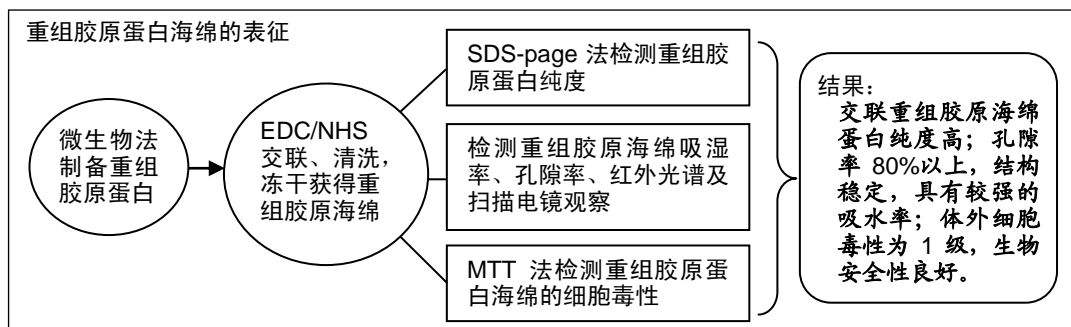


# 重组胶原蛋白海绵的制备及性状表征

何越<sup>1</sup>, 侯增淼<sup>1</sup>, 李晓颖<sup>1</sup>, 高恩<sup>1</sup>, 刘建利<sup>2</sup>, 赵金礼<sup>1</sup> (<sup>1</sup>陕西慧康生物科技有限责任公司医药研发中心, 陕西省西安市 710054; <sup>2</sup>西北大学生命科学学院, 陕西省西安市 710069)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1580 ORCID: 0000-0001-6859-8270(何越)

文章快速阅读:



何越, 男, 1987年生, 陕西省西安市人, 汉族, 2013年西北大学毕业, 硕士。

通讯作者: 赵金礼, 陕西慧康生物科技有限责任公司医药研发中心, 陕西省西安市 710054

文献标识码:A  
稿件接受: 2018-07-12



文题释义:

**重组胶原蛋白:** 是采用基因工程技术, 以毕赤酵母作为宿主菌, 构建高表达与人同源的重组胶原蛋白基因工程菌, 经大规模发酵及纯化, 获得稳定的生产工艺和高纯度的重组人源胶原蛋白, 该重组胶原蛋白具有产量高、稳定性好、亲水性强、生物相容性好、无免疫病毒风险等优势。

**重组胶原蛋白海绵:** 是指采用化学交联技术将重组胶原蛋白进行化学改性, 并经专利清除工艺处理, 冷冻干燥后获得的具有高生物相容性的多孔状胶原蛋白海绵材料, 该蛋白海绵具有可降解性, 临床使用后不用额外去除。

摘要

**背景:** 重组胶原蛋白具有良好的亲水性及生物相容性, 但其存在溶解性强及机械强度不足等缺点。化学交联可显著提高材料的韧性、力学强度及耐降解性。

**目的:** 制备重组胶原蛋白海绵, 并对其理化性质及安全性进行评价。

**方法:** 采用微生物发酵法获得重组胶原蛋白, 经戊二醛交联后, 将其置于模具中冷冻干燥, 获得多孔重组胶原蛋白海绵, 检测交联后重组胶原海绵的吸水率与孔隙率, 采用扫描电镜观察交联前后重组胶原海绵的表面形态, 红外光谱仪对比交联前后重组胶原海绵结构的变化。采用交联重组胶原海绵浸提液培养 L929 细胞, 培养第 68 小时, 采用 MTT 法检测细胞相对增殖率, 评估交联重组胶原海绵的细胞毒性。

**结果与结论:** ①交联后重组胶原海绵的吸水率为(2 903.83±47.90)%, 平均孔隙率在 85%以上; ②扫描电镜显示, 交联前, 重组胶原海绵的孔隙呈蜂窝状, 致密; 交联后, 重组胶原海绵的孔隙较大, 呈板层结构, 可看到板层间桥键连接, 纵向可看到较大褶皱; ③红外光谱显示, 交联后的重组胶原海绵特征性化学结构特征无明显变化; ④交联重组胶原海绵浸提液培养 L929 细胞的相对增殖率为 84%, 细胞毒性为 1 级, 生物安全性良好; ⑤结果表明采用戊二醛交联制备的重组胶原海绵, 理化性质稳定, 生物相容性良好。

