

· 综 述 ·

# 重组胶原蛋白的产业发展历程和生物医学应用前景展望

傅容湛<sup>1</sup>, 范代娣<sup>1,2</sup>, 杨婉娟<sup>3</sup>, 陈亮<sup>3</sup>, 曲词<sup>4</sup>, 杨树林<sup>5</sup>, 徐丽明<sup>3</sup>

1 西北大学 化工学院, 陕西 西安 710069

2 陕西巨子生物技术有限公司, 陕西 西安 710077

3 中国食品药品检定研究院, 北京 102629

4 河北考力森生物科技有限公司, 河北 邯郸 057450

5 南京理工大学 环境与生物工程学院, 江苏 南京 210094

傅容湛, 范代娣, 杨婉娟, 陈亮, 曲词, 杨树林, 徐丽明. 重组胶原蛋白的产业发展历程和生物医学应用前景展望. 生物工程学报, 2022, 38(9): 3228-3242.

FU RZ, FAN DD, YANG WJ, CHEN L, QU C, YANG SL, XU LM. Industrial development and biomedical application prospect of recombinant collagen. Chin J Biotech, 2022, 38(9): 3228-3242.

**摘 要:** 重组胶原蛋白作为天然动物组织胶原的替代物具有广泛应用于生物材料、生物医学等领域的潜力。种类繁多的重组胶原蛋白类型及其衍生体在多种表达系统中可实现一定规模的产业化生产, 为探索和拓展重组胶原蛋白的临床应用奠定了基础。文中简述了重组胶原蛋白的不同表达体系, 如大肠杆菌、酵母、植物、昆虫、哺乳动物和人类细胞表达体系, 重组胶原蛋白的优势及潜在的应用和局限。着重介绍了目前重组胶原蛋白生产, 包括不同表达体系的构建策略和重组胶原蛋白羟基化修饰等方面的研究进展, 总结了重组胶原蛋白在生物医药领域的应用及应用基础研究和应用前景展望。

**关键词:** 重组胶原蛋白; 重组类人胶原蛋白; 重组胶原蛋白变体; 重组蛋白表达体系; 生物医学应用

**Received:** January 22, 2022; **Accepted:** April 13, 2022

**Supported by:** National Key Research and Development Program of China (2019YFA0905200)

**Corresponding authors:** FAN Daidi. E-mail: fandaidi@nwu.edu.cn

XU Liming. E-mail: xuliming@nifdc.org.cn

**基金项目:** 国家重点研发计划 (2019YFA0905200)

# Industrial development and biomedical application prospect of recombinant collagen

FU Rongzhan<sup>1</sup>, FAN Daidi<sup>1,2</sup>, YANG Wanjuan<sup>3</sup>, CHEN Liang<sup>3</sup>, QU Ci<sup>4</sup>, YANG Shulin<sup>5</sup>, XU Liming<sup>3</sup>

1 School of Chemical Engineering, Northwest University, Xi'an 710069, Shaanxi, China

2 Shaanxi Giant Biotechnology Co. Ltd., Xi'an 710077, Shaanxi, China

3 National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China

4 Hebei Collagen Biotechnology Co. Ltd., Handan 057450, Hebei, China

5 School of Environment and Biological Engineering, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing 210094, Jiangsu, China

**Abstract:** Recombinant collagen, as an alternative to natural collagen, has the potential to be widely used in biomaterials, biomedicine, etc. Diverse recombinant collagens and their variants can be industrially produced in a variety of expression systems, which lays a foundation for exploring and expanding the clinical application of recombinant collagens. We reviewed different expression systems for recombinant collagens, such as prokaryotic expression systems, yeast expression systems, as well as plant, insect, mammal, and human cell expression systems, and introduced the advantages, potential applications, and limitations of recombinant collagen. In particular, we focused on the current progress in the recombinant collagen production, including recombinant expression system construction and hydroxylation strategies of recombinant collagen, and summarized the current biomedical applications of recombinant collagen.

**Keywords:** recombinant collagen; recombinant human-like collagen protein; recombinant collagen variant; recombinant protein expression system; biomedical application

胶原 (collagen) 是指作为细胞外基质的关键结构成分的一大类蛋白质, 广泛存在于所有组织和器官内, 包括皮肤、骨骼、肌腱、韧带、软骨和其他特定组织, 为组织提供强度、耐久性和柔韧性<sup>[1-2]</sup>。胶原蛋白因其优异的生物学功能、生物相容性和生物可降解等特性, 成为生物材料和再生医学等领域最广泛使用的蛋白质材料之一, 包括美容填充材料<sup>[3]</sup>、药物递送系统<sup>[4]</sup>、手术缝合和组织工程支架<sup>[5-6]</sup>等。目前市面上广泛使用的胶原材料主要是来源于动物组织提取获得的各种不同类型胶原蛋白。

大约 30 年前, 研究人员开始使用重组 DNA 技术制备胶原蛋白的研究。在生物材料或生物医学领域中, 重组胶原蛋白已成为动物源胶原

蛋白材料的一种有吸引力的替代方法。重组胶原蛋白是通过将胶原蛋白的天然基因序列或重新优化设计的基因序列, 导入选定的宿主细胞中, 如: 大肠杆菌和酵母菌, 经过培养、发酵、分离纯化等工艺, 获得的具有一定天然胶原蛋白特征和主要功能的蛋白质。由于重组胶原蛋白分子单一、结构清晰、易于控制, 因此在生物医学及组织工程领域具有很好的潜在应用价值。此外, 重组胶原蛋白技术可以用于无法从组织中规模获取的胶原蛋白类型的大量生产及一些在其他动物群体 (包括鸟类和海洋物种) 中存在的独特胶原蛋白类型的生产<sup>[7]</sup>。

根据重组胶原蛋白研究策略, 目前可分为 3 类: (1) 重组人胶原蛋白 (recombinant human

collagen protein), 是指由 DNA 重组技术制备的, 含有人胶原蛋白特定类型基因编码的全长(至少含有全部螺旋域)或部分基因序列(至少含有螺旋域)的重组蛋白, 具有胶原蛋白理化性质和生物学功能, 但非必须具有三螺旋结构; (2) 重组类人胶原蛋白 (recombinant human-like collagen protein), 是指由 DNA 重组技术制备的, 含有人特定类型或不同类型胶原蛋白基因编码的部分序列, 经基因编辑、组合、拼装、剪辑等制备的人胶原蛋白类似物, 具有蛋白质结构, 可无或有三螺旋结构, 具有胶原蛋白理化性质和生物学功能; (3) 重组类胶原蛋白 (recombinant collagen-like protein), 是指由 DNA 重组技术制备的, 含有人特定或不同类型胶原蛋白部分基因编码及人工设计的基因编码, 经基因编辑、组合、拼装等制备的胶原蛋白类似物, 其基因编码序列或氨基酸序列与人胶原蛋白的基因编码序列或氨基酸序列同源性很低, 但具有与胶原蛋白相似的理化性质和生物学功能。

重组胶原表达体系的选择对于成功制备在结构及性能上与生理性胶原蛋白类似的重组胶原蛋白至关重要。胶原蛋白的一些关键特征决定了其作为结构和细胞信号分子的特性, 包括由特定类型  $\alpha$  链组成的热稳定三螺旋构象,  $\alpha$  链的正确翻译后修饰, 前肽的正确加工以及形成超分子组装体的能力。这些关键特征除了依赖于胶原蛋白的自组装, 还很大程度上依赖于重组胶原表达体系中多种胶原修饰酶的存在。因此, 选择具有所需胶原修饰酶的表达体系是成功制备生产重组胶原蛋白的关键。目前多种表达系统被用于制备各种类型胶原蛋白、胶原蛋白片段和修饰的胶原蛋白变体, 促进了重组胶原蛋白产业长足发展。本文主要对重组胶原蛋白的产业发展历程, 包括各种表达体系的开

