

胶原酶研究进展与应用

宋易航¹, 王楚浩¹, 方柏山^{1,2,3}

(¹ 厦门大学化学化工学院; ² 厦门市合成生物学重点实验室; ³ 福建省化学学生物学重点实验室, 福建 厦门 361000)

摘要: 胶原蛋白广泛存在于有机体生命各组织, 是构成生命体的基础性蛋白之一。胶原蛋白结构相对复杂、稳定性良好、不易受到普通蛋白酶的降解破坏。而基质金属蛋白酶和微生物胶原酶是为数不多能原位降解胶原蛋白的两类胶原酶, 能够在生理环境下保持较高酶活力从而发挥作用, 因此受到研究者的广泛关注。首先简要介绍胶原蛋白及其水解酶, 其次重点介绍基质金属蛋白酶和微生物胶原酶的发掘历程和水解机理, 然后综述这两类酶的最新研究进展及其在医疗诊治、食品加工、环境保护及组织工程等多方面的应用, 最后总结胶原酶及胶原蛋白研究现状、研究难点和未来研究方向。

关键词: 生物工程; 酶; 蛋白质; 基质金属蛋白酶; 微生物胶原酶

中图分类号: Q 814.9

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

文章编号: 0438-1157 (2019) 09-3213-15



Progress and application of collagenase research

SONG Yihang¹, WANG Chuhao¹, FANG Baishan^{1,2,3}

(¹ College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University; ² The Key Laboratory for Synthetic Biotechnology of Xiamen City, Xiamen University; ³ The Key Laboratory for Chemical Biology of Fujian Province, Xiamen 361000, Fujian, China)

Abstract: Collagen is widely distributed in various tissues of living organisms and is one of the basic proteins that constitute living organisms. The structure of collagen is more complicated than that of general protein and it displays a more stable property so that normal proteases have no significant effect to deal with it. There are only two typical enzymes have ability to hydrolyze collagen *in situ*, one is called matrix metalloproteinase (MMP) and another is bacterial collagenase. In this review the collagen and hydrolase are introduced in briefly, then the development process and the hydrolysis mechanism to collagen between matrix metalloproteinase and collagenase are presented, then the particular aspects of the different enzyme activities will be contextualized within relevant areas of application, mainly about therapeutics, food processing, environmental protection and tissue engineering. In the end the development of the present research and guide further potential research orientation of the system of collagen & collagenase is summarized.

Key words: bioengineering; enzyme; protein; matrix metalloproteinase; bacterial collagenase

收稿日期: 2019-04-01 修回日期: 2019-05-17

通信作者: 方柏山(1957—), 男, 博士, 教授, fbs@xmu.edu.cn

第一作者: 宋易航(1993—), 男, 硕士研究生, tjusyh@foxmail.com

基金项目: 国家自然科学基金项目(21336009, 41176111)

引用本文: 宋易航, 王楚浩, 方柏山. 胶原酶研究进展与应用[J]. 化工学报, 2019, 70(9): 3213-3227

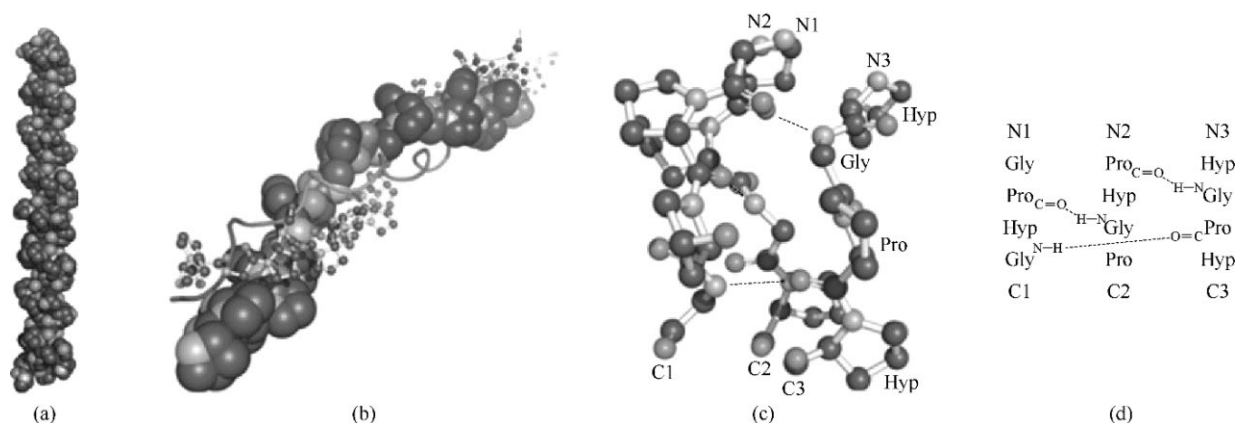
Citation: SONG Yihang, WANG Chuhao, FANG Baishan. Progress and application of collagenase research[J]. CIESC Journal, 2019, 70(9): 3213-3227

引 言

胶原蛋白来源丰富,广泛存在于动物肌腱、韧带、牙质及骨骼等组织的有机质中,对人而言,胶原蛋白占蛋白总量的三分之一以上,占皮肤总干重的四分之三以上^[1]。其中,至少有42种不同类型的多肽链可以构建28种以上不同类型的胶原蛋白(表1)^[2]。1951年Pauling等^[3]提出胶原蛋白的基本结构;1955年Rich等^[4]进一步明确其是由三条左旋的富脯氨酸链在氨基酸残基交互力的作用下形成的一条右手超螺旋蛋白(图1)。其特殊的螺旋结构和稳定的性质主要是由重复出现的“Xaa-Yaa-Gly”残基结构决定的,其中Xaa、Yaa可为任意氨基酸(最为常见的三肽单位为“Pro-Hyp-Gly”,约占胶原蛋白总量的10.5%^[5])。正是由于胶原蛋白适当的氨基酸组成、特殊的序列、巧妙的折叠、较强的氨基酸分子间氢键以及空间结构和电子效应等因素^[6-13]交互作用决定了胶原蛋白较高的热稳定性和较强的机械强度。胶原蛋白也具备自组装形成纤维结构的特殊性质(主要发生于I、II型胶原蛋白),进一步提高了胶原蛋白间的整体稳定性^[14]。

表 1 不同类型胶原蛋白举例^[1]Table 1 Several different types of collagen^[1]

类型	分类	组成	分布
I	纤维状	$\alpha 1[I]_2, \alpha 2[I]$	皮肤、骨、肌腱等
II	纤维状	$\alpha 1[II]_3$	软骨、玻璃体等
III	纤维状	$\alpha 1[III]_3$	血管、结肠等
IV	网状	$\alpha 1[IV]_2, \alpha 2[IV], \alpha 3[IV], \alpha 4[IV], \alpha 5[IV], \alpha 5[IV]_2, \alpha 6[IV]$	组织基膜等

图 1 胶原蛋白示意图^[1]Fig.1 Diagram of collagen^[1]

(a) 胶原蛋白结构示意图; (b) 沿轴向三螺旋胶原蛋白球棍示意图; (c) 胶原蛋白片段氨基酸组成球棍示意图(虚线为链间氢键); (d) 图(c)的平面示意图

胶原蛋白因其稳定而保守的螺旋结构一般不被普通蛋白酶所降解,只有在高温、极端酸碱环境下才会部分解旋发生水解。而胶原酶能够在体温附近有效解旋胶原蛋白,使其成为易被蛋白酶水解的单股肽链,因此添加胶原酶成为提高胶原蛋白水解水平的重要手段,在食品、医疗、组织工程中都有广泛的应用。关于胶原酶的确切分类尚有争议,目前将能够水解原生胶原蛋白的一类酶统一称为胶原酶,在对胶原酶活性的定量描述上,以I型或III型胶原蛋白为底物加入胶原酶相互作用,以甘氨酸或其他游离氨基酸产生的多寡来定义酶活性的高低。胶原酶来源于动物、植物或微生物中,但主要研究对象为基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)及微生物胶原酶(collagenase)两类,接下来将详细介绍两类胶原酶的发现、功能作用的异同点以及胶原蛋白与胶原酶的相关应用。

1 基质金属蛋白酶

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)是一大类依赖钙离子激活和锌离子结合催化域体现水解活性的蛋白肽链内切酶,迄今为止至少已发现该酶系28种结构相似、功能接近的酶类,其主要是脊椎动物自身基质分泌的一类酶。MMP类酶在胚胎发育、细胞形态建成、血管再生和伤口愈合等生理和病理方面发挥着重要作用^[15],甚至能在一些生理过程中改变细胞行为,例如在骨骼组织重新塑形过程中,能够激活并聚集破骨细胞发挥功能^[16]。

MMP的发现要追溯至20世纪60年代,1962年Gross等^[17]研究发现蝌蚪变态期能够产生一种降解胶原蛋白的“活性物质”,后来被证实这一类“活性物质”便是间质胶原酶,即被准确定义为胶原型基质金属蛋白酶的一类酶。在挖掘MMP酶系家族过程中,克服了纯化的困难获得了纯酶,基于技术平台和实验手段的进步明确了酶的结构特征,最终发现了MMP酶原激活的模式,对MMP调节生理功能有了更明晰的认识。其详细的发展史见表2。

MMP类胶原酶可由基质细胞、上皮细胞、巨噬细胞和白细胞等分泌^[18]。根据结构的差异和底物特异性的不同,MMP被分为六个亚族,分别是胶原酶(collagenases,包括MMP-1、MMP-8、MMP-13、MMP-18等)、明胶酶(gelatinases,MMP-2、MMP-9)、间质溶解素(stromelysins,MMP-3、MMP-10)、基质溶解因子(matrilysins,MMP-7、MMP-26)、膜型MMP(membranetype MMPs,MMP-14、MMP-15)及其他类型MMP,共同在调节生理功能中发挥着重要作用。

