

文章编号 1006-8147(2022)04-0348-06

论 著

负载酪氨酸酶抑制肽的牛奶外泌体抑制酪氨酸酶活性及黑色素生成研究

栗瑞斌,王倩,张雷杰,荆轲威,尹海芳

(天津医科大学基础医学院细胞生物学系,天津 300070)

摘要 目的:探讨酪氨酸酶抑制肽(YRS)功能化的牛奶外泌体(mEXO_{YRS}),对酪氨酸酶活性及黑色素生成的抑制作用。方法:通过超速离心法获取牛奶外泌体(mEXO);利用外泌体特异锚定肽CP05将YRS修饰在mEXO表面,获得mEXO_{YRS},随后通过流式细胞仪分析YRS的负载效率;在黑色素瘤细胞B16-F10中,检测细胞对mEXO_{YRS}的摄取效率以及YRS与酪氨酸酶的共定位效率,评估mEXO_{YRS}对B16-F10黑色素瘤细胞酪氨酸酶活性的抑制效果及对黑色素合成的抑制作用;进一步将mEXO_{YRS}均匀涂抹于Nude BALB/c小鼠黑色素瘤细胞B16-F10所成皮下瘤模型上,评估其在体内对黑色素合成的抑制作用;通过对C57BL/6小鼠表面皮肤涂抹mEXO_{YRS},评估其对小鼠毛囊的着色程度及小鼠皮肤的美白效果。结果:YRS通过外泌体特异锚定肽CP05高效负载至mEXO,并且不影响mEXO的形态结构及标志性蛋白的表达;在B16-F10黑色素瘤细胞摄取实验中,mEXO能够增强YRS与细胞内酪氨酸酶共定位的效率,在1周、2周及6周时均显著抑制细胞产生黑色素($F=56.117, 48.954, 560.006$, 均 $P<0.05$);在Nude BALB/c小鼠黑色素皮下瘤模型中,与YRS组相比,mEXO_{YRS}更好的抑制了黑色素的产生;在C57BL/6小鼠模型中,mEXO_{YRS}降低了黑色素的产生,并显著降低了黑色素含量($F=173.083, P<0.05$)及酪氨酸酶活性指标($F=34.156, P<0.05$),取得了美白效果。结论:YRS修饰的mEXO可通过内体转运途径,靶向运输到酪氨酸酶处,降低酪氨酸酶活性,并有效抑制黑色素生成,提高YRS的美白效果。

关键词 黑色素瘤;牛奶外泌体;酪氨酸酶抑制肽;靶向治疗

中图分类号 R781.4

文献标志码 A

Inhibition of tyrosinase activity and melanin synthesis by milk exosomes loaded with tyrosinase inhibitory peptide

LI Rui-bin, WANG Qian, ZHANG Lei-jie, JING Ren-wei, YIN Hai-fang

(Department of Cell Biology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract **Objective:** To investigate the inhibitory effect of milk-derived exosomes functionalized with tyrosinase inhibitory peptide YRS (mEXO_{YRS}) on tyrosinase activity and melanin synthesis. **Methods:** Milk exosomes (mEXO) were isolated and purified via ultracentrifugation. The YRS peptide was loaded on mEXO surface with exosomal anchor peptide CP05 to form mEXO_{YRS}. The loading efficiency of YRS peptide was analyzed by flow cytometer. In B16-F10 melanoma cells, the uptake efficiency of mEXO_{YRS}, co-localization of YRS peptide and tyrosinase were detected. The inhibitory effect of mEXO_{YRS} on tyrosinase activity and melanin synthesis were evaluated in melanoma cells B16-F10. mEXO_{YRS} was uniformly applied to subcutaneous melanoma model of Nude BALB/c melanoma cell B16-F10 to evaluate its inhibitory effect on melanin synthesis *in vivo*. mEXO_{YRS} was applied to the skin of C57BL/6 mice to evaluate the whitening effect of mEXO_{YRS} and the color degree of hair follicles. **Results:** The YRS peptide was efficiently loaded on mEXO via CP05 without altering mEXO morphological structure and exosomal biomarker expression. In B16-F10 melanoma cell uptake experiments, mEXO could improve the efficiency of YRS uptake, and enhance the efficiency of YRS co-localization with tyrosinase. At 1, 2 and 6 weeks, melanin synthesis was significantly inhibited ($F=56.117, 48.954, 560.006$, all $P<0.05$). In the Nude BALB/c mouse model of melanoma subcutaneous tumor, mEXO_{YRS} significantly inhibited melanin synthesis compared to YRS group. In C57BL/6 mouse models, mEXO_{YRS} reduced melanin synthesis and significantly inhibited the amount of melanin ($F=173.083, P<0.05$) and tyrosinase activity ($F=34.156, P<0.05$). **Conclusion:** mEXO_{YRS} can be transported to tyrosinase through endosomal transport pathway, reduce tyrosinase activity, resulting in reduction of melanin production and improvement of whitening effect of YRS *in vivo*.

