DOI:10.12441/spyswjs.20240109001 [文章编号] 1673-1689(2025)01-0132-11

超分子弹性蛋白的促细胞增殖及抗氧化能力研究

王兆石[1] 王召君[1] 董明盛[1] 吴俊俊[1,2*]

(1. 南京农业大学食品科技学院,江苏 南京 210095; 2. 江南大学生物工程学院,江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】为解决动物体内的弹性蛋白不可溶性以及重组类弹性蛋白聚集的问题,提升其在功能性食品中的应用潜力。**【方法】**将昆虫弹性蛋白(resilin 16, R16)、链球菌中免疫球蛋白B1结构域(GB1)、酿酒酵母中Ure2的前1~80个序列Ure2(1-80)以及促进细胞黏附的RGD细胞结合位点进行连接,构建可溶性超分子弹性蛋白。测定超分子弹性蛋白对C2C12细胞的细胞毒性及生物安全性,并与透明质酸(hyaluronic acid, HA)和猪皮胶原蛋白进行促细胞增殖和抗氧化能力比较。**【结果】**超分子弹性蛋白对细胞无毒性,皮下注射无明显炎症反应,生物安全性高;自组装的原纤维可促进细胞增殖,对4种自由基的清除能力和对H_2O_2诱导的L929细胞损伤的保护作用均显著高于HA和猪皮胶原蛋白。**【结论】**该研究获得的超分子弹性蛋白生物安全性高,可以促进细胞增殖并且具有抗氧化能力,为开发功能性食品提供了新材料。

关键词:超分子弹性蛋白;生物安全;细胞增殖;氧化损伤保护

Cell Proliferation-promoting Effect and Antioxidant Capacity of Supramolecular Elastin

WANG Zhaoshi[1] *WANG Zhaojun*[1] *DONG Mingsheng*[1] *WU Junjun*[1,2*]

(1. College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. College of Biological Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: [**Objective**] The aim of this study is to address the insolubility of elastin derived from animals and the aggregation of recombinant elastin-like proteins, and to enhance the elastin potential application in functional foods. [**Method**] In view of the above problems, resilin 16 (R16) derived from insects, immunoglobulin G domain B1 (GB1) from *Streptococcus*, and the Ure2 sequence of aa 1~80 Ure2(1-80) from *Saccharomyces cerevicae* were linked with the RGD sequence (a binding site of cells that promote cell adhesion) to construct the soluble supramolecular elastin. The cytotoxicity of the supramolecular elastin to C2C12 cells as well as its biosafety was evaluated. Furthermore, the supramolecular elastin was compared with hyaluronic acid (HA) and pigskin collagen in terms of the cell proliferation-promoting effect and antioxidant capacity. [**Result**] The supramolecular elastin had no toxic effect on cells and did not induce obvious inflammation after subcutaneous injection, demonstrating high biosafety. The self-assembled fibril promoted cell proliferation, and it showcased stronger scavenging ability against four kinds of free radicals and protective effect against H_2O_2-induced damage of L929 cells than HA and pigskin collagen. [**Conclusion**] The obtained supramolecular elastin has high biosafety, cell proliferation-promoting effect, and antioxidant capacity, serving as a new material for the development of functional food.

Keywords: supramolecular elastin; biosafety; cell proliferation; protection against oxidative damage

---

基金项目:国家自然科学基金面上项目(31972060);国家自然科学基金青年基金项目(31601448);江苏省自然科学基金前沿引领技术基础研究专项项目(BK20202002);江苏省博士后科研资助计划项目(2018K030B)。

通信作者:吴俊俊(1987—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事合成生物设计与智能制造研究。E-mail: wujunjun@njau.edu.cn

收稿日期:2024-01-09 **修回日期:**2024-02-12

弹性蛋白是人体中的一种结构与功能蛋白质[1]，是细胞外基质的重要组成部分[2]，多存在于人的皮肤、心脏、血管等结缔组织中[3]，同时也存在于牛、猪等哺乳动物的皮肤、韧带等组织中[4]。弹性蛋白是在赖氨酰氧化酶作用下高度交联形成的聚合物，导致其具有不可溶性，难以进行再加工，因而限制了其在食品、药物递送、组织工程[5-6]等领域中的应用。目前对弹性蛋白的利用主要是通过酶解将不溶性弹性蛋白水解成可溶性弹性蛋白多肽[7]或将弹性蛋白转化成可溶性蛋白，其中可溶性弹性蛋白主要有弹性蛋白原、α-弹性蛋白以及重组类弹性蛋白。弹性蛋白原和α-弹性蛋白可通过化学试剂从不溶性弹性蛋白中提取，过程较为烦琐。

重组类弹性蛋白主要由Val-Pro-Gly-Xaa-Gly这5种多肽重复不同次数串联而成，其中Xaa可以用除脯氨酸以外的其他氨基酸代替，并构成具有特定功能的弹性蛋白[8]，在药物递送[9]、细胞工程[10]以及组织工程[11]等领域均有应用。重组类弹性蛋白具有高于相变温度析出，低于相变温度溶解的特性，基于这种特性可以通过热诱导和调控pH使其组装。然而其相变温度受Xaa、构成蛋白质的序列长短以及溶液的离子强度等多种因素影响[12]，使其不能在常温下长期储存，只能保存于较低温度，因而限制了其在常温条件下的使用。

针对以上问题，将来自昆虫的弹性蛋白R16、链球菌中的GB1结构域、RGD细胞结合位点[13]以及酿酒酵母中具有高效自组装能力的Ure2(1-80)序列[14]连接，成功构建了可溶性超分子弹性蛋白Ure(1-80)-(GB1-R16)$_4$-RGD[15]，同时将其与HA以及猪皮胶原蛋白在促进细胞增殖和抗氧化方面进行系统比较，为将其应用于功能性食品、化妆品以及医药等领域提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大肠杆菌BL21(DE3)、胰酶、青霉素-链霉素混合液：美国Thermo Fisher Scientific公司；C2C12、L929细胞系：赛维尔生物科技有限公司；胰蛋白胨、酵母粉：英国oxoid公司；咪唑、磷酸二氢钾、三水合磷酸氢二钾、Tris、DMEM高糖培养基、硫磺素T(thioflavin T，ThT)、刚果红(congo red，CR)、镍离子亲和层析柱：生工生物工程(上海)股份有限公司；胎牛血清：Lonsa Science Srl公司；猪皮胶原蛋白：北京德航五洲科技有限公司；CCK-8检测试剂盒：北京兰杰柯科技有限公司；1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl，DPPH)：梯希爱(上海)化成工业发展有限公司；HA、2,2-二氮-双(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)diammonium salt，ABTS)：上海麦克林生化科技股份有限公司；H_2O_2、$FeSO_4$·$7H_2O$、水杨酸：国药集团化学试剂有限公司；碘化丙啶(propidium lodide，PI)、钙黄绿素乙酰甲酯(calcein acetyl methyl ester，AM)：江苏凯基生物技术股份有限公司；BALB/C小鼠：北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.2 仪器与设备

