

蒋挺大 编著

胶原与胶原蛋白



化学工业出版社



蒋挺大 编著

胶原与胶原蛋白



化学工业出版社

· 北京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

胶原与胶原蛋白/蒋挺大编著. —北京: 化学工业出版社, 2006. 2

ISBN 7-5025-8196-0

I. 胶… II. 蒋… III. 胶原蛋白-基本知识 IV. Q51

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2006) 第 005192 号

胶原与胶原蛋白

蒋挺大 编著

责任编辑: 侯玉周

文字编辑: 焦欣渝

责任校对: 战河红

封面设计: 尹琳琳

*

化学工业出版社出版发行

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

购书咨询: (010)64982530

(010)64918013

购书传真: (010)64982630

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

北京云浩印刷有限责任公司印刷

三河市前程装订厂装订

开本 720mm×1000mm 1/16 印张 23 字数 444 千字

2006 年 3 月第 1 版 2006 年 3 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-8196-0

定 价: 48.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

前 言

胶原广泛存在于从低等脊椎动物的体表面到哺乳动物机体的一切组织中，是哺乳动物体内含量最多的一类蛋白质，占蛋白质总量的25%~30%。

胶原是一类特殊的蛋白质。一般的蛋白质是双螺旋结构，而胶原是三螺旋结构，是一种硬蛋白。过去认为胶原是无生理活性的蛋白质，对胶原深入研究后发现，胶原与组织的形成、成熟、细胞间信息的传递，与细胞增生、分化、运动、细胞免疫、肿瘤转移以及关节润滑、伤口愈合、钙化作用、血液凝固和衰老等有着密切的关系，也与许多结缔组织胶原病的发生密切相关。因此，对胶原及其基因的研究越来越引起人们的重视。

现在，人们对胶原的兴趣分两个方面：一方面是对体内胶原的分子生物学、生物化学及生理、病理学的研究；另一方面是从机体组织中分离提取出来的胶原，可以制备具有生物活性的胶原及无活性的胶原蛋白，成为重要的生物医学材料和工业材料，在手术缝合线、止血纤维和止血海绵、代血浆、水凝胶、敷料、人工皮肤、人工血管、人工食管、心脏瓣膜、人工骨和骨的修复、角膜、神经修复、药物缓释材料等的临床应用中发挥了重要的作用，在可降解生物医学材料中占有很重要的位置。胶原在作为组织工程生物材料方面显示出来的优越性，将会有力地促进组织工程的发展。

有关胶原和胶原蛋白的研究论文，全世界每年要发表近千篇，我国近年来每年也要发表一二百篇，这是不多见的。从20世纪80年代到现在，我国已经建起了100多个生产胶原和胶原蛋白的企业（不包括明胶厂），形成了一个产业群，推动了生物医学材料、美容保健、食品饲料和轻工业的发展。

为了进一步推动我国对胶原和胶原蛋白的研究，开发研制更多的新产品，发展胶原蛋白产业，特编写此书。我国的明胶行业有萎缩之势，希望此书能对明胶行业的发展有所启发和促进。

2001年出版的《胶原蛋白》是第一本由中国人撰写的关于胶原蛋白的著作，2003年出版了顾其顺、蒋丽霞主编的《胶原蛋白与临床医学》，这两本书都是作者自己研究工作的总结。为了比较全面反映胶原与胶原蛋白的研究、应用及生产的状况，在理论和实践两个层面作深入浅出的阐述，根据国内外的最新资料，编写了这本《胶原与胶原蛋白》。为了便于更多人的阅读和查找相关资料，每章都附有大量的参考文献，而且以中文的参考文献为主。本书共10章：第1章～第3章阐述体内胶原的存在、结构、生物合成以及物理、化学性质，第4章、第5章为制备、生产技术和检测方法，第6章～第10章是应用。

由于本书涉及的学科领域较多，所以写作的难度较大，很可能有错误和不足之处，敬请专家和读者赐教，不胜感激！

蒋挺大

2005年10月17日于北京

时值神舟六号载人飞船胜利返航，举国同庆

目 录

1 胶原、明胶和胶原蛋白	1
1.1 概述	1
1.1.1 存在	2
1.1.2 氨基酸组成	4
1.1.3 结构功能	7
1.2 胶原的结构	9
1.2.1 一级结构	9
1.2.2 空间结构	11
1.2.3 结构类型	14
1.2.4 温度对胶原蛋白结构的影响	18
1.3 胶原的生物合成	21
1.3.1 前胶原 α -肽链的合成	21
1.3.2 前胶原 α -肽链的羟基化修饰	21
1.3.3 前胶原 α -肽链的糖基化修饰	22
1.3.4 前胶原 α -肽链的连接与前胶原的分泌	23
1.3.5 前胶原转变为原胶原	24
1.3.6 原胶原聚合	24
1.3.7 原胶原的共价交联	24
1.3.8 胶原的分解代谢	27
1.4 胶原、明胶和胶原蛋白的异同	28
参考文献	30
2 物理性质	32
2.1 两性电解质性质和等电点	32
2.2 相对分子质量及其分布	33
2.3 水溶液聚集状态	37
2.4 玻璃化转变温度	37
2.5 变性	39