MMP家族酶在结构上有几个共同特征:都包含

氮端前导序列(P)、前肽结构域(Pro)、催化域(Cat)、血红结合素域(Hpx,除MMP-7及MMP-26外均含该结构域)及连接域(H,富含脯氨酸短肽,除MMP-7及MMP-26外均含该结构域)等功能域^[19],其中催化域结构高度保守,均是由五条 β 片和三条 α 螺旋组成一个边界明晰的“口袋”,可以根据“口袋”中残基的差异来判断不同的MMP类型。各结构域并非各自独立,而是具有交互作用,共同决定不同MMP的特异性,协作完成整个分子催化水解过程。结构域的相似使得不同类型的胶原酶“共享”相同的酶原激活机理,但由于催化域的关键氨基酸、结构上功能域的差异等原因,导致不同类型MMP的特异性底物不同,如胶原酶类型MMP对胶原蛋白有良好降解能力,而明胶酶类型胶原酶仅能降解明胶^[18],其结构差异如图2所示,其中除弗林蛋白酶切割位点(F)与转膜域(TM,transmembrane domain)外,各结构域上文均有记述。

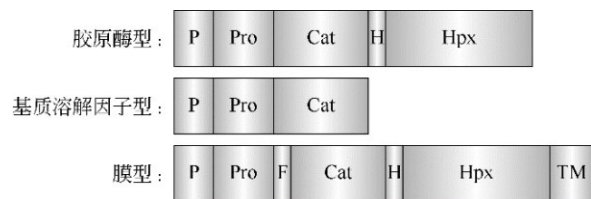
1.1 MMP酶原及活化机理

影响MMP活性的因素很多,包括但不限于基因

表2 MMP研究发展史^[18]

Table 2 Research development of MMP^[18]

时间	事件
1962年	在蝌蚪尾中发现具有胶原酶活性物质
1970年	首次纯化人类皮肤中的胶原酶
1971年	发现存在酶原形式的胶原酶
1972年	在类风湿性滑膜检测到胶原酶活性
1977年	类白介素-1活性诱导胶原酶
1979年	纯化胶原酶组织抑制剂(TIMP-1)
1980年	将IV型胶原酶活性与肿瘤转移建立联系
1984—1986年	克隆部分MMP的互补DNA及基因组
1985年	克隆TIMP-1
1988年	MMP启动子用作转录调节启动子模型,在老鼠模型中使用合成的MMPI
1989年	在美国佛罗里达召开MMP会议,会上阐述MMP-2及TIMP-2之间相互作用
1990年	解释半胱氨酸开关激活MMP活性中发挥的作用,克隆老鼠胶原酶
1992年	巴马司他(MMP组织抑制剂)用作I期临床试验
1993年	第一届MMP高登研究会议,高登会议中揭示了第一张MMP结晶结构图
1994年	鉴定出人类MMP-13、TIMP-3突变与sorbey眼底营养不良症相关,克隆膜结合MMP(MT1-MMP)
1995年	MMP-3基因敲除型小鼠模型
1996年	鉴定MMP-3启动子中单核苷酸多态性
1998年	鉴定MMP-1启动子中单核苷酸多态性
1999年	建立MT1-MMP基因敲除型小鼠模型,强力霉素(MMP组织抑制剂)获得许可
2001年	发现MMP膜型酶原激活模式
2004年	提出MMP胶原酶降解胶原蛋白方式
2006年	解析出MMP-1蛋白晶体图
2012年	构建起MMP降解胶原蛋白分子模拟图,明确了酶解作用的关键位点及功能域作用

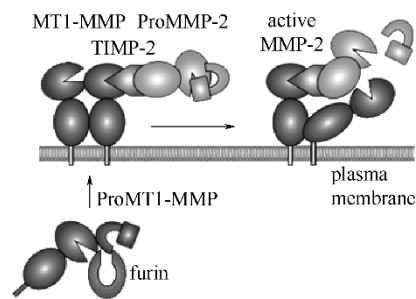
图 2 几种不同类型的 MMP 结构示意图^[18]Fig.2 Diagram of several types of MMPs^[18]

转录、转录后翻译修饰、酶原激活效率及内源性物质抑制等^[20]。研究者发现细胞因子(如白介素)、生长因子(如转化生长因子)、血小板衍生生长因子、荷尔蒙和类固醇等因素都能影响 MMP 基因的转录,能够提高或者降低 MMP 基因的转录水平。另外单核苷酸多态性也可能影响 MMP 基因调控,从而改变 MMP 的产生分泌。

在研究 MMP 酶活性调控因素的过程中, Wart 等^[21]发现了 MMP 独特的酶活性激活方式,即“半胱氨酸开关(cysteine switch)”。所有类型的 MMP 分泌时均是无酶活的酶原,而该类酶原可被某些蛋白酶水解,或由十二烷基硫酸钠和硫氰酸钠扰动改变结构,也可被重金属离子或部分氧化剂影响从而产生活性。其原理在于酶原前肽结构域(Pro)中包含一段高度保守的多肽序列“Pro - Arg - Cys - Gly - X - Pro - Asp”,其中未成对的 Cys 与催化域(Cat)中激活酶活性的锌离子产生相互作用,从而导致活性位点被屏蔽,所以只要通过物理、化学、生物手段将两域间的相互作用消除即可激活酶原产生酶活性^[18,21]。

同时 MMP 间也存在相互作用,例如 Itoh 等^[22]发现 MMP-14 可激活 MMP-2。首先 MMP-14(也被称为 MT1-MMP,属膜型 MMP)在胞内由弗林蛋白酶激活后通过跨膜功能域结合在细胞膜表面,与金属蛋白酶的抑制剂(tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMPs)氨基末端结合,而 MMP-2 酶原的血红结合素域与 TIMP 的羧基末端产生相互作用而结合,构成了 MMP-14&TIMP&MMP-2 单元。构成的复合体在空间位置上使得 MMP-14 的催化域距离 MMP-2 的前肽结构域很近,从而能够将此区域剪断,将被半胱氨酸屏蔽的催化域暴露出来从而激活酶活,其过程如图 3 所示。

组织抑制剂也是影响 MMP 酶活的重要因素,1997 年 Gomis-Rüth 等^[23]通过 X 射线晶体结构分析验证了间质溶解素-1(stromelysin-1)催化域与组织抑制剂-1(TIMP-1)构成的复合物,并发现 TIMP-1 前肽区 Cys-1 能够与 MMP 中催化域锌离子螯合从

图 3 MMP-14 激活 MMP-2 示意^[18]Fig.3 Activation of MMP-2 by MMP-14^[18]

而抑制 MMP 活性。TIMP 与 MMP 间结合区域并未像之前预测的那样多,就整体结构而言,TIMP-1 共 184 个氨基酸残基仅有 Cys1-Thr2-Cys3-Val4 和 Ser68-Val69 会与 MMP-3 催化域有一定相互作用,且结合形式与底物结合相仿。此外 TIMP 不仅作用于 MMP 抑制酶活,也能够抑制酶原形式的 MMP 激活,使其不能被其他蛋白酶或 MMP 等活化,例如 TIMP-1 能够与酶原 MMP-9 的羧基端结合,抑制其被间质溶解素类 MMP 激活,而这可能和 TIMP 以底物结合的方式与 MMP 连接有关^[24]。

1.2 MMP 催化水解胶原蛋白机理

MMP 因其在生理调控中发挥的重要作用受到研究者的广泛关注,更深入地探究 MMP 在生物体中发挥的功能作用、探究 MMP 水解胶原蛋白机理等,能够解析一些疾病的发病机理,了解人体某些组织器官代谢调控的控制途径,对人体保健、医疗卫生等相关健康行业的发展也有良好促进作用。剖析 MMP-1 水解胶原蛋白机理的难点之一在于胶原蛋白复杂的结构特征,因为胶原蛋白尤其纤维状胶原蛋白本身难溶于水,加之复杂的分层结构和较大的尺寸,使得其在生物化学和生物物理方面的研究困难重重,后来通过以序列相仿、结构相似的三螺旋胶原型多肽(CRP, collagen-related peptides)替代胶原蛋白进行研究,这一问题方得到解决^[25]。

在上述研究基础上,依旧难于完整解释其水解机理。以 MMP-1 为研究对象,通过蛋白结晶研究者发现其催化域狭缝过小[$\approx 5 \text{ \AA}$ ($1 \text{ \AA} = 0.1 \text{ nm}$,后同)],无法容纳直径约 15 \AA 的胶原蛋白(图 4),这意味着酶切位点无法与蛋白结合。而事实上根据实验结果可以得知 MMP-1 能够良好地水解胶原蛋白,将其降解为一般多肽。这一结果似乎与观测到的情况相悖。据此研究者提出 MMP 降解胶原蛋白前需将其解旋的假设,解旋后的单股胶原蛋白多肽直径小于 5 \AA ,可被 MMP-1 催化域完全包围,使得多肽链能够

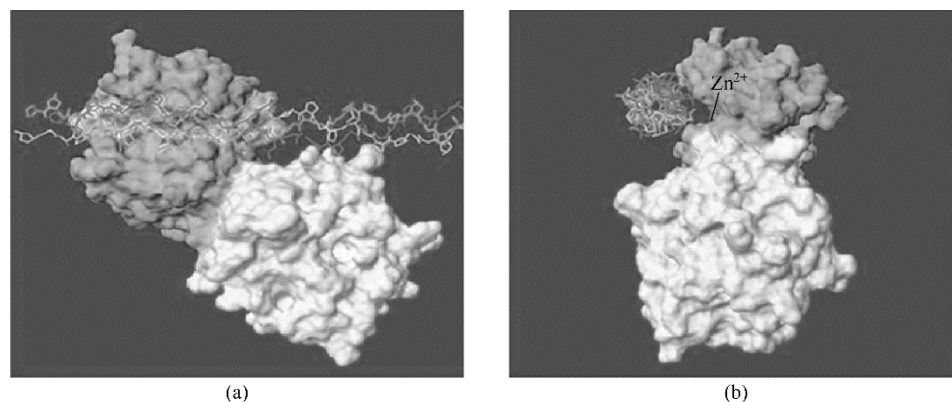


图4 胶原蛋白多肽(CRP)与MMP-1催化域狭缝分子模拟对比^[15](图中浅色为催化域,深色为血红结合素域,图(b)箭头为催化域结合的锌离子)

