

海洋生物原料贻贝粘蛋白的代谢特性研究

高敏, 顾铭*

(江阴贝瑞森生化技术有限公司, 江苏江阴, 214400)

DOI:10.61369/CDCST.2026010020

摘要

贻贝粘蛋白因具有抗炎、促愈合、长效抗氧化等功能在医疗产品、化妆品等日用消费中有着广泛的应用价值。贻贝粘蛋白发挥功能的同时, 其代谢同特征直接关系原料的安全性。使用放射性同位素标记技术研究雌雄 Sprague-Dawley (SD) 大鼠单次直肠给予 $1.5\text{mg}/100\mu\text{Ci}/\text{kg}$ 的 [^3H] 贻贝粘蛋白后, 检测血浆中总放射性的药代动力学行为, 以及 [^3H] 贻贝粘蛋白在直肠黏膜的滞留情况。结果显示, 在大鼠直肠给予放射性标记贻贝粘蛋白后 168 小时, 直肠局部仍有放射性, 血浆中贻贝粘蛋白的量远低于直肠局部, 提示贻贝粘蛋白在局部长时间起效, 具有较高的安全性。

关键词: 贻贝粘蛋白; 放射性标记; 安全性

第一作者简介: 高敏, 工学博士, 就职于江阴贝瑞森生化技术有限公司总工程师, 从事蛋白质分离纯化工艺研究。E-mail:gaomin@usunbio.com。

通讯作者简介: 顾铭, 工学博士, 就职于江阴贝瑞森生化技术有限公司总经理, 从事新材料、新技术研究。E-mail:guming@usunbio.com。



高敏



顾铭

○

贻贝粘蛋白 (Mussel Adhesive Protein) 是从紫贻贝 (*Mytilus edulis*) 的足丝腺中提取纯化的一种蛋白质。由于贻贝粘蛋白具有抗炎修复、隔水黏附特性、生物相容性及生物可降解性。贻贝粘蛋白是中国原研的医用材料, 经过多年的临床验证, 已证明贻贝粘蛋白具有抗炎、促愈合和长效抗氧化等功能, 贻贝粘蛋白也逐渐被应用于医疗产品和消费品中, 可作为修复性原料用于皮肤创伤、皮肤屏障功能受损等领域^[1-5]。

贻贝粘蛋白的结构中含有 3,4-二羟基苯丙氨酸 (DOPA) 和羟脯氨酸等羟基化氨基酸, 这些特殊的结构使得贻贝粘蛋白呈现出多样的化学反应性, 可以通过非共价键和共价键与多种基材表面键合, 形成很强的黏附力^[6-9]。贻贝粘蛋白形成附着后的代谢特性关系到贻贝粘蛋白的作用模式和安全性, 使用放射性同位素标记技术研究雌雄 Sprague-Dawley (SD) 大鼠单次直肠给予 $1.5\text{mg}/100\mu\text{Ci}/\text{kg}$ 的 [^3H] 贻贝粘蛋白后, 血浆中总放射性的药代动力学行为, 以及 [^3H] 贻贝粘蛋白在直肠黏膜的滞留情况, 探讨贻贝粘蛋白使用后的安全性。

1. 试验设计

30 只 SD 大鼠 (雌雄各半) 经肌肉注射麻醉后直肠给予 $1.5\text{mg}/100\mu\text{Ci}/\text{kg}$ 的 [^3H] 贻贝粘蛋白, 分别于 1h、6h、24h、72h 和 168h 依序取 3 只雄鼠和 3 只雌鼠转移至诱导盒内, 吸入过量二氧化碳实施安乐死后, 心脏穿刺采集血液

样品, 然后立即解剖采集直肠, 用约 5mL 生理盐水反复冲洗直肠, 将其内容物和冲洗液均作为直肠内容物收集, 随后剥离收集直肠黏膜。另有 1 只雄性 SD 大鼠单次直肠给予空白凝胶后收集 24h 的血浆、直肠内容物和直肠黏膜样品。

血浆取样干燥后加水复溶供测定; 直肠黏膜加水匀浆, 取样干燥后加入适量的 1mol/L KOH 溶液, 在 90°C 条件下加热溶解后供测定; 直肠内容物匀浆, 取样后加入适量的 1mol/L KOH 溶液, 在 90°C 条件下加热溶解后供测定。上述处理后的每份样品加入适量闪烁液混匀后, 使用液体闪烁计数仪测定放射性量。样品中测定的放射性量用于计算每克样品中的总放射性, 应用 WinNonLin 软件 (8.3 版, Pharsight) 按照非房室模型计算总放射性的消除半衰期 ($t_{1/2}$)。

