



Whitening Efficacy Evaluation of the Multi-Herb

Lu Yi-na*, Yang Ya-di, Lin Meng-gan, Xie Zhi-yong*

Shanghai Greaf Biotech Co. Ltd., Shanghai, China

Email address:

inna@greaf.com.cn (Lu Yi-na), berny@greaf.com.cn (Xie Zhi-yong)

*Corresponding author

To cite this article:

Lu Yi-na, Yang Ya-di, Lin Meng-gan, Xie Zhi-yong. *Whitening Efficacy Evaluation of the Multi-Herb*. *Science Discovery*.

Vol. 6, No. 4, 2018, pp. 306-311. doi: 10.11648/j.sd.20180604.22

Received: May 21, 2018; Accepted: July 20, 2018; Published: August 10, 2018

Abstract: The multi-Herb (mH) was prepared from 4 plant extracts including *Phyllostachis Bambusoides*, *Sophora Flavescens* Root, *Lycium Barbarum* Fruit and *Pyracantha Fortuneana* Fruit through ethanol extraction, filtration and concentration. Focus on tyrosinase activity and melanin content, mH repressed the activity of tyrosinase from mushroom and B16F1 cells to 49.2% and 76.2% respectively, at concentration of 3%. mH reduced the cellular melanin synthesis to 98.2% in nature and 92.1% under α -MSH induced melanogenesis respectively, showed a dose-dependently inhibitory effect. The human-skin test results showed that the skin melanin content (MI value) was significantly reduced by 12.3% after 7 weeks application of a cream containing 5% mH, better than arbutin of 2% concentration. All the results indicate that mH displays a good effect for whitening.

Keywords: Multi-Herb, Tyrosinase, Melanin Synthesis, Human-Skin Test

一种植物复合提取物的美白功效评价

卢伊娜*, 杨雅迪, 林梦感, 谢智勇*

上海珈叶实业有限公司, 上海, 中国

邮箱

inna@greaf.com.cn (卢伊娜), berny@greaf.com.cn (谢智勇)

摘要: 通过乙醇提取, 过滤浓缩将桂竹叶、苦参、枸杞、火棘果4种中药材混合制备成一种植物复合提取物(mH)。针对酪氨酸酶活性及黑色素含量进行研究, 发现3%的mH对蘑菇酪氨酸酶活性的抑制率达到49.2%, 对小鼠黑色素瘤细胞(B16F1)内酪氨酸酶活性的抑制率达到76.2%。同时mH对自然状态下细胞内黑色素生成的抑制率最大达到98.2%, 对促黑激素(α -MSH)诱导的黑色素生成也有剂量依赖性的抑制, 最大抑制率达到92.1%。人体试验结果表明, 使用含mH 5%的美白霜7周后, 受试者皮肤黑色素含量(MI值)明显降低了12.3%, 效果强于2%的熊果苷。综合以上实验结果, 说明mH具有良好的美白效果。

关键词: 植物复合提取物, 酪氨酸酶, 黑色素生成, 人体试验

1. 引言

人类崇尚美, 女性更加期望皮肤美, 而亚洲女性尤其注重皮肤的白皙美。《闲情偶寄》云: “妇人本质, 惟白

最难。”因此, 众多化妆品公司都争相对皮肤美白的有效成分进行研究开发。早期的纯化合物氢醌、中期的果酸由于其毒副作用在化妆品使用中均受限制, 从天然植物中寻找安全高效的美白祛斑活性物质成为近期研发趋势。

皮肤颜色与许多因素有关,主要取决于黑色素的含量及分布,角质层的厚薄、内分泌、营养、血液循环等因素也可通过影响黑色素来影响皮肤颜色。黑色素在黑素细胞的黑色素小体中合成或生成,再从黑素细胞转运至相邻的角质形成细胞内,从而分布于整个表皮中,来决定人体皮肤颜色[1-3]。黑素细胞的结构功能和数量直接影响皮肤中黑色素的含量,是黑色素生成的主要场所,而酪氨酸酶是黑色素合成的主要限速酶,可催化酪氨酸和多巴进行化学反应,最终生成黑色素。因此对酪氨酸酶的活性进行调控,从而影响黑色素生成是目前肌肤美白研究和应用最多的途径[4-6]。目前已开发的针对酪氨酸酶的活性成分主要包含曲酸及其衍生物、甘草黄酮、壬二酸及其衍生物、熊果苷等。