发和潜在应用, 以及亟待解决的问题进行综述。

## 1 重组胶原蛋白的表达体系

第一个用于制备重组胶原蛋白的表达体系是 Fertala 等<sup>[8]</sup>尝试的具有表达天然胶原蛋白修饰酶活性的哺乳动物细胞。该团队所制备的重组 I 型和 II 型前胶原具有正常的热稳定性, 并且实现了正确的脯氨酸和赖氨酸残基羟基化、正确的糖基化和前胶原 N 蛋白酶和 C 蛋白酶的加工; 经过适当的修饰和酶促处理, 这些天然的重组胶原蛋白能够组装成组织良好的原纤维。但较低的产率和高成本是哺乳动物细胞表达体系生产该类胶原蛋白的关键卡脖子问题, 因此易于工业规模生产的表达体系得到了充分的研究和发展, 主要包括细菌、酵母和昆虫细胞。此外, 研究人员还研究了在包括烟草、大麦和玉米在内的植物细胞, 或在转基因小鼠乳腺和转基因鸡的卵中制备重组胶原蛋白的可行性。表 1 列举了目前被使用的用于表达重组胶原蛋白的各种不同表达系统。

### 1.1 原核生物 (大肠杆菌) 表达体系

大肠杆菌表达系统是目前应用最广泛的蛋白质表达系统, 其遗传背景清晰, 发酵成本低、生产周期短、效率高, 可以快速大规模生产外源蛋白, 具备规模化生产外源蛋白的潜力。大肠杆菌已被成功用于表达多种重组类人胶原蛋白, 常见载体包括 pGE、pET 系列, 尽管所表达的胶原蛋白通常缺乏羟基化, 仍能表现出良好的热稳定性<sup>[39]</sup>。范代娣教授团队<sup>[25,38]</sup>利用大肠杆菌表达发酵获得的不同类型的重组 I、II、III 型胶原蛋白 (Mr 分别为 97、110、130 kDa) 其最高产量达 14 g/L, 构建了不同类型和不同分子量的胶原蛋白分子库。这些重组胶原蛋白已被用于研制人工血管、止血敷料、皮肤创伤修复材料、医学美容、软骨修复

表 1 不同表达系统制备的重组胶原蛋白

Table 1 Recombinant collagen produced in different expression systems

Expression system	Host cell	Collagen types	Hydroxylation	References	
a. Expression systems containing endogenous proline-4-hydroxylase (P4H) activity					
Cell culture	HT-1080	Type I $\alpha 1$ chain	Endogenous	[9]	
	CHO cells	Type IV	Endogenous	[10]	
	HEK293 cells	Type X	Endogenous	[11]	
	Sf9 cells with baculovirus		Type I	Endogenous	[12]
			Type II	Enhance Endogenous	[13-14]
			Type III	Endogenous	[15]
			Type IX	Enhance endogenous	[16]
Transgenic animals	Mouse	Type XIII	Endogenous	[17]	
		Type I $\alpha 1$	Endogenous	[18]	
		Type VII	Endogenous	[19]	
	Silkworm	Type III fragment	Enhance endogenous	[20]	
b. Expression systems with no P4H activity					
Transgenic plants	Tobacco	Type I $\alpha 1$	-	[21]	
	Corn	Type I $\alpha 1$	-	[22]	
	Barley	Type I $\alpha$ and type I $\alpha 1$ chain-fragment	-	[23]	
Micro organisms	<i>E. coli</i>	Type 2 CB8, CB10	-	[24]	
		Type I	-	[25]	
		Type III $\alpha$ chain fragment	-	[26]	
c. Expression systems with exogenous P4H activity					
Transgenic plants	Tobacco	Type I $\alpha 1$	Exogenous	[21,27]	
	Maize seed	Type I $\alpha 1$	Exogenous	[28]	
Micro organisms	<i>P. pastoris</i>	Type I	Exogenous	[29-31]	
		Type III	Exogenous	[29,32]	
		Type II	Exogenous	[33]	
	<i>S. cerevisiae</i>	Type I	Exogenous	[34-35]	
	<i>H. polymorpha</i>	Recombinant gelatin	Exogenous	[36]	
	<i>E. coli</i>	Type III	Exogenous	[24,37-38]	

等医学领域<sup>[40-42]</sup>。王皓<sup>[43]</sup>在大肠杆菌系统中表达类人胶原蛋白基因 *COL6A2*，重组类人胶原蛋白 (Mr = 30 kDa) 表达量为 34.2%。李瑛琦等<sup>[26]</sup>构建大肠杆菌表达菌株表达类人 III 型胶原蛋白，并发酵扩大培养提升类人 III 型胶原蛋白 (Mr = 13 kDa) 的产量可以达到 3.02 g/L。杨霞<sup>[44]</sup>报道采用大肠杆菌表达系统表达一种单

链重组类人胶原蛋白，由人 III 型胶原蛋白肽段作为基本重复单元 (30 个氨基酸残基) 重复 16 次后连接人胶原蛋白 II 型肽段 (10 个氨基酸残基) 为末端，通过发酵实现制备，但产量未见相关报道。

然而，大肠杆菌由于自身缺乏脯氨酸羟化酶，因此在单独表达胶原蛋白时不能获得

羟基化的胶原蛋白，无法有效形成三螺旋结构，进而抑制天然结构胶原分子到胶原纤维的自组装。细菌体系表达重组胶原蛋白存在的羟基化问题可以通过转导羟化酶来解决。唐云平等<sup>[24]</sup>将胶原蛋白部分编码基因、人源脯氨酸羟化酶基因和 D-阿拉伯糖-1,4-内酯酶基因在大肠杆菌中共表达，获得了羟化的类人胶原蛋白 (Mr = 35 kDa)，脯氨酸残基羟化率超过 10%，产量为 0.26 g/L。Rutschman 等<sup>[37]</sup>在大肠杆菌中将人 III 型部分胶原蛋白编码基因 (*COL3A1*) 与病毒来源的赖氨酰羟化酶 L230 基因和脯氨酸羟化酶 L593 基因共表达，制备获得重组 III 型类人胶原蛋白 (Mr = 29 kDa) 具有与天然人胶原蛋白相似的羟基化水平，但由于其氨基酸序列与人胶原蛋白差异明显，存在增加免疫原性风险。虽然在大肠杆菌中可获得羟化的类人胶原蛋白，但产量普遍不高，为满足市场上对胶原蛋白的需求还须不断的探索与改进。

## 1.2 真核生物表达体系

### 1.2.1 酵母表达体系

酵母表达体系因其易于遗传修饰，且具有合成翻译后修饰和蛋白质折叠所需酶的能力，理论上说也具有易高细胞密度发酵和低成本优势等优点。迄今为止，利用酵母表达人胶原蛋白的研究较多，如毕赤酵母、汉逊酵母和酿酒酵母等，其中利用毕赤酵母工程菌表达获得的重组人胶原蛋白的表达量和羟化效率最高。Myllyharju 等<sup>[29-30]</sup>将人 I、II 和 III 型胶原蛋白编码基因整合到含脯氨酸羟化酶的毕赤酵母工程菌中，获得的重组胶原蛋白均能被充分羟基化，且通过持续供氧使产量达到 0.2–0.6 g/L，获得的人 I、II 和 III 型胶原蛋白的分子量为 116–200 kDa。FibroGen 公司采用该技术生产重组类人 I 和 III 型胶原蛋

