

一种鲑皮肤分泌物水解液及其制备方法和应用

[1]. 本申请要求 2021 年 11 月 19 日提交的中国发明专利申请【CN2021113742137】、名称为“一种鲑皮肤分泌物水解液的制备方法”的优先权，该优先权发明专利申请以引用方式全文并入。

技术领域

[2]. 本发明涉及生物材料领域，具体涉及一种鲑皮肤分泌物水解液及其制备方法和应用。

背景技术

[3]. 伤口闭合在外科手术中至关重要。临床上，60% 的伤口在手术后通过缝合或钉固定。由于软组织的脆弱性和局部应力，机械闭合可能导致二次损伤，并且需要拆除不可降解的缝合线或钉。在对外伤进行缝合时，往往会因为对位不良、皮肤治疗过度、皮肤擦伤过深等原因，造成增生性瘢痕。

[4]. 迄今为止，现有技术中大多数可用于伤口闭合的粘合剂都有局限性。例如，最广泛使用的商业化学合成粘合剂——氰基丙烯酸酯（CA），虽然具有优异的粘合强度，但其细胞毒性和不可生物降解无法让人忽视。另外，氰基丙烯酸酯的弹性较差，不能适应关节、皮肤等活动度较大的软组织粘附。与氰基丙烯酸酯相比，生物来源的粘合剂（例如纤维蛋白胶、明胶、透明质酸等）虽然具有良好的生物相容性，但是其粘合强度低，使用时只能作为缝线的辅助使用而不能单独使用，从而限制了其的应用。

发明内容

[5]. 第一方面，本发明提供了一种鲑皮肤分泌物水解液的制备方法，包括以下步骤：

S1 将二硫键还原剂和第一溶剂混合，得到第二溶剂；

S2 将鲑皮肤分泌物冻干粉与所述第二溶剂混合，得到第一混合液；

S3 将所述第一混合液充分水解，得到第二混合液；

S4 将所述第二混合液离心并收集上清液；

S5 将所述上清液装入截留分子量 ≤ 1000 的透析袋中并置于所述第一溶剂中充分透析，得到所述鲑皮肤分泌物水解液；

其中所述二硫键还原剂包括特异性二硫键还原剂，所述特异性二硫键还原剂为三(2-羧乙基)膦盐酸盐（TCEP-HCl），所述第一溶剂包括超纯水、去离子水、注射用水、纯水中的一种或多种。

[6]. 在一些实施例中，所述第一溶剂和所述鲑皮肤分泌物冻干粉的质量比至少为 4:1。

[7]. 在一些实施例中，所述鲑皮肤分泌物冻干粉和所述二硫键还原剂的质量比至少为 3:1。

[8]. 在一些实施例中，所述水解的水解时间包括 2-168 小时。

[9]. 在一些实施例中，所述水解的水解时间为 12-48 小时。

[10]. 在一些实施例中，所述 S3、所述 S4 和所述 S5 的温度条件包括 0-8℃。

- [11]. 在一些实施例中, 所述 S3、所述 S4 和所述 S5 的温度条件为 0-4℃。
- [12]. 在一些实施例中, 所述 S3 在真空反应釜中进行, 所述真空反应釜的真空度 $<5\text{ kPa}$ 。
- [13]. 在一些实施例中, 所述二硫键还原剂还包括维生素 C。
- [14]. 在一些实施例中, 所述透析的透析时间包括 48 小时。
- [15]. 在一些实施例中, 所述得到的所述鲑皮肤分泌物水解液的浓度包括 3%-7%。
- [16]. 在一些实施例中, 所述方法进一步包括 S6 将所述鲑皮肤分泌物水解液浓缩, 得到浓缩鲑皮肤分泌物水解液。
- [17]. 在一些实施例中, 所述浓缩的方法包括将所述鲑皮肤分泌物水解液装入截留分子量 $\leq 3\text{K}$ 的浓缩离心管中离心或将所述鲑皮肤分泌物水解液蒸发浓缩。
- [18]. 第二方面, 本发明还提供了一种鲑皮肤分泌物水解液, 其特征在于, 所述鲑皮肤分泌物水解液通过上述方法制备得到。
- [19]. 第三方面, 本发明还提供了一种鲑皮肤分泌物水解液在制备生物粘合剂中的用途, 其特征在于, 所述鲑皮肤分泌物水解液通过上述方法制备得到。
- [20]. 在一些实施例中, 所述鲑皮肤分泌物水解液的浓度包括 5%-7%。
- [21]. 在一些实施例中, 当所述生物粘合剂被施用至伤口后, 所述生物粘合剂自行或经外部压力渗入所述伤口的组织内部形成微凝胶结构。
- [22]. 在一些实施例中, 所述伤口包括皮肤伤口。
- [23]. 在一些实施例中, 所述生物粘合剂用于促进所述伤口的愈合。
- [24]. 第四方面, 本发明还提供了一种鲑皮肤分泌物水解液在制备伤口敷料中的用途, 其特征在于, 所述鲑皮肤分泌物水解液通过上述方法制备得到。
- [25]. 第五方面, 本发明还提供了一种鲑皮肤分泌物水解液在制备光敏水凝胶中的用途, 其特征在于, 所述光敏水凝胶包括浓缩鲑皮肤分泌物水解液和光引发剂, 在可见光的照射下, 所述浓缩鲑皮肤分泌物水解液固化, 以形成所述光敏水凝胶; 所述浓缩鲑皮肤分泌物水解液通过上述方法制备得到, 所述光引发剂包括 Ru/SPS 系统。
- [26]. 在一些实施例中, 所述可见光的强度包括 7000W。
- [27]. 在一些实施例中, 所述光敏水凝胶用于作为止血剂。
- [28]. 在一些实施例中, 所述光敏水凝胶用于作为生物粘合剂。
- [29]. 在一些实施例中, 所述光敏水凝胶用于作为伤口敷料。
- [30]. 如本发明所使用, 术语“生物粘合剂”是指可以粘附到和保留在生物组织的生物相容性物质。在一些实施例中, 所述生物粘合剂为生物胶水。在一些实施例中, 所述生物粘合剂可以替代缝线/钉, 起到封闭伤口和止血的效果。在一些实施例中, 所述生物粘合剂还具有抗感染、促愈合、抑制瘢痕增生等功能。通过本发明提供的制备方法制备得到的鲑皮肤分泌物水解液, 可以作为生物粘合剂, 达到粘附、封闭伤口(甚至止血、抑菌)和促进伤口愈合等效果, 能够减少缝合所需时间和技术敏感度、降低术后护理难度、避免拆除缝线/钉对患者的二次损伤、减少患者就诊次数和就诊时间等。
- [31]. 如本发明所使用, 术语“水凝胶”是指具有高吸收性(例如, 可以吸收和/或保留大量体积的水)的天然或合成聚合物网络。
- [32]. 如本发明所使用, 术语“微凝胶”是指具有分子内交联结构、粒径为微米级的水凝胶微粒。
- [33]. 如本发明所使用, 术语“伤口敷料”是指用于覆盖在伤口表面并起到治

疗或防护伤口作用的物质。在一些实施例中，所述伤口敷料分为：（1）被动型敷料（即传统敷料），被动覆盖创面和吸收渗出物，为创面提供有限的保护作用；

（2）相互作用型敷料，敷料与创面之间存在着多种形式的相互作用，例如吸收渗出物和有毒物质、允许气体交换，从而为愈合创造一个理想的环境；提供阻隔性外层结构，防止环境中微生物侵入、预防创面交叉感染等。本发明所涉及的鲛皮肤分泌物水解液及其形成的光敏水凝胶属于相互作用型敷料。

[34]. 如本发明所使用，术语“生物组织”或“组织”是指活体或死亡生物体的任何组织或源自活体或死亡生物体的任何组织。生物组织可以包括任何单一组织（例如，可以被互连的细胞的集合）或组成生物体的器官或部分或区域的一群组织。生物组织包括粘膜组织、表皮组织、真皮组织和皮下组织中的一种或多种的动物组织。不同的生物组织可以形成特定功能的器官。生物组织相关或来源的生物体（即，受试者或个体）可以是任何动物，包括哺乳动物和非哺乳动物（例如无脊椎动物）。生物组织可以是完整的，或者可以具有一个或多个切口、裂痕、缺损或其他类型的伤口。在一些实施例中，生物组织为哺乳动物的组织。

