

DOI: 10.20135/j.issn.1006-8147.2025.05.0464

论著

桑叶细胞外囊泡抑制酪氨酸酶活性及黑色素生成的研究

曹楠¹, 王倩¹, 荆韧威², 尹海芳¹

(天津医科大学 1.医学技术学院; 2.基础医学院, 天津 300070)

摘要 目的:探讨桑叶细胞外囊泡(EV_{MA})对酪氨酸酶活性及黑色素生成的作用。方法:使用差速离心法从桑叶中提取EV_{MA};将实验分为正常对照组(NC组)、EV_{MA}组和桑皮苷F组,荧光标记EV_{MA}并与黑色素瘤细胞B16-F10细胞共培养,观察细胞对EV_{MA}的摄取效率,并检测EV_{MA}与酪氨酸酶的共定位程度,同时测定EV_{MA}对B16-F10细胞酪氨酸酶活性的抑制效果,定量分析黑色素合成量;EV_{MA}局部处理C57BL/6小鼠,观察小鼠皮肤毛囊色素沉积程度,评估其美白效果。结果:经分离纯化后可得粒径均一的EV_{MA},且在B16-F10细胞摄取实验中,与桑皮苷F组相比,EV_{MA}组可更好地被B16-F10细胞摄取($t=103.3, P<0.001$);在B16-F10细胞的体外实验中,与桑皮苷F组相比,EV_{MA}组能更精准地靶向酪氨酸酶区域并抑制其催化活性,从而使黑色素合成减少($t=7.796, P<0.05$);在动物模型中,EV_{MA}抑制了黑色素的合成,使黑色素含量显著下调($t=4.641, P<0.05$)。结论:EV_{MA}兼具抑制酪氨酸酶活性与减少黑色素生成的双重功效。

关键词 桑叶细胞外囊泡;酪氨酸酶;黑色素;美白

中图分类号 [R931.6]

文献标志码 A

文章编号 1006-8147(2025)05-0464-05

Study on the inhibition of tyrosinase activity and melanin production by extracellular vesicles derived from *Morus alba*

CAO Nan¹, WANG Qian¹, JING Renwei², YIN Haifang¹

(1.School of Medical Biotechnology; 2.School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To explore the effect of extracellular vesicles derived from *Morus alba* (EV_{MA}) on tyrosinase activity and melanin production. **Methods:** EV_{MA} were isolated from *Morus alba* via differential centrifugation. The experiments were divided into the negative control (NC) group, the EV_{MA}-treated (EV_{MA}) group, and the Mulberroside F group. Fluorescently labeled EV_{MA} were cocultured with B16-F10 melanoma cells to assess cellular uptake efficiency, analyze co-localization with tyrosinase, determine the inhibitory effect on tyrosinase activity in B16-F10 cells, and quantify melanin synthesis levels. Additionally, topical application of EV_{MA} on C57BL/6 mice was performed to evaluate the degree of follicular pigmentation in skin and assess whitening efficacy. **Results:** Following isolation and purification, EV_{MA} exhibited uniform particle size distribution and demonstrated superior cellular uptake efficiency in B16-F10 melanoma cells uptake experiment compared to the Mulberroside F group ($t=103.3, P<0.001$). *In vitro* experiments of B16-F10 cells further revealed that EV_{MA}, in contrast to Mulberroside F, precisely targeted tyrosinase-containing regions and inhibited its catalytic activity, thereby significantly reducing melanin synthesis ($t=7.796, P<0.05$). *In vivo* studies showed that EV_{MA} treatment markedly suppressed melanin production, leading to significant downregulation of melanin content ($t=4.641, P<0.05$). **Conclusion:** EV_{MA} exhibits dual functionality in inhibiting tyrosinase activity and suppressing melanin production.