Fig.4 Alignment of collagen-related peptides (CRP) with active site of MMP-1^[15]

(a) 胶原型多肽(CRP)与MMP-1蛋白质分子间位置关系;(b) 图(a)绕中心轴旋转90°后相对位置,由图可以看出催化域狭缝无法完全容纳CRP结合到催化位置

与催化位点结合从而发生水解,根据这一假设弥补了胶原蛋白水解过程中缺失的论据链条。

接下来学者们尝试验证这一假设,Chung等^[15]通过基因突变将MMP-1催化域中结合锌离子的谷氨酸替换为丙氨酸使其失活(E200A),分别让无胶原水解活性的MMP-1[Δ C](缺乏Hpx功能域)、MMP-3[Δ C](本身非胶原酶,并缺乏Hpx功能域)、MMP-3、HLE(人白细胞弹性蛋白酶)自身和与E200A结合的复合体系水解胶原蛋白,结果发现以上酶皆与E200A结合方能水解胶原蛋白,特异性酶解胶原蛋白(Gln/Leu)-Gly#(Ile/Leu)-(Ala/Leu)多肽链(#代表酶切位点),产生典型的1/4、3/4胶原多肽片段。于是他们提出假设:失活后的E200A虽然不能够水解胶原蛋白,但依旧保留着局部解旋胶原蛋白的能力,使解旋位置能够与普通蛋白酶发生作用从而水解。之后通过测定胶原蛋白自身及与E200A复合体的解链温度,他们进一步论证前述过程中胶原蛋白发生的是局部水解,仅胶原蛋白部分位点发生解旋而能够被普通蛋白酶水解。

之后,2006年Bertini等^[26]通过核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)和小角度X光散射(small angle X-ray scattering, SAXS)等解析出MMP-1蛋白伸展和收缩的结构形态。Iyer等^[27]解析了MMP-1的晶体结构,从微观层面剖析MMP-1水解胶原蛋白过程中发生的形态变化、动力学特征。在发掘水解机理的过程中,Iyer等^[27]发现一个有趣的现象,MMP-1与MMP-3功能域几乎相仿,但在作用底物上相差甚远。MMP-1是一种典型的胶原酶,能够在原位良好降解胶原蛋白,而MMP-3则是典型

的间质溶解素,对胶原蛋白尤其是纤维状胶原蛋白束手无策。通过突变和域交换嵌合体研究,首先明确了MMP-1连接肽、Hpx(血红结合素域)和Cat(催化域)同时存在能够水解胶原蛋白,另外将MMP-1的Hpx功能域替换至MMP-3,后者依旧无法水解胶原蛋白,说明两者无法正常配对。从而证明了多功能域在基因层面需适配、转录出的产物才具有相应活力这一命题,也从侧面说明了关键氨基酸序列在酶活水平上相对的唯一性。

Manka等^[28]从分子层面进一步解释了MMP-1-底物相互作用的机理。文献首先验证了Cat与Hpx结构域相互协同方能与胶原蛋白结合这一实验现象,发现二者之间柔性较强的多肽连接链发挥着至关重要的作用。同时实验者通过构建胶原蛋白多肽与MMP-1相互作用库发现Gly#(Ile/Leu)-(Ala/Leu)-GXY-GXY-GL(O/Ala)(O代表羟脯氨酸,#代表酶切位点)这一多肽链在不同物种来源的I、II及III型胶原蛋白 α 链中较为保守,且与MMP-1有较强的相互作用(这一发现与Chung等^[15]相同)。他们通过氢/氘交换质谱法(H/DXMS)确定了MMP-1和胶原蛋白的重点结合区域,在图5中明确了胶原蛋白与MMP-1间的作用位点,图5(a)表示胶原蛋白三肽链的序列组成,其中与胶原酶相距4Å范围以内有较强相互作用力的氨基酸残基以色块渲染,图5(b)则构建了胶原蛋白和MMP-1之间的相互作用立体图。通过解析二者相互作用模型晶体结构确认了Cat和Hpx结构域分别与胶原多肽三条多肽链发生作用的部位,图5(c)、(d)则反映了MMP-1中这两个结构域与胶原蛋白作用的具体位点。同时他们认为温度

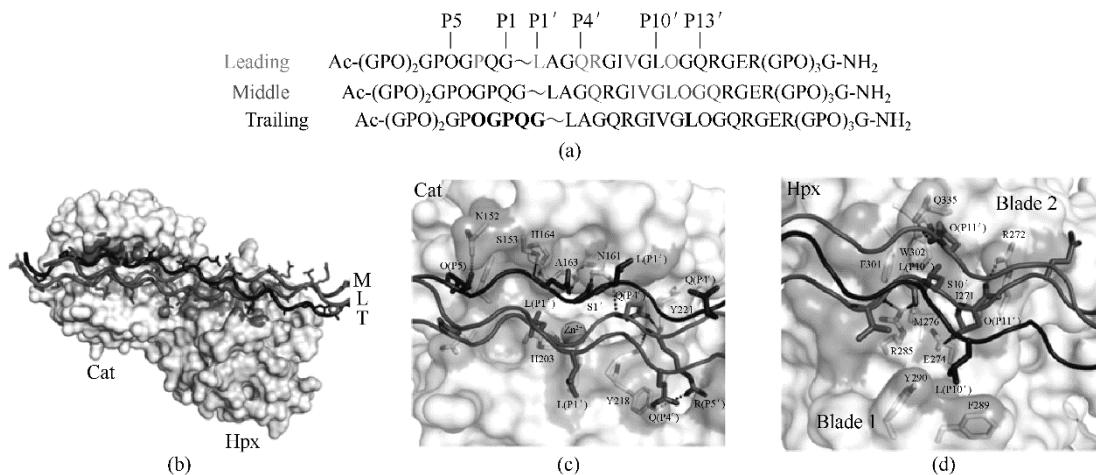


图 5 胶原蛋白多肽与胶原酶相互作用分子模拟图^[28](图中虚线代表氢键,活性位点 Zn²⁺以小球表示)
Fig.5 Crystal structure of MMP-1(E200A) & triple helical collagen peptide complex in molecular simulation^[28]

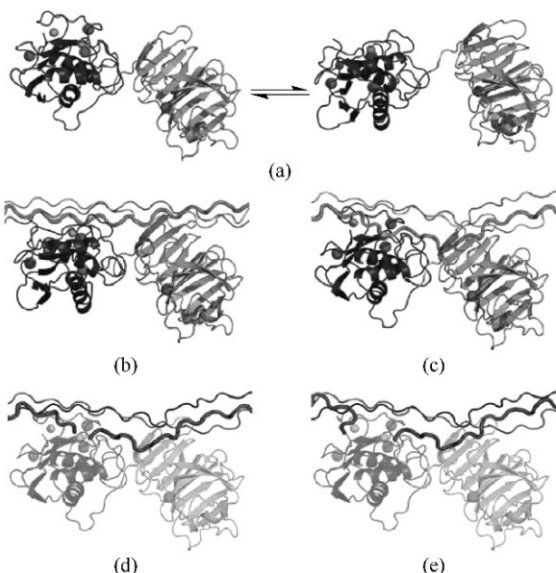


图 6 MMP-1 水解胶原蛋白步骤图解^[29]
Fig.6 Steps of collagenolysis by MMT-1^[29]

在解旋胶原蛋白中发挥了至关重要的作用,随温度提高胶原多肽内部作用减弱, MMP-1(E200A)通过自身结构域能够更好地锚定胶原蛋白多肽,从而将多肽的切割位点“吞入”疏水催化口袋 S1 中予以水解。

Bertini 等^[29]结合前述研究的工作,将 MMP-1 酶解胶原蛋白过程拆解为四个步骤:第一步如图 6(a)所示, MMP-1 的 Cat(深色)及 Hpx(浅色)结构域处于松弛-紧张平衡构型下(左右分别为松弛态、收缩态),如图 6(b)所示 Hpx 结构域首先锚定胶原蛋白多肽, Cat 结构域通过柔性多肽连接链被引导至胶原蛋白 α(I)链 Gly775 - Ile776 附近;第二步如图 6(c)所示,通过同轴旋转使得 Cat 结构域锚定至胶原多

肽链的同时促进胶原蛋白发生解旋;第三步如图 6(d)所示,局部解旋的胶原多肽在酶切位点水解,但发生水解的多肽链依旧与 MMP-1 连接;第四步如图 6(e)所示,被水解的胶原多肽链脱落, MMP-1 继续水解其余胶原多肽。

2 微生物胶原酶

20 世纪生物学家发现微生物具有降解人体组织使伤口溃败、加重感染的能力,其原因在于构成人体组织的胶原蛋白被微生物某种酶类降解,从而导致微生物侵入。在 1954 年 Maclennan 等^[30]就尝试用 162 株菌株水解胶原蛋白,发现仅有产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)及溶组织梭菌(*Clostridium histolyticum*)能够降解胶原蛋白,其中尤以溶组织梭菌为优(其中一株溶组织梭菌来源于伤兵伤口中),其培养液稀释 256 倍后依旧具备降解偶氮骨胶原的能力。之后研究者又陆续在弧菌、杆菌等菌属中发现胶原酶的存在。因其相较 MMP 类酶有更多样的蛋白切割位点、更丰富的来源和更广泛的应用^[31-33],因此受到研究者的重点关注。下文将针对微生物胶原酶的发掘历程、酶解机理等进行梳理。