Key words melanoma; milk exosome; tyrosinase inhibitory peptide; targeted therapy

黑色素是在黑色素细胞内生成的一种生物色

基金项目 天津市自然科学基金青年项目(20JCQNJC00580)

作者简介 栗瑞斌(1997-),男,硕士在读,研究方向:牛奶外泌体相关研究;通信作者:尹海芳, E-mail:haifangyin@tmu.edu.cn;荆轲威, E-mail:jingrenwei@tmu.edu.cn。

素^[1],黑色素在皮肤的沉积会造成皮肤暗沉等相关问题。抑制黑色素产生是现阶段化妆品行业达到美白效果的重要方式。在黑色素产生的过程中,酪氨酸酶起主要作用^[2]。同时,由于酪氨酸酶只表达于黑

色素细胞内,靶向酪氨酸酶的抑制剂可以特异性地抑制细胞中的黑色素生成而不会产生不良反应。现阶段,通过靶向抑制酪氨酸酶活性,从而抑制黑色素的产生成为了美白皮肤的重要思路。熊果苷是一种天然的酪氨酸酶抑制剂分子,可以有效抑制酪氨酸酶活性,减少黑色素的生成。然而,天然的熊果苷在化学组成上不稳定,可分解为苯代谢物,对骨髓具有一定的毒害作用^[3-5]。对苯二酚虽然也可以有效抑制酪氨酸酶活性,但会引起哺乳动物的组织坏死,并会导致许多不良反应,包括色斑、接触性皮炎^[6-9]。由于以上酪氨酸酶抑制剂具有较大的不良反应,所以更为安全的蛋白类酪氨酸酶抑制剂成为有效抑制酪氨酸酶活性的研究重点。研究报道,酪氨酸酶抑制肽 YRS(YRSRKYSWY)可以显著抑制酪氨酸酶活性,减少黑色素的产生^[9]。但由于其渗透性差,无法递送至皮肤基底层,无法被细胞高效摄取以及无法与酪氨酸酶高效共定位,导致其在体内抑制酪氨酸酶的作用不明显。目前,如何促进短肽类酪氨酸酶抑制剂渗透皮肤基底层,与酪氨酸酶实现高效共定位,提高其抑制酪氨酸酶活性的效果,成为了减少黑色素生成的关键。

近年来,外泌体(exosome)作为细胞分泌的天然纳米级生物小囊泡,因其具有多种生物活性分子,如蛋白、mRNA、脂质等,可用作载体递送、功能化治疗以及疾病诊断^[10-12]。目前有研究报道,可通过间充质干细胞对皮肤进行美白及抗衰老的相关修复。因此,外泌体在美白领域有着较大的应用潜力和优势^[13]。牛奶是一种组成高度复杂的生物体液,含有大量具有生物活性分子的外泌体^[14]。由于牛奶外泌体(mEXO)产量高,且可通过内体途径被动靶向至黑色素体内部,所以通过 mEXO 对皮肤进行修复及美白成为了可能。本课题组前期通过噬菌体展示技术对外泌体表面高度表达的蛋白进行了筛选,获得一种新型的外泌体特异锚定肽 CP05,通过该短肽可实现对外泌体的高效捕获、靶向及功能化修饰^[15]。因此,本研究通过外泌体特异锚定肽 CP05 将 YRS 负载至 mEXO 表面,在 C57BL/6 小鼠模型上,系统探究该生物纳米制剂对酪氨酸酶活性以及黑色素生成的抑制作用,为进一步优化纳米制剂及提高抑制酪蛋白酶活性提供新的方法,从而为美白提供新的思路和治疗手段。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器 小鼠黑色素瘤细胞系 B16-F10 细胞、兔源 CD63 多克隆抗体(美国, Santa Cruz 公司)、HRP 标记羊抗兔抗体(美国, Sigma 公司)、

HRP 标记兔抗羊抗体(美国, Sigma 公司)、微型滚针(中国, DRS Dermaroller 公司)、电镜铜网(中国, 北京新兴百业公司)。

清洁级 1~3 周的 C57BL/6 健康雄鼠 30 只, 体重为 6~15 g, 购于南京模式动物研究所; 清洁级 6~8 周的 Nude BALB/c 健康雄鼠 12 只, 体重为 18~20 g, 购于南京模式动物研究所。

分光光度计 Nanodrop2000c 核酸蛋白微量检测仪(美国, Thermo 公司)、Avanti J-26XP 超速离心机(德国, Beckman 公司)、HT7700 透射电子显微镜(日本, 日立高新技术公司)。

