



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117243885 A

(43) 申请公布日 2023. 12. 19

(21) 申请号 202311516539.8

A61K 8/06 (2006.01)

(22) 申请日 2023.11.15

A61K 8/73 (2006.01)

(71) 申请人 北京青藤谷禧干细胞科技研究院有限公司

A61Q 19/00 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

地址 100093 北京市海淀区瀚河园26号楼3层02

(72) 发明人 王壮 雷起凤 尹娜 梁玉倩

(74) 专利代理机构 北京一诺通成知识产权代理事务所(普通合伙) 16145

专利代理师 龚春娟

(51) Int. Cl.

A61K 8/99 (2017.01)

A61K 8/9728 (2017.01)

A61K 8/58 (2006.01)

A61K 8/64 (2006.01)

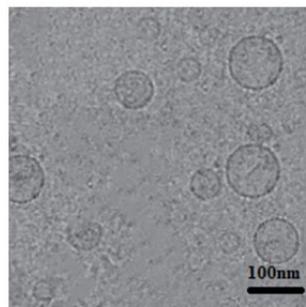
权利要求书3页 说明书17页 附图1页

(54) 发明名称

一种改善皮肤的干细胞外泌体组合物及其制备方法

(57) 摘要

本发明提出了一种改善皮肤的干细胞外泌体组合物及其制备方法,属于化妆品技术领域。将猪脂肪间充质干细胞体外培养传代,离心获得脂肪干细胞外泌体,剩余的培养液留用,将燕麦、葛仙米、枸杞和蜗牛原液混合酶解提取醇沉,得到活性多糖,其余物与剩余的培养液混合发酵,螯合Zn和Cu,发酵菌经过溶菌酶酶解,得到二裂酵母胞溶物,与脂肪干细胞外泌体、螯合Zn/Cu的发酵产物、乙酰基二肽-1鲸蜡酯、棕榈酰三肽-5、谷胱甘肽混合加入含有活性多糖的温敏水凝胶中,制得改善皮肤的干细胞外泌体组合物,具有很好的抗氧化、抗炎、抗皮肤光老化,改善皮肤粗糙度,降低黑色素含量,提高皮肤亮度、光泽、弹性和抗皱等多种功效,具有广阔的应用前景。



1. 一种改善皮肤的干细胞外泌体组合物的制备方法,其特征在于,将猪脂肪间充质干细胞体外培养传代,离心获得脂肪干细胞外泌体,剩余的培养液留用,将燕麦、葛仙米、枸杞和蜗牛原液混合酶解提取醇沉,得到活性多糖,其余物与剩余的培养液混合,接种长双歧杆菌和短双歧杆菌发酵,得到的发酵产物螯合Zn和Cu离子,发酵菌经过溶菌酶酶解,得到二裂酵母胞溶物,与脂肪干细胞外泌体、螯合Zn/Cu的发酵产物、乙酰基二肽-1鲸蜡酯、棕榈酰三肽-5、谷胱甘肽混合加入含有活性多糖的温敏水凝胶中,搅拌混合均匀,制得改善皮肤的干细胞外泌体组合物。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1. 脂肪干细胞外泌体的提取:将猪脂肪间充质干细胞用 α -MEM完全培养液重悬细胞,进行体外培养,待细胞密度70-80%时,用PBS溶液冲洗细胞,剩余的培养液留用,接种到无血清培养基中培养36-60h后,收集细胞,剩余的培养液留用,与之前的培养液合并,制得脂肪干细胞无细胞培养液;然后用PBS溶液冲洗细胞,加入胰蛋白酶消化,在2-4 $^{\circ}$ C,将培养基依次在270-320 \times g离心10-15min,1800-2200 \times g离心5-10min,8000-12000 \times g离心25-35min,去除细胞和细胞碎片;继续在98000-102000 \times g离心60-80min,将底部的沉淀物重悬并用PBS溶液冲洗,最后在98000-102000 \times g离心60-80min去除外泌体中污染的蛋白质,最终获得脂肪干细胞外泌体;

S2. 活性多糖的制备:将燕麦、葛仙米、枸杞分别洗净,干燥,粉碎,加入蜗牛原液,搅拌混合均匀,加入水中,加入复合酶加热酶解提取,过滤,滤渣留用;滤液中加入乙醇沉淀,过滤,得到活性多糖,滤液冷冻干燥,与滤渣混合均匀,制得提取混合物;

S3. 发酵菌的活化:将长双歧杆菌和短双歧杆菌分别接种至高氏培养基中,活化培养,得到长双歧杆菌和短双歧杆菌菌种种子液;

S4. 培养基的制备:将步骤S1中的脂肪干细胞无细胞培养液、步骤S2中的提取混合物和水混合均匀,灭菌,得到培养基;

S5. 发酵:将步骤S3制得的长双歧杆菌和短双歧杆菌菌种种子液接种至步骤S4制得的培养基中,缺氧条件下进行发酵培养,过滤,固体用无菌水洗涤,收集发酵菌,浓缩得到的发酵菌液;滤液冷冻干燥,得到发酵产物;

S6. 金属离子螯合物:将步骤S5制得的发酵产物加入水中,加入可溶性铜盐和可溶性锌盐,搅拌混合均匀,透析,透析液冷冻干燥,制得螯合Zn/Cu的发酵产物;

S7. 二裂酵母胞溶物的制备:向步骤S5制得的发酵菌液加入溶菌酶酶解,灭酶,离心,收集上清液,冷冻干燥,制得二裂酵母胞溶物;

S8. 添加剂的制备:将乙酰基二肽-1鲸蜡酯、棕榈酰三肽-5、谷胱甘肽混合均匀,制得添加剂;

S9. 温敏水凝胶的制备:将步骤S2制得的活性多糖、透明质酸钠溶于水中,得到混合糖溶液;将羟丙基甲基纤维素溶于水中,加入混合糖溶液,搅拌混合均匀,加入甘油,搅拌混合均匀,制得温敏水凝胶;

S10. 改善皮肤的干细胞外泌体组合物的制备:将步骤S1制得的脂肪干细胞外泌体、步骤S6制得的螯合Zn/Cu的发酵产物、步骤S7制得的二裂酵母胞溶物、步骤S8制得的添加剂混合均匀,加入步骤S9制得的温敏水凝胶中,搅拌混合均匀,制得改善皮肤的干细胞外泌体组合物。

3. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,步骤S1中所述加入胰蛋白酶消化的方法为加入0.2-0.3wt%的胰蛋白酶于36-38℃消化3-5min;步骤S2中所述燕麦、葛仙米、枸杞、蜗牛原液的质量比为5-7:10-15:3-5:7-10,所述复合酶为纤维素酶和果胶酶的混合物,质量比为5-7:1-2,所述加热酶解提取的温度为45-50℃,时间为2-4h,所述加入乙醇至体系乙醇的浓度为70-80wt%,沉淀时间为3-5h。

4. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,步骤S3中所述活化培养的条件为36-38℃,70-100r/min,活化的时间为24-36h,所述菌种种子液的含菌量为 10^8 - 10^9 cfu/mL;步骤S4中所述脂肪干细胞无细胞培养液、提取混合物和水的质量比为20-25:7-10:100。

5. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,步骤S5中所述长双歧杆菌和短双歧杆菌菌种种子液的接种量分别为2-4v/v%和1-3v/v%,所述发酵培养的条件为36-38℃,70-100r/min,发酵培养的时间为48-72h,所述发酵菌液的含菌量为 10^{10} - 10^{11} cfu/mL;步骤S6中所述发酵产物、可溶性铜盐和可溶性锌盐的质量比为15-20:0.7-1.2:0.5-1,所述可溶性铜盐选自氯化铜、硫酸铜、硝酸铜中的至少一种,所述可溶性锌盐选自氯化锌、硫酸锌、硝酸锌中的至少一种,所述透析用的透析袋的孔径为1-1.5kDa,透析的时间为3-5h。

6. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,步骤S7中所述发酵菌液、溶菌酶的质量比为1000:3-5,所述酶解的温度为40-45℃,时间为2-4h,所述离心的条件为5000-7000r/min离心10-15min;步骤S8中所述乙酰基二肽-1鲸蜡酯、棕榈酰三肽-5、谷胱甘肽的质量比为3-5:1-3:2-4。

7. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,步骤S9中所述活性多糖、透明质酸钠、羟丙基甲基纤维素、甘油的质量比为5-7:7-10:6-8:2-4;步骤S10中所述脂肪干细胞外泌体、螯合Zn/Cu的发酵产物、二裂酵母胞溶物、添加剂、温敏水凝胶的质量比为1-3:3-5:2-4:0.5-1:15-20。

8. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,具体包括以下步骤:

S1. 脂肪干细胞外泌体的提取:将猪脂肪间充质干细胞用 α -MEM完全培养液重悬细胞,进行体外培养,待细胞密度70-80%时,用PBS溶液冲洗细胞,剩余的培养液留用,接种到无血清培养基中培养36-60h后,收集细胞,剩余的培养液留用,与之前的培养液合并,制得脂肪干细胞无细胞培养液;然后用PBS溶液冲洗细胞,加入0.2-0.3wt%的胰蛋白酶溶液中,溶液中细胞密度为 10^8 - 10^9 个/mL,于36-38℃消化3-5min,在2-4℃,将培养基依次在 270 - $320 \times g$ 离心10-15min, 1800 - $2200 \times g$ 离心5-10min, 8000 - $12000 \times g$ 离心25-35min,去除细胞和细胞碎片;继续在 98000 - $102000 \times g$ 离心60-80min,将底部的沉淀物重悬并用PBS溶液冲洗,最后在 98000 - $102000 \times g$ 离心60-80min去除外泌体中污染的蛋白质,最终获得脂肪干细胞外泌体;