2.1 微生物胶原酶发掘历程

微生物胶原酶最早报道见于 1932 年^[34],受限于技术环境对于“真”胶原酶的定义较为模糊,当时部分研究者将能够降解明胶或胶原蛋白的酶统一称为胶原酶。经过 20 余年的发展, Maclennan 等^[30]认为明胶作为底物特异性不强,其也能够被部分蛋白酶水解,为了更好区别将能够降解原生胶原蛋白的微生物酶定义为胶原酶。同时发现微生物胶原酶

的一些特点^[33]:一是同一种菌所产的胶原酶并非只有单一类型,不但类型多样而且由不同基因编码翻译;二是观测到胶原酶多种亚型构象依旧具有酶活,推测这是由其本身“自水解”或是蛋白酶水解造成的情况,但留有酶活的问题仍需深入研究。这两个现象均反映出—个值得深究的科学问题,那就是胶原酶究竟是由哪些功能域构成,又是怎样发挥自身降解胶原蛋白的功能。

经长时间物理化学及生物化学研究,研究者将典型胶原酶产生菌产气荚膜梭菌及溶组织梭菌分泌的胶原酶分为两类:第一类酶能够较好水解胶原蛋白但对合成的胶原蛋白多肽 FALGPA(不会被蛋白酶类降解)无明显降解作用,第二类酶则正好相反。Matsushita 等^[35]发现溶组织梭菌产生的两类酶分别由 ColG 和 ColH 转录翻译而来,其氨基酸组成有较大的不同,但均是由多个功能域构成,其主要包括一段用作指导分泌的信号肽、一段前肽域(bacterial pre-peptidase, PPC)、一段催化功能域(activator domain, AD)、至多两个类多囊肾病样结构域(polycystic kidney disease-like domains, PKD)以及至多三个胶原蛋白结合域(collagen-binding domains, CBD),而 PKD 与 CBD 两个域的多寡正是区别微生物一类胶原酶和二类胶原酶的重要依据(为方便描述,分别将催化域 AD 称为 S1、PKD 结构域称为 S2、CBD 结构域称为 S3),其具体结构见图 7(阴影部分为 PPC, H 为连接肽)。

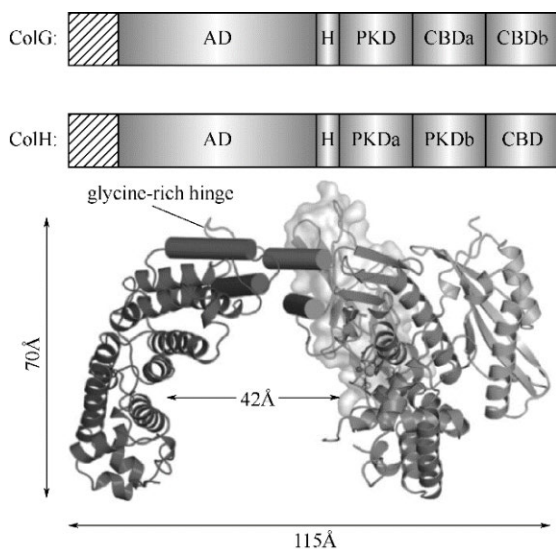


图7 溶组织梭菌两类胶原酶结构略图及 ColG 翻译胶原酶分子模拟图^[33,36]

Fig.7 Diagram of two types of *C. histolyticum* collagenase and molecular simulation of collagenase translated by ColG^[33,36]

根据以上的命名标准,将溶组织梭菌 ColG 及产气荚膜梭菌 ColA 基因翻译的胶原酶划归为一类胶原酶,其结构域主要包括 S1、S2、S3a 及 S3b;溶组织梭菌 ColH 翻译的胶原酶则被划归为二类胶原酶,其结构域主要包括 S1、S2a、S2b 及 S3。研究证明,保留最低酶活的构型需至少一段 S1 及 S3 结构域^[37]。例如由溶组织梭菌 ColG 基因转录翻译的胶原酶,倘若截去活性区域 Lys396–Lys1118,截断的胶原酶能够维持完整胶原酶对短肽的酶解水平,但却完全无法降解胶原蛋白。若保留包含活性部位及部分 S3 结构域(含 Tyr119–Gly790 等氨基酸残基),依旧能够确保胶原蛋白的降解。由此可见除最低限度的组成外,其余结构域更多是在动力学上发挥作用^[38]。关于这一独特的情况,有研究者推测微生物胶原酶在微生物入侵宿主细胞过程中,因外界环境因素、自身或蛋白酶水解及宿主防御机制抵抗等因素,其酶蛋白完整结构不易保留,但通过自然进化保留最“至关重要”的酶组件,在结构被完全破坏前能够始终保持一定的水解胶原能力,能够最大程度上完成对机体调理作用的干扰及对宿主的侵袭^[39]。

2.2 微生物胶原酶水解胶原蛋白机理

由 ColG 转录翻译而来的胶原酶常被用作模型酶来解析酶活性及水解胶原蛋白机制。与 MMP 类胶原酶类似,微生物胶原酶催化域也存在一个锌离子作为活性中心,与胶原酶氨基酸残基 His523、His527、Glu555 以及一个水分子以四面体形式结合,另外边缘的水分子又以氢键与 Glu524 相结合(图 8)。

关于其结构解析的历程也与 MMP 相仿,但因为微生物胶原酶分子量普遍更大、结构域更复杂所以对环境要求更高。随着技术成熟,精度逐渐提高,经小角度 X 光散射、蛋白结晶分析、单量子相干核磁共振(single quantum coherence nuclear magnetic resonance, HSQC NMR)等^[36–37,39]分析,确定了微生物胶原酶各结构域功能并揭示了其与胶原蛋白作用机理。在 ColG 胶原酶中,CBD 结构域通过识别胶原蛋白特殊的三螺旋结构能够与之良好结合,与 MMP 不同的是 CBD 提高的是与纤维状胶原蛋白的结合能力,意味着 CBD 的多寡决定了与纤维状胶原蛋白的结合力强弱;PKD 结构域进一步加强与纤维状胶原蛋白的结合能力;AD 结构域则将结合的纤维状胶原蛋白水解。同样在水解之前,胶原蛋白也将发生构型解旋的变化,这一机理被 Eckhard 等^[36]称之为

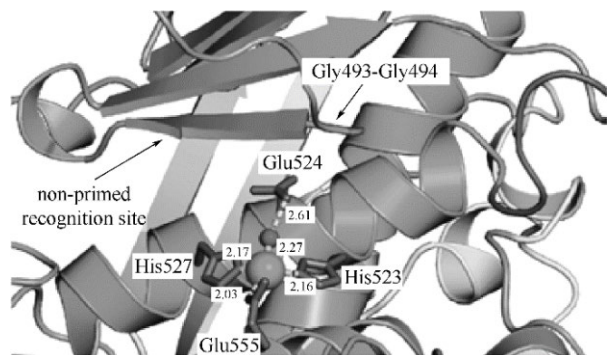


图 8 溶组织梭菌(*Clostridium histolyticum*) ColG 基因转录翻译的胶原酶活性位点示意图^[39](图中较大微球为 Zn^{2+} , 较小微球为与之结合的水分子。各棒状模型为胶原酶氨基酸残基, 由图可见 His523、His527、Glu555 及水分子以四面体形式将 Zn^{2+} 包裹其中, Glu524 又以虚线所示的氢键与水分子结合)

Fig.8 Collagenase (*Clostridium histolyticum*) translated by gene of ColG with ribbon representation of active site^[39]

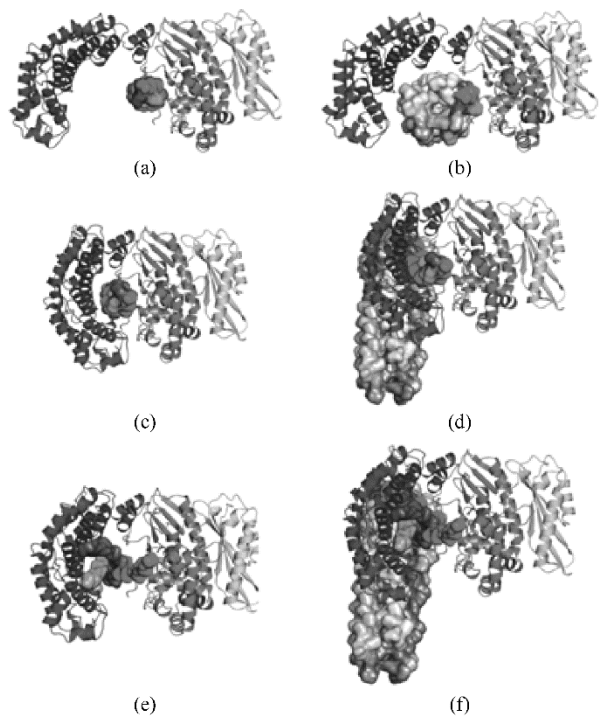


图 9 胶原蛋白及纤维状胶原蛋白被胶原酶水解示意图^[39]

Fig.9 Collagenolysis process model of triple-helical and microfibrillar collagen^[39]

“吞消机理”(chew-and-digest mechanism), 如图 9 所示其水解过程大体分为两步: 第一步微生物胶原酶通过多组功能域与(纤维状)胶原蛋白结合, 胶原酶逐渐由松弛构型变为闭合构型[如图 9(a)、(b)及(d)、(e)所示]; 第二步胶原酶恢复半开-半闭构型过程中, (纤维状)胶原蛋白在强结合力作用下被解旋, 其二级结构暴露在活性位点下完成水解[如图 9(c)、(f)所

示]。此时胶原蛋白被解旋酶解, 胶原酶也随之恢复松弛构型, (纤维状)胶原蛋白未解旋的其余部分或尚未水解的可进行下一轮水解开始新一周期。此外需要注意的是, 影响微生物胶原酶活性和水解水平的除了结构的完整性、酶活性中心的结合情况外, Ca^{2+} 也发挥了至关重要的作用。其核心在于改变胶原酶局部构型, 使之更适宜改变结构以催化胶原蛋白^[40], 这也是为何胶原酶活性测定中需加入 Ca^{2+} 的原因。