1.2 mEXO 的分离和收集 选用生牛乳作为 mEXO 的来源, 将牛奶进行梯度离心(2 000×g 离心 30 min, 10 000×g 离心 30 min)去除细胞碎片, 将上清液通过 0.22 μm 的滤器, 去除杂质; 再将滤液以 100 000×g 离心 70 min, 弃去上清, 用干净的 100 μL 的 DPBS 反复吹打离心管底部, 重悬得到 mEXO。

1.3 醋酸铀染色及透射电镜观察 mEXO 的形态及大小 将 mEXO 重悬液加入到等体积的、质量分数为 4%的多聚甲醛溶液中静置 25 min; 将铜网放在固定液上, 室温固定 25 min; 用滤纸吸去多余的固定液, 向铜网中滴加 100 μL 1%戊二醛溶液, 室温孵育 5 min; 吸去戊二醛溶液, 加入 100 μL 去离子水洗涤铜网, 每次洗涤 2 min, 洗涤 8 次; 向铜网滴加 100 μL 草酸铀溶液染色 5 min; 吸去多余草酸铀, 向铜网上滴加 100 μL 甲基纤维素-乙酸双氧铀溶液, 放置冰上染色 7 min; 吸去铜网上多余的甲基纤维素-乙酸双氧铀溶液, 并将铜网置于滤纸上风干, 透射电镜观察。

1.4 Western 印迹检测 mEXO 标志性蛋白(CD63、CD81)的表达 吸取等质量(20 μg)mEXO 样品和负载了 YRS 的 mEXO 于两个样品管中制样, 依次进行电泳、转膜、孵育一抗鼠源 CD63 单克隆抗体、一抗鼠源 CD81 单克隆抗体, 4℃摇床孵育 10 h; 以质量分数 5%的脱脂牛奶洗一抗; 孵育 HRP 标记的羊抗兔二抗或兔抗羊二抗, 4℃摇床孵育 2 h; 用含有体积分数为 5%吐温-20 的 PBS 洗二抗; 最后向 PVDF 膜滴 200 μL 发光液(发光液 A 和 B 等体积混合均匀), 暗室曝光。

1.5 流式细胞分析仪检测 mEXO 中 YRS 的负载效率 将 mEXO、mEXO 和 YRS、mEXO 和 CP05 修饰的 YRS 各吸取 20 μL, 加入到 200 μL 的 PBS 中, 通过流式细胞分析仪检测其负载 YRS 的效率。

1.6 通过外泌体锚定肽 CP05 将 YRS 负载至 mEXO 本课题组前期采用噬菌体库筛选出与外泌

体表面的 CD63 蛋白特异结合的锚定肽 CP05 (CRHSQMTVTSRL)^[15]。将外泌体锚定肽 CP05 通过连接肽 G4S (GGGGS) 与 YRS (YRSRKYSSWY) 连接, 经生物公司在体外合成 YRS-CP05 功能短肽 (YRSRKYSSWYGGGSCRHSQMTVTSRL)。并通过 DIR 荧光染料标记 mEXO, 将标记好的 mEXO 与 YRS-CP05 短肽或 YRS 裸肽 (无菌的 PBS 溶解) 按照质量比 1:2 的比例置于 4℃ 摇床孵育 6 h。

1.7 黑色素瘤细胞摄取 YRS、mEXO 以及 mEXO_{YRS}, 观察与酪氨酸酶的共定位情况 在黑色素细胞中分别加入 mEXO (50 μg)、YRS (50 μg) 以及 mEXO_{YRS} (50 μg mEXO+50 μg YRS), 并将培养基换成无 FBS 的培养基, 同时加入 2% 的双抗, 37℃ 的培养箱中过夜, 第 2 天将上清弃去并用 PBS 清洗 3 次, 4% 的多聚甲醛室温固定 30 min, 之后将黑色素细胞固定至加入 DAPI 的盖玻片上, 避光固定 4 h 后, 通过共聚焦显微镜观察细胞摄取效率。

1.8 黑色素瘤细胞摄取 YRS、mEXO 以及 mEXO_{YRS}, 观察不同时间点黑色素表达 将每皿黑色素细胞定量在 1×10^6 个, 随机分为 4 组: PBS 缓冲溶液治疗组 (Untreated)、mEXO 单独治疗组 (mEXO)、YRS 单独治疗组 (YRS)、mEXO_{YRS} 治疗组 (mEXO_{YRS}), 每组 3 皿, 各组 YRS 给药剂量为 50 μg, 并将培养基换成无 FBS 的培养基, 同时加入 2% 的双抗, 37℃ 的培养箱中过夜, 分别处理 1 周 (1W)、2 周 (2W)、6 周 (6W), 处理结束后将上清弃去并用 PBS 清洗 3 次, 4% 的多聚甲醛室温固定 30 min, PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 之后通过共聚焦显微镜观察各处理组在不同时间点的黑色素表达情况。

