

• 论 著 •

九肽-1/依克多因经皮共递送纳米脂质体美白修复功效研究

王 曦^{1,2},陈 丹^{1,2},罗 丹^{1,2},陈 璇³,马佳月升⁴,张亮韬⁴,刘 卫^{2,3△}

[1. 武汉百思凯瑞生物科技有限公司,湖北 武汉 430075;2. 华中科技大学国家纳米药物
工程技术研究中心,湖北 武汉 430075;3. 华中科技大学生命科学与技术学院,湖北 武汉 430074;
4. 样美生物科技(北京)有限公司,北京 100020]

[摘 要] 目的 探讨九肽-1/依克多因经皮共递送纳米脂质体(Non/Ect-NLPs)的美白修复功效。
方法 通过细胞活性测试研究 Non/Ect-NLPs 安全性,观察黑素细胞对纳米脂质体摄取情况,并比较不同水平
Non/Ect-NLPs 组及游离成分溶液组酪氨酸酶活性、黑色素水平、氧化损伤细胞存活率及人源水通道蛋白-3
(AQP3)、丝聚合蛋白(FLG)、紧密连接蛋白 1(Claudin-1)水平。结果 游离成分溶液组和不同水平 Non/Ect-
NLPs 组中 HaCaT 细胞活性均在 80%以上。与游离成分溶液组比较,Non/Ect-NLPs 水平为 250.0、500.0 μg/
mL 时,其对 B16F10 细胞酪氨酸酶活性显著降低($P<0.05$)。与游离成分溶液组比较,Non/Ect-NLPs 水平为
125.0、500.0 μg/mL 时,其能显著抑制 B16F10 细胞分泌黑色素($P<0.05$)。与模型组比较,Non/Ect-NLPs
水平为 250.0、500.0 μg/mL 时,可显著提高氧化损伤细胞的存活率($P<0.05$)。与对照组比较,游离成分溶液
组和 Non/Ect-NLPs 组能显著促进 HaCaT 细胞迁移($P<0.01$)。与对照组比较,游离成分溶液组、Non/Ect-
NLPs 组 AQP3、FLG、Claudin-1 水平显著增高($P<0.05$)。结论 Non/Ect-NLPs 作为新型皮肤美白修复功
效原料具有良好的应用前景。

[关键词] 九肽-1; 依克多因; 共递送纳米载体; 美白功效

DOI:10.3969/j.issn.1009-5519.2024.02.004 中图法分类号:TQ460.4

文章编号:1009-5519(2024)02-0196-05 文献标识码:A

Study on whitening and repairing efficacy of nonapeptide-1/ectoin nanoliposomes

WANG Xi^{1,2},CHEN Dan^{1,2},LUO Dan^{1,2},CHEN Xuan³,
MA Jiayuesheng⁴,ZHANG Liangtao⁴,LIU Wei^{2,3△}

(1. Wuhan Best Carey Biotechnology Co., Ltd., Wuhan, Hubei 430075, China; 2. National
Engineering Research Center for Nanomedicine, Huazhong University of Science and
Technology, Wuhan, Hubei 430075, China; 3. College of Life Science and Technology,
Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430074, China;
4. Youngmay Biotech (Beijing) Co., Ltd., Beijing 100020, China)

[Abstract] Objective To explore the whitening and repairing effects of nonapeptide-1 / ectoin nanoli-
posomes(Non/Ect-NLPs). Methods The safety of Non/Ect-NLPs was studied by cell viability test, and the
uptake of nanoliposomes by melanocytes was observed. Tyrosinase activity, melanin levels, survival rate of ox-
idative damage cells, and the levels of human aquaporin-3(AQP3), filaggrin(FLG), and tight junction protein-
1(Claudin-1) levels were compared between groups with different levels of Non/Ect-NLPs and free component
solution groups. Results The viability of HaCaT cells in both the free component solution group and the
groups with different levels of Non/Ect-NLPs were all above 80%. Compared with the free component solu-
tion group, when the levels of Non/Ect-NLPs were 250.0 and 500.0 μg/mL, the tyrosinase activity of B16F10
cells was significantly decreased($P<0.05$). Compared with the free component solution group, when the lev-
els of Non/Ect-NLPs were 125.0 and 500.0 μg/mL, it could significantly inhibit the secretion of melanin by
B16F10 cells($P<0.05$). Compared with the model group, Non/Ect-NLPs at 250.0 and 500.0 μg/mL signifi-
cantly increased the survival rate of oxidative damaged cells($P<0.05$). Compared with the control group, the