S2. 活性多糖的制备:将5-7重量份燕麦、10-15重量份葛仙米、3-5重量份枸杞分别洗净,干燥,粉碎,加入7-10重量份蜗牛原液,搅拌混合均匀,加入200重量份水中,加入0.5-1重量份复合酶,加热至45-50℃,酶解提取2-4h,过滤,滤渣留用;滤液中加入乙醇至体系乙醇的浓度为70-80wt%,沉淀3-5h,过滤,得到活性多糖,滤液冷冻干燥,与滤渣混合均匀,制得提取混合物;

所述复合酶为纤维素酶和果胶酶的混合物,质量比为5-7:1-2;

S3. 发酵菌的活化:将长双歧杆菌和短双歧杆菌分别接种至高氏培养基中,36-38℃,

70-100r/min,活化培养24-36h,得到长双歧杆菌和短双歧杆菌菌种种子液,含菌量为 10^8 - 10^9 cfu/mL;

S4.培养基的制备:将20-25重量份步骤S1中的脂肪干细胞无细胞培养液、7-10重量份步骤S2中的提取混合物和100重量份去离子水混合均匀,灭菌,得到培养基;

S5.发酵:将步骤S3制得的长双歧杆菌和短双歧杆菌菌种种子液接种至步骤S4制得的培养基中,所述长双歧杆菌和短双歧杆菌菌种种子液的接种量分别为2-4v/v%和1-3v/v%,缺氧条件下,36-38℃,70-100r/min,发酵培养的时间为48-72h,过滤,固体用无菌水洗涤,收集发酵菌,浓缩得到的发酵菌液,含菌量为 10^{10} - 10^{11} cfu/mL;滤液冷冻干燥,得到发酵产物;

S6.金属离子螯合物:将15-20重量份步骤S5制得的发酵产物加入200重量份水中,加入0.7-1重量份可溶性铜盐和0.5-1重量份可溶性锌盐,搅拌混合均匀,用孔径为1-1.5kDa的透析袋透析3-5h,透析液冷冻干燥,制得螯合Zn/Cu的发酵产物;

S7.二裂酵母胞溶物的制备:向1000重量份步骤S5制得的发酵菌液加入3-5重量份溶菌酶,40-45℃酶解2-4h,灭酶,5000-7000r/min离心10-15min,收集上清液,冷冻干燥,制得二裂酵母胞溶物;

S8.添加剂的制备:将3-5重量份乙酰基二肽-1鲸蜡酯、1-3重量份棕榈酰三肽-5、2-4重量份谷胱甘肽混合均匀,制得添加剂;

S9.温敏水凝胶的制备:将5-7重量份步骤S2制得的活性多糖、7-10重量份透明质酸钠溶于200重量份水中,得到混合糖溶液;将6-8重量份羟丙基甲基纤维素溶于100重量份水中,加入混合糖溶液,搅拌混合均匀,加入2-4重量份甘油,搅拌混合均匀,制得温敏水凝胶;

S10.改善皮肤的干细胞外泌体组合物的制备:将1-3重量份步骤S1制得的脂肪干细胞外泌体、3-5重量份步骤S6制得的螯合Zn/Cu的发酵产物、2-4重量份步骤S7制得的二裂酵母胞溶物、0.5-1重量份步骤S8制得的添加剂混合均匀,加入15-20重量份步骤S9制得的温敏水凝胶中,搅拌混合均匀,制得改善皮肤的干细胞外泌体组合物。

9.一种如权利要求1-8任一项所述的制备方法制得的改善皮肤的干细胞外泌体组合物。

10.一种如权利要求9所述改善皮肤的干细胞外泌体组合物在制备皮肤抗衰老、促进皮肤弹性恢复、美白、祛皱、保湿的产品中的应用。

一种改善皮肤的干细胞外泌体组合物及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及化妆品技术领域,具体涉及一种改善皮肤的干细胞外泌体组合物及其制备方法。

背景技术

[0002] 皮肤老化是目前皮肤保健和护肤化妆品研究中的重要课题,皮肤老化不仅会严重影响美观,还可能出现干燥、粗糙、毛细血管扩张、弹性降低、不规则色素沉着、脂溢性角化等具体症状。按照作用机理,皮肤老化主要分为内源性老化和外源性老化两大类,内源性老化是受基因、激素等影响的生理性过程,外源性老化主要指皮肤受外源性理化刺激所导致的老化,紫外线是导致皮肤老化的重要因素。

[0003] 紫外线根据波长大小可分为3个波段,即长波紫外线UVA(320-400nm)、中波紫外线UVB(275-320nm)、短波紫外线UVC(230-275nm),由于大气层的阻挡作用,UVC几乎全被臭氧层吸收,入射到地球表面的紫外线主要为UVA和UVB,而据研究表明相同剂量的UVB辐射对皮肤的损伤比UVA大800-1000倍,可见对皮肤造成损伤的主要是UVB。当皮肤接受过多的紫外线照射后,皮肤组织细胞会产生氧化应激,产生过量的活性氧簇(ROS),ROS能够破坏细胞膜的完整性和细胞内的抗氧化系统,进而引起细胞炎症、细胞凋亡及肿瘤的形成,同时过量的紫外线照射会使皮肤胶原、透明质酸、弹性蛋白降解,导致皮肤弹性变低、粗糙、形成皱纹,而且如果长时间照射紫外线,还可能引起黑色素的过度沉降,严重者可诱导皮肤癌变。

[0004] 抗氧化应激是保护皮肤免受紫外线损伤的重要途径,对此研究人员提供了多种抗氧化手段,用于保护皮肤和促进损伤后修复,如我国研究人员现有提出使用红树莓(覆盆子)提取物、芦荟提取物、人参皂苷、甲基心莲碱等天然植物成分对抗紫外线引起的氧化应激,还有研究人员提出使用活性肽防护皮肤紫外损伤,如中国发明专利CN112574282B、CN108703287B、CN107955062B、CN109415422B等均提供了使用活性肽防护紫外损伤的技术方案,但是上述活性肽的紫外防护效果仍有待强化,尤其是如何提高对抗氧化应激效能,促进损伤后修复过程,改善皮肤胶原分泌,使皮肤迅速恢复弹性、光泽。

[0005] 外泌体(exosomes)是一种由细胞分泌的直径为40-150nm、密度范围为1.09-1.18g/ml的具有双层磷脂膜结构的囊泡样物质。目前已经从各物种、各类型的细胞培养上清中提取出了外泌体,如神经元细胞、间充质干细胞、成纤维细胞、内皮细胞、巨核细胞等。外泌体也被发现存在于人体的各类体液中,如血液、唾液、尿液、乳汁等。外泌体携带的miRNA能够部分调节htNSC的抗老化效应,并在htNSC进入脑脊髓液后发挥相应作用。

[0006] 中国发明专利CN111821251B,要求保护一种化妆品用组合物和化妆品,其主要成分为CD200修饰的间充质干细胞外泌体,用于皮肤表面后,能够增加皮肤细胞活力,促进皮肤细胞新陈代谢,促进皮肤修复,延缓皮肤衰老;中国专利CN110540956B,要求保护一种由胎盘间充质干细胞简易制备细胞因子的方法,优化了源自胎盘间充质干细胞的细胞因子制备方法,能够大规模制备细胞因子,促进皮肤损伤后修复和皮肤保健。然而干细胞产品成分复杂,制备工艺需要进行严格管控,单独使用干细胞或其衍生品的护肤效果稳定性欠佳,使

得其在护肤化妆品的应用受到一定的限制。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于提出一种改善皮肤的干细胞外泌体组合物及其制备方法,具有生物相容性、低毒性、低免疫原性,以及很好的透过皮肤组织的屏障被真皮层细胞吸收的效果,可促进角质形成细胞,促进成纤维细胞的迁移、增殖和分泌胶原,具有很好的抗氧化、抗炎、抗皮肤光老化,改善皮肤粗糙度,降低黑色素含量,提高皮肤亮度、光泽、弹性和抗皱等多种功效,具有广阔的应用前景。

[0008] 本发明的技术方案是这样实现的:

本发明提供一种改善皮肤的干细胞外泌体组合物的制备方法,将猪脂肪间充质干细胞体外培养传代,离心获得脂肪干细胞外泌体,剩余的培养液留用,将燕麦、葛仙米、枸杞和蜗牛原液混合酶解提取醇沉,得到活性多糖,其余物与剩余的培养液混合,接种长双歧杆菌和短双歧杆菌发酵,得到的发酵产物螯合Zn和Cu离子,发酵菌经过溶菌酶酶解,得到二裂酵母胞溶物,与脂肪干细胞外泌体、螯合Zn/Cu的发酵产物、乙酰基二肽-1鲸蜡酯、棕榈酰三肽-5、谷胱甘肽混合加入含有活性多糖的温敏水凝胶中,搅拌混合均匀,制得改善皮肤的干细胞外泌体组合物。