**关键词:**

重组胶原蛋白; 交联; 创面止血; 胶原蛋白海绵; 基因工程; 宿主菌; 基因工程菌

**主题词:**

胶原; 止血; 交联试剂; 组织工程

中图分类号: R459.9; R318.08

**基金资助:**

西安市科技计划项目(CX13120); 项目负责人: 赵金礼

## Preparation and properties of recombinant collagen sponge

He Yue<sup>1</sup>, Hou Zengmiao<sup>1</sup>, Li Xiaoying<sup>1</sup>, Gao En<sup>1</sup>, Liu Jianli<sup>2</sup>, Zhao Jinli<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Pharmaceutical Research and Development Center, Huikang Biotechnology Co., Ltd., Xi'an 710054, Shaanxi Province, China; <sup>2</sup>College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, Shaanxi Province, China)

**Abstract**

**BACKGROUND:** Recombinant collagen has good hydrophilicity and biocompatibility, but it has the disadvantages of strong solubility and low mechanical strength. Chemical crosslinking can significantly improve the toughness, mechanical strength and degradation resistance of the material.

**OBJECTIVE:** To prepare recombinant collagen sponge and to evaluate its physicochemical properties and safety.

**METHODS:** The recombinant collagen was obtained via microbial fermentation and cross-linked with

He Yue, Master, Pharmaceutical Research and Development Center, Huikang Biotechnology Co., Ltd., Xi'an 710054, Shaanxi Province, China

Corresponding author: Zhao Jinli, Pharmaceutical Research and Development Center, Huikang Biotechnology Co., Ltd., Xi'an 710054, Shaanxi Province, China

glutaraldehyde. The porous recombinant collagen sponge was finally obtained by freeze-drying in the mold. The water absorption, porosity and crosslinking agent residual of the recombinant collagen sponge were detected. The surface morphology of the recombinant collagen sponge before and after cross-linking was observed by scanning electron microscope. The changes in recombinant collagen structures before and after cross-linking were compared by infrared spectrometer. L929 cells were cultured with cross-linked recombinant collagen sponge extract. At 68 hours after culture, the relative proliferation rate of the cells was detected by MTT, and the cytotoxicity of cross-linked recombinant collagen sponge was evaluated.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) The water absorption of the cross-linked collagen sponge was  $(2\ 903.83\pm 47.90)\%$  and the average porosity was over 85%. (2) Under the scanning electron microscope, the pores of the collagen sponge were honeycomb and dense before cross-linking. After cross-linking, the pores of the collagen sponge were large and bridged bond linkage of laminar layer structure could be seen, and also the large folds could be seen in the longitudinal direction. (3) There was no obvious change in the characteristic chemical structure of the recombinant collagen sponge after cross-linking. (4) The relative proliferation rate of L929 cells was 84% after culture in cross-linked recombinant collagen sponge extract, and the cytotoxicity was level 1, indicating the biological safety was good. To conclude, the recombinant collagen sponge with glutaraldehyde cross-linking shows stable physicochemical properties and good biocompatibility.

**Subject headings:** Collagen; Hemostasis; Cross-Linking Reagents; Tissue Engineering

**Funding:** the Scientific Research Plan of Xi'an City, No. CX13120 (to ZJL)

## 0 引言 Introduction

胶原蛋白具有低抗原性、可生物降解性、良好的生物相容性及促进细胞增殖等作用,被认为是一种优良的生物医用材料,已被广泛应用于临床多个领域<sup>[1-5]</sup>。有报道认为胶原具有良好的止血效果,其止血机制:一是由于胶原分子具有良好的亲水性,可通过接触伤口吸附创面渗血,促进血痂形成,阻塞断裂的血管;二是胶原对血液中的血小板具有聚集作用,且胶原可刺激血小板进一步释放凝血因子,激活机体的内源性凝血机制,达到止血效果<sup>[6]</sup>。同时,由于胶原具有可生物降解性,故在使用后不需要去除,特别是机体内止血的使用,更为便捷和有效。

重组胶原蛋白是采用基因工程技术,以毕赤酵母作为宿主菌,构建高表达与人同源的重组胶原蛋白基因工程菌,经大规模发酵及纯化,获得稳定的生产工艺和高纯度的重组人源胶原蛋白,该重组胶原蛋白具有产量高、稳定性好、亲水性强、生物相容性好、无免疫病毒风险等优势,是一种理想的医用生物材料<sup>[7-10]</sup>。但由于重组胶原的溶解性强及机械强度不足,在一定程度限制了其使用<sup>[11]</sup>,因此对重组胶原进行改性,以满足生物材料甚至组织工程材料对基质的要求,是重组胶原得以进一步作为生物材料使用的关键。