free component solution group and the Non/Ect-NLPs group significantly promoted the migration of HaCaT cells ($P < 0.01$). Compared with the control group, the free component solution group and the Non/Ect-NLPs group had significant increases in AQP3, FLG, and Claudin-1 levels ($P < 0.05$). **Conclusion** Non/Ect-NLPs have a good application prospect as a new type of skin whitening and repair efficacy raw material.

[Key words] Nonapeptide-1; Ectoin; Co-delivery nanocarriers; Efficacy of whitening

九肽-1 是一种含有 9 个氨基酸的小分子肽,通过竞争性方式与黑色素皮质素受体 1 相结合,阻碍酪氨酸酶活化,进而抑制黑色素的生成^[1]。依克多因能阻止应激因子损伤细胞,隔离紫外线辐射、变应原、污染物等对皮肤的损害,1.0% 依克多因能有效防止皮肤细胞损伤,皮肤自愈修复速度提升了 2~3 倍^[2-3]。利用纳米脂质体包载技术,可以改善皮肤功效活性成分的稳定性,促进活性成分进入靶细胞,有效提高活性成分的生物利用率^[4-5]。本研究探讨了九肽-1/依克多因经皮共递送纳米脂质体(Non/Ect-NLPs)的皮肤美白和修复作用,以期研制具有美白修复功效的护肤品提供理论和技术基础。

1 资料与方法

1.1 主要试剂与细胞 九肽-1 购自南京莱昂生物科技有限公司;依克多因购自济南华熙生物科技有限公司;卵磷脂购自上海太伟药业公司;聚乙二醇-40(PEG-40)氢化蓖麻油购自德国巴斯夫公司;1,3-丙二醇、1,2-己二醇、甘油购自国药集团公司。DMEM 高糖培养基、胎牛血清、青链霉素、胰蛋白酶-EDTA 购自美国 Gibco 公司;L-多巴、酪氨酸、TritonX-100、3% H_2O_2 、 α -melanocyte stimulating hormone(α -MSH)购自美国 Sigma-Aldrich 公司;Cell Counting Kit-8(CCK-8)、活性氧检测试剂盒购自上海碧云天生物技术公司;人源水通道蛋白-3(AQP3)、丝聚合蛋白(FLG)、紧密连接蛋白 1(Claudin-1)的酶联免疫吸附试验试剂盒购自江苏酶免生物科技公司。人角质形成细胞(HaCaT)、小鼠黑色素瘤细胞(B16F10)购自中国科学院昆明细胞库。

1.2 主要仪器 SHJ-6A 数显磁力搅拌水浴锅购自常州亿能实验仪器厂;JN-02HC 高压均质机购自安拓思纳米技术(苏州)有限公司;粒径分析仪购自英国 Malvern 公司;超净工作台购自苏州净化设备有限公司;细胞培养箱购自美国 Thermo Fisher 公司;酶标仪购自美国 Perkin Elmer 公司;倒置荧光显微镜购自广州明美光电技术有限公司;FV3000 激光共聚焦显微镜购自日本 Olympus 公司。

1.3 方法

1.3.1 Non/Ect-NLPs 的制备及粒径等测定 称取处方量卵磷脂、胆固醇、PEG-40 氢化蓖麻油和 1,3-丙

二醇为 A 相,另称取处方量九肽-1、依克多因、1,2-己二醇和甘油等溶于适量超纯水中为 B 相,于 40 °C 水浴混匀,将 A 相和 B 相混合,继续搅拌,高压均质机均质溶液 3 次后,得到 Non/Ect-NLPs。取适量 Non/Ect-NLPs,稀释适当倍数,测定粒径、多分散性指数(PDI)和 Zeta 电位。