3 基质金属蛋白酶(胶原酶型)及微生物胶原酶的应用研究

通过 20 世纪至今对胶原酶的研究, 研究者对 MMP 及微生物胶原酶构成、结构等有了全面深刻的认识, 并逐渐探明了不同类型胶原酶与胶原蛋白间相互作用的机理, 为当下及未来的研究与应用奠定了基础。MMP 因与人类息息相关, 其研究成果多被用于设计组织抑制剂用于治疗癌症、关节炎等疾病^[19], 而微生物胶原酶因来源广泛、多样性丰富, 应用领域更加多元化^[31]。下文就两种胶原酶在医疗诊治、食品加工、环境保护及组织工程等多方面的应用研究予以综述。

3.1 在医疗诊治中的应用研究

目前已知的微生物胶原酶多来自原核生物, 在微生物侵袭有机体过程中, 胶原酶发挥了降解特定细胞膜和细胞外基质的作用^[41], 其同时分泌蛋白酶提高侵染能力, 进一步深入有机体内部微氧或厌氧部位中, 破坏有机体免疫系统, 达到对人或动物的深层感染。人体炎症性肠胃病、伤口感染腐败化脓、牙周类炎症等疾病大多由此类原因造成^[42-43]。值得一提的是, 有报道称部分微生物胶原酶不仅能够消化胶原蛋白组织, 同时本身不受组织蛋白抑制剂的影响, 甚至能够使抑制剂失活无法发挥作用^[44]。此外, 除了致病微生物降解胶原蛋白给人和动物带来的潜在危险, 若胶原蛋白本身在组成、结构上发生突变, 也会引起局部肌体产生病变^[45]。

随着对胶原酶研究的深入, 加之提纯技术逐渐进步, 采用胶原酶来治疗甚至治愈有关疾病成为现实。基于胶原酶能够在生理条件下原位降解特性, 使得其在治疗组织纤维化、腰椎间盘突出、杜普伊特挛缩、伤口愈合及疤痕修复等方面发挥着越来越重要的作用。杜普伊特挛缩(Dupuytren's

contracture)是一类手掌胶原蛋白组织异常增生肥大,在后期由于手掌结构变形无法正常收缩手指造成功能性衰退的疾病。传统的治疗手段是通过外科手术进行筋膜切开术^[46],常伴随长期疼痛和较高的复发率,给患者带来精神和生理上的双重负担。研究者针对病情特点,论证胶原酶作为治疗方案的可行性,从治疗方式、损害程度、恢复周期及复发率等多个层次追踪,明确了胶原酶治疗的可靠性^[47-48],最终获美国食品和药物管理局(Food and Drug Administration, FDA)及欧盟药品局(European Medicines Agency, EMA)批准^[49],由溶组织梭菌(*Clostridium histolyticum*)分泌产生的胶原酶可用作医疗专用酶,目前该治疗方式已得到较为广泛的应用。Villegas等^[49]在传统注射胶原酶的基础上,制备了纳米型胶原酶颗粒,构建了小鼠组织纤维化模型分别比较传统注射治疗方式及纳米颗粒治疗的效果,他们分别以注射生理盐水的小鼠作阴性对照组,注射博来霉素小鼠致皮肤纤维化作阳性对照组,持续注射博来霉素但分别采用普通胶原酶治疗或纳米颗粒型胶原酶治疗小鼠作为实验模型(图10中从左至右为四种小鼠模型切片染色图,着色区即组织纤维化区域),发现纳米缓释型处理半衰期长,治疗效果好,同单位量效力明显提高,同时可明显减轻传统手术开刀治疗或注射胶原酶等方式带来的生理痛苦,研究者认为该方法具明显优势。

在应对组织增生、髓核组织溶出、清创等方面,胶原酶展现出愈发明朗的应用前景。Zhang等^[50]以羟脯氨酸、黏多糖为检测指标,以髓核组织形态变化为直接观察对象,应用靶向射频热凝固术并结合胶原酶溶核术治疗椎间盘突出问题,发现各项指标均出现下降趋势,同时对236名椎间盘突出问题的病人采取该联合法进行治疗,术后两周转好率达66.5% (157/236)、三周转好率达88.1% (208/236)。后续观察未发现并发症产生,二次检查椎间盘突出问题减缓或愈合率可达86.8%,证明联合疗法效果良好。Huett等^[51]将胶原酶应用于幼儿伤口清创手术中,其中5/6创口类型属于外科手术裂开,其余均属于静脉注射渗透。采用胶原酶进行清创后,短时间内半数伤口完成造粒响应并愈合,平均时间十二天内全部伤口均愈合且无明显生理性疼痛。综上,胶原酶治疗逐渐成为相关疾病的主流治疗方案,但治疗过程中出现的水肿、皮下出血、注射部位局部性疼痛和排异性反应依旧不能忽视。

胶原酶同时应用在基因治疗中,因传统基因治疗过程中受限于基因表达效率偏低,尤其在肿瘤基因治疗过程中由于间质间高压(interstitial fluid pressure, IFP)导致纳米载体输运受阻,从而使传递的单克隆抗体及DNA载体等因摄取量不足表达出较低的活性^[52]。通过预混胶原酶与透明质酸酶对肿瘤丰富的细胞间质进行预处理,可有效降解间质密

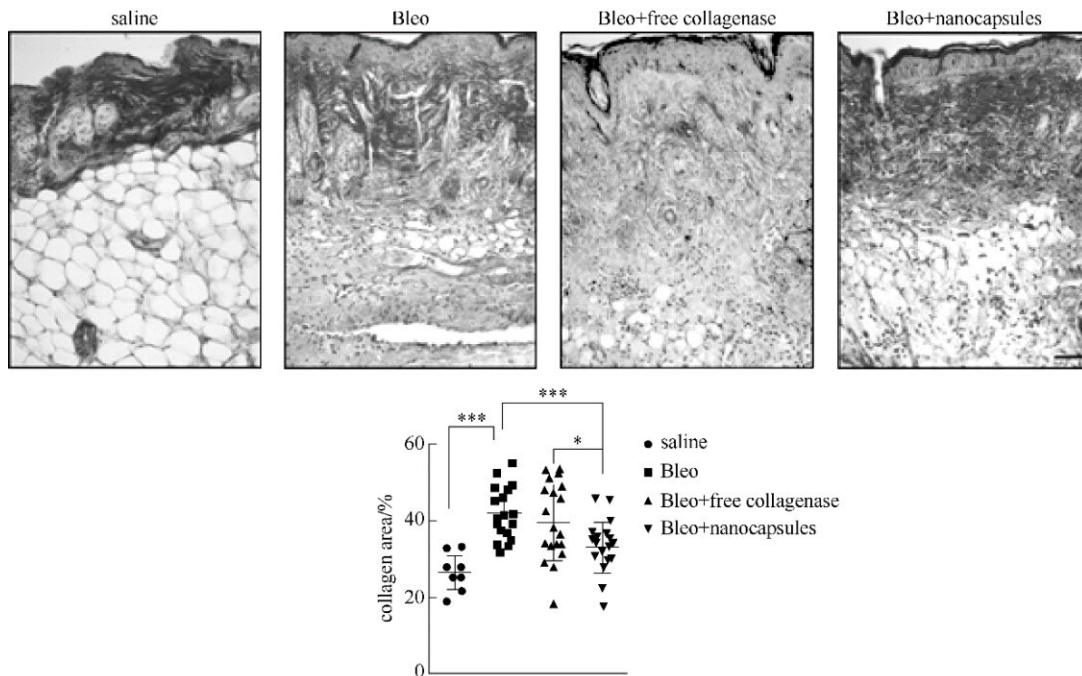


图10 纳米颗粒缓释胶原酶治疗小鼠纤维化模型切片染色图及治疗效果分析^[49]

Fig.10 Effect of collagenase nanocapsules in bleomycin induced skin fibrosis and analysis of therapeutic effect^[49]

集的胶原网络束,达到降低 IFP 的目的,从而促进治疗药品的扩散与分布,提高转染比率实现治疗的目的^[53]。

3.2 在食品加工中的应用研究

胶原蛋白氨基酸种类丰富,包含多种人体必需氨基酸,是理想的氨基酸来源补充。胶原蛋白经热水解或碱、酶部分水解处理可制成常见的水凝胶物质明胶(部分解旋),可用作食品、乳化剂、发泡剂、胶质稳定剂、絮凝剂、生物降解包装材料及微胶囊等^[54-56],另外由胶原蛋白制备的功能肽被证明具有促进促炎细胞因子产生^[57]、改善骨质疏松类疾病^[58]、改善紫外线过度照射皮肤病^[59]、对革兰氏细菌有一定的抗菌活性^[60-61]、具有抗氧化活性^[62]、具有无明显副作用抗高血压疾病等功能^[63-64]。多年来研究者尝试在不同处理环境下使用各类蛋白酶及胶原酶等处理明胶或胶原蛋白,而胶原酶因特异性强、处理效果好且本身用途较为广泛而备受关注^[65-68]。目前,胶原酶及蛋白酶已经广泛应用在奶酪制造、低敏婴儿食品、肉类嫩化等诸多方面^[69]。

肉类口感往往受到肌节长度、组织完整性和胶原纤维状态等影响,人们往往期待口感嫩滑、鲜美多汁的各型肉类,诸如口感生硬发柴、纤维粗大等肉类则不符合口感要求。而在部分发展中国家因牲畜通常要耗尽其生产价值后才会宰杀售卖肉类,这类肉品一般品质不佳,需嫩化处理提高其口感品质^[70]。Zhao 等^[71]对一株深海嗜冷菌株假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas* sp. SM9913)自产的耐冷胶原酶 MCP-01 的应用效果进行研究,发现经 MCP-01 处理后的肉类纤维剪切力减少 23%,在 4℃ 下处理其肉类相对肌原纤维破碎指数达 91.7%,肉类经过处理能够保持鲜肉色彩同时维持一定潮湿感。与木瓜蛋白酶和菠萝蛋白酶处理肉类相比,MCP-01 能够在 4℃ 保持处理能力,在扫描电镜观察下发现与前者的纤维断裂模式也存在差异。说明微生物胶原酶是一种优良的肉类嫩化酶剂,可以成为嫩肉剂的重要补充。