1.9 免疫荧光染色 在黑色素细胞中分别加入 mEXO (50 μg)、YRS (50 μg) 以及 mEXO_{YRS} (50 μg mEXO+50 μg YRS), 并将培养基换成无 FBS 的培养基, 同时加入 2% 的双抗, 37℃ 的培养箱中过夜, 第 2 天将上清弃去并用 PBS 清洗 3 次, 4% 的多聚甲醛室温固定 30 min, PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 用 0.2%~0.5% tritonX-100 对细胞透化处理 10 min, 之后利用 2% BSA 封闭 30 min, 依次加入一抗、二抗, 最后加入 0.5 μg/mL DAPI 染色后, 加入 20 μL 封片剂。

1.10 YRS、mEXO 以及 mEXO_{YRS} 对于 Nude BALB/c 小鼠黑色素皮下瘤裸鼠模型的美白 通过对 Nude BALB/c 小鼠进行皮下注射黑色素瘤细胞 (1×10^6), 接种后 7 d 开始治疗。将荷瘤 Nude BALB/c 小鼠随机分成 4 组: PBS 缓冲溶液治疗组 (Untreated)、mEXO 单独治疗组 (mEXO)、YRS 单独治疗组 (YRS)、mEXO_{YRS}

治疗组 (mEXO_{YRS}), 每组 3 只, 各组 YRS 给药剂量为 50 μg, 每日涂抹皮下瘤位置, 涂抹 2 周后对涂抹区域的皮肤进行 HE 染色并定量分析。

1.11 YRS、mEXO 以及 mEXO_{YRS} 对于 C57BL/6 小鼠的美白 对 C57BL/6 小鼠随机分成 4 组: PBS 缓冲溶液治疗组 (Untreated)、mEXO 单独治疗组 (mEXO)、YRS 单独治疗组 (YRS)、mEXO_{YRS} 治疗组 (mEXO_{YRS}), 每组 3 只, 各组 YRS 给药剂量为 50 μg, 每日涂抹至 1 周龄的 C57 小鼠背部, 涂抹 3 周, 之后对各处理组小鼠背部涂抹区域的皮肤进行石蜡切片并在镜下观察。

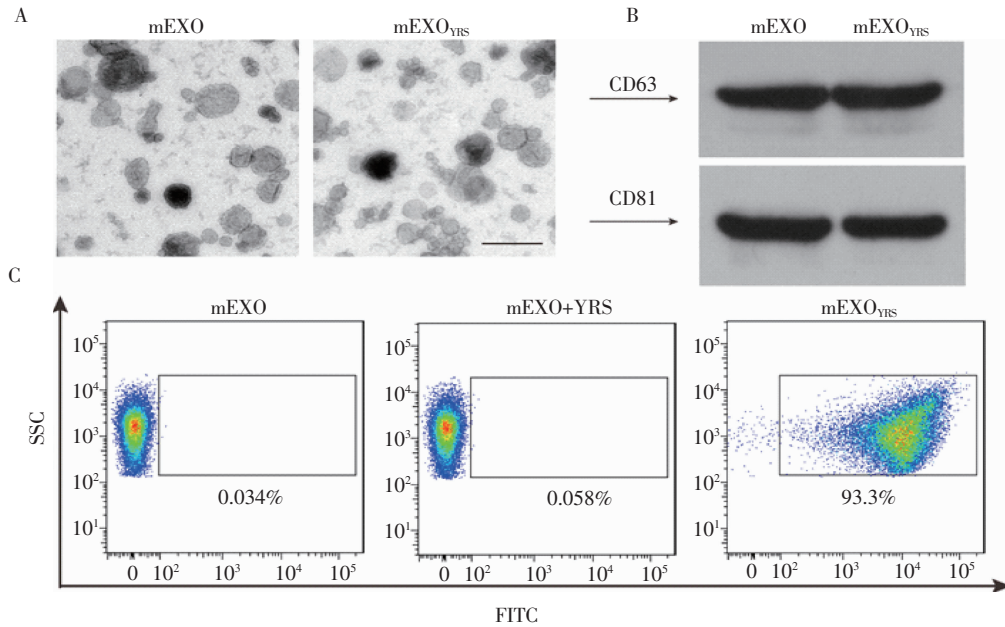
1.12 统计学处理 使用 SPSS16.0 进行统计分析, 正态分布的计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较进行单因素 ANOVA 方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 mEXO_{YRS} 表征及负载效率的验证 与 mEXO 相比, mEXO 负载 YRS 后, 具有相同的清晰的双层膜结构, 负载 YRS 并不影响 mEXO 的形态结构 (图 1A), 外泌体标志性蛋白 CD63、CD81 与 mEXO 有同样的表达丰度 (图 1B)。在流式细胞分析结果中, YRS 通过外泌体锚定肽 CP05 的负载效率达到了 93.3%, 而单独 YRS 与 mEXO 的负载效率为 0.058% (图 1C)。

