

不同酸鹼值和溫度影響體外合成羥基磷灰石：膠原蛋白複合物的形態及顯微鏡構造之探討

田文斌、陳明造

E-mail: 9706917@mail.dyu.edu.tw

摘要

膠原蛋白是動物結締組織最主要的構造蛋白質，而羥基磷灰石是脊椎動物硬組織中的無機成分，具有良好的生物相容性。本研究主要分為兩部分：第一部分，利用鹽析法自豬皮萃取出膠原蛋白，並探討其產率、純度、電泳行為(Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)及掃描式電子顯微鏡(Scanning Electron Microscope, SEM)之形態觀測；第二部分，是將膠原蛋白和羥基磷灰石利用共沉澱的方式，依照特定比例，在不同溫度及pH值環境下作用(最長至72 hr)，即可得到羥基磷灰石-膠原蛋白複合物，並探討其SDS-PAGE電泳行為分析、傅立葉轉換紅外線光譜儀(Fourier Transform Infrared, FTIR)、X光結晶繞射分析(X-ray Diffraction, XRD)及掃描式電子顯微鏡等的差異。研究結果發現：在膠原蛋白萃取方面，產率可達到11.38%，純度可達31.42%，而SDS-PAGE電泳行為分析及掃描式電子顯微鏡構造觀察，則和市售(Sigma)及中興大學動物科學系提供之膠原蛋白相符合；在複合物方面，複合物和膠原蛋白的電泳圖譜比較結果，發現複合物中少了膠原蛋白 2 鏈，且在鹼性條件下，2 鏈會緩慢消失，代表合成反應之進行，而在酸性條件下，則需沉澱48小時之後，才有明顯的合成反應發生。在傅立葉轉換紅外線光譜圖譜顯示複合物有新的鍵結產生，唯在pH=5下，有雜亂的吸收波峰。由X光結晶繞射分析，得到皆有羥基磷灰石結晶反應，但在 pH=5環境下，產生許多雜亂的結晶。在掃描式電子顯微鏡圖中發現，當合成時pH值較低者，較易形成片狀結構，而在pH值較高者呈現密集的珊瑚狀結構。

