯氨酸含量越高,收缩温度越高。

1.3.2 盐析与盐溶 作为蛋白质的一类,胶原也具有盐溶、盐析等性质,如在中性溶液中氯化钠浓度小于 1.0 mol·L<sup>-1</sup> 时,有利于 I 型胶原的溶解,而当氯化钠浓度大于 1.0 mol·L<sup>-1</sup> 时,则有利于 IV 型胶原的沉淀<sup>[8]</sup>。依据不同类型胶原溶解度与氯化钠浓度的关系,可以对不同类型的胶原进行分离。

1.3.3 酸和碱水解 胶原是天然的极性蛋白质,如 IV 型胶原含有 4.4% 天冬氨酸(Asp)残基,7.2% 谷氨酸(Glu)残基,2.8% 赖氨酸(Lys)残基,所以酸、碱对胶原均有作用。低离子浓度酸可以破坏分子间盐键和 Schiff 碱,从而引起胶原纤维膨胀、溶解,因此,可以采用 0.5 mol·L<sup>-1</sup> 的乙酸、柠檬酸或盐酸控制 pH 2~3 提取胶原<sup>[9]</sup>,此条件不能引起胶原的全部水解,要得到完全游离的氨基酸,必须使胶原在 105℃、6 mol·L<sup>-1</sup> HCl 中彻底水解<sup>[10]</sup>。碱容易造成胶原肽键水解,含羟基、巯基的氨基酸全部被破坏。如果水解严重,则会产生 D、L-型氨基酸消旋混合物,若 D-型氨基酸含量大于 L-型氨基酸,则会抑制 L-型氨基酸的吸收,有些 D-型氨基酸有毒甚至有致癌、致畸、致突变的作用<sup>[11]</sup>,因此,提取完整胶原时应禁用。

1.3.4 酶解 对胶原作用的酶大致分为 3 类:动物胶原酶、作用于胶原非螺旋区段的蛋白酶及细菌胶原酶。胶原酶是一种能在中性 pH 环境下特异分解天然胶原的酶<sup>[12]</sup>。动物胶原酶的作用位点在第 775 与 776 位氨基酸之间,因为缺少亚氨基,三股螺旋结构较松散<sup>[13]</sup>。α 链被切成两段后就很容易被其它蛋白酶继续水解,因此,在提取用于生物医用材料的胶原时不能使用胶原酶。作用于胶原非螺旋区段的蛋白酶包括胃蛋白酶(pepsin)、木瓜蛋白酶(papain)和胰蛋白酶(trypsin)等,这些酶只作用于非螺旋区肽链,对螺旋区一般没有作用。免疫印记法测得胃蛋白酶在 N 端 3/4 处将 IV 型胶原切短<sup>[14]</sup>。这类酶保留了胶原的三股螺旋区段,使胶原仍然具有生物活性,因此在胶

原提取中应用较多。细菌胶原酶可以从肽链的两端逐步把胶原水解至 Gly-X-Y 的三肽。细菌胶原酶的活性可以不受金属蛋白酶组织抑制剂的影响<sup>[15]</sup>。

## 2 胶原蛋白的生物学功能

### 2.1 胶原蛋白在人体内的作用

2.1.1 保护皮肤,提高皮肤的弹性 胶原蛋白占皮肤成分的 70%,表面积相当大,人体四肢活动时,皮肤中胶原蛋白发挥功能,使皮肤具有保护功能,又有适当弹性及坚硬度。人类表皮分为基底层、棘细胞层、颗粒层、透明层和角质层等,是处于不断更新再生的组织,基底层细胞粘附到和真皮分界的基底膜上,表皮的分化伴随有基底细胞粘附的减少,不断分裂,逐渐向上推移、角化、变形,形成角质层以至最后脱落。每人每天约有 6~14 g 鳞屑脱落,胶原蛋白在调节表皮更新再生中发挥重要的作用,胶原蛋白可促进细胞粘附和细胞增殖<sup>[16]</sup>,Nagelschmidt 等<sup>[17]</sup> 研究表明,胶原蛋白可以被表皮吸收,但不能进入真皮,提示胶原蛋白对角质化的细胞有作用。胶原蛋白存在于真皮层,占皮肤组成成分的 70%。当人活动时,皮肤中胶原蛋白发挥作用,使皮肤具有保护功能,同时又具有适当弹性及坚硬度,如手脚能自由弯曲,跳高时具有弹性等。胶原蛋白是维持皮肤与肌肉弹性的主要成分,能促使肌肉细胞连接并使其具有弹性与光泽。肌肉主要是由肌纤维蛋白及肌球蛋白构成,使细胞与细胞之间利用胶原蛋白进行粘合。胶原蛋白分子形成的立体骨架可以使身体保持良好姿势,并呈现适当柔软度。