电泳仪：JY300C型，北京君意东方电泳设备有限公司；高速冷冻离心机：TGL-16R型，山东百欧医疗科技有限公司；冷冻干燥机：SCIENTZ-10N型，宁波新芝生物科技股份有限公司；CO_2培养箱：3111型，美国Thermo Fisher Scientific公司；倒置荧光显微镜：DMI 6000B型，美国Micro Demo公司；酶标仪：HH3400型，美国Perkin Elmer公司；超声波破碎仪：LISK-900-6M型，南京立思高仪器设备有限公司。

1.3 重组蛋白质粒的构建

以pET-28a(+)作为蛋白质表达载体，所设计的引物见表1[15]，由苏州金唯智生物科技有限公司进行pET28a-Ure2(1-80)-(GB1-R16)$_4$-RGD质粒的构建。

1.4 超分子弹性蛋白的发酵、诱导表达、鉴定及纯化

将导入质粒的大肠杆菌BL21(DE3)接种到40 mL的LB培养基中，37 ℃、220 r/min培养12 h。当初始OD_{600}值为0.1时，接种到100 mL的LB培养基中扩大培养。在OD_{600}值达到0.6时加入诱导剂，使IPTG终浓度为0.5 mmol/L，30 ℃、220 r/min培养12 h。取诱导前后的培养液，通过SDS-PAGE鉴定蛋白质条带大小。取200 mL发酵液收集菌体并用PBS重悬，于超声细胞破碎仪中以540 W超声6 min，间隔2 s，使蛋白质从菌体中释放出来，以8 000 r/min离心10 min，将离心后的上清液与5 mL填料孵育1 h。孵育完毕后分别用20 mmol/L Tris-HCl洗20 min、40 mmol/L咪唑洗20 min、60 mmol/L咪唑洗20 min、150 mmol/L咪唑洗15 min，收集150 mmol/L咪唑洗脱液，于去离子水中透析3 d，将透析后的溶液用液氮速冻，速冻完毕

表 1 PCR 扩增引物序列

Table1 Sequences of primers for PCR

引物	引物序列（5′—3′）
Ure2（1-80）	F：AGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGATGAATAACAACGGCAACCAAGT
	R：CTTTGCTCATACCGCTACCACCGCTACCGGTATTCTTGATATTATTCTCGTTATC
$(GB1\text{-}R16)_4$	F：GGCAGCCATATGGATACGTACAAGCTGATCTTAAACGGTAAAACCCTGAAAGGTGA
	R：GAGATCCCTCGAGTTATGGCGCACCATACTGACTACTCGGCGTCTGCGCACTACGTTCGGTCACGG
Ure2（1-80）-$(GB1\text{-}R16)_4$-RGD	F：GGCAGCCATATGATGAATAACAACGGCAACCAAGTGTCGAATCTCTCCAATGCGCT
	R：GAGATCCCTCGAGTCAGCCCGGGCTATCGCCGCGGCCACCGCTACCACCGCTACCCGGCGCACCATACTGA CTGCTCGGCGTC

后置于−80 ℃过夜，冷冻干燥后得到蛋白质冻干粉末。

1.5 超分子弹性蛋白自组装性质表征

1.5.1 ThT 荧光检测

将 5 mg 蛋白质溶解于 1 mL PBS 溶液（20 mmol/L ，pH 7.4）中，蛋白质溶液在 37 ℃下充分自组装形成蛋白质凝胶。分别取组装前后的超分子弹性蛋白液各 5 μL 于 500 μL PBS 溶液（20 mmol/L）中进行稀释。在上述溶液中加入 3 μL Tris-HCL 配制的 1 mmol/L ThT 溶液（pH 7.4），立即用酶标仪进行荧光光谱扫描，激发波长为 440 nm，发射波长为 460~650 nm，激发和发射宽度均为 5 nm[16]。

1.5.2 CR 检测

准确称取 25 mg CR 溶解于 100 mL PBS 溶液（含有体积分数 10% 的乙醇）中，并用 0.45 μm 滤膜过滤，使 CR 最终浓度达到 360 μmol/L。分别取组装前后的超分子弹性蛋白液各 85 μL 与 15 μL CR 溶液混合均匀。避光孵育 5 min，用酶标仪在 300~700 nm 波长下进行波段扫描，间隔 1 nm，对其发射光谱进行检测[17]。

1.5.3 冷冻扫描电子显微镜观察

使用液氮速冻超分子弹性蛋白自组装后的样品，将速冻后样品置于载物台上，抽真空后观察。

1.6 超分子弹性蛋白生物安全性评价

1.6.1 C2C12 和 L929 细胞的培养

将 C2C12 和 L929 细胞冻存液于 37 ℃下解冻，离心弃去上清液，加入含有体积分数 10% 的胎牛血清、100 U 青霉素和 100 g/L 链霉素的 DMEM 完全培养基，置于 37 ℃、CO_2 体积分数为 5% 的培养箱中培养待用[18]。

1.6.2 细胞活力测定

对胰酶消化后的细胞进行计数，按 1×10^4 个/孔的细胞密度接种于 96 孔细胞培养板中，培养 24 h，细胞完全贴壁后，弃去上清液。样品组各孔分别加入不同质量浓度（0.10、0.25、0.50、1.00、1.50 g/L）的超分子弹性蛋白液（用 100 μL DMEM 完全培养基溶解）；对照组各孔加入 100 μL DMEM 完全培养基，但不加入超分子弹性蛋白液；空白组只加入 DMEM 完全培养基，不接种细胞，孵育 24 h。采用 CCK-8 法测定细胞活力[19]，具体方法如下：将孔中的旧培养基吸掉，用 PBS 溶液润洗 2 次后，每孔加入 100 μL 含有体积分数 10% CCK-8 的 DMEM 溶液，于培养箱中避光孵育 1 h，孵育结束后于 450 nm 测定吸光度，细胞活力按照式（1）计算。

$$O=\frac{A_1-A_0}{A_2-A_0}\times100\% \quad (1)$$

式中：

A_0——空白组吸光度；

A_1——样品组吸光度；

A_2——对照组吸光度；

O——细胞活力，%。

1.6.3 生物相容性检测

配制质量分数为 3% 的超分子弹性蛋白液、质量分数分别为 1%、3% 的 HA 溶液和生理盐水，用 0.45 μmol/L 滤膜过滤，静置 12 h 待用。在小鼠背部左侧用记号笔均匀标记 4 个位置，作为超分子弹性蛋白支架和生理盐水的注射位置，右侧均匀标记 2 个位置作为 HA 的注射部位。用镊子轻轻将要注射的皮肤捏起来，用针头（5 mm×20 mm 的 1 mL 注射器）在标记部位分别注射 20 μL 不同的样品，注射完毕后分别在 30 d 和 60 d 取注射部位周围的皮肤样品，使用生理盐水清洗皮肤样品，然后将其浸泡在体积分数 4% 的多聚甲醛组织固定液中进行 HE 染色，观察不同组织是否存在损伤[20]。