黑色素合成过程中的多巴色素异构酶和羟基吡啶羧氧化酶、过氧化物酶、黑色素从黑素细胞转运至角质形成细胞、黑色素在角质形成细胞内的降解是近年来开发美白类活性成分的新的关注点[7-11]。已开发的针对过氧化物酶的活性成分如谷胱甘肽、维生素C及其衍生物,针对黑色素转运的活性成分如烟酰胺、绿茶提取物等,均在美白类化妆品中得到应用。

苦参中的生物碱类成分、竹叶中的黄酮及酚酸类成分、火棘果中的有机酸成分、枸杞中的多糖类成分能够抑制酪氨酸酶活性、抗氧化,并促进皮肤的新陈代谢[12-15],可针对黑色素合成、黑色素代谢等不同机理达到美白的效果。本研究将这四种植物进行工艺优化,复配制备成一种纯天然植物来源的美白原料——植物复合提取物(multi-Herb, mH),通过体外实验测定mH对小鼠黑色素瘤细胞的酪氨酸酶活性及黑色素生成的作用,再应用人体试验结合仪器测量的方法,来评价mH的美白功效。

2. 实验方法与结果

2.1. 主要试剂与仪器

2.1.1. 细胞

小鼠黑色素瘤细胞(B16F1)购自武汉细胞库(货号CRL-6323)。

2.1.2. mH的制备

桂竹叶、苦参、枸杞、火棘果购自各大药材市场。量取苦参33 g、桂竹叶34 g、火棘果32 g和枸杞31 g,用10倍量[溶液体积(mL):药材重量(g)]的含10%的乙醇水溶液在40℃浸泡提取2次,每次浸泡48 h,制备成乙醇提取液。将乙醇提取液过滤后浓缩50倍,用大孔吸附树脂进行纯化,用75%的乙醇水溶液进行洗脱,洗脱后收集洗脱液。洗脱液浓缩15倍后,加0.5倍体积的1,3-丁二醇,搅拌均匀,静置36小时,收集上清液。对上清液进行离心操作,获得离心上清液,即为mH。

2.1.3. 试剂

熊果苷粉末,北京贝丽莱斯生物化学有限公司;DMEM培养基、胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)、青霉素-链霉素(Penicillin Streptomycin, PS)、胰酶、PBS, Thermo Fisher公司;中性红(Neutral Red, NR)粉末、蘑菇酪氨酸酶、L-酪氨酸粉末、L-DOPA粉末、Triton

X-100溶液, Sigma公司;促黑素细胞激素(alpha-Melanocyte-stimulating hormone, α -MSH), R&D公司;Na₂HPO₄·12H₂O、NaH₂PO₄·2H₂O、乙醇、乙酸,国药集团。其他试剂均为国产分析纯。

2.1.4. 仪器耗材

Mexameter MX18型皮肤黑色素测试探头及MPA 6多功能皮肤测试系统,德国CK公司;离心机及移液枪, Eppendorf公司;倒置显微镜,江南永新光学有限公司;MultiSkan FC酶标仪、无菌操作台、CO₂培养箱, Thermo Fisher公司。

2.2. 实验方法

2.2.1. 细胞培养

选择对数生长期的B16F1细胞,经0.25%胰酶消化,用含有10%FBS、1% PS的DMEM培养基传代,置于培养箱37℃、5% CO₂环境中进行培养。每2天传代一次,传代10次后弃用。