[0009] 作为本发明的进一步改进,包括以下步骤:

S1. 脂肪干细胞外泌体的提取:将猪脂肪间充质干细胞用 α -MEM完全培养液重悬细胞,进行体外培养,待细胞密度70-80%时,用PBS溶液冲洗细胞,剩余的培养液留用,接种到无血清培养基中培养36-60h后,收集细胞,剩余的培养液留用,与之前的培养液合并,制得脂肪干细胞无细胞培养液;然后用PBS溶液冲洗细胞,加入胰蛋白酶消化,在2-4 $^{\circ}$ C,将培养基依次在270-320 \times g离心10-15min,1800-2200 \times g离心5-10min,8000-12000 \times g离心25-35min,去除细胞和细胞碎片;继续在98000-102000 \times g离心60-80min,将底部的沉淀物重悬并用PBS溶液冲洗,最后在98000-102000 \times g离心60-80min去除外泌体中污染的蛋白质,最终获得脂肪干细胞外泌体;

S2. 活性多糖的制备:将燕麦、葛仙米、枸杞分别洗净,干燥,粉碎,加入蜗牛原液,搅拌混合均匀,加入水中,加入复合酶加热酶解提取,过滤,滤渣留用;滤液中加入乙醇沉淀,过滤,得到活性多糖,滤液冷冻干燥,与滤渣混合均匀,制得提取混合物;

S3. 发酵菌的活化:将长双歧杆菌和短双歧杆菌分别接种至高氏培养基中,活化培养,得到长双歧杆菌和短双歧杆菌菌种种子液;

S4. 培养基的制备:将步骤S1中的脂肪干细胞无细胞培养液、步骤S2中的提取混合物和水混合均匀,灭菌,得到培养基;

S5. 发酵:将步骤S3制得的长双歧杆菌和短双歧杆菌菌种种子液接种至步骤S4制得的培养基中,缺氧条件下进行发酵培养,过滤,固体用无菌水洗涤,收集发酵菌,浓缩得到的发酵菌液;滤液冷冻干燥,得到发酵产物;

S6. 金属离子螯合物:将步骤S5制得的发酵产物加入水中,加入可溶性铜盐和可溶性锌盐,搅拌混合均匀,透析,透析液冷冻干燥,制得螯合Zn/Cu的发酵产物;

S7. 二裂酵母胞溶物的制备:向步骤S5制得的发酵菌液加入溶菌酶酶解,灭酶,离心,收集上清液,冷冻干燥,制得二裂酵母胞溶物;

S8. 添加剂的制备:将乙酰基二肽-1鲸蜡酯、棕榈酰三肽-5、谷胱甘肽混合均匀,制得添加剂;

S9. 温敏水凝胶的制备:将步骤S2制得的活性多糖、透明质酸钠溶于水中,得到混合糖溶液;将羟丙基甲基纤维素溶于水中,加入混合糖溶液,搅拌混合均匀,加入甘油,搅拌混合均匀,制得温敏水凝胶;

S10. 改善皮肤的干细胞外泌体组合物的制备:将步骤S1制得的脂肪干细胞外泌体、步骤S6制得的螯合Zn/Cu的发酵产物、步骤S7制得的二裂酵母胞溶物、步骤S8制得的添加剂混合均匀,加入步骤S9制得的温敏水凝胶中,搅拌混合均匀,制得改善皮肤的干细胞外泌体组合物。

[0010] 作为本发明的进一步改进,步骤S1中所述加入胰蛋白酶消化的方法为加入0.2-0.3wt%的胰蛋白酶于36-38℃消化3-5min;步骤S2中所述燕麦、葛仙米、枸杞、蜗牛原液的质量比为5-7:10-15:3-5:7-10,所述复合酶为纤维素酶和果胶酶的混合物,质量比为5-7:1-2,所述加热酶解提取的温度为45-50℃,时间为2-4h,所述加入乙醇至体系乙醇的浓度为70-80wt%,沉淀时间为3-5h。

[0011] 作为本发明的进一步改进,步骤S3中所述活化培养的条件为36-38℃,70-100r/min,活化的时间为24-36h,所述菌种种子液的含菌量为 10^8 - 10^9 cfu/mL;步骤S4中所述脂肪干细胞无细胞培养液、提取混合物和水的质量比为20-25:7-10:100。

[0012] 作为本发明的进一步改进,步骤S5中所述长双歧杆菌和短双歧杆菌菌种种子液的接种量分别为2-4v/v%和1-3v/v%,所述发酵培养的条件为36-38℃,70-100r/min,发酵培养的时间为48-72h,所述发酵菌液的含菌量为 10^{10} - 10^{11} cfu/mL;步骤S6中所述发酵产物、可溶性铜盐和可溶性锌盐的质量比为15-20:0.7-1.2:0.5-1,所述可溶性铜盐选自氯化铜、硫酸铜、硝酸铜中的至少一种,所述可溶性锌盐选自氯化锌、硫酸锌、硝酸锌中的至少一种,所述透析用的透析袋的孔径为1-1.5kDa,透析的时间为3-5h。

[0013] 作为本发明的进一步改进,步骤S7中所述发酵菌液、溶菌酶的质量比为1000:3-5,所述酶解的温度为40-45℃,时间为2-4h,所述离心的条件为5000-7000r/min离心10-15min;步骤S8中所述乙酰基二肽-1鲸蜡酯、棕榈酰三肽-5、谷胱甘肽的质量比为3-5:1-3:2-4。

[0014] 作为本发明的进一步改进,步骤S9中所述活性多糖、透明质酸钠、羟丙基甲基纤维素、甘油的质量比为5-7:7-10:6-8:2-4;步骤S10中所述脂肪干细胞外泌体、螯合Zn/Cu的发酵产物、二裂酵母胞溶物、添加剂、温敏水凝胶的质量比为1-3:3-5:2-4:0.5-1:15-20。

[0015] 作为本发明的进一步改进,具体包括以下步骤:

S1. 脂肪干细胞外泌体的提取:将猪脂肪间充质干细胞用 α -MEM完全培养液重悬细胞,进行体外培养,待细胞密度70-80%时,用PBS溶液冲洗细胞,剩余的培养液留用,接种到无血清培养基中培养36-60h后,收集细胞,剩余的培养液留用,与之前的培养液合并,制得脂肪干细胞无细胞培养液;然后用PBS溶液冲洗细胞,加入0.2-0.3wt%的胰蛋白酶溶液中,溶液中细胞密度为 10^8 - 10^9 个/mL,于36-38℃消化3-5min,在2-4℃,将培养基依次在270-320×g离心10-15min,1800-2200×g离心5-10min,8000-12000×g离心25-35min,去除细胞和细胞碎片;继续在98000-102000×g离心60-80min,将底部的沉淀物重悬并用PBS溶液冲洗,最后在98000-102000×g离心60-80min去除外泌体中污染的蛋白质,最终获得脂肪干细胞

外泌体；

S2. 活性多糖的制备：将5-7重量份燕麦、10-15重量份葛仙米、3-5重量份枸杞分别洗净，干燥，粉碎，加入7-10重量份蜗牛原液，搅拌混合均匀，加入200重量份水中，加入0.5-1重量份复合酶，加热至45-50℃，酶解提取2-4h，过滤，滤渣留用；滤液中加入乙醇至体系乙醇的浓度为70-80wt%，沉淀3-5h，过滤，得到活性多糖，滤液冷冻干燥，与滤渣混合均匀，制得提取混合物；

所述复合酶为纤维素酶和果胶酶的混合物，质量比为5-7:1-2；

S3. 发酵菌的活化：将长双歧杆菌和短双歧杆菌分别接种至高氏培养基中，36-38℃，70-100r/min，活化培养24-36h，得到长双歧杆菌和短双歧杆菌菌种种子液，含菌量为 10^8-10^9 cfu/mL；

S4. 培养基的制备：将20-25重量份步骤S1中的脂肪干细胞无细胞培养液、7-10重量份步骤S2中的提取混合物和100重量份去离子水混合均匀，灭菌，得到培养基；

S5. 发酵：将步骤S3制得的长双歧杆菌和短双歧杆菌菌种种子液接种至步骤S4制得的培养基中，所述长双歧杆菌和短双歧杆菌菌种种子液的接种量分别为2-4v/v%和1-3v/v%，缺氧条件下，36-38℃，70-100r/min，发酵培养的时间为48-72h，过滤，固体用无菌水洗涤，收集发酵菌，浓缩得到的发酵菌液，含菌量为 $10^{10}-10^{11}$ cfu/mL；滤液冷冻干燥，得到发酵产物；

S6. 金属离子螯合物：将15-20重量份步骤S5制得的发酵产物加入200重量份水中，加入0.7-1重量份可溶性铜盐和0.5-1重量份可溶性锌盐，搅拌混合均匀，用孔径为1-1.5kDa的透析袋透析3-5h，透析液冷冻干燥，制得螯合Zn/Cu的发酵产物；

S7. 二裂酵母胞溶物的制备：向1000重量份步骤S5制得的发酵菌液加入3-5重量份溶菌酶，40-45℃酶解2-4h，灭酶，5000-7000r/min离心10-15min，收集上清液，冷冻干燥，制得二裂酵母胞溶物；