1.7 超分子弹性蛋白自组装支架对C2C12细胞的增殖作用

将超分子弹性蛋白液涂抹于普通酶标板表面，待其充分自组装后，按照5 000个/孔的细胞密度接种于自组装后的超分子弹性蛋白支架上，不涂蛋白液的普通酶标板作为空白组，细胞培养板作为对照组。分别于第1、2、3、4天用AM/PI复合染液进行细胞的活/死染色[21]，同时用CCK-8法测定各组细胞第0、1、3天的生长状况，测定步骤同1.6.2。

1.8 超分子弹性蛋白的抗氧化活性测定

1.8.1 DPPH自由基清除率测定

参考Parejo等[22]的方法测定。样品组为100 μL不同质量浓度（0.5、1.0、3.0、5.0、10.0 g/L）的超分子弹性蛋白液与100 μL 0.1 mmol/L DPPH乙醇溶液的混合液体；对照组为100 μL 0.1 mmol/L DPPH乙醇溶液与100 μL无水乙醇的混合液体；空白组为100 μL不同质量浓度的超分子弹性蛋白液与100 μL无水乙醇的混合液体。将上述各混合液于室温避光反应30 min后，8 000 r/min离心1 min，取上清液于517 nm处测定吸光度。DPPH自由基清除率按照式（2）计算。

$$I=\frac{A_5-(A_4-A_3)}{A_5}\times 100\% \quad (2)$$

式中：

A_3——空白组吸光度；

A_4——样品组吸光度；

A_5——对照组吸光度；

I——DPPH自由基清除率，%。

1.8.2 •OH清除率测定

参考范三红等[23]的方法测定。样品组为在1.5 mL离心管中依次加入100 μL 9.0 mmol/L $FeSO_4$·$7H_2O$溶液、100 μL 9.0 mmol/L水杨酸溶液（用乙醇溶解）、100 μL不同质量浓度（0.5、1.0、3.0、5.0、10.0 g/L）的超分子弹性蛋白液和100 μL 8.8 mmol/L H_2O_2。对照组为将样品组中的超分子弹性蛋白液换成蒸馏水。空白组是将样品组中的H_2O_2换成蒸馏水。将上述溶液混匀后于37 ℃水浴加热30 min，8 000 r/min离心1 min，取上清液于510 nm处测吸光度。•OH清除率按照式（3）计算。

$$K=\frac{A_8-(A_7-A_6)}{A_8}\times 100\% \quad (3)$$

式中：

A_6——空白组吸光度；

A_7——样品组吸光度；

A_8——对照组吸光度；

K——•OH清除率，%。

1.8.3 ABTS自由基清除率测定

参考吕新河等[24]的方法测定。将200 μL 7.4 mmol/L ABTS与200 μL 2.6 mmol/L $K_2S_2O_8$混合，静置15 h，用PBS缓冲液（pH 7.4）稀释50倍作为ABTS工作液。样品组为25 μL不同质量浓度（0.5、1.0、3.0、5.0、10.0 g/L）的超分子弹性蛋白液与100 μL ABTS工作液的混合液体。对照组为25 μL去离子水和100 μL ABTS工作液的混合液体。空白组中分别加入25 μL不同质量浓度（0.5、1.0、3.0、5.0、10.0 g/L）的超分子弹性蛋白液和100 μL去离子水，静置6 min，8 000 r/min离心1 min，取上清液于734 nm处测定吸光度。ABTS自由基清除率按照式（4）计算。

$$P=\frac{A_{11}-(A_{10}-A_9)}{A_{11}}\times 100\% \quad (4)$$

式中：

A_9——空白组吸光度；

A_{10}——样品组吸光度；

A_{11}——对照组吸光度；

P——ABTS自由基清除率，%。

1.8.4 H_2O_2清除率测定

参考Liu等[25]的方法测定。分别取25 μL不同质量浓度（0.5、1.0、3.0、5.0、10.0 g/L）的超分子弹性蛋白液于1.5 mL离心管中，加入150 μL PBS溶液和25 μL 40 mmol/L的H_2O_2溶液，轻轻吹打混匀作为样品组，用25 μL PBS溶液代替超分子弹性蛋白液作为对照组，用150 μL PBS溶液代替H_2O_2作为空白组，于25 ℃下加热10 min，加热完毕后在230 nm处测定吸光度。H_2O_2清除率按照式（5）计算。

$$H=\frac{A_{14}-(A_{13}-A_{12})}{A_{14}}\times 100\% \quad (5)$$

式中：

A_{12}——空白组吸光度；

A_{13}——样品组吸光度；

A_{14}——对照组吸光度；

H——H_2O_2清除率，%。

1.8.5 H_2O_2诱导L929细胞氧化损伤模型的建立

将细胞按照1×10^4个/孔的密度接种于96孔细胞培养板中，贴壁培养24 h后，再继续培养24 h，在各孔中分别加入100 μL浓度为0、500、600、700、

800、900、1 000、1 100、1 200、1 300、1 400、1 500 μmol/L 的 H_2O_2，诱导 4 h 后，用 PBS 溶液润洗 3 次，采用 CCK-8 法测定细胞活力，具体方法同 1.6.2。

1.8.6　超分子弹性蛋白对 H_2O_2 诱导的 L929 细胞损伤的保护作用

将细胞按照 1×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔细胞培养板中，贴壁培养 24 h，样品组分别加入质量浓度为 0.10、0.25、0.50、1.00、1.50 g/L 的超分子弹性蛋白液。对照组和模型组加入 100 μL DMEM 完全培养基。空白组只加入 DMEM 完全培养基，不接种细胞。孵育 24 h 后吸出上清液，用 PBS 溶液润洗 3 次，样品组和模型组加入 100 μL 1 000 μmol/L 的 H_2O_2 诱导损伤 4 h，再用 PBS 溶液润洗 3 次，用 CCK-8 法测定细胞活力，具体方法同 1.6.2。

1.9　数据统计与分析

利用 SPSS 22.0 软件，使用单因素方差分析中的 Duncan 检验进行显著性分析，$P<0.05$ 表示差异显著，数据用平均值±标准差表示，使用 Origin 2021 进行图像绘制。

2　结果与讨论

2.1　超分子弹性蛋白的纯化及自组装性质表征

按照图 1 所示流程构建 pET28a-Ure2(1-80)-(GB1-R16)$_4$-RGD 质粒，将质粒导入 BL21(DE3) 宿主菌进行发酵并诱导表达。在纯化时，先使用