關鍵詞：膠原蛋白；羥基磷灰石；pH值和溫度；合成

目錄

| | |
|---|----|
| 目錄 | 1 |
| 1. 緒言 | 2 |
| 2. 文獻回顧 | 3 |
| 2.1 膠原蛋白 | 3 |
| 2.1.1 膠原蛋白簡介 | 3 |
| 2.1.2 膠原蛋白之結構和纖維構造 | 3 |
| 2.1.3 膠原蛋白抗原免疫特性之去除 | 6 |
| 2.1.4 膠原蛋白的分類、結構與組織分佈 | 9 |
| 2.1.4.1 第一型膠原蛋白 | 9 |
| 2.1.4.2 第二型膠原蛋白 | 10 |
| 2.1.4.3 第三型膠原蛋白 | 10 |
| 2.1.4.4 第四型膠原蛋白 | 11 |
| 2.1.4.5 第五型膠原蛋白 | 12 |
| 2.1.4.6 第六型膠原蛋白 | 12 |
| 2.1.4.7 第七型膠原蛋白 | 12 |
| 2.1.4.8 第八型膠原蛋白 | 13 |
| 2.1.4.9 第九型膠原蛋白 | 13 |
| 2.1.4.10 第十型膠原蛋白 | 14 |
| 2.1.4.11 第十一型膠原蛋白 | 14 |
| 2.1.5 膠原蛋白之應用 | 18 |
| 2.1.5.1 生醫材料方面 | 18 |
| 2.1.5.2 食品加工方面 | 20 |
| 2.1.5.3 化妝品方面 | 20 |
| 2.2 羥基磷灰石 | 22 |
| 2.2.1 羥基磷灰石簡介 | 22 |
| 2.2.2 羥基磷灰石應用於骨骼的特性 | 22 |
| 2.2.3 羥基磷灰石的合成方法 | 27 |
| 2.2.4 骨骼基質與膠原蛋白之關係 | 29 |
| 3. 材料與方法 | 31 |
| 3.1 實驗藥品與儀器 | 31 |
| 3.1.1 材料 | 31 |
| 3.1.2 藥品 | 31 |
| 3.1.3 儀器 | 32 |
| 3.2 實驗方法 | 32 |
| 3.2.1 膠原蛋白的製備 | 32 |
| 3.2.2 膠原蛋白的產率 | 33 |
| 3.2.3 膠原蛋白的含量(純度之測定) | 33 |
| 3.2.3.1 試劑製備 | 34 |
| 3.2.3.2 步驟 | 34 |
| 3.2.4 SDS-PAGE電泳行為分析 | 35 |
| 3.2.4.1 試劑製備 | 35 |
| 3.2.4.2 蛋白質變性處理 | 37 |
| 3.2.4.3 電泳之操作 | 37 |
| 3.2.4.3.1 膠片的製備 | 37 |
| 3.2.4.3.2 電器泳動之操作 | 38 |
| 3.2.5 掃描式電子顯微鏡的觀察 | 39 |
| 3.2.6 羥基磷灰石-膠原蛋白複合物的合成 | 39 |
| 3.2.7 傅立葉轉換紅外線光譜儀分析 | 40 |
| 3.2.8 X光結晶繞射分析 | 41 |
| 3.2.9 繪圖軟體 | 41 |
| 4. 結果與討論 | 42 |
| 4.1 膠原蛋白之測定 | 42 |
| 4.1.1 膠原蛋白外觀、產率及純度之測定 | 42 |
| 4.1.2 膠原蛋白之SDS-PAGE分析 | 45 |
| 4.1.3 膠原蛋白掃描式電子顯微構造之觀察 | 47 |
| 4.2 羥基磷灰石-膠原蛋白複合物之測定 | 49 |
| 4.2.1 羥基磷灰石-膠原蛋白複合物之外觀 | 49 |
| 4.2.2 羥基磷灰石-膠原蛋白複合物之SDS-PAGE分析 | 51 |
| 4.2.3 羥基磷灰石-膠原蛋白複合物之傅立葉轉換紅外線光譜儀測定 | 59 |
| 4.2.4 X光結晶繞射分析 | 67 |
| 4.2.5 羥基磷灰石-膠原蛋白複合物掃描式電子顯微結構之觀察 | 73 |
| 5. 結論 | 79 |
| 參考文獻 | 81 |
| 圖目錄 | |
| 圖2.1 膠原蛋白的三螺旋結構 | 4 |
| 圖2.2 膠原蛋白微纖維之微細結構 | 5 |
| 圖2.3 膠原蛋白分子結構示意圖 | 7 |
| 圖3.1 羥基磷灰石-膠原蛋白合成複合物之裝置圖 | 40 |
| 圖4.1 豬皮萃取出之膠原蛋白外觀 | 43 |
| 圖4.2 Hydroxyproline標準曲線圖 | 44 |
| 圖4.3 自製膠原蛋白和購自Sigma膠原蛋白之電泳圖 | 46 |
| 圖4.4 自製萃取膠原蛋白和中興大學提供膠原蛋白之掃描式電子顯微構造圖(10000倍) | 48 |
| 圖4.5 羥基磷灰石-膠原蛋白複合物之外觀 | 50 |
| 圖4.6 羥基磷灰石-膠原蛋白複合物之電泳圖 | 53 |
| 圖4.7 不同沉澱時間羥基磷灰石-膠原蛋白複合物之電泳圖(pH=9) | 54 |
| 圖4.8 不同沉澱時間羥基磷灰石-膠原蛋白複合物之電泳圖(pH=8) | 55 |
| 圖4.9 不同沉澱時間羥基磷灰石-膠原蛋白複合物之電泳圖(pH=7) | 56 |
| 圖4.10 不同沉澱時間羥基磷灰石-膠原蛋白複合物之電泳圖(pH=6) | 57 |
| 圖4.11 不同沉澱時間羥基磷灰石-膠原蛋白複合物之電泳圖(pH=5) | 58 |
| 圖4.12 羥基磷灰石-膠原蛋白複合物之傅立葉轉換紅外線光譜圖 | 61 |
| 圖4.13 不同條件下合成羥基磷灰石-膠原蛋白複合物之傅立葉轉換紅外線光譜圖(37 °C, pH=9 ; 37 °C, pH=8) | 62 |
| 圖4.14 不同條件下合成羥基磷灰石-膠原蛋白複合物之傅立葉轉換紅外線光譜圖(37 °C, pH=7 ; 37 °C, pH=6) | 63 |
| 圖4.15 不同條件下合成羥基磷灰石-膠原蛋白複合物之傅立葉轉換紅外線光譜圖(37 °C, pH=5 ; 40 °C, pH=9) | 64 |
| 圖4.16 不同條件下合成羥基磷灰石-膠原蛋白複合物之傅立葉轉換紅外線光譜圖(40 °C, pH=8 ; 40 °C, pH=7) | 65 |
| 圖4.17 不同條件下合成羥基磷灰石-膠原蛋白複合物之傅立葉轉換紅外線光譜圖(40 °C, pH=6 ; 40 °C, pH=5) | 66 |
| 圖4.18 不同條件下合成羥基磷灰石-膠原蛋白複合物之X光結晶繞射圖譜(37 °C, pH=9 ; 40 °C, pH=9) | 68 |
| 圖4.19 不同條件下合成羥基磷灰石-膠原蛋白 | |