1.3.2 观察细胞摄取行为 采用异硫氰酸荧光黄(FITC)代替活性成分制备 FITC 标记的纳米脂质体(FITC-NLPs),与游离 FITC 中荧光标记水平相同。将 B16F10 细胞以 3×10^5 /mL 的密度接种于共聚焦皿,每皿 2 mL,培养 24 h,弃上清液,加入含游离 FITC、FITC-NLPs(FITC 均为 1 μ g/mL)的培养基,置于细胞培养箱摄取 4 h,弃去培养基,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 3 次,采用组织固定液固定细胞,在避光环境下,依次用罗丹明 B(RhoB)、4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)溶液(均为 1 μ g/mL)染色各 15 min,采用激光共聚焦显微镜观察拍照。

1.3.3 细胞安全性评价 将 1.5×10^5 /mL 的 HaCaT 细胞加入 96 孔板,每孔 100 μ L,培养 24 h,每孔分别加入 100 μ L 含有 62.5、125.0、250.0、500.0、1 000.0 μ g/mL Non/Ect-NLPs(Non/Ect-NLPs 组)及游离成分溶液(游离成分溶液组,与 Non/Ect-NLPs 组中活性成分水平相同)的 DMEM 完全培养基,对照组仅加 100 μ L DMEM 完全培养基。每组 3 个平行孔,重复 3 次。继续培养 24 h,于 450 nm 波长处测吸光度,计算细胞存活率。

1.3.4 酪氨酸酶活性测定 将 5.0×10^4 /mL 的 B16F10 细胞加入 24 孔板,每孔 500 μ L,培养 24 h。对照组仅加入完全培养基,模型组、游离成分溶液组及 Non/Ect-NLPs 组加入 100 nmol/L α -MSH 制备黑色素高表达细胞模型。Non/Ect-NLPs 组同时加入 125.0、250.0、500.0 μ g/mL Non/Ect-NLPs,游离成分溶液组与 Non/Ect-NLPs 组中活性成分水平相同,均用 DMEM 完全培养基配制。每组 3 个平行孔,重复 3 次。培养 48 h 后,弃去上清液,每孔加入 1% TritonX-100 的 PBS 200 μ L 于 -80 °C 冰箱裂解,取细胞裂解液离心,取各孔上清液 100 μ L,加入 0.1% L-多巴 100 μ L,37 °C 放置 1 h,于 490 nm 波长处测吸光度,计算酪氨酸酶活性^[6]。

1.3.5 黑色素水平测定 将 5.0×10^4 /mL 的 B16F10 细胞加入 6 孔板,每孔 2 mL,培养 24 h。各分组及加样方式同“1.2.4”。每组设 3 个平行孔,重复 3 次。培养 48 h 后,PBS 清洗细胞后,每孔加入含有 10%二甲基亚砷的 1.0 mmol/L 氢氧化钠溶液 300 μ L,在 90 $^{\circ}$ C 水浴裂解细胞 3 h,于 405 nm 波长处测各孔吸光度,计算黑色素水平^[6]。

1.3.6 细胞抗氧化分析 将 1.5×10^5 /mL 的 HaCaT 细胞加入 96 孔板,每孔 100 μ L,培养 24 h。各分组及加样方式同“1.2.4”,仅在造细胞氧化损伤模型时,将 100 nmol/L α -MSH 替换为 0.8 mmol/L H_2O_2 。每组 3 个平行孔,重复 3 次。继续培养 24 h 后,于 450 nm 波长处测吸光度,计算细胞存活率。

1.3.7 细胞迁移分析 将 5.0×10^5 /mL 的 HaCaT 细胞加入 6 孔板,每孔 2 mL,培养 24 h。用黄色枪头在细胞生长的中央区域划 1 条线,PBS 清洗细胞 3 次,显微镜拍照观察加样前的划痕宽度。拍照后,对照组加入无血清培养基,其他组分别加入 250.0 μ g/mL Non/Ect-NLPs 与游离成分溶液的无血清培养基。培养 24 h 后,用显微镜拍照观察加样后的划痕宽