Key words extracellular vesicles derived from *Morus alba*; tyrosinase; melanin; skin whitening

黑色素由皮肤中的黑色素细胞产生,其异常积累会导致一系列皮肤病,使皮肤出现色斑^[1]。因此,调控黑色素合成是改善皮肤色素性疾病的安全有效的治疗路径^[2]。酪氨酸酶作为黑色素代谢的限速酶,通过催化酪氨酸羟化与多巴氧化反应控制黑色素生成^[3],故其抑制剂被广泛应用于美白产品。然而,传统成分如氢醌与维甲酸存在显著不良反应,这使得研究转向天然替代物。尽管熊果苷^[4]与桑皮

苷 F (Mulberroside F)^[5]等植物成分展现出酪氨酸酶抑制活性,但前者可能致敏,后者有效成分递送效率低,限制了临床应用。

细胞外囊泡是由细胞释放的含生物活性分子的天然纳米颗粒,在疾病诊断、药物递送与靶向治疗等方面具有独特优势^[6]。研究显示,人参来源的细胞外囊泡可增强人体皮肤细胞的抗衰老作用^[7-8]。角质细胞来源的细胞外囊泡通过转运 miR-330-5p,

基金项目 双一流学科建设经费(116019-XK010301)

作者简介 曹楠(1999-),女,硕士在读,研究方向:植物细胞外囊泡相关研究;通信作者:尹海芳,E-mail:haifangyin@tmu.edu.cn。

调控黑色素代谢,下调酪氨酸酶表达水平并抑制黑色素合成^[9]。因此,细胞外囊泡在美容医疗领域的转化应用也备受瞩目。由于植物细胞外囊泡稳定、安全、生物相容性高^[10],因此利用其来改善皮肤色素沉积,正逐步成为美白产品的研发方向。桑叶作为传统药用植物^[11],其细胞外囊泡(EV_{MA})具有良好的生物相容性和低免疫原性,可经由内体途径被动靶向到未成熟黑色素体内部,进而为皮肤美白提供一种新的途径。本研究通过 C57BL/6 小鼠模型,证实 EV_{MA} 对黑色素的生成具有显著抑制效应,为未来医疗美容行业治疗色素沉着提供了可行性方法,可作为下一代药物递送系统用于皮肤相关疾病的治疗。

1 材料与方法

1.1 动物与材料仪器 小鼠黑色素瘤 B16-F10 细胞系、DMEM 基础培养基、双抗(青霉素+链霉素)(Invitrogen 公司,美国)、胎牛血清、戊二醛、甲基纤维素、多聚甲醛、HRP 标记兔抗羊抗体、HRP 标记羊抗兔抗体(Sigma 公司,美国),铜网(新兴百业有限公司,中国),0.22 μm 滤器(Millipore 公司,美国),超速离心管(Beckman 公司,德国),微型滚针(DRS Dermaroller 公司,中国),细胞培养皿、细胞培养箱、超微量分光光度计 NanodropOne、核酸蛋白微量检测仪 Nanodrop2000c(Thermo 公司,美国),水浴锅(森信实验仪器有限公司,中国),超净工作台(AIRTECH 公司,中国),台式高速冷冻离心机(艾本德股份公司,德国),超速离心机 Optimal-100XP(贝克曼库尔特公司,美国),透射电子显微镜 HT7700(日立高新技术公司,日本),Nanosight 纳米粒度分析仪(Malven 公司,英国),多功能酶标仪(Bio-Tek 仪器公司,美国),荧光倒置显微镜(奥林巴斯公司,日本)。

所有实验均使用 1~3 周龄 C57BL/6 雄性小鼠。在温度受控的特定无病原体条件下饲养小鼠。SPF 级 C57BL/6 小鼠购自上海南方模式生物科技股份有限公司[动物批号:20240007004811;许可证号:SCXK(沪)2024-0007]。实验已通过天津医科大学动物伦理委员会审批(SYXK 2023-0004)。

