



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110548001 A

(43)申请公布日 2019.12.10

(21)申请号 201910878701.8

A61Q 19/08(2006.01)

(22)申请日 2019.09.06

(71)申请人 沈阳细胞治疗工程技术研发中心有限公司

地址 110000 辽宁省沈阳市浑南区智慧二街400-8号A10

(72)发明人 郭丹慧 荣耀星 于艳秋 杨柳松

(51)Int.Cl.

A61K 8/99(2017.01)

A61K 8/92(2006.01)

A61K 8/55(2006.01)

A61K 8/64(2006.01)

A61K 8/68(2006.01)

A61K 8/9789(2017.01)

A61K 8/67(2006.01)

A61Q 19/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书17页

(54)发明名称

一种含脐带间充质干细胞外泌体的修复抗衰护肤品

(57)摘要

本发明公开了一种含脐带间充质干细胞外泌体的修复抗衰护肤品,包括以下成分:间充质干细胞外泌体、甘露醇、EDTA-2Na、黄原胶、丁二醇、甘油、水溶性霍霍巴油、橄榄油、聚二甲基硅氧烷、羟乙基纤维素、氢化卵磷脂、枯草杆菌脂肽钠、PCA Na、尿素、透明质酸、β-葡聚糖、干细胞分泌素、血清白蛋白、神经酰胺-2和水,还包括:霍霍巴油、角鲨烷、乳木果油、辛酸癸酸甘油三酯、甘草酸二钾、视黄醇棕榈酸酯、积雪草提取物和维生素E醋酸酯。本发明的含脐带间充质干细胞外泌体的修复抗衰护肤品,可有效保证干细胞外泌体的活性,并在无防腐剂和乳化剂的情况下最大限度地保证因子活性,配合多种肌肤养护成分,能够更好地修复肌肤屏障。

1. 一种含脐带间充质干细胞外泌体的修复抗衰护肤品,其特征在於,包括以下成分:间充质干细胞外泌体、甘露醇、EDTA-2Na、黄原胶、丁二醇、甘油、水溶性霍霍巴油、橄榄油、聚二甲基硅氧烷、羟乙基纤维素、氢化卵磷脂、枯草杆菌脂肽钠、PCA Na、尿素、透明质酸、 $\beta$ -葡聚糖、干细胞分泌素、血清白蛋白、神经酰胺-2和水。

2. 如权利要求1所述的脐带间充质干细胞外泌体的修复抗衰护肤品,其特征在於,由以下重量百分数的组分组成:间充质干细胞外泌体0.1%~1%,甘露醇5%~7%,EDTA-2Na 0.05%~0.25%,黄原胶0.10%~0.25%,丁二醇3%~5%,甘油1%~3%,水溶性霍霍巴油0.3%~0.6%,橄榄油2%~10%,聚二甲基硅氧烷1.5%~2.5%,羟乙基纤维素0.4~0.6%,氢化卵磷脂1.0%~2.0%,枯草杆菌脂肽钠0.4%~0.8%,PCA Na 0.4~0.6%,尿素0.2~0.5%,透明质酸0.4~0.6%, $\beta$ -葡聚糖0.2~0.5%,干细胞分泌素2~5%,血清白蛋白0.05~0.15%,神经酰胺-2 0.05~0.15%,余量为水。

3. 如权利要求1或2所述的脐带间充质干细胞外泌体的修复抗衰护肤品,其特征在於,还包括以下成分:霍霍巴油、角鲨烷、乳木果油、辛酸癸酸甘油三酯、甘草酸二钾、视黄醇棕榈酸酯、积雪草提取物和维生素E醋酸酯。

4. 如权利要求3所述的脐带间充质干细胞外泌体的修复抗衰护肤品,其特征在於,由以下重量百分数的组分组成:间充质干细胞外泌体0.1%~1%,甘露醇5%~7%,EDTA-2Na 0.05%~0.25%,黄原胶0.10%~0.25%,丁二醇3%~5%,甘油1%~3%,水溶性霍霍巴油0.3%~0.6%,橄榄油2%~10%,聚二甲基硅氧烷1.5%~2.5%,羟乙基纤维素0.4~0.6%,氢化卵磷脂1.0%~2.0%,枯草杆菌脂肽钠0.4%~0.8%,PCA Na 0.4~0.6%,尿素0.2~0.5%,透明质酸0.4~0.6%, $\beta$ -葡聚糖0.2~0.5%,干细胞分泌素2~5%,血清白蛋白0.05~0.15%,神经酰胺-2 0.05~0.15%,霍霍巴油1.5%~2.5%,角鲨烷0.3%~0.6%,乳木果油0.8%~1.2%,辛酸癸酸甘油三酯1.5%~2.5%,甘草酸二钾0.08%~0.12%,视黄醇棕榈酸酯0.02%~0.03%,积雪草提取物0.4%~0.6%,维生素E醋酸酯0.4%~0.6%,余量为水。

5. 如权利要求1-4任一所述的脐带间充质干细胞外泌体的修复抗衰护肤品,其特征在於,所述的间充质干细胞外泌体,为人的脐带间充质干细胞分泌的多种活性因子的混合物。

6. 如权利要求1-5任一所述的脐带间充质干细胞外泌体的修复抗衰护肤品,其特征在於,所述的间充质干细胞外泌体的制备方法,包括以下步骤:

A、取胎盘,分离出绒毛膜,用PBS缓冲液冲洗去除红细胞,将绒毛膜剪成10~20mm<sup>3</sup>大小的组织块,加入胶原酶消化液进行消化;

B、取消化后的组织块,过滤得滤液1,剩余组织加入用胰蛋白酶进行,消化后,组织悬块过滤得滤液2;合并滤液1和滤液2,加入血清终止消化,离心,弃去上清,收集离心获得的细胞;