S8. 添加剂的制备：将3-5重量份乙酰基二肽-1鲸蜡酯、1-3重量份棕榈酰三肽-5、2-4重量份谷胱甘肽混合均匀，制得添加剂；

S9. 温敏水凝胶的制备：将5-7重量份步骤S2制得的活性多糖、7-10重量份透明质酸钠溶于200重量份水中，得到混合糖溶液；将6-8重量份羟丙基甲基纤维素溶于100重量份水中，加入混合糖溶液，搅拌混合均匀，加入2-4重量份甘油，搅拌混合均匀，制得温敏水凝胶；

S10. 改善皮肤的干细胞外泌体组合物的制备：将1-3重量份步骤S1制得的脂肪干细胞外泌体、3-5重量份步骤S6制得的螯合Zn/Cu的发酵产物、2-4重量份步骤S7制得的二裂酵母胞溶物、0.5-1重量份步骤S8制得的添加剂混合均匀，加入15-20重量份步骤S9制得的温敏水凝胶中，搅拌混合均匀，制得改善皮肤的干细胞外泌体组合物。

[0016] 本发明进一步保护一种上述的制备方法制得的改善皮肤的干细胞外泌体组合物。

[0017] 本发明进一步保护一种上述改善皮肤的干细胞外泌体组合物在制备皮肤抗衰老、促进皮肤弹性恢复、美白、祛皱、保湿的产品中的应用。

[0018] 本发明具有如下有益效果：

脂肪间充质干细胞外泌体携带了丰富的蛋白质以及RNA、DNA和脂质分子，具有生物相容性、低毒性、低免疫原性，可透过机体组织的生理屏障，参与细胞间的物质交换和信

息沟通,可促进角质形成细胞和成纤维细胞的迁移、增殖和分泌胶原,可显著改善皮肤粗糙度,降低黑色素含量,提高皮肤亮度、光泽、弹性和抗皱等多种功效,在抗皮肤老化、创面修复、瘢痕修复有明显的作用。同时,本发明将猪脂肪间充质干细胞体外培养过程中的培养液进行收集,得到的脂肪干细胞无细胞培养液中含有丰富的脂肪干细胞分泌的细胞因子(包括血管内皮生长因子、肝细胞生长因子和碱性成纤维细胞生长因子等)、外囊泡、外泌体、DNA、RNA等活性物质,能够促进皮肤成纤维细胞的生长,提高其增殖及合成胶原的能力,从而减少皱纹、细纹、色素沉着,促进皮肤弹性的恢复,同时,能够对成纤维细胞增殖和迁移的促进作用,促进促进创面愈合以及皮肤瘢痕的消除。另一方面,脂肪干细胞无细胞培养液中还含有丰富的营养因子,能够促进发酵菌的快速增殖。

[0019] 本发明将燕麦、葛仙米、枸杞和蜗牛原液进行混合酶解,燕麦、葛仙米、枸杞中均含有丰富的多糖和蛋白质物质,蜗牛原液的主要成分为尿囊素、乙醇酸、胶原蛋白、葡萄糖醛酸、海藻糖等,经过酶解能够促进植物细胞壁破裂,促进细胞内的多糖、蛋白质等活性物质溶出,进一步通过加入乙醇沉淀,获得了含有燕麦多糖、葛仙米多糖、枸杞多糖、蜗牛原液多糖的活性多糖;同时,酶解产物和过滤物中含有丰富的营养物质,与脂肪干细胞无细胞培养液一同混合,能进一步促进发酵菌的快速增殖。接种双歧杆菌属的发酵菌进行发酵后,获得的发酵产物为二裂酵母发酵产物,其含有丰富的燕麦多肽、葛仙米多肽、来源于葛仙米藻的藻胆蛋白、枸杞多肽、蜗牛原液中的胶原蛋白肽等,具有很好的抗氧化、吸湿保湿、与金属离子螯合、抗炎、刺激细胞产生胶原蛋白、促进创面增生修复、抗刺激、镇痛麻醉、去腐生肌等功效。

[0020] 本发明将制得的发酵产物与Cu离子和Zn离子进行螯合,少量的Cu离子能够促进皮肤角质形成,有效促进皮肤细胞增殖,在胶原蛋白的合成过程中,对络氨酸酶有激活作用,以及具有抗炎、防晒、延缓衰老的作用,稳定并保护细胞膜,促进细胞生长,保持肌肤弹性。少量的Zn离子能够增强皮肤的抵抗力,减少外界细菌的侵入,起到达到预防皮肤感染的作用,同时,能够促进人体内胶原蛋白的合成,促进伤口的愈合,有利于皮肤的恢复,还可以参与皮肤的代谢,可以加速皮肤的修复,有利于皮肤的新陈代谢。两者的协同作用进一步提高了组合物对皮肤的抗氧化、抗炎、防晒、抗衰老、促进愈合和抗皱的作用,具有协同增效的效果。

[0021] 另外,本发明将获得的浓缩菌液经过溶菌酶酶解,获得了二裂酵母胞溶物,双歧杆菌在发酵过程中,自身产生了大量的活性物质,经过溶菌酶酶解,细胞内大量的活性物质得到释放,包括了多种氨基酸、蛋白质和各类分子介质,具有调节平衡肌肤、调节免疫机能的功效,具有很好的抗皱、紧致、修护、防晒、抗氧化、抗衰老作用,能够减少紫外线等外源刺激的损害,促进损伤DNA的修复。

[0022] 乙酰基二肽-1鲸蜡酯具有 α -MSH类似活性,可以通过调节NF- κ B干预炎症反应的发生,通过减少皮肤炎症和改善皮肤屏障发挥作用。棕榈酰三肽-5能够通过抑制酪氨酸酶活性,下调MITF和酪氨酸酶的mRNA水平,抑制黑色素的生成,显著使紫外线诱导的皮肤色素的沉淀减少。谷胱甘肽能够清除皮肤组织中过剩的自由基和一些过氧化物,显著防止细胞内线粒体的脂质过氧化,具有保护皮肤和抗细胞衰老作用,三者的添加具有协同增效的作用。

[0023] 温敏水凝胶是一种在室温下为溶液状态,而在一定的温度时能够形成凝胶,本发明温敏水凝胶的原料包括活性多糖、透明质酸钠、羟丙基甲基纤维素和甘油,其中,羟丙基

甲基纤维素是一种纤维素衍生的温敏性亲水聚合物,具有无毒、低成本、高溶胀性和表面活性,透明质酸钠是一种具有保湿和促进皮肤水分吸收的多糖化合物,同时,活性多糖中含有的多糖组分不仅能够参与形成温敏水凝胶,同时,能够很好的起到保湿、抗氧化、抗炎、抗皱等效果,同时,该活性多糖也能够起到很好的透皮吸收促进效果,通过几者的合理比例混合,形成的水凝胶在皮肤表皮温度下能够形成水凝胶,在室温时为水溶液状态,能够充分的负载物质包括二裂酵母胞溶物、脂肪干细胞外泌体、螯合Zn/Cu的发酵产物、乙酰基二肽-1鲸蜡酯、棕榈酰三肽-5、谷胱甘肽,涂覆在表皮时,在体表温度下可形成固态凝胶,增强对皮肤的黏着性,促进活性物质的释放和被皮肤吸收,从而发挥出很好的改善皮肤的效果。

[0024] 本发明制得的改善皮肤的干细胞外泌体组合物具有生物相容性、低毒性、低免疫原性,以及很好的透过皮肤组织的屏障被真皮层细胞吸收的效果,可促进角质形成细胞,促进成纤维细胞的迁移、增殖和分泌胶原,具有很好的抗氧化、抗炎、抗皮肤光老化,改善皮肤粗糙度,降低黑色素含量,提高皮肤亮度、光泽、弹性和抗皱等多种功效,具有广阔的应用前景。

附图说明

[0025] 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简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅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他的附图。

[0026] 图1为实施例1制得的脂肪干细胞外泌体的TEM图。

具体实施方式

[0027] 下面将对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅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做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。

[0028] 猪脂肪间充质干细胞,购于上海联祖生物科技有限公司;蜗牛原液,含量>90%,购于广州恒约生物科技有限公司;纤维素酶,1.1万U/g,果胶酶,2.5万U/g,胰蛋白酶,20万U/g;溶菌酶,200万U/g,购于夏盛(北京)生物科技开发有限公司;透明质酸钠,分子量为80-120万Da,纯度>99%,购于西安万方生物科技有限公司;长双歧杆菌,100亿cfu/g,短双歧杆菌,100亿cfu/g,购于中科嘉亿生物工程技术有限公司。

实施例1

[0029] 本实施例提供一种改善皮肤的干细胞外泌体组合物的制备方法,具体包括以下步骤:

S1. 脂肪干细胞外泌体的提取:将猪脂肪间充质干细胞用 α -MEM完全培养液重悬细胞,进行体外培养,待细胞密度为70%时,用PBS溶液冲洗细胞,剩余的培养液留用,接种到无血清培养基中,接种后细胞密度为 2×10^7 个/mL,培养36h后,收集细胞,剩余的培养液留用,与之前的培养液合并,制得脂肪干细胞无细胞培养液;然后用PBS溶液冲洗细胞,加入