白複合物之X光結晶繞射圖譜(37 , pH=8 ; 40 , pH=8)69 圖4.20 不同條件下合成羥基磷灰石-膠原蛋白複合物之X光結晶繞射圖譜(37 , pH=7 ; 40 , pH=7)70 圖4.21 不同條件下合成羥基磷灰石-膠原蛋白複合物之X光結晶繞射圖譜(37 , pH=6 ; 40 , pH=6)71 圖4.22 不同條件下合成羥基磷灰石-膠原蛋白複合物之X光結晶繞射圖譜(37 , pH=5 ; 40 , pH=5)72 圖4.23 不同條件下合成羥基磷灰石-膠原蛋白複合物之掃描式電子顯微鏡圖 (pH=9) 74 圖4.24 不同條件下合成羥基磷灰石-膠原蛋白複合物之掃描式電子顯微鏡圖 (pH=8) 75 圖4.25 不同條件下合成羥基磷灰石-膠原蛋白複合物之掃描式電子顯微鏡圖 (pH=7) 76 圖4.26 不同條件下合成羥基磷灰石-膠原蛋白複合物之掃描式電子顯微鏡圖 (pH=6) 77 圖4.27 不同條件下合成羥基磷灰石-膠原蛋白複合物之掃描式電子顯微鏡圖 (pH=5) 78 表目錄 表2.1 在酸性及中性環境中膠原蛋白沉澱所需之鹽濃度8 表2.2 膠原蛋白種類、基因位置及分佈組織16 表2.3 羥基磷灰石之物理和化學性質24 表2.4 常用之生醫骨材料的種類25 表2.5 各種生醫材料物理性質26 表2.6 羥基磷灰石的合成方法28 表4.1 豬皮萃取之膠原蛋白產率及純度44