白，并应用于止血剂<sup>[38]</sup>和角膜再生材料<sup>[39]</sup>商业化产品的研发。范代娣教授课题组<sup>[31]</sup>在毕赤酵母 GS115 中实现了人 I 型和 III 型胶原  $\alpha 1$  链基因和脯氨酸-4-羟化酶基因共表达，实现羟化人 I 型和 III 型胶原蛋白  $\alpha 1$  链 (Mr = 130 kDa) (无 N 端前肽和 C 端前肽) 的高效生产，酵母体系重组胶原蛋白分别被用于研制创伤修复材料、注射凝胶类材料及软骨修复类等医学领域<sup>[40-42]</sup>。徐立群<sup>[45]</sup>表达了重组 VI 型胶原蛋白 (Mr = 32 kDa)，为其活性功能的探讨及其生产奠定基础。杨树林教授课题组<sup>[32,46-47]</sup>以人 III 型胶原蛋白  $\alpha 1$  链编码基因为模板，在毕赤酵母细胞中表达重组胶原蛋白 (Mr = 55 kDa)，12.5 L 发酵罐体系表达量为 3.81 g/L。该团队生产的高纯度 (>99%) 重组胶原蛋白已在医用生物材料及组织工程领域开展了诸如生物多孔海绵支架<sup>[48]</sup>、敷料<sup>[49]</sup>、医用纳米纤维膜<sup>[50]</sup>及医用水凝胶<sup>[51]</sup>等产品的研发。李佳佳等<sup>[33]</sup>和钱松等<sup>[52]</sup>分别在毕赤酵母 SMD1168 中实现编码人 I 型胶原蛋白  $\alpha 1$  和 II 型胶原蛋白  $\alpha 1$  链的优化基因的表达，实现了成熟全长的人 I 型胶原蛋白  $\alpha 1$  链 (Mr = 97.15 kDa) 和成熟全长 II 型胶原蛋白  $\alpha 1$  链 (Mr = 98.5 kDa) (均为包含 N 端前肽、三螺旋区域、C 端前肽的成熟全长氨基酸序列) 的高效生产表达。侯增森等<sup>[53]</sup>基于人 I 型胶原蛋白 Gly-X-Y 序列设计编码亲水性 Gly-X-Y 胶原肽段的核苷酸序列，构建类人胶原蛋白毕赤酵母工程菌，获得表达量达 4.5 g/L，纯度大于 95% 的重组类人胶原蛋白 (Mr = 38 kDa)。总体而言，重组胶原蛋白能够通过脯氨酸-羟化酶在毕赤酵母中共表达实现充分的羟基化，且随着发酵产量的逐步提高，具备了工业化生产前景。酿酒酵母也被许多人用来生产重组胶原蛋白。Chan 等<sup>[35]</sup>设计了含有脯氨酰羟化酶的酿酒酵母可制备 III 型胶

原蛋白 ( $M_r = 190$  和  $270$  kDa), 但脯氨酸羟基化水平约 0.5%, 显著低于天然人胶原蛋白。Vaughn 等<sup>[54]</sup>采用不同的克隆策略提升了 III 型胶原蛋白 ( $M_r = 30$  和  $60$  kDa) 的羟基化水平, 但仍低于天然胶原蛋白。

虽然酵母重组人胶原蛋白与天然人胶原蛋白相似度更高, 但多为同源三聚体。然而, 相对更难表达的异源三聚体胶原, 如人 I 型胶原, 由于其在组织中含最高、被研究报道得最多, 同时科学界对其性能安全性了解最清晰, 因此在生物医药或组织工程等领域比同源三聚体胶原, 如 II 和 III 型胶原, 具有更广泛的潜在应用前景。Toman 等采用优化克隆表达脯氨酸羟化酶两个亚单位的在酿酒酵母, 成功制备人 I 型胶原蛋白  $\alpha_1$  链和  $\alpha_2$  链, 其  $\alpha_1$  链和  $\alpha_2$  链比例与天然 I 型胶原具有的比例 (2:1) 相似<sup>[34]</sup>。Olsen 等通过去除对于 I 型胶原蛋白三螺旋结构非必需的 N-和 C-区域, 提高酿酒酵母生产重组人 I 型胶原蛋白的产量<sup>[55]</sup>。

### 1.2.2 植物表达体系的构建

重组胶原蛋白已经在几种植物系统中被成功表达, 如玉米 (*Zea mays*) 和烟草植物 (*Nicotiana tabacum*) 中的植物细胞<sup>[21,27]</sup>, 通过与羟基化酶共表达能够产生重组 I 型胶原同源三聚体 ( $M_r = 70.0$ – $120.0$  kDa), 但通常存在着外源蛋白表达量低等问题。Merle 等<sup>[27]</sup>通过共表达人 I 型胶原蛋白  $\alpha_1$  链基因和嵌合的 P4H 基因至烟草植株, 成功制备羟基化的同源三聚体重组 I 胶原蛋白 ( $M_r = 120.0$  kDa)。这是第一次在烟草中运用瞬时表达技术, 共表达动物细胞来源修饰酶, 以提高植物中重组蛋白的质量。Eskelin 等<sup>[23]</sup>以大麦种子作为宿主, 表达了人 I 型胶原蛋白的  $\alpha_1$  链 ( $M_r = 45$  kDa) 和  $4.5 \times 10^4$  片段, 其中  $4.5 \times 10^4$  片段的产量达到

150 g/ha, 有商业应用前景。Stein 等<sup>[21]</sup>在烟叶中将人 I 型胶原蛋白  $\alpha_1$  链和  $\alpha_2$  链编码基因、人源脯氨酸羟化酶和赖氨酸羟化酶基因进行共表达 ( $M_r = 170.0$  kDa), 产量为 20 g/L, 且羟脯氨酸和羟赖氨酸的含量分别为 7.55% 和 0.74%, 羟基化程度与天然人 I 型胶原蛋白非常接近, 该技术已被 Collplant 公司 (耐斯兹敖那, 以色列) 用来商业化生产重组 I 型人胶原蛋白用于临床应用的产品中, 据报道用于伤口敷料凝胶 (VergenixFG)<sup>[56-58]</sup>和用于肌腱治疗相关材料 (VergenixSTR) 中<sup>[59]</sup>。

### 1.2.3 昆虫表达系统

昆虫杆状病毒表达载体系统 (baculovirus expression vector systems, BEVS) 由杆状病毒表达载体和病毒感染的昆虫宿主组成的二元表达系统, 由于其可以对真核蛋白进行翻译后加工等过程而被广泛地用于真核基因的体外表达。而且昆虫是杆状病毒的自然宿主, 不会感染其他动物、植物及人类, 具有较高的安全性。Nokelainen 等<sup>[13]</sup>构建了两株杆状病毒表达系统, 其中一株编码 II 型胶原  $\alpha$  链, 另一株编码人 P4H 的  $\alpha$  和  $\beta$  亚基, 共转染昆虫细胞后, 成功表达了具有稳定三螺旋结构的人 II 型胶原蛋白 ( $M_r = 120.0$  kDa), 表达量达 50 mg/L。齐琦等<sup>[14]</sup>研究了利用重组杆状病毒多基因表达系统高效表达人 II 型胶原蛋白全序列。利用重组病毒 BmNPV-Col II-IM 注射 5 龄起家蚕幼虫, 得到的重组人 II 型胶原蛋白 ( $M_r = 300.0$  kDa) 可高达约 1 mg/头。但是, 昆虫杆状病毒表达系统也存在着一定的缺陷, 例如无法连续表达异源蛋白, 无法产生复杂的糖基侧链。分离的昆虫细胞也被用作重组胶原蛋白表达系统, 如由甘蓝夜蛾 (*Trichoplusia ni*) 获得的克隆 High Five<sup>TM</sup> (HF) 昆虫细胞。在没有重组脯氨酸-羟化酶 P4H 的情况下, HF 细胞能够表达含 4-羟

基脯氨酸的重组人III型胶原蛋白,但热稳定性较低。添加重组脯氨酸-羟化酶 P4H 或在培养基中添加抗坏血酸均可提升胶原的羟基化水平和热稳定性<sup>[16]</sup>。

Tomita 等<sup>[15]</sup>构建了胶原蛋白表达载体,并采用基因植入方法,通过转基因蚕的丝腺分泌表达人III型胶原蛋白片段 (Mr = 53、75 和 88 kDa),长度约为天然人III型胶原蛋白全长的 1/5,含量约为占蚕茧干重的 1%,且脯氨酸羟基化不充分。Adachi 等<sup>[20]</sup>采用多基因共表达技术实现 I 型胶原蛋白  $\alpha 1$  链和高活力脯氨酸羟基化酶 P4H 的共表达,转基因蚕的 P4H 活力是野生型的 130 倍,利用转基因蚕的中部丝腺分泌表达人 I 型胶原蛋白  $\alpha 1$  链,表达量提高到蚕茧干重的 8%,但所表达的人 I 型胶原蛋白链 (Mr = 120.0 kDa) 缺乏羟脯氨酸,不能形成三螺旋结构。