[35]. 如本文所使用，“伤口”是指生物组织结构的连续性或完整性的物理破坏。伤口可能是由于切割、擦伤、撕脱伤、撕裂伤、穿刺、癌症、糖尿病性溃疡或病变、烧伤、手术或其他损伤造成的。在一些实施例中，伤口可能导致出血。

[36]. 如本文所使用，“伤口愈合”是指组织完整性的部分或完全恢复。在一些实施例中，所述组织为皮肤，即伤口是皮肤伤口，例如真皮或表皮伤口。在一些实施例中，伤口愈合包括时间上和空间上的愈合程序，所述程序包括伤口闭合和涉及伤口闭合的过程。“促进伤口愈合”应理解为使组织从连续性或完整性的中断中恢复。在一些实施例中，促进伤口愈合包括达到相同的愈合程度，所需愈合时间更短。在一些实施例中，促进伤口愈合包括在相同愈合时间内，达到的愈合程度更高。具体可能涉及：新血管形成；成纤维细胞、内皮细胞和上皮细胞迁移；细胞外基质沉积；表皮再植；以及重塑中的一种或多种。

[37]. 如本文所使用，术语“伤口闭合”是指伤口的封闭，包括关闭伤口并不使内部组织暴露。在一些实施例中，所述伤口闭合包括伤口的侧边重新接合以形成连续的屏障物（例如完好的皮肤）。在一些实施例中，所述伤口闭合还包括止血。

[38]. 如本文所使用，“全层伤口”是指真皮（和表皮）的全层破坏。

[39]. 如本文所使用，“瘢痕”是指由创伤后所引起的组织的外观形态和组织病理学改变，其是机体创伤修复过程中必然产物。瘢痕生长超过一定的限度时，可能会发生各种并发症（例如外形的破坏及功能活动障碍等），给患者带来巨大的肉体痛苦和精神痛苦（尤其是烧伤、烫伤、严重外伤后遗留的瘢痕）。“无瘢痕愈合”是指少于、明显少于或不存在伤口自然愈合所形成的瘢痕。

[40]. 如本发明所使用，术语“生物相容性”是指在其预期使用的体内环境中基本无毒，并且基本不会被个体的生理系统排斥的材料。评价生物材料的生物相容性应遵循生物安全性和生物功能性两个原则，既要求生物材料具有很低的毒性，同时要求生物材料在特定的应用中能够恰当地激发机体相应的功能（例如，材料与机体环境相互作用）。在一些实施例中，所述生物相容性满足 FDA 的要求。体内的免疫反应和组织修复过程十分复杂，通过一种细胞或组织确定某种材料的生物相容性往往是不够的。本发明参考国际标准化组织（International Standards Organization, ISO）10993 和国家标准 GB/T16886 的要求，通过一系列体外、体内实验验证了鲛皮肤分泌物水解液对生物体（特别是伤口环境）具有较高的生物

相容性。

[41]. 如本文所使用,“再生”是组织或器官受外部作用而部分缺失,在剩余部分的基础上又生长出与缺失部分在形态和/或功能上相同的结构的修复过程。

[42]. 如本文所使用,“生物来源的”是指源自或取自天然存在的有机体和有机体的部分。换句话说,本发明涉及的鲑皮肤分泌物冻干粉和鲑皮肤分泌物水解液并非是通过基因重组技术获得的。

[43]. 本文所使用,术语“实质上不包含”或“实质上不含有”是指所指物质不存在或以不可被分析检测到的含量存在于某种物质中。

附图说明

[44]. 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作一简单地介绍。显而易见地,下面描述中的附图是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动性的前提下,还可以根据这些附图获得其它的附图。

[45]. 图 1 为鲑皮肤分泌物冻干粉及其遇水形成的水凝胶的代表性实物图;

[46]. 图 2a 为鲑皮肤分泌物水解液在水解前、水解后以及得到的粘性上清液的代表性图像;

[47]. 图 2b 为图 2a 中的上清液在透析前、透析中和透析后的代表性图像;

[48]. 图 2c 为本发明提供的有粘性的鲑皮肤分泌物水解液的代表性实物图;

[49]. 图 3a 和图 3c 为检测鲑皮肤分泌物水解液的细胞毒性的实验结果图;

[50]. 图 3b 示出了本发明 TCEP 组的水解液的高细胞相容性;

[51]. 图 3d 和图 3e 分别为培养第 7 天和第 14 天时,鲑皮肤分泌物水解液促进细胞的成血管相关基因表达的实验结果图;

[52]. 图 3f 示出了维生素 C 组和 TCEP 组的划痕实验结果;

[53]. 图 3g 示出了维生素 C 组和 TCEP 组的 Transwell 实验结果;

[54]. 图 3h 示出了鲑皮肤分泌物水解液的渗透性;

[55]. 图 3i 示出了鲑皮肤分泌物水解液对猪皮的粘接界面的代表性 SEM 图像;

[56]. 图 4a 为各实验组(空白对照组、水解液组、纤维蛋白粘合剂组、缝合组、氰基丙烯酸酯组)的皮肤切口愈合实验的宏观实验结果图;

[57]. 图 4b 为各实验组(空白对照组、水解液组、纤维蛋白粘合剂组、氰基丙烯酸酯组)的皮肤切口愈合实验的 HE 染色的实验结果图;

[58]. 图 4c 为各实验组(空白对照组、维生素 C 组、TCEP 组、纤维蛋白粘合剂(FB)组、氰基丙烯酸酯(CA)组和缝合组)的皮肤切口愈合实验的宏观实验结果图;

[59]. 图 4d 为各实验组(空白对照组、维生素 C 组、TCEP 组、纤维蛋白粘合剂(FB)组、氰基丙烯酸酯(CA)组和缝合组)的皮肤切口愈合实验的 HE 染色的实验结果图;

[60]. 图 5a 为鲑皮肤分泌物水解液+Ru/SPS 光敏剂与细胞共培养的实验结果图;

[61]. 图 5b 示出了鲑皮肤分泌物水解液+光敏剂 Ru/SPS 固化形成的光敏水凝胶(简称为光敏水凝胶)作为光敏止血剂的止血效果;

[62]. 图 5c 示出了光敏水凝胶作为伤口敷料的效果图;

[63]. 图 6a 示出了鲑皮肤分泌物水解液作为液体伤口敷料,促进皮肤全层缺损的伤口愈合的宏观效果图;

[64]. 图 6b 示出了鲑皮肤分泌物水解液作为液体伤口敷料,促进皮肤全层缺损

的伤口愈合实验的 HE 染色的实验结果图；

[65]. 图 6c 示出了各实验组（空白对照组、水解液组、纤维蛋白粘合剂（FG）组、氰基丙烯酸酯（CA）组和缝合组）的皮肤切口愈合实验的宏观实验结果图；

[66]. 图 7 为本发明提供的鲛皮肤分泌物水解液的性能和具体用途的总结图；

[67]. 图 8a 示出了经可见光固化后的未浓缩和浓缩后的鲛皮肤分泌物水解液的代表性扫描电镜图像和粘度；

[68]. 图 8b 示出了 CA、浓缩后的水解液、未浓缩的水解液以及光敏水凝胶的最大粘结强度及检测装置示意图；

[69]. 图 8c 示出了光敏水凝胶的体内可生物降解特性；

[70]. 图 8d 示出了本发明构建的肝脏出血模型的手术过程；

[71]. 图 8e 示出了对出血肝脏进行止血后，光敏水凝胶与肝脏紧密结合的 SEM 图像；

[72]. 图 8f 示出了各实验组（空白组、水解液组、纤维蛋白胶（FB）组和光敏水凝胶组）对肝脏的止血效果；

[73]. 图 9a 示出了不同样品（鲛皮肤分泌物冻干粉、鲛皮肤分泌物水凝胶、TCEP 组和维生素 C 组）的拉曼光谱图；

[74]. 图 9b 示出了不同样品（鲛皮肤分泌物冻干粉、鲛皮肤分泌物水凝胶、TCEP 组和维生素 C 组）不同样品的红外光谱分析。

具体实施方式

[75]. 为使本发明实施例的目的、技术方案和优点更加清楚，下面将结合本发明实施例中的附图，对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述。显然，所描述的实施例是本发明一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本发明保护的范围。

