



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116694474 A

(43) 申请公布日 2023. 09. 05

(21) 申请号 202310413120.3

A61Q 19/00 (2006.01)

(22) 申请日 2023.04.10

A61Q 19/02 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

(71) 申请人 深圳元育生物科技有限公司

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

地址 518000 广东省深圳市南山区西丽街道松坪山社区朗山路13号南门西侧清华信息港科研楼708-1

C12R 1/89 (2006.01)

申请人 珠海元育生物科技有限公司

广东艾万生物科技有限公司

(72) 发明人 肖奕博 屈玉娇 韩柱 傅子文

(74) 专利代理机构 北京易捷胜知识产权代理有限公司 11613

专利代理师 齐云

(51) Int. Cl.

G12N 1/12 (2006.01)

A61K 8/99 (2017.01)

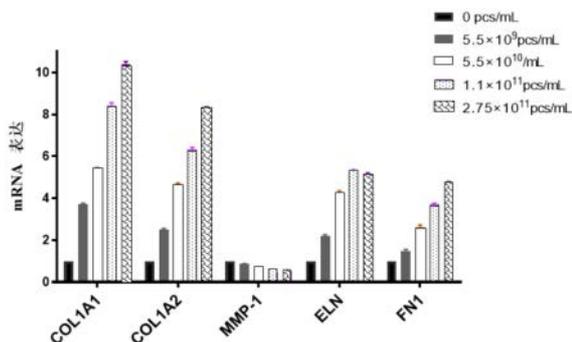
权利要求书2页 说明书6页 附图4页

(54) 发明名称

一种新的可用于护肤品的外泌体制备方法及其应用

(57) 摘要

本发明涉及一种新的可用于护肤品的外泌体制备方法,包括:通过高密度异养发酵培养小球藻,收集小球藻培养液上清,通过PEG沉淀法获得纯净的小球藻外泌体,使用小球藻外泌体替代动物细胞外泌体制作护肤品。本发明提供的原始小球藻外泌体,相比动物来源的外泌体,具有培养成本低、培养周期短,产量大,产率高、易于提取,具有更好的生物相容性和低毒副性,不存在异体免疫原性问题和伦理问题。实验证明,原始小球藻外泌体对HaCaT和HDF具有明显的促增殖并降低MMP1的表达,还能明显抑制黑色素细胞中酪氨酸酶活性,减少皮肤黑色素的产生,因此可用于制备美白、抗炎、抗过敏、皮肤紧致或皮肤组织修复的化妆品或护肤品。



1. 一种新的可用于护肤品的外泌体制备方法,其特征在于,其包括:通过高密度异养发酵培养小球藻,收集小球藻培养液上清,通过PEG沉淀法获得纯净的小球藻外泌体,使用小球藻外泌体替代动物细胞外泌体制作护肤品。

2. 根据权利要求1所述的一种新的可用于护肤品的外泌体制备方法,其特征在于,所述外泌体获取方法包括:

S1、小球藻的培养

小球藻的培养包括摇瓶培养和发酵罐培养;所述小球藻为原始小球藻 *Auxenochlorella protothecoides* 0710;所述发酵罐培养的方法为:初始发酵条件:温度 $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$, pH=6.0-6.3, 溶氧100%, 搅拌速度200-400rpm;

培养过程中:使用浓缩葡萄糖和酵母提取液进行分批补料,控制发酵罐中葡萄糖浓度在8-25g/L,利用NaOH调整pH恒定在6.3-6.5;通过调节搅拌速度和通气,使溶氧保持在 $\geq 20\%$;

S2、制备外泌体粗体液

当发酵培养至发酵罐内剩余葡萄糖浓度低于5g/L时,以4500g-5000g离心力1.5-3min使藻细胞沉淀,保留上清液,转移至新的离心管中,以4500g-5000g离心力25-35min使上清液中的大块碎片沉淀,将离心上层液转移到新容器中,得到外泌体粗体液;

S3、PEG沉淀法获得纯净外泌体,其具体包括:

S31: 将外泌体粗体液通过微滤膜过滤,得到滤液;

S32: 将PEG与水配制成浓度18-24wt%的PEG的水溶液,PEG的重均分子量为2000-8000;

S33: 将PEG的水溶液与上述滤液按照体积比1:1混匀,置低温保存过夜沉淀;24h后取出,在8000g-12000g离心力离心50-80min,得到沉淀产物和上清;

S34: 按照每100mL上述上清产生的沉淀产物加入1.5-2mL的PBS的比例对离心管的沉淀产物进行重悬,得到外泌体。

3. 根据权利要求2所述的一种新的可用于护肤品的外泌体制备方法,其特征在于,S2中,具体方法为:当发酵培养至发酵罐内剩余葡萄糖浓度低于5g/L时,5000g离心2min,使藻细胞沉淀,转移上清液至新的离心管中, -80°C 冰箱保存备用;提取前一天将上述上清液从 -80°C 冰箱中取出,置于 4°C 冰箱过夜解冻;将完全解冻融化的小球藻上清液取出,在 4°C 和5000g离心力离心30min,丢弃下层沉淀,转移到新的容器中,得到所述外泌体粗提液。

4. 根据权利要求2所述的一种新的可用于护肤品的外泌体制备方法,其特征在于,S31中所述微滤膜滤孔为 $0.22\mu\text{m}$;

S32中PBS的质量浓度为19.3%,PEG的重均分子量为6000;