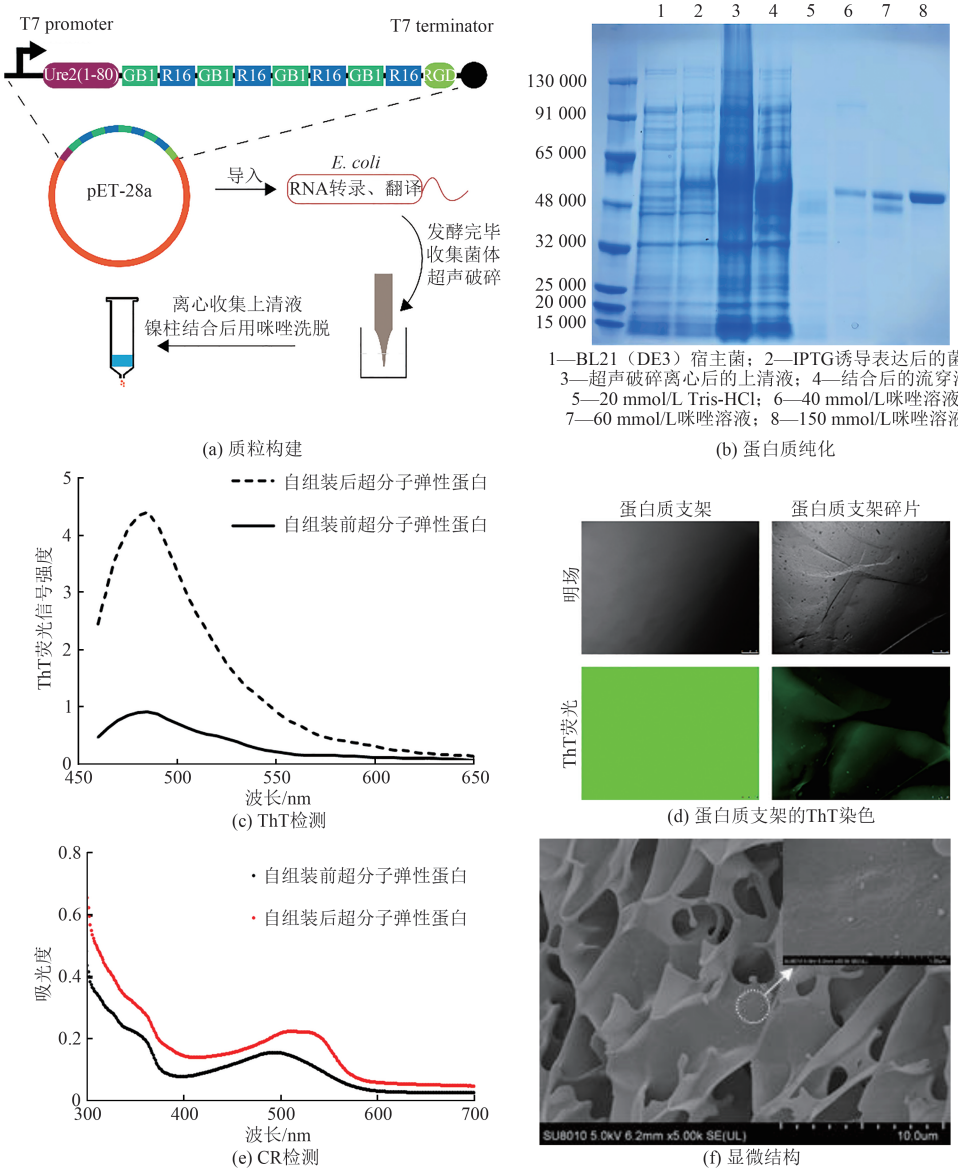


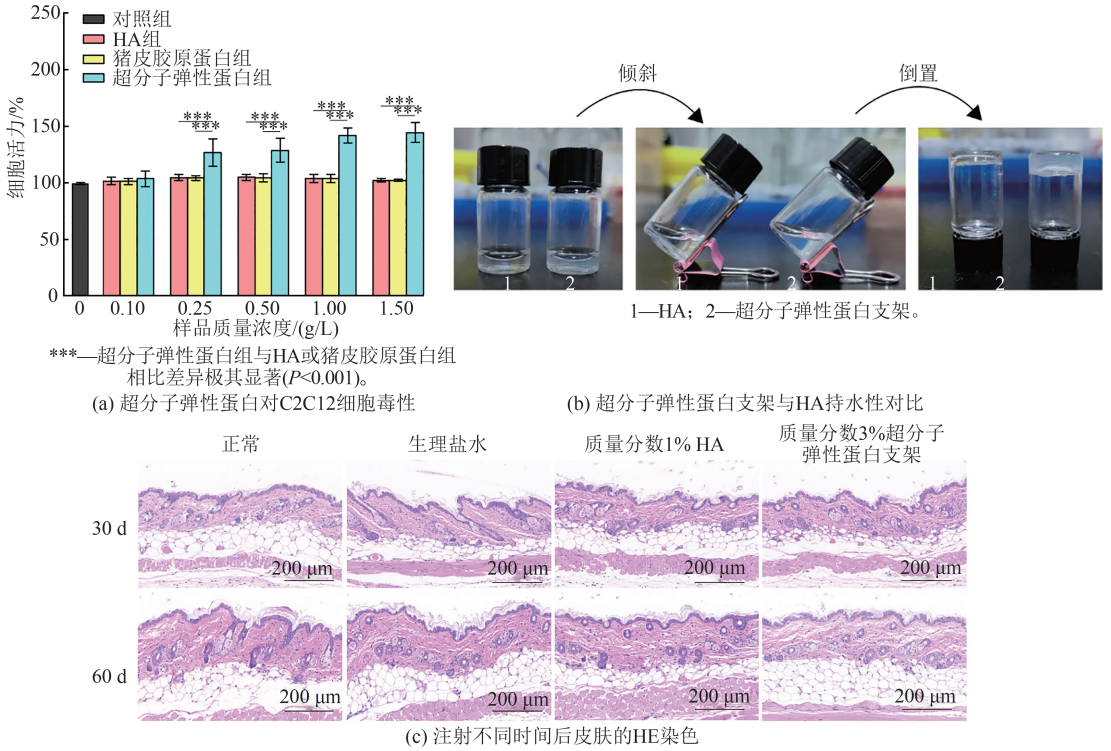
图 1　超分子弹性蛋白的纯化及自组装性质表征

Fig. 1　Purification and self-assembly characterization of supramolecular elastin

40 mmol/L 和 60 mmol/L 咪唑溶液将杂蛋白质洗去，最后使用 150 mmol/L 咪唑溶液洗脱得到纯的目的蛋白质。目前已知的 ThT 和 CR 都只与淀粉样蛋白质或多肽聚集体结合，而不是与它们对应的单体结合，因此这 2 种试剂可以用于体外或者体内的淀粉样蛋白质原纤维的检测[26]。从图 1 可以看出，自组装后比自组装前的 ThT 荧光信号强，被 ThT 的 Tris-HCl 缓冲液破碎后，蛋白质支架发出荧光，说明蛋白质支架特异性结合了 ThT，而含有 ThT 的缓冲液是黑色的，这与 Arndt 等[27]的研究结果一致。同时，蛋白质自组装后发生了 CR 吸收增加和红移，这与 Jacob 等[17]的研究结果一致。进一步使用冷冻扫描电子显微镜可以观察到蛋白质支架呈现多孔结构，使其具有负载、控制营养物质[28]以及药物释放的能力[29]。随着放大倍数增大，可以清楚看见蛋白质支架表面有纤维状结构。以上结果均表明，纯化出来的蛋白质可以自组装成蛋白质纤维并构成支架网络。