[76]. 需要说明的是，在本文中，术语“包括”、“包含”或者其任何其他变体意在涵盖非排他性的包含，从而使得包括一系列要素的过程、方法、物品或者装置不仅包括那些要素，而且还包括没有明确列出的其他要素，或者是还包括为这种过程、方法、物品或者装置所固有的要素。在没有更多限制的情况下，由语句“包括一个……”限定的要素，并不排除在包括该要素的过程、方法、物品或者装置中还存在另外的相同要素。

[77]. 如在本说明书中使用的，术语“大约”，典型地表示为所述值的 $\pm 5\%$ ，更典型的是所述值的 $\pm 4\%$ ，更典型的是所述值的 $\pm 3\%$ ，更典型的是所述值的 $\pm 2\%$ ，甚至更典型的是所述值的 $\pm 1\%$ ，甚至更典型的是所述值的 $\pm 0.5\%$ 。

[78]. 在本说明书中，某些实施方式可能以一种处于某个范围的格式公开。应该理解，这种“处于某个范围”的描述仅仅是为了方便和简洁，且不应该被解释为对所公开范围的僵化限制。因此，范围的描述应该被认为是已经具体地公开了

所有可能的子范围以及在此范围内的独立数字值。例如，范围 1~6 的描述应该被看作已经具体地公开了子范围如从 1 到 3，从 1 到 4，从 1 到 5，从 2 到 4，从 2 到 6，从 3 到 6 等，以及此范围内的单独数字，例如 1，2，3，4，5 和 6。无论该范围的广度如何，均适用以上规则。

[79]. 本发明提供的鲛皮肤分泌物水解液的制备方法，包括以下步骤：

[80]. S1 将二硫键还原剂和第一溶剂混合，得到第二溶剂。

[81]. 合适的第一溶剂应当实质上不包含离子，例如超纯水、去离子水、注射用水、纯水等。

[82]. S2 将鲟皮肤分泌物冻干粉与所述第二溶剂混合，得到第一混合液。

[83]. 实际上，所述二硫键还原剂、所述第一溶剂和所述鲟皮肤分泌物冻干粉的混合顺序（即得到所述第一混合液的步骤）并没有具体限制。例如，所述第一混合液可以是所述二硫键还原剂、所述第一溶剂和所述鲟皮肤分泌物冻干粉一起加入和混合得到的，也可以是将所述二硫键还原剂与所述第一溶剂混合、再将所述鲟皮肤分泌物冻干粉加入其中混合得到的，也可以是将所述鲟皮肤分泌物冻干粉与所述第一溶剂混合、再将所述二硫键还原剂加入其中混合得到的，还可以是将所述二硫键还原剂与所述鲟皮肤分泌物冻干粉混合、再将所述第一溶剂加入其中混合得到的。所述二硫键还原剂、所述第一溶剂和所述鲟皮肤分泌物冻干粉的可以根据实际需要进行相应的调整，本发明对此不做限定。作为示例，所述鲟皮肤分泌物冻干粉与所述二硫键还原剂的质量比可以是 10:1、9:1、8:1、7:1、6:1、5:1、4:1 或 3:1。所述第一溶剂与所述鲟皮肤分泌物冻干粉的质量比可以是 12:1、11:1、10:1、9:1、8:1、7:1、6:1、5:1 或 4:1。所述第二溶剂的浓度可以是大约 1%-5%（具体取值可根据实际情况选为大约 1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%或 5%，w/w%）。所述鲟皮肤分泌物冻干粉和所述二硫键还原剂的质量比的下限（最小值）可以是 3:1。所述第一溶剂和所述鲟皮肤分泌物冻干粉的质量比的下限（最小值）可以是 4:1。

[84]. 示例性的鲟皮肤分泌物冻干粉的制备方法如下（以中国大鲟为例）：将成年健康雄性中国大鲟（3-6 岁，体长 65-110 cm，体重 2.8 ± 0.7 kg）用干净的水清洗。在温和的机械刺激下，诱发中国大鲟背侧皮肤的粘液分泌，并收集在干净的管子里。收集后，用灭菌的 PBS 或者其他合适的溶剂洗涤中国大鲟皮肤分泌物粘液、震荡、离心并收集上清液。将上清液冷冻干燥 24 h，并通过冷冻球磨机中研磨成粉末（即大鲟皮肤分泌物冻干粉，简称 SSAD），如图 1 的左图所示。鲟皮肤分泌物冻干粉于 -20°C 储存，直到进一步使用。所述 SSAD 优选为新鲜制备的。在本发明中，大鲟皮肤分泌物冻干粉、SSAD、SSAD 冻干粉和 SSAD 粉末具有相同含义，除非另有说明。皮肤是鲟的重要的呼吸器官，分布着粘液腺和颗粒腺。本发明选择中国大鲟皮肤分泌物的原因在于，其能够代表鲟这类两栖动物受刺激所分泌的粘液。电刺激和皮肤刮擦的方式可促进粘液的分泌。

[85]. S3 将所述第一混合液充分水解，得到第二混合液。

[86]. 所述水解的温度条件包括 0-8°C（优选为 0-4°C）。水解时间与具体的水解温度、所述第二溶剂的浓度、鲟皮肤分泌物冻干粉的浓度等因素有关。在 0-8°C 的温度范围内，温度越高，水解时间相对越短；所述第二溶剂的浓度越高，水解时间相对越短；鲟皮肤分泌物冻干粉的浓度越高，水解时间相对越长。水解时间还可能跟所使用的具体二硫键还原剂种类有关。因此，水解时间可以根据实际需要进行相应的调整，本发明对此不做限定。示例性的水解时间包括 2-168 h，优选为 12-48 h。混合可以以本领域常用的混合方式进行，例如震荡混匀、涡旋混匀等。作为优选，S3 可以在低温真空反应釜中进行，所述真空反应釜的真空度 < 5 kPa。

[87]. S4 将所述第二混合液离心并收集上清液。

[88]. 离心的具体条件可以根据实际需要进行相应的调整，本发明对此不做限定。示例性的离心条件包括在 4°C 下、以 4500 rpm 离心 10 min。

[89]. S5 将所述上清液装入截留分子量 ≤ 1000 的透析袋中置于所述第一溶剂中充分透析, 得到所述鲑皮肤分泌物水解液。

[90]. 所述透析的温度条件包括 $0-8^{\circ}\text{C}$ (优选为 $0-4^{\circ}\text{C}$)。优选采用截留分子量为 500 或 1000 的透析袋。透析时间实际上与透析期间的处理方式相关, 例如可以通过提高更换透析袋所处第一溶剂的次数等方式以缩短透析时间。因此透析时间可以根据实际需要进行相应的调整, 本发明对此不做限定。

[91]. 其中, 所述二硫键还原剂包括特异性二硫键还原剂。在本发明中, “特异性二硫键还原剂”是指能够将所要还原的蛋白或多肽中分子间二硫键还原, 而尽量保留分子内二硫键不被还原的二硫键还原剂。所述特异性二硫键还原剂包括三(2-羧乙基)膦盐酸盐 (TCEP-HCl)。当然, 在本发明提供的鲑皮肤分泌物水解液的制备方法中, 还可以搭配本领域已知的常见的蛋白变性剂/有机溶剂使用, 例如维生素 C、乙酸、盐酸、 β -巯基乙醇、二硫苏糖醇、EDTA、尿素、乙醇、丙酮、盐酸胍、十二烷基硫酸钠和氢氧化钠以及蛋白酶 (例如胃蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶)。

