



(21) 申请号 202410471016.4

(22) 申请日 2024.04.18

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 118436552 A

(43) 申请公布日 2024.08.06

(73) 专利权人 梅眸生物医药股份有限公司

地址 250022 山东省济南市莱芜高新区李

陈庄工业园金源路6号

专利权人 山东美貌制药有限公司

(72) 发明人 曾小微 王峥 叶天赐 凌沛学

亓金亮 王鹏

(74) 专利代理机构 广州市科丰知识产权代理事

务所(普通合伙) 44467

专利代理师 罗啸秋

(51) Int.Cl.

A61K 8/73 (2006.01)

A61K 8/60 (2006.01)

A61K 8/34 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

(56) 对比文件

US 2010233079 A1, 2010.09.16

WO 2022036159 A2, 2022.02.17

审查员 王伟英

权利要求书1页 说明书12页

(54) 发明名称

一种线粒体组合物及其应用、日化品

(57) 摘要

本申请属于化妆品生产技术领域,公开了一种线粒体组合物,该组合物按质量百分数计含有0.01~1%的HA20,0.0001~1%的肝素钠,0.1~2%的海藻糖,0.01~1%的M6P-LC以及余量的水,其中HA20能够保护UV照射下的线粒体;肝素钠对血管内皮细胞线粒体损伤和凋亡起到保护作用;M6P-LC能够增强ATP合成酶的功能,同时兼具抗氧化和DPPH自由基清除效果,从而有利于增加ATP生成,并通过激活自噬过程来维护线粒体健康;海藻糖则有助于保持线粒体膜结构的完整性,促进ATP合成效率上升以及跨膜电位的增强,并且以上成分之间的相互协同作用共同提升了线粒体遭受损伤后的自我修复及自噬清理能力。此外,本申请还公开了上述线粒体组合物的用途以及一种日化品。

1. 一种线粒体组合物,其特征在于,按质量百分数计,包括以下组分:

HA20	0.0125 ~ 0.2%;
肝素钠	0.00025 ~ 0.5%;
海藻糖	0.22 ~ 1%;
M6P-LC	0.062 ~ 1%;
去离子水	添加至总质量百分数达到100%;

所述M6P-LC为甘油、水、甘露糖磷酸酯钠、甘露糖的混合物,且甘油、水、甘露糖磷酸酯钠、甘露糖的质量比为50:45.1:3.4:1.5;

所述HA20为平均分子量为200KDa的全分子量水解透明质酸钠,同时包含小分子量水解透明质酸钠、中分子量水解透明质酸钠、大分子量水解透明质酸钠。

2. 根据权利要求1所述的线粒体组合物,其特征在于,包括以下组分:

HA20	0.0125 ~ 0.05%;
肝素钠	0.00025 ~ 0.001%;
海藻糖	0.22 ~ 0.875%;
M6P-LC	0.062 ~ 0.25%;
去离子水	添加至总质量百分数达到100%。

3. 通过权利要求1-2中任一所述的线粒体组合物制备日化品的用途。

4. 一种日化品,其特征在于,含有0.1 ~ 5wt%的如权利要求1-2中任一所述的线粒体组合物。

5. 根据权利要求4所述的日化品,其特征在于,所述日化品为水剂、膏霜、乳液、喷雾。

6. 根据权利要求4所述的日化品,其特征在于,所述日化品为啫喱、精华液、爽肤水、面膜、洁面乳。

## 一种线粒体组合物及其应用、日化品

### 技术领域

[0001] 本发明涉及化妆品生产技术领域,尤其涉及一种线粒体组合物及其应用、日化品。

### 背景技术

[0002] 皮肤衰老分为年龄增长造成的内源性衰老和日晒、环境污染、吸烟、生活方式等因素所致的外源性衰老,其关键特征是线粒体功能障碍的直接后果,这些衰老表型包括皱纹、头发变白和脱落、色素沉着不均以及伤口愈合缓慢等。在分子水平上,衰老皮肤的特征是真皮层和表皮层中同时存在的膜电位丧失、ROS水平升高、线粒体受损、导致核和mtDNA突变的DNA损伤、由于酶改变引起的呼吸链缺陷、细胞调节改变和疾病进展等。美国科学家哈曼(Harman)在20世纪50年代提出自由基损伤理论,认为线粒体损伤及功能障碍是衰老的始发环节,高水平ROS具有细胞毒性,作为能量代谢副产物影响线粒体功能,造成脂质、蛋白质、DNA损伤,而线粒体质量、活性改变及电子传递链复合体的生物合成直接影响细胞衰老。