1.2 方法

1.2.1 EV_{MA} 的分离及纯化 将新鲜桑叶(由天津中医药大学提供)在自来水下冲洗 0.5 h 去除污垢,晾干称重。再将总量为 500 g 的桑叶放入搅拌机中以最大速度搅拌 10 min,每搅拌 1 min 后暂停 1 min 以防止过热。得到的汁液用纱布过滤,再进行差速离心:1 000×g 离心 10 min、3 000×g 离心 20 min 和 10 000×g 离心 40 min。回收的上清液用超速离心机在 100 000×

g 下离心 90 min,将 EV_{MA} 沉淀物在 DPBS 中重悬,并用 0.22 μm 滤器过滤。在离心管中由底层到表层依次铺加 60%、45%、30%和 8%的蔗糖溶液,将 EV_{MA} 粗提物沿管壁缓慢滴加至 8%蔗糖液面表层,避免液体混层。配平后超速离心,150 000×g 离心 2 h (4℃),离心结束后分别收集 30%~45%密度层的 EV_{MA},并用 DPBS 稀释后用 0.22 μm 滤器再次过滤,并再次 100 000×g 离心 1 h(4℃)以去除游离的蔗糖及浓缩 EV_{MA}。离心结束后用无菌的 DPBS 重悬 EV_{MA},储存于-80℃冰箱。

1.2.2 醋酸铀染色及透射电镜观察 EV_{MA} 的形态

EV_{MA} 悬液与 4%PFA 等体积混合,4℃固定 25 min,将封口膜固定于操作台,铜网光面朝上置于封口膜上,取 10 μL EV_{MA} 悬液滴至铜网光面,室温吸附 30 min;1×DPBS 洗涤铜网光面 10 min,再用超纯水洗涤 10 min;将铜网移至 1%戊二醛固定 5 min;将铜网移至超纯水循环漂洗,重复操作 8 次,每次 2 min;将铜网移至 100 μL 草酸铀溶液中,室温染色 5 min;再将铜网移至 80 μL 甲基纤维素-醋酸铀溶液冰上孵育 7 min 10 s;染色结束后,用滤纸吸干残液,室温晾干后将铜网置于封口膜上;透射电镜观察 EV_{MA} 形态。

1.2.3 Nanosight 检测 EV_{MA} 的粒径和产量 EV_{MA} 悬液用 1×DPBS 稀释至 1 mL,涡旋混匀;吸取 1 mL 超纯水按程序冲洗管路并排气泡;转移稀释后的 EV_{MA} 悬液至 1 mL 注射器中并上机检测,设置参数:Camera level 13,温度 25℃。每个样品检测 3 次,使粒径检出浓度在 1×10⁸~1×10⁹ 范围内;最佳稀释浓度下测定 EV_{MA} 粒径分布,最终浓度(particles/mL)除以初始桑叶重量,计算每克桑叶的 EV_{MA} 产量。

1.2.4 计算 EV_{MA} 和桑皮苷 F 的抑制 50%酶活性的浓度(IC₅₀) 将 5 μL 的 L-酪氨酸(1.5 mmol/L)、40 μL 的 L-多巴(25 mmol/L)、80 μL 的磷酸盐缓冲液(67 mmol/L,pH 6.8)以及 40 μL 的相同缓冲液或测试样品加入 EP 管中,随后与 80 μL 的蘑菇酪氨酸酶(60 U)混合。37℃孵育 30 min 后,将 100 μL 混合液吸入到 96 孔板中,测定反应混合物中多巴色素的含量。基于 490 nm 处的光密度(OD₄₉₀),样品的抑制活性表示为 IC₅₀。

1.2.5 流式细胞术检测黑色素瘤细胞对 EV_{MA} 和桑皮苷 F 的细胞摄取 在 B16-F10 细胞中分别加入 EV_{MA} 和桑皮苷 F,将培养基替换为无 FBS 培养基(含 2%双抗),37℃过夜培养,次日弃去上清并用 DPBS 清洗 3 次,用 200 μL DPBS 重悬需进行流式分析的细胞后,立即上机检测,其余细胞用 4% PFA

室温固定 30 min, 再用含 DAPI 的封片剂封片、晾干, 共聚焦显微镜观察细胞摄取。

1.2.6 共聚焦观察黑色素瘤细胞摄取 EV_{MA} 及与酪氨酸酶的共定位情况 在 B16-F10 细胞中加入 EV_{MA} , 将培养基更换为无 FBS 培养基 (含 2% 双抗), 37°C 过夜培养。次日将培养基上清吸弃, 用 DPBS 洗 3 次细胞。随后 4% PFA 室温固定 30 min, 再用 DPBS 洗 3 次 (每次 5 min)。接着用 0.2%~0.5% Triton X-100 透化处理细胞 10 min, 并用 2% BSA 封闭 30 min。先后滴加一抗 (稀释比例为 1:1 000)、二抗 (稀释比例为 1:5 000), 最后用 DAPI 抗淬灭封片剂封片, 荧光显微镜观察并采集图像。