2.1.2 钙质与骨细胞结合 骨骼中胶原蛋白含量约占 20%,占骨中总蛋白含量的 80%。骨骼钙的流失会导致骨质疏松。因此当钙流失时,若只增加钙摄入量是无法有效地改善骨质疏松的,因为钙无法在骨中保存,这时,就要先补充胶原蛋白。此外,胶原蛋白的存在能使骨骼与牙齿在坚硬的同时带有弹性,使得钙质与骨细胞结合,不致流失。骨与骨相连接部分,如膝盖、关节等软组织主要成分也是胶原蛋白,可使运动时筋骨可保持柔软并具有弹性。

2.1.3 联结骨骼与肌肉 骨骼与肌肉能够相互联接也是靠胶原蛋白,这里的胶原蛋白特称为肌腱,其在人体运动时可保持筋骨柔软而有弹性<sup>[18]</sup>。在一般动物的筋骨中也含有许多胶原蛋

白,称为“骨胶原”,因此,可从动物筋骨中抽取胶原蛋白作医药及工业用途。另外胶原蛋白还可使肌肉细胞互相连接,并使其富有弹性和光泽。肌肉主要由肌纤蛋白及肌球蛋白构成,而胶原蛋白则可以使细胞与细胞粘合,同时也是身体构成材料之一。胶原蛋白分子所形成的立体骨架可以使身体保持良好姿势,并呈现适当柔软度。

2.1.4 保持眼角膜透明 胶原蛋白是眼角膜主要蛋白质成分,眼角膜中所含胶原蛋白纤维呈现规则排列,此结构不但可以让光线透过,还可使眼角膜呈现透明<sup>[19]</sup>。圆锥角膜属于一种眼科疾病,圆锥角膜的机械强度比正常角膜低,Wollensak等<sup>[20]</sup>发现通过核黄素和UV-A照射后获得的交联的角膜胶原蛋白能增加角膜基质的硬度,阻止圆锥角膜的进一步发展。目前还出现以胶原蛋白为材料制成的隐形眼镜,提高了眼镜的保水力。

## 2.2 胶原蛋白的基本生物学性能

2.2.1 止血性能 血管内膜损伤后暴露出的内膜下组织主要是胶原,可激活局部凝血过程而生成由纤维蛋白多聚体构成的血凝块,与血小板一起组成牢固的血栓,控制出血。天然的胶原聚集体本身就是很好的止血剂<sup>[21]</sup>。

2.2.2 低免疫原性 胶原是大分子物质,结构重复性大,可溶性胶原的免疫性很低,不溶性胶原的免疫性更低,一般机体不对其产生慢性排斥反应。因此,由胶原制备的异体组织器械如猪或牛的心包、心脏瓣膜可以长期植入人体。

2.2.3 细胞相互作用性能 胶原蛋白作为细胞生长的依附和支架物,能诱导上皮细胞等增殖、分化和移行。在胚胎发育以及成年人的伤口愈合与组织改型期间,胶原蛋白和细胞的相互作用是细胞活动的一个必不可少的特征,胶原蛋白对上皮的形成起促进作用,甚至起诱导作用。

2.2.4 生物相容性 胶原蛋白是细胞外基质的骨架,其特有的三螺旋结构,使其不论作为形成新组织的骨架被吸收,还是被宿主同化,都表现出良好的生物相容性。

2.2.5 生物可降解性 胶原蛋白只有在胶原酶的作用下才能造成肽链断裂,破坏螺旋结构而被水解,这些水解片段在体温条件下能够自行变性,进一步被其它酶降解为寡肽或氨基酸,最后被机体利用或排出。因此,胶原的可控生物降解性对于生物医学材料来说是非常难能可贵的,因此,可