研究采用重组胶原蛋白为原料,通过化学交联改性,制备多孔性可降解胶原海绵,所制备产品性能良好,可为临床中创面止血方向产品的应用提供研究支持资料。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 平行对照实验。

1.2 时间及地点 实验于2018-01-10/05-10在陕西慧康生物科技有限责任公司医药研发中心完成。

1.3 材料 25%戊二醛溶液、PBS、DMSO购自上海国药集团化学试剂有限公司; MTT检测试剂盒、DMEM培养基购自北京索宝生物科技有限公司; L929细胞购自北纳生物有限公司; 冷冻干燥机购自北京松源华兴生物技术有限公司; 透析袋购自北京瑞达恒辉科技发展有限公司; 搅拌机、超声仪、细胞培养箱、超净工作台购自宁波群安实验设备有限公司; 紫外分光光度计购自日本岛津公司; 红外光谱仪、扫描电镜为陕西科技大学试验设备公共平台中心提供。

## 1.4 实验方法

1.4.1 重组胶原蛋白原料的制备 根据毕赤酵母密码子的偏好性设计相应核苷酸序列,然后对设计合成的核苷酸序列进行酶切、连接、转化至毕赤酵母的表达载体pPIC9K中,通过筛选获得高表达毕赤酵母工程菌,诱导发酵表达,然后纯化、冻干,获得重组胶原蛋白。

1.4.2 交联重组胶原海绵的制备 采用重组胶原蛋白配置2%的胶原水溶液,加入0.04%戊二醛常温交联24 h, -20 °C预冻20 h,之后冷冻干燥机48 h冻干;将冻干的胶原样采用PBS清洗,之后采用1 kd透析膜进行透析处理24 h,每6 h更换透析外液,透析结束后再次冷冻干燥,获得交联重组胶原蛋白海绵。

1.4.3 SDS-PAGE蛋白电泳检测 对微生物发酵并经纯化获得的胶原蛋白进行电泳鉴别,采用SDS-PAGE法,上样质量浓度为1 g/L,上样量10 μL,同时点样Marker,样品直接恒压90 V跑到底,之后采用染色液染色1 h,脱色液处理3 h,观察电泳条带情况。

1.4.4 吸水率及孔隙率检测 取适量重组胶原蛋白海绵,称质量为 $m_1$ ,将样品浸没于纯化水中,常温浸泡2 h,待其充分吸水后,取出并吸去材料表面多余水分,称取湿态质量为 $m_2$ ,按如下公式计算吸水率,吸水率 $= (m_2 - m_1) / m_1 \times 100\%$ 。

取25 mL刻度瓶,加无水乙醇至刻度,称总质量为 $m_1$ ;取质量为 $m$ 的重组胶原海绵浸入乙醇中,静置30 min,吸去刻度线以上的无水乙醇,并称质量为 $m_2$ ;取出胶原海绵,称取剩余乙醇及刻度瓶的总质量为 $m_3$ ,重组海绵的孔隙率按如下公式计算,孔隙率 $= (m_2 - m_3 - m) / (m_1 - m_3) \times 100\%$ 。

1.4.5 红外光谱检测 送检中国广州分析检测中心,具体为将胶原海绵样品与溴化钾以0.1%-0.5%的比例混合研磨成均匀的粉末后压片,用红外光谱仪进行测定。红外光谱检测范围为 $500-4\ 000\ \text{cm}^{-1}$ ,分辨率为 $4\ \text{cm}^{-1}$ ,扫描信号累加64次,最终得到样品的红外光谱图。