2.2 黑色素瘤细胞高效摄取 mEXO_{YRS} 并抑制黑色素的产生 为检测 mEXO 能否促进黑色素瘤细胞对 YRS 摄取, 共聚焦显微镜检测 YRS 与黑色素瘤细胞中酪氨酸酶的定位情况, 结果显示, mEXO_{YRS} 被细胞的摄取量明显高于游离的 YRS 肽, 且通过 mEXO 的内体转运途径能提高 YRS 与酪氨酸酶的共定位效率 (图 2A)。在 1、2、6 周时间点, mEXO_{YRS} 处理的细胞中黑色素的含量与 YRS 处理的细胞中黑色素含量比值分别为 1.97、3.84、5.08 (图 2B), mEXO_{YRS} 对 B16-F10 细胞黑色素合成的抑制能力显著强于游离的 YRS 短肽。定量分析结果显示: mEXO_{YRS} 组相比于 YRS 组, 在第 1 周、第 2 周、第 6 周时, 细胞中黑色素含量均显著下降 ($F=56.117、48.954、560.006$, 均 $P < 0.05$) (图 2C)。

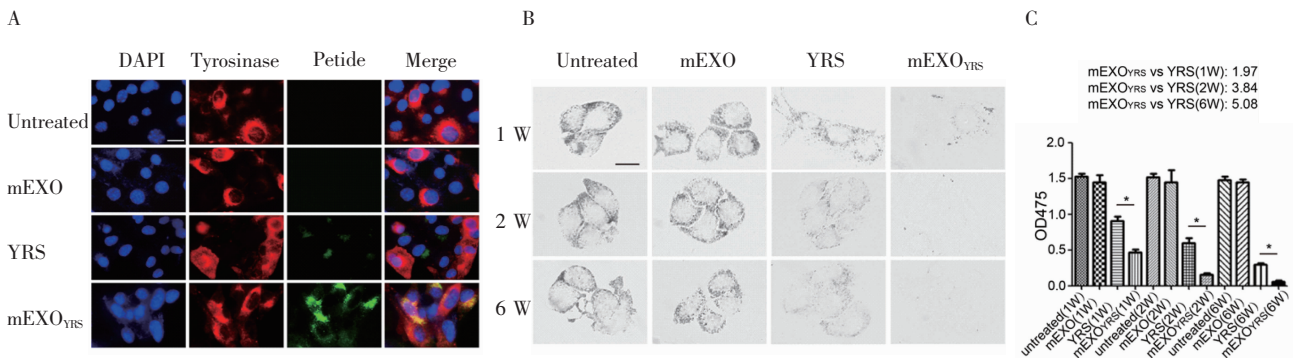
2.3 在 Nude BALB/c 小鼠黑色素细胞皮下瘤模型中 mEXO_{YRS} 抑制色素沉积 与 Untreated 相比, YRS 及 mEXO_{YRS} 均可减少黑色素瘤中黑色素的表达, 且 mEXO_{YRS} 相比于 YRS 呈现出更强的抑制黑色素表达的能力 (图 3A)。病理结果显示, YRS 及 mEXO_{YRS} 均可减少黑色素瘤的着色, 且 mEXO_{YRS} 呈现出更强的减少黑色素瘤着色的能力 (图 3B)。



注:A:透射电镜检测 mEXO 及 mEXO_{YRS} 的形态特征(Scale bar,200 nm);B:Western 印迹检测装载酪氨酸酶抑制肽的外泌体表面特征蛋白表达;C:流式细胞仪分析检测酪氨酸酶抑制肽 YRS 负载效率

图1 负载酪氨酸酶抑制肽(YRS)的牛奶外泌体(mEXO)表征及 YRS 的装载效率

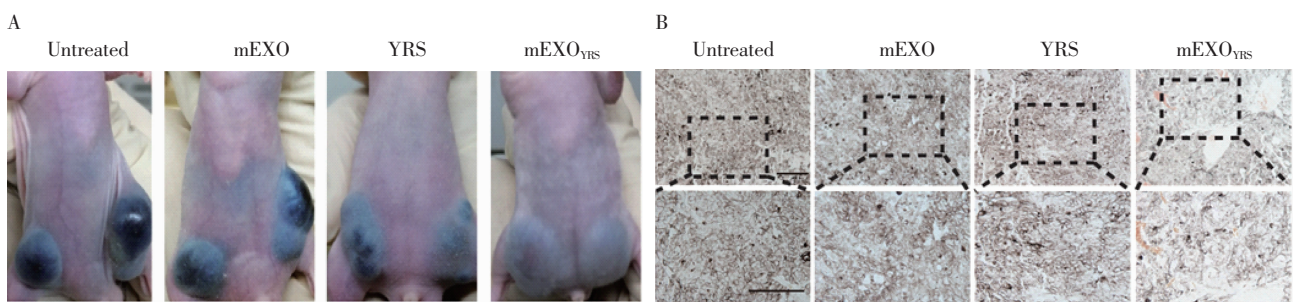
Fig 1 Characterization of mEXO loaded with YRS and loading efficiency of YRS