[0003] 随着年龄不断增长,人类总会与衰老不期而遇。2023年1月,国际顶级学术期刊Cell上发表了一篇里程碑综述长文Hallmarks of aging:An expanding universe,介绍了机体衰老的十二大特征。衰老的所有十二个特征都彼此密切相关。

[0004] 其中,线粒体功能障碍,一直是衰老研究的主要方向。线粒体不仅是细胞的力源,而且也是炎症触发因素(当活性氧或mtDNA从线粒体中泄漏时,分别导致炎症小体或DNA传感器的激活)和细胞死亡因素(当半胱天冬酶的激活剂、核酸酶或其他致命酶从膜间隙中释放出来)。

[0005] 随着年龄的增长,线粒体会因某些机制(包括线粒体DNA突变的积累、蛋白质稳态不足、细胞器周转减少和线粒体动力学变化)而出现功能障碍。线粒体功能障碍,损害了线粒体对细胞生物能量的贡献,增强了活性氧的产生,并可能引发线粒体膜的高度通透性,导致炎症发生和细胞死亡。线粒体功能正常对于维持健康至关重要,线粒体功能障碍会导致衰老。

[0006] 线粒体是细胞结构的重要组成部分,具有多种代谢和信号传导功能,是真核细胞的生物能量学中心,在能量生成和氧化应激中起首要作用的细胞器。

[0007] 线粒体不仅提供细胞90%以上的能量来源,而且深度调控能量代谢、ROS与自由基、氧化应激、炎症、伤口愈合、自噬、钙稳态、干细胞、组织重建、色素沉着、生物节律和毛发生长等功能。另外,线粒体被认为是细胞机体衰老的主要原因,线粒体功能障碍导致皮肤老化与损伤,而靶向线粒体有助于恢复皮肤活力,精准解决抗衰难题。

[0008] 线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential)是指存在于线粒体内外膜之间的电势差。线粒体膜电位由内外膜上的离子通道和转运蛋白所调节,在维持线粒体功能和能量代谢中起着重要的作用。正常情况下,线粒体膜电位通过呼吸链复合物在线粒体内外膜之间的电子传递过程中产生,这个电子传递过程与质子泵和ATP合酶相互作用,从而产生ATP。然而在外界刺激下(如UV辐照),线粒体膜电位可能丧失/下降,线粒体内的电子传递过程受到干扰,导致产生更多的自由基和ROS(活性氧自由基),这一过程可能进一步引发

细胞凋亡途径,对细胞的生存和功能产生负面影响。

[0009] 线粒体自噬(mitophagy)是细胞内线粒体的质量和数量保持平衡的一种调控机制,能及时清除功能障碍或多余的线粒体,在维持细胞稳态过程中具有重要意义。PINK1 (PTEN—induced putative kinase protein1)是一种丝氨酸/苏氨酸激酶是线粒体自噬发生的关键蛋白。正常状态下,PINK1可通过线粒体外膜上线粒体外膜转运酶(translocase outer membrane,TOM)复合物作用,进入线粒体膜间腔,其后与内膜上的TIM(translocase inner membrane)复合物相互作用,进一步转移至线粒体内膜上,被内膜上的早老素相关菱形蛋白(presenilin—associated rhomboid like protein,PARL)分解,将其降解维持其低表达水平。

[0010] 当线粒体处于衰老的状态下,线粒体膜电位下降,PINK1降解减缓或者消失,使PINK1在线粒体外膜聚集。其后血浆中Parkin亦聚集到受损的线粒体上,泛素化线粒体阴离子通道蛋白VDAC1(voltage dependent anion channel1)、融合蛋白酶2(GTPase mitofusin2,MFN2)等,成为线粒体自噬诱导的信号。

[0011] 中国专利申请202111653139.2公开了一种易于吸收、能够修复激素脸的护肤组合物及其应用,按重量份计,其原料包括:保湿剂、修复组分、抗敏组合物、营养剂。该方案中保湿剂、修复组分、抗敏组合物、营养剂的加入,使所得护肤组合物易吸收,可以恢复肌肤的正常运转功能、调整肌肤结构组织、增强肌肤代谢功能,具有显著的修复激素脸的效果。而且所得的护肤组合物还具有美白、补水保湿、消炎、抗菌的作用,同时可以一定程度上起到促进组织再生、淡化疤痕、紧致肌肤、延肌肤衰老的作用,实现护肤与功能兼具;