C、将细胞以 $2 \times 10^6$ /cm<sup>2</sup>的密度接种至含10%FBS的DMEM培养基中,37℃、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度下培养,每隔一段时间换液一次并去除未贴壁细胞;待细胞融合率达到80%~90%时,消化细胞进行传代培养;等扩增到所需数量时,离心去除细胞以及碎片等,收集上清,过0.22 $\mu$ m无菌滤膜,加入终浓度为10%的聚乙二醇,混匀,4℃孵育8~14小时,离心,弃去上清,用PBS缓冲液重悬沉淀,加入终浓度为8%的聚乙二醇,再次孵育1小时,离心,PBS缓冲液重悬沉淀,即得间充质干细胞外泌体,分装,-80℃保存。

7. 如权利要求6所述的脐带间充质干细胞外泌体的修复抗衰护肤品,其特征在于,所述的步骤B中,过100目滤网。

8. 如权利要求6所述的脐带间充质干细胞外泌体的修复抗衰护肤品,其特征在于,所述的聚乙二醇为聚乙二醇8000。

9. 如权利要求3-8任一所述的含脐带间充质干细胞外泌体的修复抗衰护肤品,其特征在于,其制备方法,包括以下步骤:

(1) 将间充质干细胞外泌体、甘露醇和适量水混合混匀,真空冷冻干燥,得冻干粉F相,备用;

(2) 将EDTA-2Na加入适量水中,加入黄原胶并加热至75~80℃,在黄原胶完全水合后,加入丁二醇、甘油和水溶性霍霍巴油,混匀,得A相,备用;

(3) 在80℃条件下,将橄榄油、霍霍巴油、角鲨烷、乳木果油、辛酸癸酸甘油三酯、聚二甲基硅氧烷、氢化卵磷脂和枯草杆菌脂肽钠混合混匀,得BD相,备用;所述的橄榄油、霍霍巴油、角鲨烷、乳木果油、辛酸癸酸甘油三酯和聚二甲基硅氧烷为B相,所述的氢化卵磷脂和枯草杆菌脂肽钠为D相;

(4) 将上述BD相加入A相中,在80℃下快速搅拌混匀,冷却至60~65℃,备用;

(5) 在40℃条件下将羟乙基纤维素溶于适量水中,得透明凝胶C相;将透明凝胶加入步骤(4)的物料中,冷却至35~40℃,加入PCA Na、尿素、透明质酸、β-葡聚糖、干细胞分泌素、血清白蛋白、神经酰胺-2、甘草酸二钾、视黄醇棕榈酸酯、积雪草提取物和维生素E醋酸酯的混合物E相和步骤(1)中的冻干粉F相,混匀,即得。

10. 如权利要求9所述的含脐带间充质干细胞外泌体的修复抗衰护肤品,其特征在于,所述的步骤(1)中,所述真空冷冻干燥的具体操作方式为:将物料置于-70℃冻干机中,冷却至-50℃以下,预冻6h,抽真空8h,缓慢升温至-20℃,再以5℃/h的速度升温至25℃,保温干燥2h,即得。

## 一种含脐带间充质干细胞外泌体的修复抗衰护肤品

### 技术领域

[0001] 本发明涉及化妆品技术领域,尤其涉及一种含脐带间充质干细胞外泌体的修复抗衰护肤品。

### 背景技术

[0002] 外泌体 (Exosome) 是细胞向胞外分泌的囊泡类小体,直径为30~150纳米,具有典型的脂质双分子层膜结构,可存在于细胞培养上清液、血浆、血清、唾液、尿液、羊水等生物体液中;其携带有母细胞的多种蛋白质、脂类、DNA和RNA等重要信息,在细胞-细胞间的物质和信息传递中起重要作用。现有研究已证明间充质干细胞分泌的外泌体在促进皮肤损伤修复、减轻炎症反应、促进血管再生等方面有重要作用。研究发现,间充质干细胞通过释放大量的外泌体来构建一个稳态的组织修复的微环境,从而消除炎症反应,促进伤口愈合。间充质干细胞外泌体应用在皮肤修复抗衰时,活性成分应用前的有效保存一直是难以解决的问题,并且产品的乳化剂及防腐剂也会对活性成分的功效有一定影响。

[0003] 为了使间充质干细胞外泌体的活性成分能较好地保存,能更好地发挥间充质干细胞外泌体的皮肤修复抗衰功效,本发明提出了一种含脐带间充质干细胞外泌体的修复抗衰护肤品及其制备方法。

### 发明内容

[0004] 基于背景技术存在的技术问题,本发明提出了一种含脐带间充质干细胞外泌体的修复抗衰护肤品,其活性成分能较好地保存,具有促进皮肤增生能力、提高皮肤弹性、改善肤质等效果,能更好地发挥间充质干细胞外泌体的皮肤修复抗衰功效,且不会引起过敏反应。

[0005] 本发明的技术方案如下:

[0006] 一种含脐带间充质干细胞外泌体的修复抗衰护肤品,包括以下成分:间充质干细胞外泌体、甘露醇、EDTA-2Na、黄原胶、丁二醇、甘油、水溶性霍霍巴油、橄榄油、聚二甲基硅氧烷、羟乙基纤维素、氢化卵磷脂、枯草杆菌脂肽钠、PCA Na (吡咯烷酮羧酸钠)、尿素、透明质酸、 $\beta$ -葡聚糖、干细胞分泌素、血清白蛋白、神经酰胺-2和水。