1.4.6 扫描电镜观察 将样品干燥后进行喷金处理,采用扫描电镜观察重组胶原交联前后的表面结构,分别观察横纵切面,放大倍数为200。

1.4.7 体外细胞毒性 以高糖DMEM培养液为浸提介质,先将重组胶原蛋白海绵饱和吸收培养液,之后以0.1 g/mL

比例进行浸提, 浸提温度为37 ℃, 浸提时间为24 h。

将传代48-72 h生长旺盛的L929细胞胰酶消化收集, 用高糖DMEM培养基配置成细胞浓度 $1 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 的细胞悬液, 接种至96孔板中, 每孔200  $\mu\text{L}$ 。在96孔板每孔加入细胞悬液200  $\mu\text{L}$ , 次日换液后, 实验组加200  $\mu\text{L}$ 重组胶原蛋白海绵浸提液, 对照组加常规培养基, 阳性对照组加5% DMSO。在培养第68小时, 各孔加入MTT试剂20  $\mu\text{L}$ , 细胞培养箱内孵育4 h, 吸弃液体, 每孔加入160  $\mu\text{L}$  DMSO, 调零孔此时也加入160  $\mu\text{L}$  DMSO, 低速震荡10 min, 使用酶联免疫检测仪在490 nm波长下测各孔吸光度值(A值), 用空白调零孔吸光度值调零, 取平均值并记录。

根据各组的吸光度均值按照如下公式计算细胞的相对增殖率, 细胞相对增殖率=实验组平均吸光度值/对照组平均吸光度值 $\times 100\%$ 。当细胞相对增殖率 $\geq 100\%$ 时, 细胞毒性0级; 当细胞相对增殖率在80%-99%之间时, 细胞毒性1级; 当细胞相对增殖率在50%-79%之间时, 细胞毒性2级; 当细胞相对增殖率在30%-49%之间时, 细胞毒性3级; 当细胞相对增殖率在0-29%之间时, 细胞毒性4级。

1.5 主要观察指标 重组胶原蛋白海绵的吸水率、孔隙率及细胞毒性。

## 2 结果 Results

2.1 SDS-PAGE蛋白电泳结果 由同批3个平行样检测电泳结果可知, 纯化后获得的重组胶原蛋白具有较高的纯度, 表达量高, 分子质量在所设计的90 000 Da左右, 见图1, 说明所用的发酵体系胶原表达高效、稳定。

2.2 吸水率及孔隙率检测结果 取6组交联重组胶原蛋白海绵样品, 对其吸水率及孔隙率进行检测, 结果见表1。

表1 重组胶原蛋白海绵吸水率与孔隙率的检测

Table 1 Water absorption and porosity of recombinant collagen sponge

样品编号	吸水率(%)	孔隙率(%)
1	2 880	86
2	2 890	85
3	2 890	90
4	2 920	86
5	3 000	86
6	2 870	87

由上表可知, 统计分析交联后重组胶原蛋白海绵的吸水率为(2 903.83 $\pm$ 47.90)%, 满足临床中用于止血产品至少20倍吸湿量的需求, 说明交联后重组胶原蛋白海绵支架具有良好的吸水率。重组胶原蛋白海绵冻干后呈柔软, 多孔状结构, 平均孔隙率在85%以上, 提供了较大的比表面积, 这为样品在止血使用过程中的快速吸湿效率及吸附聚集血小板等提供了良好的三维空间结构。

2.3 红外光谱检测结果 红外光谱检测结果显示, 图谱A与图谱B进行比对, 交联前后重组胶原蛋白海绵的光谱图样无明显差别, 各化学键出峰位置差异不大, 胶原的特征峰位置大致相同(如2 930  $\text{cm}^{-1}$ 为酰胺B峰, 1 625  $\text{cm}^{-1}$ 为酰

胺I峰, 1 545  $\text{cm}^{-1}$ 为酰胺II峰), 见图2, 说明交联后重组胶原蛋白海绵依然保持有胶原的自身结构特点。

2.4 扫描电镜观察结果 交联前, 重组胶原蛋白海绵孔隙呈蜂窝状, 致密; 交联后, 重组胶原蛋白海绵孔隙较大, 呈板层结构, 可看到板层间桥键连接, 纵向可看到较大褶皱。从研究结果显示出交联后材料三维结构更加立体, 片层结构面积更大, 具有更大的理论拉伸机械强度, 见图3, 这也与文献报道相一致, 如陈琳等<sup>[12]</sup>报道胶原交联后拉伸强度由210 N提高到3 400 N, 同时大板层间的交错结构也提供了更高的吸水性, 提高保水力。

2.5 体外细胞毒性检测结果 由图4显微镜下观察细胞增殖情况可知, 实验组细胞生长密集, 折光率高, 细胞界限清晰, 生长状态良好; 对照组细胞按正常培养过程进行增殖; 阳性对照组细胞数量很少, 难以正常生长。通过酶联免疫检测仪检测对照组及实验组的平均A值分别为0.632 7和0.531 5, 依照细胞相对增殖率公式计算, 参照细胞毒性反应评分标准, 样品的细胞相对增殖率为84%, 属于1级细胞毒性, 毒性较低, 生物安全性良好。