以用作人造器官的移植。

## 3 胶原蛋白的应用

### 3.1 在食品方面的应用

胶原蛋白本身就可以作为一种食品,食用胶原蛋白一般来源于动物的真皮、肌腱和骨胶原,其外观通常为白色,口感柔和,味道清淡,易消化。但多数情况下胶原蛋白在食品中会被用作功能物质或营养成分。

3.1.1 在功能保健食品中的应用 研究表明,作为预防疾病类食品,胶原蛋白可以降低血液中甘油三酯和胆固醇的含量,并可补充体内某些缺乏的必需微量元素,从而使其维持在一个相对正常的范围内,是一种理想的减肥降血脂食品。胶原蛋白还有加速血红蛋白和红细胞生成的功能,改善循环,有利于防治冠心病、缺血性脑病。胶原蛋白能保持血管正常功能,预防动脉硬化和高血压。癌细胞对生命体而言是一种异物,胶原蛋白会包住癌细胞,抑制癌细胞的增殖或转移。因此,它是适于糖尿病和肾脏病等重症患者摄取的优质高蛋白<sup>[22]</sup>。明矾-胶原蛋白联合能够减弱风湿性关节炎的发生<sup>[23]</sup>。此外,胶原蛋白可协助机体排出铝元素,减少铝在体内的聚积,从而降低某些疾病的发生概率,如老年痴呆症的发生。

作为补钙食品,胶原蛋白中的特殊氨基酸—羟脯氨酸是血浆中运输钙到骨细胞的运载工具。骨细胞中的骨胶原是羟基磷灰石的黏合剂,与羟基磷灰石共同构成了骨骼的主体。因此,补钙应先补胶原蛋白,人体摄入足够的胶原蛋白就会对钙质有正常的需要,就会有正常的摄取钙质的能力;李彦春等<sup>[24]</sup>研究表明,结合了钙的胶原蛋白制剂能够显著增强小鼠骨密度,促进生长发育,改善骨质疏松,其补钙效果要优于常规补钙剂,说明胶原蛋白与钙吸收间有重要的相关性。

3.1.2 在食品包装材料中的应用 人造肠衣用胶原蛋白质为主制作的,胶原肠衣本身是营养丰富的高蛋白物质,在热处理过程中,随着水分和油脂的蒸发与溶化,胶原几乎与肉食品的收缩率一致,而其它可食用包装材料还没有发现这种优点。胶原蛋白本身具有固定化酶的功能,可以改善食品尤其是香肠类制品的风味和质量。人造胶原肠衣还具有口感好、透明度高、制作工艺简单等特点,有利于大量生产,开发前景好。

包装膜胶原蛋白可以用作果脯蜜饯等的内包

装膜,辅加以甘油、 $\text{CaCl}_2$ 等添加剂,提高膜的机械性能,同时也是可食性的胶原蛋白包装膜,一般具有良好的抗张强度、热封性和较高的阻气、阻油和阻湿性等功能,可广泛用于各类食品的保鲜。

明胶作为涂层材料用于食品表面,能够避免食品氧化,防止粉末状、颗粒状的糖类食品产生吸潮结块僵硬现象,使食品表面有光泽。明胶作为稳定剂能够防止产品干缩变形。此外,明胶具有保鲜作用,明胶溶液可在果蔬表面形成皮膜,能保证食品的天然风味,可防止食品腐败,延长食品的保质期。