2.2.2. 细胞活性测定

细胞活性的测定通过NR的方法完成[16-18]。将对数生长期的B16F1细胞以 1×10^4 /孔接种于96孔板中孵育过夜,弃去培养基后分别加入200 μ L浓度为0.3%-10%的mH样品,以溶剂作为对照组。共同培养72 h后将200 μ L的NR溶液(33 μ g/mL)置换原培养基中培养液,在37℃下继续反应3 h。弃去含NR的培养液,加入100 μ L萃取液(50 H₂O:49乙醇:1乙酸),室温温和震荡20 min之后于540 nm处测定吸收值A。细胞活性通过以下公式来计算:

$$\text{细胞活性}(\%) = A_{\text{样品}}/A_{\text{对照}} \times 100\% \quad (1)$$

2.2.3. 酪氨酸酶活性测定

(i) 蘑菇酪氨酸酶活性测定

酪氨酸酶活性的测定是参照文献[19, 20],稍作修改,利用酶标仪来测定。首先将50 KU的蘑菇酪氨酸酶粉末、L-酪氨酸粉末、L-DOPA粉末分别溶解在磷酸缓冲溶液(0.1 mM, pH 6.8)来制备250 U/mL的酪氨酸酶溶液、0.5 mg/mL的酪氨酸溶液和0.5 mg/mL的L-DOPA溶液。再于96孔板中分别加入120 μ L的底物(酪氨酸溶液或L-DOPA溶液)、20 μ L的样品(mH或熊果苷稀释液)、60 μ L的酪氨酸酶溶液,37℃静置反应30 min。以磷酸缓冲液为溶剂对照,用酶标仪于492 nm处测定吸收值A,酪氨酸酶活性的抑制率通过以下公式来计算:

$$\text{抑制率}(\%) = (1 - A_{\text{样品}}/A_{\text{对照}}) \times 100\% \quad (2)$$

(ii) 细胞内酪氨酸酶活性测定

按照细胞活性测定方法,将 1×10^4 /孔的B16F1细胞接种于96孔板,培养过夜后加入安全剂量以下的不同浓度的mH、300 μ g/mL的熊果苷样品,以溶剂作为对照组。与细胞共同培养72 h后,弃去培养液, PBS清洗一次,细胞板每孔加入100 μ L 1%的Triton X-100,于-80℃裂解20 min,室温溶解之后再加入100 μ L L-DOPA溶液(用磷酸缓冲液

配置成3 mg/mL), 37°C反应1 h后于492 nm处测定吸收值A [21, 22]。抑制率计算同前。

2.2.4. 细胞内黑色素生成测定

将对数生长期的B16F1细胞以 1×10^4 /孔接种于96孔板中孵育过夜, 之后加入安全剂量以下不同浓度的mH、300 μ g/mL的熊果苷样品, 以溶剂为对照组。之后有2种处理方式, 一种为自然状态下的黑色素含量测定, 即不加入任何外源刺激, 细胞培养72 h后直接检测; 另一种为诱导状态下的黑色素含量测定, 即在细胞内再加入0.01-10 μ g/mL的 α -MSH进行刺激, 共同培养72 h后进行检测。黑色素含量的测定是参考文献[22, 23]进行修改, 具体为: 将150 μ L细胞上清液转移至新的96孔板, 于酶标仪405 nm处测定吸收值A。抑制率计算同前。

2.2.5. 人体试验评价

选择正常健康受试者10人, 其中男性4人, 平均年龄 30.2 ± 1.2 岁; 女性6人, 平均年龄 26.2 ± 3.7 岁。测试期间要求环境的温度和湿度恒定, 温度为 $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, 相对湿度为30%-60%。确定左右手臂内侧为测试区域, 面积为 $3 \text{ cm} \times 3 \text{ cm}$, 共标记3个区域。按 $2.0 \pm 0.1 \text{ mg}$ 样品/ cm^2 的用量每天早晚使用基质对照样品、5% mH样品及2% 熊果苷样品2次, 使用前、使用1周、3周、5周、7周分别使用MX 18测试探头检测皮肤黑色素含量(MI值) [24, 25]。每个区域分别检测5个点, 取平均值。黑色素减少值通过以下公式来计算:

$$\text{黑色素减少值}(\%) = (\text{MI}_{\text{样品使用后}} / \text{MI}_{\text{样品使用前}} - 1) \times 100\% - (\text{MI}_{\text{对照使用后}} / \text{MI}_{\text{对照使用前}} - 1) \times 100\% \quad (3)$$

