



新型重组人源弹性蛋白交联凝胶快速修复光损伤皮肤

李佳楠¹, 孙秀霞^{2*}, 肖建喜^{1*}

1. 兰州大学化学化工学院, 兰州 730000

2. 兰州大学药学院, 兰州 730000

*通讯作者, E-mail: sunxx@lzu.edu.cn; xiaojsx@lzu.edu.cn

收稿日期: 2022-11-12; 接受日期: 2022-12-19; 网络版发表日期: 2023-01-16

国家自然科学基金(编号: 22074057, 21775059)资助项目

摘要 光损伤是最常见的皮肤疾病, 每年遭受皮肤光损伤的人次超过全球总人口的1/3. 弹性蛋白是皮肤真皮层中的关键蛋白质, 在维持皮肤形态中扮演着重要角色. 弹性蛋白目前主要通过动物组织提取, 它存在病毒传播隐患和容易降解等缺陷. 本研究构建了一种新型的重组人源弹性蛋白及其交联凝胶, 能够快速修复光损伤皮肤. 该重组人源弹性蛋白由人弹性蛋白片段组成, 具有与天然弹性蛋白类似的二级结构和可逆相变特性. 该重组人源弹性蛋白经THPC交联形成凝胶, 具有良好的机械强度. 扫描电子显微镜结果表明, 该重组弹性蛋白凝胶具有均匀分布的网孔结构. 细胞实验表明, 该凝胶无细胞毒性, 并可以显著促进成纤维细胞的增殖. 光损伤模型小鼠的动物实验表明, 该凝胶可减轻光损伤小鼠的炎症反应, 有效抑制表皮异常增生, 并明显缩短皮肤愈合周期. 本研究开发的高纯度重组人源弹性蛋白及其交联凝胶, 对光损伤皮肤有显著的修复效果, 在皮肤医学领域具有广泛的应用前景.

关键词 重组人源弹性蛋白, 弹性蛋白交联凝胶, 紫外光损伤, 皮肤修复

1 引言

光损伤是最常见的皮肤疾病. 皮肤作为人体最大的器官, 同时也是保护机体免受外界侵袭的第一道屏障^[1]. 过量的紫外线照射皮肤, 会产生难以逆转的结构损伤, 进而引起红斑、炎症、甚至皮肤癌等一系列皮肤疾病^[2]. 根据世界卫生组织的统计数据, 每年皮肤遭受光损伤人次超过全球总人口的1/3, 由晒伤引发的黑色素瘤导致死亡的人数超过6万. 目前针对皮肤的紫

外光损伤, 已经开发了局部涂覆保湿类药物或口服抗生素等治疗方法, 但是这些方法很难修复皮肤真皮层的结构性缺损. 也有研究表明, 补充外源性的胶原蛋白能够减轻紫外光对皮肤中胶原纤维的破坏, 从而加快修复, 但该类方法不能促进皮肤中弹性纤维的再生^[3,4]. 因此, 亟需开发一种更为有效的皮肤光损伤治疗策略^[5].

弹性蛋白是皮肤真皮层中一种重要的结构蛋白, 在维持皮肤形态中扮演重要角色^[2,6]. 弹性蛋白赋予皮肤弹性, 并参与调节细胞的增殖和分化等基本的生理

引用格式: Li J, Sun X, Xiao J. A crosslinked hydrogel based on recombinant human elastin for rapid repair of photodamaged skin. *Sci Sin Chim*, 2023, 53: 227–234, doi: 10.1360/SSC-2022-0225

过程^[7,8]。弹性蛋白的结构性破坏与异常降解,是紫外光损伤皮肤的特征性病理变化^[2,9]。变性弹性蛋白在真皮中的堆积,会引起弹性纤维增粗、卷曲和排列紊乱,导致皮肤弹性降低,屏障能力减弱,进而产生皱纹、斑块与结节^[2,10]。因此,弹性蛋白在皮肤医学中的应用备受关注^[11]。

弹性蛋白目前主要依靠从动物组织中提取。牛颈部韧带经CNBr处理后,再通过酶消化除杂,首次得到低溶解度的弹性蛋白^[12]。鸡皮经NaCl脱脂和NaOH降解等步骤,提取得到可溶弹性蛋白^[13]。动物提取的弹性蛋白,易降解为片段,丧失弹性蛋白的结构特征和生物活性,并且存在病毒传播风险,严重限制了其在组织工程领域的应用。

基因重组弹性蛋白具有水溶性好、质量可控和无病毒传播风险等优势,因此引起越来越多的关注。利用大肠杆菌表达系统,可制备以VPAVG为重复单元的重组类弹性蛋白,其具有与天然弹性蛋白相似的可逆相变特性^[14]。重组类弹性蛋白 $[(VAPGVG)_3S]_n$ 能够在大肠杆菌中以可溶性状态大量表达,具有良好的生物活性^[15]。但这些重组类弹性蛋白缺少包含交联位点的亲水结构域,无法形成凝胶。