#### 1.2.4 哺乳动物或人细胞表达体系

利用现代分子生物学技术,重组 DNA 可以被导入受精卵整合到宿主基因组中,实现重组胶原蛋白在转基因动物各组织和器官中的表达。John 等<sup>[60]</sup>在转基因小鼠乳腺中表达了完全羟基化的重组胶原蛋白 (Mr = 60 kDa)。Toman 等<sup>[18]</sup>在转基因小鼠乳腺内成功表达了可分泌、可溶性、具有螺旋结构的人 I 型胶原同源三聚体 (Mr = 160 kDa),表达量高达 8 mg/mL。Hou 等<sup>[19]</sup>在中国仓鼠卵巢内表达人 VII 型胶原蛋白 (Mr = 290 kDa)。多种人类细胞系,包括纤维肉瘤细胞 (HT-1080) 和胚胎肾细胞 (293-EBNA) 被成功用于制备重组人胶原蛋白 I 型、V 型 (Mr = 120 和 250 kDa) 和 VII 型 (Mr = 290 kDa)<sup>[9,61-63]</sup>。然而,目前细胞表达体系制备重组胶原蛋白因产量低不能满足工业规模生产的需求。而转基因哺乳动物是重组人胶原蛋白可能的高产来源。

## 2 重组胶原蛋白衍生体研究进展

重组胶原蛋白表达体系关键技术研究为生产具有修饰序列的定制重组胶原蛋白变体开辟了机会,如短胶原衍生肽。虽然目前商业应用主要集中于基于天然胶原蛋白编码基因制备的重组胶原蛋白,但胶原蛋白衍生体因其具有定制特征,如热稳定性和与特定配体相互作用能力,将来可能具有更明显的优势和广泛的应用前景。

胶原衍生肽的三螺旋结构通常不稳定 (热变性温度  $T_m$  30–60 °C),在体温下会展开,因此需要采用多种技术来提高其稳定性。将胶原蛋白衍生序列与三螺旋稳定化 Gly-Pro-Pro 重复序列相接<sup>[64-66]</sup>,或将目标肽与稳定序列杂交可维持其三螺旋结构<sup>[67]</sup>;将胶原蛋白衍生序列与噬菌体 T4 纤维蛋白的 foldon 域片段相连<sup>[68-69]</sup>,由于 foldon 域片段具有形成三聚体的天然能力,因此能够有效地稳定由短胶原肽组装形成的三螺旋结构。此外,研究人员还探索了与细菌衍生的三螺旋肽融合的短胶原蛋白样片段的可能性。细菌衍生的三螺旋肽尽管不含羟脯氨酸残基,但在高温下仍可保持稳定的三重螺旋结构 (热变性温度  $T_m$  约为 89 °C)。由于其较好的稳定性、生物相容性和大规模生产潜力,细菌胶原蛋白在某些生物医学领域具有很好的应用前景。尽管上述方法显著提升了短胶原片段的稳定性,但是非天然序列的存在可能导致材料获得临床批准变得更复杂,因此可基于短胶原片段设计正常长度的胶原蛋白样结构,包含短天然域的串联重复序列,或将短结构域连接到长度与天然胶原蛋白相匹配的分子中,并使其形成三螺旋结构的能力。小部分这类构造的材料能够保留聚集为纤丝结构的能力,但大部分则无法有效形成适当的纤丝,其

中一些材料的热稳定性较低,这些都阻碍了其在组织工程中的应用<sup>[70]</sup>。此外,虽然新的串联重复胶原蛋白衍生体已被作为研究工具,用于定位胶原特异性受体的结合域,定义驱动原纤维形成的区域以及作为治疗性细胞的递送载体等,但目前尚未在临床上应用<sup>[71-73]</sup>。

### 3 重组胶原蛋白的优势及其在生物医学领域的应用

#### 3.1 重组胶原蛋白的优势

重组胶原蛋白相比于传统方法提取的动物源性胶原,水溶性更好,可加工性能更强,并且具有组分单一、制备过程可控、生产周期短等特征,产品品质也更容易控制。因此,重组胶原蛋白在生物材料和生物医学等领域中具有广泛的应用前景。重组胶原蛋白的优势主要表现在:(1)通过基因工程手段在不影响胶原蛋白功能的条件下增加其亲水性氨基酸的含量,从而提高重组胶原蛋白的亲水性,使它们在实际应用中,特别是组织工程材料构建过程中更易于使用。(2)重组单链结构胶原具有更多的活性结合位点,即便是三螺旋结构的重组胶原蛋白也会比天然人组织胶原结构更为松散,暴露出更多生物活性区域,易于与细胞或其他生物活性分子间发生相互作用,在许多方面可能表现出更强的生物活性。例如,重组胶原蛋白具有更强的促成纤维细胞募集、粘附、增殖和迁移的能力,在皮肤修复及皮肤组织工程领域展现出更强的功能性;(3)对于具有催化氧化反应特性的金属离子如铁、铜、汞、镉,具有更强的螯合能力,从而发挥更优异的抗氧化特性、减少皮肤氧化损伤和美白的作用;(4)强化了胶原蛋白富集血小板和凝血因子的能力,表现出更优异的止血与促伤口愈合能力<sup>[74]</sup>。(5)通过重组技术能够实现胶原蛋白分子进行理性设

计和改造,生产天然胶原蛋白的新变体,例如,具有更多数量或种类活性官能团的新胶原蛋白分子、具有多重复特定功能结构域的新胶原蛋白序列,以及基于胶原与其他类型分子(如生长因子)的新嵌合构建体。针对特定应用需求实现胶原蛋白的理性设计和合成,进一步强化胶原蛋白的功能性,以适应食品、化妆品、生物材料等不同领域的应用需求。

#### 3.2 重组胶原蛋白的生物医学应用

重组胶原蛋白已经被广泛用于制备适用于不同用途的生物医用材料,包括组织修复工程、药物递送和蛋白质替代疗法等。通过运用多种制备方法,重组胶原蛋白及其片段被制成多种类型的3D材料,如多孔海绵、纤丝和膜等,以更好地支持细胞附着和生长。例如,引入化学交联稳定胶原蛋白材料,使其可以在体温下发挥作用;使用静电纺丝和磁对准等多种技术形成胶原纤丝结构材料<sup>[75-78]</sup>。范代娣团队<sup>[79-80]</sup>报道多种新型重组胶原蛋白水凝胶体系,应用于皮肤烧伤或慢性伤口治疗的临床研究,发现其治疗效果显著优于临床使用的传统材料,证明重组胶原蛋白材料对于传统组织工程技术制备的临床产品具有替代性。可注射温敏型重组胶凝材料可以直接在受伤部位创建具有适当形状的组织支架,同时还具有药物、细胞输送和可控释放能力。例如,Confalonieri等采用一种市售的含有RGD序列的重组胶原蛋白肽构建微球材料,支持间充质细胞生长<sup>[81]</sup>。范代娣团队设计开发出系列基于重组胶原蛋白的水凝胶材料应用于多种受损组织的修复与再生,包括皮肤<sup>[42]</sup>、软骨<sup>[82-84]</sup>等。Yang等利用重组III型胶原蛋白制备三维多孔支架及水凝胶材料已被应用于医学组织工程领域的应用研究中<sup>[85-86]</sup>。

随着新型支架材料制造技术的进一步发



展, 包括纤维排列电纺方法和 3D 打印技术等, 使得构建有组织的支架材料以及包括细胞在内的组织状生物打印结构成为可能<sup>[87-89]</sup>。例如, 杨树林团队采用静电纺丝法构建重组Ⅲ型胶原蛋白医用双层人造血管<sup>[90]</sup>及利用活体细胞 3D 打印技术制备人造眼角膜<sup>[91]</sup>。但是, 目前大多数重组胶原蛋白材料的研究主要在简单地定义重组胶原蛋白的基本用途, 缺少更深入的关于重组胶原蛋白的基础结构特性、稳定性、异质性等质量研究和基于重组胶原蛋白医疗产品的功效机制及其临床应用研究。

### 3.3 重组胶原蛋白在蛋白质替代疗法中的潜在应用

重组胶原蛋白可用于潜在的蛋白质替代疗法, 治疗多种涉及遗传或获得性胶原缺陷等严重疾病, 尽管这些疾病有非常高的异质性, 没有明确的基因型与表型的相关性, 但大多数都是由于基因突变导致的胶原蛋白减少<sup>[92]</sup>。迄今为止, 胶原蛋白替代疗法的研究大多集中在影响皮肤和肾脏基底膜的疾病上, Ⅶ型胶原蛋白主要针对皮肤底膜的疾病, Ⅳ型胶原蛋白主要针对肾脏基底膜的疾病<sup>[19,93]</sup>。