由胶原酶、蛋白酶等复合酶解处理得来的胶原蛋白类产品,其特性受原料来源、处理过程和采用酶剂的差异而不同,但普遍具备抗菌、抗高血压、抗氧化等功能^[60-64],同时胶原酶水解多肽被 FDA 批准为公认安全(generally recognized as safe, GRAS)类食品,进一步提高了民众对多肽类食品安全性的信心^[72]。近些年来,海产品、胶原蛋白多肽类食品作为

保健类食品畅销不衰^[73-74]。Wang 等^[75]采用酸提法从大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)中提取鱼类胶原蛋白,采用胰酶及胃蛋白酶两步水解制备提取了多段活性胶原多肽,在清除羟基自由基活性、清除 DPPH 自由基、清除超氧自由基、同时清除 ABTS 自由基等方面展现出良好效果,说明制备的胶原多肽具有清除多种自由基的抗氧化能力。Guo 等^[76]应用多肽可整合多种膳食矿物质的特点,研究了经高温处理的胶原蛋白经胰蛋白酶处理得到的胶原多肽对 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 和 Cu^{2+} 等离子的螯合作用。胶原多肽经分离纯化后集中分布在分子量 500 ~ 2000 范围内,处理后经联合质谱分析至少 10 条不同序列的多肽具备整合金属离子的能力,其中序列为 GPAGPHGPPG 的多肽螯合 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 和 Cu^{2+} 的能力分别达到 $(11.52 \pm 2.23) \text{ nmol}/\mu\text{mol}$ 、 $(1.71 \pm 0.17) \text{ nmol}/\mu\text{mol}$ 、 $(0.43 \pm 0.02) \mu\text{mol}/\mu\text{mol}$,证明多肽可作为缓解矿物质缺乏症的补充食品。高血压作为一种常见的慢性病,给患者带来不适的同时,往往会引起各类心血管疾病的发生,重则危及生命。肾素血管紧张素系统对于调节体内血压平衡、液盐平衡及组织生长等起到重要生理功能,系统一旦失衡使得血管紧张素酶原激活,即导致血压升高^[77],而通过血管紧张素(angiotensin converting enzyme, ACE)抑制剂可缓解这一过程,抵抗血压升高。Gu 等^[78]以鸡肉为来源热溶胶原蛋白,以嗜热蛋白酶制备胶原多肽测试功能肽抑制 ACE 活性,经联合质谱分析有效多肽序列为 IWHHT,其 $\text{IC}_{50} = (9.93 \pm 0.65) \mu\text{mol}/\text{L}$,除了具备血管紧张素抑制剂的作用外,IWHHT 及其自身酶解碎片还具有一定的抗氧化能力与消炎能力。O'Keeffe 等^[79]利用黑曲霉(*Aspergillus niger*)分泌胶原酶处理猪皮胶原蛋白,制备的胶原多肽同样应用于抑制 ACE 活性检测中,通过采用 UPLC-ESI-MS/MS 鉴定多肽序列,发现效果最佳的为三肽 Met-Gly-Pro, ACE- IC_{50} 可达 $(51.11 \pm 1.14) \mu\text{mol}/\text{L}$,通过口服可有效降低收缩压、舒张压和心率,研究发现 ACE 活性与 C 端氨基酸组成密切相关,其中以脯氨酸(Pro)为末位的 ACE 效果最佳。另外目前从水母、鲑鱼皮、鳕鱼皮、鲫鱼及鲑鱼等水产品及动物骨骼、外皮中提取制取的胶原多肽均发现具有 ACE 活性^[80]。

3.3 在环境保护中的应用研究

在传统水产、皮革工业中,由于处理方法相对粗放及大量使用化工材料,过程中产生了大量的废渣废气,对生活和水体环境造成较大污染^[81]。随着

人们环保意识的逐渐提高,促使皮革、水产行业等高污产业提高污染物处理标准,减少有毒有害、有机试剂等常用处理剂的使用。解决这类问题的关键在于能够找到一类环境友好、高效可靠且性价比优良的替代品。酶制剂由于其高效的选择性、催化能力及相对易于处理的特点,不但能够满足环境友好的要求,往往还能提高产品品质^[82]。从以上层面出发,在传统高污行业,积极采用酶制剂来替代传统化工用品是主动解决环境问题的优先选择。

褪毛和染色是皮革产业中典型的单元操作,褪毛是整个皮革产业工序中的第一步,在褪毛过程中由于要祛除残余附着在动物毛皮上的鲜肉和毛发,需要大量使用石灰和硫化物^[83]。另外在鞣制皮革过程中也产生了大量的含铬废弃物,严重影响生态环境。Song等^[84]研究了酶制剂对皮革处理的动力学情况,以游离总蛋白量及糖类总量作分析指标,认为酶制剂处理时间不宜过长,以3~6 h处理时长为宜,否则将损坏毛皮质量影响后续工艺。Smail等^[85]筛菌后选用哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)自产混合酶(检测含有 α 角蛋白酶、胶原酶、中性酶等酶活性)进行褪毛处理,可良好祛除上皮、毛发,在节约成本的同时实现环境保护。靳鸿蔚^[86]为了解决皮革铬屑污染问题,利用皮革厂附近采集的样品筛选出的巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)生产胶原酶,经纯化精制后处理铬屑情况良好,30 h可完全消化铬屑皮革废弃物。此外由于原生皮革着色率差,所以染色过程需要巨量的合成染色剂进行作业。但染色剂生物降解性差,一旦汇入水体中很难被处理^[87]。Kanth等^[88]通过使用胶原酶对皮革进行预处理,使皮革着色率提高至99%,提高了染色剂使用效率的同时降低了用量,间接降低了染色剂对环境的危害,同时经过胶原酶预处理的皮革,力学性质未降低且柔软性、触感有所提升。王耿^[89]从皮革厂、屠宰场等处采集样品,筛选出一株能产碱性蛋白酶的短小芽孢杆菌,经优化发酵培养条件,酶活比原始菌株提高5倍,经鉴定脱毛效果良好。

3.4 在组织工程上的应用

在实验室中为了评估细胞信号通路并了解细胞调控机制,通常需要进行体外细胞培养。细胞培养具有多种培育方式,但均需要酶来消解组织以实现细胞分离^[90]。同样在临床手术中,外科手术医生往往也需要采用组织工程的手段治疗组织损伤,如

整形外科医生需要体外培养软骨组织,最为关键的一步即是采集良好的细胞进行培养^[91]。过去常利用胰蛋白酶分离目的细胞,当富集的细胞吸附在无菌培养皿壁上,需要采用蛋白酶处理来重悬组织细胞。但在应用中胰蛋白酶会水解蛋白C端的赖氨酸或精氨酸残基,甚至会损伤细胞表面生长因子受体和膜蛋白,对细胞造成损害^[33,92]。此外,一些富含胶原蛋白的组织也不易被蛋白酶降解处理,因而凸显了胶原酶在分离细胞组织上的应用潜力。Isyar等^[91]进行了软骨组织细胞的分离培养,结果显示良好。Song等^[93]采用嗜热蛋白酶和胶原酶从小鼠耳蜗中提取上皮细胞,结果表明分离的细胞保留干细胞特性,能够诱导分化为目的细胞。胰岛细胞分离技术也采用了复合酶来进行分离胰岛细胞,原因在于单纯的胶原酶分离胰岛细胞过程难以控制,研究者通过调控胶原酶及蛋白酶的比例,将来源一致的胰腺三等分后分别以高胶原酶试剂、高蛋白酶试剂、普通配比试剂进行实验,结果证明,胶原酶不可缺少但应适当降低比例效果最优,改良试剂取得了较高的净化后胰岛回收率($83.8\% \pm 5.6\%$)并提高了回收质量^[94-95]。

4 结 语

基于胶原酶可在生理条件下高效、专一地降解各类型胶原蛋白,加之胶原蛋白来源广泛,也是各类必需氨基酸、亚氨基酸最为丰富的来源之一,所以在应用中二者往往扮演着“成双入对”的角色。本文对胶原蛋白及两类主要的胶原酶:胶原酶型的MMP(matrix metalloproteinase)和微生物胶原酶(microbial collagenase)的结构特点、作用机理、实际应用等研究进展进行总结。主要对实质性胶原酶和普通蛋白酶以及两类胶原酶在降解胶原蛋白过程中结构上、机理上的异同进行区分,明确了MMP及微生物胶原酶的功能特点。目前此两种胶原酶已广泛应用于病理学研究、治疗组织增生类疾病、生产功能性食品 and 解决污染问题等多个领域中,在人类生产生活中扮演了重要角色。

当前对于胶原蛋白研究较为清楚,对各类型不同组成和结构的胶原蛋白有明确认识^[1]。但对胶原酶来说还有许多亟待填补的空白:例如为了更好地理解微生物胶原酶作用、发展更多有效的胶原酶抑制剂,需要解析更多的结构并分析其功能组成^[33]。

另外在原生菌胶原酶纯化操作中目前还存在诸多问题, 往往会出现酶活降低、蛋白量降低的问题^[96]。此外对不同类型的微生物胶原酶生理安全性还需分别评估, 对胶原酶适用范围和应用潜力上尚有有很大的挖掘空间^[33,69]。