## 3 讨论 Discussion

胶原蛋白广泛存在于动物结缔组织中, 如皮肤、肌腱、软骨、血管、骨、肌腱、韧带等, 是动物体内重要的结构蛋白, 也是哺乳动物体内含量最多、分布最广的功能蛋白, 如皮肤真皮层的细胞外基质<sup>[13-15]</sup>, 其主要成分即为胶原蛋白, 对机体起保护及支撑作用。同时研究发现, 胶原蛋白与细胞间信息的传递、组织的形成、伤口愈合及机体衰老等方面关系密切, 故其在组织工程材料、创伤修复等方向的研究为一大热点领域。

胶原蛋白种类较多, 常见类型有I型、II型、III型、V型和XI型, 其中I型胶原广泛存在于机体结缔组织, 作为组织工程材料研究也最为深入。胶原蛋白具有典型的(G-X-Y)结构, 其中G代表甘氨酸, X、Y代表其他氨基酸, G-X-Y结构重复出现, 形成胶原原纤维, 此独特结构也造成了胶原蛋白较低的免疫原性<sup>[16]</sup>。此外, 胶原蛋白还具有生物可降解性、细胞可黏附性、促进血小板凝集及良好的生物相容性等特性<sup>[17-20]</sup>, 基于这些特性, 胶原蛋白被作为生物材料广泛应用于临床医疗多个方面, 如引导组织再生生物膜、胶原海绵、软骨膜片、疝修补片、硬脑膜、人工皮肤、人工血管等。实验选用的胶原蛋白原料为微生物发酵法获得的重组人胶原蛋白, 该胶原蛋白具有与人同源的基因序列, 并采用高效纯化技术获得, 蛋白纯度高, 质量稳定, 相比动物提取的胶原蛋白, 具有亲水性强、生物相容性好、低免疫原性等优势<sup>[21]</sup>。

胶原蛋白产品虽然取得了良好的临床应用效果, 但其本身也存在降解速率不易控制、产品机械强度相对较差等不足, 限制了进一步的开发与利用<sup>[22-24]</sup>。故当前人们将研究热点放在对胶原改性方面, 以期获得生物安全性良好、降解可控、机械强度较高等特点的胶原类产品, 使改性后的胶原产品可在细胞支架、诱导组织再生及止血等方面有更广泛的应用。

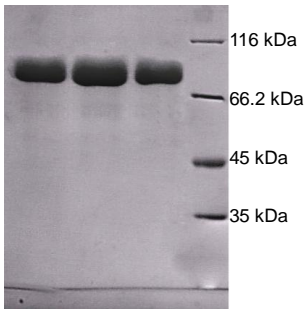
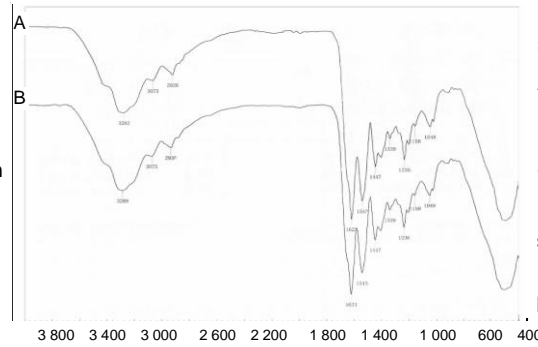
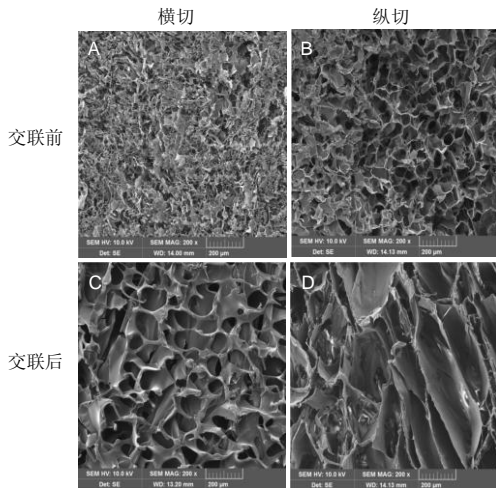