[0012] 进一步观察该方案的说明书可见,该方案中其保湿剂选自赤藓醇、木糖醇、丝氨酸、甘氨酸、丙氨酸、海藻糖、天冬氨酸、缬氨酸、麦芽糖、精氨酸、异亮氨酸、葡萄糖、亮氨酸、果糖、谷氨酸、脯氨酸、乳酸钠、尿囊素、甜菜碱、透明质酸钠、维生素B、甘油、丁二醇中的一种或多种;

[0013] 该方案中其营养剂选自维生素E乙酸酯、肌醇、弹力蛋白、藻提取物、胶原蛋白、尿囊素、胶原蛋白肽、乳白鱼肝油、肝素钠、髓杪椶叶提取物、蜂蜜中的一种或多种;

[0014] 由此可见,在本方案中透明质酸钠、海藻糖更多的作为保湿功效成分,而肝素钠更多的作为营养成分被添加。

[0015] 中国专利申请202111538795.8公开了一种清爽保湿、美白抗敏的护肤品及其应用,通过将A组份原料在特定温度下与B组分原料混合,并搅拌均匀,降温至特定温度条件下,逐一加入C组分原料,搅拌均匀降至室温后,制备得到一种清爽保湿、美白抗敏的护肤品,其理化性质稳定,具有优异的长效滋润保湿、美白舒缓修复过敏肌肤,温和无刺激等功效;

[0016] 进一步观察该方案的说明书可见,该方案中的A组分由醇类化合物、粘度控制剂、表面活性剂、调理剂、缓释剂组成,其中调理剂包括尿囊素、透明质酸钠、甜菜碱、水解透明质酸钠、海藻糖、吡咯烷酮羧酸钠中的一种或几种的组合;

[0017] 并且观察该方案说明书第46段可知,该方案通过调理剂、修护剂、增效剂,三者协同作用,修护剂中具有长链结构的分子的活性基团通过分子间相互作用与增效剂中的活性基团紧密相连,其分子链相互缠结,形成包覆结构,将活性成分紧密的包覆在所形成的包覆结构中,提高了活性成分的理化稳定性,二者与调理剂中的具有长链结构的透明质酸钠及

具有短链结构的尿囊素、甜菜碱通过分子链上活性基团的相互作用,通过长、短链间的分子间相互作用,进一步提高了包覆结构的稳定性,由此可见,该方案中调理剂、修护剂、增效剂三者缺少任一者后,三者间的协同作用将被打破。

[0018] 中国专利申请202310939814.0公开了一种舒缓抗皱组合物,该方案所公开的舒缓抗皱组合物包括以下重量份的组分:甘露糖磷酸酯钠0.0289-0.1020份、甘露糖0.0128-0.0450份、桃树脂提取物0.1000-0.2500份、马齿苋提取物8.4686-19.9260份、重组Ⅲ型人源化胶原蛋白0.0500-0.1200份、羟丙基四氢吡喃三醇0.3500-1.0000份、蛭提取物0.0012-0.0060份。

[0019] 该方案选择甘露糖磷酸酯钠、甘露糖、桃树脂提取物搭配其他组分,协同作用,帮助改善细纹和皱纹,解决熬夜后的黑眼圈问题;该组合物用于制备舒缓抗皱眼膜,利用生物磁眼膜和微热感循环技术促进有效活性物充分吸收。

[0020] 本方案需要解决的问题:如何提供一种能够促进损伤后线粒体自噬能力和促进ATP生成的线粒体组合物。

## 发明内容

[0021] 本发明的目的是提供一种线粒体组合物,该组合物能够促进线粒体受到损伤后的自噬能力并促进ATP生成,进而及时清除功能障碍或多余的线粒体。

[0022] 为实现上述目的,本申请公开了一种线粒体组合物,按质量百分数计,包括以下组分:

	HA20	0.01~1%;
[0023]	肝素钠	0.0001~1%;
	海藻糖	0.1~2%;
	M6P-LC	0.01~1%;
[0024]	去离子水	添加至总质量百分数达到 100%。

[0025] HA20能够吸附周围的水分子,形成一层保湿膜,有效锁住水分,防止水分的流失,从而保持皮肤水分充足,同时HA20可以增强皮肤屏障功能,提高皮肤的保护能力,减少外界刺激对皮肤的损害,帮助皮肤恢复健康状态,并且HA20还能够填充皮肤表面的细小皱纹和瑕疵,使皮肤变得更加光滑柔软;