1.2.7 观察黑色素瘤细胞摄取 EV_{MA} 或桑皮苷 F 后对酪氨酸酶活性及黑色素含量表达的影响 按 1×10^6 个细胞/皿接种 B16-F10 细胞, 随机分为正常对照组 (NC 组)、 EV_{MA} 组、桑皮苷 F 组, 各组给药剂量为 IC50 剂量。将培养基更换为无 FBS 培养基 (含 2% 双抗), 37°C、5% CO_2 培养箱孵育 24 h, 连续培养 7 d 后弃去培养液上清, DPBS 洗 3 次 (每次 5 min)。随后进行酪氨酸酶活性的 SDS-PAGE 检测: 总蛋白定量取 40 μ g 进行 10% SDS-PAGE 电泳, 再将 PAGE 胶浸入 200 mL NaH_2PO_4 缓冲液中平衡 30 min (避光操作) 以维持酶活性。平衡结束后去除残留缓冲液, 加入 200 mL L-多巴反应液, 将平皿迅速转移至 37°C 培养箱并避光, 每隔 1 h 更换新鲜反应液 (持续 3 h) 以消除 L-多巴的自发氧化产生非特异性染色。3 h 后, 凝胶中黑色条带即为酪氨酸酶所在位置, 其显色强度与酪氨酸酶活性呈正相关。将进行黑色素含量检测的细胞用 4% PFA 室温固定 30 min, DPBS 漂洗 3 次 (每次 5 min), 随后显微镜下对比各组黑色素沉积差异。

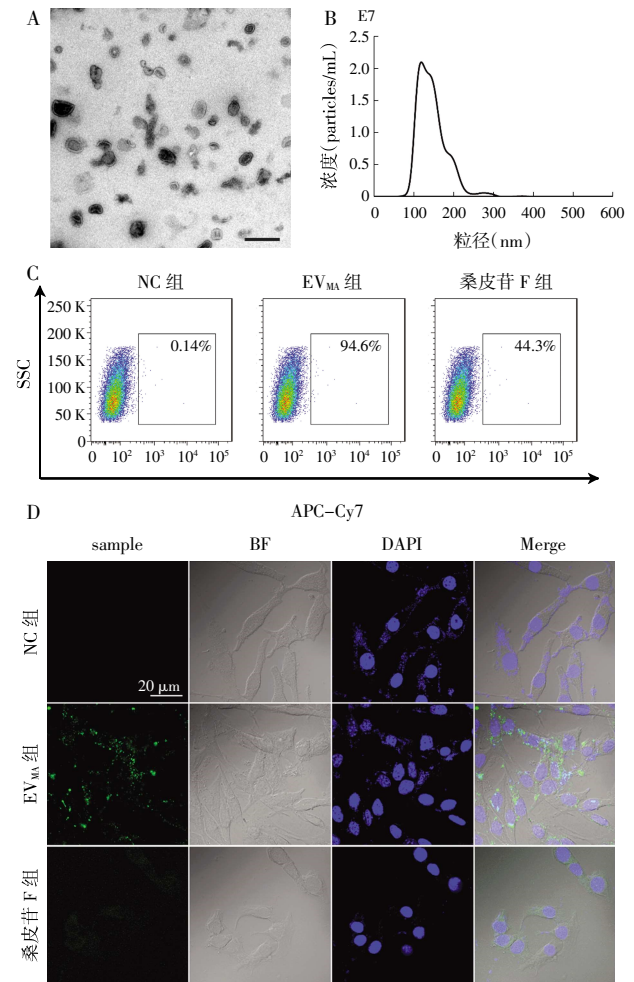
1.2.8 EV_{MA} 和桑皮苷 F 在 C57BL/6 小鼠模型中的美白功效评价 利用随机数表法将 C57BL/6 小鼠分成 3 组: NC 组、 EV_{MA} 组、桑皮苷 F 组, 每组 3 只, 各组给药剂量为 IC50 对应剂量。连续 21 d 每日对 1 周龄 C57BL/6 小鼠背部进行外用给药, 处理结束后取皮肤样本进行石蜡切片并在镜下观察。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 28.0 软件, 正态分布数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间均数比较行单因素方差分析 (One-way ANOVA) 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 EV_{MA} 的表征及细胞摄取效率的验证 将 EV_{MA} 分离和纯化后, 表征结果显示 EV_{MA} 具有清晰的双层膜结构 (图 1A), EV_{MA} 的囊泡粒径较为均一 (图