[0007] 所述的脐带间充质干细胞外泌体的修复抗衰护肤品,由以下重量百分数的组分组成:间充质干细胞外泌体0.1%~1%,甘露醇5%~7%,EDTA-2Na 0.05%~0.25%,黄原胶0.10%~0.25%,丁二醇3%~5%,甘油1%~3%,水溶性霍霍巴油0.3%~0.6%,橄榄油2%~10%,聚二甲基硅氧烷1.5%~2.5%,羟乙基纤维素0.4~0.6%,氢化卵磷脂1.0%~2.0%,枯草杆菌脂肽钠0.4%~0.8%,PCA Na 0.4~0.6%,尿素0.2~0.5%,透明质酸0.4~0.6%, $\beta$ -葡聚糖0.2~0.5%,干细胞分泌素2~5%,血清白蛋白0.05~0.15%,神经酰胺-2 0.05~0.15%,余量为水。

[0008] 优选的,所述的含脐带间充质干细胞外泌体的修复抗衰护肤品,还包括以下成分:霍霍巴油(跟水溶性霍霍巴油不是一种物质,此为油性原料)、角鲨烷、乳木果油、辛酸葵酸

甘油三酯、甘草酸二钾、视黄醇棕榈酸酯、积雪草提取物和维生素E醋酸酯。

[0009] 优选的,所述的含脐带间充质干细胞外泌体的修复抗衰护肤品,由以下重量百分数的组分组成:间充质干细胞外泌体0.1%~1%,甘露醇5%~7%,EDTA-2Na 0.05%~0.25%,黄原胶0.10%~0.25%,丁二醇3%~5%,甘油1%~3%,水溶性霍霍巴油0.3%~0.6%,橄榄油2%~10%,聚二甲基硅氧烷1.5%~2.5%,羟乙基纤维素0.4~0.6%,氢化卵磷脂1.0%~2.0%,枯草杆菌脂肽钠0.4%~0.8%,PCA Na 0.4~0.6%,尿素0.2~0.5%,透明质酸0.4~0.6%, $\beta$ -葡聚糖0.2~0.5%,干细胞分泌素2~5%,血清白蛋白0.05~0.15%,神经酰胺-2 0.05~0.15%,霍霍巴油1.5%~2.5%,角鲨烷0.3%~0.6%,乳木果油0.8%~1.2%,辛酸葵酸甘油三酯1.5%~2.5%,甘草酸二钾0.08%~0.12%,视黄醇棕榈酸酯0.02%~0.03%,积雪草提取物0.4%~0.6%,维生素E醋酸酯0.4%~0.6%,余量为水。

[0010] 优选的,所述的间充质干细胞外泌体,为人的脐带间充质干细胞分泌的多种活性因子的混合物。

[0011] 进一步优选的,所述的间充质干细胞外泌体的制备方法,包括以下步骤:

[0012] A、取胎盘,分离出绒毛膜,用PBS缓冲液冲洗去除红细胞,将绒毛膜剪成10~20mm<sup>3</sup>大小的组织块,加入胶原酶消化液进行消化;

[0013] B、取消化后的组织块,过滤得滤液1,剩余组织加入用胰蛋白酶进行,消化后,组织悬块过滤得滤液2;合并滤液1和滤液2,加入血清终止消化,离心,弃去上清,收集离心获得的细胞;

[0014] C、将细胞以 $2 \times 10^6/\text{cm}^2$ 的密度接种至含10%FBS的DMEM培养基中,37℃、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度下培养,每隔一段时间换液一次并去除未贴壁细胞;待细胞融合率达到80%~90%时,消化细胞进行传代培养;等扩增到所需数量时,离心去除细胞以及碎片等,收集上清,过0.22 $\mu\text{m}$ 无菌滤膜,加入终浓度为10%(体积百分数)的聚乙二醇,混匀,4℃孵育8~14小时,离心,弃去上清,用PBS缓冲液重悬沉淀,加入终浓度为8%的聚乙二醇,再次孵育1小时,离心,PBS缓冲液重悬沉淀,即得间充质干细胞外泌体,分装,-80℃保存。

[0015] 优选的,所述的步骤B中,过100目滤网。

[0016] 优选的,所述的聚乙二醇为聚乙二醇8000。

[0017] 所述的含脐带间充质干细胞外泌体的修复抗衰护肤品的制备方法,包括以下步骤:

[0018] (1) 将间充质干细胞外泌体、甘露醇(赋形剂)和适量水混合混匀,真空冷冻干燥,得冻干粉(F相),备用;

[0019] (2) 将EDTA-2Na加入适量水中,加入黄原胶并加热至75~80℃,在黄原胶完全水合后,加入丁二醇、甘油和水溶性霍霍巴油,混匀,得A相,备用;

[0020] (3) 在80℃条件下,将橄榄油、霍霍巴油、角鲨烷、乳木果油、辛酸葵酸甘油三酯、聚二甲基硅氧烷、氢化卵磷脂和枯草杆菌脂肽钠混合混匀,得BD相,备用;所述的橄榄油、霍霍巴油、角鲨烷、乳木果油、辛酸葵酸甘油三酯和聚二甲基硅氧烷为B相,所述的氢化卵磷脂和枯草杆菌脂肽钠为D相;

[0021] (4) 将上述BD相加入A相中,在80℃下快速搅拌混匀,冷却至60~65℃,备用;

[0022] (5) 在40℃条件下将羟乙基纤维素溶于适量水中,得透明凝胶(C相);将透明凝胶

(C相)加入步骤(4)的物料中,冷却至35~40℃,加入PCA Na、尿素、透明质酸、β-葡聚糖、干细胞分泌素、血清白蛋白、神经酰胺-2、甘草酸二钾、视黄醇棕榈酸酯、积雪草提取物和维生素E醋酸酯的混合物(E相)和步骤(1)中的冻干粉(F相),混匀,即得。

