

FROST & SULLIVAN

沙利文

TRAUTEC  
创健医疗

# 重组XVII型胶原蛋白白皮书

版权所有

©2023弗若斯特沙利文咨询（中国）

©江苏创健医疗科技股份有限公司



扫码了解详情

# 引言

胶原蛋白广泛存在于人体组织中,对维持组织结构和功能非常重要。其中XVII型胶原蛋白是连接细胞骨架和基底膜的关键成分,可维持皮肤完整性。

近年来研究表明XVII型胶原蛋白不仅与皮肤疾病有关,还是调控多种干细胞的关键因子,与衰老表型如脱发、白发等有关;在皮肤创伤修复过程中,XVII型胶原蛋白通过影响干细胞的迁移、增殖和分化来发挥重要作用。随着合成生物学技术的发展,可以获得重组XVII型胶原蛋白,作为新型治疗用蛋白质和抗衰老原料,在皮肤修复、抗衰老等领域展现出巨大的应用潜力。

本白皮书从XVII型胶原蛋白的结构特点入手,介绍其氨基酸序列、三维结构、以及与其他蛋白质的相互作用。同时系统阐述了它与自身免疫性皮肤病、癌症的关系,以及在皮肤衰老、脱发、白发、创伤修复中的关键调节作用,并以重组XVII型胶原蛋白的设计与合成生产为例,阐述了利用合成生物学重组技术获得重组XVII型胶原蛋白的特点与优势,对其生物学活性进行了详细的评价,展望重组XVII型胶原蛋白的潜在应用价值。

我们希望,本白皮书可以帮助读者更好地理解XVII型胶原蛋白的重要性和应用潜力,能为重组XVII型胶原蛋白的研究和应用提供有价值的参考,并为相关领域的研究人员和从业人员提供启示。

## 编写顾问 (以姓氏拼音首字母排序)

赖维, 李远宏, 刘玮, 马彦云, 杨建中

## 编写委员会

江苏创健医疗科技股份有限公司 (以姓氏拼音首字母排序) : 储筠, 邓汉卿, 付生伟, 凡孝菊, 胡淑娴, 纪白慧, 李海航, 李李佳, 潘立旭, 石叶飞, 王丽萍, 翟源心  
弗若斯特沙利文 (北京) 咨询有限公司: 毛化, 李谦, 汪鹏, 王思懿

## 联合发布单位

江苏创健医疗科技股份有限公司

弗若斯特沙利文 (北京) 咨询有限公司

# 序言

随着人民日益增长的对美好生活的需要，国内医疗美容以及功效性护肤市场正处于高速增长阶段，消费者对医疗美容及皮肤护理知识的需求日益增加，对生物医药领域的新材料及创新产品的需求同样也日益增多。在全球领先的合成生物学产业智造平台下，重组XVII型胶原蛋白这一调控多种干细胞的关键因子，由创健医疗在全球范围内首次自主研发成功，并实现了规模化生产，这将作为新型治疗用蛋白质和抗衰老原料，在皮肤修复、抗衰老等领域展现出巨大的应用潜力。基于创健医疗的社会责任感、卓越的研发实力以及强大的专家资源，本白皮书希望可以帮助读者更好的理解XVII型胶原蛋白的重要性及应用潜力，并为相关领域研究人员提供其实和灵感，共同推动中国皮肤医学事业发展，共同打造中国皮肤医学美容新天地。

——贝泰妮集团副总裁 王飞飞

“二十一世纪是生命科学的世纪”，这个提法，近5年来在合成生物学的基础研究进展及其产业化应用领域的迅猛发展方面，得到了淋漓尽致的体现。这说明，基于人类强大应用需求驱动的基础研究和应用研究领域，最容易实现原创性的科学发现和产业化应用突破。合成生物学可以通过基因工程技术，设计和构建新的生物合成途径，并通过高效的过程优化，以前人无法想象的模式，快速和高效地量产出高安全性、多功能性和质量稳定的新型天然生物材料。这类新材料的来源，从化学分子层面和生物基因维度都是高度可控的，新材料本身的生物活性及其功能的作用科学机制清晰、生物兼容性好，为产业下游的生物医疗、药物研发、护肤产品和洗护发领域终端产品的应用和产业化，创造出了无限广阔的应用想象空间。中国的重组XVII胶原蛋白技术，就是一个很好的例子。

——伽蓝（集团）股份有限公司研发中心总经理 邹岳

NatureLab是一家以“赋能于人”为理念，通过产品和创意不断向世界提出新价值的企业。特别是在护发领域，作为业界的领导者，开发了适用广泛的护发、护肤商品和兼具功能性及高附加价值的多个品牌，从家庭用到专业用。通过研究，我们注意到XVII型胶原可以维持皮肤和毛囊干细胞再生。我们从2010年起将其应用于产品中。自2011年以来，学术界发表了大量关于XVII型胶原蛋白的研究论文，2016年我们发现胶原蛋白仿生肽和植物干细胞诱导产生XVII型胶原蛋白，已被证明可以抑制脱发并促进头发生长。我们将其应用于MARO这个面向男性的品牌，该品牌现已发展成为一个知名品牌。创健医疗重组XVII型胶原蛋白的发明是一个非常令人惊喜的成就。我们计划在现有研究成果的基础上，推进创健医疗重组XVII型胶原蛋白在产品中的应用开发。

——NatureLab研究开发部部长 Atsushi Takeoka

# 序言

世界胶原蛋白之父布兰特（J·Brandt）博士曾说过：“人体衰老的过程就是胶原蛋白流失的过程。”就人体皮肤而言，作为细胞外基质的主要组分，胶原在真皮层中含量高达70%-80%，不仅在物理架构上为维持皮肤和肌肉的弹性作出了主要贡献，还进一步参与细胞通讯、信号传导等一系列细胞行为调控。到目前为止，胶原蛋白共发现了28种遗传学不同类型，以往业界的研究目光多集中于I型和III型纤维状胶原，而随着科研技术的发展、迭代和成熟，非纤维状的XVII型胶原在皮肤抗衰领域逐渐崭露头角，是一类具有广阔应用前景的活性分子。创健医疗作为该赛道中极具创新力的玩家，分别参与了中国YY/T 1849-2022《重组胶原蛋白》行业标准和YY/T 1888-2023《重组人源化胶原蛋白》行业标准的制定。同时，也是目前唯一实现XVII型重组胶原产业化的科技企业。无论是在促进细胞粘附、迁移、表皮修复方面，还是对头部毛发密度和生长速度的提升，创健重组XVII型胶原蛋白均呈现出了显著效果，是同类产品中的有力竞争者。以其优异的多重效能和良好的应用前景为诸多品牌提供了一个新的选择。

——上海澄穆化妆品有限公司总经理 杨凯

创健医疗与沙利文咨询联合发布《重组XVII型胶原蛋白白皮书》，旨在探索新材料在皮肤抗衰老及疾病等方面的独特优势及应用前景。XVII型胶原蛋白作为维持皮肤稳态抗衰老的关键因子，对表皮、毛囊、黑色素干细胞都有着重要作用，与皮肤和毛囊健康状态密不可分。该白皮书系统阐释了XVII型胶原蛋白的结构、功能、机理，以及重组XVII型胶原蛋白技术优势、作用价值和应用场景。可以预见，伴随XVII型胶原蛋白的深入研究与技术发展，尤其是创健医疗相关新产品的开发应用，将让更多的消费者受益，为市场的繁荣发展注入全新活力。大麦毛发医疗集团是国内在中高端毛发诊疗服务行业中的领先医疗集团，旗下大麦微针植发是一家专业治疗脱发的全国直营连锁医疗机构。多年来坚持医生创建，专注脱发诊疗及干预。我们深知头皮抗衰对于植发效果和毛发质量的重要性，因此我们非常关注创健医疗XVII型胶原蛋白的研究进展和应用成果。我们期待白皮书的发布能够唤起更多关注，我们也希望与创健医疗进行更深入的合作和交流，共同促进XVII型胶原蛋白在头皮护理领域的应用与创新，为造福社会贡献力量。

——大麦毛发医疗（深圳）集团股份有限公司

皮肤科存在一种好发于老年人的自身免疫性大疱性疾病，即大疱性类天疱疮（bullous pemphigoid, BP），该病由针对两种半桥粒蛋白质BP180和BP230的自身抗体引起。其发病机制取决于易感因素之间的相互作用，临床上通常表现为严重的瘙痒和紧张性水疱，并伴有糜烂和结痂。BP的发病率逐渐增加，并伴有高死亡率。XVII型胶原蛋白（Collagen XVII，也称为BP180）是表皮锚定复合物半桥粒（hemidesmosomes）的关键组成部分，其功能是维持表皮与基底膜的粘附。除了维持真皮-表皮连接的完整性外，有证据表明，XVII型胶原蛋白还参与跨膜信号转导和角化细胞分化的调节。XVII型胶原蛋白的遗传缺陷或缺失，导致人类表皮-真皮交界处疾病的发生，如大疱性类天疱疮、妊娠性类天疱疮、粘膜类天疱疮、线状IgA皮病、类天疱疮性扁平苔藓和结节性类天疱疮。重组XVII型胶原蛋白的研制与转化，为这类疾病提供了新的直接针对发病机制的治疗方案。基于重组XVII型胶原蛋白开展的单中心临床研究（ChiCTR2300070035）显示，局部应用XVII型胶原蛋白加速了BP的创面愈合，降低了继发感染风险，缩短了疗程，产生了令人鼓舞的治疗效果。

——常州市第一人民医院皮肤科主任医师 张汝芝

# 目录

## 第一章：胶原蛋白概述

1.1 胶原蛋白的定义和功能	09
1.1.1 胶原蛋白定义	09
1.1.2 胶原蛋白功能	10
1.2 胶原蛋白在人体中的分布	11
1.3 胶原蛋白的结构	12
1.4 胶原蛋白的类型	13

## 第二章：XVII型胶原蛋白简介

2.1 XVII型胶原蛋白的发现和命名	16
2.2 XVII型胶原蛋白的结构	17
2.3 XVII型胶原蛋白的存在形态	19
2.4 XVII型胶原蛋白的分布与功能	20
2.5 XVII型胶原蛋白相互作用	22
2.6 XVII型胶原蛋白与信号通路的联系	23
2.6.1 TGF- $\beta$	23
2.6.2 Wnt	23
2.6.3 STAT3	23
2.6.4 Hippo	23
2.6.5 Rac1和p38MAPK	23
2.6.6 p53	23

## 第三章：XVII型胶原蛋白同健康与疾病之间的联系

3.1 在自身免疫系统中的作用	25
-----------------	----

# 目录

3.1.1 XVII型胶原蛋白的表位 (Epitope) 图谱	25
3.1.2 XVII型胶原蛋白与BP的病因	26
3.2 XVII型胶原蛋白与癌症	27
3.2.1 XVII型胶原蛋白与皮肤癌的关系	27
3.2.2 XVII型胶原蛋白与其他癌症的关系	29
3.3 XVII型胶原蛋白是维持皮肤稳态抗衰老的关键因子	32
3.3.1 与毛囊干细胞 (HFSC) 和衰老脱发	33
3.3.2 与黑色素细胞干细胞 (MSC) 和头发变白	36
3.3.3 XVII型胶原蛋白与黑色素细胞干细胞 (MSC) 和头发变白	37
3.4 XVII型胶原蛋白是伤口修复的调节因子	40
3.4.1 伤口修复中的干细胞	40
3.4.2 干细胞群体动力学	41
3.4.3 干细胞迁移	41
<b>第四章：重组XVII型胶原蛋白</b>	
4.1 重组与动物源型胶原蛋白区别	44
4.2 重组胶原蛋白符合可持续发展目标	45
4.3 重组胶原蛋白的表达体系	46
4.3.1 原核生物 (大肠杆菌) 表达体系	47
4.3.2 酵母表达体系	47
4.3.3 植物表达体系	48
4.3.4 昆虫表达体系	48
4.3.5 哺乳动物或人细胞表达体系	48
4.4 重组胶原蛋白的优势	49
4.5 重组胶原蛋白的行业标准	50

# 目录

4.6 重组XVII型胶原蛋白的设计与生产	51
4.6.1 重组人源化XVII型胶原蛋白	51
4.6.2 真核微生物酵母表达体系	51
4.6.3 序列设计与产品	52
<b>第五章：重组XVII型胶原蛋白的生物功能性</b>	
5.1 安全性	55
5.2 细胞黏附活性	57
5.3 促细胞迁移活性	58
5.4 调节毛囊和皮肤细胞相关功能基因	59
5.5 提升抗活性氧（ROS）能力	62
5.6 防皱功效	63
5.7 防脱发作用	64
<b>第六章：重组XVII型胶原蛋白应用场景</b>	
6.1 蛋白质替代疗法中的潜在应用	67
6.2 在医药产品中的应用	68
6.3 在护肤品中的应用	70
6.4 在洗护发产品中的应用	71
参考文献	72
法律声明	83
联系我们	85

# 第一章 胶原蛋白概述





# 1.1 胶原蛋白的定义和功能

† 胶原蛋白 (Collagen) 是发现最早、含量最丰富的一类细胞外基质蛋白，在人与动物体的皮肤、肌肉、骨骼及内脏中广泛存在，不论是维护细胞、组织和器官的正常生理功能，还是修复损伤都有重要作用。胶原蛋白因其具有优异的理化性质、生物学功效性和生物相容性、可生物降解等特性，使其在食品、化妆品、营养保健等领域得到广泛应用。

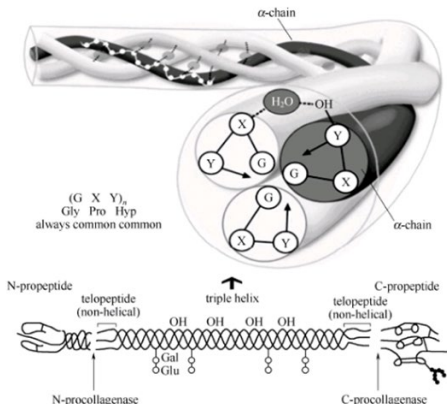
## 1.1.1 胶原蛋白定义<sup>[1]</sup>

胶原蛋白的英文名是Collagen，也称胶原多肽 (Collagen peptide)。胶原蛋白在以三股螺旋状态存在于机体组织时，通常被称为胶原，英文名即Collagen。胶原是细胞外基质的关键结构成分，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。胶原不但为组织提供强度、耐久性和柔韧性，还广泛参与特定的生物相互作用。在所有多细胞动物的细胞外基质中均发现了胶原的存在，包括海绵动物、无脊椎动物和脊椎动物。1956年Gross首先命名构建胶原纤维的蛋白质单体叫做原胶原 (Tropocollagen)，原胶原、胶原是胶原蛋白的天然存在形式，胶原是由胶原蛋白分子经过多级聚集而成的、具有特定结构的复杂化合物。

胶原通常由3条胶原肽链组成，这些肽链被称为 $\alpha$ 链，有些胶原分子中 $\alpha$ 链是相同的；有的2条 $\alpha$ 链相同而1条不同：有的3条 $\alpha$ 链则各不相同。按照惯例，分子中的不同肽链被称为 $\alpha 1$ 链、 $\alpha 2$ 链和 $\alpha 3$ 链。如果属于不同类型的胶原，则在其后附带大写字母，并用括号括起来。如I型胶原的 $\alpha 1$ 链称为 $\alpha 1(I)$ ， $\alpha 2$ 链称为 $\alpha 2(I)$ 等。单一一种II型胶原被称为 $[\alpha 1(I)]_3$ ，具有3条不同肽链的型胶原被称为 $\alpha 1(M)\alpha 2(M)\alpha 3(M)$ 。例如，I型胶原的2条不同肽链被称为 $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$ 。

由此，对于胶原和胶原蛋白的定义则是：胶原是细胞外基质的结构蛋白，分子中至少应该有一个结构域或具有1个或几个由 $\alpha$ 链组成的三螺旋结构的区域，即胶原结构域。每1条 $\alpha$ 链即为1个胶原蛋白分子，胶原是由3条胶原蛋白分子以右手螺旋方式拧成的三螺旋结构。单个的I型胶原分子质量约为285000 Da，宽1.4 nm，长约300 nm。每条胶原蛋白分子质量在100000 Da左右。

胶原的三螺旋结构模型<sup>[2]</sup>



来源：文献检索

### 1.1.1 胶原蛋白定义 (续)

胶原蛋白肽链是由重复的氨基酸片段 (G-X-Y)<sub>n</sub> 构成。其中, G 为甘氨酸 (Gly), 约占胶原蛋白氨基酸含量的 30%; 而 X 和 Y 代表其他氨基酸, 通常是脯氨酸 (Pro) 和羟脯氨酸 (Hyp)。羟脯氨酸的含量影响分子内氢键的形成, 对分子三螺旋构型的稳定十分重要。另外, 还有特殊的羟赖氨酸, 部分羟赖氨酸会继续经糖基化修饰。不同类型的胶原蛋白其三螺旋区域的长度不同。构成三螺旋区域的 (G-X-Y)<sub>n</sub> 片段在成纤维胶原 (I 型、II 型、III 型) 中含量最高, 其三螺旋结构区域长 300 nm, 大概由 1000 个氨基酸组成。其他类型的胶原蛋白其三螺旋区域较短, 或含有非三螺旋结构的干扰片段。在 VI 型及 X 型胶原蛋白中, 其三螺旋区域分别由 200 个和 460 个氨基酸组成。

三螺旋结构对胶原蛋白来说是最显著的特征, 也是成纤维胶原的最重要组成, 在三螺旋区域两侧的非胶原结构域对胶原分子的结构组成和功能特性也发挥着重要的作用。C 末端前肽 (C-propeptide) 参与启动三螺旋结构的形成, 而 N 末端前肽 (N-propeptide) 则与所形成胶原纤维的直径大小有关。胶原蛋白单体中较短的非螺旋端肽不仅参与胶原分子的共价交联, 也在胶原分子与其他分子的链接中发挥重要作用。






胶原蛋白不是一种纯蛋白质, 而是一种糖蛋白, 蛋白质分子与糖分子相结合。脊椎动物中的胶原蛋白约含六碳糖 0.5~1.3%, 如葡萄糖、半乳糖等, 而非脊椎动物胶原蛋白则含糖 3~4%。这些糖类与胶原蛋白的羟脯氨酸这类氨基酸以糖苷键相结合。

### 1.1.2 胶原蛋白功能

胶原作为一种天然蛋白质大分子, 是重要的生物可降解材料。胶原在人体内的功能主要包括免疫原性低、可生物降解性、生物相容性、促进细胞生长、止血性。

由于胶原在人体组织中的重要作用以及作为生物材料的突出优势, 国内外学者从多方面多角度对胶原进行了研究和探索, 特别是胶原的合成与制备、活性胶原多肽的设计开发、胶原类材料新功能的探索和各类型胶原基材料及医用材料的开发制造。目前使用胶原制造的部分组织工程材料和生物医用材料已经在临床上取得成功, 广泛被临床医生和患者接受。

#### 胶原在人体内的主要功能

 免疫原性低	胶原结构重复率较高, 相比于其他具有免疫原性的蛋白质, 胶原免疫原性更低。因为胶原的主要免疫原性位点是在分子的 C、N 末端区域, 该区域被称为端肽, 由短的非螺旋氨基酸序列组成。在胶原提取过程中, 端肽会被选择性水解或者去除而失去活性, 仅在胶原分子的三股螺旋结构内保留一些微弱的免疫原性。
 可生物降解性	胶原紧密的螺旋结构使得大多数蛋白酶只能切断胶原的侧链, 破坏胶原分子之间的交联。胶原肽键只有在胶原酶作用下才会被破坏, 人体内部组织中存在的胶原酶对促进胶原降解发挥很大作用。
 生物相容性	胶原具有良好的亲和性, 能够帮助细胞和组织维持正常的生理功能。同时, 优良的亲和性有利于细胞外基网络构成, 提高细胞黏附性, 使得胶原具有一定的修复作用。
 促进细胞生长	胶原是细胞生长的良好培养基质, 在细胞的迁移、增殖过程中, 胶原不仅提供营养基础, 还起到支架作用。胶原能引导上皮细胞迁移到人体组织缺损区, 从而促进上皮损伤修复及细胞生长。同时, 胶原的降解产物能够被新生细胞利用, 合成新的胶原, 在细胞中起到连接作用。
 止血性	胶原具有促进血小板凝聚和血浆结块功能, 与血液接触后, 血液中的血小板会与胶原纤维吸附在一起, 发生凝集反应, 从而生成纤维蛋白, 促进血浆结块, 进而形成血栓, 达到阻止流血、促进凝血的目的。

来源: 文献检索

## 1.2 胶原蛋白在人体中的分布

### 胶原蛋白广泛分布于人体的结缔组织、骨骼、肌肉中

胶原蛋白属于动物性蛋白质，也是动物体内含量最多、分布最广的蛋白质。胶原是细胞外基质四大组分之一，而且是主要组分。胶原蛋白在动物细胞中扮演着黏结功能的角色，广泛存在于动物细胞外，是细胞外基质最重要的组成成分，也是动物结缔组织中最主要的一种结构性蛋白质。

人体成分有16%左右是蛋白质，而蛋白质中又有30%~40%属于胶原蛋白，所以，成年人身体中大约有3kg胶原蛋白，主要存在的部位有结缔组织、皮肤、肌肉、骨骼、牙齿、内脏（如胃、肠、心肺、血管与食道）、韧带、巩膜与眼睛等组织器官。眼角膜几乎完全由胶原组成。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，连接成组织和器官，具有防御、支持、保护、营养等功能，由此可见胶原对机体重要性<sup>[3]</sup>。

胶原与组织的形成、成熟、细胞间信息的传递，细胞的增殖、分化、免疫，动物运动、关节润滑，肿瘤转移、伤口愈合、血液凝固等关系密切，对维持各结缔组织的完整性和功能性也起着重要的作用。

- **结缔组织**：结缔组织将全身细胞黏合，连接成组织和器官，具有防御、支持、保护、营养等功能。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。在显微镜下观察，胶原约占真皮结缔组织的95%，由直径为2~15 μm的胶原纤维组成，多数呈束状结构。在电子显微镜下观察，胶原纤维由许多原纤维组成。原纤维直径为100 nm左右（70~140 nm），横切面呈圆形，纵切面呈带状，有明暗相间的周期性横纹。原纤维平行排列，组成粗细不等的胶原纤维<sup>[4]</sup>。
- **骨骼**：骨骼中也有较多的胶原，称为骨胶原，人体正常骨骼蛋白质中含有约80%的胶原。骨骼中的胶原赋予骨骼弹性和抗折性，人体骨骼有人形容为“钢筋混凝土结构”，其中的“钢筋”就是胶原，羟基磷酸钙就是“水泥和石子”，胶原在骨骼中互相交织，形成一张网络，将羟基磷酸钙等物质交织在一起，形成了坚硬的骨骼。
- **肌肉**：肌肉中大约含有2%左右的胶原，它沿着整个肌肉膜的长轴形成高度交联并具有拉伸强度的网状结构，将肌肉细胞和组织紧紧交织在一起。人或动物衰老时，可发现其胶原的交联度明显增加，溶解度显著降低，对细胞间液和肌肉蛋白产生较大的压力，使得肌肉的硬度增强，弹性变小，从而逐渐僵硬，表现出皮肤出现皱纹，这在面部和手上尤为敏感。



来源：文献检索

## 1.3 胶原蛋白的结构

### 胶原具有完整的四级空间结构<sup>[5]</sup>

胶原的生物学功能在很大程度上是由其空间结构确定的。不同类型的胶原生理功能不同，结构也不同。例如肌腱中的胶原是具有高度不对称结构的高强度蛋白，皮肤中的胶原则是松软的纤维，牙和骨骼中硬质部分的胶原含有钙磷多聚物，眼角膜中的胶原如水晶般透明。通常认为，只有具有三级以上的结构蛋白质才具有生理功能，而胶原具有完整的四级空间结构<sup>[6]</sup>。

- **一级结构**：也称化学结构，是指蛋白多肽链的氨基酸排列顺序，包括二硫键的位置。胶原分子中具有 $\alpha$ 链组成的三股螺旋构象区称为胶原结构域，胶原分子中至少应包含一个胶原结构域。大多数蛋白质的同一条多肽链中氨基酸一般不会有周期性的重复序列，但是胶原结构域中存在三肽序列“甘氨酸-X-Y”的重复，其中最常见的是“甘氨酸-脯氨酸-羟脯氨酸”序列，约占整个“甘氨酸-X-Y”序列的12%，“甘氨酸-脯氨酸-Y”或“甘氨酸-X-羟脯氨酸”序列约占44%，其他“甘氨酸-X-Y”序列构成剩余的44%。而这些重复三肽“甘氨酸-X-Y”的数量接近全部序列的1/3，对维持胶原的结构起重大作用。在肽链中，脯氨酸消除 $\phi$ 角度的自由旋转，却可以轻微增加 $\omega$ 角度的旋转，有助于增加链段刚性<sup>[7]</sup>。
- **二级结构**：蛋白质二级结构是指多肽主链骨架原子沿一定的轴盘旋或折叠而形成的特定的空间位置排布（如 $\alpha$ 螺旋、 $\beta$ 折叠、 $\beta$ 转角）或无规则的空间排布（如无规卷曲）。胶原的二级结构形成左手 $\alpha$ 螺旋结构，是由聚脯氨酸II（PP II结构）链经左手螺旋形成的特殊结构。每条PP II结构链每旋转一圈含3.3个氨基酸残基，每个氨基酸在螺旋轴上的投影为0.286 nm，螺距（螺旋每上升一圈的高度）为0.858 nm。三条PP II结构链可进一步组装成胶原三股螺旋结构。由于组成胶原 $\alpha$ 链的氨基酸中存在“甘氨酸-X-Y”重复序列，X位置上的脯氨酸和Y位置上的羟脯氨酸之间存在空间排斥力，成为螺旋结构形成的推动力，而胶原 $\alpha$ 链中氨基酸残基的酰胺氢原子和羰基氧原子之间形成的平行于螺旋轴的氢键，进一步稳定了其螺旋结构<sup>[8]</sup>。
- **三级结构**：在二级结构的基础上，肽链进一步盘绕、折叠，依靠次级键的维系固定所形成的特定空间结构称为蛋白质的三级结构，它描述了整个肽链（包括主侧链在内）的空间排布，揭示了蛋白质分子中肽链之间的次级键作用。而胶原的三级结构是其特征三股螺旋结构。在蛋白质早期研究中已发现胶原的构象不同于其他蛋白质。胶原的三股螺旋结构是由三条独立的、呈左手螺旋的聚脯氨酸II链围绕同一中心轴，彼此错位一个氨基酸残基，通过链与链之间形成的氢键相互连接缠绕后形成的一个右手超螺旋棒状结构。胶原三股螺旋结构中每三个氨基酸中含一个甘氨酸，任意一个甘氨酸突变都会对胶原三股螺旋结构造成破坏。氢键的形成是胶原三股螺旋结构保持稳定必不可少的因素。不同于 $\alpha$ 螺旋和 $\beta$ 折叠需要所有氨基酸都参与氢键形成，在三股螺旋结构中只有特定位置的氨基酸会参与形成氢键。胶原三股螺旋结构中形成的氢键主要是由其三条链中的一条 $\alpha$ 螺旋链中甘氨酸残基的NH与相邻两条 $\alpha$ 螺旋链中X位置氨基酸的CO之间形成的NH $\cdots$ CO氢键，同时处于Y位置上的羟脯氨酸的羟基也可参与形成链与链间的氢键，氢键的存在是三股螺旋能形成稳定结构的主要原因。三股螺旋结构中形成的氢键是垂直于其轴线的，而 $\alpha$ 螺旋链中形成的氢键一般平行于其轴线<sup>[9]</sup>。
- **四级结构**：是指分子更大的蛋白质，常由多条肽链组成，分子中每条肽链都盘曲成特定的三级结构，一般情况下单独存在时并无功能，被称为亚基（subunit），亚基之间再按特定的方式排列形成更高层次的具有立体结构的蛋白质分子，得到具有极短非三股螺旋区（称为端肽）的胶原分子。前胶原分子分泌到细胞外后，在特异性金属酶的作用下，切除位于三股螺旋两端的前肽，得到具有极短非三股螺旋区的胶原分子。胶原分子按规则平行排列成束，首尾错位1/4，通过共价键搭接交联，形成稳定的胶原微纤维，并进一步聚集成束，形成具有高度轴向排列特征的胶原纤维。以成纤维胶原为例，常规电子显微镜样品制备过程存在脱水 and 收缩，检测到胶原纤维具有约5~65 nm的周期性条纹，但在天然水合状态下会产生平均67 nm的周期性条纹。胶原分子通过分子内或分子间的作用力形成不溶性的纤维，故大多数胶原属于不溶性硬蛋白。

来源：文献检索

# 1.4 胶原蛋白的类型

## 目前已发现28种不同的胶原<sup>[10]</sup>

从遗传学到分子结构，胶原都是有不同类型的蛋白质家族。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。组成原胶原分子的每种α链都可以分为若干亚型，如α1(I)、α1(II)、α1(III)、α1(IV)、α1(V)、α2(I)、α2(IV)、α3(IV)等，每一条α链都有一种基因编码。从理论上讲，20多种α链可组成1000种以上的胶原，但到目前为止，还只发现了28种不同的胶原<sup>[11]</sup>，今后还有可能继续发现新的胶原类型。按照被发现的先后顺序分别称之为I型胶原、II型胶原和III型胶原，以此类推。

根据胶原蛋白的功能，可将胶原分为成纤维胶原和非成纤维胶原。成纤维胶原包括第 I、II、III、V、XI、XXIV和XXVII型胶原，非成纤维胶原可进一步分为6种：① FACIT族胶原（Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple helices），包括IX、XII、XIV、XVI、XIX、XX、XXI和XXII型胶原；② 网状结构胶原，包括IV、VIII和X型胶原；③ 念珠状原纤维胶原，包括VI型胶原；④ 锚定原纤维或纤维胶原，包括VII和XVII型胶原；⑤ 跨膜区胶原，包括XIII、XVII、XXIII和XXV型胶原；⑥ 内皮抑素相关胶原，包括XV和XVIII型胶原。

对人体来说，最常见胶原主要有四种形态：

- **胶原I型**：主要存在于成人皮肤和骨组织，数量最大
- **胶原II型**：主要存在于软骨组织
- **胶原III型**：主要存在于婴幼儿皮肤或血管、内膜、肠、胃器官
- **胶原IV型**：主要存在于各组织器官的基底膜、胎盘和晶状体

## 胶原的类型及其在组织中的分布(1/2)

	α链组成	类别	分子量α链/kDa	组织分布
<b>I型 (异源三聚体)</b>	[α1(I) <sub>2</sub> α2(I)]	成纤维胶原	95	皮肤、骨骼、肌腱、韧带、血管壁、牙齿等
<b>I型 (同源三聚体)</b>	[α1(I) <sub>3</sub> ]	成纤维胶原		肿瘤、胚胎等
<b>II型</b>	[α1(II) <sub>3</sub> ]	成纤维胶原	95	软骨、玻璃体、肌腱软骨区、椎间盘等
<b>III型</b>	[α1(III) <sub>3</sub> ]	成纤维胶原	95	皮肤、肺、肝、肠、血管等
<b>IV型</b>	[α1(IV) <sub>2</sub> α2(IV)α3(IV), α4(IV), α5(IV), α6(IV)]	网状结构胶原	170 ~ 180	基底膜
<b>V型</b>	[α1(V) <sub>2</sub> α2(V)[α1(V)α2(V)α3(V)]] [α1(V) <sub>3</sub> ]	成纤维胶原	120 ~ 145	骨骼、肌腱、角膜、皮肤、血管等
<b>VI型</b>	[α1(VI)α2(VI)α3(VI)]α4(VI), α5(VI), α6(VI)	珠状细丝胶原	140	真皮、骨骼肌、肺、血管、角膜、肌腱、皮肤、软骨、椎间盘、脂肪等
<b>VII型</b>	[α1(VII) <sub>3</sub> ]	锚定胶原	170	皮肤、直肠、结肠、小肠、食管、口腔黏膜等
<b>VIII型</b>	[α1(VIII) <sub>2</sub> α2(VIII)]	网状结构胶原	61	心脏、脑、肝、肺、肌肉、软骨等

