

综述

重组Ⅲ型胶原蛋白产品研究进展与应用

冯 垚¹, 季 磊³, 洪靖君^{1,2*}

(¹安徽大学物质科学与信息技术研究院, 合肥 230601; ²安徽大学生命科学与医学工程学院, 合肥 230601; ³安徽中生安兰健康产业有限公司, 合肥 230601)

摘要: Ⅲ型胶原蛋白是纤维状胶原蛋白组的重要成员, 广泛存在于内脏器官、血管系统和皮肤的细胞外基质中, 对于维持组织的结构完整性和功能性至关重要。其在伤口愈合、组织再生等领域具有重要作用, 并与Ⅰ型胶原蛋白共同发挥作用。重组Ⅲ型胶原蛋白及其产品已广泛应用于组织工程, 尤其是伤口愈合或骨和神经再生等领域, 并且新型重组Ⅲ型胶原蛋白也成为化妆品行业广泛应用的良好候选者。本综述详细探讨了Ⅲ型胶原蛋白的结构特性、制备方法及其在皮肤组织工程、骨组织工程、心血管领域和护肤品中的应用进展。同时, 文章还分析了Ⅲ型胶原蛋白产品的优势与面临的挑战, 展望了其未来的研究趋势和应用前景。本综述旨在系统阐明重组Ⅲ型胶原蛋白在组织修复与再生过程中的潜在应用。

关键词: 重组Ⅲ型胶原蛋白; 伤口愈合; 组织工程; 护肤品

Research progress in application of recombinant type Ⅲ collagen products

FENG Ya¹, JI Lei³, HONG Jingjun^{1,2*}

(¹Institutes of Physical Sciences and Information Technology, Anhui University, Hefei 230601, China;

²School of Life Sciences and Medical Engineering, Anhui University, Hefei 230601, China;

³Anhui Zhongsheng Anlan Health Industry Co., Ltd, Hefei 230601, China)

Abstract: Type III collagen is an important member of the fibrillar collagen group, widely exists in the extracellular matrix of internal organs, vascular system and skin, and is essential for maintaining the structural integrity and functionality of tissues. It plays an important role in wound healing, tissue regeneration and other fields, and plays a role together with type I collagen. Recombinant type III collagen and its products have been widely used in tissue engineering, especially in wound healing or bone and nerve regeneration, and the new recombinant type III collagen has also become a good candidate for wide application in the cosmetics industry. This review discusses in detail the structural properties, preparation methods and application progress of type III collagen in skin tissue engineering, bone tissue engineering, cardiovascular field and skin care products. At the same time, we also analyze the advantages and challenges of type III collagen products, and looks forward to its future research trends and application prospects.

Key Words: recombinant type III collagen; wound healing; tissue engineering; skin care products

收稿日期: 2025-04-02

基金项目: 合肥市自然科学基金项目(HZR2422); 2024重组人胶原蛋白生产工艺与医疗器械医用敷料产品研制项目(K160162428)

第一作者: E-mail: q24301419@stu.ahu.edu.cn

*通信作者: E-mail: jjhong@ahu.edu.cn

胶原蛋白作为细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的关键成分, 是一种重要的结构蛋白, 存在于人体的皮肤、肌腱和血管等弹性组织中^[1]。胶原蛋白至少含有28种不同的类型, 其中Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ型在人体内含量较高, 最为常见^[2]。Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ型胶原蛋白占人体总胶原蛋白的90%左右。其中, Ⅲ型胶原蛋白是第二丰富的胶原蛋白类型(占总胶原的15%~20%)^[3]。主要分布在可膨胀的组织如皮肤、内脏器官。Ⅲ型胶原蛋白是由三个相同的 $\alpha 1(\text{Ⅲ})$ 链组成的同源三聚体^[4], 通常形成比Ⅰ型胶原蛋白更灵活的三重螺旋结构, 既能通过调节自身三重螺旋的构象变化参与维持整体组织的弹性平衡, 又能与其他细胞外基质成分协同作用, 调控细胞的增殖、分化及信号传递等关键生理过程。其富含甘氨酸、脯氨酸和羟脯氨酸等氨基酸, 这些氨基酸的独特组成赋予了胶原蛋白特殊的结构和功能。自1880年以来, 随着生物工程技术的进步, 胶原蛋白得到了越来越多的研究和利用。传统天然胶原蛋白大多来源于动物, 难以溶于水, 病毒传播风险高, 具有潜在的免疫原性; 并且从动物组织中提取纯化胶原蛋白成本高、难度大, 极大地限制了其临床应用^[5]。如朊病毒污染的牛源性支架可能传播牛海绵状脑^[6]; 并且, 有数据表明, 2%~4%的人对猪和牛来源的胶原蛋白过敏, 而使用人源性的胶原蛋白可以预防这些负面效应^[7]。与动物源性胶原蛋白或全长人胶原蛋白相比, 重组Ⅲ型胶原蛋白具有更低的抗原性、更好的生物降解性、更高的生物活性和更稳定的结构特性^[8], 所以为了预防使用动物源性天然胶原蛋白而出现的免疫原性和病毒传播风险等问题, 重组胶原蛋白的开发成为理想的替代方案。重组Ⅲ型胶原蛋白确实具有良好细胞间的相互作用, 可以在细胞黏附、分化和迁移中发挥支持作用^[9], 治疗一些疾病如改善盆底功能障碍。因为重组胶原蛋白具有高细胞黏附能力, 研究合成重组Ⅰ型胶原蛋白和重组Ⅲ型胶原蛋白的可注射重组蛋白, 为盆底功能障碍提供了有效的治疗方法, 促进了ECM重塑和盆底功能障碍大鼠模型的盆底功能改善^[10]。重组Ⅲ型胶原蛋白还可以使子宫内膜基质细胞炎症反应下调以治疗慢性子宫内膜炎, 恢复子宫正常生理功能^[11]。重组Ⅲ型胶原蛋白对