2.2　超分子弹性蛋白的生物安全性

采用 CCK-8 法评价不同质量浓度的超分子弹性蛋白、HA 和猪皮胶原蛋白对 C2C12 细胞活力的影响。由图 2 可知，超分子弹性蛋白质量浓度由 0.10 g/L 增加至 1.50 g/L 时，细胞活力也随之增加，且细胞活力均大于 100%。HA 和猪皮胶原蛋白组的细胞活力均大于 95%，表明所构建的超分子弹性蛋白、商业化的 HA 和猪皮胶原蛋白对 C2C12 细胞活力没有明显的负面影响[30]，且超分子弹性蛋白自组装后的支架比 HA 具有更好的持水性。为了进一步验证其在体内的生物相容性，将各组分进行皮下注射，通过对 30 d 和 60 d 的组织进行 HE 染色发现，超分子弹性蛋白组染色结果与正常皮肤无明显差别，未出现破损情况与炎症反应。上述结果说明，超分子弹性蛋白的生物安全性高。



***—超分子弹性蛋白组与HA或猪皮胶原蛋白组相比差异极其显著(P<0.001)。

(a) 超分子弹性蛋白对C2C12细胞毒性

1—HA；2—超分子弹性蛋白支架。

(b) 超分子弹性蛋白支架与HA持水性对比

(c) 注射不同时间后皮肤的HE染色

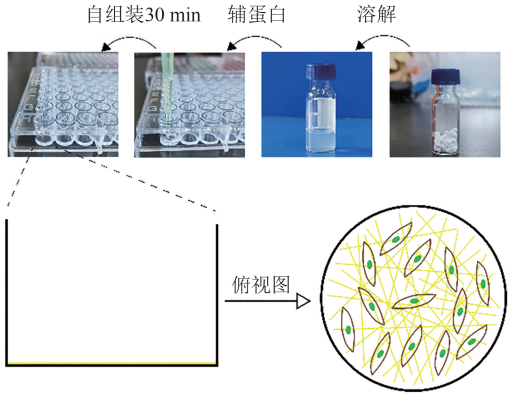
图 2　超分子弹性蛋白的生物安全性

Fig. 2　Biosafety of supramolecular elastin

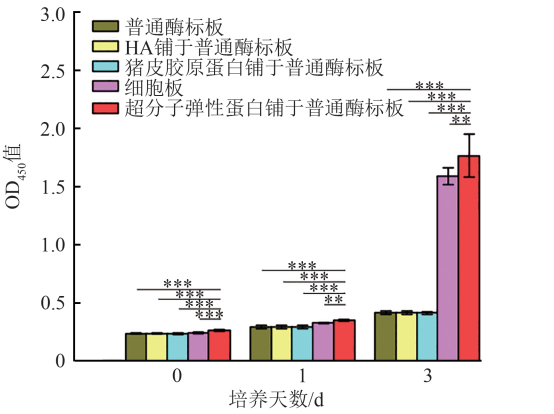
2.3　超分子弹性蛋白支架对 C2C12 细胞增殖的影响

在食品领域，合适的细胞培养支架有利于细胞培养肉的发展[31]；在生物医药领域，细胞培养支架可以用于组织修复以及其他与细胞有关的研究，且 RGD 序列修饰后的材料对细胞的培养更加有利[32]。如图 3 所示，溶解后的超分子弹性蛋白溶液浸润 96 孔板底部后吸出，让其自组装 30 min 后，超分子弹性蛋白原纤维铺满并黏附于普通酶

标板的底部，蛋白质中的RGD细胞结合位点有利于接种后的细胞黏附并且生长于超分子弹性蛋白原纤维的表面。HA和猪皮胶原蛋白也按照上述操作涂抹于普通酶标板上，通过CCK-8法以及细胞活/死染色法观察细胞生长状况，C2C12细胞增殖情况用OD_{450}值表征。与HA、猪皮胶原蛋白和细胞板相比，加入超分子弹性蛋白原纤维对促进细胞黏附和增殖的效果更加显著，说明超分子弹性蛋白支架有利于C2C12细胞的增殖，可以作为细胞培养支架。

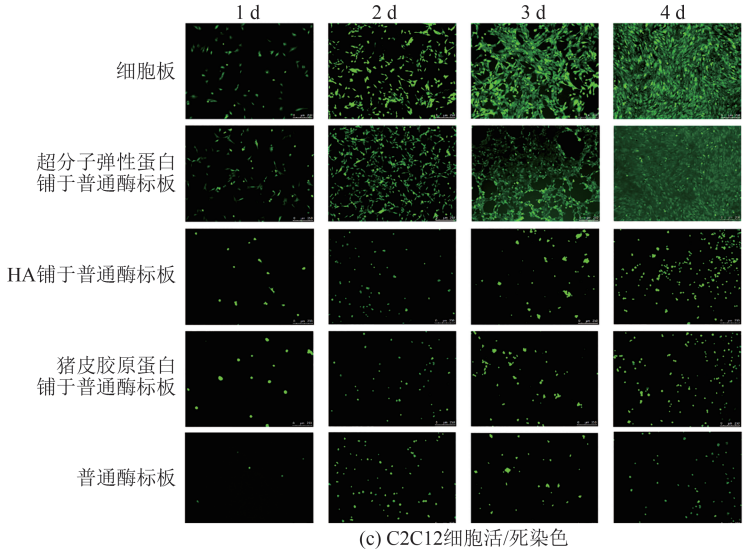


(a) 细胞铺在蛋白质支架上的示意图



**—超分子弹性蛋白组与其余组相比差异极显著(P<0.01)；
***—超分子弹性蛋白组与其余组相比差异极其显著(P<0.001)。

(b) C2C12细胞增殖



(c) C2C12细胞活/死染色

图 3　超分子弹性蛋白支架对C2C12细胞增殖的影响

Fig. 3　Effect of supramolecular elastin scaffold on C2C12 cell proliferation

2.4　超分子弹性蛋白的氨基酸组成

氨基酸组成是蛋白质发挥抗氧化性的重要基础。由表2可知，超分子弹性蛋白的氨基酸组成较为丰富，含有8种人体必需氨基酸，占蛋白质质量的36.68%，其中质量分数最高的是苏氨酸（Thr）。超分子弹性蛋白的氨基酸组成多样，营养丰富，可作为功能性食品。

2.5　超分子弹性蛋白的抗氧化活性

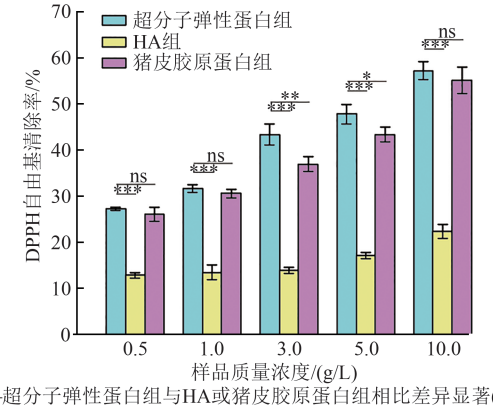
抗氧化活性物质可以通过与DPPH自由基的未成对电子配对，使DPPH自由基数目变少，导致溶液颜色变浅，根据颜色深浅判定该物质清除DPPH自由基的能力。•OH在人体内可以与一些具有功能活性的生物大分子发生反应，使其失去原本的功能，从而造成机体损伤，超分子弹性蛋白可通过清除•OH，降低溶液吸光度，从而测定该物质清除•OH的能力。ABTS自由基是衡量总体抗氧化能力的一个重要指标，与DPPH自由基清除