S33中离心条件为 4°C 、10000g离心力离心1h。

5. 根据权利要求2所述的一种新的可用于护肤品的外泌体制备方法,其特征在于,S1中,所述摇瓶培养包括:

S11、配制异养液体培养基:

配制含有 KH_2PO_4 0.7-7g/L, K_2HPO_4 0.3-3g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3-2g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.003-0.02g/L, 维生素B1 10-20g/L, 葡萄糖30-60g/L, 酵母提取物1-2.5g/L, 甘氨酸2-10g/L, A5微量元素母液0.8-1.2mL/L的水溶液,对该水溶液高温高压灭菌,即得到所述异养液体培养基;

A5微量元素母液配方为： H_3BO_3 286mg/L, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 250mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22.2mg/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 7.9mg/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.1mg/L;

S12、摇瓶培养

吸取一定数量的原始小球藻*Auxenochlorella protothecoides* 0710的细胞,加入到所述异养液体培养基中,黑暗100-200rpm摇床培养,达到 $2-3 \times 10^6$ 个藻细胞/mL;继续在黑暗的恒温摇床中28℃,180-250rpm摇床培养,直到达到稳定生长期;摇瓶培养的藻液接种到发酵罐中。

6. 权利要求1-5任一项所述的一种新的可用于护肤品的外泌体制备方法制备的外泌体在制备护肤品中的应用。

7. 原始小球藻*Auxenochlorella protothecoides* 0710的外泌体在制备护肤品中的应用。

8. 原始小球藻*Auxenochlorella protothecoides* 0710的外泌体在制备用于促进HDF中胶原纤维相关基因表达、促进HaCaT中紧密连接蛋白相关基因的表达和抑制黑色素细胞B16中酪氨酸酶活性的化妆品或护肤品中的应用。

9. 原始小球藻*Auxenochlorella protothecoides* 0710的外泌体在制备美白、抗炎、抗过敏、皮肤紧致或皮肤组织修复的化妆品或护肤品中的应用。

一种新的可用于护肤品的外泌体制备方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物护肤品技术领域,具体为一种新的可用于护肤品的外泌体制备方法及其应用。

背景技术

[0002] 外泌体是干细胞最精华的部分,外泌体是指包含了复杂RNA和蛋白质的小膜泡(30-150nm),现今其特指直径在40-100nm的盘状囊泡。外泌体是细胞分泌的一种细胞外囊泡,其主要成分是磷脂双分子层和携带相关内容。外泌物提取可从多种体液中提取,如人体血液、尿液、精液和唾液,也可从多种细胞培养中提取。

[0003] 外泌体主要来源于细胞内溶酶体微粒内陷形成的多囊泡体,经多囊泡体外膜与细胞膜融合后释放到胞外基质中。外泌体在1983年首次被发现后,其被认为是细胞排泄废物的一种方式,如今随着大量对其生物来源、其物质构成及运输、细胞间信号的传导以及在体液中的分布的研究发现,外泌体具有多种多样的功能。外泌体的功能取决于其所来源的细胞类型,其可参与到机体免疫应答、抗原提呈、细胞迁移、细胞分化、肿瘤侵袭等方方面面。例如肿瘤来源的外泌体参与到肿瘤细胞与基底细胞的遗传信息的交换,从而导致大量新生血管的生成,促进了肿瘤的生长与侵袭。动物细胞来源的外泌体可用于抗过敏和皮肤抗衰老的护肤品或药品,能够有效地减少皮肤皱纹的数量,起到抗衰老的作用。

[0004] 然而,动物来源的外泌体的获取难度大,成本高,难以实现大规模产业化应用。主要原因包括:(1)动物来源的外泌体主要通过培养脐带干细胞,并从培养液中分离得到,干细胞的培养需要用到比较昂贵的血清制品,培养规模一般在毫升级,培养周期较长,产率还很低;(2)动物来源的外泌体还存在同种异体免疫原性问题,其安全性不能保证,还受到动物种类及动物细胞健康状况的影响,需严格把关干细胞来源;(3)动物来源的外泌体由于缺乏相关的法律和规范,干细胞技术在科研及应用环节涉及诸多伦理问题,难以寻求科技与伦理之间的平衡。

[0005] 目前有关微藻外泌体的研究较少,已有的关于莱茵衣藻外泌体的聚合物沉淀法无法得到结构完整、纯净的外泌体囊泡,且其提取产物的生物活性尚未得到实验验证,不适合用在美容护肤领域。

发明内容

[0006] (一)要解决的技术问题

[0007] 鉴于现有技术的上述缺点、不足,本发明提供一种新的可用于护肤品的外泌体制备方法及其应用,其解决了动物来源外泌体获取难度大、成本高、安全性难以保证,无法实现大规模产业化应用的技术问题。因此,本发明实质是提供了一种简单易行、可获取纯净完整的微藻外泌体提取方法,提高外泌体在护肤品/美容等领域中的应用率。

[0008] (二)技术方案

[0009] 第一方面,本发明提供一种新的可用于护肤品的外泌体制备方法,其包括:通过高

密度异养发酵培养小球藻,收集小球藻培养液上清,通过PEG沉淀法获得纯净的小球藻外泌体,使用小球藻外泌体替代动物细胞外泌体制作护肤品。

[0010] 根据本发明的较佳实施例,所述外泌体获取方法包括:

[0011] S1、小球藻的培养

[0012] 小球藻的培养包括摇瓶培养和发酵罐培养;所述小球藻为原始小球藻 *Auxenochlorella protothecoides* 0710;所述发酵罐培养的方法为:初始发酵条件:温度 $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$, pH=6.0-6.3, 溶氧100%, 搅拌速度200-400rpm;