[92]. 进一步的, 本发明提供的鲑皮肤分泌物水解液的制备方法还可以包括 S6 将所述鲑皮肤分泌物水解液浓缩, 得到浓缩鲑皮肤分泌物水解液。

[93]. 示例性的浓缩方法包括将所述鲑皮肤分泌物水解液装入截留分子量 $\leq 3\text{K}$ 的浓缩离心管中离心或将所述鲑皮肤分泌物水解液蒸发浓缩。

[94]. 作为优选, 上述任何步骤在真空或惰性气氛下进行。

[95]. 制备实施例 1: 使用 TCEP-HCl (简称 “TCEP”) 制备 SSAD 水解透析液

[96]. 称取 100mg TCEP 溶于 5mL 去离子水中, 并称取 500mg SSAD 粉末加入其中, 震荡混匀, 得到混合液。将混合液置于 4°C 中水解 48h, 将水解 48h 后的混合液于 4°C 、以 4000rpm 离心 20 分钟, 得到上清约 3.5mL。用截留分子量为 1000 的透析袋于去离子水中低温 (4°C) 透析 48h, 得到 SSAD 水解透析液。

[97]. 以 SSAD 粉末与 TCEP 的质量比为 10:1、5:1、3:1 的混合比例, 对 SSAD 粉末分别进行水解。结果发现水解 1 天后, 胶体分散呈絮状, 得到的上清液保持 SSAD 本身具备的粘性的同时, 还保持 SSAD 所含的蛋白和多肽的活性, 而得到的下部沉淀无粘性。作为优选, SSAD 粉末与 TCEP 的质量比可以是 5:1, SSAD 粉末与去离子水的质量比可以是 10:1。

[98]. SSAD 水解液在水解前、水解后以及得到的具有粘性的上清液的代表性图像 (以 SSAD 粉末与 TCEP 的质量比为 5:1 为例) 如图 2a 所示。将水解后获得的混合液离心, 得到的上清液具有明显的粘性。上清液在透析前、透析中和透析后的代表性图像如图 2b 所示, 实验发现, 透析前原本澄清透明的液体在透析后变为淡乳白色。淡乳白色可能是透析过程中的氧化所导致。因此, 如果条件允许, 本发明提供的制备方法中的任何步骤优选在真空或惰性气氛下进行。图 2c 为制得的 SSAD 水解液的代表性图像, 其中, 左图为制备好的 SSAD 水解液, 呈均匀的半透明样; 中间上图为装载在注射器中的 SSAD 水解液, 中间下图为滴在手指上的一滴 SSAD 水解液, 这表明 SSAD 水解液的流动性好且可注射; 以及右图: 将 SSAD 水解液滴至手指后, 两手指捏住不到 1 min, 即可粘住上下手指, 展示出明显的粘性。在本发明中, SSAD 水解透析液、SSAD 水解液和水解液具有相同含义, 除非另有说明。

[99]. 制备实施例 2: 使用维生素 C 制备 SSAD 水解透析液

[100]. 称取 66 mg 维生素 C 溶于 5mL 去离子水中, 并称取 500mg SSAD 粉末

加入其中，震荡混匀，得到混合液。将混合液置于 4℃中水解 48h。将水解 48h 后的混合液于 4℃、4000rpm 离心 20 分钟，得到上清约 3.5mL。用截留分子量为 1000 的透析袋于去离子水中低温（4℃）透析 48h，得到 SSAD 水解透析液。

[101]. 通过本发明提供的制备方法制备得到的鲛皮肤分泌物水解液的浓度通常在 3%-7%之间。本文中鲛皮肤分泌物水解液（例如 SSAD 水解液）的浓度通过冻干后称重计算，除非另有说明。除非另有说明（例如，维生素 C 组），本发明中“鲛皮肤分泌物水解液”和“水解液”均指的是使用 TCEP 制备的鲛皮肤分泌物水解液。

[102]. 实际上，本发明还尝试利用其他本领域常见的蛋白变性剂/有机溶剂，以将鲛皮肤分泌物冻干粉水解，包括浓度为 25%、50%、75%和 99.5%的乙酸、浓度为 21.6%和 36%盐酸、浓度为 25%、50%和 57%尿素水溶液，还有 β-巯基乙醇、二硫苏糖醇（DTT）、EDTA、氢氧化钠、乙醇、丙酮、盐酸胍、十二烷基硫酸钠（SDS）以及蛋白酶等（胃蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶等）。实验结果显示，即使加入强碱调节 pH，使用乙酸或盐酸水解得到的上清液仍过酸且粘性极低；而使用尿素水溶液水解 5 小时后胶体溶胀，得到的上清液粘性中等偏下，得到的下部沉淀反而为中粘性。

[103]. **实施例一：鲛皮肤分泌物水解液的特征**

[104]. 1.1 鲛皮肤分泌物水解液的粘性

[105]. 鲛皮肤分泌物冻干粉（例如粉状 SSAD）遇水会立即形成粘性较强的水凝胶，但是，其在水溶液中难以分散（即不能溶解），如图 1 的右图所示。

[106]. 本发明提供的鲛皮肤分泌物水解液（以 SSAD 水解液为例）与先前制备的鲛皮肤分泌物冻干粉相比，具备更好的生物相容性的同时，具备相近的粘性（表 1）且粘性可调。与根据预实验推测的粘性结果（即鲛皮肤分泌物水解液的粘性随着浓度的增加而增加）不同，本发明出乎意料地发现，较低浓度的鲛皮肤分泌物水解液（例如下面浓度为 5%、7%的水解液）的粘附强度反而高于通过浓缩等方式获得的较高浓度的鲛皮肤分泌物水解液（例如下面浓度为 10%、15%、20%的水解液）。换句话说，鲛皮肤分泌物水解液的粘性和浓度相关程度呈现出向下开口的抛物线：当浓度为 5-7%时，鲛皮肤分泌物水解液的粘性最高；当浓度<5%时，鲛皮肤分泌物水解液的粘性随着浓度的增加而增加；当浓度>7%时，鲛皮肤分泌物水解液的粘性随着浓度的增加而减少。

[107]. 表 1：SSAD 水解液的粘性

SSAD 水解液的浓度	皮肤粘性
3%	10.8 kPa±2.3 kPa
5%	26.5kPa±3.9 kPa
7%	27.6 kPa±3.2 kPa
10%	21.8 kPa±2.7 kPa
15%	17.7 kPa±3.6 kPa
20%	16.3 kPa±2.1 kPa

[108]. 1.2 鲛皮肤分泌物水解液的生物相容性

[109]. 按照制造商的指示，使用细胞活力检测试剂盒(CCK-8)来评估鲛皮肤分泌物水解液的生物相容性。如图 3a 和图 3c（图 3a 和图 3c 是同样的数据的不同表现形式）所示，分别检测不同浓度（图中的 1/100、1/1000、1/10000 均为 w/w%）的粉浸提液、已透析上清液和未透析上清液对皮肤成纤维细胞的细胞毒性。结果证明，已透析上清液（即 SSAD 水解液）的生物相容性好，不仅没有明显的细胞

毒性, 还有促进细胞增殖的作用。

[110]. 使用聚合酶链式反应(PCR)技术, 对人脐静脉内皮细胞(Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC)与不同浓度的 SSAD 水解液共培养后的成血管相关基因的表达进行检测。图 3d 和图 3e 显示了 HUVEC 中成血管相关基因表达量的变化情况。如图 3d(共培养 7 天)和图 3e(共培养 14 天)所示, 1/50 组(SSAD 水解液的浓度约为 5%, 与细胞培养基 1:49 的体积比例混合)和 1/100 组(SSAD 水解液的浓度约为 5%, 与细胞培养基 1:99 的体积比例混合)的 CD31、VEGF、EphrinB2 等成血管相关基因有明显高表达且呈剂量依赖性。换句话说, 随着 SSAD 水解液浓度的增加, 细胞中成血管相关基因量表达增加且呈浓度依赖效应, 说明 SSAD 水解液具有促进血管生成的作用。