本研究制备了新型重组人源弹性蛋白及其交联凝胶,可快速修复光损伤皮肤。通过构建包含亲水/疏水结构域的重组人源弹性蛋白RHE (recombinant human elastin)的表达质粒和大肠杆菌工程菌株,成功制备了高纯度的重组人源弹性蛋白。该重组人源弹性蛋白具有与天然弹性蛋白相似的二级结构和可逆相变特性。利用四羟甲基氯化磷(THPC)交联得到的重组人源弹性蛋白凝胶,具有良好的机械强度和均匀分布的微观形貌。该凝胶能够显著促进细胞的增殖和黏附,具有高生物活性。动物实验表明,该凝胶可抑制表皮增生,诱导胶原纤维与弹性纤维再生,对光损伤皮肤具有显著的修复效果。本研究提供了一种新型的重组人源弹性蛋白及其凝胶的制备方法,在组织工程领域具有广阔的应用前景。

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

2.1.1 实验试剂

Prestained Protein Marker Ladder、胰蛋白胍和酵

母提取物均购自赛默飞世尔科技有限公司(美国)。二水合磷酸二氢钠、十二水合磷酸氢二钠、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、葡萄糖和氯化钠均购自国药集团化学试剂有限公司(中国)。丙三醇(甘油)购自天津大茂化学试剂厂(中国)。四羟甲基氯化磷、硫酸卡那霉素和异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)均购自阿拉丁生化科技股份有限公司(中国)。蛋白纯化填料(Ni Bestarose FF/HP亲和介质)购自博格隆生物技术有限公司(中国)。丙烯酰胺购自Amresco公司(美国)。咪唑和透析袋(截流分子量8000~14000)均购自北京博奥拓达科技有限公司(中国)。链霉亲和素、胰蛋白酶、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、0.067 M磷酸盐缓冲溶液(PBS)、DMEM培养基及CCK-8 (cell counting kit-8)均购自通用电气医疗集团(GE Healthcare Life Science, 美国)。Hoechst33258和鬼笔环肽-四甲基罗丹明异硫氰酸酯(Phalloidin-TRITC)购自Sigma公司(美国)。

2.1.2 实验仪器

电子分析天平(Mettler Toledo AL104, 瑞士),紫外可见分光光度计(Shimadzu UV-1750, 日本),台式低温高速离心机(SCIENTZ-H2050R, 中国),立式高压灭菌锅(上海申安 LDZX-50KBS, 中国),高压均质机(安拓思AH-MINI PLUS, 中国),冷冻干燥机(SCIENTZ-12N, 中国),基质辅助激光解析电离串联飞行时间质谱仪(Shimadzu MALDI-TOF 7090, 日本),电泳仪(北京六一DYY-7C, 中国),研究级荧光显微镜(Olympus IX71, 日本),聚物流变仪系统(Anton Paar Physica MCR301, 奥地利),扫描电子显微镜(Hitachi S-4800, 日本),酶标仪(Tecan infinite M200, 瑞士),圆二色谱分析仪(JASCO J1500, 日本)。

2.2 实验方法

2.2.1 重组人源弹性蛋白的制备

将重组人源弹性蛋白RHE的基因插入pcold-III质粒中,导入大肠杆菌BL21(DE3)宿主,得到重组人源弹性蛋白RHE工程菌株,保存于15%甘油。

取10 μ L重组人源弹性蛋白RHE菌株的甘油保存液,室温下复苏后,接种到100 mL LB培养基(10 g NaCl, 10 g胰蛋白胍, 5 g酵母提取物, 50 mg硫酸卡那霉素/L)中,作为发酵的一级种子;培养10~12 h后,转接到4 \times 1 L LB培养基内,继续扩大培养,测量培养基在

$\lambda=600$ nm处的吸光度(OD_{600}), OD_{600} 达到0.8左右时, 加入终浓度为1.0 mM的IPTG, 25°C下诱导表达12 h, 离心收集菌体。

RHE菌体分散于A1液中(20 mmol/L PBS, 20 mmol/L咪唑, pH 7.4), 搅拌均匀。采用超高压均质机800 bar, 4°C, $f=40$ Hz均质2~3次, 使菌体破碎, 菌体内部的蛋白游离。破碎液离心20 min, 保留上清蛋白粗溶液, 经镍离子亲和色谱柱纯化, 20 mmol/L PBS中透析, 冻干, 得到重组人源弹性蛋白粉末。

2.2.2 圆二色谱

重组人源弹性蛋白RHE的圆二色谱图在圆二色光谱仪(JASCO J1500)上获得。将重组人源弹性蛋白RHE的冻干粉末溶解于去离子水, 制备成终浓度为10 μ mol/L的CD样品, 倒入厚度为1 mm的微量比色皿。温度25°C, 波长扫描范围为190~260 nm, 间隔1 nm, 平均时间为5 s。利用Chirascan软件对重组人源弹性蛋白的圆二色谱图进行分析, 计算不同构象在二级结构中的占比。