来源：文献检索

胶原的类型及其在组织中的分布(1/2)

	$\alpha$ 链组成	类别	分子量 $\alpha$ 链/kDa	组织分布
<b>IX型</b>	[ $\alpha 1(\text{IX})\alpha 2(\text{IX})\alpha 3(\text{IX})$ ]	纤维相关胶原	68~115	软骨、脊柱、玻璃体等
<b>X型</b>	[ $\alpha 1(\text{X})_3$ ]	网状结构胶原	59	钙化软骨（包括肌腱部位）
<b>XI型</b>	[ $\alpha 1(\text{XI})\alpha 2(\text{XI})\alpha 3(\text{XI})$ ]	成纤维胶原	110~145	关节软骨、睾丸、气管、肌腱、骨小梁、骨骼肌、胎盘、肺、大脑等
<b>XII型</b>	[ $\alpha 1(\text{XII})_3$ ]	纤维相关胶原	220, 340	皮肤、肌腱、软骨等
<b>XIII型</b>	[ $\alpha 1(\text{XIII})_3$ ]	跨膜胶原	62 ~ 67	内皮细胞、表皮等
<b>XIV型</b>	[ $\alpha 1(\text{XIV})_3$ ]	纤维相关胶原	220	皮肤、肌腱、角膜、软骨等
<b>XV型</b>	[ $\alpha 1(\text{XV})_3$ ]	内皮抑制素相关胶原	125	微血管、心肌或骨骼肌细胞的基底膜区域
<b>XVI型</b>	[ $\alpha 1(\text{XVI})_3$ ]	纤维相关胶原	150 ~ 160	皮肤、软骨、心脏、肠、动脉壁、肾脏等
<b>XVII型</b>	[ $\alpha 1(\text{XVII})_3$ ]	跨膜胶原	180	皮肤、黏膜、眼睛等
<b>XVIII型</b>	[ $\alpha 1(\text{XVIII})_3$ ]	内皮抑制素相关胶原	200	肝脏、眼睛、肾脏等
<b>XIX型</b>	[ $\alpha 1(\text{XIX})_3$ ]	纤维相关胶原	165	乳腺、结肠、肾脏、肝脏、胎盘、前列腺、骨骼肌、皮肤、脾脏等
<b>XX型</b>	[ $\alpha 1(\text{XX})_3$ ]	纤维相关胶原	185,170, 135	角膜、血管
<b>XXI型</b>	[ $\alpha 1(\text{XXI})_3$ ]	纤维相关胶原		心脏、胎盘、胃、空肠、骨骼肌、肾脏、肺、胰腺、淋巴结
<b>XXII型</b>	[ $\alpha 1(\text{XXII})_3$ ]	纤维相关胶原	200	心脏、骨骼肌
<b>XXIII型</b>	[ $\alpha 1(\text{XXIII})_3$ ]	跨膜胶原		肺、角膜、皮肤、肌腱、羊膜
<b>XXIV型</b>	[ $\alpha 1(\text{XXIV})_3$ ]	成纤维胶原		骨骼、大脑、肌肉、肾脏、脾脏等
<b>XXV型</b>	[ $\alpha 1(\text{XXV})_3$ ]	跨膜胶原	50/100	脑、心脏、睾丸、眼睛等
<b>XXVI型</b>	[ $\alpha 1(\text{XXVI})_3$ ]	—	约80	卵巢、睾丸
<b>XXVII型</b>	[ $\alpha 1(\text{XXVII})_3$ ]	成纤维胶原		肥厚软骨
<b>XXVIII型</b>	[ $\alpha 1(\text{XXVIII})_3$ ]	—	约50	外周神经、颅盖、皮肤和郎飞节

来源：文献检索

# 第二章

## XVII型胶原蛋白简介



# 2.1 XVII型胶原蛋白的发现和命名

## XVII型胶原蛋白又名COL17 / BP180 / BPAG2

XVII型胶原蛋白 (Collagen XVII, 17型胶原蛋白), 又称为COL17 / BP180 / BPAG2, 是一种跨膜蛋白, 在维持表皮黏附所涉及的细胞内和细胞外结构元素之间的联系方面发挥着至关重要的作用。

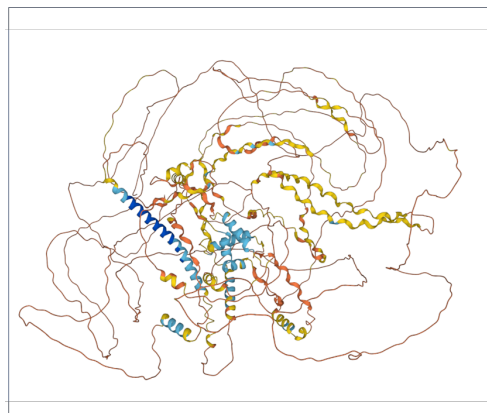
COL17最初是由Diaz等人于1980年代在大疱性类天疱疮 (Bullous Pemphigoid, BP) 中发现的。半个多世纪前, 研究人员开始表征包括皮肤在内的组织的超微结构。电子显微镜 (Electron Microscope, EM) 显示真皮-表皮交界处 (dermal-epidermal junction, DEJ) 和皮肤基底膜区 (basement membrane zone, BMZ) 具有多种结构成分, 包括: 半桥粒 (Hemidesmosome, HD)、透明层 (Lamina lucida)、致密层 (Lamina densa) 和锚定原纤维 (Anchoring fibrils)。在1960年代和70年代开发了免疫荧光技术, 用来揭示免疫球蛋白在人体组织和循环系统中的沉积, 检测出了许多靶向器官的自身抗体。1980年代使用BP患者的血清对人表皮提取物进行的蛋白质印迹分析发现, 存在两种BP自身抗原: 230 kDa 蛋白 (BP230或BP 抗原1, 也称为BPAG1) 和180 kDa蛋白 (BP180或BP抗原2, 也称为BPAG2)。BPAG的是大疱性类天疱疮 (BP) 的抗原的简称, AG是抗原Antigen的缩写<sup>[12][13]</sup>。在1990年代初期, 分子克隆技术确定了BP230和BP180的氨基酸序列<sup>[14]</sup>。随后, 由于BP180检测到由重复的三联“甘氨酸-X-Y”组成的几个胶原区域, BP180被重新标记为XVII型胶原蛋白<sup>[15]</sup>。目前已经证实COL17是BP患者IgG、IgA和 IgE自身抗体靶向的主要自身抗原。下图展示了XVII型胶原蛋白的氨基酸序列<sup>[16]</sup>和AlphaFoldDB数据库给出蛋白三维结构。

COL17A1是该基因的官方名称。COL17A1基因固定位于人第10染色体长臂的10q25.1位点, 其mRNA约6 kb。cDNA序列分析表明, COL17A1有一单一的编码区长4596 bp, 肽链全长为1532个氨基酸。它编码 XVII 型胶原蛋白的alpha链 (α链)。XVII型胶原蛋白是一种跨膜蛋白, 与XIII、XXIII 和 XXV 型胶原蛋白类似。XVII型胶原蛋白是半桥粒 (Hemidesmosome, HD) 的结构成分, 半桥粒是基底细胞与下方基底膜带之间的主要连接结构, 系由角质形成细胞真皮侧胞膜的不规则突起与基底膜带相互嵌合而成。半桥粒有使细胞固着于基膜的作用, 主要功能是加强细胞间的连接。COL17A1基因突变与全身性萎缩性良性角膜病和交界性表皮松解症以及复发性角膜糜烂有关<sup>[18]</sup>, 在多种癌症中COL17A1基因的表达也呈现异常<sup>[19]</sup>。

XVII型胶原蛋白的序列

Length: 1,497	Last updated: 2007-05-01 v3
Mass (Da): 150,419	Checksum: E0102700593AEB4
MDVTKKRRD GTEVTERDVT ETVTTLRLTL PPKGOSTSND RLEKQGLR 766 776 786 796 806 816 826 836 846 856 866 876 886 896 906 916 926 936 946 956 966 976 986 996	SSGVYINSTGS TRGHMSTSV RRHMSFASLT PHSFSPYFER
KTHVTRHVE GSSSNGSPF YPRLKFASS TRGKSTRES EIRVRLQAS PSTRNTELD VKRLKGGAS AVSVPTNDS NTLPSFAGDT VETKVFAGS	
QSVSTYSLD ILDANLSDQ MSSTLRASLQ WHTYHNSDQL QSSSLFALG VSASSVDFG NNMASCDFTC HPSLTSSEDP FQKQNLSDQ LTLTSLHSTP	
TSTAVDHRN HPGKPAAVNT QVSTSACTT SVQGLDLN DCKFLILEQ NTRAKKRNEL LMTKDSGV 730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900 910 920 930 940 950 960 970 980 990	PTASGASIAA TFSFSDTLK EQQAIVNDS
GLIABANDL KTVSTGRTT TADSHVSSS GGGSSGSSSS VGGASDQAP PAFPKMGLS CCSMANKLG LLLTLLLLG LLFGLTALR EVKLLKAFDD	
ELEIRERLTL PVSDSHSDLE KDRLQKQANL AGADLNLSE HSDQQLKML FVRKLLKPLQ ENRLEGRSFA PKGSDMSDFG KGDGKFSPTP QECPLODMS	
PQGNKQKSS VSDMRESPH QKQKREKRS PRGKASPPS GKKVBERGLS EPGKHPDVL PDSVDPKSS GSPGKDFPS PVQLQLRGE VQLPVDKDD	
GHMPPKPKG QDREKSPKEL TQESHKSLP GAVKSPKQD ANKSPKQDM QPFRKQGLT 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900 910 920 930 940 950 960 970 980 990	TPQSPKPLK QTPKRPKSLG
EPKADPLIV SEGSMLTDP GPPGPPGALN PPGPPSPAPQ AGPAQLGKQ EVLALQKPPS PPGPRFPDP SIPGPPKFRS PQQELKLPF GPPSFLDMS	
ETFLSDPFD PGPSPVPSQD GPPGPRKQD KQLPQFSTL GSSFLQLLQ GPPGPPKQD PKDKKQDVL PGLLISLSD SEGSSSTHY VSGPPKQDP	
PSPGSSLSS QREIQKSLR VYKQDSSEV LSGVQKPP PPGPPPTTT TRETFTQTEL ASHVVSLEAT SVGVDSVPS S1SSSEIQLA LQKDDVYV	
KYLYNRPDP PGPRAQSDS LLSLDYLIEL SKRLSYMS SG1SLQLPP PGPPLPYS YEELSLGLS SEFRGIVPP GPPGPPKQD NMGSSIVDS	
LSVYLHSDQ SFTEHPKSDP GPPGPRASDQ VSGALLTAL ENDSFSEET ISVLTDFQMS SFTEHPKSDP GPPGPPKQD LLSTDAKSD GSSSSSSD	
VRRSSSTSS HSTGGSSLE LGAQAFDEA AGSDRFTDTL DPGGOSTGAA AEGGKQMLL GLLGDFAED LDVLELVDL SEGMKQLL QRMVYQDP	
PQKPPKQPF GSKVSLVST VWTADLHDF QFVGLIQDFP QKQKSHDTG 1450 1460 1470 1480 1490 1496 1497	SHKELGKGL DQVYVAGRR RSLDKVP

XVII型胶原蛋白的蛋白三维结构



来源: 文献检索



## 2.2 XVII型胶原蛋白的结构

XVII型胶原蛋白是一种含有1497个氨基酸的跨膜蛋白，其N端位于细胞质中，C端位于细胞外基质中

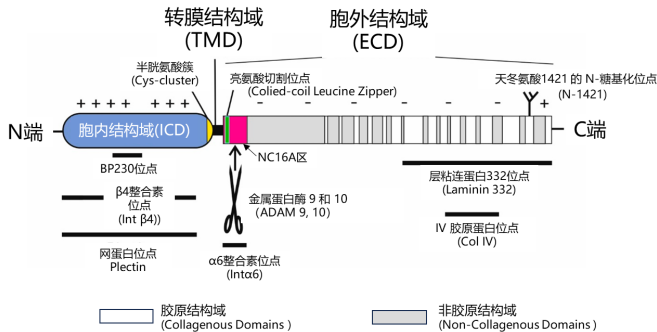
XVII型胶原蛋白是一种少见的II型跨膜蛋白，其最明显的结构特征是氨基末端（N末端）位于细胞内，由501个氨基酸组成，其中部含有4个由24~26个氨基酸组成的串联重复序列；羧基末端（C末端）为较长的细胞外肽链，与皮肤基底膜透明板的锚纤维连接。

通过蛋白序列分析COL17有以下结构特征。如下图所示，人类COL17（1497 aa，氨基酸amino acid，简称为aa）含有15个胶原结构域（下图所示白色区域），这些结构域位于胞外结构域（Extracellular domain, ECD; aa 489-1497），这种细胞外胶原结构域可能是其与细胞外基质成分相互作用从而稳定表皮与真皮联系的结构部位。同时，这些胶原结构域相互间被短的非胶原结构域（NC, non-collagenous domain; 也称Nonhelical region, 非螺旋结构域。下图所示灰色区域）隔开。

COL17的ECD胶原结构域含有重复的“甘氨酸-X-Y（glycine-X-Y）”三元组，其中X通常是脯氨酸，Y是羟脯氨酸。穿插的非胶原结构域从羧基末端（C末端）起分别称为NC1、NC2直至NC16。人类COL17最靠近氨基末端（N末端）的非螺旋结构域NC16，包含位置为aa 1-566的氨基酸。NC16由胞外并膜区（Extracellular juxtamembrane region; NC16A区，aa 489-566；下图所示粉红色区域）、跨膜结构域（Transmembrane domain, TMD; NC16B区，aa 468-488）和胞内结构域（Intracellular domain, ICD; NC16C, aa1-467）组成。值得说明的是，色氨酸467（Tryptophan 467）有时也被认为是跨膜结构域的一部分。胞内结构域（ICD）包含四个串联重复序列（aa 227-324）、一个甘氨酸束（aa 428-447）和一个半胱氨酸簇（Cys456、458、461和462）。早期的研究表明，COL17的ICDs可形成二硫桥三聚体<sup>[20]</sup>。

人类COL17是一种电荷极化非常强的蛋白质。它的胞内结构域（ICD）是碱性的（pI为9.5；Isoelectric point, 等电点，简称pI：碱性pI大于7，酸性pI小于7），而它的胞外结构域（ECD）（除了最远端的富含精氨酸的羧基末端外）是酸性的（pI为6.3）。如果没有NC1，人类COL17胞外结构域（ECD）的pI为5.7。人类COL17的36个氨基酸长的NC4结构域（aa 1280-1315）大多含有小的极性氨基酸（17个丝氨酸、2个苏氨酸和4个甘氨酸）。这一特性可能在蛋白质与蛋白质之间的相互作用中发挥作用，而且NC4结构域可能含有几个潜在的O-糖基化位点（O-glycosylation sites）。此外，该结构域所在区域常是大疱性类天疱疮（BP）的自身抗原（Antigen）<sup>[21]</sup>。

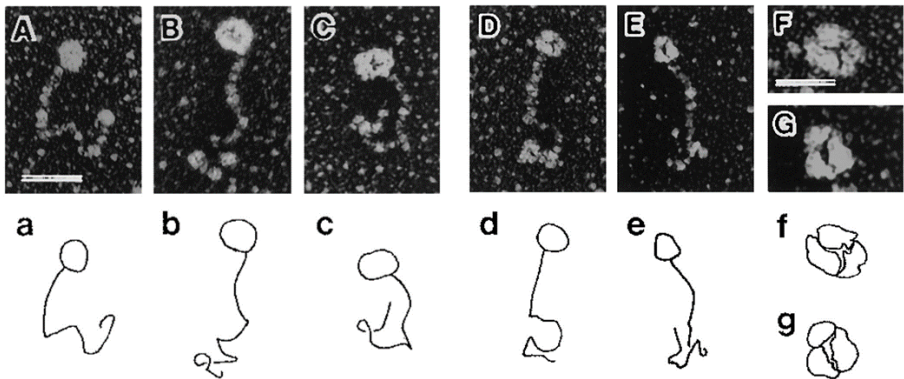
XVII型胶原蛋白的结构特征<sup>[22]</sup>



来源：文献检索

COL17的高级结构是三聚体，由胶原结构域的三螺旋组装驱动。与纤维型胶原不同，COL17缺乏羧基末端的前体肽。相反，其胶原三股螺旋是由非胶原结构域NC16A的亮氨酸拉链样序列之间的卷曲结构引导的。这种N末端三股螺旋的种子化是跨膜胶原家族的几个其他成员的典型特征，如XIII、XXIII和XXV胶原蛋白。免疫电子显微镜研究显示，在基底膜中，COL17的胞外结构域（ECD）穿过基底膜的透明层（Lamina lucida）进入致密层（Lamina densa），然后弯曲回透明层。旋转阴影电子显微镜成像也证明，其胞外结构域（ECD）具有杆状形态，而呈碱性的胞内结构域部分（ICD）则呈球状，如下图所示<sup>[23]</sup>。

#### XVII型胶原蛋白的三聚体结构形态<sup>[24]</sup>

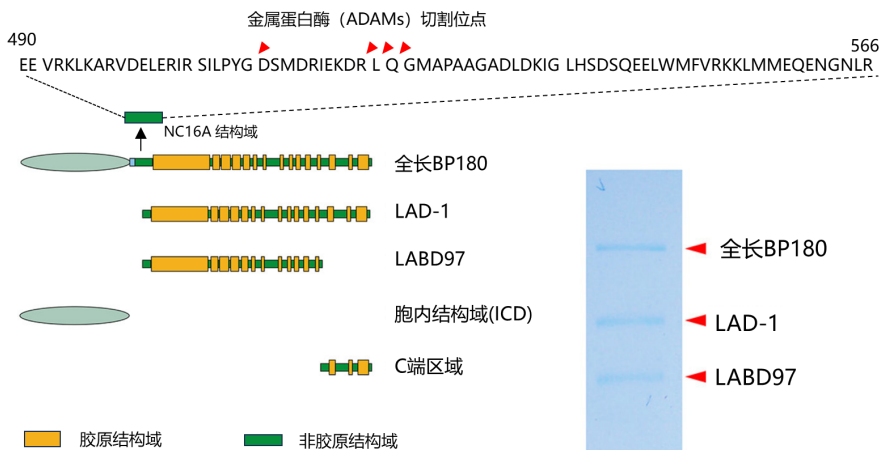


## 2.3 XVII型胶原蛋白的存在形态

XVII型胶原蛋白有三种大小的存在形态：全长180 kDa，剪切后的120 kDa（LAD-1）和97 kDa（LABD97）

- **全长180 kDa**：在大疱性类天疱疮（BP）患者血清中的自身抗体可识别两种形式的COL17：180 kDa 和 120 kDa，这两种形式的COL17都存在于皮肤中。角质细胞提取物中就含有这两种形式的COL17，而细胞培养基中只有120 kDa形式的 COL17。
- **剪切后的120 kDa**：120 kDa 的存在形态是通过A型去整合素（A disintegrin）和金属蛋白酶（Metalloprotease, ADAM）9和10以组成型和诱导型方式从全长COL17蛋白中切割得到的可溶性的COL17胞外结构。通过质谱分析，COL17被金属蛋白酶（ADAMs）切分的位点可以是 Gly513|Asp514、Arg523|Leu524、Leu524|Gln525 和 Gln525|Gly526。这些切割位点位于非胶原结构域NC16A上。其中Leu524|Gln525是主要的生理切割位点。尽管存在优势裂解位点，但金属蛋白酶（ADAMs）并不具有序列特异性，而是由蛋白的结构特征决定的。这个120 kDa的胞外结构域，也称为线性 IgA 皮肤病抗原（Linear IgA disease antigen 1, LAD-1）。
- **剪切后的97 kDa**：切割脱落的120 kDa胞外结构域可能会经过进一步加工。线状IgA大疱性皮肤病（Linear IgA bullous dermatosis, LABD）是一种丘疹性类风湿关节病，患者体内的IgA自身抗体可识别120 kDa的胞外结构域，并在纤溶酶（Plasmin）作用下，生成97 kDa片段，称为LABD97（Linear IgA bullous disease antigen of 97 kDa）。

XVII型胶原蛋白的三种存在形态



来源：文献检索

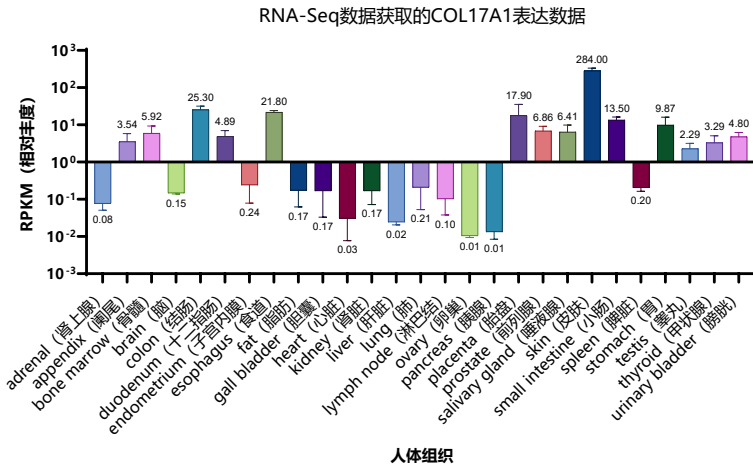
## 2.4 XVII型胶原蛋白的分布与功能

### XVII型胶原蛋白在多种组织中都有表达，其在皮肤中的表达量最高

如下图所示，通过测序获得了COL17A1基因在不同组织中的表达水平，包括在皮肤 (Skin)、结肠 (Colon)、食道 (Esophagus)、胎盘 (Placenta)、小肠 (Small intestine)、胃 (Stomach) 中等。COL17A1基因在不同组织中的表达呈现部位集中且分化严重的特点：在皮肤 (Skin) 中的表达处于绝对优势，占比接近70%，剩余其他占比约30%；排名第二的结肠 (Colon)、第三的食道 (Esophagus)、第四的胎盘 (Placenta) 均不足皮肤表达水平的十分之一<sup>[28]</sup>。

人们对COL17了解最清楚的是它在皮肤角质形成细胞 (Skin keratinocytes) 和其他分层上皮细胞的半桥粒 (HDs) 中的功能：在这些细胞中，COL17有助于细胞内角蛋白丝网络 (Intracellular keratin filament network) 与基底膜细胞外蛋白之间的连接，从而建立上皮细胞与下层基底膜之间的黏附性<sup>[30]</sup>。因此，COL17结构、功能和相互作用在皮肤的半桥粒 (HD) 中研究得最为清楚。

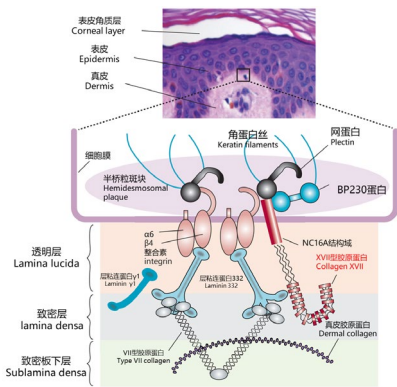
### COL17A1基因在不同组织中的表达水平<sup>[29]</sup>



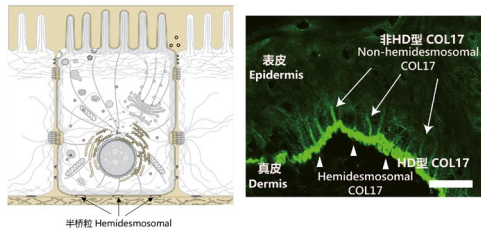
如左图所示。皮肤半桥粒 (HD) 在基底角质细胞 (底层核细胞和基底膜层) 之间形成黏附。在半桥粒 (HD) 中, COL17以三聚体形式存在, 细胞内结构域 (ICD) 通过网蛋白 (Plectin) 和蛋白BP230 (BP230, 另外一种大疱性类天疱疮 (BP) 的抗原, 也被叫做BPAG2。) 与角蛋白中间丝 (keratin intermediate filaments, 简称 IF, 亦称微纤维microfibrils) 结合。COL17的胞外结构域 (ECD) 与整合素 $\alpha 6$  (Integrin alpha 6,  $\alpha 6$ )、层粘连蛋白332 (Laminin-332) 和IV型胶原蛋白 (Collagen IV) 结合, 它们将半桥粒 (HD) 与基底层的VII型胶原蛋白的固定纤维连接起来, 以确保整个上层细胞与基座能够牢牢地固定在一起<sup>[32]</sup>。COL17除了在皮肤的半桥粒 (HD) 中存在, 已有研究证实COL17还存在于基底角质细胞之间的细胞间隙<sup>[33]</sup>, 如右图所示。这些存在于细胞间隙的COL17称为非半桥粒 (Non-hemidesmosomal Collagen XVII) 型, 在半桥粒 (HD) 中发挥作用的COL17称为半桥粒 (Hemidesmosomal Collagen XVII) 型。

COL17在皮肤上皮细胞和其他分层上皮细胞, 如口腔粘膜 (Oral mucosa)、角膜 (Cornea)、宫颈 (Cervix) 和阴道 (Vagina) 中表达较为丰富。胎盘 (Placenta) 的鳞状上皮细胞 (Squamous epithelia cell)、合胞细胞和细胞增殖细胞中 (Syncytial and Cytotrophoplactic cell) 也有大量的COL17。口腔中的COL17在牙釉质形成中是必需的。COL17在乳腺和肠道上皮有较低水平的表达。在层状上皮 (Layered epithelia) 中, COL17主要在基底细胞 (Basal cells) 中表达。在皮肤中, 它既存在于毛囊中又存在于间质表皮中。除了半桥粒型表达外, 非半桥粒型COL17还存在于基底角质细胞的可溶性膜的顶侧表面上<sup>[34]</sup>。虽然已经对半桥粒型COL17的表达和功能有了很好的研究, 非半桥粒型COL17的功能以及非上皮组织中的功能相对未知。

XVII型胶原蛋白在皮肤的半桥粒 (HD) 的分布<sup>[31]</sup>



XVII型胶原蛋白的非半桥粒 (Non-HD) 存在<sup>[35]</sup>



## 2.5 XVII型胶原蛋白相互作用

### COL17可与表皮基底角质细胞中的半脂质蛋白和细胞外基质（ECM）蛋白相互作用

由于COL17的N末端定位在表皮基底角质细胞的细胞质中，而其胶原结构域存在于细胞外空间，因此COL17可与表皮基底角质细胞中的半脂质蛋白和细胞外基质（ECM）蛋白<sup>[36]</sup>相互作用。

在皮肤中，COL17与其他半桥粒（HD）成分之间的蛋白质相互作用非常明显（可参见2.2和2.4部分），半桥粒（HD）将细胞骨架中间丝束（Cytoskeletal intermediate filament bundles）固定在基底膜（Basement membrane）上。单个角蛋白丝由两个与半桥粒（HD）相关的斑块（Plakin）家族蛋白：网蛋白（Plectin）和BP230结合。超分辨率显微镜显示，核心HD跨膜蛋白整合素 $\alpha 6\beta 4$ 异质二聚体（integrin  $\alpha 6\beta 4$  heterodimers）和COL17三聚体位于角蛋白-网蛋白/BP230蛋白（keratin-plectin/BP230）接触点周围。重要的是，COL17的胞内结构域（ICD）是整合素 $\beta 4$ 与BP230正常连接所必需的。

利用酵母双杂交筛选技术绘制了COL17的胞内结构域（ICD）与角蛋白K18（keratin K18）、网蛋白（Plectin）、BP230以及整合素 $\beta 4$ 的细胞膜结构域之间的蛋白质相互作用图<sup>[37][38]</sup>。角蛋白K18和BP230相互作用所必需的COL17区域（aa 13-89和145-230）的pI分别为10.3和10.0，而角蛋白K18的相互作用部分（aa 332-429）的pI为4.8，BP230（aa 1-555）的pI为5.4。同样，与COL17带正电的胞内结构域（ICD）相互作用的整合素 $\beta 4$ 的纤连蛋白结构域III（aa 1530-1625）是微酸性的，pI为6.2，而网蛋白（Plectin）相互作用区域（aa 563-819）接近中性（pI 6.7）。此外，酸性调节蛋白14-3-3 $\sigma$ 与COL17的胞内结构域（ICD）结合。因此，与阴离子蛋白和质膜带负电的胞质小叶的静电相互作用很可能调节了COL17胞内结构域（ICD）的折叠和展开，从而促进了半桥粒（HD）的组装/解体<sup>[39]</sup>。

COL17胞外结构域（ECD）直接与整合素 $\alpha 6$ 、层粘连蛋白332和胶原蛋白IV结合，这些相互作用介导角质形成细胞与基底基质的黏附，并与胞外结构域（ECD）脱落一起调节角质形成细胞的迁移。在BP病例中，针对COL17的自身抗体会破坏这些相互作用。除了COL17A1基因突变导致翻译产物截短和COL17多肽几乎完全缺失外，在交界性大疱性表皮松解症（Junctional epidermolysis bullosa, JEB）患者中还发现了影响COL17与基底膜成分之间蛋白质相互作用的突变。例如，富含丝氨酸的NC4结构域中出现Arg1303Gln突变不会影响蛋白质的稳定性，但会破坏COL17与层粘连蛋白332的结合。这些例子说明了COL17A1基因突变是可以转变为半桥粒（HD）黏附缺陷的。同样，强有力的体外证据表明，阻断COL17与胶原蛋白IV相互作用的自身抗体可破坏细胞基质的相互作用<sup>[40]</sup>。

此外，还有研究显示COL17与周斑蛋白（Periplakin）、DFNB31、CSTF2T、PPLIL1、PLOD3、CDH1、PNKP、HRAS、SPDL1、EGFR和ubiquilin2可能结合或具有相互作用，这些相互作用组可能参与了COL17的生物合成、运输和翻译后修饰或其非半桥粒型的功能。这些相互作用信息可以通过BioGRID相互作用数据库进行详细查询<sup>[41]</sup>。

## 2.6 XVII型胶原蛋白与信号通路的联系

### XVII型胶原蛋白与体内多种信号通路调节有关

#### 2.6.1 TGF- $\beta$

TGF- $\beta$  (Transforming growth factor- $\beta$ , 转化生长因子 $\beta$ ) 是一种细胞因子, 可调节许多器官的细胞增殖和分化。TGF- $\beta$  通路与COL17 相关的毛囊干细胞 (Hair follicle stem cell, HFSC) 维持有关<sup>[42]</sup>, 因为在 Col17a1-/- 小鼠中 TGF- $\beta$  信号下调, TGF- $\beta$  受体无效小鼠出现灰发, 与 Col17a1-/- 小鼠类似。这与 Col17a1-/- IFE (IFE: 滤泡间表皮) 形成了鲜明对比, 后者的 TGF- $\beta$  信号没有明显改变<sup>[43]</sup>。

#### 2.6.2 Wnt

Wnt通路在细胞增殖、分化和迁移中发挥着积极作用, 主要在组织形态发生过程中调节发育和干细胞 (Stem cell, SC) 的命运。新生 Col17a1-/- 小鼠IFE的基因表达谱显示了COL17与Wnt信号的关系, Wnt相关基因的表达发生了变化。K14- $\Delta$ NLef 小鼠 (其中显性阴性 LEF1可抑制Wnt信号传导) 和接受Wnt拮抗剂治疗的小鼠的新生儿 IFE表现出过度增殖, 与Col17a1-/-表型一致。实验进一步证实, COL17 的存在增强了体外的Wnt活性<sup>[44]</sup>, 而 COL17A1 基因缺失则降低了其在体内IFE中的活性。利用过表达人COL17A1来转基因拯救新生Col17a1-/-小鼠, 可恢复Wnt相关基因的表达以及基底表皮角质细胞中LEF1和细胞核中 $\beta$ -catenin 等标记基因的表达<sup>[45]</sup>。

#### 2.6.3 STAT3

STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3, 转录信号传导和激活因子3) 是一种转录因子, 稳态时位于细胞质中, 被 JAK (Janus kinase) 磷酸化后转入细胞核。STAT3在细胞核中起转录激活剂的作用, 有助于调节细胞生长和凋亡。STAT3 在 Ser727处的磷酸化已被证明可介导球形富集肿瘤初始细胞 (Tumor-initiating cells, TICs) 的存活能力。基因表达筛选发现COL17 是 Ser727 磷酸化STAT3的靶点, 对维持TIC的存活至关重要<sup>[46]</sup>。这些结果与COL17 表达与结直肠癌较高肿瘤分期之间的相关性一致, 而COL17是否与表皮中的STAT3相关尚不清楚。