表2　超分子弹性蛋白的氨基酸组成及质量分数

Table 2　Amino acid composition and mass fraction of supramolecular elastin

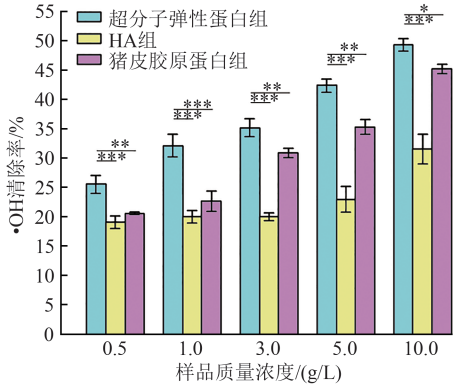
氨基酸种类		质量分数/%
必需氨基酸	异亮氨酸（Ile）	1.85
	亮氨酸（Leu）	3.69
	赖氨酸（Lys）	6.60
	苯丙氨酸（Phe）	2.64
	苏氨酸（Thr）	13.98
	色氨酸（Trp）	1.06
	缬氨酸（Val）	5.28
	甲硫氨酸（Met）	1.58
非必需氨基酸	丙氨酸（Ala）	8.71
	精氨酸（Arg）	2.11
	天冬酰胺（Asn）	11.87
	天冬氨酸（Asp）	7.12
	谷氨酰胺（Gln）	4.49
	谷氨酸（Glu）	5.80
	甘氨酸（Gly）	9.50
	脯氨酸（Pro）	2.37
	丝氨酸（Ser）	7.12
	酪氨酸（Tyr）	4.22

原理较为相似。H_2O_2可以通过Fenton反应穿透细胞膜积累自由基，从而导致细胞损伤和死亡，因此研究自由基对机体的损伤时，H_2O_2也被认为是自由基。贾斌等[33]研究紫花苜蓿蛋白的不同消化阶段发现，胃消化2 h后水解物中疏水性氨基酸含量增加有利于蛋白质对DPPH自由基的清除。Ghribi等[34]同样发现疏水性氨基酸所提供的疏水环境有利于提升酶解产物的抗氧化能力。刘辉等[35]认为有环状结构的氨基酸可以作为•OH的清除剂。郑淋[36]的研究结果显示抗氧化肽中游离的Tyr、Trp对清除ABTS自由基的贡献较大。由表2可知，超分子弹性蛋白中质量分数最高的3个疏水性氨基酸分别为Gly、Lys、Val。环状结构的氨基酸有Phe、Tyr、Trp以及Pro，质量分数分别为2.64%、4.22%、1.06%和2.37%，这为超分子弹性蛋白具备抗氧化能力提供了理论依据。如图4所示，在样品质量浓度为0.5~10.0 g/L时，超分子弹性蛋



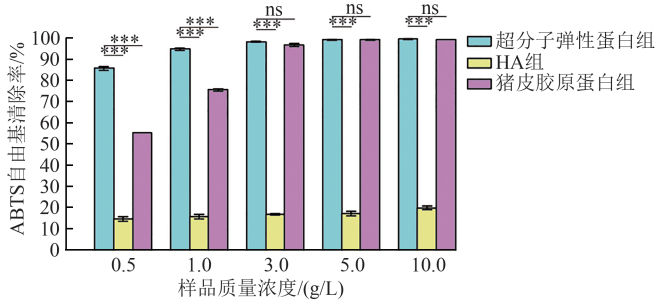
*—超分子弹性蛋白组与HA或猪皮胶原蛋白组相比差异显著(P<0.05)；**—超分子弹性蛋白组与HA或猪皮胶原蛋白组相比差异极显著(P<0.01)；***—超分子弹性蛋白组与HA或猪皮胶原蛋白组相比差异极其显著(P<0.001)；ns—超分子弹性蛋白组与HA或猪皮胶原蛋白组相比差异不显著(P>0.05)。

(a) 超分子弹性蛋白对DPPH自由基的清除能力



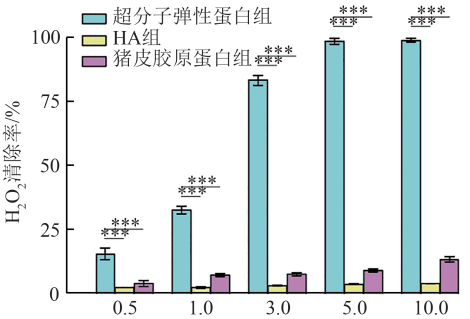
*—超分子弹性蛋白组与HA或猪皮胶原蛋白组相比差异显著(P<0.05)；**—超分子弹性蛋白组与HA或猪皮胶原蛋白组相比差异极显著(P<0.01)；***—超分子弹性蛋白组与HA或猪皮胶原蛋白组相比差异极其显著(P<0.001)。