2.2.3 可逆相变实验

将重组人源弹性蛋白RHE的冻干粉末分散于相变缓冲液(0.5 mol/L NaCl, 1 mmol/L $CaCl_2$, 50 mmol/L Tris, pH 7.4), 蛋白终浓度为100 μ mol/L。将溶液倒入比色皿, 紫外分光光度计中以室温为起始温度, 升温间隔2°C, 每个温度下平衡3 min, 测定蛋白溶液在波长440 nm下的吸光度变化, 吸光度不断增加直至达到稳定后, 停止测试。吸光度显著增加区间的终点为可逆相变点 T_i 。将加热后的蛋白浊液置于4°C冰箱内冷却3 h, 重新振荡分散, 观察蛋白的复溶情况, 确认所有沉淀全部溶解, 以验证相变的可逆性。

2.2.4 重组人源弹性蛋白交联凝胶的制备

将重组人源弹性蛋白RHE冻干粉末, 溶解于20 μ mol/L PBS, 蛋白终浓度为100 μ mol/L, 于冰水浴中搅拌, 使重组人源弹性蛋白在溶液中均匀分散直至完全溶解。将重组人源弹性蛋白溶液37°C下水浴加热1 h, 使之发生相变。趁热均质, 注入预热好的模具中, 加入1% THPC。模具于恒温培养箱中静置3 h。待蛋白完全凝固成凝胶后, 置于20 μ mol/L PBS中浸泡过夜, 以除去未反应的交联剂。将重组人源弹性蛋白凝胶浸泡于去离子水中, 4°C冰箱内保存待用。

2.2.5 流变力学实验

将弹性蛋白凝胶从模具中谨慎取出, 置于安东帕(Physica MCR301)流变仪样品台上。频率扫描: 设置应变参数为1%, 应力为1.0 N。测试随扫描频率变化的凝胶的储能模量 G' (Pa)及损耗模量 G'' (Pa)。应变扫描: 固定扫描频率为1 rad/s, 测试随剪切应变力增大时储能模量 G' (Pa)及损耗模量 G'' (Pa)的变化。

2.2.6 扫描电子显微镜

将重组人源弹性蛋白凝胶冻干后, 切成厚度为0.5 mm左右的薄片, 黏于金属样品盘表面的导电胶上, 真空条件下喷金15 s; 然后用场发射扫描电子显微镜观察样品的微观形貌, 工作电压为5.0 kV左右。

2.2.7 细胞毒性

将重组人源弹性蛋白RHE冻干粉末, 溶于少量无菌水, 加入一定量的DMEM细胞培养基(含有10% FBS, 1%双抗)稀释, 蛋白终浓度100 μ mol/L。将重组人源弹性蛋白溶液加热相变后加入TC处理的96孔板中, 再加入THPC进行交联, THPC终浓度分别为0.1%、0.25%、0.5%、0.75%、1.0%、1.5%和2%, 放置于超净台内交联。用100 μ L 0.067 mol/L PBS浸洗凝胶3次, DMEM培养基浸润3 h, 加入100 μ L 50000个/mL HFF-1细胞, 放入细胞培养箱中, 37°C下培养24 h。加入CCK-8孵育30 min, 采用Tecan infinite M200酶标仪测定每孔的吸光度, 对细胞数目进行定量。空白组为不加入细胞的凝胶, 对照组为不含有凝胶的等量细胞。

2.2.8 细胞增殖

96孔板中每孔加入100 μ L 100 μ mol/L重组人源弹性蛋白RHE的DMEM培养基溶液, 与1% THPC交联, DMEM浸润, 加入100 μ L 50000个/mL HFF-1细胞, 37°C下培养, 每48 h更换细胞培养液, 防止代谢产物累积。每24 h加入CCK-8, 对凝胶表面的活细胞数目进行定量。空白组为不加入细胞的凝胶, 对照组为不含有凝胶的等量细胞。

2.2.9 细胞免疫荧光成像

将包含100 μ mol/L重组弹性蛋白的DMEM培养基溶液倒入若干个未TC处理的玻底培养皿中, 加入终浓

度为1%的THPC, 超净台中静置3 h; 待交联完毕后, 加入PBS润洗3遍, 用DMEM培养基浸润. 加入50000个HFF-1细胞, 37°C下培养, 每48 h更换一次细胞培养液. 分别在第1、4、7天取出, 用4%甲醛固定10 min, 0.1% Triton-X通透5 min, 1% BSA封闭30 min, 鬼笔环肽-TRITC避光孵育1 h, 然后加入Hoechst 33258孵育10 min, 分别染色细胞肌动蛋白与细胞核. 在Olympus BX63荧光显微镜下观察凝胶表面的HFF-1细胞数目与形态.

2.2.10 重组人源弹性蛋白凝胶的动物实验

取若干只 20 ± 2 g的SPF级昆明小鼠, 雄性, 用飞利浦理发器对小鼠背部进行剃毛, 再涂敷脱毛膏进行脱毛, 使背部表皮完全裸露, 脱毛区域约为 $2 \text{ cm} \times 4 \text{ cm}$, 脱毛完成后, 稳定24 h, 以排除脱毛膏对表皮损伤的影响. 小鼠随机分为三组, 空白组不做处理, 实验组和对照组用连续波长的紫外光 UV_A (320~440 nm)和 UV_B (280~320 nm)照射小鼠背部, 紫外辐照计对辐射进行定量, 总量为 200 J/cm^2 , 造成小鼠的急性皮肤炎症.