[0013] 培养过程中:使用浓缩葡萄糖和酵母提取液进行分批补料,控制发酵罐中葡萄糖浓度在8-25g/L,利用NaOH调整pH恒定在6.3-6.5;通过调节搅拌速度和通气,使溶氧保持在 $\geq 20\%$;

[0014] S2、制备外泌体粗体液

[0015] 当发酵培养至发酵罐内剩余葡萄糖浓度低于5g/L时,以4500g-5000g离心力1.5-3min使藻细胞沉淀,保留上清液,转移至新的离心管中,以4500g-5000g离心力25-35min使上清液中的大块碎片沉淀,将离心上层液转移到新容器中,得到外泌体粗体液;

[0016] S3、PEG沉淀法获得纯净外泌体,其具体包括:

[0017] S31:将外泌体粗体液通过微滤膜过滤,得到滤液;

[0018] S32:将PEG与水配制成浓度18-24wt%的PEG的水溶液,PEG的重均分子量为2000-8000;

[0019] S33:将PEG的水溶液与所述滤液按照体积比1:1混匀,置低温保存过夜沉淀;24h后取出,在8000g-12000g离心力离心50-80min,得到沉淀产物和上清;

[0020] S34:按照每100mL所述上清产生的沉淀产物加入1.5-2mL的PBS的比例对离心管的沉淀产物进行重悬,得到外泌体。

[0021] 根据本发明的较佳实施例,S2中,具体方法为:当发酵培养至发酵罐内剩余葡萄糖浓度低于5g/L时,5000g离心2min,使藻细胞沉淀,转移上清液至新的离心管中,-80℃冰箱保存备用;提取前一天将所述上清液从-80℃冰箱中取出,置于4℃冰箱过夜解冻;将完全解冻融化的小球藻上清液取出,在4℃和5000g离心力离心30min,丢弃下层沉淀,转移到新的容器中,得到所述外泌体粗提液。

[0022] 根据本发明的较佳实施例,S31中所述微滤膜滤孔为0.22 μm ;

[0023] S32中PBS的质量浓度为19.3%,PEG的重均分子量为6000;

[0024] S33中离心条件为4℃、10000g离心力离心1h。

[0025] 根据本发明的较佳实施例,S1中,所述摇瓶培养包括:

[0026] S11、配制异养液体培养基:

[0027] 配制含有 KH_2PO_4 0.7-7g/L, K_2HPO_4 0.3-3g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3-2g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.003-0.02g/L,维生素B1 10-20g/L,葡萄糖30-60g/L,酵母提取物1-2.5g/L,甘氨酸2-10g/L,A5微量元素母液0.8-1.2mL/L的水溶液,对该水溶液高温高压灭菌,即得到所述异养液体培养基;

[0028] A5微量元素母液配方为: H_3BO_3 286mg/L, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 250mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22.2mg/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 7.9mg/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.1mg/L;

[0029] S12、摇瓶培养

[0030] 吸取一定数量的原始小球藻*Auxenochlorella protothecoides* 0710的细胞,加入到所述异养液体培养基中,黑暗100-200rpm摇床培养,达到 $2-3 \times 10^6$ 个藻细胞/mL;继续在黑暗的恒温摇床中28℃,180-250rpm摇床培养,直到达到稳定生长期;摇瓶培养的藻液接种到发酵罐中。

[0031] 此外,本发明还通过CCK8增殖实验验证了,原始小球藻*Auxenochlorella protothecoides* 0710的外泌体具有促进HDF中胶原纤维相关基因表达、促进HaCaT中紧密连接蛋白相关基因的表达和抑制黑色素细胞B16中酪氨酸酶活性的功效,对人类永生表皮细胞(HaCaT)、人皮肤成纤维细胞(HDF)表现出增殖活性,抑制黑色素产生,因此可制备具有美白、抗炎、抗过敏、皮肤紧致或皮肤组织修复的化妆品或护肤品。

[0032] (三)有益效果

[0033] 本发明提供的原始小球藻*Auxenochlorella protothecoides* 0710的外泌体,相比动物来源的外泌体,具有如下优势:

[0034] (1)培养成本低:与动物细胞培养所需昂贵的血清制品不同,对小球藻的发酵培养时其主要培养基成分为葡萄糖与无机盐,配方简单,价格低廉,显著减少了生产过程中的培养成本。

[0035] 培养周期更短,产量大,产率高:利用发酵罐对小球藻进行发酵培养,发酵罐培养一般都在50L-10000L,可快速获得大量藻细胞,按目前技术发酵培养小球藻培养密度最高可达270g/L,细胞培养密度远超过动物细胞;小球藻培养周期短为5-10天,远少于动物细胞培养所需的时间成本。由于小球藻生长速度快、生长周期短、藻的培养可以利用光能固定二氧化碳作为碳源,或采用价格较低廉的无机盐与糖类,可以发酵至数吨,利用微藻进行外泌体提取更有利于后续的工业化大规模生产,按照50L的发酵罐体积、培养时间为10天左右,细胞最高培养密度100g/L估算,每获取1mg小球藻外泌体的成本不到羊膜干细胞外泌体成本的0.1%,在成本方面差异显著。因此,本发明制备外泌体的方法,相较于传统动物脐带干细胞培养法,具有十分乐观的产业应用前景。