图1 重组胶原蛋白电泳结果  
Figure 1 Results of recombinant collagen electrophoresis

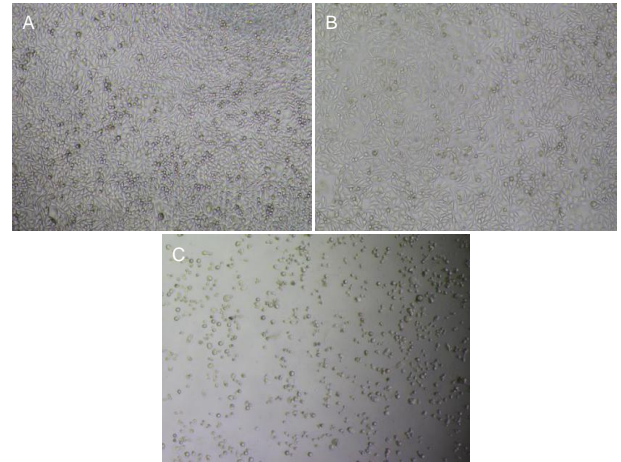


图注：图中 A 为交联前，B 为交联后；戊二醛交联后，重组胶原蛋白海绵依然保持有胶原的自身结构特点。  
图2 重组胶原蛋白海绵交联前后红外光谱检测结果  
Figure 2 Infrared spectroscopy results of the recombinant collagen sponge before and after cross-linking



图注：交联前，重组胶原蛋白海绵孔隙呈蜂窝状，致密(A, B)；交联后，重组胶原蛋白海绵孔隙较大，呈板层结构，可看到板层间桥键连接，纵向可看到较大褶皱(B, D)。

图3 重组胶原蛋白海绵交联前后扫描电镜观察结果  
Figure 3 Scanning electron microscope detection of the recombinant collagen sponge before and after cross-linking



图注：图中 A 为实验组，细胞生长密集，折光率高，细胞界限清晰，生长状态良好；B 为对照组，细胞生长密集，生长状态良好；C 为阳性对照组，细胞数量很少，难以正常生长。

图4 MTT 法检测交联重组胶原蛋白海绵的体外细胞毒性  
Figure 4 MTT detection of cytotoxicity *in vitro*

常见的交联方法主要有物理交联法，如紫外线照射、 $\gamma$ 射线、反复冻融等；化学交联法如戊二醛、碳二亚胺、京尼平、谷氨酰转氨酶、环氧化物等。与物理交联方法相比，化学交联法具有交联度高、反应均一等优势，可显著提高材料的韧性、力学强度及耐降解性。戊二醛是最早使用的交联剂之一，具有价格低、水性反应、反应高效等特点<sup>[25-26]</sup>，可通过两端醛基与2个胶原蛋白的伯氨基反应形成希夫碱，提高胶原稳定性。如用低浓度戊二醛对胶原纤维进行改性处理，胶原纤维的原始形态不会发生明显改变，但可有效改进胶原的物理、化学稳定性。有研究认为，过度使用戊二醛会造成组织钙化，引发组织炎症，且具有较高的细胞毒性，因此使用中应注意对残留戊二醛含量进行有效控制，降低游离戊二醛浓度，保证生物相容性合格。研究结果显示，交联后的重组胶原蛋白海绵孔隙率高，吸水性好；且交联前后红外光谱检测无明显差异，说明交联未改变胶原性质。扫描电镜观察发现，交联后重组胶原蛋白海绵形态结构稍有变化，由小孔网状变为较大褶皱的片状，且间隙有明显的桥状连接，提高了其韧性和机械强度，这也与Chen等<sup>[27-28]</sup>的结果相一致。体外细胞毒性结果表明，材料交联后经有效排残处理，最终材料本身的生物相容性较佳，为1级细胞毒性，可满足国家对植入类医疗器械的质量要求<sup>[29-31]</sup>。

临床手术中常面临急性出血等突发问题，特别是外科手术中或术后大量出血，会显著降低手术质量和预后效果，有效止血是手术成败的关键之一。目前市面上止血材料众多，多具有一定的吸水性能，可通过挤压、局部提高血液浓度等方式达到止血效果，但止血速率及效果有限。胶原蛋白具有良好生物相容性、可降解性等优点，将胶原蛋白开发为多孔网状胶原蛋白海绵止血产品，可大量吸附渗出液，同时加速血小板凝聚，达到止血效果。研究制备的交联重组胶原蛋白海绵，蛋白性状完好，孔隙率高，吸水性强，生物相容性良好，临床操作中可紧贴创面，起物理隔离屏障作用，防止伤口污染，作为止血材料使用满足要求，同时与创面接触时，胶原天然的支架结构还可作为细胞黏附增长的支撑，提高创面愈合效果<sup>[32-34]</sup>。已有报道发现胶原海绵对于凝血机制的启动具有一定的促进作用<sup>[6, 35-36]</sup>，这也是后期对该改性材料进一步研究的目标。