将凝胶贴敷于实验组小鼠背部皮肤的紫外灯照射区域, 覆盖纱布, 再用绷带固定防止凝胶在小鼠活动过程中脱落, 每48 h更换一次凝胶贴片; 对照组小鼠背部每48 h涂敷一次生理盐水. 空白组不做任何处理. 第1~7天, 每48 h对小鼠进行脱臼处死, 取材背部皮肤, 冷冻暂存. 皮肤组织使用4%多聚甲醛固定48 h, 浸蜡、脱水、透明、包埋、切片, 切片厚度 $3.5 \mu\text{m}$. 对皮肤切片进行脱蜡、返水、HE/Masson染色、脱水、透明、封片后保存. 在Olympus IX71荧光显微镜下拍照, 观察皮肤损伤与恢复情况.

3 结果与讨论

3.1 重组人源弹性蛋白的设计和表征

首先构建具有与天然弹性蛋白相同疏水/亲水嵌段结构的重组人源弹性蛋白RHE. RHE由人弹性蛋白的20~24号结构域按照20-21-22-23-24-21-22-23-24的顺序组成, 并在N端添加His-tag作为纯化标签. 将重组人源弹性蛋白RHE的基因编码序列插入到pcold-III质粒, 导入大肠杆菌BL21(DE3)得到RHE工程菌株, 培养、诱导表达并纯化. RHE包含263个氨基酸, 理论分子量为22.3 kDa.

纯化后的重组人源弹性蛋白RHE, 通过SDS-PAGE和MALDI-TOF-MS对RHE的纯度与分子量进行表征. 从SDS-PAGE结果可以看出, RHE仅在略小于25 kDa处有单一条带, 表明制备得到了高纯度蛋白(图1a). MALDI-TOF MS谱图中, 在 $m/z=22.9$ kDa处有一高丰度的分子离子峰, 其分子量与理论分子量一致(图1b). 上述结果均表明高纯度的重组人源弹性蛋白RHE成功制备.

3.2 重组人源弹性蛋白的二级结构与可逆相变

用圆二色谱仪测定重组人源弹性蛋白的二级结构. 重组人源弹性蛋白RHE主要在190~200 nm处有一个最大吸收的负峰(图2a). 利用Chirscan软件对重组人源弹性蛋白进行构象分析, 发现重组人源弹性蛋白RHE的构象主要以无序结构为主($70\% \pm 4\%$), β 螺旋与 β 转角构象也部分存在, 占比分别为 $18\% \pm 2\%$ 和 $12\% \pm 1\%$, 表明重组人源弹性蛋白具有与天然弹性蛋白相似的二级结构^[16].

配制 $100 \mu\text{mol/L}$ 重组人源弹性蛋白相变溶液, 观察其在15~44°C的状态变化. 以15°C下的重组人源弹性蛋白溶液为参比, 测量其吸光度随温度的改变, 研究其可逆相变行为. 15~25°C之间, 溶液吸光度基本保持不变; 温度超过25°C以后, 溶液中开始出现沉淀, 吸光度迅速增加; 当温度继续升至37°C, 溶液中沉淀不再增加, 溶液吸光度达到最大值0.5 (图2b). 将浊液冷却至室温能够重新复溶. 以上结果表明, 重组人源弹性蛋白RHE具有与天然弹性蛋白类似的可逆相变特性^[17,18], 相变温度为37°C.

3.3 交联重组人源弹性蛋白凝胶的力学性能与形貌

将重组人源弹性蛋白RHE $100 \mu\text{mol/L}$ 与1% THPC交联, 制备得到弹性蛋白凝胶. 交联前重组人源弹性蛋白为白色半透明溶液, 交联后形成微黄色的固体凝胶(图3a).

通过流变力学频率扫描与应变扫描实验, 研究重组人源弹性蛋白凝胶的力学性能. 在频率扫描实验中, 随着剪切频率的不断增大, 凝胶的储能模量(G')和压缩模量(G'')均快速上升. 在高剪切频率下, 储能模量可达 $1.5 \times 10^3 \text{ Pa}$ (图3b). 在应变扫描实验中, 当剪切应变小于10%时, 凝胶发生弹性形变, 储能模量(G')大于损耗模量(G''), 二者基本恒定; 剪切应变进一步增加, 储

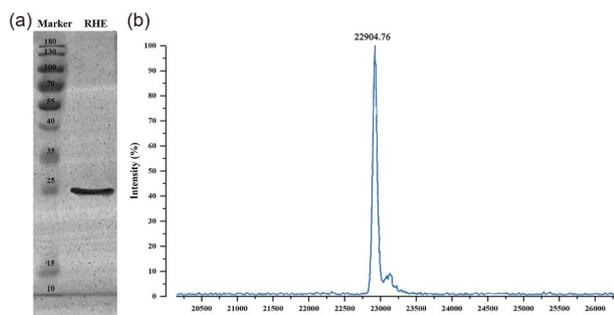


图1 重组人源弹性蛋白的SDS-PAGE图(a)和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱图(b) (网络版彩图)

Figure 1 (a) SDS-PAGE and (b) MALDI-TOF MS of RHE (color online).