注:A:检测 B16-F10 细胞对 mEXO(50 μ g)、YRS 短肽(50 μ g)及 mEXO_{YRS}(50 μ g mEXO+50 μ g YRS)的摄取效率(Scale bar,10 μ m);B:检测 B16-F10 细胞与 mEXO(50 μ g)、YRS 短肽(50 μ g)及 mEXO_{YRS}(50 μ g mEXO+50 μ g YRS)共孵育后 1 周、2 周、6 周后,各组 B16 细胞黑色素的表达(Scale bar,10 μ m)。C:B16-F10 细胞与 mEXO(50 μ g)、YRS 短肽(50 μ g)及 mEXO_{YRS}(50 μ g mEXO+50 μ g YRS)共孵育后 1 周、2 周、6 周后,各组 B16-F10 细胞黑色素的表达定量(* P <0.05)

图2 mEXO_{YRS} 的细胞摄取效率及抑制黑色素生成效率

Fig 2 Cell uptake efficiency and inhibition efficiency of melanin production of mEXO_{YRS}

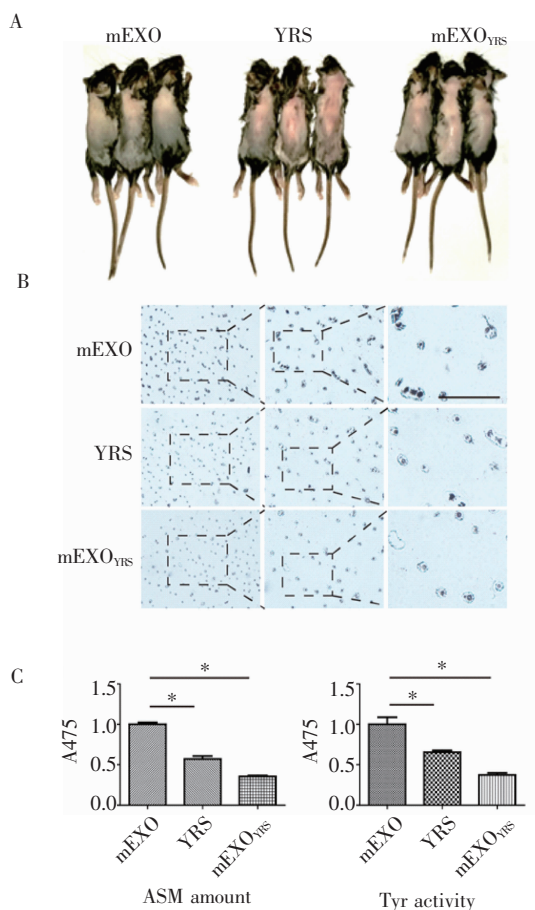


注:A:裸鼠黑色素皮下瘤中各治疗组抑制黑色素表达;B:石蜡切片评估各治疗组皮下瘤的病理表型(Scale bars,100 μ m)

图3 mEXO_{YRS} 抑制黑色素皮下瘤模型中黑色素产生

Fig 3 The melanin production in a melanoma subcutaneous tumor model inhibited by mEXO_{YRS}

2.4 mEXO_{YRS} 在 C57BL/6 小鼠皮肤上具有美白功能 mEXO_{YRS} 处理的小鼠的皮肤相比于其他处理组,有更少的黑色素沉积(图 4A)。同样病理结果显示, mEXO_{YRS} 组中毛囊色素沉积相比于其他处理组更少(图 4B),定量结果表明(图 4C),与 mEXO 组相比, YRS 组与 mEXO_{YRS} 组均显著减少了黑色素含量 ($F=173.083, P<0.05$) 并显著抑制了酪氨酸酶活性 ($F=34.156, P<0.05$)。



注:A:不同处理组对 C57BL/6 小鼠背部皮肤美白情况;B:病理切片评估不同处理治疗 C57BL/6 小鼠背部皮肤病理表型(Scale bar, 100 μ m); C:皮肤中黑色素含量及酪氨酸酶活性定量(* $P<0.05$)

图 4 mEXO_{YRS} 对 C57BL/6 小鼠皮肤美白效果验证

Fig 4 Verification of skin-whitening effect of mEXO_{YRS} on C57BL/6 mice

3 讨论

皮肤色素沉着是由于黑色素体产生黑色素导致的,而黑色素的产生与黑色素体的酪氨酸酶活性有关,在酪氨酸酶的催化作用下,酪氨酸被氧化成多巴醌,多巴醌会自动氧化为多巴色素,最后在半胱氨酸的条件下生成黑色素^[16]。近期有报道指出,通过抑制黑色素体的酪氨酸酶活性,是减少黑色素产生,改善皮肤色素沉积的有效方法^[17]。现阶段熊果苷及对苯二酚可有效抑制酪氨酸酶活性,但其在抑制酪氨酸酶活性的同时也会产生不良反应,根据报