[0026] 肝素钠具有抗氧化性质,可以中和自由基,减少氧化应激对皮肤的损害,从而延缓皮肤衰老过程,它还可以促进胶原蛋白和弹性蛋白的合成,提高皮肤弹性,减少皱纹和细纹的出现,使肌肤更加紧致,并且肝素钠具有很强的保湿能力,能够吸附并保持水分子,形成一层保湿膜,有效锁住水分,保持皮肤水润,这有助于改善皮肤干燥、粗糙等问题,使肌肤更加柔软和光滑;

[0027] 海藻糖能够吸附并保持水分子,形成一层保湿膜,有效锁住水分,防止水分的流失,从而保持皮肤水分充足。这有助于改善皮肤干燥、紧绷等问题,使肌肤更加柔软和有弹性,同时海藻糖还具有一定的抗炎性质,可以减轻皮肤的炎症反应,缓解皮肤发红、瘙痒等不适症状,除此之外,海藻糖还具有一定的抗氧化性质,可以中和自由基,减少氧化应激对

皮肤的损害,有助于延缓皮肤衰老过程;

[0028] M6P-LC为甘油、水、甘露糖磷酸酯钠、甘露糖的混合物,其具有一定的抗氧化性质,可以中和自由基,减少氧化应激对皮肤的损害。这有助于保护皮肤免受环境污染和紫外线辐射的伤害,延缓皮肤衰老过程,并且还具有良好的保湿能力,能够吸附并保持水分子,形成一层保湿膜,有效锁住水分,防止水分的流失;

[0029] 在本申请所公开的组分当中,HA20能够保护UV照射下的线粒体;肝素钠对血管内皮细胞线粒体损伤和凋亡起到保护作用;M6P-LC能够增强ATP合成酶的功能,同时兼具抗氧化和DPPH自由基清除效果,从而有利于增加ATP生成,并通过激活自噬过程来维护线粒体健康;海藻糖则有助于保持线粒体膜结构的完整性,促进ATP合成效率上升以及跨膜电位的增强,并能有效清除自由基以保护线粒体免受氧化损伤,此外还能够通过启动自噬机制,及时清除功能异常或过剩的线粒体。

[0030] 并且以上成分之间的相互协同作用共同提升了线粒体遭受损伤后的自我修复及自噬清理能力,同时有效地促进了ATP的合成。

[0031] 优选地,包括以下组分:

HA20	0.0125~0.2%;
------	--------------

肝素钠	0.00025~0.5%;
-----	---------------

[0032] 海藻糖 0.22~1%;

M6P-LC	0.062~1%;
--------	-----------

去离子水	添加至总质量百分数达到 100%。
------	-------------------

[0033] 优选地,包括以下组分:

HA20	0.0125~0.05%;
------	---------------

肝素钠	0.00025~0.001%;
-----	-----------------

[0034] 海藻糖 0.22~0.875%;

M6P-LC	0.062~0.25%;
--------	--------------

去离子水	添加至总质量百分数达到 100%。
------	-------------------

[0035] 此外,本申请还公开了通过上述的线粒体组合物制备日化品的用途。

[0036] 此外,本申请还公开了一种日化品,含有0.1~5wt%的如上述的线粒体组合物。

[0037] 优选地,所述日化品为水剂、膏霜、乳液、喷雾。

[0038] 优选地,所述日化品为啫喱、精华液、爽肤水、面膜、洁面乳。

[0039] 本申请的有益效果是:

[0040] 本申请所公开的线粒体组合物中,HA20能够保护UV照射下的线粒体;肝素钠对血管内皮细胞线粒体损伤和凋亡起到保护作用;M6P-LC能够增强ATP合成酶的功能,同时兼具抗氧化和DPPH自由基清除效果,从而有利于增加ATP生成,并通过激活自噬过程来维护线粒体健康;海藻糖则有助于保持线粒体膜结构的完整性,促进ATP合成效率上升以及跨膜电位的增强,并能有效清除自由基以保护线粒体免受氧化损伤,此外还能够通过启动自噬机制,