2.6 红外光谱和紫外光谱	40
2.6.1 不同温度下胶原蛋白的红外光谱	41
2.6.2 不同湿度下胶原蛋白的红外光谱	42
2.6.3 紫外光谱	44
2.7 功能性质	45
2.7.1 水合性质	45
2.7.2 溶解性	46
2.7.3 吸油性	48
2.7.4 乳化性和乳化稳定性	48
2.7.5 起泡性和泡沫稳定性	51
2.7.6 黏度	51
2.7.7 凝胶性	53
参考文献	54

3 化学性质 56

3.1 酸碱性质	56
3.1.1 两性电解质	56
3.1.2 酸碱介质中的膨胀	57
3.1.3 盐的作用	58
3.2 氨基的反应	59
3.2.1 脱氨基反应	59
3.2.2 与甲醛的反应	60
3.2.3 酰基化反应	60
3.2.4 胍基化反应	62
3.2.5 甲基化反应	62
3.2.6 与氮丙啶的反应	62
3.2.7 巯基化反应	62
3.2.8 与环氧化合物的反应	63
3.2.9 与乙烯砜的反应	63
3.3 羧基的反应	63
3.3.1 酯化反应	63
3.3.2 酰胺化反应	63
3.3.3 与环氧化合物的反应	64
3.3.4 与氮丙啶的反应	64
3.4 甲硫基的反应	64
3.5 胍基的反应	64

3.6	羟基的反应	65
3.7	非酶磷酸化	65
3.8	与金属离子的作用	65
3.8.1	银离子与明胶的螯合	65
3.8.2	铜离子与明胶的螯合	66
3.8.3	铁离子与明胶的相互作用	66
3.8.4	过渡金属离子与明胶的相互作用	67
3.8.5	钺(Ⅲ)与Ⅱ型胶原的相互作用	67
3.9	显色反应	68
3.9.1	茚三酮的显色反应	68
3.9.2	双缩脲反应	69
3.9.3	酚试剂反应	69
3.10	与表面活性剂的作用	70
3.11	氧化	70
3.12	还原性	71
3.13	交联	72
3.13.1	物理交联方法	73
3.13.2	醛类交联剂	73
3.13.3	亚胺类交联剂	74
3.13.4	二异氰酸酯类交联剂	74
3.13.5	京尼平	75
3.13.6	叠氮二苯基磷	76
3.13.7	无机交联剂(鞣革剂)	77
3.14	降解	79
3.14.1	水解	79
3.14.2	酶解	79
3.14.3	热解	81
3.15	接枝共聚	81
3.16	复凝聚	83
3.16.1	明胶-壳聚糖	84
3.16.2	明胶-卡拉胶	85
3.16.3	明胶-海藻胶	87
3.16.4	明胶-丙烯酸类聚合物	87
	参考文献	88

4 制备和生产技术 90

4.1	一般方法	90
4.1.1	组织材料的选择和前处理	91
4.1.2	胶原的提取	91
4.1.3	盐析	92
4.2	胶原的分离纯化	94
4.2.1	离子交换色谱	94
4.2.2	凝胶过滤色谱	96
4.2.3	亲和色谱	97
4.2.4	高效液相色谱	97
4.3	明胶的精制纯化	97
4.3.1	硅藻土过滤脱色	97
4.3.2	聚丙烯酰胺絮凝	98
4.3.3	离子交换树脂处理	98
4.4	从牛腱及牛皮中提取胶原	98
4.4.1	牛腱的酶法提取	98
4.4.2	牛腱的酸性提取	99
4.4.3	牛皮的中性提取	100
4.4.4	牛皮的酶法提取	102
4.5	从猪皮中提取胶原	102
4.5.1	中性萃取法	103
4.5.2	酸性萃取法	104
4.5.3	酶法提取	104
4.6	骨胶原的制备	106
4.7	从鱼皮和其他水产品中提取胶原	109
4.7.1	鲑鱼皮	110
4.7.2	大马哈鱼皮	110
4.7.3	鱼鳞	110
4.7.4	海星体壁	111
4.8	鼠尾肌腱胶原的提取	113
4.9	从其他皮中提取胶原	113
4.9.1	山羊胎皮	113
4.9.2	家兔皮	114
4.10	人胶原的制备	115
4.10.1	从人胎盘中提取I型、III型、IV型和VI型胶原	115
4.10.2	从肺小叶中提取IV型和V型胶原	117
4.10.3	从人胎骨中提取I型和II型胶原	117