### 3.2 在化妆品方面的应用

胶原蛋白具有保湿、修复皮肤、美白和润泽头发等作用,已经广泛应用于化妆品中。其功效主要有<sup>[25]</sup>:(1)营养性。可以补充皮肤层所需的养分,补充 17 种对人体有益的氨基酸,使皮肤中的胶原蛋白活性增加,保持角质层水分以及纤维结构的完整性,改善皮肤细胞生存环境和促进皮肤组织的新陈代谢,增强循环,达到滋润皮肤、延缓衰老、美容、消皱、养发的目的。(2)修复性。胶原蛋白具有独特的修复功能,胶原蛋白和周围组织的亲和性好,从而具有修复组织的功能。(3)保湿性。天然保湿因子是保持皮肤水分的重要物质,其主要成分是甘氨酸、羟脯氨酸、丙氨酸、天门冬氨酸和丝氨酸等游离氨基酸。在水解胶原蛋白产品中,甘氨酸、丙氨酸、天门冬氨酸和丝氨酸的含量都比较丰富,其质量分数分别达到 20%~23%、10%~12%、4%和 3%左右。另外,胶原分子外侧亲水基团羧基和羟基等的大量存在,使胶原分子极易与水形成氢键,所以胶原蛋白及其多肽具有良好的保水、保湿性能。在相对湿度 70%时,胶原及其水解产物仍可保持其自身质量 45%的水分,化妆品中添加的胶原蛋白达到 0.01%时,即能供给皮肤所需的全面水分<sup>[26]</sup>。(4)配伍性。胶原蛋白可以起到调节并稳定 pH、稳定泡沫、乳化胶体的作用,同时,作为一种功能性成分在化妆品中可以减轻各种表面活性剂、酸、碱等刺激性物质对毛发、皮肤的损害。(5)亲和性。胶原蛋白对皮肤和头发表面的蛋白质分子有较大的亲和力,主要通过物理吸附与皮肤和头发结合,耐漂洗。亲和作用大小随相对分子质量增大而增强,相对分子质量较大,结合位置较多,结合力增强,亲和力增大。它可以渗入皮肤表皮和头发,甚至

皮质层,达到营养皮肤的作用。

3.2.1 在护肤品中的应用 由于胶原及其水解物与人皮肤胶原的结构相似,相容性好,可以扩散到皮肤深层,对人的皮肤有很好的营养作用,且胶原蛋白分子外侧存在大量的羧基和羟基,同时存在大量的甘氨酸等天然保湿因子,能提高组织细胞的贮水能力,使皮肤保湿;许多种胶原蛋白多肽与皮肤细胞的生长、分化、分裂、增殖和迁移有关,能为皮肤提供养分,延缓皮肤衰老,促进皮肤创面修复;胶原蛋白溶液还有很强的抗辐射作用,目前市场中销售的面膜、眼霜和护肤霜等化妆品中很多都含有胶原蛋白。

3.2.2 在护发素中的应用 头发的健康关键在于头发的基础头皮皮下组织的营养,位于真皮层的胶原蛋白是表皮层及表皮附属物的营养供应站。胶原蛋白主要控制着头发的弹性和湿润度,缺乏胶原蛋白头发干燥分叉。毛鳞片是一种十分脆弱的组织,磨擦受热就会磨损,内层的胶原蛋白就会受到刺激而分解,所以需补充胶原蛋白,营养皮下组织,保持头发柔软亮泽。

3.2.3 在美容品中的应用 胶原蛋白虽不是肌肉组织的主要组成物质,但与肌肉生长有着密切关系。对于处于生长阶段的青少年来说,补充胶原蛋白能够促进生长激素分泌以及肌肉生长。而对于想保持体形的成年人,塑造结实健美的肌肉也需要补充胶原蛋白。皮肤的表皮是一层非常致密的组织结构,只能让水、电解质及结构简单的小分子物质通过,而胶原蛋白的分子量大,结构复杂,皮肤无法吸收,因此,在化妆品中直接加入胶原蛋白对皮肤产生美容功效是不可行的。可见,探索得到相对分子质量小、分子结构简单的生物活性胶原肽是将其用于化妆品中的一个重要前提。

### 3.3 在生物医学领域中的应用

低免疫抗原性、生物相容性、止血作用和可生物降解性是胶原蛋白作为生物医学材料的优势所在。近年来,英美等国采用注射性胶原整复面部软组织等各种损伤。我国研制的胶原注射剂已广泛应用于美容界,在延缓皮肤衰老和重建受损肌肤等方面取得了良好的效果,是一种理想的医用材料。Rafiuddin M 等人<sup>[27]</sup>使用胶原蛋白制成的交联管状神经导管成功实现了神经再生;Gopinath D 等人<sup>[28]</sup>用姜黄素交联胶原蛋白膜,使抗氧

化剂缓慢释放以改善创口愈合性能;Ziyuan Cheng 等人<sup>[29]</sup>用丙烯酸和胶原蛋白改善 PCL 表面的亲水性以及细胞-生物材料间的相容性。目前所使用的美容胶原大部分是从健康人体(如胎盘)中提取的,所以需要开发出更多的胶原产品,进而推广使用。