[111]. 维生素 C, 又称抗坏血酸, 是一种强还原剂。同时, 维生素 C 是生物体(特别是人类)的必需营养素, 因此其被认为生物安全性高。使用细胞活力检测试剂盒(CCK-8), 本发明进一步对比了制备实施例 1 制备的水解液(简称 TCEP 组, 下同)和制备实施例 2 制备的水解液(简称维生素 C 组, 下同)的生物相容性。然而, 令人惊讶的是, 如图 3b 所示, TCEP 组在第 1 天、第 3 天、第 5 天的生物相容性均高于维生素 C 组。划痕实验(图 3f)和 Transwell 实验(图 3g)也进一步证实, TCEP 组的生物相容性比维生素 C 组更高。

[112]. 划痕实验的示例性实验方法包括: 在 6 孔板中每孔接种约 5×10^5 个细胞, 在适宜的条件下培养 24h; 24h 后, 用枪头垂直于培养孔底, 划出横竖相交的线各 5 条; 用 PBS 洗涤细胞 3 次以去除划下的细胞, 然后加入无血清培养基; 将所述 6 孔板放入 37°C 、5% CO_2 培养箱培养, 并在培养后 0、12、24、48 小时取样和拍照记录。Transwell 实验的示例性实验方法包括: 取对数生长期的细胞, 将其常规消化后, 用含 1%FBS 的培养基重悬细胞并调整细胞密度为 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 。取 100 μL 细胞悬液接种于 Transwell (24 孔板) 小室的上室, 并在下室加入 600 μL 含 10%FBS 的培养基, 对照组加入浓度为 1%的 SSAD 水解液。培养细胞 24h 或 48h 后, 取出小室并置于烧杯内涮洗, 然后向小室内以 800 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入甲醇。吸干上室液体, 并用 4%多聚甲醛室温固定 10~30min。吸干上室固定液后, 加入 0.1%结晶紫染色液, 室温染色 20min。将小室用流动水轻轻冲洗并浸泡 3 次来进行脱色染色。吸干上室液体, 用棉签轻轻擦掉上室底部膜表面的未迁移细胞。显微镜下随机观察 5 个视野细胞并进行拍照记录(使用 ImageJ 软件处理图像)。

[113]. 本实施例采用拉曼光谱法和红外光谱法来进一步分析 TCEP 组与维生素 C 组的水解液。拉曼光谱和红外光谱基于不同的物理原理, 以探测分子的振动性质, 具有测定方法简单且不损坏样品等优点。红外光谱是基于样本的吸收性质, 其中信号强度遵循比尔(Beer)定律, 而拉曼光谱依赖于被检测样本非弹性散射的光子, 拉曼位移的强度与分子浓度成正比。

[114]. 图 9a 显示, 相较于鲎皮肤分泌物冻干粉、鲎皮肤分泌物水凝胶, TCEP 组和维生素 C 组在二硫键对应波长处没有出峰。具体地, 如图 9a 所示, 鲎皮肤分泌物冻干粉(简称“粉”)在 499 cm^{-1} 处出现了对应的 S-S 振动模式, 鲎皮肤分泌物水凝胶(简称“水凝胶”)在 492 cm^{-1} 出现了对应的 S-S 振动模式, 而 TCEP 组和维生素 C(简称 VC)组并未出现对应的 S-S 振动, 这表明 TCEP 组和维生素 C 组的水解液中的二硫键可能大部分被还原。基于此, 本实施例进一步分析了不同样品的二硫键(S-S)子构象。

[115]. 二硫键(S-S)会发生伸缩振动, $500\text{--}550\text{ cm}^{-1}$ 附近的拉曼光谱属于二硫键特征谱带, 该处拉曼峰主要可分为 3 个子构象的 S-S 伸缩振动。其中, 508 cm^{-1}

附近拉曼峰对应 *gauche-gauche-gauche* (ggg)构象的 S-S 伸缩振动, 525 cm^{-1} 附近拉曼峰对应 *gauche-gauche-trans* (ggt)构象的 S-S 伸缩振动, 545 cm^{-1} 附近拉曼峰对应 *trans-gauche-trans* (tgt)构象的 S-S 伸缩振动。tgt 与 ggg 构象分别属于分子间和分子内的二硫键构型。结果如表 3 所示, 相比于单独的粉, 水凝胶的 S-S 的 3 个子构象均发生了明显改变。相比于水凝胶, 维生素 C 组变化较小, 只在 tgt 子构象有轻微改变; 而 TCEP 组变化较大, 在 ggt、tgt 处均有较大的变化差异。由此可见, 相比于维生素 C 处理, TCEP 处理可能对蛋白质的空间结构改变的影响更大。进一步分析表明, 相比于粉, 维生素 C 组的 ggg 和 tgt 构象含量均下降, 而 TCEP 组的 ggg 构象下降、tgt 构象含量上升, 这说明维生素 C 处理使得分子间的部分二硫键受到破坏, 从而可能导致其分子间的作用力降低, 最终导致维生素 C 处理后的蛋白结构的稳定性下降。这也说明 TCEP 处理使得分子间二硫键含量上升, 从而可能导致其分子间的作用力上升, 最终导致 TCEP 处理后的蛋白结构的稳定性提高。

[116]. 表 3 不同样品的 S-S 子构象 (拉曼光谱)

	ggg	ggt	tgt
水凝胶	45.47%	48.62%	5.91%
粉	55.84%	31.04%	13.12%
维生素 C	44.20%	47.13%	8.67%
TCEP	47.29%	34.00%	18.71%

[117]. 拉曼光谱还显示, TCEP 组在 1667 cm^{-1} 处出现了酰胺 I 带振动, 1453 cm^{-1} 出现了 C-C 伸缩振动。维生素 C 组在 1659 cm^{-1} 处出现了酰胺 I 带吸收峰, 在 1445 cm^{-1} 处出现了 C-C 伸缩振动。粉在 1670 cm^{-1} 处出现了酰胺 I 带吸收峰, 在 1448 cm^{-1} 处出现了 C-C 伸缩振动, 在 1003 cm^{-1} 处出现了 C-C 伸缩振动, 在 499 cm^{-1} 处出现了 S-S 振动模式。水凝胶在 1674 cm^{-1} 处出现了酰胺 I 带振动, 在 1585 cm^{-1} 处出现了酰胺 II 带振动, 在 1454 cm^{-1} 处出现了 C-C 伸缩振动, 在 1307 cm^{-1} 处出现了酰胺 III 带振动, 在 1007 cm^{-1} 处出现了 C-C 伸缩振动, 在 492 cm^{-1} 处出现了 S-S 伸缩振动 (如图 9a 和表 4 所示)。

[118]. 表 4 不同样品的酰胺 I 带、酰胺 II 带、酰胺III带和 C-C 构象(拉曼光谱)

	酰胺 I 带	酰胺 II 带	酰胺III带	C-C
水凝胶	1674 cm^{-1}	1585 cm^{-1}	1307 cm^{-1}	1007、1454 cm^{-1}
粉	1670 cm^{-1}	-	-	1003、1448 cm^{-1}
维生素 C	1659 cm^{-1}	-	-	1445 cm^{-1}
TCEP	1667 cm^{-1}	-	-	1453 cm^{-1}

[119]. 图 9b 和表 5 显示不同样品的红外光谱分析。二硫键对稳定蛋白质的三级结构起到重要作用。水解液制备过程中, 二硫键被破坏, 蛋白质需要形成新的三级结构, 从而使得肽链中所有的原子达到空间上的重新排布。红外光谱中芳香族 C-H 结构的出现表明, 水解液中的蛋白分子内部具有酪氨酸、色氨酸等芳香族氨基酸, 这进一步表明水解液的制备过程会使蛋白构象发生变化, 从而使内部结构发生暴露。相较于粉, TCEP 组的酰胺 II 带逐渐减弱, 水凝胶中酰胺 II 带甚至消失不见, 这表明 TCEP 组和水凝胶的样品生成过程对蛋白含量及结构具有一定影响。然而, 维生素 C 组在 931、3080 cm^{-1} 处出现 C-H 振动峰, 这表明其蛋白结构和组成发生明显变化, 出现大量芳香族蛋白 (酪氨酸、色氨酸等)。芳香族蛋白相对含量的增加可能会改变经维生素 C 处理得到的水解液的疏水性和结构稳