4.10.4	重组类人胶原	118
4.11	从组织细胞培养液中提取胶原	119
4.12	酶法制备明胶和胶原蛋白	120
4.12.1	胃蛋白酶法	121
4.12.2	中性蛋白酶法	122
4.13	从制革废渣中提取胶原蛋白	124
4.13.1	脱鞣	125
4.13.2	反应条件	127
4.13.3	酶法	130
4.14	胶原蛋白寡肽的制备	132
4.15	胶原酶的提取	133
4.15.1	溶组织梭状芽孢杆菌制备胶原酶	133
4.15.2	从双胸蚓中提取胶原酶	134
4.15.3	聚乙二醇修饰胶原酶	135
	参考文献	135

5 检测方法 138

5.1	胶原及其类型的鉴定	138
5.1.1	Van Gieson 染色法	138
5.1.2	苦味酸-天狼猩红染色-偏振光法	139
5.1.3	复合染色法	140
5.2	定量分析	140
5.2.1	凯氏定氮法	141
5.2.2	双缩脲法	142
5.2.3	紫外吸收法	143
5.2.4	考马斯亮蓝 G-250 染色法	143
5.2.5	天狼猩红法	144
5.3	免疫学检测法	145
5.3.1	酶联免疫检测法	145
5.3.2	免疫印迹法	149
5.3.3	放射免疫法	151
5.3.4	免疫荧光法	153
5.3.5	免疫电镜法	155
5.4	特异性氨基酸的测定	157
5.4.1	Woessner 比色法	157
5.4.2	Kivirikko 比色法	158

5.4.3	组织中羟脯氨酸的比色测定 (ISO 法)	159
5.5	氨基酸的分析	160
5.6	分子量的测定	164
5.6.1	凝胶色谱法	164
5.6.2	高效液相色谱法	168
5.6.3	质谱法	169
5.7	聚丙烯酰胺凝胶电泳	169
5.8	$^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱	171
5.9	技术指标	174
5.9.1	水分	174
5.9.2	水不溶物	175
5.9.3	灰分	175
5.9.4	pH 值	175
5.9.5	氮含量	175
5.9.6	黏度	175
5.9.7	重金属	176
5.9.8	砷	177
5.9.9	铬	179
5.9.10	微生物	183
	参考文献	184
6	生物医学材料与临床应用	186
6.1	手术缝合线	187
6.1.1	胶原可吸收缝合线	188
6.1.2	胶原-聚乙烯醇可吸收缝合线	188
6.1.3	胶原-壳聚糖可吸收缝合线	189
6.1.4	胶原-壳聚糖-聚丙烯酰胺可吸收缝合线	189
6.2	止血纤维	191
6.3	止血海绵	194
6.4	代血浆	196
6.4.1	氧化聚明胶代血浆	197
6.4.2	血安定	198
6.4.3	血代	198
6.4.4	海星明胶代血浆	199
6.5	水凝胶	199
6.5.1	胶原-聚甲基丙烯酸羟乙酯水凝胶	200

6.5.2	胶原-聚乙烯醇水凝胶	201
6.5.3	胶原-聚异丙基丙烯酰胺水凝胶	202
6.5.4	明胶-壳聚糖水凝胶	203
6.6	敷料	204
6.6.1	海绵型敷料	205
6.6.2	胶原膜敷料	206
6.6.3	凝胶敷料	207
6.7	人工皮肤	208
6.7.1	第一代人工皮肤	208
6.7.2	组织工程	210
6.7.3	第二代人工皮肤——组织工程化皮肤	210
6.8	人工血管	219
6.9	人工食管	223
6.9.1	人工材料制作的人工食管	223
6.9.2	可降解材料制作的无细胞支架人工食管	224
6.9.3	组织工程化食管	224
6.10	心脏瓣膜	225
6.10.1	支架材料的选择	226
6.10.2	细胞的种植和培养	228
6.11	骨的修复和人工骨	229
6.11.1	组织引导再生术	230
6.11.2	组织工程化骨组织的构建	233
6.12	角膜	239
6.12.1	角膜胶原膜	239
6.12.2	组织工程化角膜	240
6.13	神经修复	242
6.14	药物载体	245
6.14.1	胶原膜	245
6.14.2	胶原海绵	247
6.14.3	药用胶囊和微胶囊	247
6.14.4	丸剂或片剂	250
6.15	固定化酶的载体	250
	参考文献	251