度,计算细胞迁移率,实验重复 3 次^[7]。

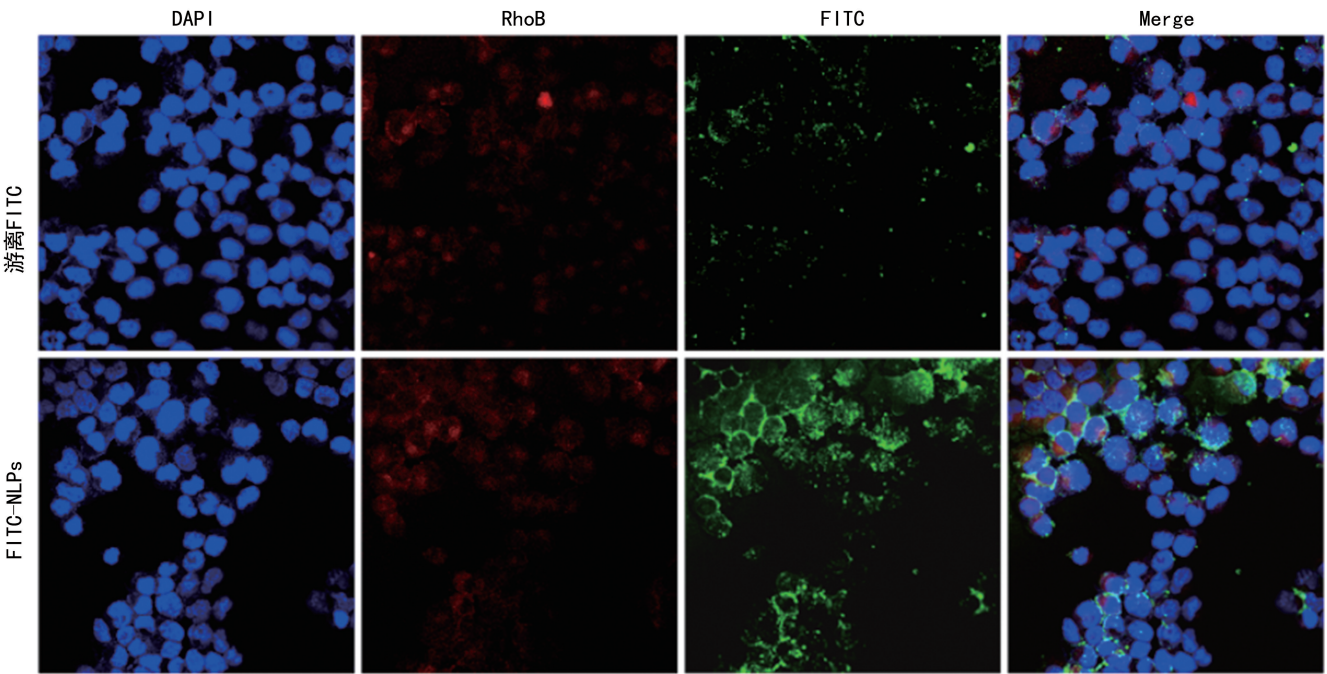
1.3.8 皮肤修复相关因子检测 将 1.0×10^5 /mL 的 HaCaT 细胞加入 24 孔板,每孔 500 μ L,培养 24 h。对照组仅加 DMEM 完全培养基,其他组分别加入含有 125.0、250.0、500.0 μ g/mL Non/Ect-NLPs 与游离成分溶液的 DMEM 完全培养基。每组 3 个复孔,实验重复 3 次。继续培养 48 h,检测上清液中 AQP3、FLG、Claudin-1 水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件进行统计学处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 粒径、PDI 和 Zeta 电位 Non/Ect-NLPs 为淡黄色透明液体,测得其粒径为 (34.3 ± 0.1) nm,PDI 为 (0.195 ± 0.007) ,Zeta 电位为 (-31.7 ± 0.9) mV。

2.2 黑素细胞摄取情况 孵育相同时间,FITC-NLPs 细胞质中荧光强度明显强于游离 FITC,而游离 FITC 主要聚集于 B16F10 细胞表面。FITC-NLPs 能够被快速摄取进入 B16F10 细胞。见图 1。