參考文獻

1. 王隸。1994。利用豬皮膠原蛋白酵素水解物試製機能性配料之研究。私立東海大學碩士論文。台中。
2. 江怡雯。1999。生物可吸收性的多孔質聚左乳酸/氫氧基磷灰石複合材的製備及其性質之探討。台北醫學院口腔復健醫學研究所碩士論文。台北。
3. 江晃榮。1998。生體高分子(幾丁質、膠原蛋白)在食品工業上的應用。食品資訊 150:19-25。
4. 林詠凱。2001。雞腳膠原蛋白與明膠之萃取及特性之研究。國立中興大學碩士論文。台中。
5. 林庭璋。2004。膠原蛋白/幾丁聚醣/硫酸軟骨素做為人工皮膚基材之研發。台北醫學大學碩士論文。台北。
6. 吳昌至。2002。雞冠與豬眼球中玻尿酸和膠原蛋白之抽取及純化。國立中興大學碩士論文。台中。
7. 周繼發、林慶文。1985。膠原蛋白分子結構之解析。科學農業, 33(9~10):347~350。
8. 洪偉章、李金枝與陳榮秀。1997。化妝品原料與功能。藝軒圖書出版社。台北。
9. 施威任。2007。奈米級氫氧基磷灰石之合成及燒結。國立成功大學博士論文。台南。
10. 黃茂烽。1998。關節疼痛講座。浩園文化出版社。台北。
11. 黃慧平。1998。聚乳酸薄膜及複合材之性質研究。台北醫學院口腔復健醫學研究所碩士論文。台北。
12. 許富銀、鄭明鎮與王盈錦。1998。膠原蛋白在醫學上的應用。生物產業9:21-26。
13. 陳志豪。2005。豬皮膠原蛋白水解物吸收紫外線之機能性。私立東海大學碩士論文。台中。
14. 楊崇煒。2006。水熱法與高溫後處理對電漿熔射氫氧基磷灰石塗層微觀組織及結合強度之效應。國立成功大學博士論文。台南。
15. 劉雅馨。2005。翻車鮑膠原蛋白的萃取及熱穩定性改善之研究。國立東華大學碩士論文。花蓮。
16. 賴永沛。1997。吃的化妝品原料-collagen peptide。食品資訊143:40-44。
17. 藍正文。2003。膠原蛋白做為骨母細胞分離與生長基材之研究。國立陽明大學博士論文。台北。
18. 顧其勝、蔣麗霞。2003。膠原蛋白與臨床醫學。上海第二軍醫大學出版社。上海。
19. Arborelius, M., Kontinen, Y. T., Nordstrom, D. C. and Solovieva, S. A. 1999. Gly-X-Y repeat sequences in the treatment of active rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.* 18: 129-135.
20. Baily, A. J. and Light, N. D. 1989. Connective tissue in meat and meat products. *Meat Sci.* 26: 325-326.
21. Barinaga, M. 1993. Treating arthritis with tolerance. *Sci.* 261: 1969-1970.
22. Brown, P. W. and Constanz, B. 1994. Hydrothermal Processing of Hydroxyapatite: Past, Present, and Future. In Yoshimura, M. and Suda, H. (Eds), *Hydroxyapatite and Related Materials*. p. 45-72, CRC Press Inc. Florida, USA.
23. Burson, D. E. and Hunt, M. C. 1986. Heat-induced change in the proportion of type I and II collagen in bovine *Longissimus dorsi*. *Meat Sci.* 17: 153-160.
24. Donley, G. E. and Fitzpatrick, L. A. 1998. Noncollagenous matrix proteins controlling mineralization: Possible role in pathologic calcification of vascular tissue. *Trends Cardiovasc. Med.* 8: 199-206.
25. Gehron, R. P. 1996. Vertebrate mineralized matrix proteins: Structure and function. *Connect. Tiss. Res.* 35: 131-136.
26. Gelse, K., Pöschl, E. and Aigner, T. 2003. Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55: 1531-1546.
27. Harkness, R. D. 1961. Biological functions of collagen. *Biol. Rev.* 36: 399-463.
28. Harlow, E. and Lane, D. 1988. SDS-polyacrylamide Gel Electrophoresis. In Harlow, E. and Lane, D. (Eds), *Antibodies*. p. 636-639, p. 685. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
29. Heinegard, D. and Oldberg, A. 1989. Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *FASEB J.* 3: 2042-2051.
30. Ho, H. O., Lin, L. H. and Sheu, M. T. 1997. Characterization of collagen isolation and application of collagen gel as drug carrier. *J. Control Release* 44: 103-112.
31. Huang-Lee, L. L. H. and Nimni, M. E. 1993. Preparation of type I collagen fibrillar matrices and the effects of collagen concentration of fibroblast contraction. *Biomed. Eng. Appl. Basis Comm.* 5: 664-675.
32. Ignjatovic, N., Tomic, S., Dakic, M., Miljkovic, M., Plavsic, M. and Uskokovic, D. 1999. Synthesis and properties of hydroxyapatite/poly-L-lactide composite biomaterials. *Biomaterials* 20: 809-816.
33. Jarcho, M., Bolen, C. H., Thomas, M. B., Bobick, J., Kay, J. F. and Doremus, R. H. 1976. Hydroxyapatite synthesis and characterization in dense polycrystalline form. *J. Mater. Sci.* 11: 2027-2035.
34. Kikuchi, M., Ikoma, T., Itoh, S., Matsumoto, H. N., Koyama, Y., Takakuda, K., Shinomiya, K. and Tanaka, J. 2004. Biomimetic synthesis of bone-like nanocomposites using the self-organization mechanism of hydroxyapatite and collagen. *Composites Sci. and Tech.* 64: 819-825.
35. Kikuchi, M., Itoh, S., Ichinose, S., Shinomiya, K. and Tanaka, J. 2001. Self-organization mechanism in a bone-like hydroxyapatite/collagen nanocomposite synthesized in vitro and its biological reaction in vivo. *Biomaterials* 22: 1705-1711.
36. Li, S. T. 1993. Collagen biotechnology and its medical applications. *Biomed. Eng. Appl. Basis Comm.* 5: 646-657.
37. Miller, E. J. and Rhodes, R. K. 1982. Preparation and characterization of the different types of collagen. *Meth. Enzymol.* 82: 59-64.
38. Mundy, G. R. 1995. Osteoblasts, bone formation and mineralization. In Fogelman I. (Ed), *Bone remodeling and its disorders*. p. 27-38. Martin Dunitz, London.
39. Nenad, I., Simonida, T., Momcilo, D., Miroslav, M., Milenko, P. and Dragan, U. 1999. Synthesis and properties of hydroxyapatite/poly-L-lactide composite biomaterials. *Biomaterials*. 20: 809.
40. O'Driscoll, W. S., Salter, R. B. and Keeley, F. W. 1985. A method for quantitative analysis type I and type II collagen in small sample of articular cartilage. *Anal. Biochem.* 145: 277-285.
41. Ratner B. D., Hoffman A. S., Schoen F. J. and Lemons J.