7 美容和保健

7.1	胶原与衰老	256
-----	-------------	-----

7.2	胶原蛋白的美容功能	256
7.3	化妆品	258
7.4	面膜	261
7.5	胶原注射	262
7.6	丰胸	263
7.7	减肥、降压和降血脂	264
7.8	补钙理论	265
7.9	排除体内的铝	269
7.10	促进指甲和头发生长	270
7.11	阿胶	270
	参考文献	272

8 在食品中的应用

8.1	硬蛋白的转化及营养学意义	273
8.1.1	胶原的代谢	274
8.1.2	从硬蛋白到胶原蛋白的转化	274
8.1.3	营养学研究	276
8.2	功能作用	277
8.2.1	乳化剂	277
8.2.2	稳定剂	277
8.2.3	发泡剂	278
8.2.4	胶冻剂	278
8.2.5	澄清剂	278
8.3	改良作用	281
8.3.1	肉和肉制品	281
8.3.2	乳制品	282
8.3.3	饮料	284
8.4	模拟食品	285
8.4.1	仿生海参	285
8.4.2	人造鱼翅	287
8.4.3	胶原蛋白丝	288
8.4.4	人工发菜	288
8.5	可食包装膜	288
8.6	胶原肠衣	293
	参考文献	295

9 在其他工业中的应用

297

9.1 造纸	297
9.1.1 胶原蛋白的作用机理	298
9.1.2 增强作用	299
9.1.3 表面涂饰	304
9.1.4 胶原纤维的复合抄纸	306
9.2 制革	309
9.2.1 蛋白鞣剂	309
9.2.2 复鞣填充剂	311
9.2.3 皮革涂饰剂	314
9.3 表面活性剂	316
9.3.1 氨基酸系表面活性剂	316
9.3.2 水解蛋白系表面活性剂	318
9.4 分离膜和液体地膜	322
9.4.1 分离膜	322
9.4.2 液体地膜	324
9.5 胶原蛋白纤维	325
9.6 微生物发酵培养基	327
参考文献	328

10 在饲料中的应用	330
10.1 营养学研究	330
10.1.1 材料和方法	331
10.1.2 结果与讨论	333
10.2 毒理学研究	336
10.2.1 六价铬	336
10.2.2 氨基酸	337
10.2.3 霉菌毒素	337
10.2.4 其他原因造成的毒性	338
10.2.5 饲料胶原蛋白粉没有毒性的证明	338
10.3 动物喂养试验	341
10.3.1 主要试材	341
10.3.2 试验方法	341
10.3.3 结果与讨论	342
10.4 胶原蛋白-铬(Ⅲ)的保健作用	345
10.4.1 胶原蛋白的保健作用	345
10.4.2 铬的生物学功能	346

10.4.3 饲料胶原蛋白粉的促进生长和保健作用·····	347
10.5 鱼虾饵料的添加剂·····	350
10.5.1 饲料胶原蛋白粉的氨基酸组成适合于鱼虾·····	350
10.5.2 蛋白型黏合剂·····	350
10.6 毛皮动物和宠物饲料·····	351
参考文献·····	351

1 胶原、明胶和胶原蛋白

1.1 概述

蛋白质是一类含有碳(50%~55%)、氢(6%~7%)、氮(12%~19%)、氧(20%~23%)四种元素的天然高分子化合物,还有许多蛋白质含有硫(0.2%~3%)和磷(0.5%~6%)元素,有些蛋白质还含有铁、铜、锌和碘元素。蛋白质是一切生命体必不可少的组成部分,在生命活动中起着十分重要的作用。

蛋白质完全水解的产物是氨基酸,说明蛋白质是由氨基酸组成的。研究发现,组成各种蛋白质的氨基酸有20种以上,但是由于氨基酸结构的特殊性,构成的蛋白质种类繁多,仅人体内的蛋白质就有10万种之多。

在种类繁多的蛋白质中,胶原是一类重要的蛋白质。胶原的英文是collagen,源自希腊文,意思是“生成胶的产物”。

1940年,Orekhovich等用柠檬酸缓冲液(pH 3.0~4.5)从大鼠皮中溶解出不溶于水的蛋白质,其中含有角蛋白及弹性蛋白,此外还有一种是胶原的前驱体,这种从酸性盐溶液中提取的胶原被命名为“前胶原”。后来经过许多研究者的努力,发现从中性盐和碱性盐溶液中也能提取出胶原。1953年,Gross把这种构建胶原的蛋白质单体命名为“原胶原”(tropocollagen),它是胶原的基本结构单位,原胶原分子经过多级聚集,形成了胶原。