注:Merge 是将 DAPI、RhoB、FITC 图片进行组合。

图 1 黑素细胞摄取情况

2.3 细胞安全性比较 不同水平 Non/Ect-NLPs 组和游离成分溶液组中 HaCaT 细胞活性均在 80% 以上,无细胞毒性。见图 2。

2.4 酪氨酸酶活性比较 与游离成分溶液组比较,Non/Ect-NLPs 水平为 250.0、500.0 μ g/mL 时,其对

B16F10 细胞酪氨酸酶活性显著降低($P < 0.05$)。Non/Ect-NLPs 抑制黑素细胞酪氨酸酶的能力强于同剂量游离成分。见图 3。

2.5 黑色素水平比较 与游离成分溶液组比较,Non/Ect-NLPs 水平为 125.0、500.0 μ g/mL 时,其能

显著抑制 B16F10 细胞分泌黑色素($P<0.05$)。Non/Ect-NLPs 抑制黑素细胞黑色素分泌能力强于同剂量游离成分。见图 4。

2.6 细胞抗氧化能力比较 采用 0.8 mmol/L H_2O_2 损伤 HaCaT 细胞后,其存活率为 50.36%,细胞氧化损伤明显。与模型组比较,Non/Ect-NLPs 水平为 250.0、500.0 $\mu\text{g/mL}$ 时,可显著提高氧化损伤细胞的存活率($P<0.05$)。与游离成分溶液组比较,Non/Ect-NLPs 水平为 500.0 $\mu\text{g/mL}$ 时,可显著提高氧化损伤细胞的存活率($P<0.01$)。Non/Ect-NLPs 的细胞抗氧化功效更为显著。见图 5。

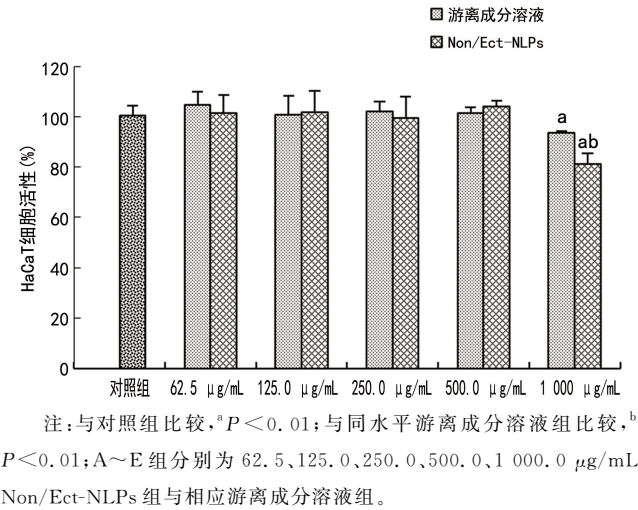


图 2 细胞安全性比较

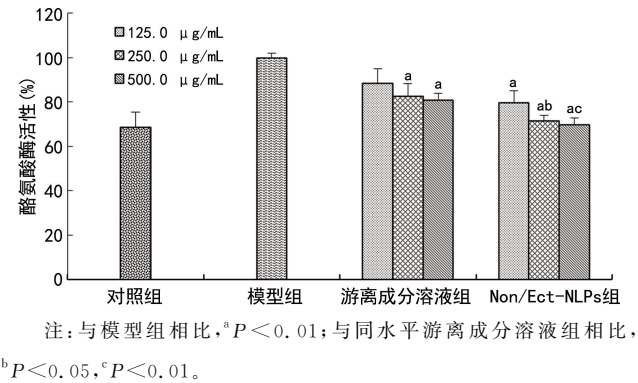


图 3 酪氨酸酶活性比较

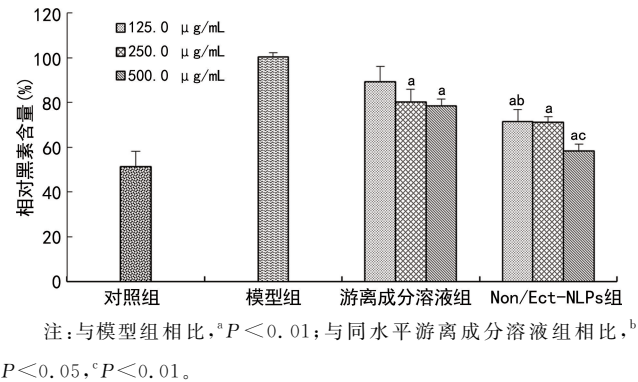


图 4 黑色素水平比较

2.7 细胞迁移能力比较 与对照组比较,游离成分溶液组和 Non/Ect-NLPs 组能显著促进 HaCaT 细胞迁移($P<0.01$)。与游离成分溶液组比较,Non/Ect-NLPs 组能显著促进 HaCaT 细胞迁移($P<0.01$)。Non/Ect-NLPs 促进 HaCaT 细胞迁移的能力优于游离成分溶液。见图 6、7。