[0023] 优选的,所述的步骤(1)中,所述真空冷冻干燥的具体操作方式为:将物料置于-70℃冻干机中,冷却至-50℃以下,预冻6h,抽真空8h,缓慢升温至-20℃,再以5℃/h的速度升温至25℃,保温干燥2h,即得。

[0024] 本发明的有益之处在于:本发明的含脐带间充质干细胞外泌体的修复抗衰护肤品,可有效保证干细胞外泌体的活性,并在无防腐剂和乳化剂的情况下最大限度地保证因子活性,配合多种肌肤养护成分,能够更好地修复肌肤屏障。

## 具体实施方式

[0025] 实施例1

[0026] 一种含脐带间充质干细胞外泌体的修复抗衰护肤品的制备方法,包括以下步骤:

[0027] (1)将间充质干细胞外泌体、甘露醇(赋形剂)和适量水混合混匀,真空冷冻干燥,得冻干粉(F相),备用;

[0028] (2)将EDTA-2Na加入适量水中,加入黄原胶并加热至78℃,在黄原胶完全水合后,加入丁二醇、甘油和水溶性霍霍巴油,混匀,得A相,备用;

[0029] (3)在80℃条件下,将橄榄油、霍霍巴油、角鲨烷、乳木果油、辛酸癸酸甘油三酯、聚二甲基硅氧烷、氢化卵磷脂和枯草杆菌脂肽钠混合混匀,得BD相,备用;所述的橄榄油、霍霍巴油、角鲨烷、乳木果油、辛酸癸酸甘油三酯和聚二甲基硅氧烷为B相,所述的氢化卵磷脂和枯草杆菌脂肽钠为D相;

[0030] (4)将上述BD相加入A相中,在80℃下快速搅拌混匀,冷却至62℃,备用;

[0031] (5)在40℃条件下将羟乙基纤维素溶于适量水中,得透明凝胶C相;将透明凝胶加入步骤(4)的物料中,冷却至36℃,加入PCA Na、尿素、透明质酸、β-葡聚糖、干细胞分泌素、血清白蛋白、神经酰胺-2、甘草酸二钾、视黄醇棕榈酸酯、积雪草提取物和维生素E醋酸酯的混合物(E相)和步骤(1)中的冻干粉(F相),混匀,即得。

[0032] 所述的步骤(1)中,所述真空冷冻干燥的具体操作方式为:将物料置于-70℃冻干机中,冷却至-50℃以下,预冻6h,抽真空8h,缓慢升温至-20℃,再以5℃/h的速度升温至25℃,保温干燥2h,即得。

[0033] 所述的间充质干细胞外泌体,为人的脐带间充质干细胞分泌的多种活性因子的混合物。

[0034] 所述的间充质干细胞外泌体的制备方法,包括以下步骤:

[0035] A、取胎盘,分离出绒毛膜,用PBS缓冲液冲洗去除红细胞,将绒毛膜剪成10~20mm<sup>3</sup>大小的组织块,加入胶原酶消化液进行消化;

[0036] B、取消化后的组织块,过滤得滤液1,剩余组织加入用胰蛋白酶进行,消化后,组织悬块过滤得滤液2;合并滤液1和滤液2,加入血清终止消化,离心,弃去上清,收集离心获得的细胞;

[0037] C、将细胞以 $2 \times 10^6/\text{cm}^2$ 的密度接种至含10%FBS的DMEM培养基中,37℃、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度下培养,每隔一段时间换液一次并去除未贴壁细胞;待细胞融合率达到82%时,消化

细胞进行传代培养;等扩增到所需数量时,离心去除细胞以及碎片等,收集上清,过0.22 $\mu$ m 无菌滤膜,加入终浓度为10% (体积百分数)的聚乙二醇,混匀,4 $^{\circ}$ C 孵育12小时,离心,弃去上清,用PBS缓冲液重悬沉淀,加入终浓度为8%的聚乙二醇,再次孵育1小时,离心,PBS缓冲液重悬沉淀,即得间充质干细胞外泌体,分装,-80 $^{\circ}$ C 保存。

[0038] 所述的步骤B中,过100目滤网。

[0039] 所述的聚乙二醇为聚乙二醇8000。

[0040] 所述的含脐带间充质干细胞外泌体的修复抗衰护肤品的组分组成如表1所示。

[0041] 表1:实施例1的修复抗衰护肤品的组分组成;

	成分	百分含量%
A 相	水	38.095
[0042]	EDTA-2Na	0.1
	黄原胶	0.18
	丁二醇	4

[0043]

	甘油	2
	水溶性霍霍巴油	0.5
B相	橄榄油	3
	霍霍巴油	2
	角鲨烷	0.5
	乳木果油	1
	辛酸葵酸甘油三酯	2
	聚二甲基硅氧烷	2
C相	水	30
	羟乙基纤维素	0.5
D相	氢化卵磷脂	1.5
	枯草杆菌脂肽钠	0.6
E相	PCA Na	0.5
	尿素	0.3
	1%透明质酸钠	0.5
	$\beta$ -葡聚糖	0.3
	干细胞分泌素	3
	血清白蛋白	0.1
	神经酰胺-2	0.1
	甘草酸二钾	0.1
	视黄醇棕榈酸酯	0.025
	积雪草提取物	0.5



	维生素 E 醋酸酯	0.5
[0044] F 相	间充质干细胞外泌体	0.6
	甘露醇	5.5
	合计	100

## [0045] 实施例2

[0046] 一种含脐带间充质干细胞外泌体的修复抗衰护肤品的制备方法,包括以下步骤:

[0047] (1) 将间充质干细胞外泌体、甘露醇(赋形剂)和适量水混合混匀,真空冷冻干燥,得冻干粉(F相),备用;