及时清除功能异常或过剩的线粒体。

[0041] 并且以上成分之间的相互协同作用共同提升了线粒体遭受损伤后的自我修复及自噬清理能力,同时有效地促进了ATP的合成。

### 具体实施方式

[0042] 下面将结合本发明的实施例,对本发明进行清楚、完整的描述,在本发明的描述中,需要说明的是,实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市售购买获得的常规产品。

[0043] 在进行实施例的展示之前,先对实施例中各原料的基本信息做出以下必要的说明,其中原料、中文名称及其供应商、生物学信息介绍如表1所示:

[0044] 表1

[0045]	原料名称	中文名称	供应商及信息介绍
	HA20	水解透明质酸钠	购自山东贯天下生物科技有限公司,全分子量的且平均分子量为( $2 \times 10^5$ Da)的水解透明质酸钠。
	肝素钠	肝素钠	购自山东绅联药业股份有限公司,分子量为15000~19000。
	海藻糖	海藻糖	购自 Hayashibara Co., Ltd., 分子式为 $C_{12}H_{22}O_{11}$ 。
	M6P-LC	\	购自北京焉支山科技有限公司。

[0046] 需要说明的是,M6P-LC为甘油、水、甘露糖磷酸酯钠、甘露糖的混合物,且甘油、水、甘露糖磷酸酯钠、甘露糖的质量比为50:45.1:3.4:1.5。

[0047] 同时,需要进一步说明的是,实施例及对比例中,线粒体组合物的制备方法为:

[0048] 步骤1:清洁并消毒所需设备,准确称量组合物中的各组分原料,用干净消毒好的器皿盛放备用。

[0049] 步骤2:将原料HA20、海藻糖加入水锅中,搅拌升温至80~85℃,搅拌至完全溶解,开始降温。

[0050] 步骤3:温度降到45℃,分别加入原料肝素钠和M6P-LC,搅拌至完全溶解。

[0051] 步骤4:取样检测各项理化指标,合格后过滤出料。

[0052] 实施例1-5

[0053] 一种线粒体组合物,配方如表2所示:

[0054] 表2

[0055]

组别 组分	实施例 1	实施例 2	实施例 3	实施例 4	实施例 5
HA20	0.05%	0.2%	0.0125%	0.025%	0.1%
肝素钠	0.001%	0.0001%	0.0005%	0.00025%	0.5%
海藻糖	0.875%	1%	0.22%	0.5%	0.1%
M6P-LC	0.25%	0.01%	0.1%	0.062%	1%
去离子水	TO100%	TO100%	TO100%	TO100%	TO100%

[0056] 需要说明的是,上述HA20为平均分子量为200KDa的全分子量水解透明质酸钠,同时包含小分子量水解透明质酸钠、中分子量水解透明质酸钠、大分子量水解透明质酸钠。

[0057] 对比例1-4

[0058] 一种组合物,配方如表3所示:

[0059] 表3

[0060]

组别 组分	对比例 1	对比例 2	对比例 3	对比例 4
HA20	0	0.05%	0.05%	0.05%
肝素钠	0.001%	0	0.001%	0.001%
海藻糖	0.875%	0.875%	0	0.875%
M6P-LC	0.25%	0.25%	0.25%	0
去离子水	TO100%	TO100%	TO100%	TO100%

[0061] 对比例5-11

[0062] 一种组合物,配方如表4所示:

[0063] 表4



	组别 组分	对比例 5	对比例 6	对比例 7	对比例 8	对比例 9	对比例 10	对比例 11
[0064]	HA20	0	0.05%	0.05%	0.05%	0	0.05%	0.05%
	肝素钠	0.001%	0	0.001%	0.001%	0.001%	0.001%	0.001%
	海藻糖	0.875%	0.875%	0	0.875%	0.875%	0	0.875%
	M6P-L C	0.25%	0.25%	0.25%	0	0.25%	0.25%	0
	HA60	0.05%	0	0	0	0	0	0
	胶原蛋白	0	0.001%	0	0	0	0	0
[0065]	白肽							
	尿囊素	0	0	0.875%	0	0	0	0
	甘露糖	0	0	0	0.25%	0	0	0
	鼠李糖	0	0	0	0	0	0.875%	0
	玻色因	0	0	0	0	0	0	0.25%
	水解透明质酸钠	0	0	0	0	0.05%	0	0
	去离子水	TO100 %	TO100 %	TO100 %	TO100 %	TO100 %	TO100 %	TO100 %