1B), 每克桑叶所对应的 EV_{MA} 的产量为 5.2×10^8 particles/g。在流式细胞分析结果中, EV_{MA} 组在 B16-F10 细胞中的摄取效率达到 94.6%, 而桑皮苷 F 组的细胞摄取效率为 44.3% ($t=103.3, P < 0.001$, 图 1C)。共聚焦显微镜检测结果显示, 与桑皮苷 F 组相比, EV_{MA} 组在 B16-F10 细胞中更易被摄取 (图 1D)。

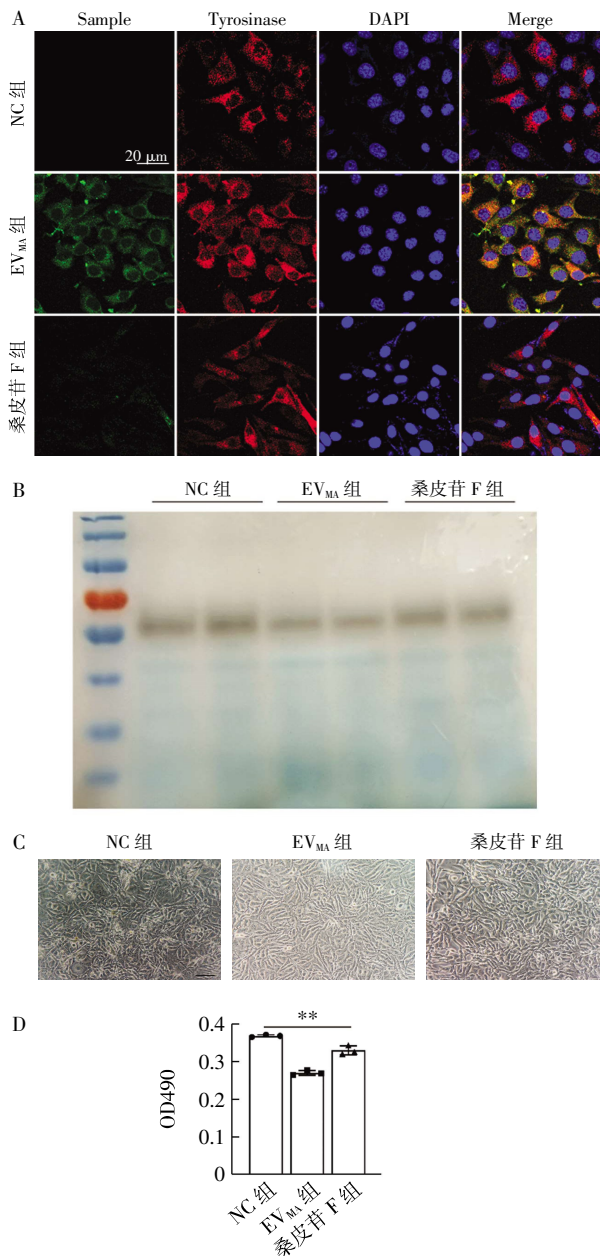


注: A: 透射电镜表征 EV_{MA} 组的形态结构 (Scale bar, 200 nm); B: Nanosight 纳米粒度分析仪测定 EV_{MA} 组的囊泡粒径; C: 流式细胞术分析检测 EV_{MA} 组和桑皮苷 F 组的细胞摄取效率; D: 共聚焦显微镜观察 EV_{MA} 组和桑皮苷 F 组在 B16-F10 细胞中的摄取; EV_{MA} : 桑叶细胞外囊泡