总体来说，重组胶原蛋白在临床医疗领域应用前景广阔，其高稳定性，易扩大生产，高生物相容性等均是其可作为组织工程医疗器械产品的实施基础，Mirazul等<sup>[37-41]</sup>也将其用于创面修复、角膜替代物等再生医疗领域且取得了一定的临床效果，故对重组胶原及改性胶原的开发研究未来依然是生物材料领域热点方向之一。



**作者贡献:** 何越进行实验设计, 实验实施为何越、李晓颖, 实验评估为侯增森、高恩, 资料收集为何越, 何越成文, 赵金礼、刘建利审核。

**经费支持:** 该文章接受了“西安市科技计划项目(CX13120)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**写作指南:** 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**文章查重:** 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

**文章外审:** 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合期刊发稿宗旨。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

## 4 参考文献 References

- [1] 高长有, 马列. 医用高分子材料[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006:22-26.
- [2] Deepthi S, Nivedhitha SM, Deepti KJ, et al. Layered chitosan-collagen hydrogel/ aligned PLLA nanofiber construct for flexor tendon regeneration. Carbohydr Polym. 2016;153:492-500.
- [3] Panwar P, Lamour G, Mackenzie NCW, et al. Changes in structural/mechanical properties and degradability of collagen during aging-associated modifications. J Biol Chem. 2015;290(38):23291-23306.
- [4] Walters BD, Stegemann JP. Strategies for directing the structure and function of three-dimensional collagen biomaterials across length scales. Acta Biomaterialia. 2014;10(4):1488-1501.
- [5] Maynes R. Structure and function of collagen types. Elsevier, 2012.
- [6] Usha R, Sreeram KJ, Rajaram A, et al. Stabilization of collagen with EDC/NHS in the presence of L-lysine: A comprehensive study. Colloids Surf B Biointerfaces. 2012;90:83-90.
- [7] 王晓军, 惠俊峰, 米钰, 等. 重组人胶原蛋白的分离纯化[J]. 中国生物制品学杂志, 2003, 16(4):212-214.
- [8] Ramachandran G. Biochemistry of collagen. Springer Science & Business Media, 2013.
- [9] Jia L, Duan Z, Fan D, et al. Human-like collagen/ nanohydroxyapatite scaffolds for the culture of chondrocytes. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2013;33(2):727-734.
- [10] 柴雅琳, 何会霞, 肖建喜. 重组胶原蛋白-羟基磷灰石复合材料的制备与表征[J]. 皮革科学与工程, 2017, 27(4):36-42.
- [11] Chang L, Liu XL, Di Fan D, et al. The efficiency of magnetic hyperthermia and in vivo histocompatibility for human-like collagen protein-coated magnetic nanoparticles. Int J Nanomedicine. 2016; 11:1175-1185.
- [12] 陈琳, 吕洋, 管利东, 等. 生物支架材料胶原膜交联前后的特性分析[J]. 中国修复重建外科杂志, 2008, 22(2):183-187.
- [13] Murphy CM, Matsiko A, Haugh MG, et al. Mesenchymal stem cell fate is regulated by the composition and mechanical properties of collagen-glycosaminoglycan scaffolds. J MechBehav Biomed Mater. 2012;11:53-62.
- [14] 何静. 胶原蛋白在生物医药工程中的应用研究进展[J]. 河南科技, 2015, 564(5):104-105.
- [15] Hu Y, Liu L, Gu ZP, et al. Modification of collagen with a natural derived cross-linker, alginate dialdehyde. Carbohydr Polym. 2014;102(1):324-332.
- [16] 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.
- [17] Chen MM, Huang YQ, Guo H, et al. Preparation, characterization, and potential biomedical application of composite sponges based on collagen from silver carp skin. J Appl Polym Sci. 2014;131(21):1-8.
- [18] Inzana JA, Olvera D, Fuller SM, et al. 3D printing of composite calcium phosphate and collagen scaffolds for bone regeneration. Biomaterials. 2014;35(13):4026-4034.