[0036] (2)易于采用生物手段以获得更多外泌体。小球藻比动物细胞具有更好的耐受性和抗逆性,易于进行基因改造、压力胁迫诱导或刺激等,以促进小球藻产生更多外泌体,在获得的外泌体与动物细胞源外泌体具有等同护肤效果的前提下达到提高产量、降低成本、扩大产品化应用的目的。

[0037] (3)小球藻源外泌体易于提取且能够得到边缘清晰,结构完整的外泌体囊泡结构。本发明采用PEG沉淀法提取小球藻外泌体,通过过滤、沉淀、离心等步骤进行小球藻外泌体的提取,无需复杂的仪器设备,工艺成本较低。而动物细胞来源的外泌体由于培养基血浆血清中含有较多脂蛋白,PEG共沉淀容易沉淀脂蛋白好人其他物质,纯度低,因此动物来源的外泌体一般只能采用蔗糖或者碘克沙醇密度梯度离心法,这种方法针对的体量极小,只有几个毫升到几十个毫升,难以在产业上进行应用,无法规模化地提取几升到几万升细胞培养液的外泌体。

[0038] (4)与动物细胞来源的外泌体不同,微藻来源的外泌体以植物活性物质为基础,包含内容物丰富,具有绿色化的优势,因而具有更好的生物相容性和低毒副性。本发明提供的外泌体不会存在同种异体免疫原性问题,安全性高;也不存在伦理问题。

[0039] (5)本发明用已验证,原始小球藻*Auxenochlorella protothecoides*0710的外泌

体,对HaCaT和HDF具有促增殖作用,可提高了HDF胶原纤维相关基因、HaCaT紧密连接蛋白相关基因的表达。此外,所述小球藻外泌体还能抑制黑色素细胞B16中酪氨酸酶活性,减少皮肤黑色素的产生,可用于疤痕创面修复和美白。

[0040] 综上所述,本发明的小球藻外泌体的制备方法简单,制备过程无毒无害,工艺参数易控制,成本低廉,外泌体成分容易被细胞摄取,通过测试其在护肤上的功效,具有美白、抗衰老、抗炎、保湿嫩肤、抗氧化、晒后修护、淡斑、抗炎、抗过敏、舒缓、紧致等多重功效,解决了美白、皮肤皱纹和防止皮肤衰老等问题,并降低外泌体护肤品的价格,使广大爱美人士均有能力消费外泌体护肤产品。

附图说明

- [0041] 图1为小球藻外泌体透射电子显微镜图。
[0042] 图2为小球藻外泌体对HDF细胞增殖影响图。
[0043] 图3为小球藻外泌体对HaCaT细胞增殖影响图。
[0044] 图4小球藻外泌体对HaCaT紧密连接蛋白基因表达图。
[0045] 图5为小球藻外泌体对HDF胶原纤维相关基因表达图。
[0046] 图6为小球藻外泌体对B16中酪氨酸酶活性影响图。

具体实施方式

[0047] 为了更好的解释本发明,以便于理解,下面结合附图,通过具体实施方式,对本发明作详细描述。

[0048] 实施例1

[0049] 本实施例为小球藻外泌体的制备方法,具体如下:

[0050] (1) 配制小球藻异养培养液,包含 KH_2PO_4 5g/L, K_2HPO_4 2g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g/L,维生素B1 15g/L,葡萄糖50g/L,酵母提取物2g/L,甘氨酸6g/L,A5微量元素母液1mL/L。

[0051] A5微量元素母液配方为 H_3BO_3 286mg/L, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 250mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22.2mg/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 7.9mg/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.1mg/L。经过高温高压灭菌后即可得到异养原始小球藻培养基。

[0052] (2) 吸取一定数量的原始小球藻*Auxenochlorella protothecoides* 0710细胞,加入到一定体积的液体培养基中,黑暗100-200rpm摇床培养,最终使每毫升培养基中含有 $2-3 \times 10^6$ 个藻细胞。将培养物放置在黑暗的恒温摇床中,28℃,180-250rpm摇床培养,直到达到稳定生长期。

[0053] (3) 小球藻的发酵罐培养

[0054] 采用5L发酵罐(型号:GBJS-5L-AUTOBIO,镇江东方,中国)进行所述藻株的发酵培养。初始发酵条件为:温度 $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$,pH 6.3,溶氧度(pO_2)100%,搅拌速度300rpm。使用浓缩葡萄糖和酵母提取液进行分批补料,利用NaOH调整PH至6.5。发酵过程中,人工补料控制蔗糖浓度在8-25g/L,其他参数为自动控制。通过调节搅拌速度和通气,使溶氧度保持在20%以上。

[0055] (4) 制备外泌体粗提液

[0056] 当剩余葡萄糖浓度低于5g/L时,收集藻体。藻液5000g离心2min,使藻细胞沉淀,转移上清液至新的离心管中,-80℃冰箱保存备用。

[0057] 提取前一天从-80℃冰箱中取出冻成冰的上清液,置于4℃冰箱过夜解冻,备用;将完全融化的小球藻上清液取出,分装于100mL离心管内(100mL离心管加液体体积不超过80mL);采用5000g离心力4℃离心30min,去除上清液里的大块碎片;离心结束后将上层液转移至新的容器内,丢弃下层沉淀,得到外泌体粗提液。