0.2wt%的胰蛋白酶溶液中,溶液中细胞密度为 3×10^8 个/mL,于 36°C 消化3min,在 2°C ,将培养基依次在 $270 \times g$ 离心10min, $1800 \times g$ 离心5min, $8000 \times g$ 离心25min,去除细胞和细胞碎片;继续在 $98000 \times g$ 离心60min,将底部的沉淀物重悬并用PBS溶液冲洗,最后在 $98000 \times g$ 离心60min去除外泌体中污染的蛋白质,最终获得脂肪干细胞外泌体,图1为该脂肪干细胞外泌体的TEM图,由图可知,该外泌体主要为球形,结构完整,直径主要在30-110nm之间;

S2. 活性多糖的制备:将5重量份燕麦、10重量份葛仙米、3重量份枸杞分别洗净,干燥,粉碎,加入7重量份蜗牛原液,搅拌混合20min,加入200重量份水中,加入0.5重量份复合酶,加热至 45°C ,酶解提取2h,过滤,滤渣留用;滤液中加入乙醇至体系乙醇的浓度为70wt%,沉淀3h,过滤,得到活性多糖,滤液冷冻干燥,与滤渣搅拌混合10min,制得提取混合物;

所述复合酶为纤维素酶和果胶酶的混合物,质量比为5:1;

S3. 发酵菌的活化:将长双歧杆菌和短双歧杆菌分别接种至高氏培养基中,缺氧条件下, 36°C ,70r/min,活化培养24h,得到长双歧杆菌和短双歧杆菌菌种种子液,含菌量为 2×10^8 cfu/mL;

S4. 培养基的制备:将20重量份步骤S1中的脂肪干细胞无细胞培养液、7重量份步骤S2中的提取混合物和100重量份去离子水搅拌混合10min,灭菌,得到培养基;

S5. 发酵:将步骤S3制得的长双歧杆菌和短双歧杆菌菌种种子液接种至步骤S4制得的培养基中,所述长双歧杆菌和短双歧杆菌菌种种子液的接种量分别为 $2v/v\%$ 和 $1v/v\%$,缺氧条件下, 36°C ,70r/min,发酵培养的时间为48h,过滤,固体用无菌水洗涤,收集发酵菌,浓缩得到的发酵菌液,含菌量为 4×10^{10} cfu/mL;滤液冷冻干燥,得到发酵产物;

S6. 金属离子螯合物:将15重量份步骤S5制得的发酵产物加入200重量份水中,加入0.7重量份氯化铜和0.5重量份氯化锌,搅拌混合反应30min,用孔径为1kDa的透析袋透析3h,透析液冷冻干燥,制得螯合Zn/Cu的发酵产物;

S7. 二裂酵母胞溶物的制备:向1000重量份步骤S5制得的发酵菌液加入3重量份溶菌酶, 40°C 酶解2h,灭酶,5000r/min离心10min,收集上清液,冷冻干燥,制得二裂酵母胞溶物;

S8. 添加剂的制备:将3重量份乙酰基二肽-1鲸蜡酯、1重量份棕榈酰三肽-5、2重量份谷胱甘肽,搅拌混合15min,制得添加剂;

S9. 温敏水凝胶的制备:将5重量份步骤S2制得的活性多糖、7重量份透明质酸钠溶于200重量份水中,得到混合糖溶液;将6重量份羟丙基甲基纤维素溶于100重量份水中,加入混合糖溶液,搅拌混合15min,加入2重量份甘油,搅拌混合15min,制得温敏水凝胶;

S10. 改善皮肤的干细胞外泌体组合物的制备:将1重量份步骤S1制得的脂肪干细胞外泌体、3重量份步骤S6制得的螯合Zn/Cu的发酵产物、2重量份步骤S7制得的二裂酵母胞溶物、0.5重量份步骤S8制得的添加剂,搅拌混合15min,加入15重量份步骤S9制得的温敏水凝胶中,搅拌混合20min,制得改善皮肤的干细胞外泌体组合物。

实施例2

[0030] 本实施例提供一种改善皮肤的干细胞外泌体组合物的制备方法,具体包括以下步骤:

S1. 脂肪干细胞外泌体的提取:将猪脂肪间充质干细胞用 α -MEM完全培养液重悬细

胞,进行体外培养,待细胞密度为80%时,用PBS溶液冲洗细胞,剩余的培养液留用,接种到无血清培养基中,接种后细胞密度为 4×10^7 个/mL,培养60h后,收集细胞,剩余的培养液留用,与之前的培养液合并,制得脂肪干细胞无细胞培养液;然后用PBS溶液冲洗细胞,加入0.3wt%的胰蛋白酶溶液中,溶液中细胞密度为 10^9 个/mL,于38℃消化5min,在4℃,将培养基依次在 $320 \times g$ 离心15min, $2200 \times g$ 离心10min, $12000 \times g$ 离心35min,去除细胞和细胞碎片;继续在 $102000 \times g$ 离心80min,将底部的沉淀物重悬并用PBS溶液冲洗,最后在 $102000 \times g$ 离心80min去除外泌体中污染的蛋白质,最终获得脂肪干细胞外泌体;

S2. 活性多糖的制备:将7重量份燕麦、15重量份葛仙米、5重量份枸杞分别洗净,干燥,粉碎,加入10重量份蜗牛原液,搅拌混合20min,加入200重量份水中,加入1重量份复合酶,加热至50℃,酶解提取4h,过滤,滤渣留用;滤液中加入乙醇至体系乙醇的浓度为80wt%,沉淀5h,过滤,得到活性多糖,滤液冷冻干燥,与滤渣搅拌混合10min,制得提取混合物;

所述复合酶为纤维素酶和果胶酶的混合物,质量比为7:2;

S3. 发酵菌的活化:将长双歧杆菌和短双歧杆菌分别接种至高氏培养基中,缺氧条件下,38℃,100r/min,活化培养36h,得到长双歧杆菌和短双歧杆菌菌种种子液,含菌量为 10^9 cfu/mL;

S4. 培养基的制备:将25重量份步骤S1中的脂肪干细胞无细胞培养液、10重量份步骤S2中的提取混合物和100重量份去离子水搅拌混合10min,灭菌,得到培养基;

S5. 发酵:将步骤S3制得的长双歧杆菌和短双歧杆菌菌种种子液接种至步骤S4制得的培养基中,所述长双歧杆菌和短双歧杆菌菌种种子液的接种量分别为4v/v%和3v/v%,缺氧条件下,38℃,100r/min,发酵培养的时间为72h,过滤,固体用无菌水洗涤,收集发酵菌,浓缩得到的发酵菌液,含菌量为 10^{11} cfu/mL;滤液冷冻干燥,得到发酵产物;

S6. 金属离子螯合物:将20重量份步骤S5制得的发酵产物加入200重量份水中,加入1重量份硫酸铜和1重量份硫酸锌,搅拌混合反应30min,用孔径为1.5kDa的透析袋透析5h,透析液冷冻干燥,制得螯合Zn/Cu的发酵产物;

S7. 二裂酵母胞溶物的制备:向1000重量份步骤S5制得的发酵菌液加入5重量份溶菌酶,45℃酶解4h,灭酶,7000r/min离心15min,收集上清液,冷冻干燥,制得二裂酵母胞溶物;

S8. 添加剂的制备:将5重量份乙酰基二肽-1鲸蜡酯、3重量份棕榈酰三肽-5、4重量份谷胱甘肽,搅拌混合15min,制得添加剂;

S9. 温敏水凝胶的制备:将7重量份步骤S2制得的活性多糖、10重量份透明质酸钠溶于200重量份水中,得到混合糖溶液;将8重量份羟丙基甲基纤维素溶于100重量份水中,加入混合糖溶液,搅拌混合15min,加入4重量份甘油,搅拌混合15min,制得温敏水凝胶;

S10. 改善皮肤的干细胞外泌体组合物的制备:将3重量份步骤S1制得的脂肪干细胞外泌体、5重量份步骤S6制得的螯合Zn/Cu的发酵产物、4重量份步骤S7制得的二裂酵母胞溶物、1重量份步骤S8制得的添加剂,搅拌混合15min,加入20重量份步骤S9制得的温敏水凝胶中,搅拌混合20min,制得改善皮肤的干细胞外泌体组合物。

实施例3

[0031] 本实施例提供一种改善皮肤的干细胞外泌体组合物的制备方法,具体包括以下步

骤:

S1. 脂肪干细胞外泌体的提取:将猪脂肪间充质干细胞用 α -MEM完全培养液重悬细胞,进行体外培养,待细胞密度为75%时,用PBS溶液冲洗细胞,剩余的培养液留用,接种到无血清培养基中,接种后细胞密度为 3×10^7 个/mL,培养48h后,收集细胞,剩余的培养液留用,与之前的培养液合并,制得脂肪干细胞无细胞培养液;然后用PBS溶液冲洗细胞,加入0.25wt%的胰蛋白酶溶液中,溶液中细胞密度为 7×10^8 个/mL,于37℃消化4min,在3℃,将培养基依次在 $300 \times g$ 离心12min, $2000 \times g$ 离心7min, $10000 \times g$ 离心30min,去除细胞和细胞碎片;继续在 $100000 \times g$ 离心70min,将底部的沉淀物重悬并用PBS溶液冲洗,最后在 $100000 \times g$ 离心70min去除外泌体中污染的蛋白质,最终获得脂肪干细胞外泌体;