- [19] 迟妍妍, 乐尧金, 刘旭昭, 等. 胶原蛋白海绵的生物特性及体内降解吸收[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(34):5515-5519.
- [20] Antoine EE, Vlachos PP, Rylander MN. Review of collagen I hydrogels for bioengineered tissue microenvironments: characterization of mechanics, structure, and transport. Tissue Eng Part B Rev. 2014; 20(6):683-696.
- [21] Olsen D, Yang CL, Bodo M, et al. Recombinant collagen and gelatin for drug delivery. Adv Drug Del Rev. 2003, 55(12):1547-1567.
- [22] 刘振辉, 吕卫金, 戴圣佳, 等. 胶原蛋白的提取、改性及应用研究进展[J]. 食品与药品, 2014, 16(6):443-447.
- [23] 刘辉辉, 郭善禹. 皮肤组织损伤修复的研究进展[J]. 外科理论与实践, 2013, 18(2):188-192.
- [24] Zhang X, Yang Y, Yao J, et al. Strong collagen hydrogels by oxidized dextran modification. ACS Sustain Chem Eng. 2014;2(5):1318-1324.
- [25] Gong ZJ, Zhang S, Wang K, et al. Chimeric flaps pedicled with the lateral circumflex femoral artery for individualised reconstruction of through-and-through oral and maxillofacial defects. Br J Oral Maxillofac Surg. 2015;53(2):148-152.
- [26] Sheu MT, Huang JC, Yeh GC, et al. Characterization of collagen gel solutions and collagen matrices for cell culture. Biomaterials. 2001; 22(13):1713-1719.
- [27] Chen JT, Zhao YP, Xu Z, et al. Study on the FTIR of Recombinant Collagen and Bovine Type I Collagen. Chin J Mater Res. 2008;22(3):119-121.
- [28] 蔡洁. 新型交联剂的合成及交联改性胶原的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2014.
- [29] 程玮璐, 李慧, 贺金梅, 等. 可降解复合止血胶原蛋白海绵的制备及生物应用性能研究[J]. 化学与黏合, 2016, 38(4):231-234.
- [30] GB/T16886.1-2011 医疗器械 风险管理过程中的评价与实验.
- [31] Zhao L, Xian L, Zhao J, et al. A novel smart injectable hydrogel prepared by microbial transglutaminase and human-like collagen: Its characterization and biocompatibility. Mater Sci Eng C. 2016;68:317-326.
- [32] 曹谊林, 刘伟, 张文杰, 等. 组织工程研究进展[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2012, 32(9):1241-1250.
- [33] 邹勇, 刘文杰. 胶原在止血材料中的应用研究进展[J]. 明胶科学与技术, 2010, 30(1):1-4.
- [34] Jayalakshmi K, Pasiyappazham R, Vairamani S, et al. Isolation and partial characterization of collagen from outer skin of Sepia pharaonis (Ehrenberg, 1831) from Puducherry coast. Biochem Biophys Res. 2017;10:39-45.
- [35] Chan EC, Peshavariya HM, Liu GS, et al. Nox4 modulates collagen production stimulated by transforming growth factor  $\beta$ 1 in vivo and in vitro. Biochem Biophys Res Commun. 2013;430(3):918-925.
- [36] 刘新华, 但年华, 李正军, 等. 胶原基复合医用海绵的研究进展[J]. 西部皮革, 2012, 35(8):13-18.
- [37] Si NP, Hye JL, Kwang HL, et al. Biological characterization of EDC-crosslinked collagen-hyaluronic acid matrix in dermal tissue restoration. Biomaterials. 2003;24:1631-1641.
- [38] Mirazul I, Vytautas C, Chaoliang, et al. Functional fabrication of recombinant human collagen-phosphorylcholine hydrogels. Acta Biomaterialia. 2015;12:70-80.
- [39] Fagerholm P, Lagali NS, Ong JA, et al. Stable corneal regeneration four years after implantation of a cell-free recombinant human collagen scaffold. Biomaterials. 2014;35(8):2420-2427.
- [40] 刘文广, May Griffith, Frank Li. 基于重组人胶原构建角膜替代物[J]. 高分子通报, 2010, 23(8):000001-6.
- [41] 马慧军, 贾赤宇, 魏蓉, 等. 胶原蛋白凝胶促进皮肤创面修复的临床研究[J]. 中国美容医学, 2011, 20(2):235-236.