(b) 超分子弹性蛋白对•OH的清除能力



***—超分子弹性蛋白组与HA或猪皮胶原蛋白组相比差异极其显著(P<0.001)；ns—超分子弹性蛋白组与HA或猪皮胶原蛋白组相比差异不显著(P>0.05)。

(c) 超分子弹性蛋白对ABTS自由基的清除能力



***—超分子弹性蛋白组与HA或猪皮胶原蛋白组相比差异极其显著(P<0.001)。

(d) 超分子弹性蛋白对H_2O_2的清除能力

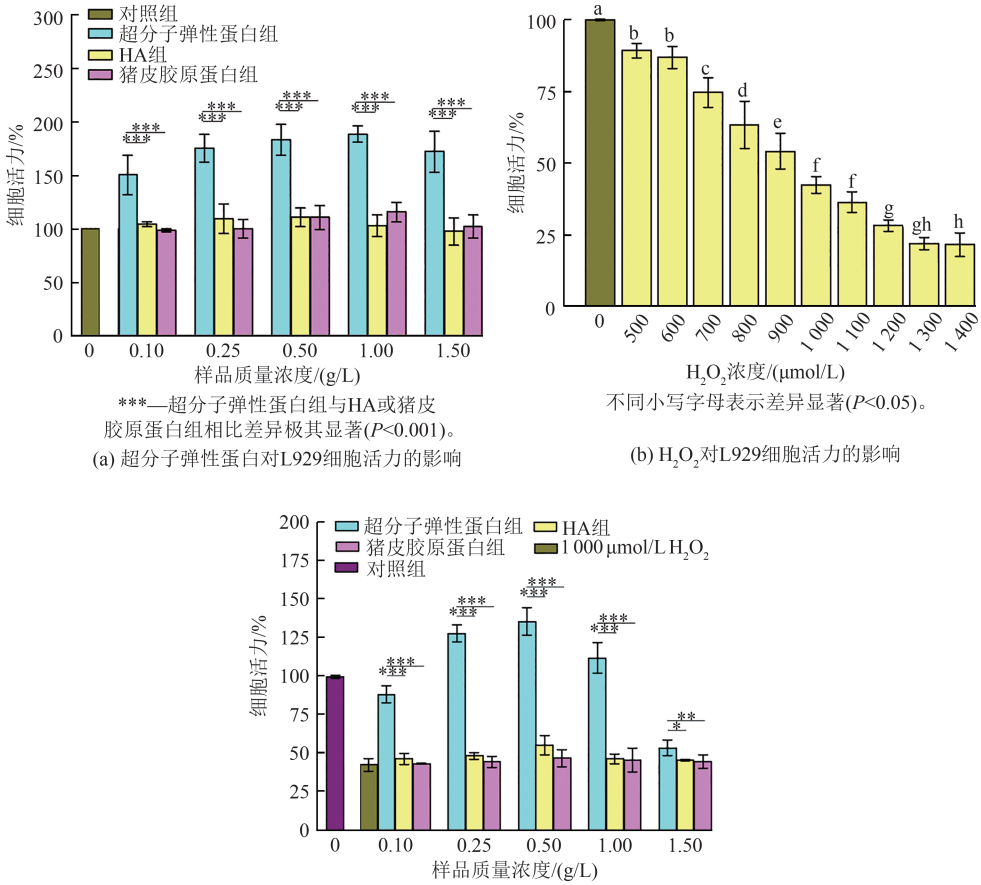
图4　超分子弹性蛋白体外抗氧化活性

Fig. 4　Antioxidant activity of supramolecular elastin *in vitro*

白对于DPPH自由基、•OH、ABTS自由基、H_2O_2的清除率与HA相比均具有显著性差异；在样品质量浓度为3.0~5.0 g/L时，超分子弹性蛋白对DPPH自由基清除率与猪皮胶原蛋白相比具有显著性差异。在样品质量浓度为0.5~10.0 g/L时，超分子弹性蛋白对•OH和H_2O_2的清除率与猪皮胶原蛋白相比均具有显著性差异。在样品质量浓度为0.5~1.0 g/L时，超分子弹性蛋白对ABTS自由基清除率与猪皮胶原蛋白相比具有显著性差异。以上结果表明超分子弹性蛋白具有优异的抗氧化活性。

2.6 超分子弹性蛋白对H_2O_2诱导的L929细胞损伤的保护作用

采用CCK-8法评估不同质量浓度的超分子弹性蛋白、HA以及猪皮胶原蛋白对L929细胞活力的影响。如图5(a)所示，与HA和猪皮胶原蛋白相比，超分子弹性蛋白质量浓度在0.10~1.50 g/L时，细胞具有较高的活力，均大于125%。且在此质量浓度范围内，超分子弹性蛋白、HA以及猪皮胶原蛋白不会影响L929细胞活力。利用H_2O_2对细胞损伤的作用原理造模，结果显示，不同浓度H_2O_2孵育4 h后，细胞活力与空白组相比均显著下降，随着H_2O_2浓度上升，细胞活力逐渐下降，表现出浓度依赖性。当H_2O_2浓度为1 000 μmol/L时，细胞活力为42.3%，对L929细胞的损伤为57.7%，因此选用1 000 μmol/L为建模时H_2O_2的最佳浓度，见图5(b)。H_2O_2损伤后，超分子弹性蛋白组的细胞活力均显著优于HA以及猪皮胶原蛋白，0.50 g/L的超分子弹性蛋白对L929细胞的保护效果最强，细胞活力达到135.4%，见图5(c)。以上结果证实了超分子弹性蛋白对于H_2O_2诱导



***—超分子弹性蛋白组与HA或猪皮胶原蛋白组相比差异极其显著(P<0.001)。

(a) 超分子弹性蛋白对L929细胞活力的影响

不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。

(b) H_2O_2对L929细胞活力的影响

*—超分子弹性蛋白组与HA或猪皮胶原蛋白组相比差异显著(P<0.05)；

**—超分子弹性蛋白组与HA或猪皮胶原蛋白组相比差异极显著(P<0.01)；

***—超分子弹性蛋白组与HA或猪皮胶原蛋白组相比差异极其显著(P<0.001)。

(c) 超分子弹性蛋白对H_2O_2诱导L929细胞损伤的保护作用

图5 超分子弹性蛋白对H_2O_2诱导的L929细胞损伤的保护作用

Fig. 5 Protective effect of supramolecular elastin on H_2O_2-induced L929 cell damage

的L929细胞氧化损伤具有优异的保护作用，同时其效果显著优于商业化的HA以及猪皮胶原蛋白。

3 结论

作者构建的超分子弹性蛋白对C2C12和L929细胞无毒性作用，且皮下注射结果表明其不会引起皮肤不良反应和炎症反应，生物安全性高。自组装后形成的蛋白质支架具备促进C2C12细胞增殖的能力。同时，与HA和猪皮胶原蛋白相比，超分子弹性蛋白具有良好的体外抗氧化能力，其中DPPH自由基清除率最高达到了57.20%、•OH清除率最高达到了49.49%、ABTS自由基清除率最高达到了99.89%、H_2O_2清除率最高达到了99.17%。超分子弹性蛋白对H_2O_2诱导的L929细胞氧化损伤的保护作用最强时，细胞活力可达135.4%，这使得超分子弹性蛋白作为细胞培养支架和抗氧化剂成为可能。同时，通过冷冻扫描电子显微镜观察发现，此蛋白质支架呈现多孔状，为其作为营养物质或药物载体提供了良好的结构基础，拓宽了应用范围。该研究结果表明超分子弹性蛋白在功能性食品、化妆品以及医药等领域具有很大的应用潜力。

参考文献

[1] GUO Z W，XU Y Y，DONG L N，et al. Design of functional hydrogels using smart polymer based on elastin-like polypeptides [J]. Chemical Engineering Journal，2022，435(3)：135155.

[2] TIAN D M，WAN H H，CHEN J R，et al. *In-situ* formed elastin-based hydrogels enhance wound healing *via* promoting innate immune cells recruitment and angiogenesis [J]. Materials Today Bio，2022，15：100300.

[3] 李佳楠. 重组弹性蛋白的制备及其凝胶的性质研究[D]. 兰州：兰州大学，2022.

[4] 李清岚，刘颖，崔春. 弹性蛋白肽的制备工艺优化及其理化性质分析[J]. 中国调味品，2023，48(6)：189-194，220. LI Q L，LIU Y，CUI C. Optimization of preparation process of elastin peptides and analysis of their physicochemical properties[J]. China Condiment，2023，48(6)：189-194，220.(in Chinese)

[5] SILVA R，SINGH R，SARKER B，et al. Hydrogel matrices based on elastin and alginate for tissue engineering applications [J]. International Journal of Biological Macromolecules，2018，114：614-625.

[6] ARSICO G，JIN C，ABBAH S A，et al. Elastin-like hydrogel stimulates angiogenesis in a severe model of critical limb ischemia (CLI)：an insight into the glyco-host response[J]. Biomaterials，2020，269：1-2.