定性，使得经维生素 C 处理得到的水解液的疏水性提高和结构稳定性下降。这表明维生素 C 处理，不仅会还原分子间和分子内的二硫键，同时还会对醛基等氧化基团起到还原作用。甲基及亚甲基强度的明显增大表明，TCEP 组和水凝胶中脂肪烃类物质含量较高，这可能主要来源于肽聚糖结构。

[120]. 表 5 不同样品的红外光谱分析

	芳香族 C-H	酰胺 II 带	酰胺 III 带	甲基及亚甲基
水凝胶	877 cm ⁻¹	-	-	2924 cm ⁻¹
粉	-	1544 cm ⁻¹	-	2927 cm ⁻¹
维生素 C	931、3080 cm ⁻¹	1533 cm ⁻¹	1235 cm ⁻¹	2967、2927、2870 cm ⁻¹
TCEP	868 cm ⁻¹	1544 cm ⁻¹	-	2924 cm ⁻¹

[121]. 此外，如红外光谱半定量分析（表 6）显示，与其他组的样品相比，维生素 C 组的二级结构发生明显改变，β-turn 和 Random 的相对含量降低并向 β-sheet 结构转化。

[122]. 表 6 不同样品的红外光谱半定量分析

	α-helix	β-sheet	β-turn	Random
粉	14.78%	27.92%	24.36%	32.94%
TCEP	15.23%	26.51%	25.32%	32.94%
水凝胶	16.81%	26.09%	23.23%	33.87%
维生素 C	14.24%	32.02%	22.57%	31.17%

[123]. 据报道，规则蛋白质的三级结构模型可分为 4 类：(1)全 α 型：以 α-螺旋结构为主，其含量大于 40%，而 β-折叠的含量小于 5%；(2)全 β 型：以 β-折叠结构为主，其含量大于 40%，而 α-螺旋的含量小于 5%；(3)α+β 型：α-螺旋和 β-折叠的含量都大于 15%，这两种结构在空间上是分离的，且超过 60%的折叠链是反平行排列；(4) α/β 型：α-螺旋和 β-折叠的含量都大于 15%，这两种结构在空间上是相间的，且超过 60%的折叠链平行排列。如圆二色光谱分析（表 7）显示，粉浸提液组的蛋白样本是一种 α+β 型蛋白，结构较为稳定。维生素 C 组的蛋白构象发生巨大变化，其二级结构特征基本消失不见，主要呈现 Random（无规卷曲）构象且相对含量达到 90%以上，这进一步证明维生素 C 使蛋白发生明显变性。粉（醋酸）组（SSAD 冻干粉用 0.75mol/L 醋酸 + 500mg SSAD 冻干粉 + 5mL ddH₂O 处理）和 TCEP 组样品中的蛋白质二级结构变为以 β-sheet(β-折叠)和 Random 为主，可能是醋酸或 TCEP 与蛋白的 α-helix（α-螺旋）结构中氨基酸的氨基及侧链基团结合，从而使蛋白质分子展开以改变其空间构象。

[124]. 表 7 不同样品的圆二色光谱分析

	α-helix	β-sheet	β-turn	Random
粉（醋酸）	20.7%	24.1%	6.9%	48.3%
TCEP	20.7%	24.1%	19.0%	36.2%
粉浸提液	31.7%	21.6%	26.4%	20.3%
维生素 C	4%	4%	2%	90%

[125]. 此外，与 SSAD 冻干粉相比，SSAD 水解液的臭味更轻。这可能是由于 TCEP 在水解 SSAD 粉末过程中，减弱或分解了二甲基二硫醚（其可能是 SSAD 粉末臭味和低毒性来源），进而使得 SSAD 水解液的臭味和毒性进一步降低。

[126]. 综上所述, 本发明采用特异性二硫键还原剂(例如 TCEP-HCl), 其能够将鲎皮肤分泌物冻干粉中分子间二硫键还原, 同时保留分子内二硫键以及氧化基团不被还原(即使这种特异性二硫键还原剂略有过量, 也不会明显影响分子内二硫键)。进一步地, 在这种特异性二硫键还原剂的水解过程中, 原本鲎皮肤分泌物冻干粉的蛋白质的结构发生重新排布, 使得得到的鲎皮肤分泌物水解液的分子内二硫键的含量上升, 进而导致鲎皮肤分泌物水解液的稳定性提高。此外, 这种特异性二硫键还原剂还能够将原本鲎皮肤分泌物冻干粉中的有毒、有臭味物质(例如, 二甲基二硫醚)还原, 降低了鲎皮肤分泌物水解液的气味和毒性。因此, 本发明使用特异性二硫键还原剂将鲎皮肤分泌物冻干粉进行水解, 制备得到一种既保持粘性又提高了生物安全性的、可溶于水、可注射的水解液(与鲎皮肤分泌物冻干粉遇水形成的水凝胶相比)。

[127]. 使用鼠尾胶原蛋白形成的能够模拟细胞外基质的三维凝胶作为体外组织模型, 本发明评估了 SSAD 水解液的组织渗透性。向干净的载玻片上滴加 100 μ L 鼠尾胶原蛋白溶液并将盖玻片覆盖在载玻片上, 然后将其放于 37 $^{\circ}$ C 摇床上, 待其凝固(约 3min)。在载玻片周围滴加荧光素标记的水解液, 使其自然渗透(全程免疫荧光显微镜(放大倍数 4 $\times$)下观察并拍照记录)。图 3h 显示了 0min、3min、5min 及 7min 时 SSAD 水解液向鼠尾胶渗透情况, 其中上层为鼠尾胶, 下层为荧光素标记的水解液。结果显示, 观察到 SSAD 水解液逐渐渗透到鼠尾胶中, 这表明适宜浓度的 SSAD 水解液作为生物粘合剂具有很好的渗透性, 可以随时间推移进入类细胞外基质环境中。

[128]. 在 SD 大鼠的背部皮肤上制造长度为 1.5 cm 的切口。如图 6c 的宏观图像显示, 光敏水凝胶组(光敏水凝胶的制备方法见下)的粘合性能优于空白组、氰基丙烯酸酯胶(CA)组、纤维蛋白胶(FB)组, 其展示了作为粘合剂的潜能。而在这 6 个组中, SSAD 水解液的愈合速度和愈合效果较佳, 甚至可以促进伤口的无瘢痕愈合。将使用 SSAD 水解液粘接的切口制作切片, 并置于扫描电镜(SEM)下观察切口粘接界面。如图 3i 的扫描电镜图像所示, SSAD 水解液粘合皮肤组织后, 切口间隙闭合较好, 几乎看不到切缘。

[129]. 如图 7 所总结, 将溶液形式的低浓度(例如 5%-7%)的鲎皮肤分泌物水解液应用至伤口时, 其能够以可注射, 更轻薄、均匀的形式覆盖在伤口表面, 与伤口的贴合程度更高, 仅需轻微的压力(例如, 使用手指按压)即可实现对伤口的稳定粘附, 整个操作过程更加简便、可控。

[130]. 令人惊讶的是, 本发明发现, 鲎皮肤分泌物水解液的实际粘接效果, 并非如通常所认为的浓度越高、粘性越高、粘接效果越好; 而是处于浓度相对较低的状态(例如 5%-7%)时, 鲎皮肤分泌物水解液的粘性效果较好。在应用至伤口前, 相对较低浓度(例如 5%-7%)的鲎皮肤分泌物水解液处于一种“饱和”状态(即“溶液”状态); 在达到“饱和”状态之前, 鲎皮肤分泌物水解液的粘性将随着浓度增加而增加; 在达到“饱和”状态之后, 鲎皮肤分泌物水解液的粘性将随着浓度增加而减少。当其被应用至伤口处时, 在轻微压力作用下, 其会粘附在伤口上并随着溶剂(例如水解液中的水)可以渗透到更深的生物组织内部。随着溶剂进入组织后, 鲎皮肤分泌物水解液局部浓度增加(例如, 增加到浓度 > 7%)和达到一种“过饱和”状态(即“微凝胶”状态), 并且能够与生物组织中的蛋白质发生反应, 在组织间形成交联网络。最终, 微凝胶在组织内部可以形成凝胶。换句话说, 在被应用至伤口并受到一定的压力后, 本发明提供的鲎皮肤分泌物水解液中的溶剂(例如, 水)能够渗透到更深的组织内部, 使得鲎皮肤分