未来伴随新兴技术的发展, 如在组学研究层面上, 势必会涉及到对胶原酶与有机体相互作用的研究分析; 又如在单分子水平上, 能够对单酶的动力学参数进行测定, 可能会对酶解胶原蛋白机理产生新的认识; 再如相较当下研究多为体外研究, 未来可更多追踪酶分子在体内作用的情况; 另外在发展生化材料方面, 利用胶原蛋白作为基质蛋白也成为当下热点。基于全新的技术设备带来的更高维度帮助, 对胶原酶及胶原蛋白这一对共同体的研究和应用势必会再上一个新台阶。

参考文献

- [1] Shoulders M D, Raines R T. Collagen structure and stability[J]. Annual Review of Biochemistry, 2009, **78**(1): 929–958.
- [2] Veit G, Kobbe B, Keene D R, et al. Collagen X XVIII, a novel von Willebrand factor a domain-containing protein with many imperfections in the collagenous domain[J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, **281**(6): 3494–3504.
- [3] Pauling L, Corey R B. The structure of fibrous proteins of the collagen-gelatin group[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1951, **37**(5): 272–281.
- [4] Rich A, Crick F H C. The structure of collagen[J]. Nature, 1955, **176**: 915–916.
- [5] Ramshaw J A M, Shah N K, Brodsky B. Gly-XY tripeptide frequencies in collagen: a context for host-guest triple-helical peptides[J]. Journal of Structural Biology, 1998, **122**(1/2): 86–91.
- [6] Boryskina O P, Bolbukh T V, Semenov M A, et al. Energies of peptide-peptide and peptide-water hydrogen bonds in collagen: evidences from infrared spectroscopy quartz piezogravimetry and differential scanning calorimetry[J]. Journal of Molecular Structure, 2007, **827**(1): 1–10.
- [7] Hyde T J, Bryan M A, Brodsky B, et al. Sequence dependence of renucleation after a Gly mutation in model collagen peptides[J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, **281**(48): 36937.
- [8] Khoshnoodi J, Cartiailler J P, Alvares K, et al. Molecular recognition in the assembly of collagens: terminal noncollagenous domains are key recognition modules in the formation of triple helical protomers[J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, **281**(50): 38117–38121.
- [9] Raghunath M, Bruckner P, Steinmann B. Delayed triple helix formation of mutant collagen from patients with osteogenesis imperfecta[J]. Journal of Molecular Biology, 1994, **236**(3): 940.
- [10] Cram D J. The design of molecular hosts, guests, and their complexes[J]. Journal of Inclusion Phenomena, 1988, **27**(8): 1009–1020.
- [11] Berg R A, Prockop D J. The thermal transition of a non-hydroxylated form of collagen. Evidence for a role for hydroxyproline in stabilizing the triple-helix of collagen[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1973, **52**(1): 115–120.
- [12] Kim C A, Berg J M. Thermodynamic β -sheet propensities measured using a zinc-finger host peptide[J]. Nature, 1993, **362**(6417): 267–270.
- [13] Minor D L, Kim P S. Measurement of the β -sheet-forming propensities of amino acids[J]. Nature, 1994, **367**(6464): 660–663.
- [14] Buehler M J. Nature designs tough collagen: explaining the nanostructure of collagen fibrils [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, **103**(33): 12285–12290.
- [15] Chung L, Dinakarpanian D, Yoshida N, et al. Collagenase unwinds triple-helical collagen prior to peptide bond hydrolysis [J]. The EMBO Journal, 2004, **23**(15): 3020–3030.
- [16] Zhao W, Byrne M H, Boyce B F, et al. Bone resorption induced by parathyroid hormone is strikingly diminished in collagenase-resistant mutant mice[J]. Journal of Clinical Investigation, 1999, **103**(4): 517–524.
- [17] Gross J, Lapiere C M. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1962, **48**(6): 1014–1022.
- [18] Brinckerhoff C E, Matrisian L M. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2002, **3**(3): 207–214.
- [19] Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry[J]. Circulation Research, 2003, **92**(8): 827–839.
- [20] Peng W, Yan J, Wan Y, et al. Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in systemic sclerosis[J]. Journal of Clinical Immunology, 2012, **32**(6): 1409–1414.
- [21] van Wart H E, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1990, **87**(14): 5578–5582.
- [22] Itoh Y, Takamura A, Ito N, et al. Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion[J]. The EMBO Journal, 2001, **20**(17): 4782–4793.
- [23] Gomis-Rüth F X, Maskos K, Betz M, et al. Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1[J]. Nature, 1997, **389**(6646): 77.
- [24] Goldberg G I, Strongin A, Collier I E, et al. Interaction of 92-kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases prevents dimerization, complex formation with interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with stromelysin[J]. J. Biol. Chem., 1992, **267**(7): 4583–4591.
- [25] Fields G B, Prockop D J. Perspectives on the synthesis and application of triple-helical, collagen-model peptides[J]. Peptide Science, 1996, **40**(4): 345–357.
- [26] Bertini I, Calderone V, Fragai M, et al. Snapshots of the reaction mechanism of matrix metalloproteinases[J]. Angewandte Chemie, 2006, **45**(47): 7952–7955.
- [27] Iyer S, Visse R, Nagase H, et al. Crystal structure of an active

- form of human MMP-1[J]. Journal of Molecular Biology, 2006, **362**(1): 78-88.
- [28] Manka S W, Carafoli F, Visse R, et al. Structural insights into triple-helical collagen cleavage by matrix metalloproteinase 1[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012, **109**(31): 12461-12466.
- [29] Bertini I, Fragai M, Luchinat C, et al. Structural basis for matrix metalloproteinase 1-catalyzed collagenolysis[J]. Journal of the American Chemical Society, 2012, **134**(4): 2100-2110.
- [30] MacLennan J D, Mandl I, Howes E L. Bacterial digestion of collagen[J]. Journal of Clinical Investigation, 1954, **32**(12): 1317-1322.
- [31] Shi L, Carson D. Collagenase Santyl ointment: a selective agent for wound debridement[J]. Journal of Wound Ostomy & Continence Nursing, 2009, **36**(6S): S12-S16.
- [32] Allen F E, Larick D K. Tenderization of beef with bacterial collagenase[J]. Meat Science, 1986, **18**(3): 201-214.
- [33] Duarte A S, Correia A, Esteves A C. Bacterial collagenases—a review[J]. Critical Reviews in Microbiology, 2016, **42**(1): 106-126.
- [34] Weinberg M, Randin A. Propriétés physicochimiques du ferment fibrolytique d'origine microbienne[J]. Compt. Rend. Soc. Biol., 1932, **110**: 352.
- [35] Matsushita O, Koide T, Kobayashi R, et al. Substrate recognition by the collagen-binding domain of *Clostridium histolyticum* Class I collagenase[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, **276**(12): 8761-8770.
- [36] Matsushita O, Jung C M, Katayama S, et al. Gene duplication and multiplicity of collagenases in *Clostridium histolyticum*[J]. Journal of Bacteriology, 1999, **181**(3): 923-933.
- [37] Eckhard U, Brandstetter H. Polycystic kidney disease-like domains of clostridial collagenases and their role in collagen recruitment[J]. Biological Chemistry, 2011, **392**(11): 1039-1045.
- [38] Vaitkevicius K, Rompikuntal P K, Lindmark B, et al. The metalloprotease PrtV from *Vibrio cholerae*[J]. FEBS Journal, 2008, **275**(12): 3167-3177.
- [39] Eckhard U, Schönauer E, Nüss D, et al. Structure of collagenase G reveals a chew-and-digest mechanism of bacterial collagenolysis [J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2011, **18**(10): 1109-1114.
- [40] Wilson J J, Matsushita O, Okabe A, et al. A bacterial collagen-binding domain with novel calcium-binding motif controls domain orientation[J]. The EMBO Journal, 2003, **22**(8): 1743-1752.
- [41] Popoff M R, Bouvet P. Clostridial toxins[J]. Future Microbiology, 2009, **4**(8): 1021-1064.
- [42] Pruteanu M, Hyland N P, Clarke D J, et al. Degradation of the extracellular matrix components by bacterial-derived metalloproteases: implications for inflammatory bowel diseases[J]. Inflammatory Bowel Diseases, 2011, **17**(5): 1189-1200.
- [43] Choi J S, Ha Y M, Joo C U, et al. Inhibition of oral pathogens and collagenase activity by seaweed extracts[J]. Journal of Environmental Biology, 2012, **33**(1): 115.
- [44] Maeda H, Yamamoto T. Pathogenic mechanisms induced by microbial proteases in microbial infections[J]. Biological Chemistry Hoppe-Seyler, 1996, **377**(4): 217.
- [45] Fratzl P. Collagen: Structure and Mechanics, an Introduction[M]. US: Springer, 2008: 1-13.
- [46] Martín-Ferrero M. Ten-year long-term results of total joint arthroplasties with ARPE(R) implant in the treatment of trapeziometacarpal osteoarthritis[J]. Journal of Hand Surgery (European Volume), 2014, **39**(8): 826-832.
- [47] Hupez A, Detrembleur C, van Innis F, et al. Comparative study of collagenase injection versus fasciectomy in Dupuytren's contracture: a 1-year follow-up[J]. Louvain. Med., 2017, **136**(4): 231-237.
- [48] Badalamente M A, Hurst L C. Development of collagenase treatment for dupuytren disease[J]. Hand Clinics, 2018, **34**(3): 345-349.
- [49] Villegas M R, Baeza A, Usategui A, et al. Collagenase nanocapsules: an approach to fibrosis treatment[J]. Acta Biomaterialia, 2018, **74**: 430-438.
- [50] Zhang D, Zhang Y, Wang Z, et al. Target radiofrequency combined with collagenase chemonucleolysis in the treatment of lumbar intervertebral disc herniation[J]. International Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2015, **8**(1): 526.
- [51] Huett E, Bartley W, Morris D, et al. Collagenase for wound debridement in the neonatal intensive care unit: a retrospective case series[J]. Pediatric Dermatology, 2017, **34**(3): 277-281.
- [52] Eikenes L, Tari M, Tufto I, et al. Hyaluronidase induces a transcapillary pressure gradient and improves the distribution and uptake of liposomal doxorubicin (Caelyx™) in human osteosarcoma xenografts[J]. British Journal of Cancer, 2005, **93**(1): 81-88.
- [53] Eikenes L, Tufto I, Schnell E A, et al. Effect of collagenase and hyaluronidase on free and anomalous diffusion in multicellular spheroids and xenografts[J]. Anticancer Research, 2010, **30**(2): 359-368.
- [54] Gómez-Guillén M C, Ihl M, Bifani V, et al. Edible films made from tuna-fish gelatin with antioxidant extracts of two different murta ecotypes leaves (*Ugni molinae* Turcz) [J]. Food HydroColloids, 2007, **21**(7): 1133-1143.
- [55] Karim A A. Fish gelatin: properties, challenge and prospects as an alternative to mammalian gelatins[J]. Food HydroColloids, 2009, **23**(3): 563-576.
- [56] Rawdkuen S, Saiut S, Benjakul S. Properties of gelatin films from giant catfish skin and bovine bone: a comparative study[J]. European Food Research & Technology, 2010, **231**(6): 907-916.
- [57] Zhang Y, Kouguchi T, Shimizu K, et al. Chicken collagen hydrolysate reduces proinflammatory cytokine production in C57BL/6.KOR-ApoEshl mice[J]. Journal of Nutritional Science & Vitaminology, 2010, **56**(3): 208.
- [58] Saito M, Kiyose C, Higuchi T, et al. Effect of collagen hydrolysates from salmon and trout skins on the lipid profile in rats[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2009, **57**(21): 10477.
- [59] Hu H, Li B, Xue Z, et al. The effect of pacific cod (*Gadus macrocephalus*) skin gelatin polypeptides on UV radiation-induced skin photoaging in ICR mice[J]. Food Chemistry, 2012, **115**(3): 945-950.
- [60] Giménez B, Alemán A, Montero P, et al. Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid [J]. Food Chemistry, 2009, **114**(3): 976-983.
- [61] Patrzykat A, Douglas S E. Antimicrobial peptides: cooperative approaches to protection[J]. Protein and Peptide Letters, 2005, **12**(1): 19-25.
- [62] Ranathunga S, Rajapakse N, Kim S, et al. Purification and characterization of antioxidative peptide derived from muscle of conger eel (*Conger myriaster*) [J]. European Food Research and