[0048] (2) 将EDTA-2Na加入适量水中,加入黄原胶并加热至80℃,在黄原胶完全水合后,加入丁二醇、甘油和水溶性霍霍巴油,混匀,得A相,备用;

[0049] (3) 在80℃条件下,将橄榄油、霍霍巴油、角鲨烷、乳木果油、辛酸癸酸甘油三酯、聚二甲基硅氧烷、氢化卵磷脂和枯草杆菌脂肽钠混合混匀,得BD相,备用;所述的橄榄油、霍霍巴油、角鲨烷、乳木果油、辛酸癸酸甘油三酯和聚二甲基硅氧烷为B相,所述的氢化卵磷脂和枯草杆菌脂肽钠为D相;

[0050] (4) 将上述BD相加入A相中,在80℃下快速搅拌混匀,冷却至60℃,备用;

[0051] (5) 在40℃条件下将羟乙基纤维素溶于适量水中,得透明凝胶C相;将透明凝胶加入步骤(4)的物料中,冷却至40℃,加入PCA Na、尿素、透明质酸、β-葡聚糖、干细胞分泌素、血清白蛋白、神经酰胺-2、甘草酸二钾、视黄醇棕榈酸酯、积雪草提取物和维生素E醋酸酯的混合物(E相)和步骤(1)中的冻干粉(F相),混匀,即得。

[0052] 所述的步骤(1)中,所述真空冷冻干燥的具体操作方式为:将物料置于-70℃冻干机中,冷却至-50℃以下,预冻6h,抽真空8h,缓慢升温至-20℃,再以5℃/h的速度升温至25℃,保温干燥2h,即得。

[0053] 所述的间充质干细胞外泌体,为人的脐带间充质干细胞分泌的多种活性因子的混合物。

[0054] 所述的间充质干细胞外泌体的制备方法,包括以下步骤:

[0055] A、取胎盘,分离出绒毛膜,用PBS缓冲液冲洗去除红细胞,将绒毛膜剪成10~20mm<sup>3</sup>大小的组织块,加入胶原酶消化液进行消化;

[0056] B、取消化后的组织块,过滤得滤液1,剩余组织加入用胰蛋白酶进行,消化后,组织悬块过滤得滤液2;合并滤液1和滤液2,加入血清终止消化,离心,弃去上清,收集离心获得的细胞;

[0057] C、将细胞以 $2 \times 10^6/\text{cm}^2$ 的密度接种至含10%FBS的DMEM培养基中,37℃、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度下培养,每隔一段时间换液一次并去除未贴壁细胞;待细胞融合率达到80%时,消化细胞进行传代培养;等扩增到所需数量时,离心去除细胞以及碎片等,收集上清,过0.22μm无菌滤膜,加入终浓度为10%(体积百分数)的聚乙二醇,混匀,4℃孵育14小时,离心,弃去上清,用PBS缓冲液重悬沉淀,加入终浓度为8%的聚乙二醇,再次孵育1小时,离心,PBS缓冲液重悬沉淀,即得间充质干细胞外泌体,分装,-80℃保存。

[0058] 所述的步骤B中,过100目滤网。

[0059] 所述的聚乙二醇为聚乙二醇8000。

[0060] 所述的含脐带间充质干细胞外泌体的修复抗衰护肤品的组分组成如表2所示。

[0061] 表2:实施例2的修复抗衰护肤品的组分组成;

[0062]

	成分	百分含量%
A相	水	37.48
	EDTA-2Na	0.25
	黄原胶	0.1
	丁二醇	5
	甘油	1
	水溶性霍霍巴油	0.6
B相	橄榄油	2
	霍霍巴油	2.5
	角鲨烷	0.3
	乳木果油	1.2
	辛酸癸酸甘油三酯	1.5
	聚二甲基硅氧烷	2.5
C相	水	32
	羟乙基纤维素	0.6
D相	氢化卵磷脂	1
	枯草杆菌脂肽钠	0.8
E相	PCA Na	0.4
	尿素	0.5
	1%透明质酸钠	0.4
	$\beta$ -葡聚糖	0.5
	干细胞分泌素	2

	血清白蛋白	0.15
	神经酰胺-2	0.05
	甘草酸二钾	0.15
	视黄醇棕榈酸酯	0.02
[0063]	积雪草提取物	0.6
	维生素 E 醋酸酯	0.4
F 相	间充质干细胞外泌体	1
	甘露醇	5
	合计	100

[0064] 实施例3

[0065] 一种含脐带间充质干细胞外泌体的修复抗衰护肤品的制备方法,包括以下步骤:

[0066] (1) 将间充质干细胞外泌体、甘露醇(赋形剂)和适量水混合混匀,真空冷冻干燥,得冻干粉(F相),备用;

[0067] (2) 将EDTA-2Na加入适量水中,加入黄原胶并加热至75℃,在黄原胶完全水合后,加入丁二醇、甘油和水溶性霍霍巴油,混匀,得A相,备用;

[0068] (3) 在80℃条件下,将橄榄油、霍霍巴油、角鲨烷、乳木果油、辛酸癸酸甘油三酯、聚二甲基硅氧烷、氢化卵磷脂和枯草杆菌脂肽钠混合混匀,得BD相,备用;所述的橄榄油、霍霍巴油、角鲨烷、乳木果油、辛酸癸酸甘油三酯和聚二甲基硅氧烷为B相,所述的氢化卵磷脂和枯草杆菌脂肽钠为D相;

[0069] (4) 将上述BD相加入A相中,在80℃下快速搅拌混匀,冷却至65℃,备用;