#### 2.6.4 Hippo

Hippo信号通路调节细胞增殖和凋亡, 从而决定器官大小, 并参与细胞接触抑制。Hippo激活会使该通路的关键转录共激活因子YAP1/TAZ磷酸化, 并将其保留在细胞质中。当YAP1/TAZ去磷酸化后, 它们进入细胞核, 与转录因子相互作用, 促进细胞增殖, 抑制细胞凋亡。有报道称, YAP与COL17A1基因的启动子结合, 同时形成 YAP和NKX2.1复合物 (一种肺特异性转录因子), 可下调肺上皮细胞中COL17A1基因的表达水平<sup>[47]</sup>。然而, YAP易位到细胞核时的COL17A1下调是肺组织特有的, 在表皮角质形成细胞中没有观察到<sup>[48]</sup>。这种差异目前可以用NKX2.1在肺组织中的优先表达来解释。

#### 2.6.5 Rac1和p38MAPK

细胞迁移时需要改变其形态, 例如具有前缘和后缘 (Leading and trailing edges)。板状伪足 (Lamellipodium) 是前缘的片状延伸, 它的形成需要肌动蛋白细胞骨架的重新排列。Rac1 (RAS-related C3 botulinus toxin substrate 1, RAS相关的C3肉毒毒素底物1) 是Rho家族的一种小GTP酶, 能调节板状伪足基质的形成。在人类表皮角质细胞中敲除COL17A1基因可降低Rac活性以及板状伪足的持久性和延伸距离<sup>[49]</sup>。由于Rac参与p38MAPK通路的调控, 这些结果与 COL17A1基因敲除后HaCaT细胞p38MAPK活性受损情况一致<sup>[50]</sup>。

#### 2.6.6 p53

p53是众所周知的肿瘤抑制因子, 其功能障碍会导致侵袭性肿瘤表型 (Aggressive tumor phenotypes)。在乳腺上皮癌细胞系中对p53 靶点的筛选发现COL17是p53的一个新的直接靶点<sup>[51]</sup>。p53 与 COL17A1启动子结合以调控其基因表达, COL17表达下调与乳腺癌预后不良相关, 这与p53功能障碍相一致。

来源: 文献检索

## 第三章

# XVII型胶原蛋白同 健康与疾病之间的联系

- XVII型胶原蛋白与疾病
- XVII型胶原蛋白是维持皮肤稳态抗衰老的关键因子
- XVII型胶原蛋白是伤口修复的调节因子





# 3.1 XVII型胶原蛋白在自身免疫系统中的作用

如前所述，XVII型胶原蛋白（BP180）与大疱性类天疱疮（Bullous pemphigoid, BP）的研究有着紧密的联系，而BP是迄今为止最常见的自身免疫性大疱性皮肤病。COL17是一种跨膜糖蛋白，在BP中有高度免疫优势。COL17的结构和位置表明它是一个重要的自身抗原，对水泡形成起关键作用<sup>[52]</sup>。因此这部分主要介绍COL17在BP患者自身免疫中的至关重要性。

BP由针对真皮-表皮交界处（DEJ）结构成分的自身抗体诱发。大多数情况下，该疾病是隐匿发展的。可能的BP病因包括砒肺病、补骨脂素和紫外线A治疗（Psoralen and ultraviolet A therapy）、感染、物理或化学损伤。然而，这些因素在BP发病机制中的作用仍有待确定。BP主要影响老年人群，但也可能影响婴儿、儿童和青少年。该疾病主要涉及皮肤，但偶尔也会涉及眼睛、口腔和生殖器。

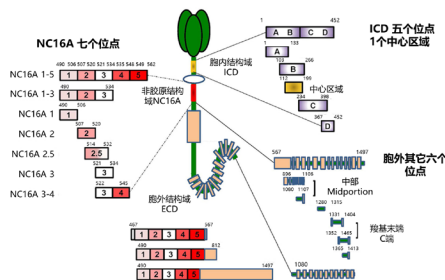
BP的皮肤表现是多态性的，可分为3类：① 经典BP、② 非大疱性皮肤类天疱疮（non-bullous cutaneous pemphigoid）、③ 各种罕见变异型<sup>[53]</sup>。典型BP的临床特征是在红斑、荨麻疹或湿疹皮损上，甚至表现为在正常的皮肤上出现大的（1-3厘米）张力性浆液性或出血性水泡。活检的皮损表现为表皮下分裂或水泡，伴有真皮层有嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、中性粒细胞、淋巴细胞和肥大细胞的密集炎症浸润。诊断BP需要进行免疫荧光分析。直接免疫荧光是诊断BP最灵敏的方法，病变部位会出现免疫球蛋白G（IgG）、C3补体甚至IgE在DEJ处的线性沉积。使用患者血清和底物（尤其是盐分皮肤）进行间接免疫荧光可发现IgG沿人工裂隙的顶端线性沉积。

BP的一个典型血清学特征是存在循环自身抗体，主要针对COL17（BP180）和BP230。最近，越来越多的证据表明，对XVII型胶原蛋白的自身免疫反应对于BP的发生和演变非常重要<sup>[54]</sup>。

## 3.1.1 XVII型胶原蛋白的表位（Epitope）图谱

XVII型胶原蛋白（COL17）的抗原决定部位（称为表位，Epitope）如下图所示。以往的研究主要集中在COL17胞外 NC16A 结构域（aa 490-562），该结构域是BP自身抗体的主要靶点。NC16A 结构域有七个抗原位点，包括 NC16A1、NC16A1-3、NC16A1-5、NC16A2、NC16A2.5、NC16A3 和 NC16A3-4。在这些位点中，NC16A2 和 NC16A2.5 是主要的抗原位点，可被所有 IgG 和 IgE 抗体靶向。

XVII型胶原蛋白的表位（Epitope）图谱<sup>[56]</sup>



来源：文献检索

### 3.1.1 XVII型胶原蛋白的表位 (Epitope) 图谱 (续)

研究还发现了COL17的其他自身抗体结合结构域，如胞内结构域 (ICD) 和胞外结构域 (ECD)。胞内结构域 (ICD) (aa 1-452) 有五个靶点，即 ICD A、ICD B、ICD C、ICD D 和 ICD A-D，以及一个中心区域 (aa 112-199)。关于胞外结构域 (ECD)，据报道，7.8%—47%的BP血清能识别胞外结构域的C末端区域。进一步研究确定了患者血清识别的NC16A以外的六个区域：aa 809-1106、aa 1080-1107、aa 1280-1315、aa 1331-1404、aa 1365-1413和aa 1048-1465。aa 809-1106和aa 1080-1107位于中段，而aa 1331-1404和aa 1365-1413位于C末端。也有研究发现了包含一个以上的结构域的其他表位，如 aa 467-567、aa 490-812和aa 490-1497。有学者认为，表位识别的模式可能会影响疾病的进程。因此，识别COL17中的靶向区域对了解BP的起病和临床特征具有重要意义<sup>[55]</sup>。

### 3.1.2 XVII型胶原蛋白与BP的病因

BP的病因复杂，但自身抗体的存在被广泛认为是该病的必要条件。健康人体内也存在抗COL17 (BP180) 自身抗体，但这些抗体在对象上与致病抗体不同；然而，只有与皮肤基底膜结合的抗体才能诱发BP，这表明健康人体内的自身抗体本身可能并非病态。自身抗体可能承担监视和自我耐受的功能。在病理情况下，自身抗体的自我耐受功能失调，从而导致产生更高水平的自身抗体，与皮肤基底膜结合，引起BP的发生。BP的发生表明，自身抗体的产生存在一个阈值或检查点。目前仍不清楚为什么某些人对COL17的免疫耐受会失调。先前的研究表明，CD4+ CD25+ Foxp3+调节性T (Treg) 细胞在维持自身耐受性和抑制过量产生对宿主有害的自身抗体方面发挥着不可或缺的作用。

由HLA-BQB1\*0301、CYP2D6、MT-ATP8等原有遗传因子变异引发的BP中，CD4+ CD25+ Foxp3+ Treg 细胞的减少会导致自身耐受性的破坏，继而导致自身反应性Th2、Th1 和 B 细胞的增加，这些细胞可通过表位扩散识别COL17的不同结构域，产生不同的自身抗体。病原体可以通过与Toll样受体结合使B细胞变得敏感，从而加剧这一过程。自身反应性T细胞可以通过CD40L-CD40、B细胞激活因子-跨膜激活剂和CAML相互作用物(TACI)/B细胞成熟抗原以及增殖诱导配体-TACI的组合与自身反应性B细胞相互作用，以进一步打破外周耐受并诱导 Ig 产生和类别转换。此外，靶向 COL17胞外结构域氨基末端部分的T和B细胞的反应性与严重BP相关，而靶向COL17中心部分的T和B细胞的串扰在局限性BP中更常见。

XVII型胶原蛋白的编码基因COL17A1基因突变可导致某些形式的交界性大疱性表皮松懈症 (Junctional epidermolysis bullosa, JEB) 和一种罕见的单纯性表皮松懈症亚型 (Epidermolysis bullosa simplex, EBS)。同时，5 种获得性水疱病：大疱性类天疱疮 (BP)、妊娠疱疹 (Herpes gestationis, HG)、瘢痕性类天疱疮 (Cicatricial pemphigoid, CP)、线性IgA大疱性皮病 (Linear IgA bullous dermatosis, LABD) 和扁平苔藓类天疱疮 (Lichen planus pemphigoides, LPP) 与 COL17的自身免疫反应有关。体内和体外疾病模型系统已明确证实，针对 COL17胞外结构域特定位点的自身抗体具有致病性<sup>[57]</sup>。下图总结了COL17与一些免疫类疾病的关系。

#### XVII型胶原蛋白与疾病的关系

	疾病	分子缺陷
遗传性大疱性皮肤病	<ul style="list-style-type: none"><li>• 中间交界性大疱性表皮松懈症</li><li>• 单纯性表皮松懈症亚型</li></ul>	基因COL17A1 多个位点的隐性错义和无义突变
自身免疫性皮肤病	<ul style="list-style-type: none"><li>• 大疱性类天疱疮</li><li>• 黏膜丘疹性荨麻疹</li><li>• 妊娠丘疹性荨麻疹</li><li>• 线性IgA大疱性皮肤病</li></ul>	针对COL17的 NC16A 免疫优势结构域以及位于 ICD、Col15 结构域和 C 端的其他表位的 IgG、IgE、IgA 自身抗体

来源：文献检索

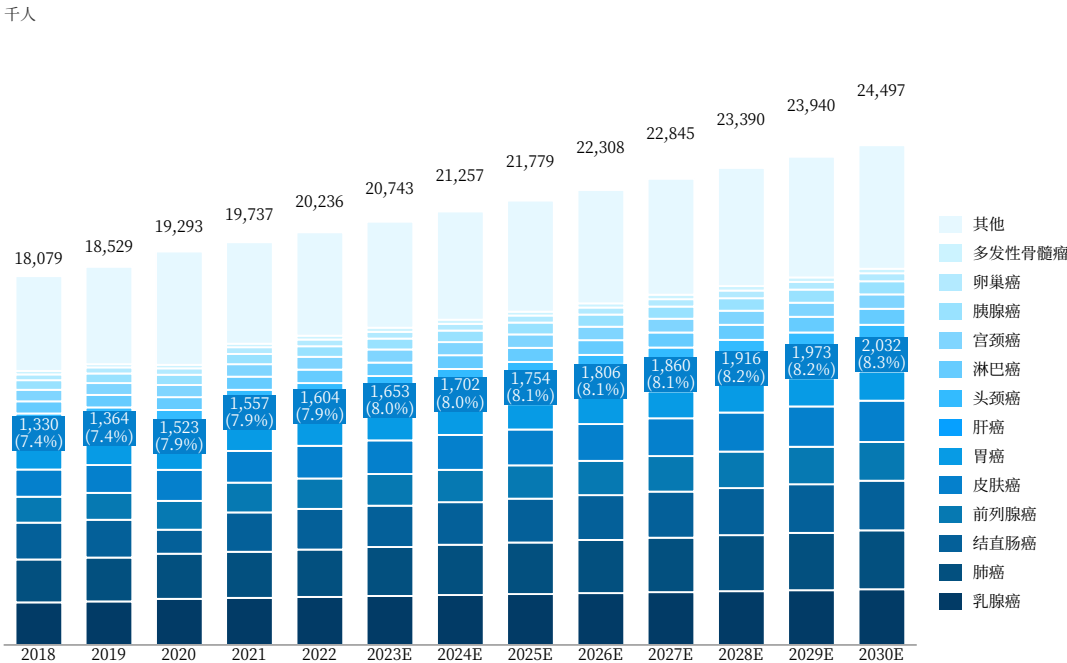
## 3.2 XVII型胶原蛋白与癌症

癌症的恶性转化是根据其侵入正常组织的能力来定义的。作为胞外基质（Extracellular matrix, ECM）的重要组成部分，XVII型胶原蛋白在形成细胞浸润屏障方面发挥着重要作用。除了作为细胞基质黏附分子的功能外，COL17在癌症生物学中的作用也成为研究热点。COL17表达和调节的改变及其对信号级联的影响表明了其在肿瘤发展和侵袭中的作用<sup>[58]</sup>。

### 3.2.1 XVII型胶原蛋白与皮肤癌的关系

全球癌症年新增病例数从2018年的1,808万增加到2022年的2,024万。预计到2025年全球癌症新发病例数将增至2,178万，到2030年全球癌症新发病例数预计达到2,450万。全球癌症新发病例数整体呈上升趋势，癌症新发病例数将逐年增加。以2022年新发病例数计，在各类高发率的癌种当中，皮肤癌新增病例数位居第四，占全球癌症新发病例数的8.0%。全球皮肤癌新发病例数从2018年1,330万增长到2022年1,604万。预计到2025年全球皮肤癌新发病例数将增长至1,754万，到2030年全球皮肤癌新发病例数预计达到2,032万。

全球癌症新发病例数，2018-2030E



来源：文献检索、National Cancer Registry (NCCR)、International Agency for Research on Cancer (IARC)、沙利文分析

### 3.2.1 XVII型胶原蛋白与皮肤癌的关系(续)

#### 鳞状细胞癌 (Squamous cell carcinoma, SCC)

在正常表皮中，随着角质形成细胞向上迁移和分化，COL17的表达会停止。而SCC的细胞则表现出COL17的过度表达，表明已发生去分化。免疫组化分析显示，在原发性SCC肿瘤和相关转移瘤中，COL17胞外结构域的免疫反应更强。在光化性角化病和原位SCC的非典型角朊细胞中也有类似发现。病毒介导的RNA干扰敲除COL17和/或 $\beta 4$ 会破坏侵袭性较低的SCC细胞的迁移和侵袭<sup>[59]</sup>。

COL17的不正常表达在头颈部鳞状细胞癌中也得到广泛关注，尤其是源自口腔和喉部的鳞状细胞癌。一份舌SCC样本中，COL17和层粘连蛋白332 (Laminin 332) 被发现共定位在向周围组织突出的侵袭性肿瘤前边缘，COL17的蛋白水解脱落可以影响HSC-3细胞的转移，进而可以增强其作为趋化因子的功能<sup>[60]</sup>。

在转录水平上，通过逆转录酶聚合酶链反应 (RT-PCR)，在表皮水平和上皮组织内发现浸润性肿瘤中COL17A1基因的mRNA过表达。RT-PCR和RNA杂交 (Northern hybridization) 证实了COL17在SCC中的表达增强。口腔角质细胞受到肿瘤促进剂光甘油酯的刺激后，COL17A1基因的mRNA的表达增加了1.5倍<sup>[61]</sup>。

在SCC中，COL17蛋白的胞外结构域脱落与肿瘤侵袭性也有密切关系。为了研究这一作用，研究人员在SCC-25细胞中引入了一种不可脱落的COL17突变体，该突变体剪切位点的连接区域缺失。SCC-25细胞是用来评估SCC中聚集体大小的细胞。阻止COL17胞外结构域的脱落可使聚集体体积变小、形成集落并减少肿瘤细胞侵袭 (Matrigel invasion assays, 肿瘤细胞侵袭实验)，而COL17的重新表达则可恢复致瘤性<sup>[62]</sup>。

#### 基底细胞癌 (Basal Cell Carcinoma)

非放射性原位杂交显示，在实体基底细胞癌 (Basal Cell Carcinoma, BCC) 的基底角质形成细胞和浅表BCC的肿瘤岛中存在胶原蛋白基因COL17A1的mRNA，而在健康表皮的基底细胞中则不存在<sup>[63]</sup>。也有研究发现，免疫染色显示实性和角化性BCC的外周细胞以及浅表BCC中侵袭性肿瘤前边缘的基底角质形成细胞中COL17的表达降低。但后来的一项研究无法重复这一发现，因为除一些分散的梭形细胞 (Spindle cells) 外，基底细胞癌胰岛中的COL17免疫染色大部分呈阴性<sup>[64]</sup>。当然，COL17在BCC发展中确切作用还需要研究者们进一步的证实。

#### 神经嵴肿瘤 (Neural Crest Tumors)

在神经嵴起源细胞和增殖组织黑色素细胞 (Cells of neural crest origin and proliferating tissue melanocytes) 中发现了COL17的表达，但在良性黑色素细胞肿瘤中却没有发现<sup>[65]</sup>。所有亚型黑色素瘤 (Subtypes of melanoma) 均呈强阳性 (大量表达)，而痣样黑色素瘤中的痣细胞 (Nevus cells in nevoid melanoma) 则呈阴性，染色效果不明显。此外，COL17的免疫染色与黑色素瘤的侵袭表型和垂直Breslow厚度 (Breslow thickness: Breslow厚度指皮肤黑色素瘤的肿瘤厚度，是T分期的基本指标) 有统计学相关性。用针对COL17胞内结构域的aa 507-529序列特异性抗体体外处理黑色素瘤细胞 (Melanoma cells)，可促进细胞凋亡、减少肿瘤细胞增殖和细胞黏附。通过对黑色素瘤cDNA中的COL17A1基因进行测序，发现胞外结构域编码区存在多个点突变和阅读框内有缺失，这表明胞外结构域的缺失与翻译后降解有关。

在一项使用具有B16黑色素瘤细胞的皮肤特异性NC16A功能障碍小鼠的体内模型的研究中，证实了角质形成细胞的COL17对黑色素瘤发生具有调节作用<sup>[66]</sup>。与对照组相比，实验模型显示肿瘤体积和淋巴转移水平增加。COL17功能障碍会导致直接炎症，这在之前被认为是癌症的一个标志。COL17功能障碍还会通过趋化因子的流入进一步募集骨髓源性抑制细胞 (Myeloid derived suppressor cells, MDSC) <sup>[67]</sup>。通过特异性抗体治疗降低MDSC水平会导致肿瘤体积减小，并降低转移发展速度，这证明了COL17通过调节MDSC浸润在抑制肿瘤侵袭中发挥了作用。由于一些研究指出特别是在免疫治疗后，大疱性类天疱疮和黑色素瘤之间存在关联，因此二者可能存在潜在的相关相互作用<sup>[68][69]</sup>。

来源：文献检索

### 3.2.2 XVII型胶原蛋白与其他癌症的关系

除了鳞状细胞癌和其他皮肤癌之外，XVII型胶原蛋白的失调似乎也发生在许多其他癌症中、包括胰腺癌、结肠直肠癌、肺癌、唾液腺癌、宫颈癌、乳腺癌、鼻咽癌等。如下图所示，总结了XVII型胶原蛋白的表达与上述癌症发展的研究结果汇总，并在下文中重点介绍了胰腺癌、结肠直肠癌、肺癌与XVII型胶原蛋白的研究进展。

XVII型胶原蛋白与不同癌症的关系

	蛋白表达	mRNA表达
鳞状细胞癌 (Squamous cell carcinoma)	+	+
光线性角化病 (Actinic keratosis)	+	
黑色素瘤 (Melanoma)	+	
基底细胞癌 (Basal cell carcinoma)	+/-	+
胰腺癌 (Pancreatic carcinoma)	*	
甲状腺癌 (Thyroid cancer)	+	
结肠直肠癌 (Colorectal cancer)	↑	↑
肺癌 (Lung cancer)	↑	↑
鼻咽癌 (Nasopharyngeal cancer)		↓
唾液腺癌 (Salivary gland cancer)	—	—
宫颈癌 (Cervical cancer)	↑	
乳腺癌 (Breast cancer)	↓	

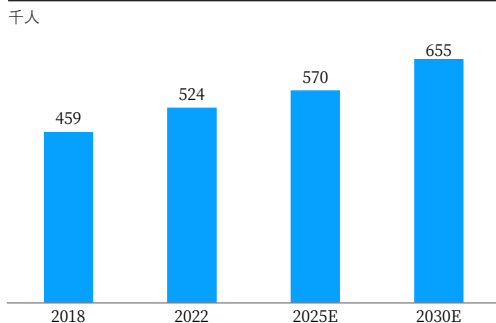
+ 代表表达；— 代表无表达；↑ 代表表达上调；↓ 代表表达下调；\* 代表剪切后的120 kDa (LAD-1) 为主要检测到的COL17蛋白形式

### 胰腺癌 (Pancreatic Cancer)

近年来，胰腺癌的发病率呈明显上升趋势，全球胰腺癌新发病例数从2018年45.9万增长到2022年52.4万。预计到2025年全球胰腺癌新发病例数将增长至57.0万，到2030年全球胰腺癌新发病例数预计达到65.5万。

免疫组化显像表明，成熟的I型半桥粒 (COL17+整合素 $\alpha 6\beta 4$ ; HD-1) 存在于人类胰腺导管上皮细胞 (Pancreatic ductal epithelium) 中，随后在胰腺癌发生过程中被分解<sup>[70]</sup>。HD-1分解的部分过程是磷酸肌酸3-激酶 (Phosphoinositide 3-kinase) 诱导基质金属蛋白酶9 (matrix-metalloprotease 9, MMP-9)，而MMP-9可裂解COL17，并使得整合素 $\alpha 6\beta 4$ 促进细胞迁移和侵袭。

全球胰腺癌新发病例数，2018-2030E



来源：文献检索、National Cancer Registry (NCCR)、International Agency for Research on Cancer (IARC)，沙利文分析

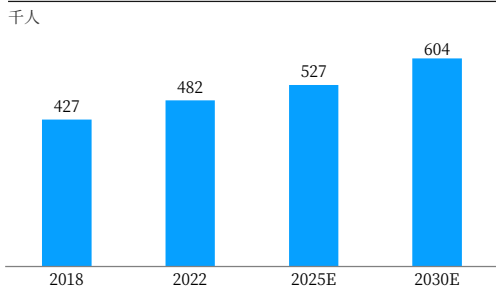
## 结直肠癌 (Colorectal Cancer)

COL17在结直肠癌 (Colorectal Cancer) 进展中的作用已得到广泛研究。在结直肠癌样本中发现全长COL17的过度表达和基因COL17A1的mRNA水平升高<sup>[71]</sup>。COL17的过度表达与较高的TNM分期相关 (TNM肿瘤分期: Tumor, Node, Metastasis (TNM) staging classification; TNM分期系统是国际上通用的肿瘤分期系统, 也是临床上对恶性肿瘤进行分期的标准方法。通常分期越高意味着肿瘤进展程度越高。), 并与浸润性生长模式、肿瘤出芽、转移和生存率降低相关。在体外, 鼠的COL17过度表达促进了结肠癌细胞通过Matrigel的侵袭性 (Matrigel invasion assays, 肿瘤细胞侵袭实验)。COL17A1基因表达是通过PP2A-S727STAT3介导的途径实现上调的<sup>[72]</sup>。在结直肠癌转移中抑制该信号通路可阻止悬浮存活、球体形成、肿瘤发生和转移, 从而加强了COL17作为结直肠癌患者重要预后因素的作用。

## 肺癌 (Lung Cancer)

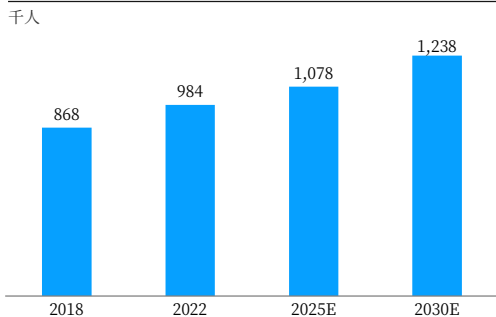
在肺癌样本的细胞中, 基质环境中COL17的表达升高, 并且与转移潜力增加相关<sup>[73]</sup>。微阵列分析揭示了球状培养物中COL17的上调和mRNA水平的升高, 证明了COL17在维持肺癌等干细胞间基质转化和转移能力中的重要性<sup>[74]</sup>。COL17脱落的胞外结构域可能具有稳定层粘连蛋白332 (laminin-332) 的功能, 进而导致FAK/AKT/GSK3 $\beta$ 信号通路的激活, 最终导致泛素降解过程的抑制, 从而促进表皮间质转变。此信号通路的阻断可以降低体内肺转移的转移潜力。在贴壁培养的A549肺腺癌细胞系中, 诱导COL17过度表达也得到了类似的结果。在这些细胞中, COL17-层粘连蛋白332 (laminin-332) 复合物通路诱导FAK/AKT/GSK3 $\beta$ / $\beta$ -catenin通路, 导致Oct4-HK2激活并诱导肺癌干细胞 (CSC, lung cancer stem cells) 样特征<sup>[75]</sup>。这些特征包括球体形成、多能性标记表达、致瘤潜能、转移以及对CSC存活和维持至关重要的CSC代谢过程的重编程。值得注意的是, COL17蛋白、Oct4和HK2的增加与较差的预后有关。另一项研究分析了支气管肺泡上皮细胞中同时缺乏Mob1A和Mob1B的小鼠的肺肿瘤发生情况, 肺腺癌是由支气管肺泡干细胞 (Bronchioalveolar stem cells, BASCs) 引起的。缺乏Mob1A/1B的成年小鼠肺上皮细胞中COL17A1基因的mRNA水平下降, 从而抑制了肿瘤的发生<sup>[76]</sup>。

全球结直肠癌新发病例数, 2018-2030E



全球结直肠癌新发病例数从2018年42.7万增长到2022年48.2万。预计到2025年全球结直肠癌新发病例数将增长至52.7万, 到2030年全球结直肠癌新发病例数预计达到65.5万。

全球肺癌新发病例数, 2018-2030E



全球肺癌新发病例数从2018年86.8万增长到2022年98.4万。预计到2025年全球肺癌新发病例数将增长至107.8万, 到2030年全球肺癌新发病例数预计达到123.8万。

来源: 文献检索、National Cancer Registry (NCCR)、International Agency for Research on Cancer (IARC)、沙利文分析

## 第三章

# XVII型胶原蛋白同 健康与疾病之间的联系

- XVII型胶原蛋白与疾病
- XVII型胶原蛋白是维持皮肤稳态抗衰老的关键因子
- XVII型胶原蛋白是伤口修复的调节因子



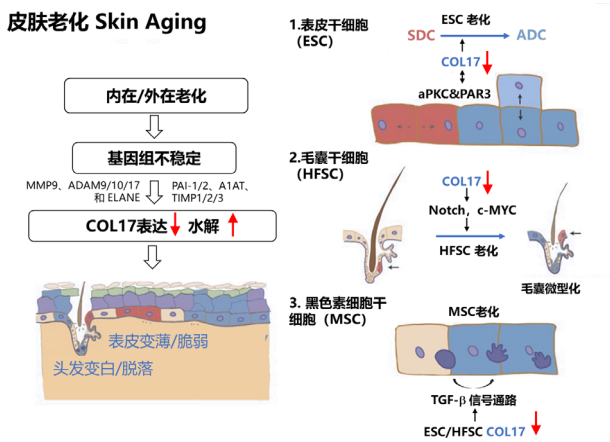
### 3.3 XVII型胶原蛋白是维持皮肤稳态抗衰老的关键因子

† 皮肤由表皮、真皮和皮下脂肪组织组成，并有毛囊、汗腺等附属物。在表皮中，角质形成细胞不断进行新陈代谢，而毛囊则进行周期性再生，并且在每个毛发周期中都会更新许多细胞。存在于皮肤组织中的干细胞是维持皮肤新陈代谢和稳态的关键要素。干细胞的自我更新和分化能力受其所处环境（生态位，Niche）的影响。对驻留干细胞的生态位研究表明跨膜胶原蛋白COL17介导干细胞与周围细胞和基质之间的相互作用，以调节皮肤稳态、衰老和伤口修复<sup>[77]</sup>。

随着年龄的增长，皮肤的结构和功能会发生深刻的变化，包括表皮和真皮变薄、真皮失去弹性和起皱、头发变白和脱落<sup>[78]</sup>。皮肤老化是由内在老化（也称为时间老化）或环境因素（如空气污染和紫外线）引起的外在老化诱发的<sup>[79]</sup>。损伤理论是一种广为接受的加速皮肤老化的机制，涉及DNA复制错误、活性氧、端粒侵蚀和染色体断裂造成的DNA损伤积累。基因组不稳定导致的组织衰退可以用细胞衰老或细胞凋亡来解释。然而，在衰老过程中，组织和器官中的组成细胞及其细胞命运的动态变化，以及衰老或受损细胞是积聚还是被消除，还是一个尚未研究清楚的问题<sup>[80]</sup>。

成体干细胞（Adult Stem Cell, ASC）对组织中的细胞替换至关重要，其主要功能就是替换可能因疾病或受伤而死亡的细胞，并维持细胞内的平衡状态，但其能力会随着年龄的增长而下降<sup>[82]</sup>。因此，皮肤中的干细胞（Stem cells），包括表皮干细胞（Pidermal stem cells, ESC）、毛囊干细胞（Hair follicle stem cells, HFSC）和黑色素细胞干细胞（Melanocyte stem cells, MSC），是皮肤衰老过程中细胞动态变化的关键（下图）。这些成体干细胞所处的生态位为干细胞的维持和功能提供了空间上独特的微环境。干细胞生态位的整体框架、组成及其运作流程在整个生命过程中不断更新。正因如此，干细胞生态位被认为是皮肤“年轻态的青春之泉”。下文将主要介绍COL17在多种皮肤干细胞中的调控作用。

#### XVII型胶原蛋白在皮肤衰老中的调控作用<sup>[81]</sup>



来源：文献检索



### 3.3.1 XVII型胶原蛋白与表皮干细胞（ESC）和皮肤再生

如前所述，皮肤老化与成体干细胞的自我更新和功能分化有关。作为皮肤中干细胞之一的表皮干细胞（ESC），其生态位和功能的保持与XVII型胶原蛋白（COL17）密切相关。

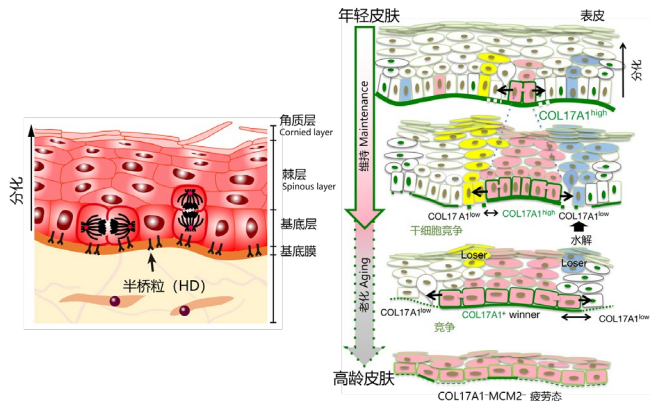
干细胞是组织稳态的基础，越来越多的证据证实，细胞与细胞、和细胞与胞外基质间（ECM）的黏附对于建立和维持细胞生态位结构至关重要<sup>[83]</sup>。与下层细胞外基质的黏附被认为是维持表皮干细胞（ESC）的重要因素<sup>[84][85]</sup>。半桥粒（HD）随着年龄的增长而减少，并导致基底细胞出现微分离。在所有半桥粒（HD）成分中，COL17是唯一一种在衰老过程中显著减少的成分<sup>[86][87]</sup>。目前的研究也表明，半桥粒（HD）的不稳定性是由内在老化和紫外线诱导的光老化<sup>[88]</sup>引起的基因组不稳定导致的COL17蛋白水解引起的。利用UVB照射会导致皮肤光老化，在小鼠和人类表皮中均会出现色素沉着和半桥粒（HD）损伤。COL17胶原蛋白缺失的小鼠皮肤色素沉着更明显，伤口愈合缓慢；而COL17胶原蛋白过度表达能显著减少色素沉着，而且能促进伤口愈合。这些数据表明了COL17胶原蛋白的表达对皮肤再生重要性<sup>[89]</sup>。