泌物水解液的局部浓度增加和在组织间形成具有交联网络的微凝胶结构。具有较小粒径的微凝胶微粒能够在伤口组织处发生自组装，因此形成的交联网络（即微凝胶结构）更致密的同时，与伤口环境更加适配。因此，微凝胶结构能够将伤口处的组织更紧密粘接在一起，加强了伤口处组织间的联系，使得伤口处组织的连续性和完整性得到一定的提高，最终促进了伤口的愈合。本发明提供的鲛皮肤分泌物水解液可以在伤口处发生浓度和状态上的改变，这为伤口提供了适合的愈合环境。此外，相较于鲛皮肤分泌物冻干粉，本发明提供的鲛皮肤分泌物水解液粘合同样面积的伤口所需的量更少、炎症反应更低的同时，伤口恢复时间更短，具有更好的促伤口愈合性能。

[131]. 1.3 SSAD 水解液的促伤口愈合性能

[132]. 先前研究已证明 SSAD 粉末可以促进伤口的无瘢痕愈合，且愈合效果在所测试的组（纤维蛋白胶组、止血对照组、氰基丙烯酸酯组和缝线组）中最好；SSAD 组伤口周围未见感染或炎症迹象，且能观察到毛发再生且无瘢痕，SSAD 促进了伤口的整体愈合。图 4a 展示了 SSAD 水解液（可以理解为作为一种生物粘合剂）与其他 4 种伤口闭合方法（分别是阴性对照组(空白)、缝合(缝线)、氰基丙烯酸酯黏合剂(商用胶)、纤维蛋白胶(生物胶))的体内效果比较。术后的第 0、1、3、5 天的大鼠背部切口（切口长度为 2cm）图像显示，SSAD 水解液保持着促细胞增殖、迁移、伤口再生、血管生成的能力，与上述 SSAD 粉末的促伤口愈合能力类似。图 4b 的损伤组织的 HE 染色图像（表皮(E)、真皮(D)、痂(SC)、切口位置(★)）显示，SSAD 水解液组的剩余裂隙宽度明显窄于空白组、纤维蛋白胶组和氰基丙烯酸酯组，其增生上皮细胞数量明显高于其他组，而肉芽组织更少。

[133]. 图 4c 的大鼠背部皮肤切口（切口长度为 2cm）模型的宏观图像显示，在术后第 5 天，维生素 C 组和 TCEP 组的伤口均已愈合结痂，愈合速度和效果明显优于氰基丙烯酸酯胶（CA）组、纤维蛋白胶（FB）组和缝合组，更是优于空白对照组。而组织学切片进一步证实，在术后第 5 天，TCEP 组和维生素 C 组的愈合效果更好，其中 TCEP 组切缘的炎症反应最轻（图 4d，E 代表表皮，D 代表真皮，CA 组下图处的“CA”表示 CA 无法降解）。

[134]. 本实施例进一步比较了 SSAD 水解液与 SSAD 冻干粉的特征，如表 2 所示。

[135]. 表 2 SSAD 水解液与 SSAD 冻干粉的对比

	SSAD 冻干粉	SSAD 水解液
物理状态	粉末	溶液
遇水后变化	成为水凝胶	被稀释
制备过程	大鲛皮肤粘液经清洁冻干后研磨得到	SSAD 粉末经水解透析后得到
气味	明显刺鼻气味	淡淡的弱蛋白粉味道
粘性（猪皮）	32±5 kPa	29±3 kPa
可注射性	无	有
生物相容性	高浓度浸提液（1%），弱细胞毒性	无明显细胞毒性（5%浓度，细胞仍能很好生长）
促细胞迁移、增殖、再生、伤口愈合	低浓度浸提液（0.01-0.05%）促细胞增殖、迁移、血管生成	保持促细胞增殖、迁移、伤口再生、血管生成，且在 0.01%-5%（或者 0.01%-7%）范围内呈剂量依赖效应，浓度越高，细胞增殖、迁移、血管生

		成效果越好
降解性	体内可完全降解	体内可完全降解
湿粘结	可以（遇水成胶，可用于有渗出、出血伤口，干燥伤口需搭配溶液使用）	不可以（已充分水化，但可应用于干燥伤口或通过基础处理手段（例如纱布）处理后的伤口）

[136]. 总之，鲎皮肤分泌物水解液不仅具有优异的粘附性能、良好的生物相容性、可生物降解、促组织再生等特性，还具有可注射、炎症反应低、在组织内部的渗透深度更深等特点，能够以简便的方式应用于伤口部位。

[137]. **实施例二：鲎皮肤分泌物水解液作为生物粘合剂和液体敷料**

[138]. 上述实验表明，鲎皮肤分泌物水解液可以作为一种生物粘合剂（图 6b）。将鲎皮肤分泌物水解液用于粘合皮肤组织后，切口间隙闭合更好，几乎看不到切缘，且炎症反应更低、伤口恢复时间更短。此外，图 6a 的大鼠皮肤全层缺损模型（直径 1.5 cm 的圆形）显示，SSAD 水解液还可以作为一种液体敷料，促进伤口的愈合和再生。

[139]. **实施例三：鲎皮肤分泌物水解液作为光敏水凝胶**

[140]. 可以使用浓缩方法，将鲎皮肤分泌物水解液进一步浓缩。经可见光固化后的未浓缩的水解液和浓缩后的水解液的扫描电镜图像和粘度如图 8a 所示。浓缩后的水解液（浓缩 1 倍是指浓缩后的水解液的体积减少至浓缩前的一半）与未浓缩的水解液相比，孔径更致密、粘度更高。合适的浓缩方法包括将鲎皮肤分泌物水解液装入截留分子量≤3K 的浓缩离心管中离心或将所述鲎皮肤分泌物水解液蒸发浓缩。

[141]. 示例性的光敏水凝胶的制备方法包括：在干净 EP 管中（全程锡箔纸避光），将 500μL 浓缩后的 SSAD 水解液（浓度约为 15%）与光引发剂 Ru/SPS（钌(II)化合物和过硫酸钠）按照 50:1 的比例进行混合（即加入 10 μL RU+10 μL SPS，Ru/SPS 的浓度为 1/25 mM）。然后，将混合物加入 96 孔板中（50 ul/孔），重复 8 个孔。随后用 7000w 可见光固化并在 30s（可见光的强度越强，固化时间越短，可以根据实际情况调整可见光的强度和固化时间）后检查是否成胶。光照前后的光敏水凝胶的宏观图像如图 7 下方所示，光照前的光敏水凝胶呈液态，而光照后的光敏水凝胶呈固态。

[142]. 细胞和光敏水凝胶共培养。配制培养基：将 5 mL FBS 和 500 ul 双抗加至 50 mL 离心管中，并用基本 DMEM 培养基定容至 50 mL，得到 50 mL 完全培养基（1%双抗+10%FBS+基本 DMEM 培养基）2 管。将 2.5 mL FBS 和 1.25 mL 双抗加至 50 mL 离心管中，并用基本 DMEM 培养基定容至 25 mL，得到 25 mL 完全培养基（5%双抗+10%FBS+基本 DMEM 培养基）1 管。消化贴壁细胞：将 10cm 培养皿从孵箱中拿出，镜下观察细胞长至 70%-80%，转移至生物安全柜中；弃旧培养基，PBS 漂洗 1 次，吸净，加入 1ml 胰酶消化 2-3 分钟，镜下观察细胞变圆时，加入 3ml 完全培养基终止消化；吹打细胞，收集细胞悬液至 15ml 离心管中，以 1000 rpm 离心 3min，弃上清，加入 3ml 完全培养基（5%双抗+10%FBS+基本 DMEM 培养基）进行重悬。细胞计数：吸取细胞悬液 200 ul 至 EP 管中，加入 600ul 5%双抗培养基，将原液稀释 4 倍，吸取 10ul 细胞悬液至血球计数板中进行细胞计数。将细胞悬液（即 6000cells/孔）以 3 ul/孔加入上述含光敏水凝胶的 96 孔板中，再加入 100ul 5%双抗培养基。然后，将 96 孔板转移至孵箱中，以 37℃、5%CO2 培养。