E.. 1996. Ceramics, Glasses, and Glass-Ceramics. In Hench, L. L. and Best S. (Eds), *Biomaterials Science*. P.166, Elsevier Academic Press, USA.

42. Ravaglioli, A. and Krajewski, A. 1992. Viscoelastic behaviour of bone. In: Ravaglioli, A. and Krajewski, A. (Eds), *Bioceramics: Materials, Properties, Applications*. p. 44-45. Chapman & Hall Press, London.

43. Reddy, G. K. and Enwemeka, C. S. 1996. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissue. *Clin. Biochem.* 29: 225-229.

44. Rest, M. V. and Garrone, R. 1991. Collagen family of proteins. *FASEB J.* 5: 2814-2823.

45. Rest, M. V. and Mayne, R. 1987. Type collagen proteoglycan from cartilage is covalently cross-linked to type collagen. *J. Biol. Chem.* 263: 1615-1618.

46. Rodrigues, C. V. M., Serricella, P., Linhares, A. B. R., Guerdes, R. M., Borojevic, R., Rossi, M. A., Duarte, M. E. L. and Farina, M. 2003. Characterization of a bovine collagen – hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. *Biomaterials* 24: 4987 – 4997.

47. Ross, M. H., Romrell, L. J. and Kaye, G. I. 1995. *Image Bank to Accompany Histology: A Text and Atlas*. Third edition. Lippincott Williams & Wilkins Press. Baltimore, USA.

48. Rousseau, F. C., and Gagnieu, H. C. 2002. In vitro cytocompatibility of porcine type atelocollagen crosslinked by oxidized glycogen. *Biomaterials* 23: 1503-1510.

49. Timpl, R. 1982. Antibodies to collagens and procollagens. *Meth. Enzymol.* 82 Pt A: 831-838.

50. Wu, T. J., Huang, H. H., Lan, C. W., Lin, C. H, Hsu, F. Y. and Wang, Y. J. 2004. Studies on the microspheres comprised of reconstituted collagen and hydroxyapatite. *Biomaterials* 25: 651 – 658.

51. Zhai, Y., Cui, F. Z. and Wang Y. 2005. Formation of nano-hydroxyapatite on recombinant human-like collagen fibrils. *Current Appl. Phys.* 5: 429 – 432.

52. Zhang, R. and Ma, P. X. 1999. Poly(-hydroxyl acids)/ hydroxyapatite porous composites for bone tissue engineering: I. Preparation and morphology. *J. Biomed. Mater. Res.*, 44: 446-445.