越来越多的研究已经阐明了蛋白酶和蛋白酶抑制剂在COL17蛋白分解中的作用，包括蛋白酶MMP9、ADAM9、10、17和ELANE<sup>[90]</sup>，以及蛋白酶抑制剂PAI-1、PAI-2、A1AT、TIMP1、TIMP2和TIMP3<sup>[91]</sup>。

对于XVII型胶原蛋白在皮肤衰老过程中的确切功能，2019年东京医科牙科大学干细胞生物学系教授Emi Nishimura的一项基于利用小鼠尾巴（小鼠尾巴具有许多与人类皮肤相同的特征）开展的研究揭示了COL17和细胞竞争在皮肤稳态和衰老过程中的参与和作用，相关研究成果发表在国际学术期刊《Nature》上<sup>[93]</sup>。

如下图所示，在皮肤稳态中，低水平COL17胶原蛋白介导的半桥粒的减少导致皮肤衰老：通过研究表明，老年小鼠基底细胞中的半桥粒数量明显低于幼龄小鼠，说明随着年龄的增长，小鼠皮肤中的半桥粒会逐渐减少，进一步研究发现，半桥粒的减少是由于其中COL17蛋白水平降低引起的，这与之前的研究结果一致<sup>[86][87]</sup>。此外，COL17蛋白的差异化表达会引发细胞间的良性竞争：COL17在不同的基底细胞克隆中表达不同，COL17表达高的表皮干细胞不断与COL17表达低的细胞竞争（干细胞间竞争（stem cell competition）），并将后者淘汰，而这些COL17低表达水平的干细胞，是已经受到损伤或不健康的细胞。将这些损伤细胞竞争性排除，可以达到抵抗表皮衰老的目的。为了研究COL17如何介导体内干细胞竞争，研究者构建了药物诱导型COL17A1基因敲除（Col17a1 cKO）小鼠，结合基底角质形成细胞中的多色标记系统发现，表皮干细胞的COL17差异性表达以细胞耦合方式驱动细胞竞争的。总的来说，这些数据表明COL17高表皮干细胞不断地与COL17低细胞竞争，以消除皮肤中的应激或不适合的细胞，从而抵抗表皮细胞的老化。

#### XVII型胶原蛋白在维持再生中的作用<sup>[92]</sup>



来源：文献检索

### 3.3.1 XVII型胶原蛋白与表皮干细胞（ESC）和皮肤再生（续）

组织学分析显示，与衰老的人类表皮一样，衰老的小鼠尾部皮肤呈现萎缩，表皮细胞层数减少，基底细胞形态更加扁平。随着年龄的增长，基底细胞总数和MCM2+基底细胞数量均减少（MCMs: Minichromosome maintenance protein; 微染色体维持蛋白；是在有丝分裂细胞中表达的蛋白质，在有丝分裂之后这些蛋白会被降解），这表明表皮干细胞及其细胞分裂随年龄的增长而减少。系谱追踪显示，老化皮肤的基底层是由非竞争性COL17和MCM2缺失（染色体维持蛋白2）的单一类型细胞组成的，而不是像年轻皮肤中COL17表达的具有明显差异性。

更深入的研究表明细胞竞争可能是由不同COL17表达介导的两种细胞分裂驱动的。COL17低表达的细胞垂直分裂的比例增加，以非对称分裂（Asymmetric cell divisions, ACD）的方式产生一个基底细胞（Basal cell）和一个位于上基底层的分化细胞（Apically located differentiating suprabasal cell），而COL17高表达的细胞则以对称分裂（Symmetric cell divisions, SCD）的方式产生两个相同的基底细胞。因此，对于非对称分裂（ACD）的细胞会导致半桥粒数量减少，从而使得其与基底膜出现微分离，进而实现COL17介导的对称细胞分裂（SCD）机械地推出COL17低表达的细胞。

这些数据表明，COL17介导的对称细胞分裂（SCD）通过其水平扩散产生细胞竞争的机械驱动力，并导致成体表皮中基底膜区域的占据以抵抗表皮老化。也就是说，具有更高潜力或质量的干细胞被选择用于维持内稳态，由此保持表皮角化细胞的年轻（质），抑制老化。但是随着年龄的增长，它们最终会因失去COL17而限制它们的竞争，从而导致衰老。由此导致的半桥粒脆弱和干细胞分层会耗尽相邻的黑色素细胞和成纤维细胞，从而促进皮肤老化。相反，强制维持COL17可以挽救皮肤器官的老化，从而表明COL17是抗衰老治疗的潜在靶标。

除了细胞竞争理论外，COL17还能通过增加平行分裂的比例直接提高表皮细胞集落的自我更新能力<sup>[94]</sup>。此外，非半桥粒型COL17的减少会导致表皮干细胞（ESCs）的不对称细胞分裂（ACDs）增加，从而导致老龄小鼠爪部表皮分层异常增加<sup>[95]</sup>。这些结果表明，半桥粒型COL17和非半桥粒型COL17对于调节ESCs中的细胞分裂至关重要，而对称和不对称分裂（SCDs和IACDs）的平衡对于调节皮肤稳态尤为关键，并在皮肤衰老过程中受到扰动。

关于COL17调节细胞分裂的机制，后续的研究中进行了进一步的探索<sup>[95]</sup>。对称和不对称分裂（SCDs和IACDs）之间的微妙平衡维持了表皮组织的完整性。调节细胞极性的关键分子包括非典型蛋白激酶C（aPKC）和蛋白酶激活受体3（Proteinase-activated receptor 3, PAR3）。表皮可以表达两种aPKC亚型，分别是aPKC $\lambda$ 和aPKC $\zeta$ 。研究发现COL17是aPKC-PAR复合物的结合伙伴，而aPKC-PAR复合物是细胞极性的关键调节因子。免疫沉淀-免疫印迹分析和蛋白质-蛋白质结合分析（Immunoprecipitation-immunoblot assay and protein-protein binding assay）证实COL17可以与aPKC和PAR3相互作用。COL17缺乏或表皮特异性aPKC $\lambda$ 缺失会破坏PAR3在表皮中的分布，但aPKC $\zeta$ 敲除则不会。在COL17缺失的新生小鼠爪子表皮中，细胞分裂不对称的现象非常明显。这些结果进一步证实，COL17在维持表皮细胞极性方面也起着关键作用<sup>[96]</sup>。

进一步研究发现，衰老引起的细胞内钙浓度变化导致aPKC受到抑制，从而减少了基底细胞顶外侧的COL17<sup>[97]</sup>。总之，aPKC和COL17之间的相互调节改变了细胞极性，促进了表皮细胞中的ASD并增加了老化皮肤中的末端分化细胞。目前的研究对于aPKC信号对COL17的影响存在争议。与上述修饰机制相反，aPKC诱导非半桥粒型COL17的磷酸化和内吞<sup>[98]</sup>，而aPKC驱动半桥粒型COL17的失稳<sup>[99]</sup>，这种差异可能归因于aPKC激活的上游信号通路不同。

### 3.3.1 XVII型胶原蛋白与表皮干细胞（ESC）和皮肤再生（续）

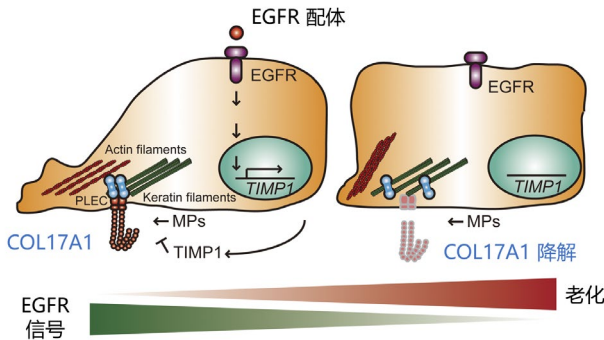
发表在《Journal of Cell Biology》上的一项研究揭开表皮生长因子受体（EGFR）信号和XVII型胶原蛋白水解，在皮肤再生中与年龄相关的角质形成细胞干细胞（keratinocyte stem cell）动力学改变之间的功能联系。此研究证实了这种功能性联系与皮肤再生过程中角质形成细胞干细胞动态变化的年龄相关。活体成像和计算机模拟实验表明，人类角质形成细胞干细胞的运动性与自我更新和表皮再生密切相关。受体酪氨酸激酶阵列（Receptor tyrosine kinase array）实验证实表皮生长因子受体信号在小鼠皮肤伤口愈合中，随着年龄增加信号逐渐衰退。培养实验证明，表皮生长因子受体（EGFR）活化可通过分泌组织金属蛋白酶抑制剂1（Tissue inhibitor of metalloproteinases 1 Metalloproteinases 1, TIMP1）抑制COL17蛋白水解，从而增加COL17的含量，推动人类角质干细胞的运动。有趣的是，COL17通过协调肌动蛋白和角蛋白丝网络（Actin and keratin filament networks）直接调节角质形成细胞干细胞的运动和细胞集体迁移。

总结来看，如下图所示。表皮生长因子受体（EGFR）信号通过TIMP1稳定COL17，而COL17是通过肌动蛋白和角蛋白丝网络协调细胞运动所必需的。与年龄相关的表皮生长因子受体（EGFR）信号的衰退会导致再上皮化和皮肤再生受损。因此，表皮生长因子受体EGFR-COL17轴介导的角质形成细胞干细胞运动推动了表皮再生，这为与年龄相关的皮肤再生障碍提供了一种新的治疗方法<sup>[100]</sup>。

研究也证实了XVII 胶原蛋白缺乏会改变表皮图案。研究发现胶原蛋白XVII（COL17）是表皮干细胞（ESC）的一个生态位，有助于稳定表皮模式。基因敲除和回补实验表明，COL17能维持小鼠尾鳞表的宽度，而不受表皮细胞极性的影响。创伤后的皮肤再生与鳞片表皮细长有关，过量表达人COL17A1基因可减轻这种情况。研究证实了COL17有助于确定小鼠尾鳞片的形状和人类皮肤的微观形态，同时也揭示了SC生态位在组织形态形成中的作用<sup>[102]</sup>。

总之，COL17驱动的干细胞竞争和对称分裂（SCD）最初协调了皮肤的稳态；但年龄诱导的COL17蛋白水解通过PKC信号传导导致干细胞中SCD和ACD失衡，导致细胞竞争、自我更新能力和干细胞维持能力丧失，最终引起年龄相关性表皮萎缩、脆弱等；并且表皮生长因子受体EGFR-COL17轴介导的角质形成细胞干细胞运动可以促进表皮再生；COL17蛋白与表皮图案也存在着密切关联。

EGFR-COL17轴介导的表皮再生调控回路<sup>[101]</sup>



### 3.3.2 XVII型胶原蛋白与毛囊干细胞（HFSC）和衰老脱发

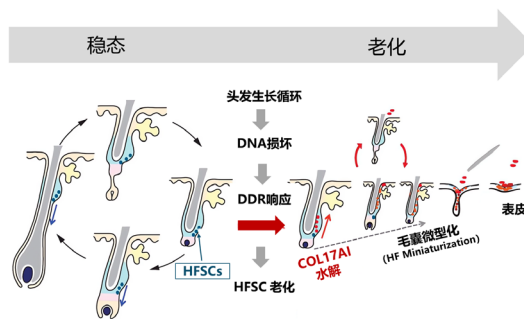
脱发是皮肤老化的常见表现之一。毛囊（Hair follicle, HF）是皮肤的一个上皮小器官，它在反复的毛发周期中维持毛发的周期性再生。毛囊干细胞（Hair follicle stem cell, HFSC）负责毛囊的周期性再生，同时也是创伤后毛囊间表皮（Interfollicular epidermis, IFE）和皮脂腺（Sebaceous glands）后代的供应源<sup>[103]</sup>。毛囊干细胞（HFSC）接收来自周围环境的信号，并主动发出信号以调节自身生态位的组织和功能<sup>[104]</sup>。

脱发是各种内因和外因共同作用导致的结果，其中衰老是不可抗因素。头发稀疏和脱落是显著的衰老表现。对衰老性脱发的机制理解也随着对毛囊干细胞（HFSC）的深入研究而逐渐变得清晰。虽然胎儿产后头皮没有新增毛囊，新头发和旧头发是从同一个地方长出来的。但为了维持表皮和皮脂腺的发育及毛发再生，在发育过程中预留了多能的干细胞库。这些珍贵的细胞存在于毛囊外根鞘上的“隆起”部。毛囊干细胞在休止期到生长期的转变中被激活，开始新一轮的毛发生长<sup>[105]</sup>。

2016年，Hiroyuki Matsumura等人发表在《Science》上的研究将小鼠毛囊的衰老过程作为器官衰老研究模型，通过追踪为毛发再生提供重要细胞的毛囊干细胞的命运发现：随着毛囊干细胞的老化，DNA损伤反应延长（DDR, DNA damage response），可激活ELANE（中性粒细胞弹性蛋白酶：一种存在于中性粒细胞中的酶，参与免疫反应和炎症过程，能够降解多种蛋白质），导致维持HFSCs的关键分子胶原蛋白COL17的水解流失，从而触发HFSC的衰老。其特征是干细胞特性的丢失和干细胞的分化竞争失调，无法继续正常复制。毛囊干细胞（HFSC）在衰老过程中失去了再生能力，是因为采用了非典型的细胞分裂程序。细胞命运追踪和细胞分裂轴分析表明：虽然年轻小鼠的毛囊干细胞（HFSC）经历典型的对称和不对称两种形式的细胞分裂（SCDs和ACDs）以再生毛囊，但在衰老或压力下，它们采用单一的不对称细胞分裂方式。这种非典型的“压力反应”类型的分裂方式伴随着半桥粒蛋白COL17和细胞极性蛋白aPKCλ的不稳定，并产生终末分化的表皮细胞，而不是再生毛囊生态位。老化的毛囊干细胞（HFSC）通过表皮终末分化为表皮角质形成细胞，周期性地从皮肤中清除。随着这种非典型分裂的重复，毛囊干细胞（HFSC）从基底膜分离，毛囊干细胞生态位逐渐缩小，毛囊本身变小（小型化），最终导致头发稀疏和脱落<sup>[107][108]</sup>。研究显示，强制性维持COL17的表达可以抑制毛囊干细胞衰老，从而可以延缓过度的脱发。这表明胶原蛋白COL17的稳态和位于同一生态位的真皮-表皮基底膜区的干细胞竞争性分裂分化有关。毛囊组织中存在以毛囊干细胞（HFSC）为中心的衰老程序，是由于干细胞分裂类型从再生型转变为衰老型引起的（下图）。虽然是基于小鼠实验获得的认识，但也在人类自身得到了验证。

尽管导致脱发的原因非常复杂，构成毛囊干细胞微生态的要素也不只是胶原蛋白COL17，例如，CXCL12通过CXCR4/STAT信号通路抑制毛发生长等<sup>[109]</sup>。但通过控制COL17来预防和治疗脱发的应用研究仍有充分的实践价值。DNA的损伤是细胞内外抗氧化机制或促/抗凋亡因子失调随着年龄增长而累积的。避免导致细胞损伤氧化应激，稳定胶原蛋白COL17的表达和调节修复损伤的细胞自噬是当前头皮抗老化研究的重点之一。

#### XVII型胶原蛋白与脱发的关系<sup>[106]</sup>



来源：文献检索

### 3.3.3 XVII型胶原蛋白与黑色素干细胞 (MSC) 和头发变白

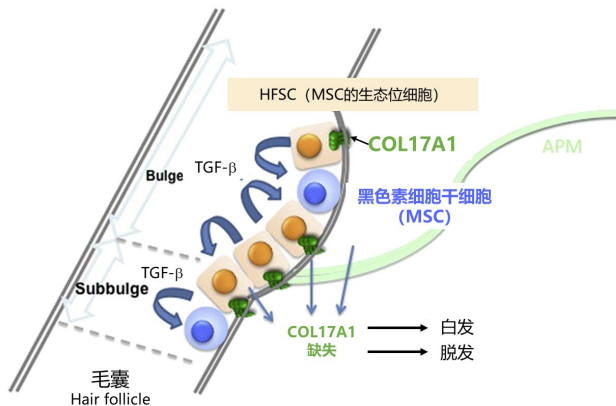
黑色素干细胞 (Melanocyte stem cell, MSC) 是一种可产生色素的黑色素细胞, 它围绕着表皮干细胞 (ESC) 和毛囊干细胞 (HFSC) 驻留在毛囊间表皮或毛囊隆起—次隆起区域<sup>[110]</sup>。它们与内在和在外在衰老过程中皮肤和毛囊色素沉着密切相关<sup>[111]</sup>。

黑色素母细胞是黑色素细胞的前体, 起源于神经嵴, 部分迁移到毛囊, 在毛囊内进一步分化成合成色素的黑色素细胞。长期以来, 人们猜测头发中存在着一个未分化黑色素干细胞 (MSC) 池, 可以补充分化黑色素细胞。2002年日本研究者Emi K Nishimura等人使用黑色素细胞标记技术, 识别和定位了存在于毛囊外根鞘的未分化黑色素干细胞池<sup>[112]</sup>。随着黑色素干细胞 (MSC) 的发现, 也就产生了这样一个问题: 头发变白的过程是由于分化的、着色的子代黑色素细胞的缺陷、还是由提供它们的未染色的前体细胞黑色素干细胞的缺陷而引起的呢? 前者关注于生长期中黑色素细胞生成黑色素的过程, 如酪氨酸酶活性降低、黑色素体转移缺陷和毛囊黑色素细胞凋亡等; 后者关注黑色素干细胞的老化缺陷和生态环境。Emi K Nishimura等人首先使用黑色素细胞标记的转基因小鼠和老化的人类毛囊, 证明了头发变白是由黑色素干细胞自我维护缺陷而引起的<sup>[113]</sup>。

2011年, 发表在国际学术期刊《Cell Stem Cell》上的研究发现跨膜胶原蛋白COL17在位于毛囊凸起区域的毛囊干细胞 (HFSC) 中有较高表达<sup>[114]</sup>。黑色素干细胞 (MSC) 并不表达COL17, 但直接黏附在HFSCs上。缺乏胶原蛋白COL17的小鼠毛发发育正常, 但进入第二个毛发生长初期开始出现异常, 最终导致脱发和头发变白。对基因COL17A1缺失小鼠的分析表明, 胶原蛋白COL17维持的毛囊干细胞 (HFSC) 的静默 (休眠) 和不成熟对 HFSC 的自我更新至关重要。此外, 在COL17A1基因缺失小鼠的基底角质形成细胞 (包括HFSCs) 中强制表达胶原蛋白 COL17可以挽救黑色素干细胞 (MSC), 免于过早分化并恢复TGF- $\beta$  (转化生长因子 $\beta$ ) 信号的传导, 结果表明毛囊干细胞 (HFSC) 对黑色素干细胞 (MSC) 生态位发挥着关键调节作用。研究还发现, Bcl2 (B淋巴细胞瘤2基因简称bcl-2, B-cell lymphoma-2, 是细胞凋亡研究中最受重视的癌基因之一) 缺乏会显著加速头发变白这一过程, 会导致黑色素干细胞选择性凋亡, 不会导致分化的黑色素细胞进入休眠状态<sup>[114]</sup>。此外, 黑色素干细胞的生理老化与生态位内的异位色素沉着或分化有关, 黑色素细胞主转录调节因子Mitf的突变也可加速这一过程。

这项研究为人类胶原蛋白COL17缺陷导致脱发、白发的潜在机制提供一种可能性的解释。即头发变白是由于黑色素干细胞 (MSC) 自我维持能力的缺陷而造成的, 虽然与COL17的缺失没有直接关系, 但黑色素干细胞 (MSC) 的流失是同一生态位不同干细胞的竞争合作的结果。表皮干细胞 (ESC) 和毛囊干细胞 (HFSC) 中COL17的下调激活该生态位的TGF- $\beta$  信号, 进而导致了黑色素干细胞 (MSC) 的老化。

#### XVII型胶原蛋白与MSC生态位的关系<sup>[115]</sup>



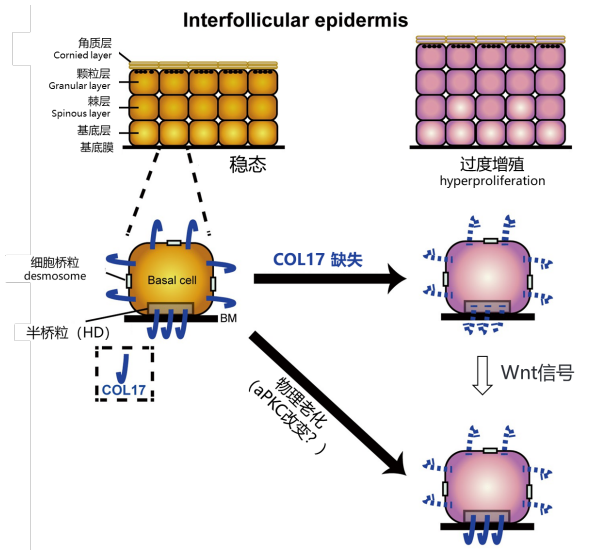
来源: 文献检索

### 3.3.3 XVII型胶原蛋白与黑色素干细胞（MSC）和头发变白（续）

XVII型胶原蛋白还存在于滤泡间表皮（Interfollicular epidermis, IFE）的真皮-表皮交界处（DEJ）中。2017年发表在《eLife》上的研究表明COL17在调节滤泡间表皮（IFE）增殖中起着核心作用[95]，如下图所示。由于Wnt信号传导异常，COL17缺失会导致新生小鼠短暂的IFE肥大。在COL17缺失小鼠的新生表皮中补充COL17可逆转增生的IFE表型和改变的Wnt信号。由于不活跃的非典型蛋白激酶C信号传导，物理老化会使IFE基底细胞中的膜COL17消失，并诱导表皮过度增殖。在老化小鼠表皮中过表达人类COL17可抑制IFE肥大。这些研究结果表明，COL17以不同的方式调控新生和老年皮肤的IFE增殖。研究也表明，COL17可能是皮肤抗衰老策略的一个重要靶点。

关于人类头发变白的机理模型，2023年4月，纽约大学格罗斯曼医学院Mayumi Ito教授团队在《Nature》发表了题为 *De-differentiation maintains melanocyte stem cells in a dynamic niche* 的研究论文，揭示了头发随着年龄增长而变白的原因[117]。研究发现：在正常的毛发生长过程中，毛囊干细胞（MSC）在发育中的毛囊的各个区域不断来回移动，在这些不同区域，MSC暴露于影响干细胞成熟的信号有所不同。也就是说，MSC在其最原始的干细胞状态和成熟状态之间的转换，而这种转换取决于它们在毛囊中所处的位置。随着头发老化、脱落，然后反复长出，越来越多的MSC被困在被称为毛囊隆突区的干细胞中，MSC被留在这里，不会进一步成熟分化，也不会回到它们在毛基质中的初始位置。而在基质中Wnt蛋白会刺激MSC成熟分化为黑色素细胞。而在毛囊隆突区，MSC接触的Wnt信号是在毛基质区中的数万亿分之一，这就导致了困在这里的MSC无法成熟并产生黑色素。而其他具有自我再生能力的干细胞，例如毛囊干细胞，不具备MSC的可塑性，它们在成熟时只沿既定的时间轴向一个方向移动。这也在一定程度上解释了为什么即使色素沉着失败（头发变白）时，头发也能继续生长。这项研究加深了对黑色素干细胞（MSC）如何影响头发颜色的基本理解，也提出了一种潜在方法——可以通过帮助被困住的MSC在发育中的毛囊中的再次移动来逆转白发或防止人类头发变白。

#### XVII型胶原蛋白与滤泡间表皮（IFE）的关系<sup>[116]</sup>



来源：文献检索

## 第三章

# XVII型胶原蛋白

## 同健康与疾病之间的联系

- XVII型胶原蛋白与疾病的关联
- XVII型胶原蛋白是维持皮肤稳态抗衰老的关键因子
- XVII型胶原蛋白是伤口修复的调节因子



# 3.4 XVII型胶原蛋白是伤口修复的调节因子

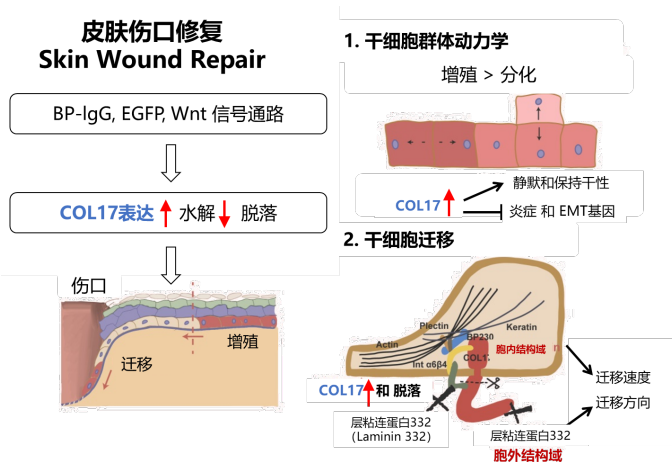
## 3.4.1 伤口修复中的干细胞

伤口愈合会经历不同的重叠阶段：止血（Hemostasis）、炎症（Inflammation）、增殖（Proliferation）和重塑（Remodeling）<sup>[118]</sup>。再上皮化（Re-epithelialization，也称为上皮再形成）是增殖期的一个重要生理过程。它指的是伤口新上皮的重新覆盖，表皮再生始于邻近的角质形成细胞迁移到伤口，可以恢复具有通透性的屏障。对于某些厚度的伤口，表皮迁移可以从皮肤附属器件迅速迁移至伤口处，如毛囊、皮脂腺等。此过程对于恢复屏障功能至关重要<sup>[119]</sup>。在皮肤稳态过程中，皮肤上皮终生不断更新，由干细胞确保增殖和分化的平衡，以取代死亡和终末分化的细胞<sup>[120][121]</sup>。在伤口修复过程中，干细胞被激活并从不同皮肤区域招募，损伤造成的空缺生态位激活了多种干细胞，使其具有不同于自身平衡作用的特征。

干细胞在再上皮化过程中主要参与三个生物学过程，包括干细胞的迁移和增殖、干细胞的群体动态和干细胞的可塑性<sup>[120]</sup>。首先，表皮损伤后，角质形成细胞（Keratinocytes）的迁移和增殖通常会增加<sup>[118]</sup>。但有趣的是，角质形成细胞并不增殖，而是在前缘以细胞片（Cellular sheet）的形式迁移，在远离边缘的地方被增殖区包围<sup>[122]</sup>。此外，在再上皮化过程中，细胞对称分裂的增加或不对称分裂导致的分化减少可补偿失去的细胞，而细胞系的层次结构以及母细胞（Progenitors，或称为祖细胞）的自我更新和分化之间的平衡则与稳态期间的状态保持不变<sup>[120]</sup>。最终，在不同的皮肤细胞系中观察到了伤口愈合后的可塑性。这个过程中，毛囊干细胞（HFSC）会在受伤后逐渐失去其初始特性，并被招募到毛囊间表皮（IFE）时重新编程为IFE命运，而分化的基底上表皮细胞（Suprabasal epidermal cells）能够在受伤后恢复到干细胞状态<sup>[123][124]</sup>。

除了前述的皮肤老化，COL17编码基因的敲除会导致伤口闭合性降低，而抑制 COL17 的剪切脱落则会增加伤口的闭合性<sup>[126]</sup>。目前的研究发现，COL17可通过两个方面在伤口修复中发挥关键作用：一是影响干细胞群体动力学，二是调节干细胞迁移和增殖（下图）。

XVII型胶原蛋白在伤口修复中的调节<sup>[125]</sup>



来源：文献检索



### 3.4.2 干细胞群体动力学

在单细胞分析研究中，在受伤和未受伤的皮肤中，无论是用COL17A1基因还是TP63（TP63是富集在静止隆起的毛囊干细胞（HFSC）中的基因）标记，都存在一个COL17A1基因高表达的亚群。在炎症发生时，COL17A1基因高表达的细胞在静默干细胞中占比高。这部分细胞直接或间接分化为棘细胞（spinous cell）或特定的增殖基底细胞池，从而维持皮肤在平衡状态下的更新。在伤口修复过程中，这些细胞会在伤口外围分化成基底细胞，也可以转化为运动能力更强的细胞，随后迁移到伤口中。

人角质形成细胞培养过程中会形成两种群落，即扩张型群落和堆积型群<sup>[94]</sup>；前者主要表现为增殖/增殖分裂（Proliferating/proliferating divisions），而后者则表现为更多的分化/分化分裂（Differentiating/differentiating divisions）。COL17在扩张型群落细胞中出现高表达，抑制COL17会降低角质形成细胞群落的生长，增加培养物中堆积型群落的比例。这些发现表明，具有高表达COL17的细胞显示出强的增殖能力而非分化能力，这有助于在再上皮化过程中弥补失去的细胞。

### 3.4.3 干细胞迁移

表皮基底细胞的迁移需要重塑细胞与细胞，和细胞与基质的接触，以使细胞从未受伤的基底膜上分离。当细胞在伤口上移动时，它们会降解临时胞外基质（Provisional matrix，可以理解成一种简单的含纤维蛋白的伤口愈合支架，用于支撑新生血凝块，在功能上有别于基底膜），同时沉积新的基质蛋白，包括层粘连蛋白332。在角质形成细胞中，基质蛋白及其受体聚集形成两种不同的蛋白质复合物：病灶黏附（Focal adhesions）和半桥粒（HD）<sup>[128]</sup>。病灶黏附被认为是动态的附着点，在细胞扩散和运动中发挥作用<sup>[129]</sup>，而半桥粒（HD）传统上被认为是促进静止表皮中基底上皮细胞稳定黏附的附着复合体。目前，人们认为半桥粒（HD）可被分解，使角质形成细胞移动到伤口处和/或临时伤口基质上，并在决定皮肤细胞运动行为的各个方面发挥重要的调节和信号作用。在检测伤口边缘时，第3天的伤口边缘显示整个伤口上皮细胞的COL17水平强烈升高，包括伤口边缘后的远端区域以及生长中的上皮细胞（Epithelial tongues）；相比之下，第6天时，COL17主要在生长中的上皮细胞中表达<sup>[130]</sup>。在探索COL17在迁移中的作用时，发现它通过不同的机制调节细胞运动的不同特征。

细胞运动的特征可大致分为迁移速度和迁移方向，而COL17对细胞速度既有积极作用，也有消极作用。在一些研究中经常观察到肌动蛋白动力学的变化。值得注意的是，用不同的方法敲除COL17会产生不同的效果。在全基因COL17敲除的转基因小鼠中，其原始角质细胞（Primary keratinocytes）的迁移速度增加，而用shCOL17敲除方法的细胞系的迁移速度下降。二者差异的可能原因是其他半桥粒蛋白对的不同敲除方法有不同的补偿反应。在皮肤和角质形成细胞中，COL17全基因敲除会显著诱导β4整合素蛋白的表达，或消除β4整合素运动的结构障碍<sup>[131]</sup>。相反，用shCOL17方法敲除只会改变细胞的运动性，而不会改变细胞的粘附性，这表明缺乏补偿反应<sup>[132]</sup>。

在速度与COL17无明显关联的研究中，就可以考虑COL17与细胞迁移方向的关系。细胞要以定向方式有效迁移，就必须建立并维持具有明确前缘和后缘的不对称形态<sup>[133]</sup>。COL17全基因敲除导致的迁移方向失调会显著减缓伤口闭合过程<sup>[131]</sup>，同时会形成不稳定的板状伪足（Lamellipodium），而板状伪足是细胞外围产生定向突起所需力量的关键细胞器。