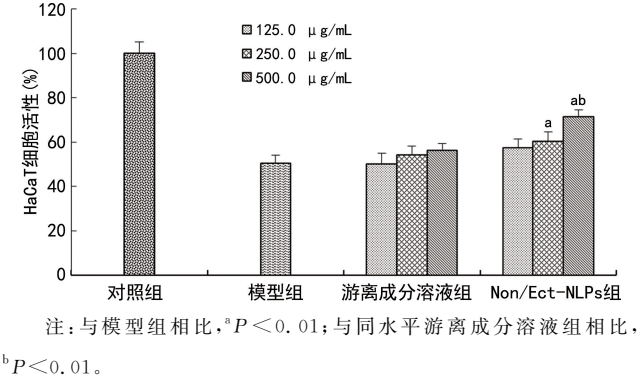


图 5 细胞抗氧化能力比较

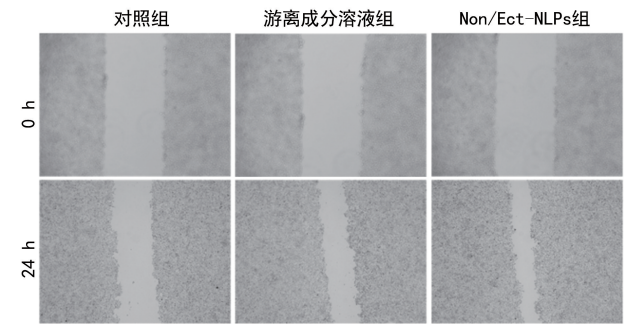


图 6 对 HaCaT 细胞迁移的影响

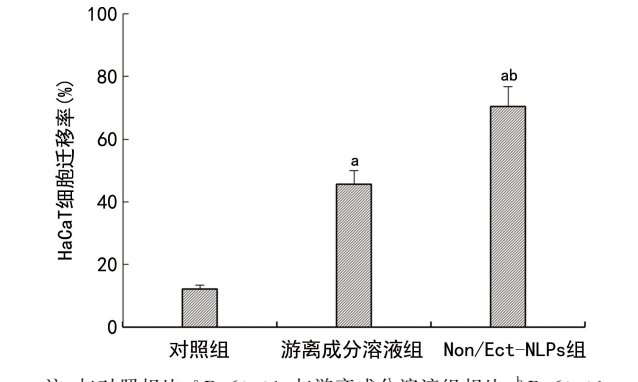
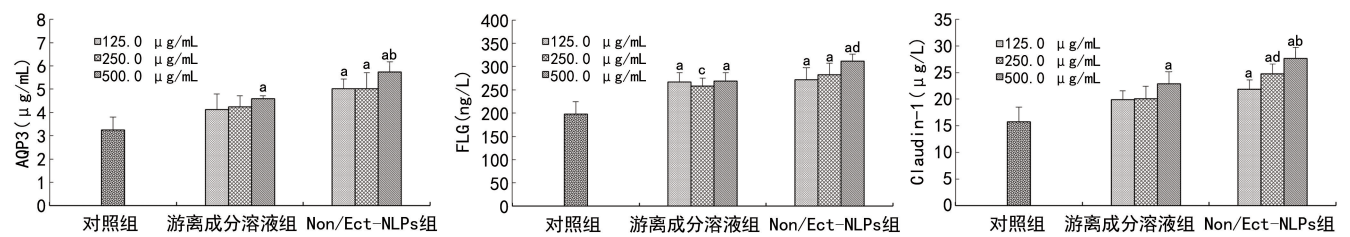


图 7 对 HaCaT 细胞迁移率的影响

2.8 皮肤修复相关因子水平比较 与对照组比较,游离成分溶液组、Non/Ect-NLPs 组 AQP3、FLG、Claudin-1 水平显著增高($P<0.05$)。与游离成分溶液组比较,500 $\mu\text{g/mL}$ Non/Ect-NLPs 组 AQP3、FLG 水平显著升高($P<0.05$);250.0、500.0 $\mu\text{g/mL}$ Non/Ect-NLPs 组 Claudin-1 水平显著升高($P<0.05$)。Non/Ect-NLPs 较相同水平游离成分溶液具有更好的皮肤保湿修复功效。见图 8。