2.2.6. 数据分析

采用Origin 8软件对数据进行统计分析, 采用配对t检验对数据进行显著性分析。 $P > 0.05$ 认定为差异不显著, $P < 0.05$ 认定为差异显著, $P < 0.01$ 认定为差异极其显著。

2.3. 实验结果

2.3.1. mH对B16F1细胞存活率的影响

采用NR法检测mH对细胞的毒性作用, 其目的在于找出一个合适的安全剂量范围。研究了不同浓度的mH样品对B16F1细胞存活率的影响, 结果如表1所示。与对照组相比, mH浓度在10%时, 细胞活性降至2.4%, 具有强细胞毒性 ($P < 0.01$); 而mH浓度小于3%时, 细胞活性均大于80%, 且细胞形态没有明显改变, 由此确定mH的最大安全浓度为3%, 并以此浓度进行后续功效验证实验。

近年来, 天然活性物——熊果苷的美白效果逐渐得到大家的认可, 它通过抑制黑色素的生成、影响黑素细胞活性等发挥美白作用[5]。我们同时研究了熊果苷对于B16F1细胞存活率的影响。结果发现1000 μ g/mL的熊果苷处理组, 与对照组相比细胞活性降低至9.6% ($P < 0.01$), 表现出强细胞毒性; 300 μ g/mL的熊果苷处理组的细胞活性为89.8%,

属于安全浓度范围。因此后续实验均选用此浓度的熊果苷作为阳性对照, 来验证mH的美白效果。

表1 mH对B16F1细胞存活率的影响。

细胞活性	mH浓度 (%)				
	0	0.3	1	3	10
%	100.0	103.8	102.1	83.2	2.4

2.3.2. mH对酪氨酸酶活性的抑制作用

在皮肤黑色素生物合成过程中, 酪氨酸羟化生成多巴, 多巴氧化生成多巴醌, 二羟基吲哚转化生成吲哚醌, 这些反应步骤均需酪氨酸酶的参与[1]。

首先检测mH对蘑菇酪氨酸酶活性的抑制作用。分别以L-酪氨酸(黑色素合成第一步反应)和L-DOPA(黑色素合成第二步反应)为底物, 通过反应终点法计算样品对酪氨酸酶活性的抑制率。研究发现, mH对第一步反应的抑制率远远强于第二步反应的抑制率(结果未显示), 而第一步反应是黑色素合成途径中的最关键限速反应, 说明mH可从源头阻止黑色素合成。

图1结果显示了mH对第一步限速反应的抑制作用。与对照组相比, 在0.75%的浓度下, mH对蘑菇酪氨酸酶活性有18.5%的抑制效果, 随着浓度增加, 在6%时抑制率达到最大, 为51.5% ($P < 0.01$)。3%的mH抑制率为49.2%, 略强于300 μ g/mL熊果苷的抑制率(45.7%, $P < 0.05$), 说明mH对蘑菇酪氨酸酶活性有较强的抑制效果。