图 1 EV_{MA} 的表征及细胞摄取

Fig.1 Characterization and cellular uptake of EV_{MA}

2.2 EV_{MA} 显著抑制酪氨酸酶活性并减少黑色素的合成 为验证 EV_{MA} 与 B16-F10 细胞内的酪氨酸酶是否存在共定位效应, 笔者检测了 EV_{MA} 、桑皮苷 F 及酪氨酸酶在 B16-F10 细胞中的分布, 结果显示, 与桑皮苷 F 组相比, EV_{MA} 组可以更好地定位到酪氨酸酶 (图 2A)。酪氨酸酶活性测试结果显示, 与桑皮苷 F 组相比, EV_{MA} 组对酪氨酸酶的抑制效果更强, 并且黑色素的生成进一步减少 ($t=7.796, P < 0.01$, 图 2B~2D)。



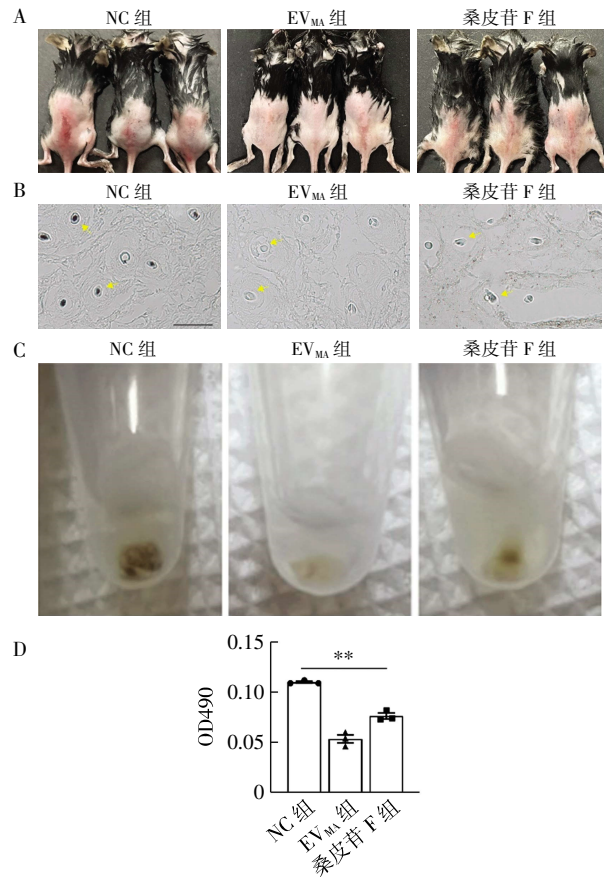
注:A:共聚焦显微镜检测 EV_{MA} 组与桑皮苷 F 组在 B16-F10 细胞中与酪氨酸酶的共定位 (Scale bar, 20 μm); B:SDS-PAGE 检测 EV_{MA} 组与桑皮苷 F 组对酪氨酸酶活性的抑制效果; C:检测 B16-F10 细胞与 EV_{MA} 组 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、桑皮苷 F 组 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 共孵育后, 各组 B16-F10 细胞中黑色素含量差异 (Scale bar, 50 μm); D: B16-F10 细胞与 EV_{MA} 组 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、桑皮苷 F 组 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 共孵育后, 各组 B16-F10 细胞黑色素水平的量化测定; EV_{MA}: 桑叶细胞外囊泡; ** $P < 0.01$

图 2 EV_{MA} 抑制酪氨酸酶活性及减少黑色素合成

Fig.2 EV_{MA} inhibited tyrosinase activity and reduced melanin synthesis

2.3 EV_{MA} 在 C57BL/6 小鼠皮肤上具有美白功效
与桑皮苷 F 组相比, EV_{MA} 组小鼠皮肤中黑色素沉积水平被显著抑制 (图 3A)。病理结果表明, EV_{MA} 组毛囊区域色素沉着程度在所有处理组中最低 (图 3B)。分别获取小鼠皮肤表面的组织并加入缓冲液进行重悬离心, 可以观察到, 与其他处理组相比, EV_{MA}