2. 试剂及仪器

2.1 试剂

贻贝粘蛋白凝胶: 向 [^3H] 贻贝粘蛋白中加入 1mL 的 pH5.0 乙酸水溶液, 混合均匀。移取 0.952mL 上述溶液至 40mL 玻璃瓶中, 加入约 200 μL 的 0.5% 伊文思蓝水溶液混合均匀。称取 20.0088g 的空白凝胶至上述 40mL 玻璃瓶中混合均匀, 得到 [^3H] 贻贝粘蛋白凝胶 (蛋白批号: P20813, 提供单位: 江阴贝瑞森生化技术有限公司)。

[^3H] 琥珀酰亚胺丙烯酸酯 (批号: 591-177-090-A-20190909-JPL, 提供单位: Moravek, Inc.)。取 5 瓶 (1mCi/mL, 2mL/瓶) [^3H] 琥珀酰亚胺丙

烯酸酯合并至15mL离心管中，氮气吹干，加入50 μ L的DMSO，加入1mL的50mmol/L pH8.0硼酸-硼砂缓冲液-50mmol/L NaCl，涡旋溶解。加入20.4mg的UH2402，混合后在25℃，200r/min下震荡反应1h，加入0.50mL(1mmol/L)的羟胺继续震荡3min。将上述反应液转移至离心超滤管中(30000NMWL)，4000×g下离心10min，收集下清液至20mL玻璃瓶中。用pH5.0乙酸水溶液反复洗脱6次，直至放射性量低于初始放射性的1%。

2.2 仪器

电子天平，ME104、ME403和PL6001E，Mettler Toledo公司；离心机，5810R和5427R，Eppendorf® AG公司；涡旋仪，Genie-2 G-560，VWR技术公司；液闪计数仪，Tri-Carb 4910 TR，Perkin Elmer仪器公司；研磨仪，JX-64，上海净信科技有限公司。

2.3 实验系统

2.3.1 动物实验中心

动物设施：屏障环境

实验动物使用许可证号：SYXK(苏)2018-0031

2.3.2 实验动物

种属及品系：SD大鼠

级别：SPF级

数量及性别：共30只，雌雄各半。

动物体重：雄性196.7~212.8g；雌性192.3~217.2g

供应商：浙江维通利华实验动物技术有限公司

实验动物生产许可证号：SCXK(浙)2019-0001

动物质量合格证号：20201120Aazz0619000612

3. 试验方法

3.1 试验方法

动物称重后经舒泰-50肌肉注射麻醉后仰位平躺，轻轻挤出直肠末端大便，75%酒精棉球肛门外周皮肤消毒。将末端封闭后的导尿管(8号，双腔带导丝)插入大鼠肛门，深度约3cm，再将灌胃针缓慢插入至少3.5cm。提起肛周皮肤固定导尿管和灌胃针后，用注射器向导尿管气囊腔注水约1mL使其膨胀，随后快速给予贻贝粘蛋白并出针，检查凝胶无渗漏表明样品给予成功。样品给予完成后结扎导尿管，在鼠尾根部缠绕胶带固定导尿管，减掉结扎后方的导尿管。导尿管在直肠维持约4h。

每只动物给予样品前后，需称取并记录注射器的重

量，计算注射器给予样品前后的重量差，通过实际给予的凝胶重量和凝胶总放射性浓度，确定每只动物的实际给予样品量。给予样品结束后，迅速将动物转移回实验笼具内收集样品，保存使用过的注射器。

3.2 生物样本收集

3.2.1 组织器官

组1的30只SD大鼠(雌雄各半)于给予样品后1h、6h、24h、72h和168h(每个时间点3只雄性和3只雌性大鼠)取一组大鼠置于麻醉诱导盒内，经吸入过量二氧化碳实施安乐死后心脏穿刺采集全血(约7mL)，置含有EDTA-K2抗凝剂的采血管中。采血结束后将大鼠返回麻醉诱导盒内，给予过量的二氧化碳实施安乐死。立即解剖收集直肠，用生理盐水反复冲洗直肠，将其内容物和冲洗液均作为直肠内容物收集，随后剥离直肠黏膜等，并保留动物剩余尸体。直肠黏膜收集于已记录重量并贴有相应标签的容器内，称量总重并记录，置于低温冰箱(-10~-30℃)中保存。

采集全血后，立即轻轻晃动采血管并置于冰上，在4℃和2400×g条件下离心5min，收集上清液获得血浆样品。除样品分析期间，所有样品收集后均置于低温冰箱(-10~-30℃)冷冻保存。

3.2.2 空白样品

组2的1只雄性大鼠将作为空白对照组，收集血浆、直肠内容物和直肠黏膜等空白样品，样品采集和保存方式与实验组相同。

3.3 生物样品处理和测定

3.3.1 血浆

血浆样品经充分涡旋，取样至20mL的闪烁瓶中，干燥后加水复溶，然后加入约10mL闪烁液混合均匀，使用液体闪烁计数仪测定。

3.3.2 直肠黏膜

直肠黏膜样品加入适量的水，称量总重并记录，用组织匀浆机进行匀浆化处理。取样至20mL的闪烁瓶中，干燥后加入适量的1mol/L KOH溶液，在90℃条件下加热溶解后，加入约10mL闪烁液后使用液体闪烁计数仪测定放射性量。