隐性营养不良大疱性表皮松解症 (recessive dystrophic epidermolysis bullosa, RDEB) 是一种因为基因突变产生了过早的终止密码子, 从而完全阻止胶原的生物合成, 导致Ⅶ型胶原蛋白完全缺失引发的水疱性皮肤病。RDEB 的进行性会导致皮肤过度损伤、疤痕、挛缩和手指融合, 甚至可能发展为鳞状细胞癌<sup>[94]</sup>。迄今为止, 研究人员已经测试了将正常Ⅶ型胶原蛋白引入患病组织的几种方法: (1) 通过递送编码正常胶原蛋白Ⅶ链的 *COL7A1* 基因进行蛋白质替代疗法; (2) 直接递送重组胶原Ⅶ的蛋白<sup>[95]</sup>。

考虑到Ⅶ型胶原蛋白的直接递送,

Remington 等<sup>[96]</sup>将重组Ⅶ型胶原蛋白直接注射到Ⅶ型胶原蛋白缺陷小鼠的皮肤中, 观察到Ⅶ型胶原蛋白在真皮基底膜区域的特定部位蓄积并形成了胶原蛋白Ⅶ组装体, 即锚定纤维, 但并未观察到抗Ⅶ型胶原蛋白 I 抗体的形成。另一项研究中, 重组Ⅶ型胶原蛋白被注射到无Ⅶ型胶原蛋白的小鼠的血液中, 与在小鼠皮内注射的结果一样, 外源重组Ⅶ型胶原蛋白能够聚集在适当的组织位置, 包括真皮与表皮的交界处、舌头和食道<sup>[19]</sup>。尽管已取得这些令人鼓舞的初步结果, 但采用直接递送重组Ⅶ型胶原蛋白以改善 RDEB 患者组织结构完整性的治疗方案并未从实验室的研究阶段转化到临床应用中。Phoenix Tissue Repair 公司开始了治疗Ⅶ型胶原突变的 RDEB 患者的临床试验, 以确定胶原蛋白替代疗法的安全性和有效性<sup>[97]</sup>。如果成功可能也会为其他胶原类型突变引起的疾病使用替代疗法提供可能性。

目前蛋白质替代疗法的发展仍然受许多问题制约。(1) 存在于溶液中的Ⅶ型胶原蛋白 (人体中最大的已知蛋白质之一) 的斯托克斯半径很大, 因此, Ⅶ型胶原蛋白或其他胶原蛋白类型不可能轻易扩散到靶组织部位, 并且高亲和性Ⅶ型胶原蛋白间的结合作用加速了不希望的聚集现象。(2) Ⅶ型胶原蛋白必须通过自组装形成功能性锚定纤维, 这类复杂的过程不太可能在经皮或静脉内注射递送的外源性Ⅶ型胶原蛋白上发生。Supp 等<sup>[98]</sup>的最新研究也支持这一观点: 要使锚定纤维在真皮-表皮交界内正确形成并发挥功能, 表皮角质形成细胞和真皮成纤维细胞都必须产生Ⅶ型胶原蛋白。(3) Ⅶ型胶原蛋白的半衰期。Kühl 等<sup>[99]</sup>证明Ⅶ型胶原蛋白的半衰期约为 1 个月, 因此为取得有积极意义的长期作用必须频繁地大量注射。(4) 静脉注射Ⅶ型胶原蛋白的血小板聚

集作用。尽管体内实验表明, VII型胶原蛋白不像形成纤维的胶原蛋白那样强烈聚集血小板, 但不能排除血液中的胶原蛋白VII触发血凝块形成的可能性<sup>[100]</sup>。而且其他类型胶原蛋白的蛋白质替代疗法在临床应用时也可能会遇到类似问题。例如, 通过局部或全身途径输送IV型胶原蛋白治疗 Alport 综合征<sup>[96]</sup>, 到目前为止仍未确定这种方法的有效性, 也并未解决其引起的小血小板聚集、扩散和激活等问题。

重组胶原蛋白替代疗法治疗胶原基因突变引起的疾病时, 治疗时间的选择是需要考虑的另一个关键因素。如果胶原蛋白是用于形成早期胚胎发育的组织模板, 仅通过产后递送重组胶原蛋白是否能够在其靶组织恢复并维持功能尚不清楚。例如, 在II型胶原蛋白突变引起的脊椎骨骺发育不良的小鼠模型中, 只有在胚胎早期干预才能恢复正常的骨骼组织。相反, 在胚胎后期和产后干预则无法改善这些组织的病程<sup>[101-102]</sup>。

#### 4 重组胶原蛋白临床研究现状及展望

尽管人们针对具有天然结构和胶原衍生结构的重组胶原蛋白已成功开发设计出多种生产系统, 包括不同的生物, 如细菌、哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母、转基因动物和转基因植物。但是所获得的重组胶原蛋白到目前为止还仅限于少数产品在临床上开始应用, 主要的原因可能包括以下几点。

(1) 目前研发重组胶原蛋白的生产系统包括: 细菌、哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母、转基因动物和转基因植物等, 但由于制造技术的难度和胶原蛋白大分子结构的复杂性, 使得能够大规模生产重组胶原蛋白的企业, 尤其是能规模制备满足临床需求品质的重组胶原的企业并不多。

(2) 虽然可以通过重组技术生产不同类型

胶原蛋白, 这也是重组技术的最大优势之一, 目前重组技术能进行规模制备的胶原主要是单链结构胶原, 单链结构胶原蛋白具有更灵活的自组装形式及与细胞基质结合位点等优势。这种组装有些可逆有些不可逆, 例如在某种温度条件下观测到单链重组胶原蛋白可呈现出生理胶原的光谱学性质, 但升高或降低温度这种性状消失, 范代娣团队研发的一种重组胶原蛋白在温度低于 15 °C 时呈现 6 聚体纤维结构, 升高温度则自动解聚, 长纤维变成短棒状, 在体内生理条件下也是一种单链结构, 说明它是一种条件弱交联组装, 而有的组装是不可逆的, 如在一些射线等作用下的组装交联, 在解除条件后其理化性能仍然维持其强组装不可逆性状。正是由于重组胶原蛋白具有多种形式和活性结合位点的优势, 使以其为原料的组织工程医疗产品获得令人鼓舞的临床前结果<sup>[81-82,103]</sup>。单链结构胶原因为非常好的可塑性、可加工性、可体外自组装等使得它更优于已经组装成天然高级结构的动物胶原蛋白, 但缺点是发酵产生的单链结构胶原在纯化及处于微生物复杂酶系时容易降解, 所以纯化成本居高不下。

(3) 基于蛋白材料结构需求进而通过理性设计获得胶原蛋白序列并进行重组表达生产, 可以获得一系列在安全性、功效性方面更好的类胶原衍生体, 而这方面的临床研究需要更严格的基础研究数据及监管部门担心的未知风险评价, 因此导致了重组胶原家族临床应用的慢进程。

(4) 由于动物胶原易于从动物的组织中分离获得, 因此其产品价格比需要更先进技术生产的重组胶原蛋白具有优势; 因此动物胶原蛋白很可能仍会继续为生物医学、制药、食品和化妆品等行业提供大量所需原料。

(5) 组织工程产品是重组胶原蛋白材料的

理想应用领域,但是,由于重组胶原蛋白可能在表达过程中存在异质型、非完全生理性人胶原结构或新结构蛋白等,如不同类型的异质性程度及是否会影响或者多大程度地影响产品的结构稳定性和功能等都需要全面的质量评价和风险评估。而对于一些特殊用途必须需要制备成天然结构胶原蛋白时,重组胶原蛋白的应用将受限于其翻译后修饰水平低、糖基化、羟基化程度不高等限制。相信随着合成生物学、蛋白质工程技术等的快速发展,探索胶原蛋白高效合成路径和特定修饰关键酶、发酵和纯化工艺优化等方法,有望推动降低成本、高修饰水平的多种类型重组胶原蛋白的研发。多种新兴技术的运用,有望进一步拓展重组胶原蛋白的构建和加工技术,同时降低生产成本。