### 3.4 在造纸工业中的应用

3.4.1 作为原料的应用 胶原纤维分子中含有大量的羧基、氨基、羟基,而纤维素中也含有大量羟基和少量羧基,这两种天然高分子中含有许多的活性基团和活性部位,可通过化学或物理的方法制成复合材料,用于制造书面革、膜塑包装材料、壁纸、生活用纸、遮光纸、农副产品包装材料、生物胶原包装纸及复合生物降解材料等。

3.4.2 作为辅助剂的应用 胶原蛋白在造纸中还可作为增强剂、黏合剂、表面活性剂和絮凝剂等,可用于砂布和砂纸等的制造。此外,胶原蛋白的水解产物明胶是照相工业中制造感光胶片的重要原料之一,明胶具有许多优异的性能,在胶片中起着多种作用,迄今为止还无一种材料可以完全取代明胶<sup>[30]</sup>。

## 4 重组胶原蛋白的国内外研究进展

### 4.1 重组胶原蛋白的特点

重组胶原蛋白又称类人胶原蛋白,是基于人胶原蛋白的特征和主要功能序列重新优化设计的基因序列,表达的蛋白是设计序列翻译的具有人胶原蛋白特征的水溶性蛋白质。伴随着基因工程和蛋白质工程等分子生物学研究的发展,人们开始把目光转向利用基因工程技术生产胶原蛋白。

类人胶原蛋白具有良好的生物学相容性、细胞黏附性、促新细胞形成和止血功能,而且可促进上皮细胞生长功能更强。与源于动物组织提取胶原蛋白的生物活性相比,该重组类人胶原蛋白不仅保留了胶原蛋白的原有功效,而且由于其可形成三重复螺旋结构,赋予了其更新的功能,如在分子量及物化特性不变条件下的可加工性。而来自动物组织提取的胶原蛋白为三交叉螺旋结构,加工过程分子容易断裂,引起物化性能的改变。另外,由于从动物组织中提取的胶原蛋白存在病毒隐患的致命缺点,直接限制了其潜在用途的开发,而类人胶原蛋白则克服了此缺点,作为生物材料,可广泛用于医疗行业中,从而拓宽了其开发用途。其进入人体后,免疫排异反应与来自动物组织的

胶原蛋白相比大大减少。

### 4.2 重组胶原蛋白的国内外研究进展

伴随着基因工程、蛋白质工程技术等分子生物学研究的快速发展,科研人员开始把目光聚焦到利用基因工程技术制备类人胶原蛋白的研究,其中主要为重组胶原 I 型、II 型、III 型和 IV 型的研发。

1980 年,Uitto J 等从人皮肤细胞体外培养中得到了 I 型和 III 型前胶原<sup>[31]</sup>。1997 年,芬兰 Oulu 大学胶原蛋白研究中心在研究人 I 型、II 型和 III 型胶原蛋白全序列的毕赤酵母表达中取得较大的成功<sup>[32]</sup>。大量研究表明,胶原蛋白与脯氨酸羟化酶在宿主细胞的共表达是一个很好的策略。1998 年,Vaughn P R 等<sup>[33]</sup>在啤酒酵母中表达出了携带有羟基化片断的类人 III 型胶原蛋白。Nokelainen M 等人使用 2 种杆状病毒转染的昆虫细胞生产类人特异性软骨胶原 II 型,表达出具有稳定三维结构的蛋白<sup>[34]</sup>,产量达到了  $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。1999 年,Bruin E C 等人使用汉森酵母和毕赤酵母作为宿主,表达人类 I 型胶原蛋白的肽链,发现使用胶原蛋白自身的信号肽能使汉森酵母表达并分泌重组蛋白,却不能使毕赤酵母分泌重组胶原蛋白<sup>[35]</sup>。2000 年,Myllyharju J 等人使用甲基酵母 *Pichia pastoris* 表达准人纤维胶原蛋白 I 型、II 型和 III 型<sup>[36]</sup>。2001 年,荷兰的 Werten MW T 等<sup>[37]</sup>利用重叠延伸 PCR 法获得了高度亲水特性长度约 300 bp 的重组明胶基因序列,并且改造后转入毕赤酵母中进行表达,生产重组明胶。2005 年,美国 Fibro Gen 公司与日本的国家传染病研究中心合作研发长度仅为 101 个氨基酸的小分子量重组人源性明胶,利用毕赤酵母 X-33 进行表达,经过高拷贝的筛选,发酵生产了具有生物活性的人源性明胶,产量达到 1.479 L,经纯化后替代动物来源的胶原蛋白应用于疫苗稳定剂<sup>[38]</sup>。2006 年,芬兰胶原蛋白研究中心<sup>[39]</sup>继续利用毕赤酵母进行选择性分泌表达没有 C 端肽的单链重组胶原蛋白片断,为以后的研究奠定了良好的理论基础。另外,还有报道称,在转基因烟草及转基因蚕中表达出人源胶原蛋白<sup>[40]</sup>。由于哺乳动物细胞和昆虫细胞培养成本高、周期长,而且培养只能限于实验规模,目前要满足产业化、大批量需求几乎是不可能的。2006 年,日本广岛大学自然科学研究所吉里胜利教授在英国《Nature》杂志网