除了不同的调节对象外，COL17本身或COL17的被剪切脱落是否在伤口修复中发挥作用也进行了广泛研究。在伤口中，COL17胞外结构域的脱落可以使得细胞从一些现有的结合伙伴中松动或释放，并使其能够根据需要发挥其他功能<sup>[134]</sup>。结合COL17胞外结构域选择性染色实验，包含完整结构域的COL17（胞外结构域未被剪切脱落）的皮肤细胞显示出运动加速的响应，尤其是速度的增强<sup>[126]</sup>；但是，这些细胞迁移的方向性比正常皮肤低近两倍，并伴随着细胞稳定极化与板状伪足（Lamellipodium）的缺乏，板状伪足是细胞边缘负责细胞移动的细胞骨架肌动蛋白。这样看来，COL17胞外结构域脱落可以作为一种细胞内在抑制剂，通过信号传导抑制角质形成细胞的迁移速度和增殖<sup>[135]</sup>。

来源：文献检索

### 3.4.3 干细胞迁移 (续)

对于胞外结构域未被剪切脱落的 COL17 皮肤可以加速再上皮化的机制，并不是很清晰。到底是剪切脱落的可溶性胞外结构域，还是剪切后产生的胞内结构域，或者是二者共同影响。目前并没有确定的答案。但已有有证据表明，脱落的胞外结构域对角质细胞的运动有直接抑制作用，主要原因有：① 高度稳定的释放 COL17 胞外结构域主要沉积在与层粘连蛋白332 结合的迁移细胞的轨迹中，从而导致基质的稳定和细胞的固定，但同时也引导了细胞的运动；② 在划痕伤口试验中，添加纯化的可溶性COL17 胞外结构域可减少角质细胞的迁移<sup>134</sup>。在另一项研究中，不脱落的 COL17 角质形成细胞前缘和后缘的突起完全失去了胞内结构域信号，而胞外结构域则没有明显变化，这表明COL17的胞内和胞外结构域均在角质形成细胞的迁移过程中起着重要作用。

在另一项研究中发现，在角质细胞形成的前导和尾部细胞边缘突起中未检测到COL17胞内结构域的信号，而胞外结构域的信号没有明显差异，表明迁移角质细胞中缺乏COL17胞内结构域会导致不稳定的前后极化（Rear-to-front polarization）和层粘连蛋白332沉积的改变，而添加COL17胞内结构域可以恢复角质细胞的运动行为和板状伪足（Lamellipodium）的动力学。COL17还可以通过与细胞骨架进行复杂的相互作用来调节迁移。COL17的缺乏会触发肌动蛋白组织的改变，从而影响板状伪足（Lamellipodium）中肌动蛋白丝131。最近的一项研究报告称，COL17还可以通过网蛋白调节肌动蛋白和角蛋白的动力学<sup>194</sup>。

在COL17的上游调控机制方面，BP-IgG与COL17结合，抑制其功能，降低细胞活力<sup>136</sup>；老化诱导的表皮生长因子受体（EGFR）下降抑制COL17蛋白水解，调控细胞活力<sup>194</sup>。也有研究证实，Wnt信号影响COL17，而COL17与伤口修复有关<sup>191</sup>。

# 第四章

## 重组XVII型胶原蛋白



## 4.1 重组与动物源型胶原蛋白区别

重组型胶原蛋白相较于动物源型胶原蛋白在生产方式、安全性、生物相容性、成本、可持续性方面更具优势

对于胶原蛋白的提取，可以通过重组和动物源（包括人源）提取的方法，但二者在来源、生产方法、提取过程、安全性等有显著不同（详见下图）。

因此，对于胶原蛋白的提取，通过动物源提取由于存在免疫性和病毒性两大问题，在实际操作过程中对于各项操作要求提出了更高的标准。此外，表达量的低下和规模化生产的困难也是要面临的挑战，这对XVII型胶原蛋白的提取同样适用。同时，XVII型胶原蛋白作为一种微量胶原蛋白，其从动物源提取的难度将进一步加大。因此，采用基因工程技术提取重组胶原蛋白，具有可持续性，已被广泛应用，成为最为理想的胶原蛋白提取方法<sup>[137]</sup>。

重组胶原蛋白量化生产体系对比

	动物源型	重组型
 来源	<ul style="list-style-type: none"><li>来源于人体组织，例如皮肤、骨骼或肌腱</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>使用基因工程方法在微生物、细胞培养或其他生产平台上生产的胶原蛋白</li><li>通过将胶原蛋白的基因插入到表达系统中，使其产生胶原蛋白</li></ul>
 生产方式	<ul style="list-style-type: none"><li>从人体组织中提取，需要经过一系列纯化和处理步骤</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>使用基因工程技术在实验室条件下生产，可以实现大规模、高纯度的生产</li></ul>
 安全性&生物相容性	<ul style="list-style-type: none"><li>由于来源于人体，生物相容性通常很好</li><li>仍存在一些潜在的病原体传播和免疫反应的风险</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>由于可以控制生产过程，潜在的病原体风险较低</li><li>可以设计特定的结构或修饰以提高其功能性</li></ul>
 成本&可持续性	<ul style="list-style-type: none"><li>由于来源有限且提取过程复杂，可能成本较高</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>可实现大规模生产，因此具有较高的可持续性和经济效益</li></ul>

## 4.2 重组胶原蛋白符合可持续发展目标

重组型胶原蛋白提供了一个对环境、经济和社会更友好的生产方法，与动物源的胶原蛋白相比更有利于实现可持续发展的目标。重组型胶原蛋白为胶原蛋白的生产带来了一个更为可持续、环境友好的选择，与当前全球面临的气候变化和资源短缺的挑战相一致，有望在未来得到更广泛的应用和推广。

- **环境：**环境上的影响是最为显著的。传统的动物来源胶原蛋白需要大规模的畜牧业来供应原材料，这导致了大量的土地、水和食物资源的消耗。而畜牧业还是温室气体排放的主要来源之一，对全球气候变化有着不容忽视的影响。相比之下，重组技术则大大减少了这些资源的需求和环境压力。使用微生物或细胞培养生产胶原蛋白不仅能够降低对水和土地的使用，而且还可以减少温室气体的排放，从而有助于对抗气候变化。
- **经济：**虽然重组胶原蛋白的初步研发和设备投资可能相对昂贵，但随着技术的进步和规模化生产，生产成本有望逐渐降低。此外，这种方法避免了与动物农业相关的风险，如疾病暴发、饲料价格波动等，从而为企业提供了更为稳定和可预测的生产环境。
- **社会：**随着消费者对环境和动物福利的日益关注，重组型胶原蛋白作为一个更为可持续的选择，有望获得更广泛的市场接受。这不仅能够满足现代消费者的需求，还能为相关的生物技术和医药产业创造新的就业机会。



## 4.3 重组胶原蛋白的表达体系

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，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。

按照国家药品监督管理局医疗器械标准管理中心发布的《重组胶原蛋白生物材料命名指导原则》<sup>[138]</sup>，重组胶原蛋白作为医疗器械领域的原材料，被分为3大类：

- ① 重组人胶原蛋白（Recombinant human collagen protein）：由DNA重组技术制备的人胶原蛋白特定型别基因编码的全长氨基酸序列，且有三螺旋结构。
- ② 重组人源化胶原蛋白（Recombinant humanlike collagen protein）：由DNA重组技术制备的人胶原蛋白特定型别基因编码的全长或部分氨基酸序列片段，或是含人胶原蛋白功能片段的组合。
- ③ 重组类胶原蛋白（Recombinant collagen-like protein）：由DNA重组技术制备的经设计、修饰后的特定基因编码的氨基酸序列或其片段，或是这类功能性氨基酸序列片段的组合。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低。

通过重组DNA技术提取胶原蛋白的流程为：获取目的基因及质粒构建和扩增→菌种培养→种子培养→发酵生产→分离→均质→分离→纯化等步骤，而用基因工程提取胶原蛋白技术上的难点在于获取目的基因及质粒构建和扩增（即基因片段的选择及三螺旋结构的构建）、细胞转染、蛋白纯化等环节。

常见的有5种表达体系，不同的表达体系得到的重组蛋白活性、复杂程度及表达率存在差异，通常根据下游应用及生产需要选择相应的表达体系。

- ① 原核细菌蛋白表达系统（大肠杆菌等）
- ② 真核酵母蛋白表达系统（毕氏酵母/酿酒酵母等）
- ③ 真核昆虫细胞蛋白表达系统（被杆状病毒感染的昆虫细胞等）
- ④ 真核哺乳动物细胞蛋白表达系统（CHO细胞、HEK293细胞等）
- ⑤ 植物表达体系（烟草、番茄等）



来源：文献检索

### 4.3.1 原核生物（大肠杆菌）表达体系

大肠杆菌表达系统是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，但仍能表现出良好的热稳定性<sup>[139]</sup>。范代娣教授团队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（分子量分别为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<sup>[140] [141]</sup>。王皓在大肠杆菌系统中表达类人胶原蛋白基因COL6A2，获得了分子量为30 kDa重组类人VI型胶原蛋白<sup>[142]</sup>。李瑛琦等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（分子量为13 kDa）的产量可以达到3.02 g/L<sup>[143]</sup>。杨震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，通过发酵实现了制备<sup>[144]</sup>。

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，进而抑制了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额外转导引入羟化酶来解决。另外一方面，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探索与改进。

### 4.3.2 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，理论上具有易高细胞密度发酵和低成本等优势优点。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人I、II和III型胶原蛋白的表达量和羟化效率最高。Myllyharju等将人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<sup>[145][146]</sup>。Fibro Gen公司采用该技术生产重组类人I和III型胶原蛋白，并应用于止血剂和角膜再生材料商业化产品的研发<sup>[147]</sup>。范代娣教授课题组在毕赤酵母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（分子量为130 kDa）（无N末端前肽和C末端前肽）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。徐立群表达了重组VI型胶原蛋白（分子量为32 kDa），为其活性功能的探讨及其生产奠定基础<sup>[148]</sup>。杨树林教授课题组以人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（分子量为55 kDa），12.5 L发酵罐体系表达量为3.81 g/L<sup>[149]</sup>。钱松等分别在毕赤酵母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（分子量为97.15 kDa）和成熟全长II型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链（分子量为98.5 kDa）（均为包含N末端前肽、三螺旋区域、C末端前肽的成熟全长氨基酸序列）的高效生产表达<sup>[150][151]</sup>。侯增淼等基于人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（分子量为38 kDa）<sup>[152]</sup>。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等设计了含有脯氨酸羟化酶的酿酒酵母可制备III型胶原蛋白（分子量为190和270 kDa）<sup>[153]</sup>，但脯氨酸羟基化水平约0.5%，显著低于天然人胶原蛋白。Vaughn等采用不同的克隆策略提升了III型胶原蛋白（分子量为30和60 kDa）的羟基化水平，但仍低于天然胶原蛋白<sup>[154]</sup>。

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，由于其在组织中含量最高、被报道得最多，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>[155]</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末端区域，以提高酿酒酵母生产重组人I型胶原蛋白的产量<sup>[156]</sup>。

来源：文献检索

### 4.3.3 植物表达体系

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，通过与羟化酶共表达能够产生重组I型胶原同源三聚体（分子量为70.0–120.0 kDa），但通常存在着外源蛋白表达量低等问题。Merle等通过共表达人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型胶原蛋白（分子量为120.0 kDa）<sup>[157]</sup>。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等以大麦种子作为宿主，表达了人I型胶原蛋白的 $\alpha 1$ 链（分子量为45 kDa）<sup>[158]</sup>。Stein等在烟叶中将人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（分子量为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<sup>[159]</sup>。该技术已被Collplant公司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。

### 4.3.4 昆虫表达体系

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（分子量为120.0 kDa），表达量可以达到50 mg/L<sup>[160]</sup>。齐琦等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Bm NPV-ColII-IM注射5龄起家蚕幼虫，得到的重组人II型胶原蛋白（分子量为300.0 kDa）可高达约1 mg/头<sup>[161]</sup>。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™（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>[162]</sup>。

Tomita等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（分子量为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<sup>[163]</sup>。Adachi等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（分子量为120.0 kDa）缺乏羟脯氨酸，不能形成三螺旋结构<sup>[164]</sup>。

### 4.3.5 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等在转基因小鼠乳腺中表达了完全羟基化的重组胶原蛋白（分子量为60 kDa）<sup>[165]</sup>。Toman等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（分子量为160 kDa），表达量高达8 mg/mL<sup>[166]</sup>。Hou等在中国仓鼠卵巢内表达人VII型胶原蛋白（分子量为290 kDa）<sup>[167]</sup>。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（分子量为120和250 kDa）和VII型（分子量为290 kDa）。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。

来源：文献检索



## 4.4 重组胶原蛋白的优势

---

### 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。

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、黏附、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；
- 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。

## 4.5 重组胶原蛋白的行业标准

### 国家药监局针对重组胶原蛋白的相关行业标准持续完善

近年来，国家及各级地方政府发布了多项重组胶原蛋白行业利好政策，鼓励国内合成生物关键核心技术和重大应用方向创新，明确了重组胶原蛋白行业的发展方向与要求，加强重组胶原蛋白原料及产品领域规范，为行业发展创造了优良的外部环境，推动重组胶原蛋白产品创新发展，促进行业规模的进一步增长。

### 2021年以来（重组）胶原蛋白行业相关政策与文件

发布时间	发布机构	政策名称	主要内容
2021.03	国家药监局	《重组胶原蛋白生物材料命名指导原则》	<ul style="list-style-type: none"><li>重组胶原蛋白生物材料名称由核心词和特征词组成，按“特征词+核心词（A+B）”结构编制，例如重组III型人源化胶原蛋白溶液</li><li>核心词和特征词应根据其真实属性和特征，优先在术语表中选择</li></ul>
2021.03	国家药监局	《关于医疗器械主文档登记事项的公告》	<ul style="list-style-type: none"><li>主文档内容主要涉及医疗器械原材料等</li><li>为境内提出的进口第二类、第三类及境内第三类医疗器械（含体外诊断试剂）注册、变更、临床试验审批等申请事项中所引用主文档的登记简化注册申报流程</li></ul>
2021.04	国家药监局	《重组胶原蛋白类医疗产品分类界定原则》	<ul style="list-style-type: none"><li>重组胶原蛋白类产品的管理类别应当不低于第二类</li><li>作为无源植入物应用时，应当按照第三类医疗器械管理</li><li>作为医用敷料应用时，若产品可部分或者全部被人体吸收，或者用于慢性创面，按照三类医疗器械管理否则按照二类</li></ul>
2022.10	商务部研究院	《国内高品质胶原蛋白行业发展白皮书》	<ul style="list-style-type: none"><li>走高质量发展之路，深化产学研政合作，提高生产工艺和产品附加值，延伸产品链和升级产品</li><li>从源头上加强把关，重视胶原蛋白的标准制定和规范化应用</li><li>倡议企业尽量把更多的高端产品留在国内，推动国内消费升级。</li></ul>
2022.12	国家药监局器审中心	《整形美容用重组人源化胶原蛋白注射材料技术审评要点（试行）》	<ul style="list-style-type: none"><li>确认整形美容用重组人源化胶原蛋白注射材料的管理类别为III类，并要求提供原材料选择、配方确定、人源化胶原蛋白的降解代谢机制及特性研究等信息，进一步明确了审评程序</li></ul>
2023.01	国家药监局	《重组人源化胶原蛋白》行业标准	<ul style="list-style-type: none"><li>规定了重组人源化胶原蛋白的质量控制、技术要求、试验方法、稳定性、生物学评价以及包装、运输和贮存等</li></ul>
2023.04	中国抗衰老促进会	《重组胶原蛋白原料质量要求及功效评价方法》	<ul style="list-style-type: none"><li>规定了适用于作为化妆品原料的重组胶原蛋白的术语和定义、质量要求、检测方法、功效评价、检验规则等</li></ul>
2023.05	国家药监局器审中心	《重组胶原蛋白创面敷料注册审查指导原则》	<ul style="list-style-type: none"><li>主要针对医疗器械用重组人源化胶原蛋白原材料的评价提供方法</li></ul>
2023.05	国家药监局器审中心	《重组人源化胶原蛋白原材料评价指导原则》	<ul style="list-style-type: none"><li>适用于第2类医疗器械管理的重组胶原蛋白创面敷料的适用范围和注册审查</li></ul>

来源：政府官网

## 4.6 重组XVII型胶原蛋白的设计与生产

### 4.6.1 重组人源化XVII型胶原蛋白

如前文所述，重组XVII型胶原蛋白也可以分为3大类：重组人XVII型胶原蛋白、重组人源化XVII型胶原蛋白、重组类XVII型胶原蛋白。其中，重组人XVII型胶原蛋白需包含人XVII型胶原蛋白的全长氨基酸序列，生产困难大；重组类XVII型胶原蛋白其基因编码序列或氨基酸序列只是部分与人胶原蛋白一致，人源性较低。因此重组人源化XVII型胶原蛋白一般被认为是人XVII型胶原蛋白重组生产的最佳方法。在下文中，将以江苏创健医疗科技股份有限公司（简称创健医疗）的重组人源化XVII型胶原蛋白（以下若非特别说明，创健医疗重组XVII型胶原蛋白均指其重组人源化XVII型胶原蛋白）的设计与生产为例进行详细介绍和说明。

#### 案例介绍 —— 创健医疗

创健医疗成立于2015年，是一家临床医学导向的重组胶原蛋白全产业链平台型企业，拥有生物合成平台及医疗器械转化平台，专注新型生物材料与创新蛋白、核酸药品、食品的研发、生产与销售，在重组胶原蛋白领域拥有5项授权重组胶原蛋白核心序列专利。创健医疗也是YYT 1849-2022《重组胶原蛋白》、YYT 1888-2023《重组人源化胶原蛋白》行业标准的起草单位之一，也是《重组胶原蛋白原料质量要求及功效评价方法》团体标准（编号：T/ZGKSL 005—2023）的牵头单位。

创健医疗目前已经先后实现了重组I、II、III、XVII型胶原蛋白的规模化和标准化生产。针对重组XVII型胶原蛋白提取，创健医疗通过技术创新，克服了重组人XVII型胶原蛋白序列（非单一性）的优化选取难题、在毕赤酵母分泌表达效率不高、现有重组人XVII型胶原蛋白仅有细胞黏附活性、现有重组人XVII型胶原蛋白未能规模化制备生产等技术问题，成功实现在毕赤酵母中的重组人XVII型胶原蛋白的规模化、高密度、高表达的发酵生产和纯化<sup>[171]</sup>。

创健医疗通过重组XVII型胶原蛋白，为胶原蛋白的生产提供了一个更加可持续和环保的选择，充分体现了公司积极践行绿色可持续发展理念的行动。此外，创健医疗还注重将环保理念贯穿于产品的全生命周期中，并实施了产品全生命周期碳盘查。公司目前已获得ISO 14064公司温室气体排查申明和ISO 14067产品碳足迹认证，并采取了减排措施，积极推动绿色办公和绿色运营。目前，创健医疗正在积极申报省级绿色工厂，以进一步推动公司的绿色发展。

### 4.6.2 真核微生物酵母表达体系

如前所述，现有重组蛋白主要由原核（大肠杆菌）表达体系，酵母表达体系、植物表达体系、昆虫细胞表达体系、哺乳动物或人细胞表达系统五大类表达系统进行生产。关于哺乳动物细胞表达人XVII型胶原蛋白的研究较少，且多处于实验研究阶段；最早使用原核表达（大肠杆菌、pGEX表达载体）的是非螺旋区NC16序列的融合蛋白，其余表达系统暂无成功表达人XVII型胶原蛋白的报道，尤其是毕赤酵母表达系统。其中哺乳动物细胞表达成本高、产量低，多用于高价值的药用蛋白表达生产。哺乳动物细胞表达的人XVII型胶原蛋白，无论是瞬时转染表达还是稳定转染细胞系表达，蛋白质表达量极低，同时其所使用的培养基昂贵，只能满足科学研究中微量的使用。昆虫细胞表达系统除成本高、成量低外，其翻译后修饰与人细胞差异巨大，胶原蛋白的大量生产应用一般不采用这两种方式。原核表达（大肠杆菌表达系统）的胶原蛋白没有对蛋白质的翻译后修饰，有大规模放大前景的原核表达只能是胞内表达，需要进行菌体的裂解，会有大量杂质蛋白与目的蛋白混合，对纯化工艺都有极高的要求，且原核表达体系天然带有内毒素、肽聚糖（细菌细胞壁成分），需要复杂的纯化工艺才能去除。

来源：公司官网、文献检索

#### 4.6.2 真核微生物酵母表达体系（续）

相比之下对于毕赤酵母，其是真核微生物，拥有真核生物完整的细胞器，能对翻译的蛋白质进行一定的翻译后修饰（尤其是糖基化修饰），有力支撑蛋白质生物学功能的实现。以其建立表达系统同时拥有微生物表达系统可高密度发酵生产、低的培养成本、短周期、高表达等规模化工业生产的优点；其可分泌于胞外的特性，可避免菌体裂解带来的杂质蛋白；细胞壁成分中不含内毒素、肽聚糖。并且毕赤酵母遗传背景清楚。

此外，无论是以上的哺乳动物细胞表达，还是大肠杆菌表达，均只停留于小体积实验室级别的培养、生产，还没有进行规模化生产。但重组胶原蛋白的应用前提是能够进行规模化、高密度、高表达的发酵生产和纯化，一般来说，经过500 L体积的中试发酵实验的验证方有工业级别、规模化放大生产的可能性。

综合以上考虑，创健医疗的重组人XVII型胶原蛋白生产选择具有细胞外分泌表达、易提纯，遗传稳定性高，毒素安全隐患低、有翻译后修饰活性且生产成本相对较低的毕赤酵母真核表达体系。

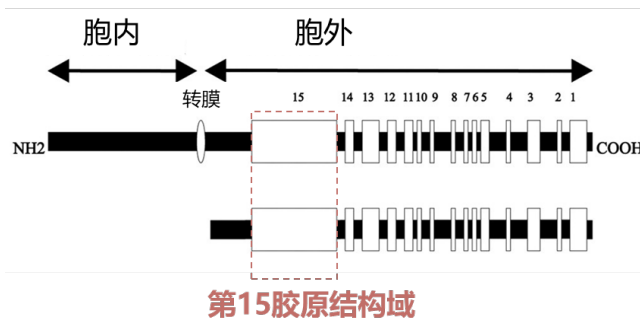
#### 4.6.3 序列设计与产品

人XVII型胶原蛋白属于跨膜类的胶原蛋白，有胞内结构域、跨膜区、胞外结构域。一般来说跨膜蛋白在真核细胞中表达时，大多数时候并不会分泌于胞外，而是会固定于细胞膜上。此外，人XVII型胶原蛋白的氨基酸序列很长（1497个氨基酸）、相应的蛋白质分子量也较大（180 kDa），理论上很难有效分泌于胞外且易于被降解。因此，要成功实现重组表达就需要进行相关序列的选取。

创健医疗研究团队从人XVII型胶原蛋白的第15胶原结构域、C末端区、中间区域等多个螺旋区序列中优化筛选后，进行序列的组合（详见下文）。组合序列与人XVII型胶原蛋白的氨基酸序列对应部分100%相同，同时实现了人XVII型胶原蛋白于毕赤酵母这种真核宿主细胞的高效分泌可溶性表达。

XVII型胶原蛋白的第15胶原结构域是其最大的胶原结构域，位置如下图所示，能有效支持角质形成细胞的黏附<sup>[172]</sup>。研究发现，第15胶原结构域的缺失导致了表皮粘附性缺陷和皮肤脆性表型。遗传学实验已经证明XVII型胶原蛋白的第15胶原结构域在体外以整合素β1依赖的方式促进细胞黏附。相关研究也已证实，重组表达后的第15胶原结构域具有更强的细胞黏附活性，并且比纤维粘连蛋白具有更强的细胞迁移活性<sup>[173]</sup>。研究表明，第15胶原结构域内的12个KGD位点（一种特殊类型的整合素结合位点）可能构成了它被角质细胞整合素识别的分子基础，具有功能的不可替代性。

XVII型胶原蛋白的第15胶原结构域的位置



来源：文献检索

### 4.6.3 序列设计与产品 (续)

从KGD活性区域的基本要素点出发进行序列设计，同时兼顾其他活性位点或片段，以及序列的稳定等因素。综合研究人员积累的研究经验，创健医疗研究人员选取人XVII型胶原蛋白α1链的5段结构域串联而成重组XVII型胶原蛋白的序列。分别是：第15胶原结构域567-619 (53 aa)；第15胶原结构域641-715 (75 aa)；第12胶原结构域906-938 (33 aa)；第11胶原结构域951-977 (27 aa)；第1胶原结构域1438-1482 (45 aa)。重组后的序列是包含10个含KGD区域序列的融合表达，同时兼容其他活性位点序列。这样的序列组合使各区域序列的功能得以集成，并不是单独分别表达而是作为一个整体进行表达，避免了重组胶原蛋白的序列单一性。

重组XVII型胶原蛋白的完整序列包含249个氨基酸（下图中上），其1-10为Strep-Tag II标签序列、11-243为XVII型胶原蛋白序列、244-249为6×His Tag标签序列，分子式： $C_{1039}H_{1589}N_{323}O_{316}S_4$ ，分子量：23789.28 Da。氨基酸序列人源分析结果显示100%同源，为重组人源化胶原蛋白。

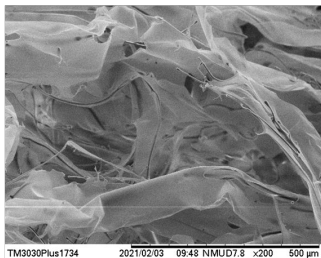
经过酵母发酵生产、分离、提纯等生产工序，利用LC-MS/MS蛋白全序列分析和Nano HPLC-MS/MS质谱肽段检测显示，氨基酸全序列分析与理论对比一致，所获得样品中含量（相对丰度）100%的蛋白为重组XVII型胶原蛋白，比对准率99.0%。经过X射线衍射测定的结构收录于PDB数据库（8K4X）。最终获得的冻干重组XVII型胶原蛋白产品如下图中的右下所示，左下为扫描电镜获得产品微观图像。

综上，创健医疗重组XVII型胶原蛋白是通过基因重组和发酵纯化技术获得的与人XVII型胶原蛋白的氨基酸序列一致的新型胶原蛋白材料，不仅实现了低丰度胶原蛋白生产的突破，同时也为满足可持续发展的目标（SDGs）的绿色化生产提供了范例。产品生物合成过程主要为：酵母菌培育→酵母发酵→蛋白纯化，产品的研发与生产不涉及任何人体或动物的组织或成分，具有非动物来源、无需溯源、蛋白序列确定、无批次差异、无动物源免疫原性、水溶性很好和可加工性极强的优点。

此外，创健医疗重组XVII型胶原蛋白还具有优异的细胞黏附活性、促细胞迁移活性以及促进组织再生和促进毛囊修复再生的生物学活性。这将在后续章节进行详细介绍。

#### 创健医疗重组XVII型胶原蛋白序列与产品

10	20	30	40	50
<b>YVWSHPQFEK</b>	<b>GSPGPKGDMG</b>	<b>SPGPKGDRGF</b>	<b>PGTPGIGPL</b>	<b>GHPGPQGPKG</b>
60	70	80	90	100
<b>QKGSVGDPMG</b>	<b>EGPGEKGERG</b>	<b>AAGEPGPHGP</b>	<b>PGVPGSVGPK</b>	<b>GSSGSPGPQG</b>
110	120	130	140	150
<b>PPGPVGLQGL</b>	<b>RGEVGLPGVK</b>	<b>GDKGPMGPPG</b>	<b>PKGDAQEKGP</b>	<b>PGPPPPPDK</b>
160	170	180	190	200
<b>GDQGPPGPRG</b>	<b>HQGEQLPGF</b>	<b>SGPPGPPGPQ</b>	<b>GPKGDKGDPG</b>	<b>VPGALGIPGP</b>
210	220	230	240	
<b>PGQKGEMGTP</b>	<b>GPKGDRGPAG</b>	<b>PPGHPGPPGP</b>	<b>RGHKGEKGDK</b>	<b>GDQHHHHHH</b>



来源：文献检索

# 第五章

## 重组XVII型胶原蛋白的生物功能性



## 5.1 安全性

### 重组XVII型胶原蛋白在正常使用条件下不会对人体和环境产生危害或危险反应、无细胞毒性

对于重组XVII型胶原蛋白的安全性，依据创健医疗重组XVII型胶原蛋白MSDS安全数据表，编号TT-RD-C-MSDS-017-00。重组XVII型胶原蛋白的安全性总结如下。

#### 创健医疗重组XVII型胶原蛋白MSDS安全数据表

 物理化学性质	<ul style="list-style-type: none"><li>• 重组XVII型胶原蛋白为固体粉末状,白色或灰白色; 无气味</li><li>• 熔点超过300 °C, 沸点/沸程超过300 °C, 相对密度1.44 g/cm<sup>3</sup> (20°C)</li><li>• 不溶于水, 溶解度小于0.1 mg/L (20 °C)。溶解于稀薄的无机酸、有机酸及极性溶剂</li><li>• 闪点超过100 °C, 可燃性不明显, 难燃, 不会自燃</li><li>• 不会发生危险反应, 如聚合反应、自身分解等。与水接触不产生可燃性气体</li></ul>
 健康危害	<ul style="list-style-type: none"><li>• 根据安全数据表危险性概述部分, 该物质不属于危险品, 正常条件下无健康危害</li><li>• 吸入: 正常条件下不产生粉尘, 即使吸入也无明显刺激性;</li><li>• 食入: 无明显毒性, 但大量食入可能引起胃肠道不适</li><li>• 眼睛接触: 无刺激性, 可立即用水冲洗</li><li>• 皮肤接触: 无刺激性, 可用水及肥皂清洗</li><li>• 暴露后无需特殊治疗, 无生命危险</li></ul>
 安全响应	<ul style="list-style-type: none"><li>• 暴露后采取一般的洗涤措施, 无需特殊的物理及化学处理</li><li>• 无需特殊的保护装备和紧急处理程序</li><li>• 避免粉尘积聚并吸入, 操作时可戴口罩</li></ul>
 稳定性&反应性	<ul style="list-style-type: none"><li>• 正常环境条件下化学稳定, 不会发生危险反应</li><li>• 避免酸、碱条件, 避免高温</li><li>• 不与其他物质发生危险反应(如聚合、分解等)</li><li>• 不属于自反应和自然分解的物质</li></ul>
 毒理学信息	<ul style="list-style-type: none"><li>• 急性毒性: 经口LD50 &gt; 15000 mg/kg (大鼠)</li><li>• 刺激性: 皮肤和眼睛无刺激性</li><li>• 致敏性: 无致敏反应</li><li>• 长期毒性: 无明确证据</li></ul>
 生态影响	<ul style="list-style-type: none"><li>• 不溶于水, 对水生生物无害</li><li>• 不会对环境产生不良影响</li><li>• 无需特殊的废弃处理方法</li></ul>

来源: 创健医疗重组XVII型胶原蛋白试验数据

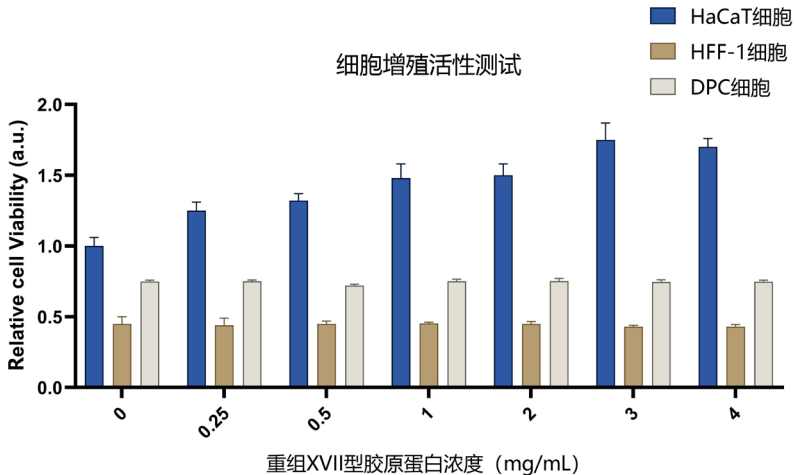
此外，研究人员通过测定吸光度的方法研究了重组XVII型胶原蛋白对人永生角质形成细胞HaCaT，人成纤维细胞HFF-1，人乳头细胞DPC三种细胞类型活力的影响，对重组XVII型胶原蛋白的细胞毒性进行了评价。