3.3.3 直肠内容物

直肠内容物加入适量的水，称量总重并记录，用组织匀浆机进行匀浆化处理。取样至20mL的闪烁瓶中，加入等体积的1mol/L KOH溶液，在90℃条件下加热溶解后，加入

约10mL闪烁液后使用液体闪烁计数仪测定放射性量。

3.4 数据分析

使用WinNonLin软件(8.3版, Pharsight)以非房室模型估算各基质中放射性浓度的终末消除半衰期($t_{1/2}$)。

采用Microsoft Office Excel(2010版本或更高版本)计算放射性浓度、占给予样品量的百分比、平均值和标准偏差等数据。

4.结果和讨论

4.1 实验动物状态观察

直肠给予 $1.5\text{mg}/100\mu\text{Ci}/\text{kg}$ 的 $[^3\text{H}]$ 贻贝粘蛋白后, 大鼠在整个实验过程中均无异常, 给予样品后无明显的不良反应。提示该实验剂量的 $[^3\text{H}]$ 贻贝粘蛋白在大鼠体内耐受性良好。

4.2 直肠内容物和直肠黏膜的分布

单次直肠给予雌雄SD大鼠 $1.5\text{mg}/100\mu\text{Ci}/\text{kg}$ 的 $[^3\text{H}]$ 贻贝粘蛋白后, 各时间点直肠黏膜、直肠内容物和血浆的平均放射性浓度数据以及消除半衰期($t_{1/2}$)汇总见表1, 平均浓度与时间的半对数曲线绘制见图1。总放射性在雌雄大鼠直肠黏膜上的滞留情况相似, 因此以下讨论均采用雌雄大鼠的平均值。

直肠给予样品后1h, 大鼠直肠黏膜的放射性浓度最高, 平均浓度为 53593ng Eq./g , 是同时间血浆平均放射性浓度(47.8ng Eq./g)的1121倍, 直肠内容物的放射性浓度(35322ng Eq./g)低于直肠黏膜, 与收集内容物时冲洗操作稀释了样品浓度有关。给予样品后6h, 直肠内容物和直肠黏膜的放射性浓度明显降低, 其中直肠黏膜的平均放射性浓度降低至 11163ng Eq./g , 约是1h的20.83%, 仍显著高于同时间点血浆平均放射性浓度(54.1ng Eq./g)。给予样品后24h和72h, 直肠黏膜中仍有较高水平的放射性, 平均浓度为 339ng Eq./g 和 147ng Eq./g , 分别约是同时间点的直肠内容物放射性浓度的6.01倍和3.32倍。末次采集时间点168h, 直肠黏膜和直肠内容物仍可检测到少量放射性, 直肠黏膜的放射性浓度(37.6ng Eq./g)约是直肠内容物(16.5ng Eq./g)的2.28倍。经计算, 直肠黏膜、直肠内容物和血浆的总放射性消除半衰期分别为45.8h、79.3h和316h。

表1 单次直肠给予雌雄SD大鼠 $1.5\text{mg}/100\mu\text{Ci}/\text{kg}$ 的 $[^3\text{H}]$ 贻贝黏蛋白后不同时间点直肠黏膜、直肠内容物、血浆的放射性浓度及其消除半衰期(平均值±标准偏差)

基质	总放射性/ ng Eq.g^{-1}					$t_{1/2}/\text{h}$
	1h	6h	24h	72h	168h(Cmax%)	
直肠黏膜	$53593\pm$	11163	339	147	37.6	45.8
	47275	± 7027	± 95.3	± 84.3	$\pm 10.2(0.07\%)$	
直肠内容物	35322	21981	56.4	44.3	16.5	79.3
	± 5154	± 15355	± 54.0	± 27.6	$\pm 6.88(0.05\%)$	
血浆	47.8	54.1	18.6	15.2	13.3	316
	± 12.2	± 14.4	± 6.24	± 8.47	$\pm 3.41(24.58\%)$	

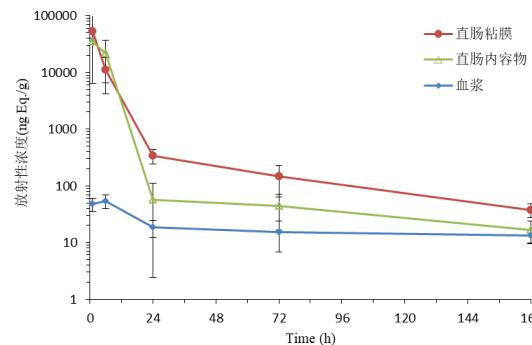


图1 单次直肠给予雌雄SD大鼠 $1.5\text{mg}/100\mu\text{Ci}/\text{kg}$ 的 $[^3\text{H}]$ 贻贝黏蛋白后不同时间点直肠黏膜、直肠内容物、血浆的放射性浓度与时间半对数曲线(平均值±标准偏差)