组对应的 EP 管底的黑色素沉淀最少 (图 3C)。定量结果显示, EV_{MA} 组较桑皮苷 F 组黑色素含量显著降低 ($t=4.641, P < 0.01$), 见图 3D。



注:A:C57BL/6 小鼠背部皮肤在不同处理组作用下的美白情况; B:石蜡包埋并切片鉴定不同处理组 C57BL/6 小鼠背部皮肤病理表型 (Scale bar, 50 μm); C:不同处理组的 C57BL/6 小鼠背部皮肤组织重悬液所对应的黑色素沉淀; D:C57BL/6 小鼠背部皮肤组织中黑色素水平量化评估; EV_{MA}: 桑叶细胞外囊泡; ** $P < 0.01$

图 3 EV_{MA} 在 C57BL/6 小鼠皮肤色素沉着模型中的美白功效评估

Fig.3 Evaluation of the whitening efficacy of EV_{MA} in the skin pigmentation model of C57BL/6 mice

3 讨论

皮肤色素沉着源自表皮基底层中黑色素颗粒的沉积^[12]。黑色素的生物合成途径涉及酪氨酸在酪氨酸酶催化下的氧化过程, 生成的多巴醌经酶促聚合反应形成致密的黑色素颗粒, 再通过黑色素细胞特有的转运系统将其释放到表皮细胞中^[13]。有研究指出, 干预皮肤色素沉着的金标准是通过抑制酪氨酸酶活性来减少黑色素合成^[14]。迄今为止, 临床上已报道的可有效抑制酪氨酸酶活性的有机化合物在发挥效能的同时均会产生不良反应, 例如含氢醌美白产品的长期使用与外源性色素代谢障碍性病变相关^[15]; 维甲酸可通过胎盘影响胎儿发育, 导致先天性畸形, 孕期及哺乳期女性需绝对避免使用, 同时其过度使用还会导致皮肤刺激^[16]; 持续使用曲酸制

剂易引发皮肤干燥综合征及鳞屑样病变;白藜芦醇因高疏水性导致经皮渗透效率不足,需通过载体系统介导方可实现透皮递送效能。而从天然植物中获取的酪氨酸酶抑制剂如熊果苷对皮肤也存在刺激作用^[17],桑皮苷 F 存在皮肤渗透性差、作用时间短等问题,其长期应用的安全性目前尚不明确。本研究发现,单独使用桑皮苷 F 时,其在黑色素瘤细胞中的摄取效率低,同时难以准确找到并结合黑色素生成的关键酶——酪氨酸酶。因此亟需研发一种新型的酪氨酸酶抑制剂,既能精准地与酪氨酸酶实现共定位,又能有效减少黑色素生成。

植物细胞外囊泡作为一种生物源性纳米级膜性颗粒,含有多种生物活性分子^[18],可以作为一种新型的酪氨酸酶活性抑制剂,实现针对黑色素瘤细胞的特异性靶向干预。有文献证实,源自朝鲜树参(*Dendropanax morbifera*)的细胞外囊泡在黑色素瘤细胞中表现出双重效应:浓度梯度相关性降低黑色素水平及抑制酪氨酸酶催化功能^[19]。本研究从桑叶中提取 EV_{MA}后,发现 EV_{MA} 能够被黑色素瘤细胞高效吸收,同时可以精准靶向酪氨酸酶,并显著抑制黑色素合成。传统酪氨酸酶抑制剂受限于皮肤屏障难以抵达表皮基底层黑色素细胞^[20],而本研究通过 C57BL/6 小鼠模型证明 EV_{MA} 可有效穿透角质层屏障并显著抑制黑色素的沉积。

综上所述,本研究通过从天然植物桑叶中提取 EV_{MA},经由内体转运机制实现酪氨酸酶的精准靶向递送,同时有效抑制黑色素的合成与皮肤色素沉积,使皮肤美白呈现显著效果。

参考文献:

- [1] PILLAIYAR T, MEENAKSHISUNDARAM S, MANICKAM M, et al. A medicinal chemistry perspective of drug repositioning: recent advances and challenges in drug discovery[J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 195: 112275.
- [2] INOUE D, NARITA T, ONO T, et al. A mechanism of melanogenesis mediated by E-cadherin downregulation and its involvement in solar lentigines[J]. *Int J Cosmet Sci*, 2023, 45(6): 775-790.
- [3] ROULIER B, RUSH I, LAZINSKI L M, et al. Resorcinol-based hemiindigoid derivatives as human tyrosinase inhibitors and melanogenesis suppressors in human melanoma cells[J]. *Eur J Med Chem*, 2023, 246: 114972.
- [4] ZHANG L, ZHAO Q, CHE Q, et al. Effectiveness and safety of combined use of home-based radiofrequency device and arbutin cream in melasma and facial rejuvenation[J]. *J Cosmet Dermatol*, 2025, 24(2): e70007.
- [5] THAMRONGWATWONGSA J, PATTARAPIPATKUL N, JAITHON T, et al. Mulberroside F from *in vitro* culture of mulberry and the potential use of the root extracts in cosmeceutical applications[J]. *Plants*, 2022, 12(1): 146.
- [6] GUPTA D, ZICKLER A M, EL ANDALOSSI S. Dosing extracellular vesicles[J]. *Adv Drug Delivery Rev*, 2021, 178: 113961.
- [7] CHO E G, CHOI S Y, KIM H, et al. *Panax ginseng*-derived extracellular vesicles facilitate anti-senescence effects in human skin cells: an eco-friendly and sustainable way to use ginseng substances [J]. *Cells*, 2021, 10(3): 486.
- [8] CHOI W, CHO J H, PARK S H, et al. Ginseng root-derived exosome-like nanoparticles protect skin from UV irradiation and oxidative stress by suppressing activator protein-1 signaling and limiting the generation of reactive oxygen species[J]. *J Ginseng Res*, 2024, 48(2): 211-219.
- [9] LIU Y, XUE L, GAO H, et al. Exosomal miRNA derived from keratinocytes regulates pigmentation in melanocytes[J]. *J Dermatol Sci*, 2019, 93(3): 159-167.
- [10] CAO M, DIAO N, CAIX, et al. Plant exosome nanovesicles (PENs): green delivery platforms[J]. *Mater Horiz*, 2023, 10(10): 3879-3894.
- [11] YANG L, ZHAO J, FAN S, et al. Effect of frost on the different metabolites of two mulberry (*Morus nigra* L. and *Morus alba* L.) leaves[J]. *Molecules*, 2023, 28(12): 4718.
- [12] CORDERO RJB, CASADEVALL A. Melanin[J]. *Curr Biol*, 2020, 30(4): R142-R143.
- [13] MARANDUCA M, BRANISTEANU D, SERBAN D, et al. Synthesis and physiological implications of melanic pigments[J]. *Oncol Lett*, 2019, 17(5): 4183-4187.
- [14] 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.
- [15] SHIVARAM K, EDWARDS K, MOHAMMAD T F. An update on the safety of hydroquinone[J]. *Arch Dermatol Res*, 2024, 316(7): 378.
- [16] 叶瑞贤,梁晓冬,邓婕,等.口服维甲酸在治疗皮肤病的应用[J]. *中国中西医结合皮肤性病学期刊*, 2020, 19(5): 497-500.
- [17] OISO N, TATEBAYASHI M, HOSHIYAMA Y, et al. Allergic contact dermatitis caused by arbutin and dipotassium glycyrrhizate in skin-lightening products[J]. *Contact Dermatitis*, 2017, 77(1): 51-53.
- [18] KALLURI R, LEBLEU V S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes[J]. *Science*, 2020, 367(6478): eaau6977.
- [19] LEE R, KO H J, KIM K, et al. Anti-melanogenic effects of extracellular vesicles derived from plant leaves and stems in mouse melanoma cells and human healthy skin[J]. *J Extracell Vesicles*, 2020, 9(1): 1703480.
- [20] 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.

(2025-02-26 收稿)