于皮肤抗紫外也具有一定作用, 可以缓解紫外线辐射引起的皮肤光老化, 包括减少表皮和真皮的增厚、增加Ⅰ型胶原蛋白和Ⅲ型胶原蛋白的分泌以及ECM的重塑^[12]。由于重组Ⅲ型胶原蛋白具有良好的生物材料特性, 值得对其临床应用进行更多研究。

重组胶原蛋白作为动物源性天然胶原蛋白的替代品, 具有广泛应用于生物材料、生物医学等领域的潜力。而Ⅲ型胶原蛋白具有良好的生物相容性、低免疫原性, 并且能够与细胞表面受体相互作用, 参与细胞的黏附、增殖和分化等生理过程, 预防皮肤老化, 抵抗紫外线侵扰。因此, 开发重组Ⅲ型胶原蛋白产品具有重要的再生医学、组织工程以及用作化妆品的应用潜力。

动物源性天然胶原蛋白存在免疫原性高、病毒传播风险大、过敏反应频发等临床应用局限, 而重组Ⅲ型胶原蛋白凭借其更低的抗原性、更优的生物降解性、更高的生物活性及更稳定的结构特性, 已成为替代传统胶原蛋白的理想选择。本研究旨在系统阐明重组Ⅲ型胶原蛋白在组织修复与再生过程中的作用, 深入探索其在再生医学(组织工程支架构建)、心血管领域(人工心脏瓣膜)及化妆品领域(抗衰修复成分应用)的潜在价值; 为推动重组Ⅲ型胶原蛋白从基础研究向临床转化及产业应用提供理论依据与实践指导, 最终助力解决传统胶原蛋白制品的临床痛点, 拓展其在多领域的安全有效应用场景。

1 胶原蛋白结构

胶原蛋白三螺旋是一种广泛的结构元件, 它不仅存在于胶原蛋白中, 还存在于许多其他蛋白质中。在组织的细胞外间隙, Ⅲ型胶原蛋白单体组装成大分子原纤维, 大分子原纤维聚集成纤维, 为需要拉伸强度的组织提供强大的支撑结构。三螺旋构象是所有纤维状胶原蛋白的特征, 在大约1 000个氨基酸的序列中, 每三个氨基酸中就有一个甘氨酸。序列 $(\text{Gly-Xaa-Yaa})_n$ 在Ⅲ型胶原蛋白分子中重复343次, 脯氨酸或羟脯氨酸通常位于X和Y的位置, 从而具有三螺旋稳定性^[13]。

Ⅲ型胶原蛋白是经历多种共翻译和翻译后修饰将细胞合成的前前胶原切割掉信号肽后形成前胶

原分子，三条相似的前胶原分子通过在C端聚集在一起形成二硫键稳定结构。每条单独的前胶原分子折叠成左旋螺旋，然后三条链共同缠绕形成右旋超螺旋，Ⅲ型前胶原的 α 条链总长度是1 466个氨基酸，所以三条 α 链形成同源三聚体作为Ⅲ型前胶原分子，C端和N端形似大球状的结构域也被蛋白酶去除，以形成完整Ⅲ型胶原蛋白^[14]。

在前胶原形成超螺旋前会进行多次翻译后的修饰，在三螺旋结构域中，239个脯氨酰残基的145个脯氨酰残基被脯氨酰-4-羟化酶羟基化为4-羟脯氨酸^[15]。其次，一些赖氨酸残基被羟基化或糖基化，一些赖氨酸和羟赖氨酸残基在赖氨酸氧化酶催化下发生氧化脱氨作用^[14]。Boudko等^[16]研究表明，如果羟脯氨酸或脯氨酸含量低，具有功能重要性的天然胶原蛋白的重组表达或化学合成片段通常不会形成稳定的三螺旋，表明Ⅲ型胶原蛋白通过C端二硫键交联来稳定胶原蛋白的三螺旋结构。而半胱氨酸残基正确氧化之前的折叠也是有必要的，因为只有在三螺旋稳定的低温(4~15 ℃)下，三聚体融合蛋白才能实现氧化折叠^[17]，在较高温度(25 ℃)下，主要检测到交联二聚体和单体物质。

天然胶原蛋白与重组胶原蛋白的结构特征也会存在差异，重组胶原蛋白可以人为设计序列去除免疫源性的区域，并且来源、免疫原性、热稳定性、安全性等方面存在显著差异，具体差异如表1所示^[2,18-20]。

2 Ⅲ型胶原蛋白的制备方法

2.1 基因工程技术

通过基因重组技术，将编码Ⅲ型胶原蛋白的基因序列导入合适的宿主细胞(如大肠杆菌、毕赤酵母等)中进行表达，然后经过分离、纯化等工艺获

得重组Ⅲ型胶原蛋白。通过基因工程技术制备的重组胶原蛋白不像动物源性的胶原蛋白，重组胶原蛋白不仅可以避免病毒危害，还具有免疫原性低、质量均一等优点。

生产重组人胶原蛋白的表达系统主要有大肠杆菌表达系统^[21]和毕赤酵母表达系统^[22]。大肠杆菌是最常见的原核宿主，是具有潜在成本效益、快速且技术简单的原核表达系统，经常用于异源蛋白的高水平生产。Yin等^[23]以大肠杆菌为表达系统，为提高异源表达的表达量和在大肠杆菌细胞中实现胶原样聚合物的高水平表达，采用T7、T7lac等不同启动子驱动并利用异丙基- β -D-硫代半乳糖苷诱导表达，最终获得0.1~0.2 g/L的胶原蛋白。但其翻译后修饰能力差致使产物活性较低，易产生包涵体和内源性致热蛋白，影响了产品的最终应用。而真核表达体系形成包涵体的概率较低，而且有完备的翻译后修饰机制，包括糖基化、羟基化、磷酸化等。这两种方法能够精确控制重组胶原蛋白的结构和性能，且生产过程相对可控。科学家尝试利用动植物细胞来表达胶原蛋白。Adachi等^[21]以桑蚕作为宿主，将杆状病毒反式激活因子基因与胶原蛋白基因引入桑蚕细胞中，最终重组胶原的含量占蚕茧的8%。然而其在动植物细胞中的整体表达水平有限，且系统操作繁琐、培养成本高、培养条件苛刻，目前成功实现大规模工业制备的案例仍较少。