络版上发表其研究成果,构建表达载体并采用基因植入法把生产人胶原蛋白的基因植入蚕的细胞里,培育出的转基因蚕的绢丝腺能同时分泌绢丝蛋白和人胶原蛋白,但是人胶原蛋白表达量非常低,含量只有 1% 左右<sup>[41]</sup>。在国内,西北大学的范代娣等<sup>[42-43]</sup>采用 PCR 扩增得到数段人胶原蛋白基因段,接着进行拼接重复,并通过高密度发酵生产人源性胶原蛋白,所得重组胶原蛋白表达量高达 29.4%。2004 年,东京农业科技大学的 Yao J 等<sup>[44]</sup>对胶原蛋白细胞附着作用和自身交联螺旋相关序列作了研究,设计了长度为 240 个氨基酸的类胶原蛋白,并在大杆菌中得到了表达。

## 5 展望

随着我国科学技术的进步、经济的发展和生活质量的普遍提高,人们崇尚绿色、回归自然的意识的加强,以胶原蛋白为原料和添加剂的化妆品受到人们的欢迎。对胶原及其水解产物的进一步研究,使人们生活中越来越多地接触到含胶原蛋白的产品。在国外,对胶原蛋白在美容方面的作用已进行了深入研究并取得了一定的成果。美国、德国和日本等国许多高档化妆品中添加有胶原蛋白。但由于胶原的一些弱点也限制了它的应用,例如经过制备后的胶原蛋白产品,拉伸强度较弱;纯胶原蛋白在体内降解较快,可能存在潜在的抗原性等。同时由于胶原蛋白的来源、加工工艺和原料配比的差异,产品的营养成分及饲用价值也不相同,且皮料在加工过程中不仅要接触许多化学物质,且易受到细菌的感染。重组类人胶原蛋白具有优于动物提取胶原蛋白的独特化学结构,其应用领域十分广阔。大规模生产重组类人胶原蛋白的关键技术之一便是产品的分离纯化。科学先进的分离纯化技术不但保证产品的质量,而且直接决定产品的成本和经济效益。利用现代基因重组技术获得该蛋白在宿主细胞内的表达已经成为研究热点。同时,开发研究化妆品用的胶原蛋白以及生物活性肽具有良好的发展前景。