总之,重组胶原蛋白以其优异的生物相容性、多功能性、可扩展性和品质可控等特性,是胶原蛋白家族的直接来源,尤其是生物相容性良好的新生物功能材料领域最大的来源之一。目前不同类型重组胶原蛋白的生产虽然受到表达体系、产量、成本等问题的制约,但未来随着技术进步,重组胶原将为生物材料或生物医学等领域提供临床安全性高、多样化、不同生物学功效的胶原蛋白原料。

## REFERENCES

- [1] Liu XH, Zheng C, Luo XM, et al. Recent advances of collagen-based biomaterials: multi-hierarchical structure, modification and biomedical applications. *Mater Sci Eng C*, 2019, 99: 1509-1522.
- [2] Li J, Wang MC, Qiao YY, et al. Extraction and characterization of type I collagen from skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its potential application in biomedical scaffold material for tissue engineering. *Process Biochem*, 2018, 74: 156-163.
- [3] Liu YW, Gan LS, Carlsson DJ, et al. A simple, cross-linked collagen tissue substitute for corneal implantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47(5): 1869-1875.
- [4] Kouris NA, Squirrell JM, Jung JP, et al. A nondenatured, noncrosslinked collagen matrix to deliver stem cells to the heart. *Regen Med*, 2011, 6(5): 569-582.
- [5] Koens MJW, Faraj KA, Wisman RG, et al. Controlled fabrication of triple layered and molecularly defined collagen/elastin vascular grafts resembling the native blood vessel. *Acta Biomater*, 2010, 6(12): 4666-4674.
- [6] Sun LL, Li BF, Jiang DD, et al. Nile tilapia skin collagen sponge modified with chemical cross-linkers as a biomedical hemostatic material. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2017, 159: 89-96.
- [7] Ramshaw JAM, Werkmeister JA, Glattauer V. Recent progress with recombinant collagens produced in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biomed Eng*, 2019, 10: 149-155.
- [8] Fertala A, Sieron AL, Hojima Y, et al. Self-assembly into fibrils of collagen II by enzymic cleavage of recombinant procollagen II. Lag period, critical concentration, and morphology of fibrils differ from collagen I. *J Biol Chem*, 1994, 269(15): 11584-11589.
- [9] Geddis AE, Prockop DJ. Expression of human *COL1A1* gene in stably transfected HT1080 cells. *Matrix*, 1993, 13: 399-405.
- [10] Fukuda K, Hori H, Utani A, et al. Formation of recombinant triple-helical $[\alpha 1(IV)]_2\alpha 2(IV)$  collagen molecules in CHO cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 231(1): 178-182.
- [11] Frischholz S, Beier F, Girkontaite I, et al. Characterization of human type X procollagen and its NC-1 domain expressed as recombinant proteins in HEK293 cells. *J Biol Chem*, 1998, 273(8): 4547-4555.
- [12] Tomita M, Kitajima T, Yoshizato K. Formation of recombinant human procollagen I heterotrimers in a baculovirus expression system. *J Biochem*, 1997, 121(6): 1061-1069.
- [13] 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. *Matrix Biol*, 1998, 16(6): 329-338.
- [14] Qi Q, Yao LG, Liang ZS, et al. Production of human type II collagen using an efficient baculovirus-silkworm multigene expression system. *Mol Genet Genom*, 2016, 291(6): 2189-2198.
- [15] Tomita M, Ohkura N, Ito M, et al. Biosynthesis of recombinant human pro- $\alpha 1(III)$  chains in a baculovirus expression system: production of disulphide-bonded and non-disulphide-bonded species containing full-length triple helices. *Biochem J*, 1995, 312(3):

- 847-853.
- [16] Pihlajamaa T, Perälä M, Vuoristo MM, et al. Characterization of recombinant human type IX collagen. *J Biol Chem*, 1999, 274(32): 22464-22468.
- [17] Snellman A, Keränen MR, Hägg PO, et al. Type XIII collagen forms homotrimers with three triple helical collagenous domains and its association into disulfide-bonded trimers is enhanced by prolyl 4-hydroxylase. *J Biol Chem*, 2000, 275(12): 8936-8944.
- [18] Toman PD, Pieper F, Sakai N, et al. Production of recombinant human type I procollagen homotrimer in the mammary gland of transgenic mice. *Transgenic Res*, 1999, 8(6): 415-427.
- [19] Hou YP, Guey LT, Wu T, et al. Intravenously administered recombinant human type VII collagen derived from Chinese hamster ovary cells reverses the disease phenotype in recessive dystrophic epidermolysis bullosa mice. *J Invest Dermatol*, 2015, 135(12): 3060-3067.
- [20] Adachi T, Wang XB, Murata T, et al. Production of a non-triple helical collagen alpha chain in transgenic silkworms and its evaluation as a gelatin substitute for cell culture. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 106(6): 860-870.
- [21] Stein H, Wilensky M, Tsafirir Y, et al. Production of bioactive, post-translationally modified, heterotrimeric, human recombinant type-I collagen in transgenic tobacco. *Biomacromolecules*, 2009, 10(9): 2640-2645.
- [22] Zhang C, Baez J, Pappu KM, et al. Purification and characterization of a transgenic corn grain-derived recombinant collagen type I alpha 1. *Biotechnol Prog*, 2009, 25(6): 1660-1668.
- [23] Eskelin K, Ritala A, Suntio T, et al. Production of a recombinant full-length collagen type I alpha-1 and of a 45-kDa collagen type I alpha-1 fragment in barley seeds. *Plant Biotechnol J*, 2009, 7(7): 657-672.
- [24] Tang YP, Yang XL, Hang BJ, et al. Efficient production of hydroxylated human-like collagen via the co-expression of three key genes in *Escherichia coli* origami (DE3). *Appl Biochem Biotechnol*, 2016, 178(7): 1458-1470.
- [25] Guo JQ, Luo YE, Fan DD, et al. Medium optimization based on the metabolic-flux spectrum of recombinant *Escherichia coli* for high expression of human-like collagen II. *Biotechnol Appl Biochem*, 2010, 57(2): 55-62.
- [26] 李瑛琦, 龚劲松, 许正宏, 等. III型类人胶原蛋白在大肠杆菌重组表达及发酵制备. *微生物学通报*, 2020, 47(12): 4164-4171.
- Li YQ, Gong JS, Xu ZH, et al. Recombinant expression and fermentation of type III human-like collagen in *Escherichia coli*. *Microbiol China*, 2020, 47(12): 4164-4171 (in Chinese).
- [27] Merle C, Perret S, Lacour T, et al. Hydroxylated human homotrimeric collagen I in *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transient expression and in transgenic tobacco plant. *FEBS Lett*, 2002, 515(1/2/3): 114-118.
- [28] Xu X, Gan QL, Clough RC, et al. Hydroxylation of recombinant human collagen type I alpha 1 in transgenic maize co-expressed with a recombinant human prolyl 4-hydroxylase. *BMC Biotechnol*, 2011, 11: 69.
- [29] Myllyharju J, Nokelainen M, Vuorela A, et al. Expression of recombinant human type I - III collagens in the yeast *Pichia pastoris*. *Biochem Soc Trans*, 2000, 28(4): 353-357.
- [30] Nokelainen M, Tu H, Vuorela A, et al. High-level production of human type I collagen in the yeast *Pichia pastoris*. *Yeast*, 2001, 18(9): 797-806.
- [31] He J, Ma XX, Zhang FL, et al. New strategy for expression of recombinant hydroxylated human collagen  $\alpha 1(\text{III})$  chains in *Pichia pastoris* GS115. *Biotechnol Appl Biochem*, 2015, 62(3): 293-299.
- [32] 刘斌. 巴氏毕赤酵母基因工程菌高密度发酵表达重组人源胶原蛋白[D]. 南京: 南京理工大学, 2012.
- Liu B. High-density fermentation of genetically engineered *Pichia pastoris* expressing recombinant human-source collagen[D]. Nanjing: Nanjing University of Science and Technology, 2012 (in Chinese).
- [33] 钱松, 李娃娃. 毕赤酵母生产重组人源II型胶原蛋白单链的方法: CN, 110747198B. 2021-04-06.
- Qian S, Li JJ. Production of recombinant human type II collagen single chain by *Pichia pastoris*. CN, 110747198B. 2021-04-06.
- [34] Toman PD, Chisholm G, McMullin H, et al. Production of recombinant human type I procollagen trimers using a four-gene expression system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 2000, 275(30): 23303-23309.
- [35] Chan SWP, Hung SP, Raman SK, et al. Recombinant human collagen and biomimetic variants using a de novo gene optimized for modular assembly. *Biomacromolecules*, 2010, 11(6): 1460-1469.
- [36] De Bruin EC, Werten MWT, Laane C, et al. Endogenous prolyl 4-hydroxylation in *Hansenula polymorpha* and its use for the production of hydroxylated recombinant gelatin. *FEMS Yeast Res*, 2002, 1(4): 291-298.
- [37] Rutschmann C, Baumann S, Cabalzar J, et al.