研究人员收集指数生长期的细胞，计数后，按  $1 \times 10^4$ /孔分别将HaCaT、HFF-1和DPC细胞铺于96孔板中，每组设置五个复孔；培养24 h后分别加入1 mg/mL的重组XVII型胶原蛋白；继续培养48 h后，吸掉原培养基后用PBS清洗1次，加入新鲜培养基，每孔加入10  $\mu$ L CCK8（CCK8试剂检测方法是用来测定细胞增殖或毒性实验中活细胞数目的一种高灵敏度，无放射性的比色检测法）。于37°C孵育1h后，用多功能酶标仪在波长450 nm下检测各孔的吸光度，统计分析各组的细胞活力。

研究结果如下图所示，重组XVII型胶原蛋白在0.25~4 mg/mL作用浓度梯度内，对HaCaT细胞活性均呈现促进作用趋势，无毒性作用，差异具有统计学显著性。结果表明重组XVII型胶原蛋白在一定的作用浓度下对表皮HaCaT细胞具有安全性及一定的促进增殖活性的作用趋势。重组XVII型胶原蛋白在0.25~4 mg/mL作用浓度梯度内不影响HFF-1和DPC的吸光度，无统计学差异性。因此，可以得出结论：重组XVII型胶原蛋白处理对HaCaT、HFF-1和DPC细胞均无毒性作用。

综上，根据安全数据表和细胞毒性实验，重组XVII型胶原蛋白属于安全性较高的物质，在正常使用条件下不会对人体和环境产生危害或危险反应、无细胞毒性。总体来说，重组XVII型胶原蛋白的安全性较高。

#### 重组XVII型胶原蛋白无细胞毒性



来源：创健医疗重组XVII型胶原蛋白试验数据



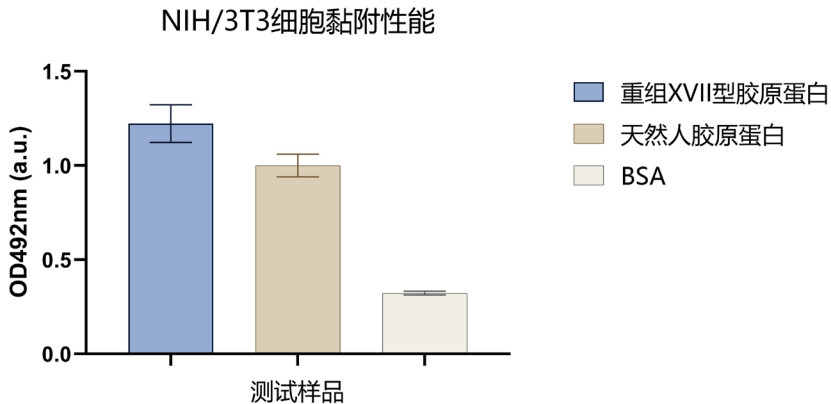
## 5.2 细胞黏附活性

### 重组XVII型胶原蛋白具有优异的细胞黏附活性

常州大学药学院功能纳米材料与生物医学检测实验室研究人员采用正常培养NIH/3T3细胞对重组XVII型胶原蛋白的黏附活性进行了评价。黏附活性检测流程参考已有研究文献<sup>[174]</sup>。取重组XVII型胶原蛋白纯化冻干品、对照人胶原蛋白及牛血清白蛋白（BSA）以纯水或1 M HCl溶液溶解，以UV蛋白定量经验公式： $C(\text{mg/mL})=0.144*(A_{215}-A_{225})$ 测定蛋白浓度，再以PBS（pH 7.4）稀释至0.5 mg/mL。向96孔细胞培养板中加入100  $\mu\text{L}$ 各种要测试的蛋白溶液，空白PBS溶液作为对照，室温静置60 min；再向每孔中加入 $10^5$ 个培养状态良好的NIH/3T3细胞，37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 孵育60 min。以PBS清洗孔中细胞4次。使用LDH检测试剂盒检测OD492nm的吸光度值，以检测细胞迁移活性。

OD492nm的吸光度相应地表征出胶原蛋白样品的细胞黏附活性：越高，说明蛋白黏附的细胞越多，黏附活性越高。研究发现（下图）重组XVII型胶原蛋白的细胞黏附活性均优于天然人胶原蛋白和BSA，说明其能在短时间内帮助细胞贴壁或黏附于细胞外基质之上，更利于构建最佳的细胞外环境。

### 重组XVII型胶原蛋白具有好的促细胞黏附活性



来源：创健医疗重组XVII型胶原蛋白试验数据

## 5.3 促细胞迁移活性

### 重组XVII型胶原蛋白具有促细胞迁移活性

细胞迁移在多细胞生物体的发育和组织维持过程中发挥着基础性作用，而细胞迁移异常则存在于癌症和动脉粥样硬化等多种病理疾病中。细胞迁移包括单个细胞、细胞片或细胞簇从一个位置向另一个位置的移动。迁移可分为两大类：单细胞迁移和细胞集体迁移。在细胞集体迁移过程中，多个细胞在细胞-细胞粘附、细胞集体极化、细胞骨架活动协调以及化学和机械线索的调控下进行协调运动。

体外细胞迁移实验是细胞迁移研究的核心方法，可以运行研究人员在受控实验条件下量化细胞迁移能力。划痕或伤口愈合试验成本低、实验设计简单，是研究细胞迁移的首选方法。划痕试验具体原理为在多孔测定板中使细胞单层生长至汇合，在单层细胞中形成一个“缺口”（无细胞区域），细胞可以迁移至其中，监测划痕区域的重新定植情况，以量化细胞迁移。在划痕实验中，有多种量化方法可用于评估细胞的集体迁移。最常见的方法侧重于“缺口”宽度或面积变化，迁移率c可通过特定时间点的“缺口”面积百分比来间接评估。一般用下式计算，其中， $A(t)$ 为t时刻无细胞空白区域面积， $A(0)$ 为初始时的无细胞空白区域面积。

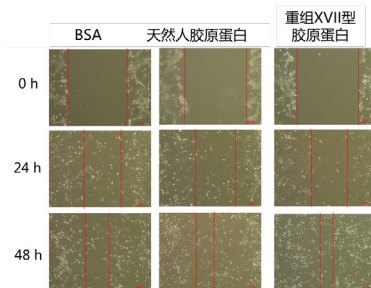
$$C = \left(1 - \frac{A(t)}{A(0)}\right) \times 100\%$$

因此，体外细胞迁移实验在一定程度上模拟了体内细胞迁移的过程，可以直接反映了细胞与胞外基质，及基质影响下细胞之间的相互作用。参考上述细胞迁移活性实验流程<sup>[175]</sup>，常州大学药学院功能纳米材料与生物医学检测实验室研究人员研究了重组XVII型胶原蛋白对细胞迁移活性的影响。

取重组XVII型胶原蛋白纯化冻干品、对照人胶原蛋白及牛血清白蛋白（BSA）溶解，测定蛋白浓度，再以DMEM无血清培养（GIBCO, pH 7.4）稀释至0.5 mg/mL（稀释后，调节其pH稳定于7.0~7.4）。正常培养、传代NIH/3T3细胞。将状态良好的细胞接入6孔板，每孔按照 $2 \times 10^4$ 细胞/mL密度接种2 mL细胞悬液，培养36 h。用200  $\mu$ L枪头制备划痕，用PBS清洗细胞3次，去除划下的细胞。于孔中加入DMEM无血清培养基稀释的蛋白溶液，继续放入37  $^{\circ}$ C、5%  $CO_2$ 培养箱培养，0、24、48 h取样、拍照。使用Image J软件对细胞迁移的图片进行处理，获得初始划痕面积和无细胞空白区域面积数据（两红线内的面积），计算迁移率c。

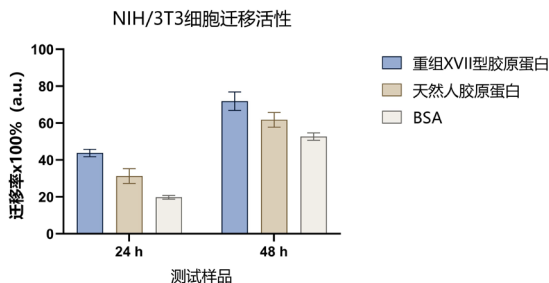
在此实验体系中，细胞迁移活性可以有效表征胶原蛋白生物学活性的指标，迁移率越高，速度越快，胶原蛋白的生物学活性越佳。如左图所示的不同时间下拍摄的细胞迁移实际对比图（量化两红色线内的“缺口”区域）及右图所示的计算细胞迁移率c（Image J计算无细胞空白区域）的比较可知，重组XVII型胶原蛋白均有比天然人胶原蛋白更优的细胞迁移活性。

划痕实验检测重组XVII型胶原蛋白促细胞迁移活性



来源：文献检索、创健医疗重组XVII型胶原蛋白试验数据

重组XVII型胶原蛋白具有促细胞迁移活性



## 5.4 调节毛囊和皮肤细胞相关功能基因

### 重组XVII型胶原蛋白能够促毛囊修复再生

通过将1 mg/ml重组XVII型胶原蛋白作用于人永生生化角质形成细胞HaCaT, 人成纤维细胞HFF-1, 人乳头细胞DPC三种细胞, 与不进行任何处理的空白对照组的基因表达差异进行比较, 来评价重组XVII型胶原蛋白对毛囊和皮肤相关功能基因的影响。

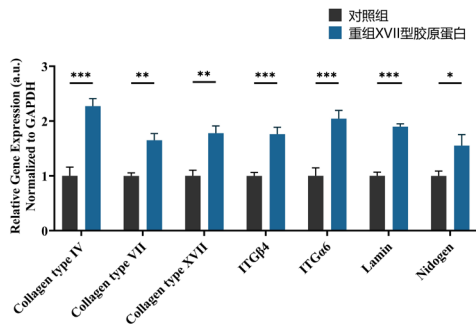
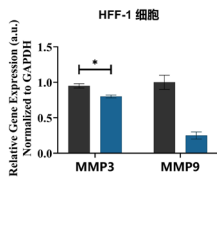
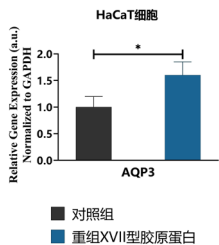
实验室冻存的HaCaT细胞和DPC细胞采用含有10%胎牛血清、1%双抗DMEM培养基进行复苏, 实验室冻存的HFF-1细胞采用含有15%的胎牛血清、1%双抗的DMEM培养基进行复苏, 随后置于含有5% CO<sub>2</sub>的37 °C恒温培养箱孵育。待细胞培养密度达到培养皿70%~80%时, 用胰酶在37 °C下消化细胞并离心收集细胞, 重悬铺板进行传代, 48~72 h传代一次, 传代比例为1:3。随后采用实时定量PCR (qRT-PCR) 分别检测重组XVII型胶原蛋白处理对HaCaT、HFF-1和DPC细胞相关功能基因表达的影响。

在HaCaT中检测AQP3基因表达, 在HFF-1细胞中检测胶原相关基因Col1A1、Col1A2、Col3A1、MMP3、MMP9表达, 在DPC中检测Wnt/ $\beta$ -catenin通路相关基因Wnt10a、LEF1、 $\beta$ -catenin和Axin2表达和VEGF通路相关基因VEGFA表达。其中Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路具有调控毛发生长周期、促进毛囊分化的作用。结果左如图所示, 重组XVII型胶原蛋白处理能够促进HaCaT细胞AQP3基因表达, AQP3是水通道转运蛋白, 有利于改善皮肤屏障功能; 在HFF-1细胞中发现, 重组XVII型胶原蛋白处理能够下调HFF-1中MMP3和MMP9基因表达, 说明重组XVII型胶原蛋白处理能够抑制基质金属蛋白酶表达, 可能对抑制胞外基质胶原降解产生作用。

在另外一项关于重组XVII型胶原蛋白影响HaCaT相关基因研究中, 将0.05%重组XVII型胶原蛋白作用于HaCaT细胞, 与不进行任何处理的空白对照组进行基因表达差异的比较。通过检测基底膜相关蛋白基因, 包括胶原蛋白基因 (IV型、VII型、XVII型胶原蛋白)、层粘连蛋白Laminin5、整合素ITG- $\beta$ 4及巢蛋白Nidogen的表达, 探究重组XVII型胶原蛋白对基底膜的影响。结果发现, 如右图所示, 0.05%重组XVII型胶原蛋白可显著促进HaCaT细胞COL7 (P<0.001)、COL17 (P<0.05) 基因表达, 并显著促进整合素ITG- $\beta$ 4 (P<0.05)、层粘连蛋白Laminin5 (P<0.0001)、巢蛋白Nidogen (P<0.01) 基因表达。上述结果提示重组XVII型胶原蛋白具有维持基底膜结构稳定从而保护基底膜的作用。

### 重组XVII型胶原蛋白调节细胞AQP3等基因表达

### 重组XVII型胶原蛋白促进基底膜相关基因表达



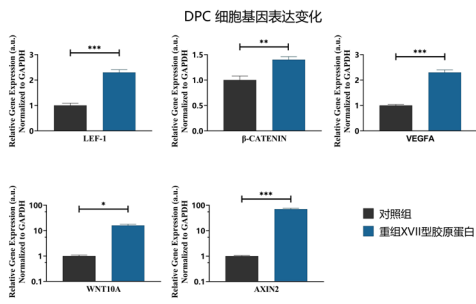
来源: 创健医疗重组XVII型胶原蛋白试验数据

在DPC中，经初步实验结果显示，如左图所示，在用1mg/mL重组XVII型胶原蛋白处理能够上调DPC中LEF1（Lymphoid Enhancer Binding Factor 1，淋巴样增强子结合因子1，主要参与典型的Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路）、 $\beta$ -catenin（ $\beta$ -连环蛋白，是一种多功能蛋白质，Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路中关键转录因子）、VEGFA基因的表达。Wnt10a和Axin2基因表达也显著上调（左图），初步提示重组XVII型胶原蛋白处理能够促进DPC中Wnt/ $\beta$ -catenin和VEGF通路基因表达。

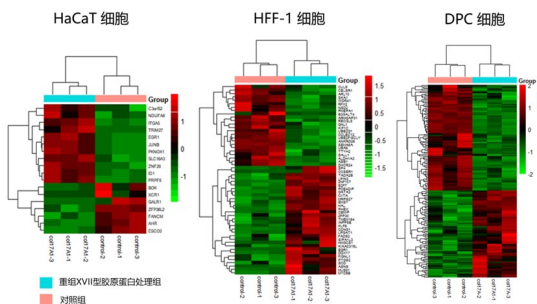
更详细地，研究人员对重组XVII型胶原蛋白处理后的将HaCaT、HFF-1和DPC细胞样品进行RNA-seq转录组学测序。

- 对重组XVII型胶原蛋白处理HaCaT细胞筛选出差异表达基因（DEG）进行层次聚类分析，热图显示（右图）了差异表达基因的聚类关系，并且显示对照组和处理组内部差异性小，样品一致性较好。重组XVII型胶原蛋白处理筛选出差异表达基因有18个，其中上调的基因有11个，下调的基因有7个。对差异表达基因进行KEGG通路功能富集分析，结果显示重组XVII型胶原蛋白处理HaCaT细胞后，差异表达基因显著富集的通路有PI3K-Akt通路、糖皮质激素受体调节网络、发育生物学相关通路、趋化因子和细胞因子介导的炎症信号通路和细胞凋亡信号通路。其中，重组XVII型胶原蛋白处理HaCaT细胞后，筛选出来基因表达变化排名靠前的分别是下调的E2F1和上调的KLF7。有文献报道，E2F1参与细胞衰老进程，而KLF7是维持皮肤表皮再上皮化、角质形成细胞更新的重要转录因子。
- 同样情况下，重组XVII型胶原蛋白处理HFF-1细胞24 h，热图显示（右图）了差异表达基因间的聚类层次关系。重组XVII型胶原蛋白处理HFF-1细胞差异表达基因有56个，上调的有32个，下调的有24个。进一步对差异表达基因功能富集分析，重组XVII型胶原蛋白处理HFF-1细胞，差异表达基因显著富集的通路有VEGF信号通路、TGF- $\beta$ 信号通路、GnRH信号通路、脂肪酸代谢和AMPK信号通路。其中，重组XVII型胶原蛋白处理HFF-1细胞，筛选出来基因表达变化排名靠前的分别是上调的MT-CYB和TGF- $\beta$ 。MT-CYB是细胞色素c还原酶复合物（即细胞色素bc1复合体）亚基，参与线粒体呼吸链复合体电子传递，对最终ATP的合成至关重要。TGF- $\beta$ 信号通路参与胶原合成的调控，能够促进胶原的合成。
- 重组XVII型胶原蛋白处理DPC细胞24 h，结果显示（右图），重组XVII型胶原蛋白处理差异表达基因有162个，上调的有73个，下调的有89个。进一步对差异表达基因进行功能富集分析，重组XVII型胶原蛋白处理DPC细胞，筛选出来基因表达变化排名靠前的分别是上调的MT-CYB和 $\beta$ -catenin。已有文献报道，Wnt- $\beta$ -catenin信号通路能促进DPC细胞增殖，调控毛发生长。

### 重组XVII型胶原蛋白促进Wnt等相关基因表达



### 重组XVII型胶原蛋白处理细胞后转录组差异基因分析

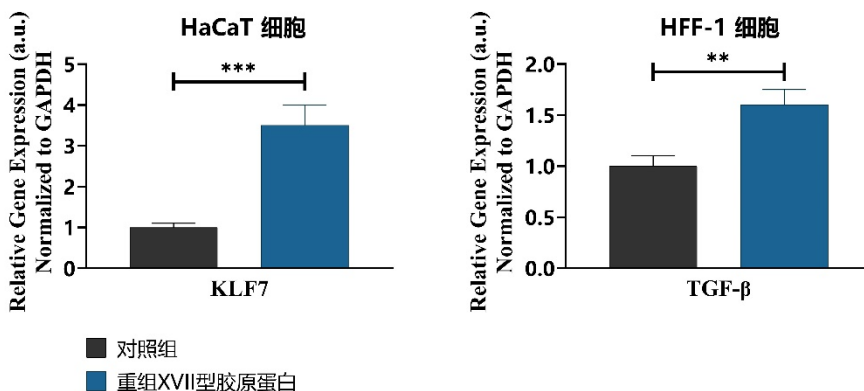


来源：创健医疗重组XVII型胶原蛋白试验数据

综合上述分析结果，结合RT-qPCR实验结果（右图）表明，重组XVII型胶原蛋白处理HaCaT细胞，能够分别下调E2F1基因表达和上调KLF7基因表达；重组XVII型胶原蛋白处理HFF-1细胞，能够分别上调MTCYB和TGFβ-1基因表达；重组XVII型胶原蛋白处理DPC细胞，能够分别上调MT-CYB和β-catenin基因表达。结果进一步表明，重组XVII型胶原蛋白可能通过上调HaCaT细胞KLF7表达来促进细胞增殖和表皮再上皮化；重组XVII型胶原蛋白可能通过上调HFF-1细胞TGF-β表达来促进胶原合成；重组XVII型胶原蛋白可能通过上调DPC细胞β-catenin表达来调控细胞周期进程。

因此，重组XVII型胶原蛋白可以通过调节Wnt/β-catenin和VEGF通路基因的表达，调控毛囊生长发育相关信号通路；同时也可以通过参与调节基底膜相关基因、E2F1和KLF7等基因的表达影响皮肤细胞。

#### 重组XVII型胶原蛋白处理细胞后RT-PCR实验证实



来源：创健医疗重组XVII型胶原蛋白试验数据

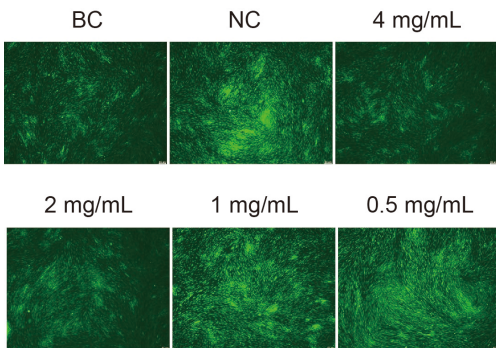
## 5.5 提升抗活性氧（ROS）能力

### 重组XVII型胶原蛋白可以通过促进细胞抗活性氧（ROS）能力的提升来延迟紫外线照射导致的皮肤衰老

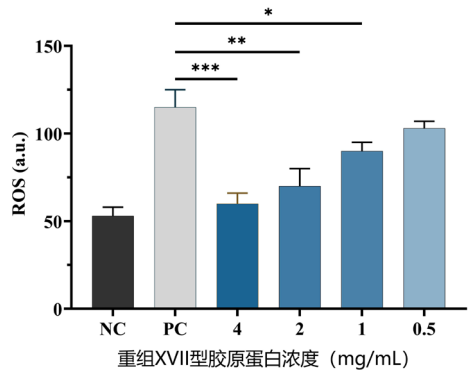
由紫外光（UV light）照射引起的ROS（活性氧）水平上升，会导致：① 基质金属蛋白酶（MMPs）的表达量上升，造成体内胶原蛋白降解量增加；② 引起炎症细胞因子表达量增加，使皮肤产生炎症反应；③ 转化生长因子 $\beta$ （TGF- $\beta$ ）信号通路受到抑制，体内胶原蛋白的合成量降低。因此，避免光照后产生过量的ROS是防止光衰老的重要手段。

研究人员将不同浓度的重组XVII型胶原蛋白与HaCat（人永生角质细胞）共培养24小时后，检测细胞在氧化应激条件下胞内ROS的水平，结果发现，浓度1 mg/mL、2 mg/mL以及4 mg/mL的重组XVII型胶原蛋白处理后的HaCat细胞均能够显著增加对ROS形成的抵抗能力，如左图所示。显微图像中绿色荧光即为ROS探针检测到的ROS强度，荧光强度越强，ROS水平越高。随着重组XVII型胶原蛋白的增大，ROS探针发出的绿色荧光越弱，并具有统计学的显著差异性（右图），结果表明随着重组XVII型胶原蛋白浓度的提高，细胞的抗氧化能力逐渐变强。因此，重组XVII型胶原蛋白可以通过促进细胞抗活性氧（ROS）能力的提升来延迟紫外线照射导致的皮肤衰老。

重组XVII型胶原蛋白提升细胞抗ROS能力荧光图像



重组XVII型胶原蛋白提升细胞抗ROS能力统计数据



## 5.6 防皱功效

### XVII型胶原蛋白具有抗皱功效

研究人员将不同浓度的重组 XVII 型胶原蛋白加入到离体皮肤组织中，接着使用紫外线UVA 和UVB 进行联合辐照，通过检测真皮连接（Dermal-epidermal junction, DEJ）的连续性和XVII型胶原蛋白含量的变化，评价了重组 XVII 型胶原蛋白抗皱功效。

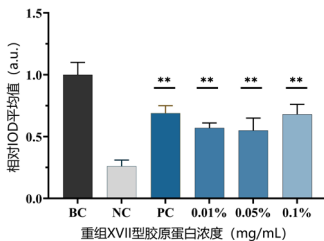
- **测试分组：**4组：① 空白组（BC）、② 阴性对照组（NC）、③ 阳性对照组（PC）、④ 实验样品组。空白组（BC）不进行辐照和给药处理；阴性对照组（NC）的离体皮肤至进行辐照不给药；阳性对照组（PC）的离体皮肤辐照后，进行100 μg/mL VC和7 μg/mL VE处理；实验组辐照后采用不同浓度的重组XVII型胶原蛋白（0.01%、0.05%、0.1%（m/v））对离体皮肤进行处理。
- **测试流程：**新鲜获得的皮肤组织浸入75%酒精中，清洗30 s，再使用无菌PBS缓冲液清洗三次；结束后，将皮肤切成24±2 mm<sup>2</sup>的组织块，表皮面向上，真皮面向下，放入培养模具中，然后将培养模具转入6孔板中，每孔加入3.7 mL 培养液，在37 °C，5% CO<sub>2</sub>孵箱中培养，每天换液。离体皮肤组织培养2天后，按照上述不同的处理条件进行分组，开始进行辐照和给药。紫外光照射剂量为UVA（30 J/cm<sup>2</sup>）和UVB（50 mJ/cm<sup>2</sup>），连续辐照4天，每次辐照完后更换新鲜培养液，并进行给药处理，阳性对照（VC+VE处理）采用液下给药的方式进行，实验样品采用表面给药的方式进行。连续辐照4天后，将离体皮肤组织继续培养3天，在此期间不进行辐照，只进行样品给药。清洗结束后，采用4%多聚甲醛固定模型，固定24 h 后，进行免疫荧光检测XVII型胶原蛋白的表达。与此同时，清洗结束后，采用4%戊二醛固定液固定模型，固定24 h 后，进行透射电镜拍照。

在用免疫荧光检测XVII型胶原蛋白含量的结果中，通过免疫积分光密度（IOD）数值来反映XVII型胶原蛋白的含量，如左图所示。与BC组相比，NC组的XVII型胶原蛋白含量显著下降，说明本次测试刺激条件有效。与NC组相比，PC（VC+VE）组的XVII型胶原蛋白含量显著上升，说明本次测试阳性对照有效。与NC组相比，样品重组XVII型胶原蛋白在0.01%、0.05%、0.1%浓度下的XVII型胶原蛋白含量均显著提升，提升率分别为119.23%、111.54%、161.54%。

在用透射电镜拍照对不同测试组的离体皮肤DEJ连续性进行分析，获取的透射电镜图像如右图所示，结果分析如下：与BC组相比，NC组的DEJ结构有损伤（有断裂），说明本次测试刺激条件有效。与NC组相比，PC（VC+VE）组的DEJ结构的连续性较好，说明本次测试阳性对照有效。与NC组相比，实验组重组XVII型胶原蛋白在不同浓度处理下，离体皮肤DEJ结构的连续性均较好，说明样品对DEJ损伤具有改善作用。

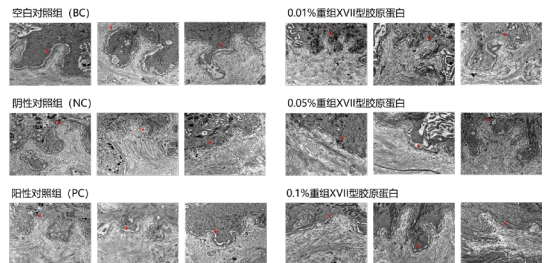
综上，基于离体皮肤组织，与对照组相比，重组XVII 型胶原蛋白在0.5 mg/mL、1 mg/mL、2 mg/mL浓度下受辐射离体皮肤的真表皮连接（DEJ）结构的连续性较好，XVII型胶原蛋白含量显著上升，提升率分别为119.23%，111.54%，161.54%。说明重组XVII 型胶原蛋白在能够改善真表皮连接（DEJ）损伤、提升XVII型胶原蛋白含量，具有抗皱功效。

#### 重组XVII型胶原蛋白提升离体皮肤胶原蛋白表达



来源：创健医疗重组XVII型胶原蛋白试验数据

#### 重组XVII型胶原蛋白提升离体皮肤的DEJ连续性



备注：红色箭头表示DEJ结构，其中NC标注的为损伤区域。

## 5.7 防脱发作用

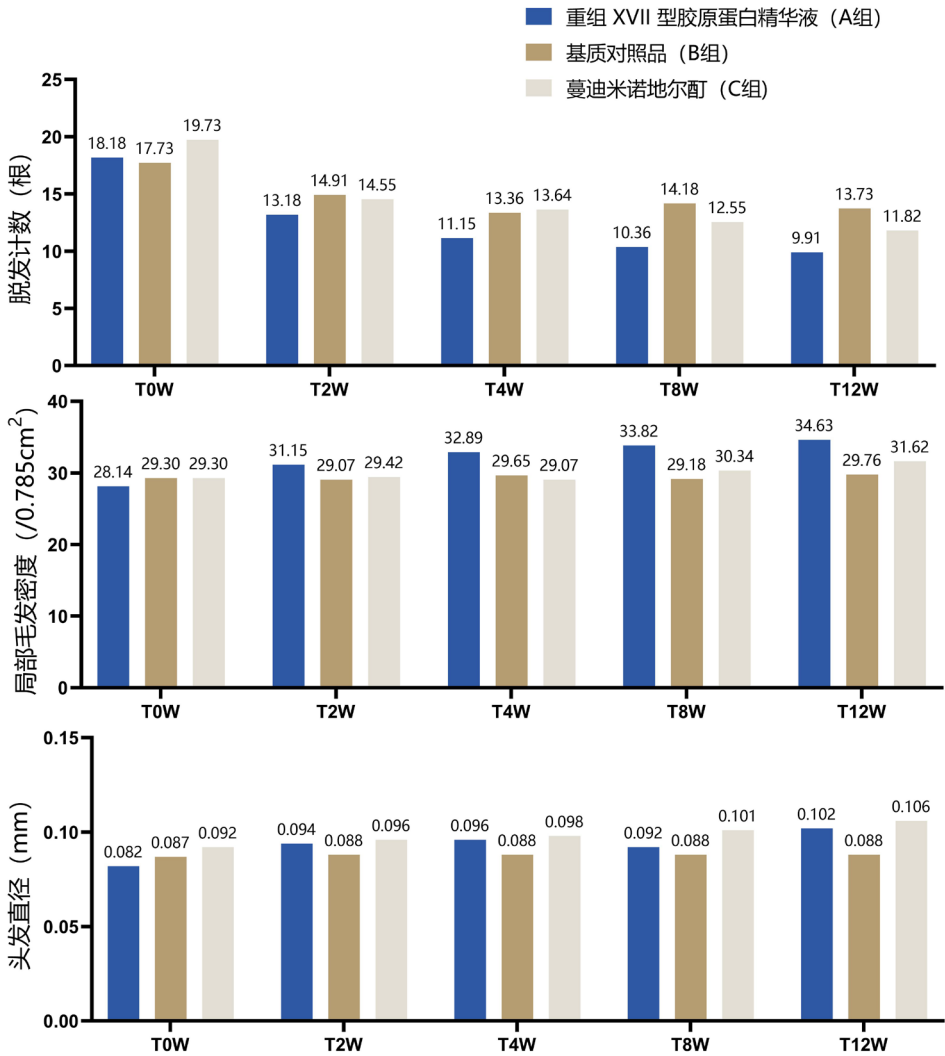
### 重组XVII型胶原蛋白具有减缓头发数量减少、增加局部毛发密度、提升头发直径的功效

在一项重组XVII型胶原蛋白人体功效评价的试验中，研究人员使用重组 XVII 型胶原蛋白精华液（A组）、重组 XVII 型胶原蛋白精华液基质对照品（B组）、蔓迪米诺地尔酊（C组，米诺地尔酊是经国家药品监督管理局批准的一种周围血管舒张药，局部使用时可刺激男性型脱发和斑秃患者的毛发生长。）作为测试样品，在人体进行了防脱发效果的测试。