[0058] (5) PEG沉淀法获得纯净外泌体组分

[0059] 将外泌体粗提液过0.22um滤膜过滤,得到滤液。将提前配制好的PEG6000溶液(24gPEG6000用于100mL水)与滤液按照体积比1:1混匀,开始一次沉淀,置于4℃冰箱过夜沉淀。24h后,将悬液取出,可看到絮状物悬浮在溶液里,4℃用10000g离心力离心1h;弃上清。按100mL上清所得产物加2mL的比例加入PBS重悬所得产物,汇总于1.5mL EP管中,按下列要求留样送检(暂时无法送检样品冻存于-80℃),余下的冻存于-80℃(在EP管上标明精确体积)。

[0060] (6) 取PBS重悬液,利用纳米库尔特粒度仪检测小球藻外泌体的粒径,根据结果计算出原上清颗粒含量为 $2.75E11$ pcs/mL,平均粒径为69nm。

[0061] (7) 利用透射电镜观察所提取的原始小球藻外泌体形态,可以观察到外泌体囊泡结构,边缘清晰,结构完整(见图1)。

[0062] 实施例2

[0063] 本实施例为采用实验方法,验证小球藻外泌体在细胞层面的生物活性,实验方法如下:

[0064] (1) 小球藻外泌体对HDF增殖影响:将HDF按照3000/孔接种到96孔板中过夜培养,种板5列,培养基采用含10%FBS(胎牛血清)的DMEM(高糖培养基)。过夜贴壁后,弃去原有培养基,第一列加入新鲜培养基作为对照,第二列加入使用浓度为 7.336×10^9 pcs/mL的小球藻外泌体,第三列加入使用浓度为 3.668×10^{10} pcs/mL的小球藻外泌体,第四列加入使用浓度为 1.834×10^{11} pcs/mL的小球藻外泌体,第五列加入使用浓度为 9.17×10^{11} pcs/mL的小球藻外泌体,48h后进行CCK8检测。由图2可明显看出,与对照组相比,加入小球藻外泌体能明显促进HDF的增殖。

[0065] (2) 小球藻外泌体对HaCaT增殖影响:将HaCaT按照5000/孔接种到96孔板中过夜培养,种板5列,培养基采用含10%FBS(胎牛血清)的DMEM(高糖培养基)。过夜贴壁后,弃去原有培养基,第一列加入新鲜培养基作为对照,第二列加入使用浓度为 5.5×10^9 pcs/mL的小球藻外泌体,第三列加入使用浓度为 5.5×10^{10} pcs/mL的小球藻外泌体,第四列加入使用浓度为 1.1×10^{11} pcs/mL的小球藻外泌体,第五列加入使用浓度为 2.75×10^{11} pcs/mL的小球藻外泌体,48h后进行CCK8检测。由图3可明显看出,与对照组相比,加入小球藻外泌体能明显促进HaCaT的增殖。

[0066] (3) 小球藻外泌体对HDF胶原纤维相关基因的表达:将HDF按照10000/cm²接种到6孔板中过夜培养,种板5孔,培养基采用含10%FBS(胎牛血清)的DMEM(高糖培养基)。过夜贴壁后,弃去原有培养基,第一孔加入新鲜培养基作为对照,第二孔加入使用浓度为 7.336×10^9 pcs/mL的小球藻外泌体,第三孔加入使用浓度为 3.668×10^{10} pcs/mL的小球藻外泌体,第四孔加入使用浓度为 1.834×10^{11} pcs/mL的小球藻外泌体,第五孔加入使用浓度为 $9.17 \times$

10^{11} pcs/mL的小球藻外泌体,48h后进行RNA提取、反转、qpcr检测。由图4可以明显看出,与对照组相比,加入小球藻外泌体能明显提高Claudin1、Claudin5和Claudin6基因的表达。

[0067] (4) 小球藻外泌体对HaCaT中紧密连接蛋白相关基因的表达:将HaCaT按照15000/cm²接种到6孔板中过夜培养,种板5孔,培养基采用含10%FBS(胎牛血清)的DMEM(高糖培养基)。过夜贴壁后,弃去原有培养基,第一孔加入新鲜培养基作为对照,第二孔加入使用浓度为 5.5×10^9 pcs/mL的小球藻外泌体,第三孔加入使用浓度为 5.5×10^{10} pcs/mL的小球藻外泌体,第四孔加入使用浓度为 1.1×10^{11} pcs/mL的小球藻外泌体,第五孔加入使用浓度为 2.75×10^{11} pcs/mL的小球藻外泌体,48h后进行RNA提取、反转、qpcr检测。由图5可明显看出,与对照组相比,加入小球藻外泌体能明显提高COLA1、COLA2、FN1、ELN基因的表达并降低MMP1的表达(MMP1会抑制胶原蛋白合成),促进胶原蛋白合成。

[0068] (5) 小球藻外泌体对黑色素瘤细胞B16中酪氨酸酶活性的影响:将黑色素瘤细胞B16按照15000/cm²接种到75瓶中过夜培养,共五瓶,培养基采用含10%FBS(胎牛血清)的DMEM(高糖培养基)。过夜贴壁后,弃去原有培养基,第一瓶加入新鲜培养基作为对照,第二瓶加入使用浓度为 5.5×10^9 pcs/mL的小球藻外泌体,第三瓶加入使用浓度为 5.5×10^{10} pcs/mL的小球藻外泌体,第四瓶加入使用浓度为 1.1×10^{11} pcs/mL的小球藻外泌体,第五瓶加入使用浓度为 2.75×10^{11} pcs/mL的小球藻外泌体,48h后消化细胞,每个瓶各取500万黑色素细胞B16加入1mL提取液后,超声破碎,条件为200W,每个周期打开3s和关闭10s,重复30次后,12000g,4℃离心20min,取上清,然后在475nm处分光光度计检测后经换算后得到酪氨酸酶活性数据。由图6可明显看出,与对照组相比,加入小球藻外泌体能明显降低酪氨酸酶活性。