毕赤酵母表达体系是近年来备受关注的真核表达系统，可以有效弥补原核表达中的一些缺点，而且几乎不存在内毒素，安全性高。毕赤酵母表达系统可以进行翻译后修饰，并且可以同时保持较高的生长速度和表达量。毕赤酵母含有组装活性脯氨酰4-羟化酶所需的适当伴侣其他条件，因为稳定的脯氨酰4-羟化酶四聚体的产生需要胶原蛋白

表1 天然胶原蛋白与重组胶原蛋白对比

项目	天然胶原蛋白	重组胶原蛋白
来源	动物组织(牛腱、鱼皮、猪皮)	基因工程技术
免疫原性	存在异种蛋白免疫风险	更低的免疫原性
热稳定性	解链温度40~60 ℃	解链温度可达85 ℃
安全性	存在病毒(疯牛病)感染的风险	无动物源性成分，安全性可控
结构特征	天然三螺旋结构，含有免疫原性表位	可人为设计序列，去除免疫原性区域

多肽链的表达,而具有稳定三螺旋的胶原蛋白分子的产生需要活性脯氨酰4-羟化酶的表达^[22]。脯氨酰4-羟化酶在所有胶原蛋白的合成中起着核心作用,因为4-羟脯氨酸残基对于形成具有稳定三螺旋的分子至关重要,可以催化胶原蛋白生物合成中重要的翻译后修饰,是一种 $\alpha_2\beta_2$ 四聚体^[24]。脯氨酰4-羟化酶中蛋白质二硫键异构酶多肽的主要功能似乎是将高度不溶的 α 亚基保持在催化活性、非聚集构象中,这种功能类似于某些伴侣(如热休克蛋白Hsp90)在其他蛋白质中的作用^[25],说明毕赤酵母可以作为胶原蛋白合成的理想生产系统,适合用于多种科学和医学目的的各种重组胶原蛋白的高水平生产。Kim等^[26]开发了一种来自人源Ⅲ型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链(human collagen type Ⅲ alpha 1, hCOL3A1)的重组胶原蛋白,该蛋白质具有稳定的三螺旋构象,在促进细胞增殖、合成胶原蛋白和伤口愈合等方面表现出良好性能。江南大学李瑛琦等^[27]成功实现了类人源Ⅲ型胶原蛋白基因在大肠杆菌体系中的表达,并且可以放大发酵提高产量到3.02 g/L,为Ⅲ型胶原蛋白的成功表达、未来规模化制备及其在生物医药行业的应用奠定了坚实基础。华南理工大学蔡思泽等^[28]通过转化毕赤酵母GS115实现了人源Ⅲ型胶原蛋白的整合表达,获得了胶原蛋白单串联、胶原蛋白二串联和胶原蛋白二串联四拷贝的毕赤酵母工程菌株,为该领域的研究与应用拓展了新的方向。Li等^[29]利用毕赤酵母体系在摇瓶水平(250 mL)中发酵生产人源Ⅲ型胶原蛋白,每24 h向培养液中添加甲醇溶液,通过优化,发现在28.5℃、1%甲醇浓度诱导条件下具有最高产量;改用30 L发酵罐进一步扩大发酵产量,饥饿1 h,采用间歇式甲醇进料、在第28 h开始诱导的策略,纯化后产量达到3.36 g/L,

开发了一种不含N端和C端肽的hCOL3A1的高水平分泌表达系统。结果表明,毕赤酵母GS115是hCOL3A1蛋白表达的良好宿主,可分泌表观分子量高达130 000的异源蛋白。

哺乳表达系统也是表达重组胶原蛋白的一种途径,该系统可以提供最接近人类体内环境的翻译后修饰,适用于需要高度修饰的胶原蛋白生产,但发酵难度大、纯化成本高且产量低,不适宜大规模生产,多用于实验室研究。利用转基因小鼠的哺乳期乳腺,使用37 kb基因组片段和 α S1-酪蛋白乳腺特异性启动子生产全长Ⅰ型前胶原同源三聚体的可行性已经得到证明,小鼠乳腺的乳汁中可以产生高水平(8 mg/mL)的可溶性前胶原,并转化为Ⅰ型胶原蛋白同源三聚体($\alpha 1$)₃^[30]。然而,培养的哺乳动物细胞的低产量不足以使其成为工业规模的重组人源Ⅲ型胶原蛋白表达系统^[31]。生产重组人胶原蛋白不同表达系统的差异如表2所示。

2.2 重组Ⅲ型蛋白的分离与纯化

重组Ⅲ型蛋白的制备需要进行分离与纯化。分离得到的菌体沉淀可以先超声使菌体细胞破裂释放蛋白质;然后进行包括沉淀、离心等步骤在内的初步纯化,去除大部分的细胞碎片和杂质;进一步根据蛋白质性质如分子大小、电荷性、结合亲和力,采用色谱技术包括离子交换色谱、亲和色谱、液相色谱等进行精度纯化,获得高纯度的Ⅲ型胶原蛋白。

详细步骤首先是制备重组Ⅲ型胶原蛋白表达菌株:将表达载体重组Ⅲ型胶原蛋白-pET-28a转化至大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞,37℃倒置,过夜生长;将转化后的菌株进行扩大培养,接种到含有卡那霉素抗性的LB培养基中,37℃、240 rpm培养,待OD₆₀₀=1.2后,加入异丙基- β -D-硫代半乳

表2 不同表达系统对比

表达系统	类型	优点	缺点	参考文献
大肠杆菌表达系统	原核	成本低、生长速度快、技术简单	翻译后修饰能力差,产物活性低,易产生包涵体和内源性致热蛋白	[32]
毕赤酵母表达系统	真核	可进行翻译后修饰(糖基化、羟基化)、表达量高、安全性高	存在密码子偏差、高浓度的甲醇浓度(高于5%)对细胞活力有很大毒性	[33]
植物细胞表达系统	真核	具备真核翻译后修饰机制	整体表达水平有限、系统操作繁琐、培养成本高、培养条件苛刻	[34]
哺乳表达系统	真核	可生产全长前胶原同源三聚体	培养哺乳动物细胞产量低,不足以达到工业规模	[30]