早先认为胶原只不过是一个结构单一的,既缺少免疫原性又缺乏生物活性的普通结构蛋白。近30年来,由于生物化学、分子生物学和细胞生物学技术的发展,人们对细胞外基质,特别是对其主要成分胶原的兴趣日益浓厚,对其研究方法和结构的认识逐渐提高,现已肯定胶原并不是某一个蛋白质的名称,而是在结构上既有共同特点又有差异的一组蛋白质。在这组蛋白质中,目前已发现有27种不同类型的胶原^[1],按照被发现的先后顺序分别称为I型胶原、II型胶原、III型胶原等,用大写罗马数字来进行命名。

胶原通常由3条肽链组成,这些肽链被称为 α -链。有的胶原分子中的 α -肽链都相同;有的有2条相同,1条不同;有的3条 α -肽链都不同。按照惯例,分子

的不同肽链被称为 α_1 -链、 α_2 -链、 α_3 -链。如果附属于不同的胶原，则在其后附带大写罗马数字，并用括号括起来，如 I 型胶原的 α_1 -链，称为 $\alpha_1(I)$ ， α_2 -链称为 $\alpha_2(I)$ 等。单一一种链的 II 型胶原被称为 $[\alpha_1(II)]_3$ ，具有 3 条不同肽链的 VI 型胶原被称为 $\alpha_1(VI)\alpha_2(VI)\alpha_3(VI)$ ，I 型胶原的 2 条不同的肽链被称为 $[\alpha_1(I)]_2\alpha_2(I)$ 。

现在对胶原的定义是：它是细胞外基质（ECM）的一种结构蛋白质，含有一个或几个由 α -链组成的三螺旋结构的区域，即胶原域。

胶原难溶于水、稀酸、稀碱水溶液及盐溶液，属硬蛋白类，因含有少量糖，故也属糖蛋白类。胶原多肽链中氨基酸组成的特点为总氨基酸中约有 1/3 是甘氨酸，1/5 是脯氨酸和特殊的 4-羟脯氨酸，另外还有特殊的羟赖氨酸。羟赖氨酸与羟脯氨酸均无遗传密码，都是在胶原合成后由相应的赖氨酸和脯氨酸残基经羟基化反应生成的，糖基化也是胶原合成后加工修饰生成的。由于胶原的氨基酸组成中含有特殊的羟赖氨酸和羟脯氨酸，故骨折时胶原大量分解，引起患者尿中羟赖氨酸和羟脯氨酸排泄量增加，临床上可通过尿液中羟赖氨酸、羟脯氨酸含量的测定，了解体内胶原的代谢状况。

1.1.1 存在

胶原是动物体内含量最多、分布最广的蛋白质。胶原广泛存在于从低等脊椎动物线虫、蚯蚓等体表的角质层到哺乳动物机体的一切组织中，即使一些简单的多细胞有机体（如水母和海绵）也有胶原存在，是哺乳动物体内含量最多的一类蛋白质。胶原是细胞外基质四大组分之一，而且是主要组分，因此胶原是细胞外蛋白质。

胶原具有独特的组织分布和功能。胶原广泛分布于结缔组织、皮肤、骨骼、内脏细胞间质及肌腔、韧带、巩膜等部位，角膜几乎完全是由胶原组成的。胶原是结缔组织极其重要的结构蛋白，起着支撑器官、保护机体的功能，是决定结缔组织韧性的主要因素。结缔组织将全身细胞黏合，连接成器官与组织，具有防御、支持、保护、营养等功能。

胶原与组织的形成、成熟、细胞间信息的传递、细胞增生、分化、运动、细胞免疫、肿瘤转移以及关节润滑、伤口愈合、钙化作用和血液凝固等有密切关系，也与一些结缔组织胶原病的发生密切相关。因此，对胶原及其基因的研究越来越引起人们的重视。

胶原同时还是人们进行衰老研究的一种模型蛋白。

胶原是哺乳动物体内含量最多的蛋白质，占体内蛋白质总量的 25%~30%，相当于体重的 6%。

胶原是由从遗传学到分子结构都不同的一组蛋白质组成的家族，不同种族、不同组织中的胶原有着不同的化学组成或不同的构型。按构成组织来分，有纤维状胶原（在生皮及肌腱中）、玻璃状胶原（骨组织中的骨素）、软骨质胶原（在软