- **测试分组：**A组，入组11人，共完成11个有效样本。其中女性6人，男性5人，年龄分布在34~50岁，平均年龄为 $41.7 \pm 4.9$ 岁。B组，入组11人，共完成11个有效样本。其中女性6人，男性5人，年龄分布在24~54岁，平均年龄为 $41.8 \pm 8.1$ 岁。C组，入组11人，共完成11个有效样本。其中女性7人，男性4人，年龄分布在26~49岁，平均年龄为 $39.9 \pm 6.8$ 岁。受试者头发长度均在5~40 cm之间，有脱发多和头发轻度稀疏困扰，且按60次梳发法脱发计数大于10根、2周洗脱期后仍大于10根，满足了项目需求。
- **测试流程：**测试时，重组XVII型胶原蛋白精华液、重组XVII型胶原蛋白精华液基质对照品：每天1瓶，每天使用2~3次，使用时按铝封撕开方向撕开瓶口，装上配套滴头，分开头发，均匀滴涂于头皮上，并轻柔按摩促进其吸收，用后无需清洗。蔓迪米诺地尔酊：每天1次，每次1 mL（约7喷），涂于头部患处，从患处的中心开始涂抹，并用手按摩3~5分钟，不管患处的大小如何，均使用该剂量。每天的总量不超过2 mL。
- **测试结果：**人体测试实验结果表明（数据见下一页），重组XVII型胶原蛋白具有减缓头发数量减少、增加局部毛发密度、提升头发直径的功效。
  - ① 使用产品4周、8周、12周后，重组XVII型胶原蛋白精华液和重组XVII型胶原蛋白精华液基质对照品相比，整体毛发密度 $\Delta T4W-T0W$ 、 $\Delta T8W-T0W$ 和 $\Delta T12W-T0W$ 重组XVII型胶原蛋白精华液结果均显著优于重组XVII型胶原蛋白精华液基质对照品，即重组XVII型胶原蛋白精华液整体毛发密度改善均显著大于重组XVII型胶原蛋白精华液基质对照品。
  - ② 使用产品8周、12周后，重组XVII型胶原蛋白精华液和重组XVII型胶原蛋白精华液基质对照品相比，局部毛发密度 $\Delta T8W-T0W$ 和 $\Delta T12W-T0W$ 重组XVII型胶原蛋白精华液结果均显著优于重组XVII型胶原蛋白精华液基质对照品，即重组XVII型胶原蛋白精华液局部毛发密度改善均显著大于重组XVII型胶原蛋白精华液基质对照品。
  - ③ 使用产品8周、12周后，重组XVII型胶原蛋白精华液和重组XVII型胶原蛋白精华液基质对照品相比，生长期与休止期比率 $\Delta T8W-T0W$ 和 $\Delta T12W-T0W$ 重组XVII型胶原蛋白精华液结果均显著优于重组XVII型胶原蛋白精华液基质对照品，即重组XVII型胶原蛋白精华液生长期与休止期比率改善均显著大于重组XVII型胶原蛋白精华液基质对照品。
  - ④ 使用产品12周后，重组XVII型胶原蛋白精华液和重组XVII型胶原蛋白精华液基质对照品相比，生发速度 $\Delta T12W-T2W$ 重组XVII型胶原蛋白精华液结果均显著优于重组XVII型胶原蛋白精华液基质对照品，即重组XVII型胶原蛋白精华液生发速度改善均显著大于重组XVII型胶原蛋白精华液基质对照品。
  - ⑤ 使用产品2周、4周、8周、12周后，重组XVII型胶原蛋白精华液和重组XVII型胶原蛋白精华液基质对照品相比，头发直径 $\Delta T2W-T0W$ 、 $\Delta T4W-T0W$ 、 $\Delta T8W-T0W$ 和 $\Delta T12W-T0W$ 重组XVII型胶原蛋白精华液结果均显著优于重组XVII型胶原蛋白精华液基质对照品，即重组XVII型胶原蛋白精华液头发直径改善均显著大于重组XVII型胶原蛋白精华液基质对照品。使用产品2周后，重组XVII型胶原蛋白精华液和蔓迪米诺地尔酊相比，头发直径 $\Delta T2W-T0W$ 重组XVII型胶原蛋白精华液结果显著优于蔓迪米诺地尔酊，即重组XVII型胶原蛋白精华液头发直径改善显著大于蔓迪米诺地尔酊。

来源：创健医疗重组XVII型胶原蛋白试验数据





来源：创健医疗重组XVII型胶原蛋白试验数据

## 第六章

# 重组XVII型胶原蛋白应用场景

基于前面的论述，XVII型胶原蛋白与自身免疫性水疱性皮肤病有着紧密的关联，XVII型胶原蛋白也是皮肤老化和创伤修复的关键因子，对皮肤保持“年轻态”，维持毛囊干细胞（脱发、白发等）、促进伤口修复等具有重要作用。而依赖于合成生物学技术的发展，利用DNA重组技术，通过重组表达可以产业化生产人源特性的XVII型胶原蛋白，结合本身的生物功能和活性，重组XVII型胶原蛋白在生物医疗、药物研发、护肤产品和洗护发领域，都展现出了显著的应用价值。同时，随着社会需求的不断增长，其市场前景将更加广阔。



## 6.1 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>[176]</sup>。目前，胶原蛋白替代疗法的已有研究大多集中在影响皮肤和肾脏基底膜的疾病上，包含VII型胶原蛋白针对的皮肤基底膜疾病<sup>[177]</sup>，IV型胶原蛋白针对的肾脏基底膜疾病<sup>[178]</sup>。

基于前面的论述，XVII型胶原蛋白的编码基因COL17A1其基因突变可导致某些形式的交界性大疱性表皮松解症（JEB）和一种罕见的单纯性表皮松解症亚型（EBS）。同时，5种获得性水疱病：大疱性类天疱疮（BP）、妊娠疱疹（HG）、瘢痕性类天疱疮（CP）、线状IgA大疱性皮肤病（LABD）和扁平苔藓类天疱疮（LPP）与COL17的自身免疫反应有关。研究人员可以通过以下两种方式将XVII型胶原蛋白引入患病组织：一是通过递送编码正常XVII型胶原蛋白的COL17A1基因进行蛋白质替代疗法，这是实验室研究常用的技术手段，但此方法临床应用难度高，操作难度高；二是直接递送重组XVII型胶原蛋白<sup>[179]</sup>，这也正是重组胶原蛋白用于潜在的蛋白质替代疗法的应用场景。

在2023年3月份，由常州市第一人民医院领导并提交了一项临床试验申请<sup>[180]</sup>，以评价重组XVII型胶原蛋白对皮肤大疱性疾病修复的安全性和有效性。这对重组XVII型胶原蛋白的临床应用发展起到了推动的作用。在其他将重组胶原蛋白用于蛋白质疗法的已有研究方面，Remington等将重组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型胶原蛋白抗体的形成<sup>[181]</sup>。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>[182]</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胶原蛋白以改善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公司与2020年开始了治疗VII型胶原突变的RDEB（隐性营养不良大疱性表皮松解症，Recessive dystrophic epidermolysis bullosa, 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>[183]</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。

但是，目前重组胶原蛋白的蛋白质替代疗法的发展仍然受许多问题制约，主要有以下方面原因：

- 存在于溶液中的VII型胶原蛋白的斯托克斯半径很大，因此，胶原蛋白不可能轻易扩散到靶组织部位，同时具有高亲和性的胶原蛋白其有可能产生不希望看到的聚集现象
- 有些胶原蛋白必须通过自组装形成功能性锚定纤维，外源性重组胶原蛋白如果是经皮肤或静脉内注射的方式进行递送，这类自组装的复杂过程一般不太可能发生。Supp等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<sup>[184]</sup>
- 需要考虑胶原蛋白的半衰期。胶原蛋白在体内的半衰期约为1个月<sup>[185]</sup>，因此为取得有积极意义的长期作用必须频繁地大量注射
- 静脉注射胶原蛋白可能会引起血小板聚集作用。虽然体内实验表明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VII型胶原蛋白会触发血凝块形成的可能性<sup>[186]</sup>。因此，对于其重组VII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。到目前为止仍未确定这种方法的有效性，也并未解决其可能引起的血小板聚集、扩散和激活等问题。以上这些问题，也是重组XVII型胶原蛋白在使用时需要考虑和解决的

重组胶原蛋白替代疗法在治疗胶原基因突变引起的疾病时，治疗时间的选择也是需要考虑的另一个关键因素。如果胶原蛋白是作用于形成早期胚胎发育时的组织模板，那么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骼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>[187]</sup>。

来源：文献检索

## 6.2 在医药产品中的应用

### 重组胶原蛋白可用于修复皱纹和疤痕

目前已经有研究证实，通过注射法将胶原蛋白注入面部组织，可以缓解组织内胶原蛋白的流失和真皮层的变薄，诱导组织内胶原蛋白再生，修复弹性纤维的结构，增加皮肤表面积，改善皮肤的紧致度、修复面部的皱纹等面部缺陷。例如，将Cosmoderm胶原蛋白溶液注射在真皮乳突层，可以淡化眼眶周围及口周的细小皱纹<sup>[188]</sup>。将Dermalogen和Cosmoplast胶原蛋白溶液注射在真皮层的中深部，可以淡化消除面部较深的鼻唇纹、法令纹、口周纹和眉间纹等，这些部位的皮肤相对活动度较小，注射药物分布均匀，不易出现局部沉积，淡化效果可达90%，有效时间约为1年<sup>[189]</sup>。

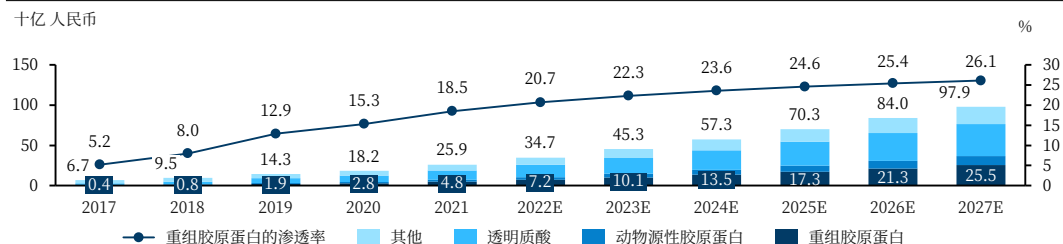
鉴于XVII型胶原蛋白在皮肤中的表达与角质形成细胞向基底膜的黏附密切相关，与皮肤的“年轻态”密切相关，研发含有重组XVII型胶原蛋白的产品，有望进一步提高胶原蛋白制剂的效果。

### 重组胶原蛋白可作为医用敷料

将范围扩充至整个胶原蛋白家族，胶原蛋白作为一种天然的生物医学材料，其开发产品被广泛用于医用敷料，特别是用于治疗烧伤、烫伤、止血等。研究表明经改性的胶原蛋白在医用敷料的使用过程中可防止伤口热量和水分的损失。此外，胶原蛋白还可以为机体提供临时性的生物屏障，避免伤口直接接触外界的刺激，促进伤口的愈合<sup>[190]</sup>，水凝胶、胶原贴剂、胶原海绵等都是比较常见的改性胶原蛋白敷料。例如，利用互贯网络技术以重组I型胶原蛋白为原料制成的海绵，作为医用敷料使用时，具有良好的透气性，能有效地促进血液凝固，可用于创口止血，加快创口的愈合。张自强等人对胶原海绵的创伤止血效果进行了研究，他们用两种胶原蛋白海绵测试鼠静脉出血和生物相容性，结果表明胶原蛋白的水解产物胶原海绵对静脉出血有明显的止血效果作用，还能促进伤口愈合<sup>[191]</sup>。靳少锋等人证明了胶原海绵具有良好的生物相容性，是一种止血效果显著的止血材料<sup>[192]</sup>。张斌杰等将II型、III型重组人源胶原蛋白用于深度烧伤患者创面的愈合中，结果表明II型、III型重组人源胶原蛋白能够将患者因烧伤所致断裂的胶原纤维重新连接起来，合成新的III型人源胶原蛋白，促进创面的愈合，减少瘢痕增生<sup>[193]</sup>。羊剑秋等研究了III型重组胶原蛋白对皮肤创口愈合的疗效，结果显示重组人源III型胶原蛋白功能凝胶可有效加速创口愈合，抑制瘢痕产生<sup>[194]</sup>。

中国医用敷料市场的市场规模随着皮肤修护需求的增长，医用敷料市场也表现出强劲增长。中国医用敷料的市场规模从2017年的67亿人民币增至2021年的259亿人民币，预计将在2027年增长至979亿人民币。基于重组胶原蛋白的医用敷料在整个医用敷料市场的渗透率从2017年的5.2%增至2021年的18.5%，预计到2027年将进一步增至26.1%。基于重组胶原蛋白的医用敷料的市场规模2021年为48亿人民币，预计将在2027年增长至255亿人民币。

中国医用敷料市场的市场规模（按零售额统计），2017-2027E



来源：文献检索，沙利文分析

## 重组XVII型胶原蛋白可作为医用敷料

如前文所述，XVII型胶原蛋白在皮肤创伤修复中的增殖与修复发挥着重要作用。该阶段的重点在于创面再上皮化，血管的生成及肉芽组织的形成。如果基底膜未受损，表皮细胞向上迁移修复创面。如基底膜被破坏，则位于创面边缘或来源于皮肤附属器的表皮细胞在活化的血小板和巨噬细胞所产生的表皮生长因子（EGF）和转化生长因子 $\alpha$ （TGF- $\alpha$ ）的刺激下向创面中心增殖，最终覆盖创面，这一过程也就是前述的再上皮化。在正常皮肤中，角质形成细胞通过与成纤维细胞相互作用维持皮肤稳态<sup>[195]</sup>。在过去的研究中，已经证实，在创伤修复过程中，胶原蛋白能够促进创面再上皮化。也有研究结果显示认为，在人类皮肤等价物中，胶原聚集物能够刺激角质形成细胞的增殖，促进表皮层的形成<sup>[196]</sup>。此外也有文献报道，稳定的胶原基质敷料可改善创面上皮化<sup>[197]</sup>。

XVII型胶原蛋白目前已经证实可以通过影响干细胞的群体动力学和迁移来加速伤口愈合。对于重组XVII型胶原蛋白，其也具有促细胞迁移活性以及优异组织再生结合的生物活性。同时，胶原蛋白分子本身含有丰富的甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸和天门冬氨酸，可以作为皮肤细胞的营养成分，有利于上皮细胞的增生修复，促进创面愈合，加快皮肤新陈代谢。因此基于重组XVII型胶原蛋白的敷料产品有望可以进一步提升胶原蛋白在皮肤创伤修复中的作用，其研发具有广阔的市场。

作为敷料产品，重组XVII型胶原蛋白的另外一个潜在利用场景适用于减缓色素沉着性皮肤病。表皮基层细胞中的黑色素细胞合成分泌的黑色素可以吸收紫外线、减轻日光辐射和皮肤损伤，但黑色素表达过量会在角质层中形成色素沉积，引发雀斑、老人斑、色素痣和太田痣等色素沉着性皮肤病<sup>[198]</sup>。黄褐斑是亚洲女性人群面部皮肤常见的获得性色素疾病，已有研究表明，采用胶原蛋白敷贴对病患处进行冷敷可以抑制皮肤内酪氨酸的转化、酪蛋白的氧化和黑色素分泌，加快已有色素斑的消退。例如，周朝晖等发现采用胶原蛋白敷料联合口服氨甲环酸片治疗黄褐斑的起效时间和有效率明显优于单纯口服氨甲环酸片，胶原蛋白的酪氨酸残基可以减少黑色素合成和色素沉着，有效修复病变区的基底膜损伤，显著改善黄褐斑患者的皮损面积和严重程度，可在临床应用中推广<sup>[199]</sup>。

此外，近年来，激光美容技术在各类色素性皮肤病的临床治疗中应用广泛，其安全性高、瘢痕修复效果好、可根据患者需求提供个性化治疗方案，但其治疗范围无法精确，容易导致周围正常组织出现紫外线光斑和棕色斑等色素沉着副作用<sup>[200]</sup>。将胶原蛋白美容贴用于激光手术后的皮肤护理可以减轻术后色素沉着、瘢痕形成、刺痛和水肿。例如，李真真采用胶原敷贴对CO<sub>2</sub>点阵激光治疗光老化皮肤的患者进行术后护理，临床效果表明在激光治疗术后加以胶原敷贴可以长期保持胶原蛋白的天然抗氧化活性，促进色素斑点代谢，减少皮肤色素沉着，改善皮肤的弹性和肤质，治疗效果显著优于二者单独治疗<sup>[201]</sup>。虽然对于XVII型胶原蛋白在减缓色素沉着方面的研究还有欠缺，对于重组XVII型胶原蛋白相关产品的功能性验证也不完善，但相信随着研究的深入和产业的发展，重组XVII型胶原蛋白在此方面的发展空间将得到探索。



来源：文献检索

## 6.3 在护肤品中的应用

### 重组XVII型胶原蛋白有望进一步提升护肤品的抗衰、保湿等护肤功效

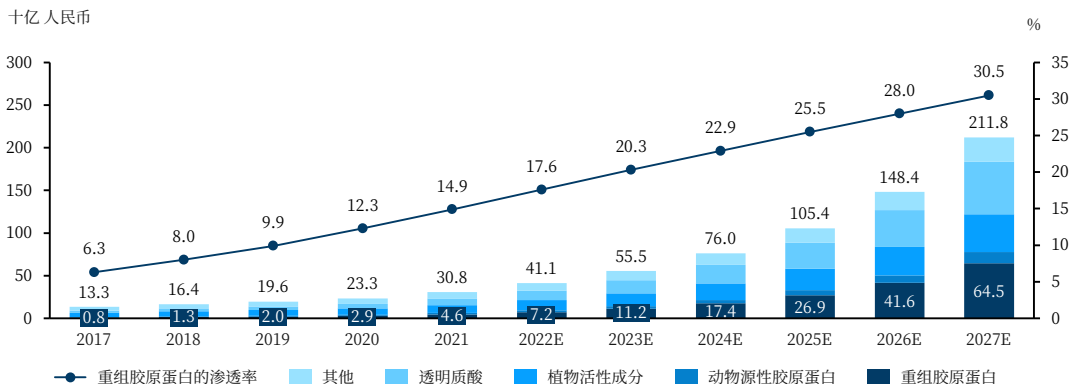
人的皮肤分为：角质层、透明层、颗粒层、棘细胞层、基底层，胶原蛋白存在于真皮层中，占皮肤组织组成的70%左右。胶原蛋白又称为“皮肤软黄金”，小分子胶原蛋白可以起到滋润肌肤的作用，同时补充皮肤所需氨基酸，修护受损肌肤。将胶原蛋白添加到化妆品中，能为皮肤提供必需的营养成分，其所含大量的亲水基团使之具有良好的保湿功效。另外胶原蛋白还能起到稳定泡沫、调节和稳定pH、乳化胶体的作用，减轻表面活性剂及酸、碱等物质对皮肤和毛发的刺激作用<sup>[202]</sup>。胶原蛋白在不同性质的化妆品中要求也不同。油性化妆品中添加的胶原多肽要求水解程度较低、分子量较大，这样相对疏水作用较强，具有较好的吸油性和乳化性；保湿型化妆品则需要酶解程度较高、分子量较小的胶原多肽，因其极性基团能形成离子键、氢键等作用力，有较好的吸水性和保水性。研究表明，营养护肤类化妆品中所添加的胶原蛋白浓度为0.01%，分子量较低时，可以保证其在皮肤内具有良好的渗透性和吸收性，并为人体皮肤提供生长所需的营养和水分<sup>[203]</sup>。

含重组胶原蛋白的化妆品品类主要包括眼膜、面膜、喷雾剂、原液、冻干粉等，将重组胶原蛋白应用于化妆品配方中，可添加0.5%的烷糖苷作为胶原蛋白保护剂，保护剂的加入有助于重组类人胶原蛋白在化妆品配方中的结构保持完整<sup>[204]</sup>。已有研究证实，在面部涂抹含有胶原蛋白的护肤品或使用胶原蛋白面膜可以使皮肤内部胶原蛋白的合成加快、活性增强，减慢皮肤的衰老周期，改善真皮和表皮的组织结构，还能有效缓解面部皮肤的细小皱纹和干燥粗糙，使皮肤更加细腻、白皙<sup>[205]</sup>。

对于重组XVII型胶原蛋白，其具有胶原蛋白家族的一般特性，同时由于其与皮肤老化密切相关，在护肤品中重组XVII型胶原蛋白有望进一步提升护肤品的抗衰、保湿等护肤功效。但在考虑抗衰功效时，需要考虑重组XVII型胶原蛋白的递送问题，分子量大的重组胶原蛋白较难渗透皮肤。一种可能的解决方法是，在保证功效的前提下，通过水解降低胶原蛋白的分子量，使其可以更好地穿透皮肤。

生物活性成分的应用带动了中国功效性护肤品市场最近几年快速增长。按零售额计的市场规模从2017年的133亿人民币增至2021年的308亿人民币，预计2027年将达到2,118亿人民币。由于重组胶原蛋白比动物源性胶原蛋白具有明显的优势，从2017年至2021年，基于重组胶原蛋白的功效性护肤品的渗透率从6.3%增至14.9%，预计将从2022年的17.6%进一步增至2027年的30.5%。基于重组胶原蛋白的功效性护肤品的市场规模从2017年的8亿人民币增至2021年的46亿人民币，预计2027年将达到645亿人民币。

中国功效性护肤品市场的市场规模（按零售额统计），2017-2027E



来源：文献检索，沙利文分析

## 6.4 在洗护发产品中的应用

### 在洗护发产品中的应用将是重组XVII型胶原蛋白最具潜力和最广阔的应用市场

头皮皮下组织的营养是头发健康的关键，真皮层中的胶原蛋白是为其提供营养的补给站。头发和皮肤一样，都是由胶原蛋白组成的，其最外层是毛鳞片，中间的皮质层含胶原蛋白，最中心的是发髓。毛鳞片是一种十分脆弱的组织，受热后容易受损，中间皮质层的胶原蛋白在受到刺激时也会被分解，头发干枯分叉主要就是缺少胶原蛋白，所以有必要及时补充胶原蛋白。胶原蛋白对头发表面的蛋白质分子有较大的亲和力，可以通过物理吸附作用与头发的表面结合。胶原蛋白耐漂洗，其亲和作用随其分子量的增大而增强，小分子量的胶原蛋白可以透过头发的皮质层，达到营养头发的作用<sup>[206]</sup>，为头发补充胶原蛋白可以促进头发的柔顺与光泽。因此含胶原蛋白水解产物的润发剂、护发霜逐渐出现在市场上。例如，英国Lux公司生产的胶原蛋白护发精华素中添加的胶原蛋白可以深入渗透发丝，有效补充头发中流失的营养物质和水分，滋润毛鳞片<sup>[207]</sup>；中国香港彩丰行有限公司生产的胶原蛋白型洗发乳中添加了水解胶原蛋白，可以在头发表面形成一层保护膜，长期有效地对头发进行锁水保湿，保持头发丰盈不黏腻，富有健康的光泽感<sup>[208]</sup>，比如胶原蛋白丝质洗发水、力士胶原蛋白保湿精华素等<sup>[209]</sup>。

健康洗发护发市场正在我国快速发展，洗发产品已从简单的清洁作用发展到护理修复、去屑止痒和防脱发、减少断发等功能，护发产品除要改善头发梳理性能外，还需赋予修护秀发、防晒、护色、防断发等功效。研究已经表明，XVII型胶原蛋白与毛囊干细胞（HFSC）和黑色素干细胞（MSC）的生态位密切相关，参与调控毛囊周期和头发生长，与白发、脱发密切相关。结合重组XVII型胶原蛋白已经证实的促进毛囊修复再生的生物学活性，重组XVII型胶原蛋白将在洗护发产品领域大放异彩。

对于重组XVII型胶原蛋白的洗护产品，除了具有基本的保湿、营养头发功能外，用户应该更关注于抗白发和防止脱发的功效。但值得说明的是，虽然XVII型胶原蛋白的表达减少与白发和脱发关系越来越清晰，但这并不意味着具有XVII型胶原蛋白或者具有生物活性的重组XVII型胶原蛋白直接涂抹于头皮或头发或通过口服摄取就会起到防止脱发或白发的作用。因此，重组XVII型胶原蛋白在洗护发产品中功效的发挥，与需要透皮的敷料类医药产品、护肤品一样，需要在其递送方面进行的深入研究和产品验证。关于重组XVII型胶原蛋白的递送途径，可以从以下3个方面进行考虑：

- 与护肤产品一样，在保证生物活性和功能的前提下，通过开发低分子量重组XVII型胶原蛋白，使其可能更好穿透皮肤，以便更好地发挥功效。
- 通过毛囊或者汗腺途径进行重组XVII型胶原蛋白的递送。2018年发表在《Frontiers in Chemistry》一篇研究，将二次谐波发生与双光子激发荧光相结合，对胶原蛋白在体内的透皮吸收动态进行可视化观察。高分辨率图像显示，大分子量的外源重组人胶原蛋白（55 kDa）通过毛囊和皮脂腺渗透表皮到达了真皮层，并实时形成网状结构。通过传统的体外皮肤扫描和组织学检查验证了这一发现。这为通过毛囊和皮脂腺的递送重组XVII型胶原蛋白提供了可能性，但这一途径仍需考虑不同组织毛囊和皮脂腺数目差异，尤其是头皮，导致的递送效率差异，以及更多相关研究的证实。
- 通过微针（Microneedles, MNs）技术对重组XVII型胶原蛋白进行精准且高效的递送，此项技术虽然专业性强且复杂度高，但其具备广泛的应用性，对医学美容应用更是具有针对性。微针这一设备，具有无痛和微创的卓越性能，能够精确无误地穿越皮肤角质层，在表皮或上部真皮层开启微米尺寸的药物输送通道。通过这一技术，重组XVII型胶原蛋白能够直接位于表皮或上部真皮层，有效地解决了肽类、蛋白类等生物大分子药物无法高效地透过皮肤角质层递送的难题。目前，由常州大学作为项目牵头单位，联合江苏创健医疗科技股份有限公司、香港中文大学、中国人民解放军海军军医大学第一附属医院、山东大学等机构共同申报的国家十四五重点研发计划“战略性科技创新合作”港澳台重点专项《重组胶原微针在皮肤抗感染修复和抗衰老方面的研究》（科技部重点研发计划项目编号：2023YFE0203500）已正式获批，并通过立项审核。该项目聚焦于通过微针技术穿透皮肤角质层，将重组胶原蛋白递送至表皮或上部真皮层，通过提升肌肤吸收率来更好地发挥胶原再生修复作用，加速皮肤抗感染修复和抗衰老。

来源：文献检索

## 参考文献

- [1] 范代娣. 胶原蛋白材料. 北京. 化学工业出版社. 2022年6月1日
- [2] Ricard-Blum S. The collagen family. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2011 Jan 1;3(1):a004978.
- [3] KIELTY, Cay M., and Michael E. Grant. "The collagen family: structure, assembly, and organization in the extracellular matrix." *Connective tissue and its heritable disorders: molecular, genetic, and medical aspects* (2002): 159-221.
- [4] Hulmes D. Building collagen molecules, fibrils, and suprafibrillar structures [J]. *Journal of Structural Biology*, 2002, 137(1-2): 2-10
- [5] Ramachandran G N, Kartha G. Structure of collagen [J]. *Nature*, 1954, 174(4423): 269-270.
- [6] Shoulders M D, Raines R T. Collagen structure and stability [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2009, 78: 929-958
- [7] 彭学宏, 郭云, 岳超, 等. 从I型到IX型人胶原蛋白 $\alpha$ 链的一级结构与氨基酸组成 [J]. *明胶科学与技术*, 2009, 29(2): 60-73
- [8] Engel J, Bächinger H P. Structure, stability and folding of the collagen triple helix [J]. *Collagen*, 2005, 247: 7-33.
- [9] Ottani V, Martini D, Franchi M, et al. Hierarchical structures in fibrillar collagens [J]. *Micron*, 2002, 33(7-8):587-596
- [10] 李八方. 水生生物胶原蛋白理论与应用. 北京: 化学工业出版社, 2014
- [11] Ricard-Blum S. The collagen family[J]. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2011, 3(1): a004978.
- [12] Stanley JR, Woodley DT, Katz SI. Identification and partial characterization of pemphigoid antigen extracted from normal human skin. *J Invest Dermatol*. 1984;82:108-11
- [13] Labib RS, Anhalt GJ, Patel HP, Mutasim DF, Diaz LA. Molecular heterogeneity of the bullous pemphigoid antigens as detected by immunoblotting. *J Immunol*. 1986;136:1231-5
- [14] Giudice GJ, Emery DJ, Diaz LA. Cloning and primary structural analysis of the bullous pemphigoid autoantigen BP180. *J Invest Dermatol*. 1992 Sep;99 (3):243-50.
- [15] Li K, Tamai K, Tan EM, Uitto J. Cloning of type XVII collagen. Complementary and genomic DNA sequences of mouse 180-kilodalton bullous pemphigoid antigen (BPAG2) predict an interrupted collagenous domain, a transmembrane segment, and unusual features in the 5'-end of the gene and the 3'-untranslated region of the mRNA. *J Biol Chem*. 1993;268:8825-34
- [16] Giudice GJ, Emery DJ, Diaz LA. Cloning and primary structural analysis of the bullous pemphigoid autoantigen BP180. *J Invest Dermatol*. 1992;99:243-50
- [17] 来源于DB数据库: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9UMD9/entry#function>
- [18] Thangavelu, P.U., Krenács, T., Dray, E. et al. In epithelial cancers, aberrant COL17A1 promoter methylation predicts its misexpression and increased invasion. *Clin Epigenet* 8, 120 (2016).
- [19] Bardhan, A., Bruckner-Tuderman, L., Chapple, L.L.C. et al. Epidermolysis bullosa. *Nat Rev Dis Primers* 6, 78 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41572-020-0210-0>
- [20] Wolf, A.M.; Nishimaki, K.; Kamimura, N.; Ohta, S. Real-Time Monitoring of Oxidative Stress in Live Mouse Skin. *J. Investig. Dermatol*. 2014, 134, 1701–1709
- [21] Tuusa, J.; Lindgren, O.; Tertsunen, H.M.; Nishie, W.; Kokkonen, N.; Huilaja, L.; Izumi, K.; Herukka, S.K.; Miettunen, J.; Shimizu, H.; et al. BP180 Autoantibodies Target Different Epitopes in Multiple Sclerosis or Alzheimer's Disease than in Bullous Pemphigoid. *J. Investig. Dermatol*. 2019, 139, 293–299.



## 参考文献

- [22] 编自J. Mol. Sci. 2021, 22, 12233.
- [23] Hirako, Y.; Usukura, J.; Nishizawa, Y.; Owaribe, K. Demonstration of the Molecular Shape of BP180, a 180-kDa Bullous Pemphigoid Antigen and its Potential for Trimer Formation. *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 13739–13745.
- [24] 编自J. Biol. Chem. 1996, 271, 13739–13745.
- [25] Nishie, W.; Natsuga, K.; Iwata, H.; Izumi, K.; Ujiie, H.; Toyonaga, E.; Hata, H.; Nakamura, H.; Shimizu, H. Context-Dependent Regulation of Collagen XVII Ectodomain Shedding in Skin. *Am. J. Pathol.* 2015, 185, 1361–1371.
- [26] 编自Acta Dermato-Venereologica 100.5 (2020): 102-107.
- [27] Tuusa, J.; Kokkonen, N.; Tasanen, K. BP180/Collagen XVII: A Molecular View. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 12233.
- [28] Fagerberg, Linn et al. “Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics.” *Molecular & cellular proteomics : MCP* vol. 13,2 (2014): 397-406. doi:10.1074/mcp.M113.035600
- [29] 数据重新分析于MCP vol. 13,2 (2014): 397-406.
- [30] <https://www.tsu.tw/pfb/jichu/xbfz/ljjg/1010.html>
- [31] 编自The Lancet 381.9863 (2013): 320-332.
- [32] Schmidt, Enno, and Detlef Zillikens. "Pemphigoid diseases." *The Lancet* 381.9863 (2013): 320-332.
- [33] Natsuga, K, Watanabe, M, Nishie, W, Shimizu, H. Life before and beyond blistering: The role of collagen XVII in epidermal physiology. *Exp Dermatol.* 2019; 28: 1135-1141.
- [34] Natsuga, K.; Watanabe, M.; Nishie, W.; Shimizu, H. Life before and Beyond Blistering: The Role of Collagen XVII in Epidermal Physiology. *Exp. Dermatol.* 2019, 28, 1135–1141.
- [35] 编自Exp. Dermatol. 2019, 28, 1135–1141
- [36] Natsuga K, Watanabe M, Nishie W, Shimizu H. Life before and beyond blistering: The role of collagen XVII in epidermal physiology. *Exp Dermatol.* 2019;28 (10):1135-1141.
- [37] Koster, J.; Geerts, D.; Favre, B.; Borradori, L.; Sonnenberg, A. Analysis of the Interactions between BP180, BP230, Plectin and the Integrin alpha6beta4 Important for Hemidesmosome Assembly. *J. Cell Sci.* 2003, 116, 387–399.
- [38] Fontao L, Tasanen K, Huber M, et al. Molecular consequences of deletion of the cytoplasmic domain of bullous pemphigoid 180 in a patient with predominant features of epidermolysis bullosa simplex. *J Invest Dermatol.* 2004;122 (1):65-72.
- [39] Li Y, Lin X, Kilani RT, Jones JC, Ghahary A. 14-3-3 sigma isoform interacts with the cytoplasmic domain of the transmembrane BP180 in keratinocytes. *J Cell Physiol.* 2007;212 (3):675-681.
- [40] Kamaguchi M, Iwata H, Nishie W, et al. The direct binding of collagen XVII and collagen IV is disrupted by pemphigoid autoantibodies. *Lab Invest.* 2019;99 (1):48-57.
- [41] Oughtred R, Stark C, Breitkreutz BJ, et al. The BioGRID interaction database: 2019 update. *Nucleic Acids Res.* 2019;47 (D1):D529-D541.
- [42] Tanimura S, Tadokoro Y, Inomata K, et al. Hair follicle stem cells provide a functional niche for melanocyte stem cells. *Cell Stem Cell.* 2011;8 (2):177-187.