道,酪氨酸酶抑制肽具有低毒性^[18]。本研究以期通过酪氨酸酶抑制肽实现抑制酪氨酸酶活性和缓解不良反应的目的。但本研究发现单独的酪氨酸酶抑制肽 YRS 被黑色素瘤细胞摄取效率低,且与黑色素体内酪氨酸酶共定位作用弱。因此,迫切需要一种新型制剂,提高 YRS 与酪氨酸酶共定位效率,增强 YRS 抑制黑色素产生的效果。

mEXO 作为一种天然的纳米级生物小囊泡,其富含抑制黑色素生成的 microRNA^[19],并且由于其独特的生物学特性,可作为理想的生物载体,通过内体转运途径,实现靶向黑色素体内酪氨酸酶的目的。基于此,本研究利用本实验室自主研发的外泌体特性锚定肽 CP05,成功将 YRS 负载至 mEXO 表面。之后参考抑制酪氨酸酶活性的相关研究^[20],本研究在黑色素瘤细胞中发现 YRS 负载至 mEXO 后,能够被细胞摄取,并与酪氨酸酶有良好的共定位效果,随着处理时间的延长,抑制黑色素的生成的效果越明显。本研究在 Nude BALB/c 小鼠黑色素瘤皮下模型上也进行了验证,同样发现 YRS 负载至 mEXO 后能够有效抑制黑色素瘤的色素沉积。黑色素体处于皮肤的基底层,常规的酪氨酸酶抑制剂较难通过皮肤的角质层,并难以被黑色素细胞摄取^[21]。为了更贴合实际,本研究在 C57BL/6 小鼠皮肤上进行了验证,结果发现 YRS 负载至 mEXO 后对小鼠皮肤具有美白的作用。

综上所述,本研究通过 mEXO 负载 YRS,依靠内体转运的方式将 YRS 被动靶向至酪氨酸酶,有效抑制了黑色素的生成,降低了皮肤色素沉积,显著对皮肤实现美白的目的。后续研究中,笔者将寻求志愿者,在人群中评估该制剂的有效性,为其商品化应用提供基础。

参考文献:

- [1] CORDERO RJB, CASADEVALL A. Melanin[J]. Curr Biol, 2020, 30(4): R142-R143.
- [2] LAI X, WICHES H J, SOLER-LOPEZ M, et al. Structure and function of human tyrosinase and tyrosinase-related proteins[J]. Chemistry, 2018, 24(1): 47-55.
- [3] WANG L, FENG Y, WANG J, et al. Arbutin ameliorates murine colitis by inhibiting JAK2 signaling pathway[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 683818.
- [4] MA C, ZHANG D, MA Q, et al. Arbutin inhibits inflammation and apoptosis by enhancing autophagy via SIRT1[J]. Adv Clin Exp Med, 2021, 30(5): 535-544.
- [5] ENGUITA F J, LEITÃO A L. Hydroquinone: environmental pollution, toxicity, and microbial answers[J]. Biomed Res Int, 2013, 2013: 542168.

- fda-approves-new-targeted-treatment-relapsed-or-refractory-a-cutaneous-myceloid-leukemia.
- [8] SUDARSHAN S, KARAM J A, BRUGAROLAS J, et al. Metabolism of kidney cancer: from the lab to clinical practice [J]. *Eur Urol*, 2013, 63(2): 244–251.
- [9] BOULLAND M, MARQUET J, MOLINIER-FRENKEL V, et al. Human IL4I1 is a secreted l-phenylalanine oxidase expressed by mature dendritic cells that inhibits T-lymphocyte proliferation [J]. *Blood*, 2007, 110(1): 220–227.
- [10] PUIFFE M L, DUPONT A, SAKO N, et al. IL4I1 accelerates the expansion of effector CD8(+) T cells at the expense of memory precursors by increasing the threshold of T-cell activation [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 600012.
- [11] AUBATIN A, SAKO N, DECROUY X, et al. IL4-induced gene 1 is secreted at the immune synapse and modulates TCR activation independently of its enzymatic activity [J]. *Eur J Immunol*, 2018, 48(1): 106–119.
- [12] RAMSPOTT J P, BEKKAT F, BOD L, et al. Emerging role of IL-4-Induced gene 1 as a prognostic biomarker affecting the local T-cell response in human cutaneous melanoma [J]. *J Invest Dermatol*, 2018, 138(12): 2625–2634.
- [13] COUSIN C, AUBATIN A, LE GOUVELLO S, et al. The immunosuppressive enzyme IL4I1 promotes FoxP3(+) regulatory T lymphocyte differentiation [J]. *Eur J Immunol*, 2015, 45(6): 1772–1782.
- [14] GAO Y, SHANG W, ZHANG D, et al. Lnc-C/EBP β modulates differentiation of MDSCs through downregulating IL4i1 with C/EBP β LIP and WDR5 [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1661.
- [15] ZHAO H, TENG Y, HAO W, et al. Single-cell analysis revealed that IL4I1 promoted ovarian cancer progression [J]. *J Transl Med*, 2021, 19(1): 454.
- [16] 庄敏敏, 张云艳. ICAM-1 在肿瘤中的研究进展 [J]. *实用肿瘤学杂志*, 2018, 32(1): 82–86.
- [17] CLAESSEON-WELSH L, WELSH M. VEGFA and tumour angiogenesis [J]. *J Intern Med*, 2013, 273(2): 114–127.
- [18] HUANG H. Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) as a cancer biomarker and MMP-9 biosensors: recent advances [J]. *Sensors (Basel)*, 2018, 18(10): 3249.
- [19] MACKINNON A, BHUPATHI D, CHEN J, et al. 705 Anti-tumor activity of CB-668, a potent, selective and orally bioavailable small-molecule inhibitor of the immuno-suppressive enzyme interleukin 4 (IL-4)-induced gene 1 (IL4I1) [J]. *J Immunother Cancer*, 2020, 8(Suppl 3): A423.
- [20] PRESSET M, DJORDJEVIC D, DUPONT A, et al. Identification of inhibitors of the immunosuppressive enzyme IL4I1 [J]. *Bioorganic Chemistry*, 2020, 94: 103463.