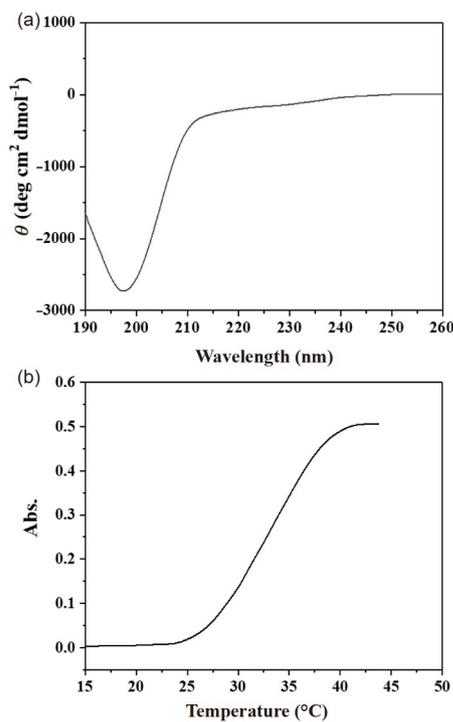


图2 重组人源弹性蛋白的圆二色谱图(a)与可逆相变曲线图(b)

Figure 2 (a) Circular dichroism spectrum and (b) reversible transition curve of RHE.

能模量开始减小,同时损耗模量增大,凝胶的弹性降低,黏性增加;剪切应变超过20%,储能模量小于损耗模量,凝胶转变为黏性流体(图3c)。以上结果表明,重组人源弹性蛋白RHE交联凝胶有着良好的机械性能。

通过扫描电子显微镜观察重组人源弹性蛋白凝胶的微观形貌。该凝胶呈现三维蜂窝网状结构,网孔直径在50~150 μm 。进一步放大观察,其呈现有序的纤维状

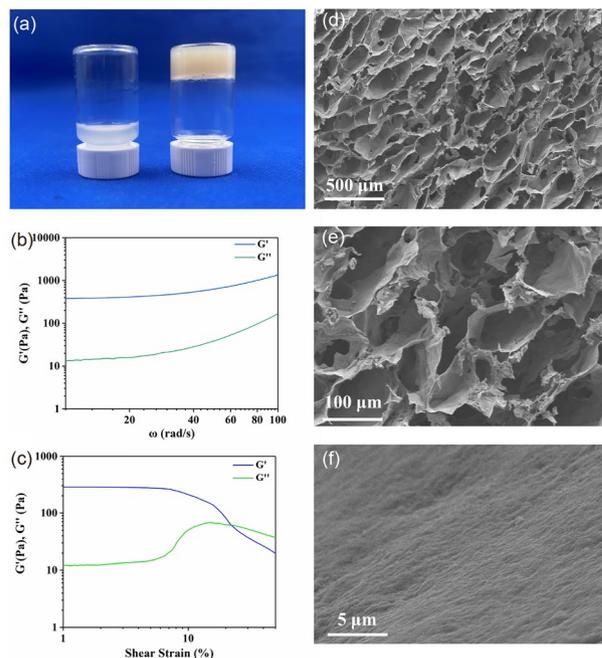


图3 (a) 重组人源弹性蛋白凝胶交联前后的实物图;重组人源弹性蛋白凝胶的(b)频率扫描与(c)应变扫描流变力学;(d~f) 重组人源弹性蛋白凝胶的扫描电子显微镜图(网络版彩图)

Figure 3 (a) Photographs of RHE hydrogel before and after cross-linking. Frequency sweep (b) and strain sweep (c) characterization of the RHE hydrogel and (d~f) scanning electron microscopy of the RHE hydrogel (color online).

排列(图3d~f)。该纤维网状结构与天然弹性蛋白的凝胶微观形貌相似,可为细胞生长提供有利的微环境^[19]。

3.4 重组人源弹性蛋白凝胶的细胞活性

利用CCK-8试剂盒测定了重组人源弹性蛋白凝胶的细胞毒性与增殖能力。相比于未加入凝胶的对照组,不同交联剂浓度下凝胶的细胞存活率均保持在100%左右,表明不同浓度的THPC交联的重组人源弹性蛋白凝胶均无细胞毒性(图4a)。在细胞增殖实验中,第1~2天凝胶表面细胞增殖率与空白对照组相比,略大于100%;第3~5天,与空白对照组相比,凝胶组细胞增殖率由110%增加至200%以上;第6~7天与空白对照组相比,凝胶组细胞增殖率超过250%(图4b)。结果表明,重组人源弹性蛋白凝胶可显著促进HFF-1细胞的增殖。

利用荧光显微镜,观察重组人源弹性蛋白凝胶表面细胞的形态。第1天,该凝胶表面HFF-1细胞正常伸展;第4天,细胞的数量明显增加,分布均匀,形态完整;第7天,细胞密度进一步增大,基本全部被细胞覆盖