[0066] 需要说明的是,上述HA60为平均分子量为600KDa的全分子量水解透明质酸钠,同时包含小分子量水解透明质酸钠、中分子量水解透明质酸钠、大分子量水解透明质酸钠;

[0067] 上述水解透明质酸钠为平均分子量为200KDa的小分子量水解透明质酸钠。

[0068] 性能测试:

[0069] 一、实验试剂:

[0070] 人原代真皮成纤维细胞和培养基购自 Lifeline® Cell Technology 公司;青霉素-链霉素-两性霉素B溶液购自 Bioind, DPBS 购自 Gibco 公司, CCK 试剂购自同仁生物;6孔板、12孔板、96孔细胞培养板采购自 Thermo Fisher 公司;组织固定液,无水乙醇(国药集团,货号 10009218),线粒体膜电位检测试剂盒(Beyotime,货号 C1073M), CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega, 货号 G7571), 重组 Anti-PINK1 抗体 (Abcam, 货号 ab216144), Anti-Parkin 抗体 (Abcam, 货号 ab77924), Anti-LC3B 抗体 (Abcam, 货号 ab63817), Anti-BNIP3 抗体 (Abcam, 货号 ab109362) 和 Anti-β-Actin 抗体 (Abcam, 货号 ab8226) 购自于美国 Abcam 公司; Triton X-100 (9002-93-1), SDS-PAGE 蛋白 5× 上样缓冲液 (Beyotime, 货号 P0015L)、RIPA 裂解液 (Beyotime, 货号 P0013B)、蛋白酶抑制剂混合物 (Beyotime, 货号 P1005)、BeyoECL Plus (超敏 ECL 化学发光试剂盒) (Beyotime, 货号 P0018S)。

[0071] 二、实验设备:

[0072] 细胞培养箱,倒置显微镜,正置荧光显微镜,生物安全柜,酶标仪,蛋白垂直电泳仪,化学发光凝胶成像仪。

[0073] 三、样品准备:

[0074] 将实施例及对比例制得的组合物使用去离子水稀释得到多组样品,稀释过程中,组合物与去离子水的质量比为 3:97,得到的样品中,组合物的质量分数为 3%。

[0075] 四、实验方法:

[0076] 1. 人原代真皮成纤维细胞活性测试:人原代真皮成纤维细胞在 5% CO<sub>2</sub>、37℃ 的培养条件下,利用成纤维细胞培养基扩增培养,当细胞生长至 80-90% 汇合时,用胰酶将其消化并接种于 96 孔板。细胞在 96 孔板中贴附培养 48h 后,使用稀释后的组合物作为样品,并使用样品处理细胞,得到对应的样品组,与此同时使用与样品组相同量的去离子水处理细胞,得到对照组,48h 后,按照说明书加入 CCK-8 试剂孵育 1h,用酶标仪在 450nm 处读取 OD 值。通过计算样品组和对照组的平均 OD 值之比得到相对细胞活性数值,判断样品的细胞毒性作用;

[0077] 其中相对细胞活性的计算方法如式 (1) 所示:

[0078] 相对细胞活性 % = (样品组 OD 值 / 对照组 OD 值) \* 100 % (式 1)

[0079] 表 5

[0080]

实验组	相对细胞活性%	S.D.
实施例 1	100.2%	2.9%
实施例 2	96.2%	1.1%
实施例 3	96.8%	4.9%
实施例 4	98.8%	4.4%
实施例 5	95.6%	6.1%

[0081] 2. ATP 检测实验

[0082] 人原代真皮成纤维细胞在 5% CO<sub>2</sub>、37℃ 的培养条件下,利用成纤维细胞培养基扩增培养。当细胞生长至 80-90% 汇合时,用胰酶将其消化并接种于 96 孔板。先用样品处理细

胞过夜,然后用UVA 10J/cm<sup>2</sup>诱导细胞损伤,随后继续用样品处理24h,检测各组ATP的生成量。

[0083] 测试结果如表6所示:

[0084] 表6

[0085]	实验组	相对 ATP 含量平均值	S.D.	P 值
	空白对照组	116.1%	4.7%	0.0163
	UVA 组	100.0%	4.3%	-
	实施例 1	181.7%	11.0%	0.0023
	实施例 2	166.8%	4.2%	0.0001
	实施例 3	161.1%	4.0%	0.0002
	实施例 4	157.7%	4.9%	0.0005
	实施例 5	169.3%	5.3%	0.0001
	对比例 1	128.5%	5.2%	0.0042
	对比例 2	126.1%	4.3%	0.0042
	对比例 3	132.8%	7.0%	0.0052
[0086]	对比例 4	127.4%	4.8%	0.0043
	对比例 5	156.7%	2.9%	0.0001
	对比例 6	147.3%	2.2%	0.0001
	对比例 7	146.4%	1.4%	0.0002
	对比例 8	146.8%	5.3%	0.0007
	对比例 9	153.5%	5.7%	0.0005
	对比例 10	151.9%	4.8%	0.0004
	对比例 11	148.7%	6.7%	0.0010

[0087] 需要说明的是,其中空白对照组为未使用UVA10J/cm<sup>2</sup>损伤的且未经过样品处理的细胞,UVA组为经UVA10J/cm<sup>2</sup>损伤的且未经过样品处理的细胞。

[0088] 3.线粒体膜电位染色实验

[0089] 人原代真皮成纤维细胞在37℃、含5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱中培养。待细胞生长至80%以上汇合后消化接种于12孔板,并继续培养48h用于测试。先用样品处理细胞过夜,然后用UVA10J/cm<sup>2</sup>诱导细胞损伤,随后继续用样品处理24h。吸除细胞培养液,加入PBS洗涤

一次。按照检测试剂盒说明书加入200 $\mu$ l检测缓冲液,轻轻混匀。室温(20~25℃)避光孵育30min。随即在荧光显微镜下观察和拍照,用Image J对荧光信号进行定量分析。

[0090] 测试结果如表7所示:

[0091] 表7

[0092]	膜电位 相对表达量	平均值	SD	P 值
	空白组	170%	16%	0.0158
	UVA 组	100%	12%	/
	实施例 1	1157%	16%	<0.0001
	实施例 2	980%	41%	<0.0001
	实施例 3	941%	26%	<0.0001
[0093]	实施例 4	911%	7%	<0.0001
	实施例 5	1007%	17%	<0.0001
	对比例 1	490%	24%	<0.0001
	对比例 2	436%	22%	<0.0001
	对比例 3	530%	28%	<0.0001
	对比例 4	467%	14%	<0.0001
	对比例 5	840%	23%	<0.0001
	对比例 6	742%	29%	0.0026
	对比例 7	677%	32%	<0.0001
	对比例 8	691%	12%	<0.0001
	对比例 9	829%	13%	<0.0001
	对比例 10	803%	10%	<0.0001
	对比例 11	787%	22%	<0.0001

[0094] 需要说明的是,其中空白对照组为未使用UVA10J/cm<sup>2</sup>损伤的且未经过样品处理的细胞,UVA组为经UVA10J/cm<sup>2</sup>损伤的且未经过样品处理的细胞。

[0095] 4.Western blot法检测自噬相关蛋白的表达

[0096] 人原代真皮成纤维细胞在5% CO<sub>2</sub>、37℃的培养条件下,利用成纤维细胞培养基扩增培养。当细胞生长至80~90%汇合时,用胰酶将其消化并接种于6孔板。继续培养48h,6孔板中细胞经处理后,弃去培养基,用预冷的PBS清洗3次,吸弃PBS,加入RIPA裂解液,按1:100

比例加入蛋白酶抑制剂;冰上摇晃20s,用细胞刮子将细胞刮下,将液体和细胞转移至1.5mL EP管中,4℃离心10min,将上清移至新EP管。将各组蛋白配制成2μg/μL上样缓冲液,100℃金属浴20min,使蛋白变性,-80℃保存。配制丙烯酰胺胶,每孔加30μg样品,80V电泳30min,100V电泳120min,用0.22μm PVDF膜,200mA、4℃湿转90min;用5%脱脂牛奶(TBST配制)室温封闭1h,按1:1000稀释PINK1,LC3B抗体,按1:5000稀释β-actin,4℃摇床孵育过夜,吸弃一抗,用TBST洗3次,每次10min,按1:10000稀释二抗,37℃摇床孵育1h,吸弃二抗,TBST洗3次,每次10min,按1:1配制显影液,用凝胶成像仪成像分析,用Image J分析定量图片蛋白表达量。

[0097] 其中PINK1表达量测试结果如表8所示:

[0098] 表8

[0099]