糖苷,使终浓度为0.25 mmol/L,37℃培养诱导表达4 h后,4 000 r/min离心20 min收集菌体。菌体用10 mmol/L咪唑溶液(缓冲液A)重悬,超声破碎细胞,12 000 r/min离心1 h,收获细菌沉淀。其次是纯化步骤:菌体破碎离心的上清使用Ni-NTA亲和层析纯化,用低温的洗杂缓冲液(含有50或100 mmol/L咪唑的PBS, pH7.4)洗涤树脂结合的蛋白质,然后用低温的洗脱缓冲液(含有500 mmol/L咪唑的PBS, pH7.4)洗脱。洗脱液在透析管中4℃对PBS(pH7.4)透析过夜。纯化的蛋白质在-80℃储存。

然而,这种方法可能受到原材料来源和提取工艺的限制,产品的质量和性能一致性较难保证。江南大学李瑛琦等^[27]将在7 L发酵罐培养的重组Ⅲ型胶原蛋白经过超滤初纯及亲和层析,最终得到纯度约91%的胶原蛋白。而胶原蛋白的提取方法(酸溶性、胃蛋白酶溶性、电渗析、超声、等电沉淀法)可能会直接影响其性质,Yan等^[35]制备了一种新型重组胶原蛋白,在大肠杆菌中成功进行了表达,通过碱沉淀和酸沉淀的合理组合,建立了一种简便的分离方法,得到纯度大于90%的新型重组胶原蛋白粗品,之后采用阳离子交换层析进行精制,使新型重组胶原蛋白的最终纯度超过98%。

3 Ⅲ型胶原蛋白在不同领域的应用

3.1 皮肤组织工程

3.1.1 伤口愈合

皮肤是人体表面积最大的器官,是抵御体外元素的主要防线。当皮肤受损或受到伤害、疾病如有害微生物的存在等的影响时,会导致身体正常功能的严重破坏。因此,通过覆盖伤口来保护皮肤是至关重要的。伤口敷料在伤口愈合过程中起着至关重要的作用,可以作为皮肤的临时替代品^[36]。胶原蛋白是皮肤的重要组成部分,能调节伤口愈合的多个方面,包括炎症、血管生成和ECM重塑^[37]。同时,胶原蛋白产品也是主要用于临床中促进伤口愈合的治疗辅助工具。

Ⅲ型胶原蛋白在伤口愈合过程中起着至关重要的作用,能够促进成纤维细胞的增殖和迁移,刺激细胞分泌胶原蛋白等细胞外基质成分,加速伤

口的愈合速度,减少疤痕形成。现今糖尿病患者数量在持续上升,并且糖尿病慢性伤口需要昂贵的长期治疗,给患者和医疗系统带来了沉重的负担,持续的炎症和不良的组织重塑严重限制了慢性伤口的愈合,因此,慢性伤口迫切需要有效的治疗政策。有研究制造了重组Ⅲ型胶原蛋白和蔡普生负载的聚(乳酸-羟基乙酸共聚物)纳米颗粒掺入的透明质酸,用于糖尿病慢性伤口治疗^[38]。Jia等^[36]在糖尿病小鼠模型中,使用重组人源Ⅲ型胶原蛋白复合海藻酸钠水凝胶(rhColⅢ/SA-EVs)治疗糖尿病伤口,21 d后伤口愈合率显著提高,约达95%,且无全身不良反应。该水凝胶通过持续释放细胞外囊泡,可发挥抗氧化、抗炎、促进细胞增殖等作用,从而有效改善了糖尿病伤口愈合困难的状况。

3.1.2 皮肤再生与修复

皮肤作为人体最大的器官,时刻面临着外界损伤的威胁,烧伤、溃疡等皮肤损伤疾病不仅给患者带来巨大的生理痛苦,还可能引发严重的心理负担。在现代医学致力于提升临床疗效、攻克组织修复难题的进程中,皮肤组织工程应运而生,为实现皮肤组织的生理性再生与功能性修复提供了创新性策略,成为解决传统治疗手段局限性的重要研究方向与应用突破口。重组Ⅲ型胶原蛋白作为这一领域中备受瞩目的关键物质,在促进皮肤组织再生中的作用机制正逐步得到阐明。

Zhang等^[39]开发了一种由甲基丙烯酸酐改性的重组Ⅲ型胶原蛋白与羧甲基壳聚糖结合形成的多糖水凝胶(rhColⅢ-HS),具有抗活性氧效果,并且可以通过促进伤口愈合和减少瘢痕来改善皮肤功能,该类型水凝胶具有良好的生物相容性和抗氧化能力,说明rhColⅢ-HS具有作为伤口敷料的潜力。因此,在皮肤组织工程中,重组Ⅲ型胶原蛋白可作为支架材料,为细胞提供附着和生长的支持,引导组织再生,用于治疗烧伤、溃疡等皮肤损伤疾病。

3.2 骨组织工程

在骨组织工程领域,重组Ⅲ型胶原蛋白与其他生物材料复合形成的支架能够模拟天然骨组织的细胞外基质环境,促进成骨细胞的黏附、增殖和分化,有助于骨缺损的修复和再生。例如,Dutta

等^[40]制备的含1%纤维素纳米晶体(cellulose nanocrystals CNC)的海藻酸钠/明胶/CNC复合水凝胶(1% CNC/Alg/Gel), 在大鼠颅骨缺损模型中表现出良好的骨再生潜力, 数据表明, 1% CNC/Alg/Gel复合水凝胶细胞活力最大, 可达到75%, 显著高于其他实验组和对照组, 并且用1% CNC/Alg/Gel支架进行细胞接种, 发现超过70%的细胞附着在支架表面, 表明对细胞活力不具有负面影响, 1% CNC/Alg/Gel支架材料还能诱导成骨细胞特异性基因表达增强。该复合水凝胶通过增强交联作用, 提高了机械强度, 同时具有良好的生物相容性和可打印性, 为骨组织工程提供了一种有潜力的生物材料。