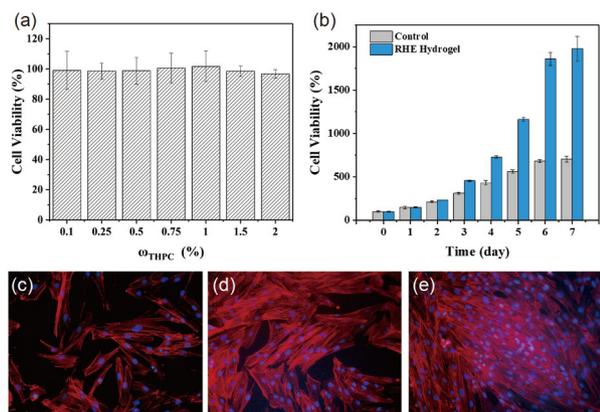


图4 重组人源弹性蛋白凝胶的细胞实验。(a)不同THPC浓度下交联凝胶的细胞毒性;凝胶的细胞增殖(b)与细胞免疫荧光成像(c~e)(网络版彩图)

Figure 4 Cell experiments of RHE hydrogel. (a) Cytotoxicity of RHE cross-linked hydrogels at different THPC concentrations; (b) cell proliferation and (c-e) cell immuno-fluorescence of RHE hydrogel (color online).

(图4c~e). 结果表明, 重组人源弹性蛋白凝胶可以促进HFF-1细胞的黏附和生长, 具有良好的细胞活性.

3.5 重组人源弹性蛋白凝胶对光损伤皮肤的修复功效

构建小鼠紫外光损伤皮肤模型, 并利用重组人源弹性蛋白凝胶对其进行修复(图5). 空白组小鼠第1~7天皮肤光滑平整, 呈现健康的状态. 对照组小鼠造模后第1天表皮开始出现干裂, 且有部分淤血; 第3~5天, 干裂表皮逐渐脱落, 部分伤口开始结痂, 同时开始出现不均匀分布的红斑凸起与褶皱; 第7天, 褶皱基本平复, 但背部中央部位仍有少部分红斑. 结果表明, 小鼠皮肤紫外损伤模型成功构建, 且皮肤损伤7天内无法自我修复完全.

对于实验组小鼠, 第1天, 背部的干裂与红肿区域明显小于对照组; 第3天, 皮肤干裂现象基本消失同时背部出现局部红斑凸起; 凝胶作用3~5天, 皮肤表面红斑基本褪去, 但仍有少部分褶皱; 凝胶作用第7天, 小鼠表皮紫外损伤基本修复完全, 与空白组小鼠的正常皮肤无明显差异. 以上结果表明, 凝胶对小鼠皮肤光损伤有良好的修复效果.

通过HE染色观察皮肤组织形态, 对凝胶的修复效果进行评价. 空白组小鼠在第1~7天内, 表皮薄厚均一且厚度适中, 下层呈波浪状起伏, 真皮层纤维排列致

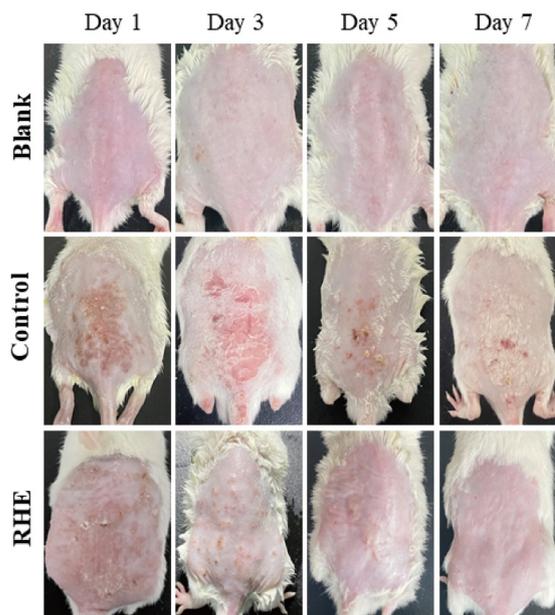


图5 小鼠的光损伤修复皮肤模型(7天)(网络版彩图)

Figure 5 The mice model of photodamaged skin for 7 days (color online).

密, 细胞核形态良好, 无炎性细胞浸润, 呈健康状态. 对照组小鼠皮肤第1天表皮全层缺损, 厚度增加, 部分基底层发生水肿, 局部结构受损, 真皮层疏松, 炎性细胞浸润; 第3天, 表皮结构缺损加重, 基底层棘层松懈, 真皮层开始出现水肿, 炎性细胞数目增加; 第5天, 表皮结构缺损状况略有缓解, 受损区域面积减小, 真皮层水肿减轻; 第7天, 小鼠表皮结构趋于完整但仍有局部断裂, 仍未恢复至正常水平. 实验组小鼠皮肤第1天表皮全层缺损, 部分基底层水肿, 局部结构受损, 真皮层疏松且有少量炎性细胞浸润; 第3天, 表皮结构缺损未进一步扩大, 但出现血管扩张充血与表皮层异常增厚现象, 真皮层结构疏松且部分水肿; 第5天, 表皮结构趋近完整但仍部分不连续, 局部有断裂, 真皮层水肿消失; 第7天, 小鼠表皮结构完整且全层可见, 有明显分层, 附属器数目及形态与正常皮肤无明显差异, 无水肿与血管充血扩张现象. 结果表明, 重组人源弹性蛋白RHE凝胶能够缓解由紫外光引起的皮肤炎症, 抑制表皮异常增生.