[0070] (5) 在40℃条件下将羟乙基纤维素溶于适量水中,得透明凝胶C相;将透明凝胶加入步骤(4)的物料中,冷却至35℃,加入PCA Na、尿素、透明质酸、β-葡聚糖、干细胞分泌素、血清白蛋白、神经酰胺-2、甘草酸二钾、视黄醇棕榈酸酯、积雪草提取物和维生素E醋酸酯的混合物(E相)和步骤(1)中的冻干粉(F相),混匀,即得。

[0071] 所述的步骤(1)中,所述真空冷冻干燥的具体操作方式为:将物料置于-70℃冻干机中,冷却至-50℃以下,预冻6h,抽真空8h,缓慢升温至-20℃,再以5℃/h的速度升温至25℃,保温干燥2h,即得。

[0072] 所述的间充质干细胞外泌体,为人的脐带间充质干细胞分泌的多种活性因子的混合物。

[0073] 所述的间充质干细胞外泌体的制备方法,包括以下步骤:

[0074] A、取胎盘,分离出绒毛膜,用PBS缓冲液冲洗去除红细胞,将绒毛膜剪成10~20mm<sup>3</sup>大小的组织块,加入胶原酶消化液进行消化;

[0075] B、取消化后的组织块,过滤得滤液1,剩余组织加入用胰蛋白酶进行,消化后,组织

悬块过滤得滤液2;合并滤液1和滤液2,加入血清终止消化,离心,弃去上清,收集离心获得的细胞;

[0076] C、将细胞以 $2 \times 10^6/\text{cm}^2$ 的密度接种至含10%FBS的DMEM培养基中,37℃、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度下培养,每隔一段时间换液一次并去除未贴壁细胞;待细胞融合率达到90%时,消化细胞进行传代培养;等扩增到所需数量时,离心去除细胞以及碎片等,收集上清,过0.22μm无菌滤膜,加入终浓度为10% (体积百分数)的聚乙二醇,混匀,4℃孵育8小时,离心,弃去上清,用PBS缓冲液重悬沉淀,加入终浓度为8%的聚乙二醇,再次孵育1小时,离心,PBS缓冲液重悬沉淀,即得间充质干细胞外泌体,分装,-80℃保存。

[0077] 所述的步骤B中,过100目滤网。

[0078] 所述的聚乙二醇为聚乙二醇8000。

[0079] 所述的含脐带间充质干细胞外泌体的修复抗衰护肤品的组分组成如表3所示。

[0080] 表3:实施例3的修复抗衰护肤品的组分组成;

[0081]

	成分	百分含量%
A相	水	33.27
	EDTA-2Na	0.05
	黄原胶	0.25
	丁二醇	3
	甘油	3
	水溶性霍霍巴油	0.3
B相	橄榄油	10
	霍霍巴油	1.5
	角鲨烷	0.6
	乳木果油	0.8
	辛酸癸酸甘油三酯	2.5
C相	聚二甲基硅氧烷	1.5
	水	25
	羟乙基纤维素	0.4
D相	氢化卵磷脂	2
	枯草杆菌脂肽钠	0.4

[0082]	E 相	PCA Na	0.6
		尿素	0.2
		1%透明质酸钠	0.6
		$\beta$ -葡聚糖	0.2
		干细胞分泌素	5
		血清白蛋白	0.05
		神经酰胺-2	0.15
		甘草酸二钾	0.5
		视黄醇棕榈酸酯	0.03
		积雪草提取物	0.4
		维生素 E 醋酸酯	0.6
	F 相	间充质干细胞外泌体	0.1
		甘露醇	7
合计		100	

[0083] 实施例4

[0084] 一种含脐带间充质干细胞外泌体的修复抗衰护肤品的制备方法,包括以下步骤:

[0085] (1) 将间充质干细胞外泌体、甘露醇(赋形剂)和适量水混合混匀,真空冷冻干燥,得冻干粉(F相),备用;

[0086] (2) 将EDTA-2Na加入适量水中,加入黄原胶并加热至78℃,在黄原胶完全水合后,加入丁二醇、甘油和水溶性霍霍巴油,混匀,得A相,备用;

[0087] (3) 在80℃条件下,将橄榄油、霍霍巴油、角鲨烷、乳木果油、辛酸癸酸甘油三酯、聚二甲基硅氧烷、氢化卵磷脂和枯草杆菌脂肽钠混合混匀,得BD相,备用;所述的橄榄油、霍霍巴油、角鲨烷、乳木果油、辛酸癸酸甘油三酯和聚二甲基硅氧烷为B相,所述的氢化卵磷脂和枯草杆菌脂肽钠为D相;

[0088] (4) 将上述BD相加入A相中,在80℃下快速搅拌混匀,冷却至62℃,备用;

[0089] (5) 在40℃条件下将羟乙基纤维素溶于适量水中,得透明凝胶C相;将透明凝胶加入步骤(4)的物料中,冷却至36℃,加入PCA Na、尿素、透明质酸、 $\beta$ -葡聚糖、干细胞分泌素、血清白蛋白和神经酰胺-2的混合物(E相)和步骤(1)中的冻干粉(F相),混匀,即得。

[0090] 所述的步骤(1)中,所述真空冷冻干燥的具体操作方式为:将物料置于-70℃冻干机中,冷却至-50℃以下,预冻6h,抽真空8h,缓慢升温至-20℃,再以5℃/h的速度升温至25

℃,保温干燥2h,即得。

[0091] 所述的间充质干细胞外泌体,为人的脐带间充质干细胞分泌的多种活性因子的混合物。

[0092] 所述的间充质干细胞外泌体的制备方法,包括以下步骤:

[0093] A、取胎盘,分离出绒毛膜,用PBS缓冲液冲洗去除红细胞,将绒毛膜剪成10~20mm<sup>3</sup>大小的组织块,加入胶原酶消化液进行消化;