Ⅲ型胶原蛋白也在成人关节软骨中出现, 其含量占总胶原蛋白的0.5%~10%。根据Wu等^[41]的研究, Ⅲ型胶原是关节软骨中的纤维网络修饰剂, 可以增强胶原纤维网络的凝聚力, 以细纤维状聚合物形式存在于软骨基质中, 这种聚合物由Ⅲ型前胶原N端肽(pN-Ⅲ型分子)在4D交错位点头对头交联形成, 并与Ⅱ型胶原蛋白纤维表面横向交联。这种交联方式有助于增强现有Ⅱ型胶原蛋白纤维网络的凝聚力, 为软骨提供更好的结构支撑, 维持软骨组织的稳定性; 还参与了软骨细胞对基质损伤的愈合反应。因此, Ⅲ型胶原蛋白可能作为对组织和基质损伤的响应, 合成并积累在软骨中, 作为现有纤维网络的修饰剂发挥作用, 帮助修复受损的软骨基质。

3.3 心血管领域

3.3.1 血管支架涂层

心血管支架植入术已经成为治疗威胁人类生命的头号杀手——冠心病最重要的工具。但是支架植入术可诱发急性血管壁损伤, 此病理过程常伴随血栓形成、急性炎症应答及血管平滑肌细胞过度增殖等系列并发症风险, 进而可能影响血管重构的正常进程及支架植入的远期疗效。而作为心血管支架的涂层材料, Ⅲ型胶原蛋白能够提高支架的生物相容性, 促进内皮细胞的黏附和生长, 抑制平滑肌细胞的过度增殖, 减少血栓形成和再狭窄的发生风险。例如, Yang等^[42]开发的重组人源Ⅲ型胶原蛋白与透明质酸通过层层自组装形成ECM模拟涂层, 可以应用于聚乳酸支架。该涂层

在体外血小板黏附实验和体内支架植入实验中, 表现出优异的抗血栓性能、促进内皮化和抑制内膜过度增生的作用, 为心血管支架的功能涂层开发提供了新途径。

3.3.2 心脏组织工程

在心脏组织工程中, 重组Ⅲ型蛋白可用于构建心脏组织的支架, 为心肌细胞提供生长和功能发挥的支持, 有望用于治疗心肌梗死等心脏疾病, 虽然目前相关研究仍处于探索阶段, 但已显示出一定的应用潜力。Ge等^[43]制备了一种定制重组人源Ⅲ型胶原蛋白, 有效地去除了与血小板的结合位点, 同时保持了细胞相容性。在该研究中, 将脱细胞猪心包与重组人源Ⅲ型胶原蛋白和缩水甘油丙烯酸通过一罐法设计为人工心脏瓣膜, 由于引入了重组人源Ⅲ型胶原蛋白, 抗凝性能得到显著改善, 血小板黏附减少, 血栓形成减少, 通过自由基聚合交联, 新型心脏瓣膜的机械性能得到显著提高。重组Ⅲ型胶原蛋白的研究为血液接触植入式设备以及心脏疾病的治疗提供了一种简单的策略, 并展示了实际应用的可能性。

3.4 重组Ⅲ型胶原蛋白在护肤品中的应用

随着生物技术的发展以及消费者对安全有效成分需求的日益增长, 重组Ⅲ型胶原蛋白在护肤品市场中的重要性日益凸显。Ye等^[44]在研究中合成的高生物活性的重组Ⅲ型胶原蛋白, 可以加速紫外线损伤皮肤的愈合。重组Ⅲ型胶原蛋白被证明可以独立地刺激原代人真皮成纤维细胞Ⅰ型和Ⅲ型胶原的产生和分泌。生物刺激、与美容产品配方的相容性和经过验证的商业生产的独特组合, 使这种新型重组Ⅲ型胶原蛋白成为化妆品行业的良好应用候选材料, 并且在医用敷料和护肤品中应用更为广泛。

3.4.1 重组Ⅲ型胶原蛋白作为护肤成分

重组Ⅲ型胶原蛋白具有较好的生物相容性与安全性, 不仅从源头上切断了潜在的动物源性疾病传播途径, 消除了相应风险, 还能有效规避因个体体质差异引发的过敏反应。基于这些特性, 其完全能够满足长期应用于敏感肌肤的需求。

重组Ⅲ型胶原蛋白还具备多重卓越功效, 能显著增强皮肤弹性、减少皱纹、深层滋润并加速皮肤愈合进程^[45]。皮肤中的Ⅲ型胶原蛋白含量会随

年龄增长而减少,而皮肤弹性取决于胶原蛋白与弹性蛋白所构建网络的完整程度,其中Ⅲ型胶原蛋白在皮肤弹力纤维架构中扮演了关键角色,它与Ⅰ型胶原蛋白紧密协作,共同为皮肤结构提供稳固支撑。在此情况下,通过外源性补充Ⅲ型胶原蛋白,可维持皮肤良好的弹性与紧致度,提升皮肤含水量,并促进皮肤组织内源性胶原蛋白的合成,最终实现皱纹平复及皮肤衰老进程的延缓。

3.4.2 重组Ⅲ型胶原蛋白应用方式

重组Ⅲ型胶原蛋白目前应用最多的是在各种护肤品配方中,包括面霜、精华液、面膜和眼霜等,以充分发挥其抗衰老、促愈合及保湿的特性。然而,由于胶原蛋白相对分子质量大、空间结构复杂,其经皮渗透效率较低。因此,为提高经皮渗透效率,护肤品中可能需要使用特殊的递送系统如脂质体或微乳液,将重组Ⅲ型胶原蛋白有效输送至皮肤深层。另外,为达到协同增效的作用,重组Ⅲ型胶原蛋白通常与其他有益皮肤的成分如抗氧化剂、透明质酸和肽类等结合使用,协同促进皮肤健康。