通过Masson染色观察皮肤的纤维结构, 对凝胶的修复效果进行评价(图6). 空白组小鼠皮肤第1~7天真皮乳头层胶原纤维纤长, 相互交织成网, 各分泌腺与血管被纤维网状胶原包裹环绕, 网状层胶原纤维束呈

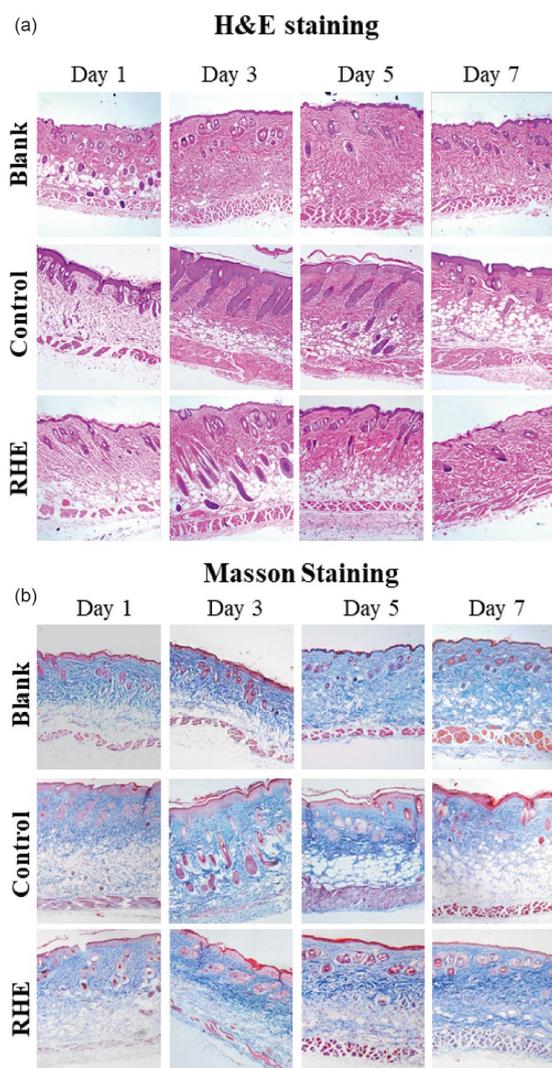


图6 小鼠皮肤切片的HE染色(a)与Masson染色(b) (网络版彩图)

Figure 6 (a) HE and (b) Masson's trichrome of mice skin sample (color online).

波浪状向各向延伸. 对照组小鼠皮肤第1天真皮层胶原纤维排列紊乱, 数目锐减, 纤维变粗、卷曲扭结, 部分聚集成团, 同时大量产生断裂、破碎; 第3天真皮层损伤加剧, 纤维进一步增粗、断裂且聚集成块; 第5天真皮层胶原纤维受损情况有所缓解, 但依然存在部分断裂, 整体仍严重缺损; 第7天, 真皮层胶原纤维开始增

多, 但与空白组小鼠皮肤仍存在较大差异.

实验组小鼠皮肤第1天真皮层大量胶原纤维排列紊乱, 数目减少, 纤维变粗、卷曲扭结, 部分聚集成团、断裂、破碎; 第3天真皮层损伤有所减轻, 异常胶原纤维数目变少; 第5天, 真皮层受损情况进一步减轻, 胶原纤维断裂处出现纤细的新生胶原纤维并各向延伸, 排列致密; 第7天, 真皮层胶原纤维相互交织成网, 各分泌腺与血管被纤维网状胶原包裹环绕, 网状层胶原纤维束呈波浪状起伏, 同一水平面上沿各向延伸. 结果表明, 重组人源弹性蛋白RHE凝胶能够抵抗紫外光对皮肤纤维结构的破坏, 促进胶原纤维与弹性纤维再生修复.

4 结论

光损伤对皮肤造成严重的结构性破坏, 削弱皮肤的屏障功能, 引发光老化、光敏性皮炎、皮肤癌等多种疾病. 弹性蛋白是皮肤真皮层的重要成分, 决定着皮肤的弹性和柔韧性, 对光损伤皮肤具有防止老化和促进再生的作用. 传统方法主要通过动物组织提取制备弹性蛋白, 其可控性差、易降解且伴有免疫原性风险. 通过基因重组表达的弹性蛋白, 水溶性好、性质稳定和无病毒传播风险, 在组织工程领域备受关注.