(2021-12-24 收稿)

(上接第 352 页)

- [6] MA W, LONG Y T. Quinone/hydroquinone-functionalized biointerfaces for biological applications from the macro- to nano-scale [J]. *Chem Soc Rev*, 2014, 43(1): 30–41.
- [7] BHATTARAI N, KORHONEN E, TOPPILA M, et al. Resvega alleviates hydroquinone-induced oxidative stress in ARPE-19 cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(6): 11–19.
- [8] MA C, HE N, ZHAO Y, et al. Antimicrobial mechanism of hydroquinone [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2019, 189(4): 1291–1303.
- [9] SREENIVASAN C C, THOMAS M, KAUSHIK R S, et al. Influenza A in bovine species: a narrative literature review [J]. *Viruses*, 2019, 11(6): 32–50.
- [10] VALADI H, EKSTRÖM K, BOSSIOS A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(6): 654–659.
- [11] EKSTRÖM K, VALADI H, SJÖSTRAND M, et al. Characterization of mRNA and microRNA in human mast cell-derived exosomes and their transfer to other mast cells and blood CD34 progenitor cells [J]. *J Extracell Vesicles*, 2012, 1(5): 20–35.
- [12] YAMASHITA T, TAKAHASHI Y, TAKAKURA Y. Possibility of exosome-based therapeutics and challenges in production of exosomes eligible for therapeutic application [J]. *Biol Pharm Bull*, 2018, 41(6): 835–842.
- [13] WU D, CHEN J S, CHANG D C, et al. Mir-434-5p mediates skin whitening and lightening [J]. *Clin Cosmet Investig Dermatol*, 2008, 1: 19–35.
- [14] ZHONG J, XIA B, SHAN S, et al. High-quality milk exosomes as oral drug delivery system [J]. *Biomaterials*, 2021, 277: 121126.
- [15] GAO X, RAN N, DONG X, et al. Anchor peptide captures, targets, and loads exosomes of diverse origins for diagnostics and therapy [J]. *Sci Transl Med*, 2018, 10(444): 386–395.
- [16] SCHLESSINGER D I, ANORUO M, SCHLESSINGER J. Biochemistry, Melanin [A]. In: *StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC., 2022.*
- [17] MANN T, GERWAT W, BATZER J, et al. Inhibition of human tyrosinase requires molecular motifs distinctively different from mushroom tyrosinase [J]. *J Invest Dermatol*, 2018, 138(7): 1601–1608.
- [18] HARIRI R, SAEEDI M, AKBARZADEH T. Naturally occurring and synthetic peptides: Efficient tyrosinase inhibitors [J]. *J Pept Sci*, 2021, 27(7): e3329.
- [19] BAE I S, KIM S H. Milk exosome-derived microRNA-2478 suppresses melanogenesis through the Akt-GSK3 β pathway [J]. *Cells*, 2021, 10(11): 638–651.
- [20] 黄硕, 刘凤. 栀子叶乙醇提取物对 B16 黑色素瘤细胞黑色素生成及酪氨酸酶活性的影响 [J]. *中国当代医药*, 2020, 27(36): 5–17.
- [21] SEBARATNAM D F, VENUGOPAL S S, FREW J W, et al. Diffuse melanosis cutis: a systematic review of the literature [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2013, 68(3): 482–488.

(2021-12-22 收稿)