4 重组Ⅲ型胶原蛋白产品的国内外研究趋势

随着国内医美市场的快速发展,Ⅲ型胶原蛋白在医美产品中的应用越来越广泛,如注射用重组Ⅲ型人源化胶原蛋白溶液等产品不断涌现。众多企业也加大了对Ⅲ型胶原蛋白植入剂等三类医疗器械的研发力度,积极开展临床试验,以验证其在组织修复、抗衰等方面的长期安全性和有效性,为产品的临床普及奠定基础。

国际企业通过技术合作加速重组Ⅲ型胶原蛋白的商业化。例如,欧莱雅与锦波生物合作,引入中国重组Ⅲ型胶原蛋白技术开发高端医美产品“铂研”胶原针,成为其首款三类医疗器械。随着医美领域需求的增长与技术创新,重组Ⅲ型胶原蛋白的全球市场规模快速增长,2023年原料端市场规模达1.465亿美元,预计2030年将增至15.86亿美元,零售端市场规模预计达243.12亿美元。国外研究聚焦于重组Ⅲ型胶原蛋白的结构优化和功能机制。此外,美国Modern Meadow公司通过植物平台生产重组Ⅲ型胶原蛋白,主打“纯净美妆”概念,但因成本高昂尚未大规模应用。欧美监管机

构(如EMA、FDA)对重组胶原蛋白产品要求严格,需提供充分的临床试验数据和长期安全性监测。例如,欧洲要求产品符合GMP生产规范,并建立不良事件监测系统。国内企业如锦波生物通过国际专利布局(如巴西、美国专利)推动技术出海,其重组Ⅲ型胶原蛋白产品已进入越南市场。

国外还在探索重组Ⅲ型胶原蛋白在生物传感器、组织工程支架等新兴领域中的应用,进一步拓展其市场潜力。Gibney等^[46]展示了一种利用高分辨率生物打印技术制备适合角膜组织工程的重组人Ⅲ型胶原蛋白薄膜的方法,并成功获得了具有良好光学和机械性能的生物打印胶原蛋白结构。Yang等^[47]通过使用重组Ⅲ型人胶原蛋白及重组Ⅲ型人胶原蛋白-壳聚糖复合材料,成功构建了高度多孔的三维支架,用于软组织再生,并具备良好的生物相容性和可调节的力学性能。基于重组Ⅲ型人胶原蛋白的多孔支架由于出色的体外细胞相容性和可调节的机械性能,显示出重组Ⅲ型人胶原蛋白用于软组织工程的前景。将重组Ⅲ型人胶原蛋白与壳聚糖结合后开发了一种新型的光响应“生物墨水”,用于3D生物打印,目的是解决传统动物源性胶原蛋白质量不一和病原体传播风险的问题,并使用人脐静脉内皮细胞进行了体外测试,发现重组Ⅲ型人胶原蛋白-壳聚糖复合材料生物墨水具有良好的生物相容性,使得该生物墨水系统具有通过3D生物打印构建不同组织的潜力。

国内以毕赤酵母和大肠杆菌表达系统为核心,通过基因编辑和发酵工艺优化实现重组Ⅲ型胶原蛋白规模化生产。例如,江南大学李瑛琦等^[27]在大肠杆菌中实现重组Ⅲ型胶原蛋白基因的高表达(3.02 g/L);聚源生物通过毕赤酵母体系在30 L发酵罐中获得3.36 g/L的重组Ⅲ型胶原蛋白^[29]。近年来,合成生物学技术被广泛应用,如纳科生物利用基因编辑技术优化大肠杆菌表达系统,解决了传统动物源胶原蛋白的排异和病毒隐患问题,实现了量产。此外,创健医疗参与的“十四五”国家重点研发计划项目,结合微针技术提升重组Ⅲ型胶原蛋白在皮肤修复中的渗透率,推动其在医美和医疗领域的应用,使重组Ⅲ型胶原蛋白的应用场景多元化拓展。2025年3月15日,锦波生物公布了A型重组Ⅲ型人源化胶原蛋白上市3年的安

全性跟踪数据, 数据显示, 200余万支注射案例中, 产品不良反应率低于行业平均水平, 临床安全性获权威验证。锦波生物的“薇旖美”和欧莱雅的“铂研”胶原针(核心成分均为重组Ⅲ型胶原蛋白)已获批上市, 用于面部抗衰和眼周修复。中国率先制定了重组胶原蛋白行业标准, 如YY/T 1849-2022《重组胶原蛋白》, 明确了质量控制要求和检测方法, 推动了产业规范化。截至2024年8月, 中国已上市约170款重组Ⅲ型胶原蛋白医疗器械, 覆盖医美注射、创面修复等领域。

国内研究以技术产业化和应用拓展为核心, 政策支持力度大、市场增长迅速; 国外则注重基础研究和高端应用, 监管严格但技术壁垒高。未来, 国内外在重组Ⅲ型胶原蛋白领域的竞争将聚焦于技术创新(如基因编辑、新型表达系统)、应用场景拓展(如再生医学、食品健康)和国际化布局。中国需进一步加强基础研究和国际合作, 突破技术瓶颈; 国外则需降低生产成本, 适应快速增长的新兴市场需求。

真皮层的胶原纤维由胶原蛋白单体组装而成, 其中Ⅰ型胶原占比最高, Ⅲ型胶原次之, 但二者均属于大分子物质, 天然透皮吸收效率极低。传统透皮技术(如化学溶解脂质、物理电穿孔或超声导入)虽能破坏皮肤屏障促进吸收, 却存在刺激皮肤、引发刺痛、导致细胞损伤及潜在毒性等局限性。为了解决目前涂抹胶原蛋白不易透过皮肤的技术问题, 本课题组进行了大量的研究, 获得了由透皮肽与人源Ⅲ型胶原蛋白氨基酸序列片段组合而成的高透皮性重组Ⅲ型胶原蛋白, 具有较高的透皮吸收能力, 并且具有高热稳定优点^[48]。此技术突破使得重组Ⅲ型胶原蛋白在医美及医疗领域的应用更具适配性, 尤其适用于面部填充剂、创面敷料、冻干纤维及凝胶等产品。其优势在于: 通过肽段修饰实现无创伤透皮给药, 避免传统皮下注射的痛楚; 可通过涂抹方式精准控制给药剂量与时间, 提升患者顺应性; 高热稳定性保障了产品在储存及生产过程中的稳定性, 为工业化大规模制备奠定了基础。该研究为解决皮肤衰老相关的胶原蛋白补充难题提供了创新路径, 推动了重组胶原蛋白在皮肤修复与抗衰领域的临床转化。