## 参考文献:

- [1] 顾其胜,蒋丽霞. 胶原蛋白与临床医学[M]. 上海:第二军医大学出版社,2003:1-58.
- [2] Gelse K, Poschl E, Aigner T. Collagen-structure, function and biosynthesis [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2003, 55: 1531-1546.
- [3] Ramachandran G N. Stereochemistry of collagen[J]. *J Peptide Protein Res*, 1988, 31: 1-16.
- [5] Simone Vesentini, Alberto Redaelli, Franco M. Estimation of the binding force of the collagen molecule-decorin core protein complex in collagen fibril[J]. *Journal of Biomechanics*, 2005, 38: 433-443.
- [6] Georgiou E, Theodossiou T, Hovhannisyan V. Second and third optical harmonic generation in type I collagen by nano-second laser irradiation over a broad spectral region[J]. *Optics Communications*, 2000, 176: 253-260.
- [7] Muyonga J H, Cole C G B, Duodub K G. Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*) [J]. *Food Chemistry*, 2004, 85 (1): 81-89.
- [8] 永井, 裕藤本大三郎. 胶原蛋白实验方法[M]. 上海: 上海中医药大学出版社, 1988.
- [9] Wolfgang Friess. Collagen-biomaterial for drug delivery[J]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 1998, 45: 113-136.
- [10] 林炜, 穆畅道, 王坤余, 等. 皮革固体废弃物资源化(IV)胶原的性质及其在医药和化妆品工业中的应用[J]. *中国皮革*, 2001, 30(15): 8-11.
- [11] 李彦春, 靳立强, 危东发, 等. 酶法提取牛皮胶原蛋白的研究[J]. *中国皮革*, 2002, 31(23): 6-9.
- [12] 洪斯同. 胶原与胶原酶[J]. *中国烧伤创疡杂志*, 2000(2): 64-65.
- [13] Barbara Brodsky, John A M Ramshaw. The Collagen Triple-Helix Structure[J]. *Matrix Biology*, 1997, 4: 545-554.
- [14] Takahashi S, Geenen D, Nieves E. Collagenase degrades collagen in vivo in the ischemic heart [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999, 1428: 251-259.
- [15] 程洪伟, 孙广慈, 管正玉, 等. 细菌胶原酶对瘢痕降解的实验研究及临床观察[J]. *中华整形烧伤外科杂志*, 1999, 15(3): 202-206.
- [16] Li G Y, Fukunaga S, Takenouchi K, et al. Comparative study of the physiological properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate as cosmetic materials[J]. *International Journal of Cosmetic Science*, 2005, 27(2): 101-106.
- [17] Nagelschmidt M, Struck H. Kollagen als cosmeticum[J]. *Arch Derm Forsch*, 1974, 250: 237-243.
- [18] Duance V C, Wotton S F, Young R D. Type IX collagen function in articular cartilage[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1990, 580(1): 480-483.
- [19] Kontadakis G, Kymionis G, Portaliou D, et al. Effect of corneal collagen crosslinking on corneal sensitivity, tear function and innervation: a clinical and confocal microscopic study[J]. *Acta Ophthalmologica*, 2009, 87(S244): 1.
- [20] Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Long-term biomechanical properties of rabbit sclera after collagen crosslinking using riboflavin and ultraviolet A [J]. *Acta Ophthalmologica*, 2009, 87(2): 193-198.
- [21] 郭炜, 李荣文, 董燕. 医用胶原蛋白海绵在骨科中的应用[J]. *中国矫形外科杂志*, 2003, 11(1): 4.
- [22] 李二凤, 何小维, 罗志刚. 胶原蛋白在食品中的应用[J]. *食品与药品*, 2006, 3(8): 57-59.
- [23] Mattsson L, Lorentzen J C, Svelander L, et al. Immunization with Alum-Collagen II Complex Suppresses the Development of Collagen-Induced Arthritis in Rats by Deviating the Immune Response[J]. *Scandinavian Journal of Immunology*, 1997, 46(6): 619-624.