[0094] B、取消化后的组织块,过滤得滤液1,剩余组织加入用胰蛋白酶进行,消化后,组织悬块过滤得滤液2;合并滤液1和滤液2,加入血清终止消化,离心,弃去上清,收集离心获得的细胞;

[0095] C、将细胞以 $2 \times 10^6/\text{cm}^2$ 的密度接种至含10%FBS的DMEM培养基中,37℃、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度下培养,每隔一段时间换液一次并去除未贴壁细胞;待细胞融合率达到82%时,消化细胞进行传代培养;等扩增到所需数量时,离心去除细胞以及碎片等,收集上清,过0.22μm无菌滤膜,加入终浓度为10% (体积百分数)的聚乙二醇,混匀,4℃孵育12小时,离心,弃去上清,用PBS缓冲液重悬沉淀,加入终浓度为8%的聚乙二醇,再次孵育1小时,离心,PBS缓冲液重悬沉淀,即得间充质干细胞外泌体,分装,-80℃保存。

[0096] 所述的步骤B中,过100目滤网。

[0097] 所述的聚乙二醇为聚乙二醇8000。

[0098] 所述的含脐带间充质干细胞外泌体的修复抗衰护肤品的组分组成如表4所示。

[0099] 表4:实施例4的修复抗衰护肤品的组分组成;

	成分	百分含量%
A 相	水	39.22
	EDTA-2Na	0.1
	黄原胶	0.18
	丁二醇	4
	甘油	2
	水溶性霍霍巴油	0.5
B 相	橄榄油	3
	霍霍巴油	2
	角鲨烷	0.5
	乳木果油	1
	辛酸癸酸甘油三酯	2
	聚二甲基硅氧烷	2

[0100]

C 相	水	30
	羟乙基纤维素	0.5
D 相	氢化卵磷脂	1.5
	枯草杆菌脂肽钠	0.6
E 相	PCA Na	0.5
	尿素	0.3
	1%透明质酸钠	0.5
	$\beta$ -葡聚糖	0.3
	干细胞分泌素	3
	血清白蛋白	0.1
F 相	神经酰胺-2	0.1
	间充质干细胞外泌体	0.6
	甘露醇	5.5
合计		100

## [0102] 实施例5

[0103] 一种含脐带间充质干细胞外泌体的修复抗衰护肤品的制备方法,包括以下步骤:

[0104] (1) 将间充质干细胞外泌体、甘露醇(赋形剂)和适量水混合混匀,真空冷冻干燥,得冻干粉(F相),备用;

[0105] (2) 将EDTA-2Na加入适量水中,加入黄原胶并加热至78℃,在黄原胶完全水合后,加入丁二醇、甘油和水溶性霍霍巴油,混匀,得A相,备用;

[0106] (3) 在80℃条件下,将橄榄油、聚二甲基硅氧烷、氢化卵磷脂和枯草杆菌脂肽钠混合混匀,得BD相,备用;所述的橄榄油和聚二甲基硅氧烷为B相,所述的氢化卵磷脂和枯草杆菌脂肽钠为D相;

[0107] (4) 将上述BD相加入A相中,在80℃下快速搅拌混匀,冷却至62℃,备用;

[0108] (5) 在40℃条件下将羟乙基纤维素溶于适量水中,得透明凝胶C相;将透明凝胶加入步骤(4)的物料中,冷却至36℃,加入PCA Na、尿素、透明质酸、 $\beta$ -葡聚糖、干细胞分泌素、血清白蛋白、神经酰胺-2、甘草酸二钾、视黄醇棕榈酸酯、积雪草提取物和维生素E醋酸酯的混合物(E相)和步骤(1)中的冻干粉(F相),混匀,即得。

[0109] 所述的步骤(1)中,所述真空冷冻干燥的具体操作方式为:将物料置于-70℃冻干机中,冷却至-50℃以下,预冻6h,抽真空8h,缓慢升温至-20℃,再以5℃/h的速度升温至25

℃,保温干燥2h,即得。

[0110] 所述的间充质干细胞外泌体,为人的脐带间充质干细胞分泌的多种活性因子的混合物。

[0111] 所述的间充质干细胞外泌体的制备方法,包括以下步骤:

[0112] A、取胎盘,分离出绒毛膜,用PBS缓冲液冲洗去除红细胞,将绒毛膜剪成10~20mm<sup>3</sup>大小的组织块,加入胶原酶消化液进行消化;

[0113] B、取消化后的组织块,过滤得滤液1,剩余组织加入用胰蛋白酶进行,消化后,组织悬块过滤得滤液2;合并滤液1和滤液2,加入血清终止消化,离心,弃去上清,收集离心获得的细胞;

[0114] C、将细胞以 $2 \times 10^6/\text{cm}^2$ 的密度接种至含10%FBS的DMEM培养基中,37℃、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度下培养,每隔一段时间换液一次并去除未贴壁细胞;待细胞融合率达到82%时,消化细胞进行传代培养;等扩增到所需数量时,离心去除细胞以及碎片等,收集上清,过0.22μm无菌滤膜,加入终浓度为10% (体积百分数)的聚乙二醇,混匀,4℃孵育12小时,离心,弃去上清,用PBS缓冲液重悬沉淀,加入终浓度为8%的聚乙二醇,再次孵育1小时,离心,PBS缓冲液重悬沉淀,即得间充质干细胞外泌体,分装,-80℃保存。

[0115] 所述的步骤B中,过100目滤网。

[0116] 所述的聚乙二醇为聚乙二醇8000。

[0117] 所述的含脐带间充质干细胞外泌体的修复抗衰护肤品的组分组成如表5所示。

[0118] 表5:实施例5的修复抗衰护肤品的组分组成;