S2. 活性多糖的制备:将6重量份燕麦、12重量份葛仙米、4重量份枸杞分别洗净,干燥,粉碎,加入8.5重量份蜗牛原液,搅拌混合20min,加入200重量份水中,加入0.7重量份复合酶,加热至47℃,酶解提取3h,过滤,滤渣留用;滤液中加入乙醇至体系乙醇的浓度为75wt%,沉淀4h,过滤,得到活性多糖,滤液冷冻干燥,与滤渣搅拌混合10min,制得提取混合物;

所述复合酶为纤维素酶和果胶酶的混合物,质量比为6:1.5;

S3. 发酵菌的活化:将长双歧杆菌和短双歧杆菌分别接种至高氏培养基中,缺氧条件下,37℃,85r/min,活化培养30h,得到长双歧杆菌和短双歧杆菌菌种种子液,含菌量为 5×10^8 cfu/mL;

S4. 培养基的制备:将22重量份步骤S1中的脂肪干细胞无细胞培养液、8.5重量份步骤S2中的提取混合物和100重量份去离子水搅拌混合10min,灭菌,得到培养基;

S5. 发酵:将步骤S3制得的长双歧杆菌和短双歧杆菌菌种种子液接种至步骤S4制得的培养基中,所述长双歧杆菌和短双歧杆菌菌种种子液的接种量分别为3v/v%和2v/v%,缺氧条件下,37℃,85r/min,发酵培养的时间为56h,过滤,固体用无菌水洗涤,收集发酵菌,浓缩得到的发酵菌液,含菌量为 6×10^{10} cfu/mL;滤液冷冻干燥,得到发酵产物;

S6. 金属离子螯合物:将17重量份步骤S5制得的发酵产物加入200重量份水中,加入0.85重量份硝酸铜和0.7重量份硝酸锌,搅拌混合反应30min,用孔径为1.2kDa的透析袋透析4h,透析液冷冻干燥,制得螯合Zn/Cu的发酵产物;

S7. 二裂酵母胞溶物的制备:向1000重量份步骤S5制得的发酵菌液加入4重量份溶菌酶,42℃酶解3h,灭酶,6000r/min离心12min,收集上清液,冷冻干燥,制得二裂酵母胞溶物;

S8. 添加剂的制备:将4重量份乙酰基二肽-1鲸蜡酯、2重量份棕榈酰三肽-5、3重量份谷胱甘肽,搅拌混合15min,制得添加剂;

S9. 温敏水凝胶的制备:将6重量份步骤S2制得的活性多糖、8.5重量份透明质酸钠溶于200重量份水中,得到混合糖溶液;将7重量份羟丙基甲基纤维素溶于100重量份水中,加入混合糖溶液,搅拌混合15min,加入3重量份甘油,搅拌混合15min,制得温敏水凝胶;

S10. 改善皮肤的干细胞外泌体组合物的制备:将2重量份步骤S1制得的脂肪干细胞外泌体、4重量份步骤S6制得的螯合Zn/Cu的发酵产物、3重量份步骤S7制得的二裂酵母胞溶物、0.7重量份步骤S8制得的添加剂,搅拌混合15min,加入17重量份步骤S9制得的温敏水凝胶中,搅拌混合20min,制得改善皮肤的干细胞外泌体组合物。

实施例4

[0032] 与实施例3相比,不同之处在于,复合酶为单一的纤维素酶。

实施例5

[0033] 与实施例3相比,不同之处在于,复合酶为单一的果胶酶。

[0034] 对比例1

与实施例3相比,不同之处在于,步骤S2中未添加复合酶。

[0035] 具体如下:

S2. 活性多糖的制备:将6重量份燕麦、12重量份葛仙米、4重量份枸杞分别洗净,干燥,粉碎,加入8.5重量份蜗牛原液,搅拌混合20min,加入200重量份水中,加热至47℃,提取3h,过滤,滤渣留用;滤液中加入乙醇至体系乙醇的浓度为75wt%,沉淀4h,过滤,得到活性多糖,滤液冷冻干燥,与滤渣搅拌混合10min,制得提取混合物。

[0036] 对比例2

与实施例3相比,不同之处在于,步骤S2中未添加蜗牛原液。

[0037] 具体如下:

S2. 活性多糖的制备:将6重量份燕麦、12重量份葛仙米、4重量份枸杞分别洗净,干燥,粉碎,搅拌混合20min,加入200重量份水中,加入0.7重量份复合酶,加热至47℃,酶解提取3h,过滤,滤渣留用;滤液中加入乙醇至体系乙醇的浓度为75wt%,沉淀4h,过滤,得到活性多糖,滤液冷冻干燥,与滤渣搅拌混合10min,制得提取混合物;

所述复合酶为纤维素酶和果胶酶的混合物,质量比为6:1.5。

[0038] 对比例3

与实施例3相比,不同之处在于,步骤S4中未添加脂肪干细胞无细胞培养液。

[0039] 具体如下:

S4. 培养基的制备:将30.5重量份步骤S2中的提取混合物和100重量份去离子水搅拌混合10min,灭菌,得到培养基。

[0040] 对比例4

与实施例3相比,不同之处在于,步骤S4中未添加提取混合物。

[0041] 具体如下:

S4. 培养基的制备:将30.5重量份步骤S1中的脂肪干细胞无细胞培养液和100重量份去离子水搅拌混合10min,灭菌,得到培养基。

[0042] 对比例5

与实施例3相比,不同之处在于,步骤S5中未接种长双歧杆菌菌种种子液。

[0043] 具体如下:

S5. 发酵:将步骤S3制得的短双歧杆菌菌种种子液接种至步骤S4制得的培养基中,所述短双歧杆菌菌种种子液的接种量为5v/v%,缺氧条件下,37℃,85r/min,发酵培养的时间为56h,过滤,固体用无菌水洗涤,收集发酵菌,浓缩得到的发酵菌液,含菌量为 6×10^{10} cfu/mL;滤液冷冻干燥,得到发酵产物。

[0044] 对比例6

与实施例3相比,不同之处在于,步骤S5中未接种短双歧杆菌菌种种子液。

[0045] 具体如下:

S5. 发酵:将步骤S3制得的短双歧杆菌菌种种子液接种至步骤S4制得的培养基中,所述短双歧杆菌菌种种子液的接种量为5v/v%,缺氧条件下,37℃,85r/min,发酵培养的时间为56h,过滤,固体用无菌水洗涤,收集发酵菌,浓缩得到的发酵菌液,含菌量为 6×10^{10} cfu/mL;滤液冷冻干燥,得到发酵产物。

[0046] 对比例7

与实施例3相比,不同之处在于,未进行步骤S3至S6。

[0047] 具体如下:

S1. 脂肪干细胞外泌体的提取:将猪脂肪间充质干细胞用 α -MEM完全培养液重悬细胞,进行体外培养,待细胞密度为75%时,用PBS溶液冲洗细胞,剩余的培养液留用,接种到无血清培养基中,接种后细胞密度为 3×10^7 个/mL,培养48h后,收集细胞,剩余的培养液留用,与之前的培养液合并,制得脂肪干细胞无细胞培养液;然后用PBS溶液冲洗细胞,加入0.25wt%的胰蛋白酶溶液中,溶液中细胞密度为 7×10^8 个/mL,于37℃消化4min,在3℃,将培养基依次在 $300 \times g$ 离心12min, $2000 \times g$ 离心7min, $10000 \times g$ 离心30min,去除细胞和细胞碎片;继续在 $100000 \times g$ 离心70min,将底部的沉淀物重悬并用PBS溶液冲洗,最后在 $100000 \times g$ 离心70min去除外泌体中污染的蛋白质,最终获得脂肪干细胞外泌体;

S2. 活性多糖的制备:将6重量份燕麦、12重量份葛仙米、4重量份枸杞分别洗净,干燥,粉碎,加入8.5重量份蜗牛原液,搅拌混合20min,加入200重量份水中,加入0.7重量份复合酶,加热至47℃,酶解提取3h,过滤,滤渣留用;滤液中加入乙醇至体系乙醇的浓度为75wt%,沉淀4h,过滤,得到活性多糖,滤液冷冻干燥,与滤渣搅拌混合10min,制得提取混合物;

所述复合酶为纤维素酶和果胶酶的混合物,质量比为6:1.5;

S3. 添加剂的制备:将4重量份乙酰基二肽-1鲸蜡酯、2重量份棕榈酰三肽-5、3重量份谷胱甘肽,搅拌混合15min,制得添加剂;

S4. 温敏水凝胶的制备:将6重量份步骤S2制得的活性多糖、8.5重量份透明质酸钠溶于200重量份水中,得到混合糖溶液;将7重量份羟丙基甲基纤维素溶于100重量份水中,加入混合糖溶液,搅拌混合15min,加入3重量份甘油,搅拌混合15min,制得温敏水凝胶;

S5改善皮肤的干细胞外泌体组合物的制备:将2重量份步骤S1制得的脂肪干细胞外泌体、0.7重量份步骤S4制得的添加剂,搅拌混合15min,加入17重量份步骤S4制得的温敏水凝胶中,搅拌混合20min,制得改善皮肤的干细胞外泌体组合物。

[0048] 对比例8

与实施例3相比,不同之处在于,步骤S6中未添加硝酸铜。

[0049] 具体如下:

S6. 金属离子螯合物:将17重量份步骤S5制得的发酵产物加入200重量份水中,加入1.55重量份硝酸铜,搅拌混合反应30min,用孔径为1.2kDa的透析袋透析4h,透析液冷冻干燥,制得螯合Zn的发酵产物。

[0050] 对比例9

与实施例3相比,不同之处在于,步骤S6中未添加硝酸锌。

[0051] 具体如下:

S6. 金属离子螯合物:将17重量份步骤S5制得的发酵产物加入200重量份水中,加入1.55重量份硝酸铜,搅拌混合反应30min,用孔径为1.2kDa的透析袋透析4h,透析液冷冻干燥,制得螯合Cu的发酵产物。

[0052] 对比例10

与实施例3相比,不同之处在于,未进行步骤S6。

[0053] 具体如下:

S1. 脂肪干细胞外泌体的提取:将猪脂肪间充质干细胞用 α -MEM完全培养液重悬细胞,进行体外培养,待细胞密度为75%时,用PBS溶液冲洗细胞,剩余的培养液留用,接种到无血清培养基中,接种后细胞密度为 3×10^7 个/mL,培养48h后,收集细胞,剩余的培养液留用,与之前的培养液合并,制得脂肪干细胞无细胞培养液;然后用PBS溶液冲洗细胞,加入0.25wt%的胰蛋白酶溶液中,溶液中细胞密度为 7×10^8 个/mL,于37℃消化4min,在3℃,将培养基依次在 $300 \times g$ 离心12min, $2000 \times g$ 离心7min, $10000 \times g$ 离心30min,去除细胞和细胞碎片;继续在 $100000 \times g$ 离心70min,将底部的沉淀物重悬并用PBS溶液冲洗,最后在 $100000 \times g$ 离心70min去除外泌体中污染的蛋白质,最终获得脂肪干细胞外泌体;

S2. 活性多糖的制备:将6重量份燕麦、12重量份葛仙米、4重量份枸杞分别洗净,干燥,粉碎,加入8.5重量份蜗牛原液,搅拌混合20min,加入200重量份水中,加入0.7重量份复合酶,加热至47℃,酶解提取3h,过滤,滤渣留用;滤液中加入乙醇至体系乙醇的浓度为75wt%,沉淀4h,过滤,得到活性多糖,滤液冷冻干燥,与滤渣搅拌混合10min,制得提取混合物;

所述复合酶为纤维素酶和果胶酶的混合物,质量比为6:1.5;

S3. 发酵菌的活化:将长双歧杆菌和短双歧杆菌分别接种至高氏培养基中,缺氧条件下,37℃,85r/min,活化培养30h,得到长双歧杆菌和短双歧杆菌菌种种子液,含菌量为 5×10^8 cfu/mL;

S4. 培养基的制备:将22重量份步骤S1中的脂肪干细胞无细胞培养液、8.5重量份步骤S2中的提取混合物和100重量份去离子水搅拌混合10min,灭菌,得到培养基;

S5. 发酵:将步骤S3制得的长双歧杆菌和短双歧杆菌菌种种子液接种至步骤S4制得的培养基中,所述长双歧杆菌和短双歧杆菌菌种种子液的接种量分别为3v/v%和2v/v%,缺氧条件下,37℃,85r/min,发酵培养的时间为56h,过滤,固体用无菌水洗涤,收集发酵菌,浓缩得到的发酵菌液,含菌量为 6×10^{10} cfu/mL;滤液冷冻干燥,得到发酵产物;

S6. 二裂酵母胞溶物的制备:向1000重量份步骤S5制得的发酵菌液加入4重量份溶菌酶,42℃酶解3h,灭酶,6000r/min离心12min,收集上清液,冷冻干燥,制得二裂酵母胞溶物;

S7. 添加剂的制备:将4重量份乙酰基二肽-1鲸蜡酯、2重量份棕榈酰三肽-5、3重量份谷胱甘肽,搅拌混合15min,制得添加剂;

S8. 温敏水凝胶的制备:将6重量份步骤S2制得的活性多糖、8.5重量份透明质酸钠溶于200重量份水中,得到混合糖溶液;将7重量份羟丙基甲基纤维素溶于100重量份水中,加入混合糖溶液,搅拌混合15min,加入3重量份甘油,搅拌混合15min,制得温敏水凝胶;

S9. 改善皮肤的干细胞外泌体组合物的制备:将2重量份步骤S1制得的脂肪干细胞外泌体、4重量份步骤S5制得的发酵产物、3重量份步骤S6制得的二裂酵母胞溶物、0.7重量

份步骤S7制得的添加剂,搅拌混合15min,加入17重量份步骤S8制得的温敏水凝胶中,搅拌混合20min,制得改善皮肤的干细胞外泌体组合物。

[0054] 对比例11

与实施例3相比,不同之处在于,步骤S9中未添加活性多糖。

[0055] 具体如下:

S9.温敏水凝胶的制备:将14.5重量份透明质酸钠溶于200重量份水中,得到混合糖溶液;将7重量份羟丙基甲基纤维素溶于100重量份水中,加入混合糖溶液,搅拌混合15min,加入3重量份甘油,搅拌混合15min,制得温敏水凝胶。

[0056] 对比例12

与实施例3相比,不同之处在于,步骤S10中未添加脂肪干细胞外泌体。

[0057] 具体如下:

S10.改善皮肤的干细胞外泌体组合物的制备:将4重量份步骤S6制得的螯合Zn/Cu的发酵产物、3重量份步骤S7制得的二裂酵母胞溶物、0.7重量份步骤S8制得的添加剂,搅拌混合15min,加入17重量份步骤S9制得的温敏水凝胶中,搅拌混合20min,制得改善皮肤的干细胞外泌体组合物。

[0058] 对比例13

与实施例3相比,不同之处在于,步骤S10中未添加螯合Zn/Cu的发酵产物。

[0059] 具体如下:

S10.改善皮肤的干细胞外泌体组合物的制备:将2重量份步骤S1制得的脂肪干细胞外泌体、3重量份步骤S7制得的二裂酵母胞溶物、0.7重量份步骤S8制得的添加剂,搅拌混合15min,加入17重量份步骤S9制得的温敏水凝胶中,搅拌混合20min,制得改善皮肤的干细胞外泌体组合物。

[0060] 对比例14

与实施例3相比,不同之处在于,步骤S10中未添加二裂酵母胞溶物。

[0061] 具体如下:

S10.改善皮肤的干细胞外泌体组合物的制备:将2重量份步骤S1制得的脂肪干细胞外泌体、4重量份步骤S6制得的螯合Zn/Cu的发酵产物、0.7重量份步骤S8制得的添加剂,搅拌混合15min,加入17重量份步骤S9制得的温敏水凝胶中,搅拌混合20min,制得改善皮肤的干细胞外泌体组合物。

[0062] 对比例15

与实施例3相比,不同之处在于,步骤S10中未添加添加剂。

[0063] 具体如下:

S10.改善皮肤的干细胞外泌体组合物的制备:将2重量份步骤S1制得的脂肪干细胞外泌体、4重量份步骤S6制得的螯合Zn/Cu的发酵产物、3重量份步骤S7制得的二裂酵母胞溶物,搅拌混合15min,加入17重量份步骤S9制得的温敏水凝胶中,搅拌混合20min,制得改善皮肤的干细胞外泌体组合物。

[0064] 测试例1

将本发明实施例1-3和对比例11中制得的温敏水凝胶进行测试。

[0065] 将制得的温敏水凝胶置于恒温水浴锅中,每隔10min取出试管,将其倒置以观察水

凝胶是否流动,如果流动则以0.5℃的速率继续升温,若不流动则将此温度定义为水凝胶的 T_{gel} 。确定 T_{gel} 后,在37℃下测量各组水凝胶的凝胶时间,凝胶时间记为各组样品不流动的时间点。结果见表1。

[0066] 表1

组别	T_{gel} (°C)	凝胶时间 (min)
实施例 1	36	7
实施例 2	35.5	5
实施例 3	36.5	10
对比例 11	42	/

[0067] 由上表可知,本发明实施例1-3制得的温敏水凝胶的凝胶温度在35.5-36.6℃之间,接近人体皮肤温度,在加热至37℃后,可以转变为不流动的水凝胶。对比例11中未添加活性多糖,凝胶化温度较高,不利于在皮肤表面形成凝胶,促进皮肤对活性组分的吸收。

[0068] 测试例2 促进皮肤愈合实验

将Ba1b/c小鼠随机分为对照组(PBS溶液)、实施例1-5组、对比例1-15组(将相应组制得的改善皮肤的干细胞外泌体组合物配制成10mg/mL的溶液),每组6只。将小鼠用1%戊巴比妥钠腹腔麻醉,背部脱毛、生理盐水冲洗,碘酒消毒,在脱毛的背部剪去直径约1cm的全层皮肤,制备创伤模型。将100 μ L溶于生理盐水中的大肠埃希菌(ATCC25922)(2×10^6 cfu/mL)接种于皮肤创口上。感染1d后,取对照组及各实验组溶液0.5mL均匀涂覆于背部创面,每3天涂覆1次,分别于创伤后的第7天观察并记录创面愈合面积,计算创面愈合率,并继续观察,记录完全愈合时间,结果见表2。