5 Ⅲ型胶原蛋白产品的优势与挑战

5.1 显著优势

因为重组Ⅲ型胶原蛋白较好的生物相容性与低免疫原性, 可以极大程度地削减人体产生排斥反应的潜在风险, 这一特性使其在生物医学领域的应用中稳稳占据安全性的高地, 为相关治疗与研究提供了坚实的基础保障。Ⅲ型胶原蛋白具有多种生物活性功能, 如促进细胞黏附、推动细胞增殖以及引导细胞迁移等, 同时还能精准调节细胞功能, 在多项生理活动中发挥重要调控作用。

5.2 现存挑战

胶原蛋白的来源筛选与制备工艺环节仍存在不确定性。动物源性胶原蛋白存在诸多局限性, 包括潜在的免疫原性、批次间差异显著及致病性污染风险等问题。重组Ⅲ型胶原蛋白是解决上述问题的潜在解决方案, 但正确的翻译后修饰重组人源胶原蛋白的生产尚未在工业规模上进行, 因此还需要进一步深入优化并强力推进生产流程的标准化建设, 以确保产品的均一性和可靠性。

当前该类产品的生产成本居高不下, 这一经济制约因素在一定程度上限制了其在多个应用领域的规模化推广与普及。因此, 亟需探索兼具经济可行性与生产高效性的制备路径, 通过系统性优化生产工艺以显著降低成本投入, 进而有效提升产品的可及性, 为其在更广泛的人群及应用场景中的推广应用提供支撑。

作者贡献声明:

冯 垭: 设计论文框架, 起草论文; 论文修改;

季 磊: 提供基金支持;

洪靖君: 设计论文框架; 拟定写作思路, 指导论文撰写、修改论文并定稿。

利益冲突声明: 本文不存在任何利益冲突。

参考文献

- [1] Avila Rodríguez MI, Rodríguez Barroso LG, Sánchez ML. Collagen: a review on its sources and potential cosmetic applications. *J Cosmet Dermatol*, 2018, 17(1): 20-26
- [2] León-López A, Morales-Pealoza A, Martínez-Juárez VM, et al. Hydrolyzed collagen—sources and applications. *Molecules*, 2019, 24(22): 4031
- [3] 梁鑫, 梁波, 张仁怀, 等. 甲醇浓度对毕赤酵母发酵表达

- 重组人Ⅲ型胶原蛋白的影响. 四川生理科学杂志, 2020, 42(3): 247-251
- [4] Parkin JD, San Antonio JD, Persikov AV, et al. The collagen III fibril has a “flexi-rod” structure of flexible sequences interspersed with rigid bioactive domains including two with hemostatic roles. *PLoS One*, 2017, 12(7): e0175582
- [5] Rahman A, Silva TH. Collagens from marine organisms towards biomedical applications. *Mar Drugs*, 2022, 20(3): 170
- [6] Gauza-Włodarczyk M, Kubisz L, Mielcarek S, et al. Comparison of thermal properties of fish collagen and bovine collagen in the temperature range 298-670 K. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017, 80: 468-471
- [7] Cooperman L, Michaeli D. The immunogenicity of injectable collagen. I. A 1-year prospective study. *J Am Acad Dermatol*, 1984, 10(4): 638-646
- [8] Hua C, Zhu Y, Xu W, et al. Characterization by high-resolution crystal structure analysis of a triple-helix region of human collagen type III with potent cell adhesion activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 508(4): 1018-1023
- [9] You S, Liu S, Dong X, et al. Intravaginal administration of human type III collagen-derived biomaterial with high cell-adhesion activity to treat vaginal atrophy in rats. *ACS Biomater Sci Eng*, 2020, 6(4): 1977-1988
- [10] Li H, You S, Yang X, et al. Injectable recombinant human collagen-derived material with high cell adhesion activity limits adverse remodelling and improves pelvic floor function in pelvic floor dysfunction rats. *Biomater Adv*, 2022, 134: 112715
- [11] You S, Zhu Y, Li H, et al. Recombinant humanized collagen remodels endometrial immune microenvironment of chronic endometritis through macrophage immunomodulation. *Regen Biomaterials*, 2023, 10: rbad033
- [12] Wang J, Qiu H, Xu Y, et al. The biological effect of recombinant humanized collagen on damaged skin induced by UV-photoaging: an *in vivo* study. *Bioact Mater*, 2022, 11: 154-165
- [13] Ricard-Blum S. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011, 3(1): a004978
- [14] Kuivaniemi H, Tromp G. Type III collagen (COL3A1): gene and protein structure, tissue distribution, and associated diseases. *Gene*, 2019, 707: 151-171
- [15] Myllyharju J, Kivirikko KI. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet*, 2004, 20(1): 33-43
- [16] Boudko SP, Engel J. Structure formation in the C terminus of type III collagen guides disulfide cross-linking. *J Mol Biol*, 2004, 335(5): 1289-1297
- [17] Bächinger HP, Bruckner P, Timpl R, et al. Folding mechanism of the triple helix in type-III collagen and type-III pN-collagen. *Eur J Biochem*, 1980, 106(2): 619-632
- [18] Ferraro V, Gaillard-Martinie B, Sayd T, et al. Collagen type I from bovine bone. Effect of animal age, bone anatomy and drying methodology on extraction yield, self-assembly, thermal behaviour and electrokinetic potential. *Int J Biol Macromol*, 2017, 97: 55-66
- [19] Nagai T, Suzuki N. Isolation of collagen from fish waste material—skin, bone and fins. *Food Chem*, 2000, 68(3): 277-281
- [20] Que RA, Chan SW, Jabaiah AM, et al. Tuning cellular response by modular design of bioactive domains in collagen. *Biomaterials*, 2015, 53: 309-317
- [21] Adachi T, Wang X, Murata T, et al. Production of a non-triple helical collagen α chain in transgenic silkworms and its evaluation as a gelatin substitute for cell culture. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 106(6): 860-870
- [22] Vuorela A. 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. *EMBO J*, 1997, 16(22): 6702-6712
- [23] Yin J, Lin J, Li W, et al. Evaluation of different promoters and host strains for the high-level expression of collagen-like polymer in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 2003, 100(3): 181-191
- [24] Vuori K, Pihlajaniemi T, Marttila M, et al. Characterization of the human prolyl 4-hydroxylase tetramer and its multifunctional protein disulfide-isomerase subunit synthesized in a baculovirus expression system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(16): 7467-7470
- [25] John DC, Grant ME, Bulleid NJ. Cell-free synthesis and assembly of prolyl 4-hydroxylase: the role of the beta-subunit (PDI) in preventing misfolding and aggregation of the alpha-subunit. *EMBO J*, 1993, 12(4): 1587-1595
- [26] Kim YU, Gi HJ, Jeong EK, et al. Development of a highly effective recombinant protein from human collagen type III $\alpha 1$ (COL3A1) to enhance human skin cell functionality. *BMB Rep*, 2024, 57(9): 424-429
- [27] 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
- [28] 蔡思泽, 王斌. 人源Ⅲ型胶原蛋白在毕赤酵母中的多拷贝重组表达、鉴定及抗氧化活性分析. 现代食品科技, 2023, 39(3): 129-137
- [29] Li L, Fan D, Ma X, et al. High-level secretory expression and purification of unhydroxylated human collagen $\alpha 1$ (III) chain in *Pichia pastoris* GS115. *Biotechnol Appl*