[0119]

	成分	百分含量%
A 相	水	43.595
	EDTA-2Na	0.1
	黄原胶	0.18
	丁二醇	4
	甘油	2
B 相	水溶性霍霍巴油	0.5
	橄榄油	3
C 相	聚二甲基硅氧烷	2
	水	30
D 相	羟乙基纤维素	0.5
	氢化卵磷脂	1.5
	枯草杆菌脂肽钠	0.6



[0120]	E 相	PCA Na	0.5	
		尿素	0.3	
		1%透明质酸钠	0.5	
		$\beta$ -葡聚糖	0.3	
		干细胞分泌素	3	
		血清白蛋白	0.1	
		神经酰胺-2	0.1	
		甘草酸二钾	0.1	
		视黄醇棕榈酸酯	0.025	
		积雪草提取物	0.5	
		维生素 E 醋酸酯	0.5	
		F 相	间充质干细胞外泌体	0.6
			甘露醇	5.5
	合计		100	

[0121] 对比例1

[0122] 将实施例1中的含脐带间充质干细胞外泌体的修复抗衰护肤品的组分组成如表6所示。

[0123] 表6:对比例1的修复抗衰护肤品的组分组成;

	成分	百分含量%	
[0124]	A 相	水	44.72
		EDTA-2Na	0.1
		黄原胶	0.18

[0125]

	丁二醇	4
	甘油	2
	水溶性霍霍巴油	0.5
B 相	橄榄油	3
	聚二甲基硅氧烷	2
C 相	水	30
	羟乙基纤维素	0.5
D 相	氢化卵磷脂	1.5
	枯草杆菌脂肽钠	0.6
E 相	PCA Na	0.5
	尿素	0.3
	1%透明质酸钠	0.5
	$\beta$ -葡聚糖	0.3
	干细胞分泌素	3
	血清白蛋白	0.1
	神经酰胺-2	0.1
F 相	间充质干细胞外泌体	0.6
	甘露醇	5.5
	合计	100

[0126] 试验例抗衰老护肤品抗皮肤老化临床观察

[0127] 试验方法:筛选400例皮肤出现老化的女性受试志愿者,年龄28~50岁,平均年龄35岁。

[0128] 入选标准:皮肤干燥,弹性降低,出现皱纹、色素沉着、肤色灰暗等皮肤老化现象;在整个试验期间愿意避免日晒,或接触阳光时面部使用SPF $\geq$ 30的防晒产品;在整个试验期

间不使用其他抗衰老产品。

[0129] 400例女性受试志愿者随机分为5组,分别为对照组、实施例1、4、5组、对比组,每组80例。其中,对照组受试者使用南京温博生物科技有限公司销售的含脐带间充质干细胞外泌体的抗皮肤衰老的精华液,早、晚洁面后取适量的精华液涂抹在面部。实施例1、4、5组和对比组受试者分别使用本发明实施例1、实施例4和实施例5、对比例1制得的抗衰老护肤品,早、晚洁面后取适量的护肤品涂抹在面部。各组整个试验时间为90d,记录试验期间发生的不良反应,并对受试者进行效果评价。

[0130] 皮肤老化评估:通过观察受试者的5个受试区的皱纹来评价(眉间纹、前额皱纹、鱼尾纹、鼻唇沟、唇周皱纹)。

[0131] 评判标准:

[0132] 没有皱纹;

[0133] 轻度:有2~3条浅皱纹,长度<1.5cm;

[0134] 中度:有2~6条浅皱纹,长度<3cm;

[0135] 重度:有数条主皱纹,长度达4cm,同时伴有浅皱纹。

[0136] 安全性评估:主要评价使用产品后受试者出现轻微不适、红斑、干燥、瘙痒和刺痛等不良反应的发生情况。在第90d对受试者采用无创性仪器检测受试部位的含水量、油脂含量,进行统计分析。

[0137] 试验结果:如表7、表8、表9所示。

[0138] 表7:试验结束后各组受试者的皮肤老化评估;

[0139]

组别	没有皱纹(例数)	轻度(例数)	中度(例数)	重度(例数)
对照组	58	16	4	2
实施例1	68	10	2	0
实施例4	61	16	3	0
实施例5	64	11	3	0
对比例	42	24	10	4

[0140] 表8:试验期间各组受试者的不良反应评价;

[0141]

组别	无(例数)	轻微不适(例数)	红斑(例数)	干燥(例数)	瘙痒(例数)	刺痛(例数)
对照组	60	10	3	3	1	3
实施例1	75	3	0	2	0	0
实施例4	70	5	0	3	1	0
实施例5	70	6	0	2	2	0
对比例1	59	9	3	5	2	2

[0142] 表9:各组受试者的试验期间的角质层含水量和油脂含量评价;

组别	0d		第90d	
	角质层含水量 (A.U)	油脂含量 (ug/cm <sup>2</sup> )	角质层含水量 (A.U)	油脂含量 (ug/cm <sup>2</sup> )
[0143] 对照组	72.12±15.20	80.46±17.26	115.34±25.15	139.24±22.05
实施例1	69.47±17.31	78.70±18.79	139.60±30.72	142.32±28.10
实施例4	73.50±18.72	81.25±18.10	121.42±29.37	138.87±25.01
实施例5	70.28±18.62	80.54±19.32	124.50±29.74	138.49±26.38
对比例1	72.30±17.28	81.10±17.69	102.59±23.62	115.38±25.39

[0144] 以上所述,仅为本发明较佳的具体实施方式,但本发明的保护范围并不局限于此,任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内,根据本发明的技术方案及其发明构思加以等同替换或改变,都应涵盖在本发明的保护范围之内。