[143]. 接着，通过活死染色法观察共培养 24 和 48 小时后，光敏水凝胶内是否

有细胞生长。荧光显微镜下的观察显示（图 5a），L929 细胞粘附在水凝胶上，光敏水凝胶体外的细胞相容性良好。示例性的实验方法包括：首先配制活死染色工作液：提前避光解冻活死染色储存液，取干净 EP 管，锡箔纸避光，加入 800 ul PBS+1.6 ul Ca+2.4 ul PI，混匀后备用；然后，将 96 孔板从孵箱中取出，离心并弃上清液。将细胞沉淀用 PBS 漂洗 1 次，吸净后，以 100ul/孔加入染色工作液，避光孵育 15min；最后，荧光显微镜下观察并拍照。

[144]. 如图 8b 的装置所示，猪皮对位粘合后，使用万能力学测试仪以 0.1N/s 的速度施加剪切力，测量 CA（氰基丙烯酸酯）、浓缩后的水解液、未浓缩的水解液以及光敏水凝胶的最大粘结强度（最大剪切应力）。结果表明，经过浓缩的浓缩水解液和光敏水凝胶的最大粘结强度不及未浓缩的水解液。

[145]. 图 8c 显示了在 SD 大鼠背部切口处皮下植入 100mg 光敏水凝胶的 7 天和 14 天后的样本切片染色结果。HE 染色和 Masson 染色皆表明光敏水凝胶可在体内降解（在植入后 21 天时可以完全降解，实验数据未显示），具有良好的生物相容性。

[146]. 图 8d 显示了大鼠肝脏出血模型的手术过程：首先，在肝脏上制造一个 8-mm 的缺损，接着切下肝脏。然后，使用纱布来使肝脏的出血停止。最后，注射光敏水凝胶和进行可见光照射。如图 5b 所示，制得的 SSAD 光敏水凝胶可用作光敏止血剂，与对照组和纤维蛋白胶（FB）组相比，光敏水凝胶组显著降低了肝脏出血模型的出血量和凝血时间。图 8e 的 SEM 图像（左图的放大倍数为 350 $\times$ ，右图为 1000 $\times$ ）显示，光敏水凝胶能够与需要止血的组织（例如，肝脏）结合非常紧密。图 8f 进一步显示了各实验组（空白组、水解液组、纤维蛋白胶（FB）组和光敏水凝胶组）在 0 min、2 min、4 min、6 min 时对肝脏的止血效果，结果表明光敏水凝胶在 1 min 时即可将肝脏的大量出血止住，而其他组在 6 min 时都无法控制出血。

[147]. 图 5c 的大鼠皮肤全层缺损模型（直径 1.5 cm 的圆形）显示，SSAD 光敏水凝胶在促进伤口愈合方面（作为一种液体敷料）也效果显著，能够促进伤口的愈合和再生。

[148]. 另外，添加了光引发剂（如 Ru/SPS）的 SSAD 水解液，还可以单独或配合其他甲基丙烯酸酯化的生物墨水基材（如 GelMA，HAMA，FibMA，CSMA，CollMA，HepMA，AlgMA，DexMA，ChsMA，CHIMA，PCLMA，ElaMA 等）用作 3D 打印的生物墨水。这也表明鲟皮肤分泌物水解液是一种优秀的新型生物材料，以更强且可调的粘性、更高的生物相容性和优秀的促再生、促增殖能力，应用于多个领域。

[149]. 上面结合附图对本发明的实施例进行了描述，但是本发明并不局限于上述的具体实施方式，上述的具体实施方式仅仅是示意性的，而不是限制性的，本领域的普通技术人员在本发明的启示下，在不脱离本发明宗旨和权利要求所保护的范围情况下，还可做出很多形式，这些均属于本发明的保护之内。

权利要求书

1. 一种鲎皮肤分泌物水解液的制备方法，包括以下步骤：
S1 将二硫键还原剂和第一溶剂混合，得到第二溶剂；
S2 将鲎皮肤分泌物冻干粉与所述第二溶剂混合，得到第一混合液；
S3 将所述第一混合液充分水解，得到第二混合液；
S4 将所述第二混合液离心并收集上清液；
S5 将所述上清液装入截留分子量 ≤ 1000 的透析袋中并置于所述第一溶剂中充分透析，得到所述鲎皮肤分泌物水解液；
其中所述二硫键还原剂包括特异性二硫键还原剂，所述特异性二硫键还原剂为三(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP-HCl)，所述第一溶剂包括超纯水、去离子水、注射用水、纯水中的一种或多种。
2. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述第一溶剂和所述鲎皮肤分泌物冻干粉的质量比至少为 4:1。
3. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述鲎皮肤分泌物冻干粉和所述二硫键还原剂的质量比至少为 3:1。
4. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述水解的水解时间包括 2-168 小时，可选地为 12-48 小时。
5. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述 S3、所述 S4 和所述 S5 的温度条件包括 0-8℃。
6. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述 S3 在真空反应釜中进行，所述真空反应釜的真空度 < 5 kPa。
7. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述二硫键还原剂还包括维生素 C。

8. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述透析的透析时间包括 48 小时。
9. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述得到的所述鲎皮肤分泌物水解液的浓度包括 3%-7%。
10. 如权利要求 1-9 任一项所述的方法, 其特征在于, 所述方法进一步包括 S6 将所述鲎皮肤分泌物水解液浓缩, 得到浓缩鲎皮肤分泌物水解液。
11. 如权利要求 10 所述的方法, 其特征在于, 所述浓缩的方法包括将所述鲎皮肤分泌物水解液装入截留分子量 $\leq 3K$ 的浓缩离心管中离心或将所述鲎皮肤分泌物水解液蒸发浓缩。
12. 一种鲎皮肤分泌物水解液, 其特征在于, 所述鲎皮肤分泌物水解液通过权利要求 1-11 任一项所述的方法制备得到。
13. 一种鲎皮肤分泌物水解液在制备生物粘合剂中的用途, 其特征在于, 所述鲎皮肤分泌物水解液通过权利要求 1-9 任一项所述的方法制备得到。
14. 如权利要求 13 所述的用途, 其特征在于, 所述鲎皮肤分泌物水解液的浓度包括 5%-7%。
15. 如权利要求 13 所述的用途, 其特征在于, 当所述生物粘合剂被施用至伤口后, 所述生物粘合剂自行或经外部压力渗入所述伤口的组织内部形成微凝胶结构。
16. 如权利要求 15 所述的用途, 其特征在于, 所述伤口包括皮肤伤口。
17. 如权利要求 15 所述的用途, 其特征在于, 所述生物粘合剂用于促

进所述伤口的愈合。

- 18.一种鲑皮肤分泌物水解液在制备伤口敷料中的用途，其特征在于，所述鲑皮肤分泌物水解液通过权利要求 1-11 任一项所述的方法制备得到。
- 19.一种鲑皮肤分泌物水解液在制备光敏水凝胶中的用途，其特征在于，所述光敏水凝胶包括浓缩鲑皮肤分泌物水解液和光引发剂，在可见光的照射下，所述浓缩鲑皮肤分泌物水解液固化，以形成所述光敏水凝胶；所述浓缩鲑皮肤分泌物水解液通过权利要求 10 所述的方法制备得到，所述光引发剂包括 Ru/SPS 系统。
- 20.如权利要求 19 所述的用途，所述可见光的强度包括 7000W。
- 21.如权利要求 19 所述的用途，所述光敏水凝胶用于作为止血剂。
- 22.如权利要求 19 所述的用途，所述光敏水凝胶用于作为生物粘合剂。
- 23.如权利要求 19 所述的用途，所述光敏水凝胶用于作为伤口敷料。