[0069] 综上所述,本发明提供的小球藻外泌体具有明显的促进HDF和HaCaT的增殖,提高Claudin1、Claudin5和Claudin6基因的表达,提高COLA1、COLA2、FN1、ELN基因的表达并降低MMP1的表达,抑制黑色素瘤细胞B16中酪氨酸酶活性的特点,此外实验过程中还发现,本发明提供的小球藻外泌体并没有减少活细胞数量和生长速度,这说明所述外泌体具有安全性,因此可用于制备具有美白、抗炎、抗过敏、皮肤紧致或皮肤组织修复的化妆品或护肤品。

[0070] 最后应说明的是:以上各实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述各实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分或者全部技术特征进行等同替换;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的范围。

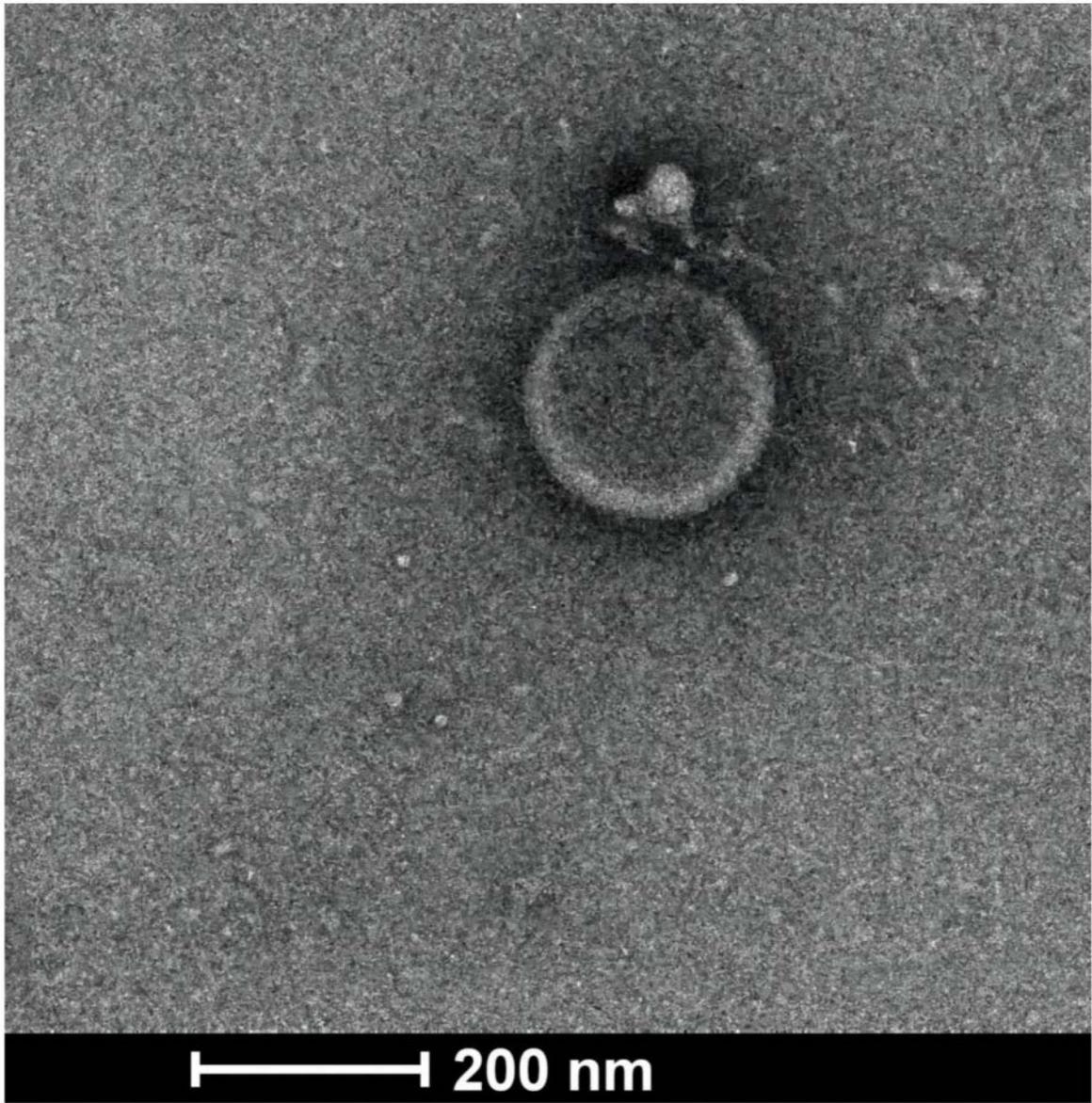