[7] 刘洋. 弹性蛋白肽的抗皮肤光老化功效及其作用机制研究[D]. 广州：华南理工大学，2019.

[8] 杨国新. 新型类弹性蛋白肽的分子设计、制备与表征[D]. 大连：大连理工大学，2022.

[9] STRIEN J，ESCALONA-RAYO O，JISKOOT W，et al. Elastin-like polypetide-based micell-es as a promising platform in nanomedicinep [J]. Journal of Controlled Release，2022，353：713-726.

[10] GONG L K，YANG Z Y，ZHANG F，et al. Cytokine conjugates to elastin-like polypeptides [J]. Advanced Drug Delivery Reviews，2022，190：114541.

[11] SARANGTHEM V，SHARMA H，GOEL R，et al. Application of elastin-like polypeptide (ELP) containing extra-cellular matrix (ECM) binding ligands in regenerative medicine [J]. International Journal of Biological Macromolecules，2022，207：443-453.

[12] 卫思丽. 类弹性蛋白的设计、制备与性能研究[D]. 西安：西北大学，2019.

[13] AHMADI Z，YADAV S，KAR A K，et al. An injectable self-assembling hydrogel based on RGD peptidomimetic β-sheets as multifunctional biomaterials[J]. Biomaterials Advances，2022，133：112633.

[14] BAXA U，TAYLOR K L，WALL J S，et al. Architecture of Ure2p prion filaments：the N-terminal domains from a central core fiber [J]. Journal of Biological Chemistry，2003，278(44)：43717-43727.

[15] WU J J，ZHOU L，PENG H，et al. A general and convenient peptide self-assembling mechanism for developing supramolecular versatile nanomaterials based on the biosynthetic hybrid amyloid-resilin protein [J]. Advanced Materials，2024，36(4)：e2304364.

[16] 何凤群. 牛血清白蛋白淀粉样纤维化及其细胞毒性[D]. 西安：陕西师范大学，2010.

[17] JACOB R S，GHOSH D，SINGH P K，et al. Self healing hydrogels composed of amyloid nano fibrils for cell culture and stem cell differentiation [J]. Biomaterials，2015，54：97-105.

[18] ALHEIB O，SILVA L P，SILVA M A，et al. Injectable laminin-biofunctionalized gellan gum hydrogels loaded with myoblasts for skeletal muscle regeneration [J]. Acta Biomaterialia，2022，143：282-294.

[19] GAO L，ZHOU Y L，PENG J L，et al. A novel dual-adhesive and bioactive hydrogel activated by bioglass for wound healing[J]. NPG Asia Materials，2019，11：66.

[20] WANG Z，ZHANG Y N，YIN Y J，et al. High-strength and injectable supramolecular hyd-rogel self-assembled by monomeric nucleoside for tooth-extraction wound healing [J]. Advanced Materials，2022，34(13)：8-9.

[21] SUN A，HE X Y，LI L，et al. An injectable photopolymerized hydrogel with antimicrobial and biocompatible properties for infected skin regeneration[J]. NPG Asia Materials，2020，12：25.

[22] PAREJO I，CODINA C，PETRAKIS C，et al. Evaluation of scavenging activity assessed by Co(II)/EDTA-induced luminol chemiluminescence and DPPH (2，2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical assay [J]. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods，2000，44(3)：507-512.

[23] 范三红，贾槐旺，李兰，等. 紫苏籽粕蛋白源抗氧化肽的纯化、结构鉴定及体外抗氧化活性[J]. 中国粮油学报，2022，37(3)：79-87.
FAN S H，JIA H W，LI L，et al. Purification and structural identification of antioxidant peptide from perilla seed meal protein and antioxidant activity *in vitro*[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils，2022，37(3)：79-87.(in Chinese)

[24] 吕新河，朱云龙. 泥鳅蛋白多肽的抗氧化活性[J]. 食品与生物技术学报，2022，41(1)：22-27.
LYU X H，ZHU Y L. Study on antioxidant activity of loach protein polypeptide[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2022，41(1)：22-27.(in Chinese)

[25] LIU M，MIN L，ZHU C，et al. Preparation，characterization and antioxidant activity of silk peptides grafted carboxymethyl chitosan[J]. International Journal of Biological Macromolecules，2017，104(PtA)：732-738.

[26] MAJI S K，PERRIN M H，SAWAYA M R，et al. Functional amyloids as natural storage of peptide hormones in pituitary secretory granules[J]. Science，2009，325(5938)：328-332.

[27] ARNDT T，JAUDZEMS K，SHILKOVA O，et al. Spidroin N-terminal domain forms amyloid-like fibril based hydrogels and provides a protein immobilization platform[J]. Nature Communications，2022，13(1)：4695.

[28] LIU L Y，ZHANG D D，SONG X X，et al. Compound hydrogels derived from gelatin and gellan gum regulates the release of anthocyanins in simulated digestion[J]. Food Hydrocolloids，2022，127：1-2.

[29] ZHAO X D，YANG Y X，YU J，et al. Injectable hydrogels with high drug loading through B-N coordination and ROS-triggered drug release for efficient treatment of chronic periodontitis in diabetic rats[J]. Biomaterials，2022，282：121387.

[30] HE Y X，LI Y，SUN Y D，et al. A double-network polysaccharide-based composite hydrogel for skin wound healing[J]. Carbohydrate Polymers，2021，261：117870.

[31] 刘东红，利婕，牛瑞浩，等. 细胞培养肉支架材料与组织成型研究进展[J]. 中国食品学报，2022，22(12)：14-24.
LIU D H，LI J，NIU R H，et al. Research progress of cell culture meat scaffold materials and tissue forming[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology，2022，22(12)：14-24.(in Chinese)

[32] JIA P P，ZHAO X T，LIU Y，et al. The RGD-modified self-assembling D-form peptide hydrogel enhances the therapeutic effects of mesenchymal stem cells (MSC) for hindlimb ischemia by promoting angiogenesis [J]. Chemical Engineering Journal，2022，450(1)：138004.

[33] 贾斌，毛小雨，许馨予，等. 不同胃肠消化阶段紫花芸豆蛋白的抗氧化活性和结构特征[J]. 中国食品学报，2022，22(9)：63-73.
JIA B，MAO X Y，XU X Y，et al. The antioxidant activity and structural characteristics of purple kidney bean protein during different digestive stages of gastrointestinal[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology，2022，22(9)：63-73.(in Chinese)

[34] GHRIBI A M，SILA A，PRZYBYLSKI R，et al. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysate of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein concentrate [J]. Journal of Functional Foods，2015，12：516-525.

[35] 刘辉，张会生，童火艳，等. 酶解大豆蛋白抗氧化肽的分离纯化与鉴定[J]. 食品科学，2022，43(20)：191-197.
LIU H，ZHANG H S，TONG H Y，et al. Isolation and identification of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed soybean protein[J]. Food Science，2022，43(20)：191-197.(in Chinese)

[36] 郑淋. 抗氧化肽的构效关系及定向制备的研究[D]. 广州：华南理工大学，2015.

（责任编辑：史润东东）