我们构建了由人弹性蛋白片段构成的重组弹性蛋白序列的表达质粒与工程菌株, 成功制备了高纯度的重组人源弹性蛋白. 圆二色谱结果表明, 该重组蛋白有着与天然弹性蛋白相似的二级结构. 相变实验结果表明, 该重组蛋白具有与天然弹性蛋白相似的可逆相变行为. 通过THPC交联重组人源弹性蛋白, 成功制备出了高机械强度的凝胶. 细胞实验结果表明, 该凝胶具有较高的生物活性. 小鼠的光损伤皮肤实验表明, 该凝胶对于损伤皮肤的修复具有明显的促进作用. 皮肤组织切片的HE染色与Masson染色结果表明, 该凝胶能够抑制表皮异常增生, 减轻细胞炎症, 加快胶原纤维与弹性纤维再生. 该新型重组人源弹性蛋白及其交联凝胶, 具有良好的生物相容性和修复光损伤皮肤的能力, 在皮肤医学和组织工程领域具有广泛的应用前景.

参考文献

- 1 Rawlings AV, Harding CR. *Dermatol Ther*, 2004, 17: 43-48

- 2 Mora Huertas AC, Schmelzer CEH, Hoehenwarter W, Heyroth F, Heinz A. *Biochimie*, 2016, 128-129: 163–173
- 3 Fan J, Zhuang Y, Li B. *Nutrients*, 2013, 5: 223–233
- 4 Wang J, Qiu H, Xu Y, Gao Y, Tan P, Zhao R, Liu Z, Tang Y, Zhu X, Bao C, Wang H, Lin H, Zhang X. *Bioactive Mater*, 2022, 11: 154–165
- 5 Samuel M, Brooke R, Hollis S, Griffiths CE. *The Cochrane Library*, 2005, 1: 1–121
- 6 Robert L. *Pathol Biol*, 2002, 50: 503–511
- 7 Hinek A. *Cell Adhes Commun*, 1994, 2: 185–193
- 8 Rodgers UR, Weiss AS. *Biochimie*, 2004, 86: 173–178
- 9 Sage H. *J Invest Dermatol*, 1982, 79: 146–153
- 10 Kamoun A, Landeau JM, Godeau G, Wallach J, Duchesnay A, Pellat B, Hornebeck W. *Cell Adhes Commun*, 1995, 3: 273–281
- 11 Annabi N, Mithieux SM, Camci-Unal G, Dokmeci MR, Weiss AS, Khademhosseini A. *Biochem Eng J*, 2013, 77: 110–118
- 12 Debelle L, Alix AJP, Jacob MP, Huvenne JP, Berjot M, Sombret B, Legrand P. *J Biol Chem*, 1995, 270: 26099–26103
- 13 Kamaruzaman N, Fauzi MB, Yusop SM. *Polymers*, 2022, 14: 963–976
- 14 Herrero-Vanrell R, Rincón AC, Alonso M, Reboto V, Molina-Martinez IT, Rodríguez-Cabello JC. *J Control Release*, 2004, 102: 113–122
- 15 Zhao YJ, Liu Y, Xue T, Wei Q, Ji JF, Chen FL, Li HM. *Sci Technol Eng*, 2014, 14: 269–273
- 16 Debelle L, Alix AJP, Wei SM, Jacob MP, Huvenne JP, Berjot M, Legrand P. *Eur J Biochem*, 1998, 258: 533–539
- 17 Vrhovski B, Jensen S, Weiss AS. *Eur J Biochem*, 1997, 250: 92–98
- 18 Hart DS, Gehrke SH. *J Pharm Sci*, 2007, 96: 484–516
- 19 Wilharm N, Fischer T, Ott F, Konieczny R, Zink M, Beck-Sickingner AG, Mayr SG. *Sci Rep*, 2019, 9: 12363

A crosslinked hydrogel based on recombinant human elastin for rapid repair of photodamaged skin

Jianan Li¹, Xiuxia Sun^{2*}, Jianxi Xiao^{1*}

¹ College of Chemistry and Chemical Engineering, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

² School of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

*Corresponding authors (email: sunxx@lzu.edu.cn; xiaojx@lzu.edu.cn)

Abstract: Photodamage is the most common skin disease, affecting more than a third of the global population each year. Elastin in dermis plays a critical role in maintaining skin shape, and its destruction is a prominent feature in skin photodamage. Currently, elastin is mostly derived from animal tissue, which has drawbacks such as virus transmission and easy degradation. We constructed a novel Recombinant Human Elastin (RHE) and its cross-linked hydrogel to rapidly repair photodamaged skin. RHE, composed of human elastin domains, preserves a similar secondary structure and reversible phase transition properties as native. RHE was cross-linked by THPC to form hydrogels with remarkable mechanical strength. Scanning electron microscopy results showed that the RHE hydrogel has a uniformly distributed mesh structure. Cell experiments indicated that the hydrogel had no cytotoxicity and significantly promoted the proliferation of fibroblasts. Animal experiments showed that the hydrogel significantly accelerated the healing of UV-irradiated skin in mice, reducing the inflammatory response and inhibiting abnormal epidermal hyperplasia. The highly biocompatible and bioactive RHE and its cross-linked hydrogel provides an efficient treatment for photodamaged skin, which may have promising applications in dermatology and tissue engineering.

Keywords: recombinant human elastin, RHE crosslinking hydrogel, photodamage, skin healing

doi: [10.1360/SSC-2022-0225](https://doi.org/10.1360/SSC-2022-0225)