注:与对照组相比,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与同浓度游离成分溶液组相比,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$ 。

图 8 保湿修复相关因子水平比较

3 讨 论

目前,功效性化妆品产品大多存在功效成分单一、透皮吸收困难等问题。纳米脂质体作为一种新型给药递送系统,制剂质量稳定,且所载活性成分经包裹后能有效提高成分稳定性。纳米脂质体粒径小,能增强药物活性成分的经皮扩散速率及药物的经皮吸收^[8]。共输送纳米载体可同时负载多种美白作用机制的功效成分,实现多靶点多效护肤功效成分协同增效^[6]。采用经皮给药纳米载体技术,将九肽-1 和依克多因共包载于同一纳米脂质体中,解决活性成分极性 强、难透皮吸收、难缓释等问题,可实现将美白修复活性成分的皮肤靶向共输送,达到协同增效及缓释作用^[8-9]。在本团队已完成的工作基础上^[7,10],本研究对 Non/Ect-NLPs 的皮肤美白和修复作用进行了探索。

本文构建的 Non/Ect-NLPs 平均粒径为(34.3±0.1) nm, PDI 为(0.195±0.007), Zeta 电位为(-31.7±0.9) mV。Non/Ect-NLPs 能促进 B16F10 细胞对活性成分的摄取,抑制 B16F10 细胞的酪氨酸酶活性和黑色素水平,缓解皮肤细胞氧化损伤,从而直接减少黑色素的产生^[11-12]。Non/Ect-NLPs 可促进角质形成细胞迁移,提高皮肤修复因子 AQP3、FLG、Claudin-1 的分泌量,提高皮肤保湿修复功能。

综上所述,Non/Ect-NLPs 具有美白皮肤和保湿修复作用,实现了不同机制活性成分的协同增效作用,在美白修复护肤品中有较好应用前景。

参考文献

[1] 苏晨灿,张忠旗,赵金礼,等. 九肽-1 纯化方法研究[J]. 山东工业技术,2018(2):200.

[2] 王玉玲,任姝静,吴越,等. 基于透明质酸、依克多因组合物的抗光老化作用研究[J]. 日用化学品科学,2022,45(7):51-56.

[3] BUENGER J, DRILLER H. Ectoin: An effective natural substance to prevent UVA-induced premature photoaging [J]. Skin Pharmacol

Physiol,2004,17(5):232-237.

[4] 李霞,田仁德,许琦,等. 神经酰胺Ⅲ B 纳米脂质体的制备及功效评价[J]. 日用化学工业,2016,46(9):514-518.

[5] GUPTA V, MOHAPATRA S, MISHRA H, et al. Nanotechnology in cosmetics and cosmeceuticals: A review of latest advancements [J]. Gels,2022,8(3):173.

[6] WEI T, CHEN D, MEI H, et al. Cationic nanoliposomes efficiently delivering phenylethyl resorcinol produce enhanced skin lightening effect [J]. Nano Life,2020,10(4):2040009.

[7] TIAN L W, LUO D, CHEN D, et al. Co-delivery of bioactive peptides by nanoliposomes for promotion of hair growth[J]. J Drug Deliv Sci Technol,2022,72:356.

[8] 何梦蝶,陈家铃,罗丹,等. 白梅花油/白藜芦醇纳米乳黑素细胞摄取及美白功效研究[J]. 中国化妆品,2022(12):86-91.

[9] 刘卫,冯年平. 经皮给药纳米技术[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:152.

[10] ZHOU H, LUO D, CHEN D, et al. Current advances of nanocarrier technology-based active cosmetic ingredients for beauty applications [J]. Clin Cosmet Investig Dermatol,2021,14:867-887.

[11] KIM B S, NA Y G, CHOI J H, et al. The improvement of skin whitening of phenylethyl resorcinol by nanostructured lipid carriers[J]. Nanomaterials(Basel),2017,7(9):241-257.

[12] 周婷,李燕,何黎. 皮肤美白机制的研究进展[J]. 皮肤病与性病,2017,39(3):168-172.

(收稿日期:2023-05-06 修回日期:2023-08-03)