- Technology, 2006: 310–315.
- [63] Ichimura T, Yamanaka A, Otsuka T, et al. Antihypertensive effect of enzymatic hydrolysate of collagen and Gly-Pro in spontaneously hypertensive rats[J]. Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, 2009, **73**(10): 2317–2319.
- [64] Fu Y, Young J F, Løkke M M, et al. Revalorisation of bovine collagen as a potential precursor of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides based on *in silico* and *in vitro* protein digestions[J]. Journal of Functional Foods, 2016, **24**: 196–206.
- [65] Lin L, Li B F. Radical scavenging properties of protein hydrolysates from jumbo flying squid (*Dosidicus eschrichtii* Steenstrup) skin gelatin[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2010, **86**(14): 2290–2295.
- [66] Cheng F Y, Wan T C, Liu Y T, et al. Determination of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides in chicken leg bone protein hydrolysate with alcalase[J]. Animal Science Journal, 2010, **80**(1): 91–97.
- [67] Cheng F Y, Liu Y T, Wan T C, et al. The development of angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from chicken bone protein[J]. Animal Science Journal, 2010, **79**(1): 122–128.
- [68] Gómez-Guillén M C, Giménez B, López-Caballero M E, et al. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: a review[J]. Food HydroColloids, 2011, **25**(8): 1813–1827.
- [69] Fernandes P. Enzymes in food processing: a condensed overview on strategies for better biocatalysts[J]. Enzyme Research, 2010, **2010**: 1–19.
- [70] Kemp C M, Sensky P L, Bardsley R G, et al. Tenderness—an enzymatic view[J]. Meat Science, 2010, **84**(2): 248–256.
- [71] Zhao G Y, Zhou M Y, Zhao H L, et al. Tenderization effect of cold-adapted collagenolytic protease MCP-01 on beef meat at low temperature and its mechanism[J]. Food Chemistry, 2012, **134**(4): 1738–1744.
- [72] Pal G K, Suresh P V. Microbial collagenases: challenges and prospects in production and potential applications in food and nutrition[J]. RSC Advances, 2016, **6**(40): 33763–33780.
- [73] Plaza M, Cifuentes A, Ibáñez E. In the search of new functional food ingredients from algae[J]. Trends in Food Science & Technology, 2008, **19**(1): 31–39.
- [74] Pangestuti R, Kim S K. Bioactive materials derived from seafood and seafood processing by-products[M]// Functional Foods and Dietary Supplements: Processing Effects and Health Benefits. New Jersey: John Wiley & Sons, Ltd., 2014: 139–158.
- [75] Wang B, Wang Y M, Chi C F, et al. Isolation and characterization of collagen and antioxidant collagen peptides from scales of croceine croaker (*Pseudosciaena crocea*) [J]. Marine Drugs, 2013, **11**(11): 4641–4661.
- [76] Guo L, Harnedy P A, O’Keeffe M B, et al. Fractionation and identification of Alaska pollock skin collagen-derived mineral chelating peptides[J]. Food Chemistry, 2015, **173**: 536–542.
- [77] Zhuang Y, Sun L, Li B. Production of the angiotensin-I-converting enzyme (ACE)-inhibitory peptide from hydrolysates of jellyfish (*Rhopilema esculentum*) collagen[J]. Food and Bioprocess Technology, 2012, **5**(5): 1622–1629.
- [78] Gu Y, Liang Y, Bai J, et al. Spent hen-derived ACE inhibitory peptide IWHHT shows antioxidative and anti-inflammatory activities in endothelial cells[J]. Journal of Functional Foods, 2019, **53**: 85–92.
- [79] O’Keeffe M B, Norris R, Alashi M A, et al. Peptide identification in a porcine gelatin prolyl endoproteinase hydrolysate with angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory and hypotensive activity[J]. Journal of Functional Foods, 2017, **34**: 77–88.
- [80] Felician F F, Xia C, Qi W, et al. Collagen from marine biological sources and medical applications[J]. Chemistry & Biodiversity, 2018, **15**(5): e1700557.
- [81] Saran S, Mahajan R V, Kaushik R, et al. Enzyme mediated beam house operations of leather industry: a needed step towards greener technology[J]. Journal of Cleaner Production, 2013, **54**(9): 315–322.
- [82] Khandelwal H B, More S V, Kalal K M, et al. Eco-friendly enzymatic dehairing of skins and hides by *C. breffeldianus* protease [J]. Clean Technologies and Environmental Policy, 2015, **17**(2): 393–405.
- [83] Thanikaivelan P, Rao J R, Nair B U, et al. Recent trends in leather making: processes, problems, and pathways[J]. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2005, **35**(1): 37–79.
- [84] Song J, Tao W, Chen W. Kinetics of enzymatic unhairing by protease in leather industry[J]. Journal of Cleaner Production, 2011, **19**(4): 325–331.
- [85] Smail A M S, Housseiny M M, Abo-Elmagd H I, et al. Novel keratinase from *Trichoderma harzianum* MH-20 exhibiting remarkable dehairing capabilities[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2012, **70**: 14–19.
- [86] 靳鸿蔚. 胶原酶产生菌的筛选、胶原酶的纯化及其酶学性质的研究[D]. 泉州: 华侨大学, 2007.
- Jin H W. Purification and partial characterization of a collagenase from a newly isolated strain of *Bacillus megaterium* [D]. Quanzhou: Huaqiao University, 2007.
- [87] Corso C R, Almeida E J R, Santos G C, et al. Bioremediation of direct dyes in simulated textile effluents by a paramorphogenic form of *Aspergillus oryzae* [J]. Water Science and Technology, 2012, **65**(8): 1490–1495.
- [88] Kanth S V, Venba R, Madhan B, et al. Studies on the influence of bacterial collagenase in leather dyeing[J]. Dyes and Pigments, 2008, **76**(2): 338–347.
- [89] 王耿. 碱性脱毛蛋白酶菌株的选育及酶的提纯研究[D]. 泉州: 华侨大学, 2007.
- Wang G. Breeding of a strain producing alkaline protease for dehairing and studies on the purification of the enzyme [D]. Quanzhou: Huaqiao University, 2007.
- [90] Duarte A S, Rosa N, Duarte E P, et al. Cardosins: a new and efficient plant enzymatic tool to dissociate neuronal cells for the establishment of cell cultures[J]. Biotechnology & Bioengineering, 2010, **97**(4): 991–996.
- [91] Isyar M, Yilmaz I, Sirin D Y, et al. A practical way to prepare primer human chondrocyte culture[J]. Journal of Orthopaedics, 2016, **13**(3): 162–167.
- [92] Olsen J V, Ong S E, Mann M. Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues[J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2004, **3**(6): 608–614.
- [93] Song Y, Tian K, Mi W, et al. Combinatorial enzymatic digestion with thermolysin and collagenase type I improved the isolation

- and culture effects of hair cell progenitors from rat cochleae[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 2016, **52**(5): 537-544.
- [94] Kin T, Johnson P R V, Shapiro A M J, et al. Factors influencing the collagenase digestion phase of human islet isolation[J]. *Transplantation*, 2007, **83**(1): 7-12.
- [95] Loganathan G, Subhashree V, Narayanan S, et al. Improved recovery of human islets from young donor pancreases utilizing increased protease dose to collagenase for digesting peri-islet extracellular matrix[J]. *American Journal of Transplantation*, 2019, **19**: 831-843.
- [96] Berková Z, Saudek F, Leontovyč I, et al. Testing of a new collagenase blend for pancreatic islet isolation produced by *Clostridium histolyticum*[J]. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2018, **9**(1): 26.