- [24] 李彦春,祝德义. 胶原多肽钙的制备及小鼠应用试验[J]. 中国皮革, 2005, 34(15): 36-40.
- [25] 陈冬英. 胶原蛋白与化妆品[J]. 香料香精化妆品, 2001(6): 18-19.
- [26] 裴炳毅. 生物技术制剂及其在化妆品的应用[J]. 日用化学工业, 1996(1): 52-61.
- [27] Rafiuddin Ahmed M, Venkateshwarlu U, Jayakumar R. Multilayered peptide incorporated collagen tubules for peripheral nerve repair[J]. Biomaterials, 2004, 25(13): 2585-2594.
- [28] Gopinath D, Rafiuddin Ahmed M, Gomathi K, et al. Dermal wound healing processes with curcumin incorporated collagen films[J]. Biomaterials, 2004, 25(10): 1911-1917.
- [29] Ziyuan Cheng, Swee-hinteh. Surface modification of ultra thin poly( $\epsilon$ -caprolactone) film using acrylic acid and collagen[J]. Biomaterials, 2004, 25(11): 1991-2001.
- [30] 任俊莉, 邱化玉, 付丽红. 胶原蛋白及其在造纸工业中的应用[J]. 中国造纸学报, 2003, 18(2): 107-109.
- [31] Uitto J, Booth B A, Polak K L. Collagen biosynthesis by human skin fibroblasts. II. Isolation and further characterization of type I and type III procollagens synthesized in culture[J]. Biochim Bio Phys Acta, 1980, 624(2): 545-561.
- [32] Vuorela A, Myllyharju J, Nissi R, et al. Assembly of human prolyl 4-hydroxylase and type III collagen in the yeast *Pichia pastoris*: formation of a stable enzyme tetramer requires coexpression with collagen and assembly of a stable collagen requires coexpression with prolyl 4-hydroxylase[J]. The EMBO Journal, 1997, 16(22): 6702-6712.
- [33] Vaughn P R, Galanis M, Richards K M, et al. Production of recombinant hydroxylated human type III collagen fragment in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. DNA Cell Biol, 1998, 17(6): 511-518.
- [34] Nokelainen M, Helaakoski T, Myllyharju J, et al. Expression and characterization of recombinant human type II collagens with low and high contents of hydroxylysine and its glycosylated forms[J]. Matrix Biol, 1998, 16(6): 329-38.
- [35] Bruin E C, Wolf F A, Laane C M. Expression and secretion of human  $\alpha 1(I)$  procollagen Fragment by *hansenula* Polymorpha as compared to *Pichia* *Pastoris* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2000, 26(9): 640-644.
- [36] Myllyharju J, Nokelainen M, Vuorela A, et al. Expression of recombinant human type I-III collagens in the yeast *Pichia* *Pastoris* [J]. Biochem Soc Trans, 2000, 28(4): 353-357.
- [37] Werten W T, Wisselink W H, Bosch T J, et al. Secreted production of a custom-designed, highly hydrophilic gelatin in *Pichia* *Pastoris* [J]. Protein Engineering, 2001, 14(6): 447-454.
- [38] Olsen D, Jiang J, Chang R, et al. Expression and characterization of a low molecular weight recombinant human gelatin: development of a substitute for animal-derived gelatin with superior features[J]. Protein Expression and Purification, 2005, 40(2): 346-357.
- [39] Pakkanen O, Pirskanen A, Myllyharju J. Selective expression of nonsecreted tripe-helical and secreted single-chain recombinant collagen fragments in the yeast *Pichia* *Pastoris* [J]. Journal of Biotechnology, 2006, 123(2): 248-256.
- [40] Olsen D, Yang C L, Bodo M, et al. Recombinant collagen and gelatin of drug delivery[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2003(55): 1547-1567.
- [41] Adaehi T, Tomita M, Shimizu K, et al. Generation of hybrid transgenic silkworms that express Bombyx mori Prolylhydroxylase  $\alpha$ -subunits and human collagens in posterior silk glands: production of cocoons that contained collagens with hydroxylated proline residues[J]. Journal of Bio technology, 2006, 126(2): 205-219.
- [42] 骆艳娥, 范代娣, 花秀夫, 等. 重组大肠杆菌高密度发酵生产类人胶原蛋白的过控研究[J]. 西北大学学报, 2005, 35(2): 180-183.
- [43] 范代娣. 一类人胶原蛋白及其生产方法: 中国, 01106757[P]. 2002-10-02.
- [44] Yao J, Yanagisawa S, Asakura T. Design, expression and characterization of collagen-like proteins based on the cell adhesive and crosslinking sequences derived from native collagens[J]. The Journal of Biochemistry, 2004, 136(5): 643-649.

## Summary on the Function of Collagen

WANG Li-hao, WANG Wen-hui, GUO Yong-xin, YANG Jing

(Ministry of Education Engineering Research Center of Bioreactor and Pharmaceutical Development, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118)

**Abstract:** Collagen is the most abundant protein in mammalian, it is widely used in many fields for its specific physicochemical properties and fine biocompatibility. In order to develop and use the economic value of collagen further and effectively, the types, physicochemical properties, biological functions and application were summarized, research progress at home and abroad of recombinant collagen and development prospects were put forward.

**Key words:** collagen; property; function; application; recombinant collagen