5.结论

单次直肠给予雌雄SD大鼠 $1.5\text{mg}/100\mu\text{Ci}/\text{kg}$ 的 $[^3\text{H}]$ 贻贝粘蛋白后, 血浆总放射性远低于局部, 直肠黏膜及其内容物的总放射性在给予样品后的1h浓度最高, 之后放射性消除迅速, 24h平均浓度约是各自 C_{max} 的0.63%和0.16%, 随后消除缓慢, 在末次采集时间点168h, 直肠黏膜和直肠内容物仍可检测到少量放射性, 给予样品局部放射性的长滞留。以上结果显示, 贻贝粘蛋白在局部使用后可以在局部附着长时间起效, 同时不会进入系统循环, 因此由全身血药浓度引起的副作用风险显著降低。贻贝粘蛋白产品预期在孕产妇人群、儿童人群、肝肾功能不全人群中使用时会表现出很好的安全性。

参考文献

- [1] Ziqi Liu, Min Jiang, Juemin Zhao, et al. Efficacy of a wound - dressing biomaterial on prevention of postinflammatory hyperpigmentation after suction blister epidermal grafting in stable

vitiligo patients: a controlled assessor - blinded clinical study with in vitro bioactivity investigation [J]. Archives of Dermatological Research, 2020, 312(9):635–645.

[2]Richeng Dong, Jiachen Yuan , Zhehu Jin, et al. Mussel adhesive protein treatment delivered by microneedling for sensitive skin: A clinical study [J]. Journal of Cosmetic Dermatology, 2023(00):1–9.

[3]韦莹婷, 杨宾烈, 黄莉霞, 等. 贻贝粘蛋白敷料在宫颈LEEP术后创面修复及阴道微生态恢复中的应用 [J]. 国际妇产科学杂志, 2022, 49(5):507–510.

[4]费烨, 王韵, 沈征宇, 等. 贻贝粘蛋白在微等离子体治疗疤痕凹陷性瘢痕后的应用 [J]. 临床皮肤科杂志, 2015, 44(1): 40–42.

[5]于东宁, 张国安, 顾铭. 贻贝粘蛋白治疗瘢痕瘙痒的临床研究 [J]. 中华损伤与修复杂志, 2013, 8(6):39–41.

[6]Sander Haemersa, Mieke C. van der Leedenb, et al. Coil dimensions of the mussel adhesive protein Mefp-1[J]. Biomaterials 2005, 26: 1231–1236.

[7]Haeshin Lee, Norbert F. Scherer, Phillip B. Messersmith. Single-molecule mechanics of mussel adhesion[J]. Pnas, 2006, 103 (35): 12999–13003.

[8]J. Herber Waitet, Marvin L. Tanzer. Polyphenolic substance of *Mytilus edulis* Novel adhesive containing L-DOPA and hydroxyproline[J]. Science, 1981, 212 (4498):1038–1040.

[9]J. Herber Waitet. Evidence for a repeating 3,4-dihydroxyphenylalanine-containing and hydroxyproline-containing decapeptide in the adhesive protein of the mussel *Mytilus edulis*[J]. Journal of Biological Chemistry, 1983, 258 (5):2911–2915.

Research on the Metabolic Characteristics of Marine Organism Raw Material - Mussel Adhesive Protein

Gao Min, Gu Ming*

(Jiangyin USUN Biochemical Technology Co. Ltd., Jiangyin, Jiangsu, 214400)

Abstract : The mussel adhesive protein has extensive application in medical device products, cosmetics and other daily consumer products due to its anti-inflammatory, promoting healing and long-lasting antioxidant functions. While the function of mussel adhesive protein is exerted, its metabolic characteristics are directly related to the safety of the raw materials. Using the radioactive isotope labeling technology, the pharmacokinetic behavior of total radioactivity in plasma was detected after single rectal administration of 1.5mg/100μCi/kg of [³H] mussel adhesive protein to male and female Sprague-Dawley (SD) rats. The retention of [³H] mussel adhesive protein in the rectal mucosa was also investigated. The results showed that after 168 hours rectal administration of radioactive-labeled mussel adhesive protein to rats, there was still radioactivity in the rectal, and the amount of mussel adhesive protein in plasma was much lower than that in the rectal. This result shows that the mussel adhesive protein can have a long-lasting effect locally and demonstrates high safety.

Keywords : mussel adhesive protein; radio labeling; safety