[0069] 创面愈合率=(初始创面面积-创面愈合后面积)/初始创面面积 \times 100%

表2

组别	创面愈合率 (%)	完全愈合时间 (d)
对照组	46.5	33.2 \pm 2.8
实施例 1	82.1	9.8 \pm 1.1*
实施例 2	82.5	9.5 \pm 1.1*
实施例 3	83.2	9.3 \pm 1.0*
实施例 4	78.9	11.4 \pm 0.9
实施例 5	77.6	11.8 \pm 1.1
对比例 1	75.1	13.2 \pm 1.2
对比例 2	73.4	16.9 \pm 1.7
对比例 3	68.9	22.4 \pm 2.0
对比例 4	70.2	20.7 \pm 1.4
对比例 5	75.6	13.1 \pm 1.5
对比例 6	76.1	12.5 \pm 1.7
对比例 7	58.2	27.9 \pm 2.1
对比例 8	77.1	12.2 \pm 1.7
对比例 9	76.8	13.4 \pm 1.3
对比例 10	74.2	15.4 \pm 2.4
对比例 11	71.6	19.4 \pm 2.7
对比例 12	65.9	24.8 \pm 1.8
对比例 13	70.7	20.1 \pm 1.9
对比例 14	78.5	11.7 \pm 1.2
对比例 15	75.1	13.9 \pm 1.6

[0070] 注释:*为与对照组相比, $P < 0.05$ 。

[0071] 由上表可知,本发明实施例1-3制得的改善皮肤的干细胞外泌体组合物具有较好

的促进皮肤伤口愈合的效果。

[0072] 测试例3 抗氧化测试

将人类永生化表皮细胞HaCaT细胞接种于96孔板中(1×10^4 /孔),培养至细胞融合度约80%-90%时。吸弃各孔内的培养基,各孔加入实施例1-5或对比例1-15药物(终浓度为0.05wt%制得的改善皮肤的干细胞外泌体组合物的培养基)、阳性组(终浓度为0.05%维生素C的培养基)或者对照组(未加入任何药物的培养基),培养箱孵育24h后吸弃培养基,加入100 μ L含DCFH-DA荧光探针的DMEM培养基,培养箱孵育25min后,用PBS缓冲液洗涤,再加入PBS缓冲液,置于UVA下辐照(剂量5.0J/cm²)。辐照结束后立即用荧光酶标仪检测荧光强度。以对照组为100%,计算各组ROS水平。结果见表3。

[0073] $ROD \text{水平} = \text{实验组荧光值} / \text{对照组荧光值} \times 100\%$

表3

组别	ROS 水平 (%)
阳性组	114.2 \pm 10.1
实施例 1	129.5 \pm 9.2
实施例 2	130.2 \pm 8.7
实施例 3	132.1 \pm 9.5
实施例 4	126.7 \pm 6.8
实施例 5	125.9 \pm 7.6
对比例 1	122.7 \pm 8.2
对比例 2	120.6 \pm 9.5
对比例 3	114.7 \pm 7.9
对比例 4	116.5 \pm 8.4
对比例 5	118.2 \pm 6.9
对比例 6	119.0 \pm 7.4
对比例 7	107.8 \pm 5.7
对比例 8	114.0 \pm 5.2
对比例 9	112.9 \pm 6.4
对比例 10	109.7 \pm 5.8
对比例 11	105.9 \pm 6.1
对比例 12	102.1 \pm 5.4
对比例 13	106.2 \pm 6.0
对比例 14	117.4 \pm 5.9
对比例 15	114.0 \pm 4.8

[0074] 注释:*为与对照组相比, $P < 0.05$ 。

[0075] 由上表可知,本发明实施例1-3制得的改善皮肤的干细胞外泌体组合物具有很好的抗氧化性能。

[0076] 测试例4 促进人皮肤成纤维细胞增殖

将人皮肤成纤维细胞体外培养24h后,加入实施例1-5或对比例1-15制得的改善皮肤的干细胞外泌体组合物,终浓度为10mg/L,空白组不添加组合物,继续培养48h后,加入CCK8试剂孵育2h,然后使用酶标仪检测波长为450nm的吸光度,以对照组为100%,计算相对细胞活力。结果见表4。

[0077] $\text{相对细胞活力}(\%) = \text{实验组OD值} / \text{空白组OD值} \times 100\%$

表4

组别	相对细胞活力 (%)
实施例 1	219.4
实施例 2	218.9
实施例 3	220.5
实施例 4	218.1
实施例 5	217.9
对比例 1	215.6
对比例 2	212.1
对比例 3	204.6
对比例 4	210.8
对比例 5	209.2
对比例 6	211.5
对比例 7	175.9
对比例 8	211.5
对比例 9	213.2
对比例 10	207.3
对比例 11	212.5
对比例 12	190.7
对比例 13	204.2
对比例 14	212.9
对比例 15	208.5

[0078] 由上表可知,本发明实施例1-3制得的改善皮肤的干细胞外泌体组合物能明显促进皮肤成纤维细胞增殖。

[0079] 测试例5

选取年龄在33-50岁的健康女性作为受试者,眼角有肉眼可见的细纹或皱纹,面部无痣、痘,随机分为实施例1-5和对比例1-15组,每组5人。

[0080] 排出条件:妊娠或哺乳期妇女;面部皮肤易过敏者;面部有严重干扰的表皮特征,如抓痕、胎记、疙瘩、痘印等;3个月内接受过皮肤科医生治疗者。

[0081] 测试方法:半脸测试。受试者每天早上8点到8点半之间在左半脸均匀涂覆0.5mL实施例1-5和对比例1-15组制得的改善皮肤的干细胞外泌体组合物,另外右半脸使用等量的清水,连续实验4周,实验期间不使用其他护肤品。实验开始前和实验结束后进行测试。测试前,受试者清水清洁面部,擦干水分,在恒温恒湿环境下($25 \pm 1^\circ\text{C}$,相对湿度 $70 \pm 10\%$)静坐30min,然后进行测定。结果见表5。

[0082] 皮肤角质层含水量:

使用水分测试仪测定左右面颊的皮肤角质层水分含量,计算两者的差值,取5次测量的平均值。差值为正数,且差值越大,说明对皮肤的保湿性改善越好。

[0083] 皮肤弹性:

使用皮肤弹性测试仪测量左右眼尾部位皮肤。计算两者的差值,选择皮肤弹性参数R5(回弹部分的弹性量/拉伸部分的弹性量)、紧致参数F4(最大拉伸量与时间构成的面积)值作为比较指标。取5次测量的平均值。

[0084] 皮肤弹性参数R5差值为正数,且差值越大,皮肤弹性越好;
紧致参数F4差值为负数,且差值的绝对值越大,皮肤越紧致。

[0085] 皮肤光泽度:

使用皮肤光泽度测试仪测量左右面颊的皮肤的光泽度,计算两者的差值,取5次测

量的平均值。差值为正数,且差值越大,说明对皮肤的光泽改善越明显。

[0086] 表5

组别	皮肤角质层含水量差值 (%)	皮肤弹性参数 R5 差值	紧致参数 F4 差值	皮肤光泽度差值
实施例 1	19.9	0.69	-0.59	0.63
实施例 2	20.2	0.69	-0.61	0.64
实施例 3	20.5	0.71	-0.62	0.66
实施例 4	17.8	0.65	-0.57	0.60
实施例 5	17.2	0.66	-0.56	0.59
对比例 1	16.5	0.63	-0.54	0.57
对比例 2	18.0	0.61	-0.51	0.55
对比例 3	17.0	0.56	-0.48	0.51
对比例 4	16.2	0.59	-0.49	0.53
对比例 5	17.5	0.58	-0.51	0.52
对比例 6	17.9	0.57	-0.52	0.54
对比例 7	14.3	0.48	-0.45	0.42
对比例 8	19.0	0.62	-0.55	0.57
对比例 9	18.8	0.63	-0.54	0.59
对比例 10	18.2	0.59	-0.50	0.52
对比例 11	16.1	0.57	-0.49	0.53
对比例 12	18.1	0.50	-0.42	0.47
对比例 13	17.9	0.57	-0.48	0.50
对比例 14	18.0	0.62	-0.51	0.56
对比例 15	17.5	0.58	-0.48	0.59

[0087] 由上表可知,本发明实施例1-3制得的具有舒缓抗衰老功效的护肤组合物能明显提高皮肤角质层的含水量,提高皮肤弹性,紧致皮肤,淡化细纹,提高皮肤光泽度,有很好的抗衰老、舒缓效果。

[0088] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

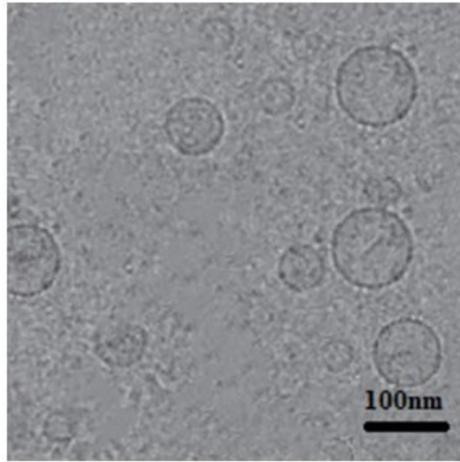


图 1