## 参考文献

- [43] Watanabe M, Natsuga K, Nishie W, et al. Type XVII collagen coordinates proliferation in the interfollicular epidermis. *Elife*. 2017;6:e26635. Published 2017 Jul 11.
- [44] Niemann C, Owens DM, Hülsken J, Birchmeier W, Watt FM. Expression of DeltaN1 in mouse epidermis results in differentiation of hair follicles into squamous epidermal cysts and formation of skin tumours. *Development*. 2002;129 (1):95-109.
- [45] Lim X, Nusse R. Wnt signaling in skin development, homeostasis, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5 (2):a008029. Published 2013 Feb 1.[25] Nishie, W.; Natsuga, K.; Iwata, H.; Izumi, K.; Ujiiie, H.; Toyonaga, E.; Hata, H.; Nakamura, H.; Shimizu, H. Context-Dependent Regulation of Collagen XVII Ectodomain Shedding in Skin. *Am. J. Pathol*. 2015, 185, 1361–1371.
- [46] Liu, CC., Lin, SP., Hsu, HS. et al. Suspension survival mediated by PP2A-STAT3-Col XVII determines tumour initiation and metastasis in cancer stem cells. *Nat Commun* 7, 11798 (2016).
- [47] Nishio M, Hamada K, Kawahara K, et al. Cancer susceptibility and embryonic lethality in *Mob1a/1b* double-mutant mice. *J Clin Invest*. 2012;122 (12):4505-4518
- [48] Otsubo K, Goto H, Nishio M, et al. *MOB1-YAP1/TAZ-NKX2.1* axis controls bronchioalveolar cell differentiation, adhesion and tumour formation. *Oncogene*. 2017;36 (29):4201-4211.
- [49] Hamill KJ, Hopkinson SB, Jonkman MF, Jones JC. Type XVII collagen regulates lamellipod stability, cell motility, and signaling to *Rac1* by targeting bullous pemphigoid antigen 1e to  $\alpha 6\beta 4$  integrin. *J Biol Chem*. 2011;286 (30):26768-26780.
- [50] Qiao H, Shibaki A, Long HA, et al. Collagen XVII participates in keratinocyte adhesion to collagen IV, and in p38MAPK-dependent migration and cell signaling. *J Invest Dermatol*. 2009;129 (9):2288-2295.
- [51] Yodsurang V, Tanikawa C, Miyamoto T, Lo PHY, Hirata M, Matsuda K. Identification of a novel p53 target, COL17A1, that inhibits breast cancer cell migration and invasion. *Oncotarget*. 2017;8 (34):55790-55803.
- [52] Liu Y, Li L, Xia Y. BP180 Is Critical in the Autoimmunity of Bullous Pemphigoid. *Front Immunol*. 2017 Dec 8;8:1752.
- [53] Bagci IS, Horvath ON, Ruzicka T, Sardy M. Bullous pemphigoid. *Autoimmun Rev* (2017) 16:445–55
- [54] Pickford WJ, Gudi V, Haggart AM, Lewis BJ, Herriot R, Barker RN, et al. T cell participation in autoreactivity to NC16a epitopes in bullous pemphigoid. *Clin Exp Immunol* (2015) 180:189–200.
- [55] Di Zenzo G, Thoma-Uszynski S, Calabresi V, et al. Demonstration of epitope-spreading phenomena in bullous pemphigoid: results of a prospective multicenter study. *J Invest Dermatol*. 2011;131 (11):2271-2280.
- [56] 编自 *J Invest Dermatol*. 2011;131 (11):2271-2280.
- [57] Van den Bergh F, Giudice GJ. BP180 (type XVII collagen) and its role in cutaneous biology and disease. *Adv Dermatol*. 2003;19:37-71.
- [58] Jones, V.A.; Patel, P.M.; Gibson, F.T.; Cordova, A.; Amber, K.T. The Role of Collagen XVII in Cancer: Squamous Cell Carcinoma and Beyond. *Front. Oncol*. 2020, 10, 352.
- [59] Moilanen JM, Loffek S, Kokkonen N, Salo S, Vayrynen JP, Hurskainen T, et al. Significant role of collagen XVII and integrin  $\beta 4$  in migration and invasion of the less aggressive squamous cell carcinoma cells. *Sci Rep*. (2017) 7:45057.

## 参考文献

- [60] Tamas L, Szentkuti G, Eros M, Danos K, Brauswetter D, Szende B, et al. Differential biomarker expression in head and neck cancer correlates with anatomical localization. *Pathol Oncol Res.* (2011) 17:721–7.
- [61] Krenacs T, Kiszner G, Stelkovich E, Balla P, Teleki I, Nemeth I, et al. Collagen XVII is expressed in malignant but not in benign melanocytic tumors and it can mediate antibody induced melanoma apoptosis. *Histochem Cell Biol.* (2012) 138:653–67.
- [62] Galiger C, Loffek S, Stemmler MP, Kroeger JK, Mittapalli VR, Fauth L, et al. Targeting of cell surface proteolysis of collagen XVII impedes squamous cell carcinoma progression. *Mol Ther.* (2018) 26:17–30.[46] Liu, CC., Lin, SP., Hsu, HS. et al. Suspension survival mediated by PP2A-STAT3-Col XVII determines tumour initiation and metastasis in cancer stem cells. *Nat Commun* 7, 11798 (2016).
- [63] Parikka M, Kainulainen T, Tasanen K, Bruckner-Tuderman L, Salo T. Altered expression of collagen XVII in ameloblastomas and basal cell carcinomas. *J Oral Pathol Med.* (2001) 30:589–95.
- [64]. Stelkovich E, Korom I, Marcinovits I, Molnar J, Rasky K, Raso E, et al. Collagen XVII/BP180 protein expression in squamous cell carcinoma of the skin detected with novel monoclonal antibodies in archived tissues using tissue microarrays and digital microscopy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* (2008) 16:433–41.
- [65] Krenacs T, Kiszner G, Stelkovich E, Balla P, Teleki I, Nemeth I, et al. Collagen XVII is expressed in malignant but not in benign melanocytic tumors and it can mediate antibody induced melanoma apoptosis. *Histochem Cell Biol.* (2012) 138:653–67.
- [66] Hwang BJ, Zhang Y, Brozowski JM, Liu Z, Burette S, Lough K, et al. The dysfunction of BP180/collagen XVII in keratinocytes promotes melanoma progression. *Oncogene.* (2019) 38:7491–503.
- [67] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* (2011) 144:646–74.
- [68] Amber KT, Panganiban CM, Korta D, Feraudy S, Kelly KM, Grando SA. A case report of bullous pemphigoid associated with a melanoma and review of the literature. *Melanoma Res.* (2017) 27:65–7.
- [69] Lopez AT, Khanna T, Antonov N, Audrey-Bayan C, Geskin L. A review of bullous pemphigoid associated with PD-1 and PD-L1 inhibitors. *Int J Dermatol.* (2018) 57:664–9.
- [70] Laval S, Laklai H, Fanjul M, Pucelle M, Laurell H, Billon-Gales A, et al. Dual roles of hemidesmosomal proteins in the pancreatic epithelium: the phosphoinositide 3-kinase decides. *Oncogene.* (2014) 33:1934–44.
- [71] Moilanen JM, Kokkonen N, Loffek S, Vayrynen JP, Syvaniemi E, Hurskainen T, et al. Collagen XVII expression correlates with the invasion and metastasis of colorectal cancer. *Hum Pathol.* (2015) 46:434–42.
- [72] Liu CC, Lin SP, Hsu HS, Yang SH, Lin CH, Yang MH, et al. Suspension survival mediated by PP2A-STAT3-Col XVII determines tumour initiation and metastasis in cancer stem cells. *Nat Commun.* (2016) 7:11798.
- [73] Papay J, Krenacs T, Moldvay J, Stelkovich E, Furak J, Molnar B, et al. Immunophenotypic profiling of nonsmall cell lung cancer progression using the tissue microarray approach. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* (2007) 15:19–30.
- [74] Liu CC, Lin JH, Hsu TW, Hsu JW, Chang JW, Su K, et al. Collagen XVII/laminin-5 activates epithelial-to-mesenchymal transition and is associated with poor prognosis in lung cancer. *Oncotarget.* (2018) 9:1656–72.
- [75] Hsu HS, Liu CC, Lin JH, Hsu TW, Hsu JW, Li AF, et al. Involvement of collagen XVII in pluripotency gene expression and metabolic reprogramming of lung cancer stem cells. *J Biomed Sci.* (2020) 27:5.

## 参考文献

- [76] Otsubo K, Goto H, Nishio M, Kawamura K, Yanagi S, Nishie W, et al. MOB1-YAP1/TAZ-NKX2.1 axis controls bronchioalveolar cell differentiation, adhesion and tumour formation. *Oncogene*. (2017) 36:4201–11.
- [77] [https://mp.weixin.qq.com/s/i0d4XJdUAAa5EG2cjb\\_f\\_ag](https://mp.weixin.qq.com/s/i0d4XJdUAAa5EG2cjb_f_ag)
- [78] Hsu YC, Li L, Fuchs E. Emerging interactions between skin stem cells and their niches. *Nat Med*. 2014;20:847-56
- [79] Franco AC, Aveleira C, Cavadas C. Skin senescence: mechanisms and impact on whole-body aging. *Trends Mol Med*. 2022;28:97-109
- [80] Matsumura H, Mohri Y, Binh NT, Morinaga H, Fukuda M, Ito M. et al. Hair follicle aging is driven by transepidermal elimination of stem cells via COL17A1 proteolysis. *Science*. 2016;351:aad4395
- [81] 編自*Theranostics* 2022; 12(15):6446-6454.
- [82] Shirai K, Obara K, Tohgi N, Yamazaki A, Aki R, Hamada Y. et al. Expression of anti-aging type-XVII collagen (COL17A1/BP180) in hair follicle-associated pluripotent (HAP) stem cells during differentiation. *Tissue Cell*. 2019;59:33-8.
- [83] Raymond K, Deugnier MA, Faraldo MM, Glukhova MA. Adhesion within the stem cell niches. *Curr Opin Cell Biol*. 2009;21:623-9
- [84] Watt FM. Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. *Embo j*. 2002;21:3919-26
- [85] Green H. Terminal differentiation of cultured human epidermal cells. *Cell*. 1977;11:405-16
- [86] Park S, Kang S, Lee WJ. Menopause, Ultraviolet Exposure, and Low Water Intake Potentially Interact with the Genetic Variants Related to Collagen Metabolism Involved in Skin Wrinkle Risk in Middle-Aged Women. *Int J Environ Res Public Health*. 2021 18
- [87] Langton AK, Halai P, Griffiths CE, Sherratt MJ, Watson RE. The impact of intrinsic ageing on the protein composition of the dermal-epidermal junction. *Mech Ageing Dev*. 2016;156:14-6
- [88] Xiang Y, Liu Y, Yang Y, Yan Y, Kim AJ, Guo C. et al. Reduced expression of Collagen 17A1 in naturally aged, photoaged, and UV-irradiated human skin in vivo: Potential links to epidermal aging. *J Cell Commun Signal*. 2022
- [89] Liu N, Matsumura H, Kato T, Ichinose S, Takada A, Namiki T. et al. Stem cell competition orchestrates skin homeostasis and ageing. *Nature*. 2019;568:344-50
- [90] Laval S, Laklai H, Fanjul M, Pucelle M, Laurell H, Billon-Galés A. et al. Dual roles of hemidesmosomal proteins in the pancreatic epithelium: the phosphoinositide 3-kinase decides. *Oncogene*. 2014;33:1934-44.
- [91] Verraes S, Hornebeck W, Polette M, Borradori L, Bernard P. Respective contribution of neutrophil elastase and matrix metalloproteinase 9 in the degradation of BP180 (type XVII collagen) in human bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol*. 2001;117:1091-6
- [92] 編自*Nature*. 2019;568:344-50.
- [93] Liu N, Matsumura H, Kato T, Ichinose S, Takada A, Namiki T. et al. Stem cell competition orchestrates skin homeostasis and ageing. *Nature*. 2019;568:344-50.
- [94] Nanba D, Toki F, Asakawa K, Matsumura H, Shiraishi K, Sayama K. et al. EGFR-mediated epidermal stem cell motility drives skin regeneration through COL17A1 proteolysis. *J Cell Biol*. 2021 220

## 参考文献

- [95] Watanabe M, Natsuga K, Nishie W, Kobayashi Y, Donati G, Suzuki S. et al. Type XVII collagen coordinates proliferation in the interfollicular epidermis. *Elife*. 2017 6
- [96] Watanabe M, Kosumi H, Osada SI, et al. Type XVII collagen interacts with the aPKC-PAR complex and maintains epidermal cell polarity. *Exp Dermatol*. 2021;30 (1):62-67.
- [97] Ali NJA, Dias Gomes M, Bauer R, Brodesser S, Niemann C, Iden S. Essential Role of Polarity Protein Par3 for Epidermal Homeostasis through Regulation of Barrier Function, Keratinocyte Differentiation, and Stem Cell Maintenance. *J Invest Dermatol*. 2016;136:2406-16.
- [98] Iwata H, Kamaguchi M, Ujiie H, Nishimura M, Izumi K, Natsuga K. et al. Macropinocytosis of type XVII collagen induced by bullous pemphigoid IgG is regulated via protein kinase C. *Lab Invest*. 2016;96:1301-10
- [99] Kosumi H, Watanabe M, Shinkuma S, Nohara T, Fujimura Y, Tsukiyama T. et al. Wnt/beta-Catenin Signaling Stabilizes Hemidesmosomes in Keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2021
- [100] Nanba D, Toki F, Asakawa K, et al. EGFR-mediated epidermal stem cell motility drives skin regeneration through COL17A1 proteolysis. *J Cell Biol*. 2021;220 (11):e202012073.
- [101] 编自 *J Cell Biol*. 2021;220 (11):e202012073.
- [102] Wang Y, Kitahata H, Kosumi H, et al. Collagen XVII deficiency alters epidermal patterning. *Lab Invest*. 2022;102 (6):581-588
- [103] Cotsarelis G. Epithelial stem cells: a folliculocentric view. *J Invest Dermatol*. 2006;126:1459-68
- [104] Li KN, Tumber T. Hair follicle stem cells as a skin-organizing signaling center during adult homeostasis. *Embo j*. 2021;40:e107135
- [105] Hsu YC, Li L, Fuchs E. Emerging interactions between skin stem cells and their niches. *Nat Med*. 2014;20:847-56
- [106] 编自 *Science*. 2016;351:aad4395.
- [107] Matsumura H, Mohri Y, Binh NT, Morinaga H, Fukuda M, Ito M. et al. Hair follicle aging is driven by transepidermal elimination of stem cells via COL17A1 proteolysis. *Science*. 2016;351:aad4395.
- [108] Matsumura, H., Liu, N., Nanba, D. et al. Distinct types of stem cell divisions determine organ regeneration and aging in hair follicles. *Nat Aging* 1, 190–204 (2021).
- [109] Zheng M, Oh SH, Choi N, Choi YJ, Kim J, Sung JH. CXCL12 inhibits hair growth through CXCR4. *Biomed Pharmacother*. 2022;150:112996.
- [110] Nishimura EK, Jordan SA, Oshima H, Yoshida H, Osawa M, Moriyama M. et al. Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. *Nature*. 2002;416:854-60
- [111] Liu N, Matsumura H, Kato T, Ichinose S, Takada A, Namiki T. et al. Stem cell competition orchestrates skin homeostasis and ageing. *Nature*. 2019;568:344-50
- [112] Nishimura, E. K., Jordan, S. A., Oshima, H., Yoshida, H., Osawa, M., Moriyama, M., Jackson, I. J., Barrandon, Y., Miyachi, Y., & Nishikawa, S. (2002). Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. *Nature*, 416 (6883), 854–860.
- [113] Nishimura, E. K., Suzuki, M., Igras, V., Du, J., Lonning, S., Miyachi, Y., Roes, J., Beermann, F., & Fisher, D. E. (2010). Key roles for transforming growth factor beta in melanocyte stem cell maintenance. *Cell stem cell*, 6 (2), 130–140.

## 参考文献

- [114] Tanimura, S., Tadokoro, Y., Inomata, K., Binh, N. T., Nishie, W., Yamazaki, S., Nakauchi, H., Tanaka, Y., McMillan, J. R., Sawamura, D., Yancey, K., Shimizu, H., & Nishimura, E. K. (2011). Hair follicle stem cells provide a functional niche for melanocyte stem cells. *Cell stem cell*, 8 (2), 177-187.
- [115] 編自Cell stem cell, 8 (2), 177-187.
- [116] 編自Exp Dermatol. 2019; 28: 1135-1141.
- [117] Sun, Q., Lee, W., Hu, H. et al. Dedifferentiation maintains melanocyte stem cells in a dynamic niche. *Nature* 616, 774-782 (2023).
- [118] Sun BK, Sipsrshvili Z, Khavari PA. Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds. *Science*. 2014;346:941-5
- [119] Rousselle P, Braye F, Dayan G. Re-epithelialization of adult skin wounds: Cellular mechanisms and therapeutic strategies. *Adv Drug Deliv Rev*. 2019;146:344-65
- [120] Dekoninck S, Blanpain C. Stem cell dynamics, migration and plasticity during wound healing. *Nat Cell Biol*. 2019;21:18-24.
- [121] Blanpain C, Fuchs E. Epidermal stem cells of the skin. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2006;22:339-73
- [122] Aragona M, Dekoninck S, Rulands S, Lenglez S, Mascré G, Simons BD. et al. Defining stem cell dynamics and migration during wound healing in mouse skin epidermis. *Nat Commun*. 2017;8:14684
- [123] Fu X, Sun X, Li X, Sheng Z. Dedifferentiation of epidermal cells to stem cells in vivo. *Lancet*. 2001;358:1067-8
- [124] Mannik J, Alzayady K, Ghazizadeh S. Regeneration of multilineage skin epithelia by differentiated keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2010;130:388-97
- [125] 編自Theranostics 2022; 12(15):6446-6454.
- [126] Jackow J, Schlosser A, Sormunen R, Nystrom A, Sitaru C, Tasanen K. et al. Generation of a Functional Non-Shedding Collagen XVII Mouse Model: Relevance of Collagen XVII Shedding in Wound Healing. *J Invest Dermatol*. 2016;136:516-25
- [127] Haensel D, Jin S, Sun P, Cinco R, Dragan M, Nguyen Q. et al. Defining Epidermal Basal Cell States during Skin Homeostasis and Wound Healing Using Single-Cell Transcriptomics. *Cell Rep*. 2020;30:3932-47 e6
- [128] Hopkinson SB, Hamill KJ, Wu Y, Eisenberg JL, Hiroyasu S, Jones JC. Focal Contact and Hemidesmosomal Proteins in Keratinocyte Migration and Wound Repair. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2014;3:247-63
- [129] Wozniak MA, Modzelewska K, Kwong L, Keely PJ. Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1692:103-19
- [130] Gipson IK, Spurr-Michaud S, Tisdale A, Elwell J, Stepp MA. Redistribution of the hemidesmosome components alpha 6 beta 4 integrin and bullous pemphigoid antigens during epithelial wound healing. *Exp Cell Res*. 1993;207:86-98
- [131] Hamill KJ, Hopkinson SB, Jonkman MF, Jones JC. Type XVII collagen regulates lamellipod stability, cell motility, and signaling to Rac1 by targeting bullous pemphigoid antigen 1e to alpha6beta4 integrin. *J Biol Chem*. 2011;286:26768-80

## 参考文献

- [132] Qiao H, Shibaki A, Long HA, Wang G, Li Q, Nishie W. et al. Collagen XVII participates in keratinocyte adhesion to collagen IV, and in p38MAPK-dependent migration and cell signaling. *J Invest Dermatol*. 2009;129:2288-95
- [133] Petrie RJ, Doyle AD, Yamada KM. Random versus directionally persistent cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10:538-49
- [134] Franzke CW, Tasanen K, Schacke H, Zhou Z, Tryggvason K, Mauch C. et al. Transmembrane collagen XVII, an epithelial adhesion protein, is shed from the cell surface by ADAMs. *EMBO J*. 2002;21:5026-35
- [135] Jackow J, Loffek S, Nystrom A, Bruckner-Tuderman L, Franzke CW. Collagen XVII Shedding Suppresses Re-Epithelialization by Directing Keratinocyte Migration and Dampening mTOR Signaling. *J Invest Dermatol*. 2016;136:1031-41
- [136] Tie D, Da X, Natsuga K, Yamada N, Yamamoto O, Morita E. Bullous Pemphigoid IgG Induces Cell Dysfunction and Enhances the Motility of Epidermal Keratinocytes via Rac1/Proteasome Activation. *Front Immunol*. 2019;10:200
- [137] 傅容湛,范代娣,杨婉娟等.重组胶原蛋白的产业发展历程和生物医学应用前景展望[J].生物工程学报,2022,38 (09):3228-3242.DOI:10.13345/j.cjb.220061.
- [138] 《重组胶原蛋白生物材料命名指导原则》国家药品监督管理局2021-03-15
- [139] 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
- [140] 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.
- [141] 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.
- [142] 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]. 吉林农业大学, 2013.
- [143] 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.
- [144] 杨霞. 一种重组人源胶原蛋白及其生产方法. CN, 103122027 B, 2014.5.14.
- [145] 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.
- [146] 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.
- [147] 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.
- [148] He J, Ma XX, Zhang FL, et al. New strategy for expression of recombinant hydroxylated human collagen I (III) chains in *Pichia pastoris* GS115. *Biotechnol Appl Biochem*, 2015, 62 (3):293-299.
- [149] 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.
- [150] 钱松, 李佳佳. 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.
- [151] 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.
- [152] 侯增淼, 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.

## 参考文献

- [153] 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.
- [154] 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.
- [155] Toman PD,Chisholm G,Mc Mullin 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.
- [156] 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.
- [157] 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.
- [158] Eskelin K,Ritala A,Suntio T,et al.Production of a recombinant full-length collagen type I alpha-1 and of a 45-k Da collagen type I alpha-1 fragment in barley seeds.Plant Biotechnol J,2009,7 (7):657-672.
- [159] Stein H,Wilensky M,Tsafir Y,et al.Production of bioactive,post-translationally modified,heterotrimeric,human recombinant type-I collagen in transgenic tobacco.Biomacromolecules,2009,10 (9):2640-2645.
- [160] 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.
- [161] 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.
- [162] Pihlajamaa T,Perälä M,Vuoristo MM,et al.Characterization of recombinant human type IX collagen.J Biol Chem,1999,274 (32):22464-22468.
- [163] 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.
- [164] 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.
- [165] 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.
- [166] 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.
- [167] 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.
- [168] YY/T 1849-2022, 重组胶原蛋白[S].
- [169] <https://www.cmde.org.cn/xwdt/shpgzgg/gztg/20221229153322140.html>
- [170] YY/T 1888-2023, 重组人源化胶原蛋白[S].



## 参考文献

- [171] 李佳佳, 王丽萍, 钱松. 一种重组人XVII型胶原蛋白、制备方法和应用:CN, 113185604A.2021-05-13.
- [172] Tasanen K, Eble JA, Aumailley M, et al. Collagen XVII is destabilized by a glycine substitution mutation in the cell adhesion domain Col15. *J Biol Chem.* 2000;275 (5):3093-3099.
- [173] Nykvist P, Tasanen K, Viitasalo T, et al. The cell adhesion domain of type XVII collagen promotes integrin-mediated cell spreading by a novel mechanism. *J Biol Chem.* 2001;276 (42):38673-38679.
- [174] Juming Yao, Satoshi Yanagisawa, Tetsuo Asakura. Design, Expression and Characterization of Collagen-Like Proteins Based on the Cell Adhesive and Crosslinking Sequences Derived from Native Collagens, *J Biochem.* 136,643-649(2004).
- [175] Bobadilla, A., et al., *J R Soc Interface*, 2019. 16(151): p. 20180709.
- [176] Olavesen AH. Connective tissue and its heritable disorders. Molecular, genetic and medical aspects. *FEBS Lett*, 1993, 335 (1):141.
- [177] 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.
- [178] Lowell HB, Michael BT, Raymond RP, et al. Collagen IV replacement: EP, 3171889A4, 2018.03.14
- [179] Has C, South A, Uitto J. Molecular therapeutics in development for epidermolysis bullosa: update 2020. *Mol Diagn Ther*, 2020, 24 (3):299-309.
- [180] <https://www.chictr.org.cn/showproj.html?proj=193752>
- [181] 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.
- [182] 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.
- [183] 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>
- [184] 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.
- [185] Kuhl 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.
- [186] 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 GPIIb/IIIa (alpha 2 beta 1-integrin). *Blood*, 1994, 83 (5):1244-1250.
- [187] 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.
- [188] 陈卓, 戴霞, 陶灵, 等. 1028例双美注射去除面部皱纹的近期临床效果分析[J]. *局解手术学杂志*, 2013 (6):604-606, 607.

## 参考文献

- [189] Alster, Tina S. , and T. B. West . "Human-Derived and New Synthetic Injectable Materials for Soft-Tissue Augmentation: Current Status and Role in Cosmetic Surgery." *Plastic & Reconstructive Surgery* (2000),105 (7),2515.
- [190] 张亚飞, 逢欣雨, 叶张靖, 等. 胶原蛋白改性方法与应用[J]. 渔业研究, 2020,42 (2):185-194.
- [191] 张自强, 张以河, 安琪, 等. 胶原蛋白海绵对大鼠股静脉创伤止血效果及组织相容性观察[J]. 转化医学杂志, 2017,6 (6):350-354.
- [192] 靳少锋, 慕惠, 舒雄, 等. 复合胶原海绵材料的体内外止血效果[J]. 中国组织工程研究, 2018,22 (2):216-221.
- [193] 张斌杰, 周丽娜. 重组人源胶原蛋白凝胶联合创面磨痂术在深II度烧伤患者中的应用[J]. 广西医科大学学报, 2018 (35):49-53.
- [194] 羊剑秋, 高以红, 朱红柳. 重组人源III型胶原蛋白功能凝胶对皮肤创口愈合的疗效及其机制[J]. 山东医药, 2021 (61):80-83.
- [195] Russo B, Brembilla NC, Chizzolini C. Interplay between keratinocytes and fibroblasts: a systematic review providing a new angle for understanding skin fibrotic disorders[J]. *Front Immunol*, 2020, 11:648.
- [196] Matsuura-Hachiya Y, Arai KY, Muraguchi T, Sasaki T, Nishiyama T. Type IV collagen aggregates promote keratinocyte proliferation and formation of epidermal layer in human skin equivalents. *Exp Dermatol*. 2018;27 (5):443-448.
- [197] El Masry MS, Chaffee S, Das Ghatak P, et al. Stabilized collagen matrix dressing improves wound macrophage function and epithelialization[J]. *FASEB J*, 2019, 33 (2):2144-2155.
- [198] 彭海月, 汪婷, 李国瑞, 黄静. 黑色素的合成及小分子对其功能的调控[J]. 高等学校化学学报, 2021, 42 (11):3357-3366.
- [199] 周朝晖, 唐剑辉, 杨天赤, 等. 氨甲环酸联合黄光、胶原贴治疗黄褐斑48例临床观察[J]. 中国皮肤性病学杂志. 2016, 30 (1), 105.
- [200] 赵秀荣、陈新、李娜. 点阵CO<sub>2</sub>激光结合强脉冲光治疗中国人群的光老化皮肤临床效果及安全性研究[J]. 中国美容医学, 2021, 30 (9):103-106
- [201] 李真真. 红光联合类人胶原蛋白敷料对CO<sub>2</sub>点阵激光治疗后色素沉着的改善作用[J]. 皮肤病与性病. 2019, (6). DOI:10.3969/j.issn.1002-1310.2019.06.055.
- [202] 钱洁, 王巧娥, 程宝箴. 胶原蛋白在化妆品中的应用研究新进展[J]. 山东医药, 2021 (61):80-83.
- [203] 李双庚, 周珍萍, 崔雪娇. 胶原蛋白贴敷料在皮肤美容中的临床应用研究[J]. 医学食疗与健康, 2019 (12):211+214.
- [204] 张卉. 重组类人胶原蛋白的表达纯化及在化妆品中的应用[D]. 暨南大学硕士学位论文, 2017:40-43.
- [205] 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.
- [206] 陈静涛, 徐政, 顾其胜. 胶原蛋白研发的最新进展[J]. 上海生物医学报, 2004 (25):52-56.
- [207] Dini I, Laneri S. Nutricosmetics: A brief overview. *Phytother Res*. 2019;33 (12):3054-3063.
- [208] 陆思楠, 刘慧, 宋立美. 天然洗浴产品的现状研究[J]. 广州化工, 2021, 49 (15):19-22.
- [209] Alster TS, West TB. Human-derived and new synthetic injectable materials for soft-tissue augmentation: current status and role in cosmetic surgery. *Plast Reconstr Surg*. 2000;105 (7):2515-2528.
- [210] Sun Y, Li L, Ma S, He G, Yang W, Wang Y. In vivo Visualization of Collagen Transdermal Absorption by Second-Harmonic Generation and Two-Photon Excited Fluorescence Microscopy. *Front Chem*. 2022;10:925931.
- [211] <https://mp.weixin.qq.com/s/Su3gRrAfG1pJ2JfA32GGw>

# 法律声明

- 本报告著作权归沙利文、创健医疗所有，未经书面许可，任何机构或个人不得以任何形式翻版、复刻、发表或引用。若征得沙利文、创健医疗同意进行引用、刊发的，需在允许的范围内使用，并注明出处为“沙利文、创健医疗”，且不得对本报告进行任何有悖原意的引用、删节或修改。
- 本报告分析师具有专业研究能力，保证报告数据均来自合法合规渠道，观点产出及数据分析基于分析师对行业的客观理解，本报告不受任何第三方授意或影响。本报告数据和信息均来源于公开信息渠道，沙利文、创健医疗拥有对报告的最终解释权。
- 本报告所涉及的观点或信息仅供参考，不构成任何投资建议。本报告仅在相关法律许可的情况下发放，并仅为提供信息而发放，概不构成任何广告。在法律许可的情况下，沙利文可能会为报告中提及的企业提供或争取提供投融资或咨询等相关服务。本报告所指的公司或投资标的的价值、价格及投资收入可升可跌。
- 本报告的部分信息来源于公开资料，沙利文、创健医疗对该等信息的准确性、完整性或可靠性拥有最终解释权。本文所载的资料、意见及推测仅反映沙利文、创健医疗于发布本报告当日的判断，过往报告中的描述不应作为日后的表现依据，沙利文、创健医疗不保证本报告所含信息保持在最新状态。在不同时期，沙利文、创健医疗可发出与本文所载资料、意见及推测不一致的报告和文章。同时，沙利文、创健医疗对本报告所含信息可在不发出通知的情形下做出修改，读者应当自行关注相应的更新或修改。任何机构或个人应对其利用本报告的数据、分析、研究、部分或者全部内容所进行的一切活动负责并承担该等活动所导致的任何损失或伤害。

# 联系我们

付生伟 Shengwei Fu

江苏创健医疗科技股份有限公司先进研究中心 科学家

 电话: +86 0519-82885966

 手机: +86 18018338356

 邮箱: fushengwei@trautec.com.cn

毛化 Fred Mao

弗若斯特沙利文大中华区医疗业务合伙人兼董事总经理

 电话: +86 5407 5780 x 8608

 手机: +86 159 2139 6033

 邮箱: fred.mao@frostchina.com

知识中心 Knowledge Center

弗若斯特沙利文大中华区生命科学事业部

 电话: +86 21 3209 6800 x 8863

 手机: +86 189 1793 5734

 邮箱: hcknowledgecenter@frostchina.com

F R O S T & S U L L I V A N

沙利文