- Recombinant expression of hydroxylated human collagen in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(10): 4445-4455.
- [38] Shi JJ, Ma XX, Gao Y, et al. Hydroxylation of human type III collagen alpha chain by recombinant coexpression with a viral prolyl 4-hydroxylase in *Escherichia coli*. *Protein J*, 2017, 36(4): 322-331.
- [39] Yu ZX, An B, Ramshaw JAM, et al. Bacterial collagen-like proteins that form triple-helical structures. *J Struct Biol*, 2014, 186(3): 451-461.
- [40] Zhu CH, Fan DD, Wang YY. Human-like collagen/hyaluronic acid 3D scaffolds for vascular tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2014, 34: 393-401.
- [41] 段志广. 类人胶原蛋白止血海绵的性能研究[D]. 西安: 西北大学, 2008.  
Duan ZG. The study on the properties of human-like collagen hematischesis sponge[D]. Xi'an: Northwest University, 2008 (in Chinese).
- [42] Zhu CH, Lei H, Fan DD, et al. Novel enzymatic crosslinked hydrogels that mimic extracellular matrix for skin wound healing. *J Mater Sci*, 2018, 53(8): 5909-5928.
- [43] 王皓. 类人胶原蛋白在大肠杆菌中的高效表达及其抗氧化活性研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2013.  
Wang H. Highly expression of human-like collagen in *E. coli* and research of oxidation resistance[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2013 (in Chinese).
- [44] 杨霞. 一种重组人源胶原蛋白及其生产方法. CN, 103122027 B, 2014. 5. 14.  
Yang X. The invention relates to a recombinant human collagen and a production method thereof. CN, 103122027 B, 2014. 5. 14 (in Chinese).
- [45] 徐立群. 类人胶原蛋白真核表达载体的构建及在毕赤酵母中的分泌表达[D]. 长春: 吉林农业大学, 2013.  
Xu LQ. Construction of human-like collagen expression vector and its expression in *Pichia pastoris*[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2013 (in Chinese).
- [46] 杨树林, 高力虎, 李新柱, 等. 类人胶原蛋白基因、其不同重复数的同向串联基因、含有串联基因的重组质粒及制备方法: 中国, 200610098297.5. 2013-04-17.  
Yang SL, Gao LH, Li XZ, et al. Human like collagen gene, homologous tandem gene with different repeat numbers, recombinant plasmid containing tandem gene and preparation method: CN, 200610098297.5. 2013-04-17 (in Chinese).
- [47] 杨树林, 刘斌, 高力虎, 等. 一种重组人源胶原蛋白及其制备方法: 中国, 201110327865.5. 2013-10-30.  
Yang SL, Liu B, Gao LH, et al. The invention relates to a recombinant human collagen and a preparation method thereof: CN, 201110327865.5. 2013-10-30 (in Chinese).
- [48] 杨树林. 一种重组人源胶原蛋白生物海绵的制备方法: CN, 103435837B, 2014-11-05.  
Yang SL. A preparation method of recombinant human collagen biological sponge: CN, 103435837B, 2014-11-05 (in Chinese).
- [49] 杨树林. 一种重组人源胶原蛋白生物海绵的制备方法: CN, L104292497B, 2017-08-25.  
Yang SL. A preparation method of recombinant human collagen biological sponge: CN, L104292497B, 2017-08-25 (in Chinese).
- [50] 杨树林. 重组人源胶原蛋白及其医用纳米纤维膜: CN, 107556377B, 2021-06-29.  
Yang SL. Recombinant human collagen and its medical nanofiber membrane: CN, 107556377B, 2021-06-29 (in Chinese).
- [51] 杨树林. 重组胶原蛋白及其医用水凝胶: CN, 111072769B, 2021-09-07.  
Yang SL. Recombinant collagen and its medical hydrogel: CN, 111072769B, 2021-09-07. CN, 111072769B, 2021-09-07 (in Chinese).
- [52] 钱松, 王丽萍. 重组人源III型胶原蛋白  $\alpha 1$  链及其应用: CN, 110606896B, 2021-02-26.  
Qian S, Wang LP. Recombinant human type III collagen  $\alpha 1$  chain and its application: CN, 110606896B, 2021-02-26 (in Chinese).
- [53] 侯增森, 李晓颖, 李敏, 等. 重组人源性胶原蛋白的制备及表征. *生物工程学报*, 2019, 35(2): 319-326.  
Hou ZM, Li XY, Li M, et al. Preparation and characterization of recombinant human-source collagen. *Chin J Biotech*, 2019, 35(2): 319-326 (in Chinese).
- [54] Vaughn PR, Galanis M, Richards KM, et al. Production of recombinant hydroxylated human type III collagen fragment in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Cell Biol*, 1998, 17(6): 511-518.
- [55] Olsen DR, Leigh SD, Chang R, et al. Production of human type I collagen in yeast reveals unexpected new insights into the molecular assembly of collagen trimers. *J Biol Chem*, 2001, 276(26): 24038-24043.
- [56] Shoseyov O, Posen Y, Grynspan F. Human collagen produced in plants: more than just another molecule. *Bioengineered*, 2014, 5(1): 49-52.
- [57] Shilo S, Roth S, Amzel T, et al. Cutaneous wound healing after treatment with plant-derived human recombinant collagen flowable gel. *Tissue Eng Part A*, 2013, 19(13/14): 1519-1526.