- Biochem, 2015, 62(4): 467-475
- [30] 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
- [31] John DCA, Watson R, Kind AJ, et al. Expression of an engineered form of recombinant procollagen in mouse milk. *Nat Biotechnol*, 1999, 17(4): 385-389
- [32] Hua X, Fan D, Luo Y, et al. Kinetics of high cell density fed-batch culture of recombinant escherichia coli producing human-like collagen. *Chin J Chem Eng*, 2006, 14(2): 242-247
- [33] 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
- [34] Stein H, Wilensky M, Tsafrir Y, et al. Production of bioactive, post-translationally modified, heterotrimeric, human recombinant type-I collagen in transgenic tobacco. *Biomacromolecules*, 2009, 10(9): 2640-2645
- [35] Yan L, Zhang Y, Zhang Y, et al. Preparation and characterization of a novel humanized collagen III with repeated fragments of Gly300-Asp329. *Protein Expr Purif*, 2024, 219: 106473
- [36] Jia Y, Han Y, Zhang Y, et al. Multifunctional type III recombinant human collagen incorporated sodium alginate hydrogel with sustained release of extra cellular vehicles for wound healing multimodal therapy in diabetic mice. *Regen Ther*, 2024, 27: 329-341
- [37] Huang NF, Zaitseva TS, Paukshto MV. Biomedical applications of collagen. *Bioengineering*, 2023, 10(1): 90
- [38] Long L, Liu W, Li L, et al. Dissolving microneedle-encapsulated drug-loaded nanoparticles and recombinant humanized collagen type III for the treatment of chronic wound via anti-inflammation and enhanced cell proliferation and angiogenesis. *Nanoscale*, 2022, 14(4): 1285-1295
- [39] Zhang X, Huang Y, Luo T, et al. Advanced wound healing and scar reduction using an innovative anti-ROS polysaccharide hydrogel with recombinant human collagen type III. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2024, 16(38): 50305-50320
- [40] Dutta SD, Hexiu J, Patel DK, et al. 3D-printed bioactive and biodegradable hydrogel scaffolds of alginate/gelatin/cellulose nanocrystals for tissue engineering. *Int J Biol Macromol*, 2021, 167: 644-658
- [41] Wu JJ, Weis MA, Kim LS, et al. Type III collagen, a fibril network modifier in articular cartilage. *J Biol Chem*, 2010, 285(24): 18537-18544
- [42] Yang L, Wu H, Lu L, et al. A tailored extracellular matrix (ECM)-mimetic coating for cardiovascular stents by stepwise assembly of hyaluronic acid and recombinant human type III collagen. *Biomaterials*, 2021, 276: 121055
- [43] Ge Y, Guo G, Liu K, et al. A strategy of functional crosslinking acellular matrix in blood-contacting implantable devices with recombinant humanized collagen type III (rhCOL III). *Composites Part B. Engineering*, 2022. doi: 10.1016/j.compositesb.2022.109667
- [44] Ye M, Fan Y, Fu C, et al. Biocompatible recombinant type III collagen enhancing skin repair and anti-wrinkle effects. *Biomater Sci*, 2024, 12(23): 6114-6122
- [45] 范婷, 赵健烽, 常烨珺, 等. 重组人源化Ⅲ型胶原蛋白对皮肤功能性相关基因表达的影响. *日用化学工业*, 2022, 52(12): 1326-1332
- [46] Gibney R, Patterson J, Ferraris E. High-resolution bioprinting of recombinant human collagen type III. *Polymers (Basel)*, 2021, 13(17): 2973
- [47] Yang Y, Ritchie AC, Everitt NM. Using type III recombinant human collagen to construct a series of highly porous scaffolds for tissue regeneration. *Colloids Surfs Biointerfaces*, 2021, 208: 112139
- [48] 安徽大学, 安徽中生安兰健康产业有限公司. 高热稳、高透皮吸收的重组Ⅲ型胶原蛋白及应用: ZL202510046893.1[P]. 2025-04-11