图1

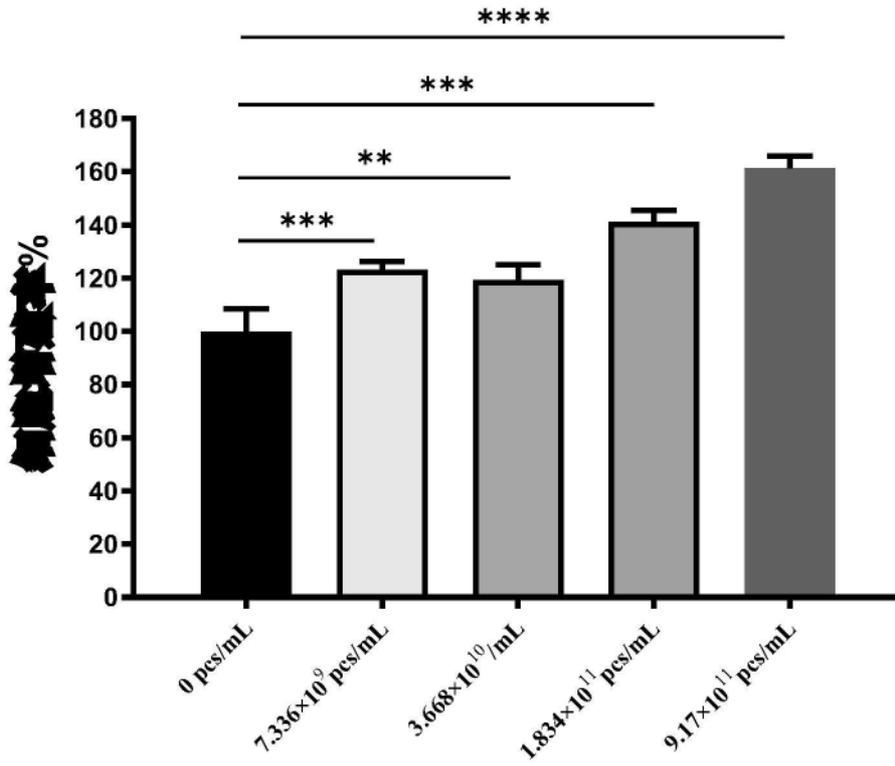


图2

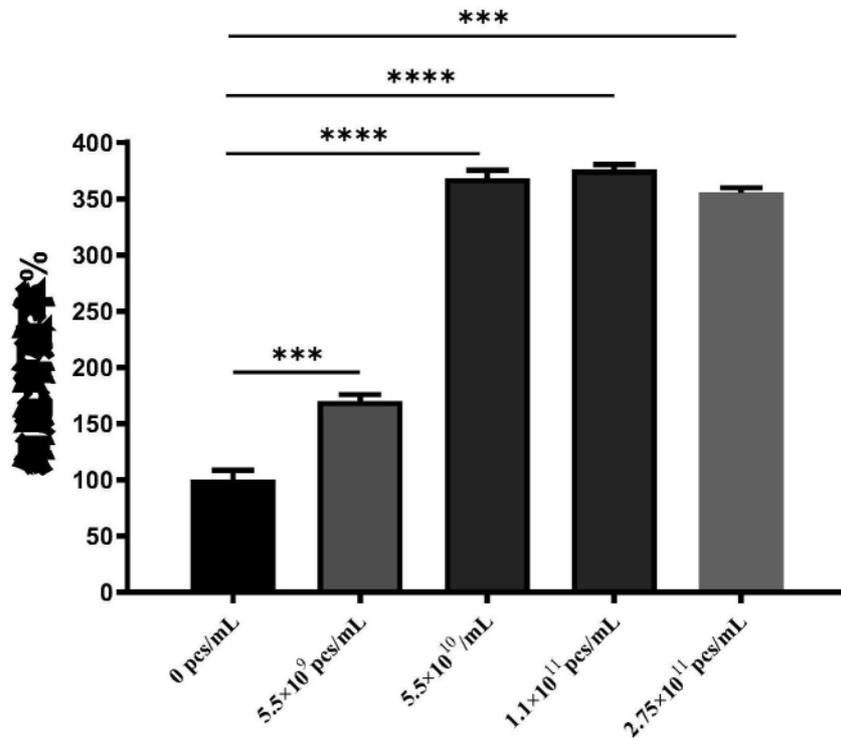


图3

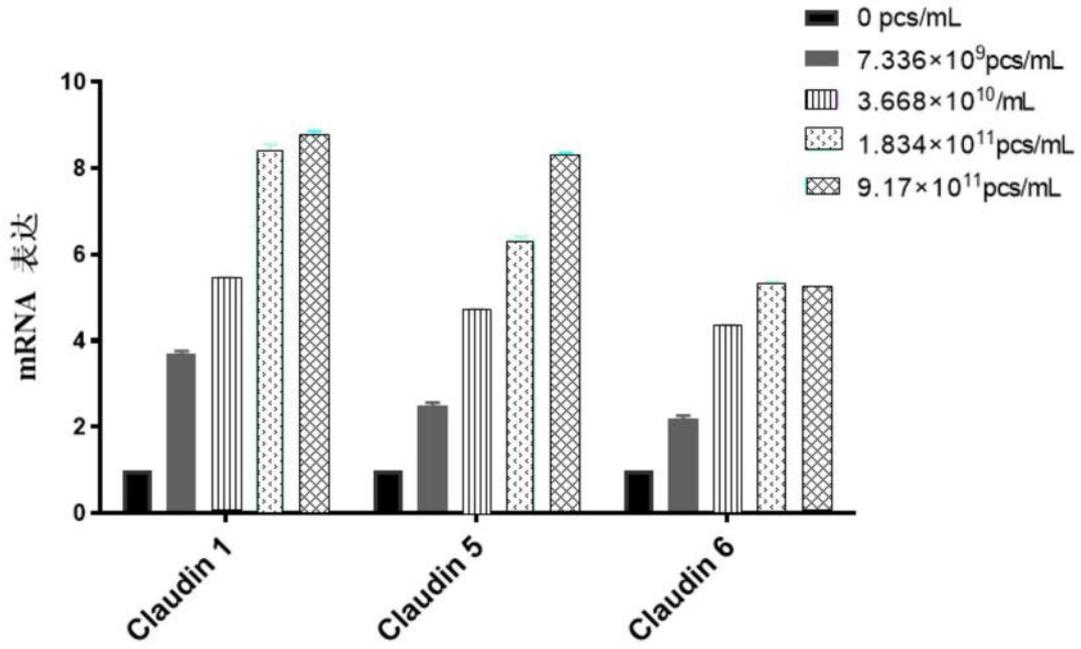


图4

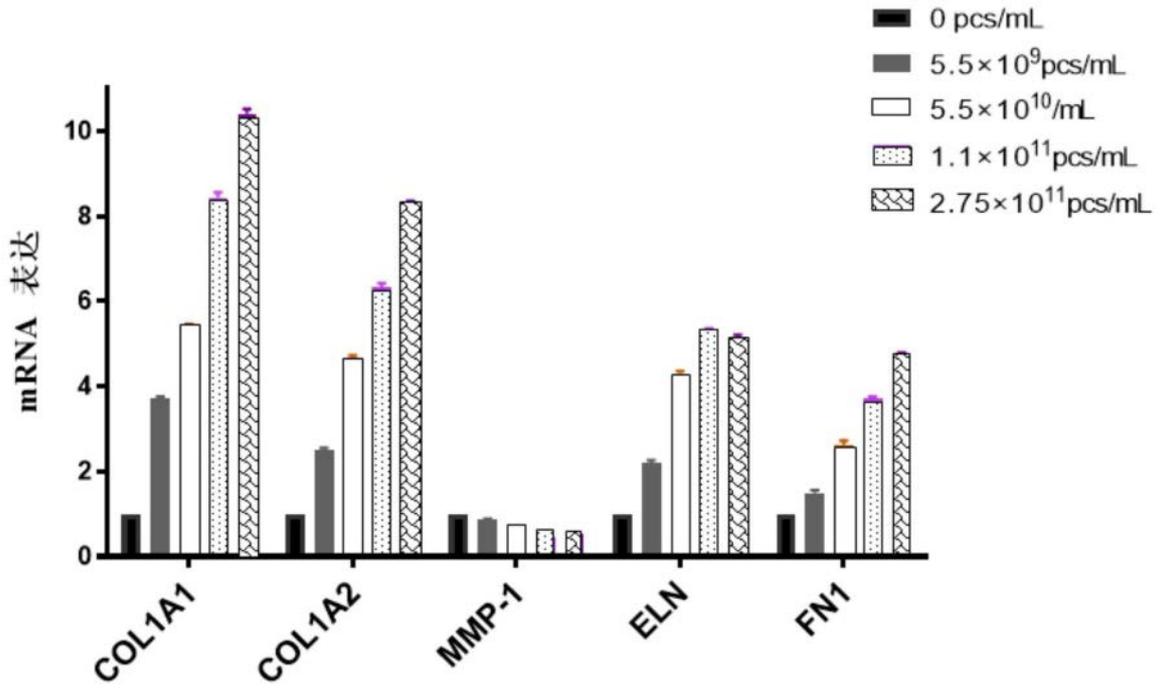


图5

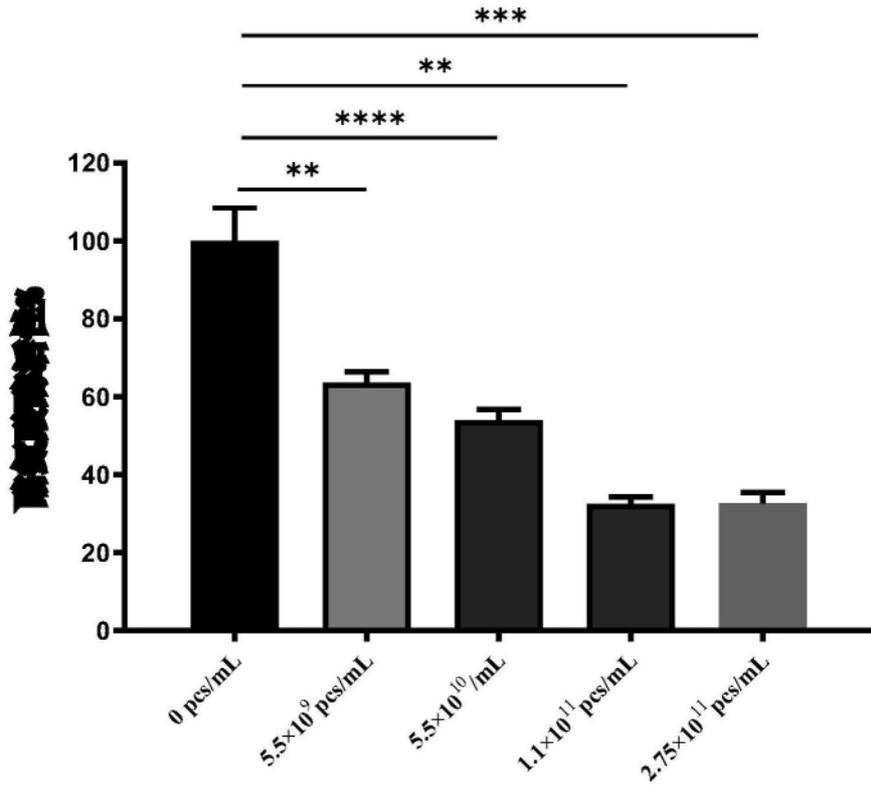


图6