- [58] Wisner I, Tamir E, Kaufman H, et al. A novel recombinant human collagen-based flowable matrix for chronic lower limb wound management: first results of a clinical trial. *Wounds*, 2019, 31(4): 103-107.
- [59] Farkash U, Avisar E, Volk I, et al. First clinical experience with a new injectable recombinant human collagen scaffold combined with autologous platelet-rich plasma for the treatment of lateral epicondylar tendinopathy (tennis elbow). *J Shoulder Elbow Surg*, 2019, 28(3): 503-509.
- [60] John DC, Watson R, Kind AJ, et al. Expression of an engineered form of recombinant procollagen in mouse milk. *Nat Biotechnol*, 1999, 17(4): 385-389.
- [61] Woodley DT, Keene DR, Atha T, et al. Injection of recombinant human type VII collagen restores collagen function in dystrophic epidermolysis bullosa. *Nat Med*, 2004, 10(7): 693-695.
- [62] Chen M, Costa FK, Lindvay CR, et al. The recombinant expression of full-length type VII collagen and characterization of molecular mechanisms underlying dystrophic epidermolysis bullosa. *J Biol Chem*, 2002, 277(3): 2118-2124.
- [63] Fichard A, Tillet E, Delacoux F, et al. Human recombinant alpha1(V) collagen chain. Homotrimeric assembly and subsequent processing. *J Biol Chem*, 1997, 272(48): 30083-30087.
- [64] Persikov AV, Ramshaw JAM, Kirkpatrick A, et al. Triple-helix propensity of hydroxyproline and fluoroproline: comparison of host-guest and repeating tripeptide collagen models. *J Am Chem Soc*, 2003, 125(38): 11500-11501.
- [65] Brodsky B, Thiagarajan G, Madhan B, et al. Triple-helical peptides: an approach to collagen conformation, stability, and self-association. *Biopolymers*, 2008, 89(5): 345-353.
- [66] Kubyshev V. Stabilization of the triple helix in collagen mimicking peptides. *Org Biomol Chem*, 2019, 17(35): 8031-8047.
- [67] Delsuc N, Uchinomiya S, Ojida A, et al. A host-guest system based on collagen-like triple-helix hybridization. *Chem Commun (Camb)*, 2017, 53(51): 6856-6859.
- [68] Setina CM, Haase JP, Glatz CE. Process integration for recovery of recombinant collagen type I  $\alpha 1$  from corn seed. *Biotechnol Prog*, 2016, 32(1): 98-107.
- [69] Du CL, Wang MQ, Liu JY, et al. Improvement of thermostability of recombinant collagen-like protein by incorporating a foldon sequence. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 79(2): 195-202.
- [70] Steplewski A, Hintze V, Fertala A. Molecular basis of organization of collagen fibrils. *J Struct Biol*, 2007, 157(2): 297-307.
- [71] Sieron AL, Louneva N, Fertala A. Site-specific interaction of bone morphogenetic protein 2 with procollagen II. *Cytokine*, 2002, 18(4): 214-221.
- [72] Majsterek I, McAdams E, Adachi E, et al. Prospects and limitations of the rational engineering of fibrillar collagens. *Protein Sci*, 2003, 12(9): 2063-2072.
- [73] Leitinger B, Steplewski A, Fertala A. The D2 period of collagen II contains a specific binding site for the human discoidin domain receptor, DDR2. *J Mol Biol*, 2004, 344(4): 993-1003.
- [74] 李阳, 朱晨辉, 范代娣. 重组胶原蛋白的绿色生物制造及其应用. *化工进展*, 2021, 40(3): 1262-1275.  
Li Y, Zhu CH, Fan DD. Green biological manufacture and application of recombinant collagen. *Chem Ind Eng Prog*, 2021, 40(3): 1262-1275 (in Chinese).
- [75] Deng AP, Yang Y, Du SM, et al. Electrospinning of *in situ* crosslinked recombinant human collagen peptide/chitosan nanofibers for wound healing. *Biomater Sci*, 2018, 6(8): 2197-2208.
- [76] Chen L, Zhu CH, Fan DD, et al. A human-like collagen/chitosan electrospun nanofibrous scaffold from aqueous solution: electrospun mechanism and biocompatibility. *J Biomed Mater Res A*, 2011, 99(3): 395-409.
- [77] Zhu CH, Ma XX, Xian L, et al. Characterization of a co-electrospun scaffold of HLC/CS/PLA for vascular tissue engineering. *Biomed Mater Eng*, 2014, 24(6): 1999-2005.
- [78] Builles N, Janin-Manificat H, Malbouyres M, et al. Use of magnetically oriented orthogonal collagen scaffolds for hemi-corneal reconstruction and regeneration. *Biomaterials*, 2010, 31(32): 8313-8322.
- [79] Yuan Y, Fan DD, Shen SH, et al. An M2 macrophage-polarized anti-inflammatory hydrogel combined with mild heat stimulation for regulating chronic inflammation and impaired angiogenesis of diabetic wounds. *Chem Eng J*, 2022, 433: 133859.
- [80] Shen SH, Fan DD, Yuan Y, et al. An ultrasmall infinite coordination polymer nanomedicine-composited biomimetic hydrogel for programmed dressing-chemo-low level laser combination therapy of burn wounds. *Chem Eng J*, 2021, 426: 130610.
- [81] Confalonieri D, La Marca M, Van Dongen EMWM, et al. An injectable recombinant collagen I peptide-based macroporous microcarrier allows superior expansion of C2C12 and human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells and supports deposition of mineralized matrix. *Tissue Eng Part A*, 2017, 23(17/18): 946-957.

- [82] Song X, Zhu CH, Fan DD, et al. A novel human-like collagen hydrogel scaffold with porous structure and sponge-like properties. *Polymers*, 2017, 9(12): 638.
- [83] Fan H, Mi Y, Hui JF, et al. Cytocompatibility of human-like collagen/nano-hydroxyapatite porous scaffolds using cartilages. *Biotechnology(Faisalabad)*, 2013, 12(2): 99-103.
- [84] Xie JH, Fan DD. A high-toughness and high cell adhesion polyvinyl alcohol(PVA-hyaluronic acid (HA)-human-like collagen (HLC) composite hydrogel for cartilage repair. *Int J Polym Mater Polym Biomater*, 2020, 69(14): 928-937.
- [85] Yang Y, Ritchie AC, Everitt NM. Using type III recombinant human collagen to construct a series of highly porous scaffolds for tissue regeneration. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2021, 208: 112139.
- [86] Yang Y, Campbell Ritchie A, Everitt NM. Recombinant human collagen/chitosan-based soft hydrogels as biomaterials for soft tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2021, 121: 111846.
- [87] Umeyama R, Yamawaki T, Liu D, et al. Optimization of culture duration of bone marrow cells before transplantation with a  $\beta$ -tricalcium phosphate/recombinant collagen peptide hybrid scaffold. *Regen Ther*, 2020, 14: 284-295.
- [88] Tytgat L, Dobos A, Markovic M, et al. High-resolution 3D bioprinting of photo-cross-linkable recombinant collagen to serve tissue engineering applications. *Biomacromolecules*, 2020, 21(10): 3997-4007.
- [89] Hu K, Hu MM, Xiao YH, et al. Preparation recombination human-like collagen/fibroin scaffold and promoting the cell compatibility with osteoblasts. *J Biomed Mater Res A*, 2021, 109(3): 346-353.
- [90] 杨树林. 重组胶原蛋白及其双层人造血管支架: CN, 201911068794.4, 2021.10.26.  
Yang SL. Recombinant collagen and its double-layer artificial vascular scaffold: CN, 201911068794.4, 2021.10.26.
- [91] 杨树林. 光交联重组胶原蛋白水凝胶、制备方法及其在 3D 生物打印中的应用. CN, 110790950A, 2020.02.14.  
Yang SL. Photo crosslinking recombinant collagen hydrogel, preparation method and its application in 3D biological printing. CN,110790950A, 2020.02.14 (in Chinese).
- [92] Olavesen AH. Connective tissue and its heritable disorders. *Molecular, genetic and medical aspects. FEBS Lett*, 1993, 335(1): 141.
- [93] Lowell HB, Michael BT, Raymond RP, et al. Collagen IV replacement: EP, 3171889A4, 2018.03.14
- [94] Bardhan A, Bruckner-Tuderman L, Chapple ILC, et al. Epidermolysis bullosa. *Nat Rev Dis Primers*, 2020, 6: 78.
- [95] Has C, South A, Uitto J. Molecular therapeutics in development for epidermolysis bullosa: update 2020. *Mol Diagn Ther*, 2020, 24(3): 299-309.
- [96] Remington J, Wang XY, Hou YP, et al. Injection of recombinant human type VII collagen corrects the disease phenotype in a murine model of dystrophic epidermolysis bullosa. *Mol Ther*, 2009, 17(1): 26-33.
- [97] A Phase 1/2 Trial of PTR-01 in Adult Patients with Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa (EB/RD). Available online: <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT03752905> (2020-10-20). <https://clinicaltrials.gov/show/NCT03752905>
- [98] Supp DM, Hahn JM, Combs KA, et al. Collagen VII expression is required in both keratinocytes and fibroblasts for anchoring fibril formation in bilayer engineered skin substitutes. *Cell Transplant*, 2019, 28(9/10): 1242-1256.
- [99] Kühl T, Mezger M, Hausser I, et al. Collagen VII half-life at the dermal-epidermal junction zone: implications for mechanisms and therapy of genodermatoses. *J Invest Dermatol*, 2016, 136(6): 1116-1123.
- [100] Saelman EU, Nieuwenhuis HK, Hese KM, et al. Platelet adhesion to collagen types I through VIII under conditions of stasis and flow is mediated by GPIa/IIa (alpha 2 beta 1-integrin). *Blood*, 1994, 83(5): 1244-1250.
- [101] Arita M, Fertala J, Hou C, et al. Prospects and limitations of improving skeletal growth in a mouse model of spondyloepiphyseal dysplasia caused by R992C (p.R1192C) substitution in collagen II. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0172068.
- [102] Arita M, Fertala J, Hou C, et al. Mechanisms of aberrant organization of growth plates in conditional transgenic mouse model of spondyloepiphyseal dysplasia associated with the R992C substitution in collagen II. *Am J Pathol*, 2015, 185(1): 214-229.
- [103] O'Donnell BT, Ives CJ, Mohiuddin OA, et al. Beyond the present constraints that prevent a wide spread of tissue engineering and regenerative medicine approaches. *Front Bioeng Biotechnol*, 2019, 7: 95.

(本文责编 陈宏宇)