组别	AVE	SD	P值
空白组	100.00%	18.98%	-
实施例1	253.18%	13.58%	0.0003
实施例2	215.03%	10.39%	0.0006
实施例3	189.03%	13.77%	0.0026
实施例4	180.96%	14.53%	0.0042
实施例5	239.01%	10.79%	0.0065
对比例1	127.08%	8.21%	0.0670
对比例2	121.77%	14.55%	0.1892
对比例3	131.75%	13.76%	0.0764
对比例4	123.11%	12.70%	0.1461
对比例5	161.96%	10.72%	0.0065
对比例6	138.08%	13.32%	0.0030
对比例7	136.75%	13.38%	0.0493
对比例8	136.42%	12.52%	0.0460
对比例9	154.10%	15.08%	0.0184
对比例10	146.75%	11.35%	0.0185
对比例11	142.08%	10.51%	0.0234

[0100] 结果分析:

[0101] 1.通过表5可见,本申请各实施例所制得的组合物对细胞活性的影响较小,无细胞毒性;

[0102] 2.观察实施例1-5可见,当HA20的添加量为0.05%、肝素钠的添加量为0.001%,海藻糖的添加量为0.875%,M6P-LC为0.25%时,实施例5制备的组合物相对具有更高的ATP生成量、膜电位表达量以及PINK1表达量,由此可见,实施例1所公开的配方相对其他实施例而言明显更具优势;

[0103] 进一步地,结合表6,观察实施例1与对比例1-4可见,当对比例1-4中依次省略实施例1中的HA20、肝素钠、海藻糖、M6P-LC,对比例1-4的相对ATP含量分别为128.5%、126.1%、132.8%、127.4%,根据对比例1-4和UVA组ATP的含量之间的差距,我们能够算出,HA20、肝素钠、海藻糖、M6P-LC四者同时存在时,ATP含量的理论值应约为138.2%,但实施例1的相对

ATP含量达到了181.7%，因此，我们认为HA20、肝素钠、海藻糖、M6P-LC四者之间产生了一定的协同作用，实施例1在该协同作用的促进下取得了超过ATP含量的理论值的良好效果；

[0104] 需要说明的是，在上述内容中，HA20、肝素钠、海藻糖、M6P-LC四者同时存在时，ATP含量的理论值的计算方法为：

[0105] 已知肝素钠、海藻糖、M6P-LC同时存在，相对ATP含量为128.5%；

[0106] HA20、海藻糖、M6P-LC同时存在，相对ATP含量为126.1%；

[0107] HA20、肝素钠、M6P-LC同时存在，相对ATP含量为132.8%；

[0108] HA20、肝素钠、海藻糖同时存在，相对ATP含量为127.4%；

[0109] 且UVA组的相对ATP含量为100.0%；

[0110] 可推算出肝素钠、海藻糖、M6P-LC同时存在，相对ATP含量提升了28.5%

[0111] HA20、海藻糖、M6P-LC同时存在时，相对ATP含量提升了26.1%；

[0112] HA20、肝素钠、M6P-LC同时存在时，相对ATP含量提升了32.8%；

[0113] HA20、肝素钠、海藻糖同时存在时，相对ATP含量提升了27.4%；

[0114] 即 $3 \text{ (HA20+肝素钠+海藻糖+M6P-LC)} = 114.8\%$ ，从而得出HA20、肝素钠、海藻糖、M6P-LC四者同时存在时，相对ATP含量的理论值应为138.2%；

[0115] 同时，进一步结合表7并同样利用上述方法计算实施例1膜电位的相对表达量的理论值应为607%，但实施例1膜电位相对表达量的实际值达到1157%，由此可见，在膜电位表达能力方面，HA20、肝素钠、海藻糖、M6P-LC四者之间同样存在协同作用，以促进组合物获得更加优异的促进膜电位表达能力；

[0116] 继续利用上述计算方法结合表8计算实施例1的INK1表达量理论值为134.57%，但实施例1的PINK1表达量的实际值达到253.18%，由此可见，在PINK1表达方面，HA20、肝素钠、海藻糖、M6P-LC四者之间同样存在协同作用，以促进组合物获得更加优异的促进PINK1表达能力；

[0117] 3. 结合表6-8并观察实施例1、对比例5-11可见，当使用本领域中作用与HA20、肝素钠、海藻糖、M6P-LC相近的物质对HA20、肝素钠、海藻糖、M6P-LC中的任一物质进行替换后，组合物的促ATP生成能力、促膜电位表达能力、促PINK1表达能力均产生不同程度的下降，由此可见，在本申请所记载的配方中，任一成分都是不可替代的。