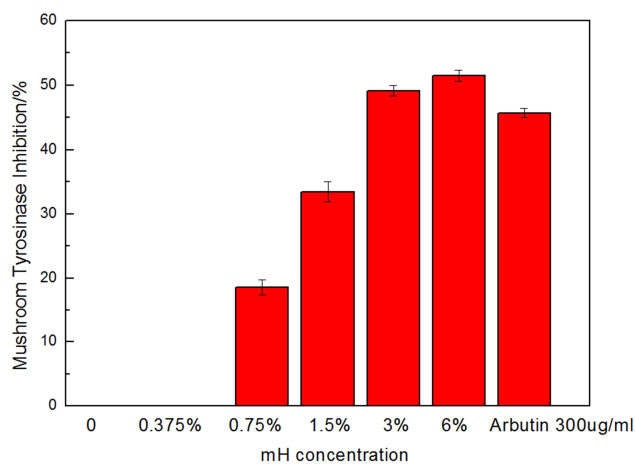


图1 mH对蘑菇酪氨酸酶活性的作用。

再检测mH对B16F1细胞内酪氨酸酶的活性的影响。样品与细胞于37°C孵育72 h后, 加入Triton X-100裂解细胞, 使细胞内的酪氨酸酶释放, 再以L-DOPA为底物, 测定酪氨酸酶的活性来评价样品的作用。结果如图2所示, 与对照组相比, mH在0.3%-3%的浓度范围内对酪氨酸酶活性的抑制作用分别达到21.7-76.2% ($P < 0.01$), 表现出显著的剂量依赖性, 其中在3%时的抑制率略强于300 μ g/mL的熊果苷对酪氨酸酶活性的抑制效果(66.7%, $P < 0.05$), 说明mH具有良好的抑制细胞内酪氨酸酶活性的作用。

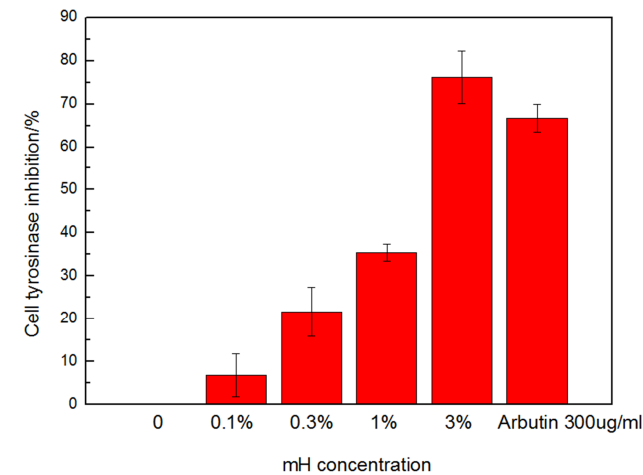


图2 mH对B16F1细胞内的酪氨酸酶活性的影响。

2.3.3. mH对黑色素生成的作用

酪氨酸酶的活性与黑色素的合成量成正相关[1-4]。我们研究了mH对B16F1细胞黑色素含量的影响。

自然状态下，通过检测B16F1细胞培养基内的黑色素含量发现（见图3），相比于对照组，mH在0.03%-3%的浓度范围内，剂量依赖性地抑制B16F1细胞的黑色素生成，在3%时最大抑制率达到98.2%（ $P<0.01$ ）。0.3%的mH对细胞黑色素含量的抑制作用为54.9%，相当于300 $\mu\text{g/mL}$ 熊果苷的抑制效果（51.3%， $P>0.05$ ）。

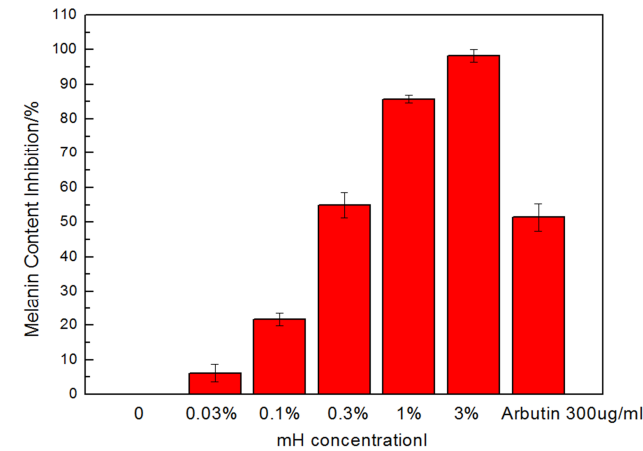


图3 mH对B16F1细胞黑色素含量的影响。

α -MSH是由13个氨基酸构成的多肽类激素，可调节黑素细胞的黑素形成、树突形成、细胞增殖等生理功能，大量研究表明其作用主要为激活酪氨酸酶，并促进酪氨酸酶合成，从而促进黑色素合成，使皮肤及毛发颜色加深[26-29]。

我们首先验证了 α -MSH对黑素细胞的作用。表2数据显示，0.01-10 $\mu\text{g/mL}$ 的 α -MSH可显著增强B16F1细胞的酪氨酸酶活性，提高黑色素含量，0.1 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度可使酪氨酸酶活性检测值从0.36增加至0.45（ $P<0.01$ ），黑色素含量检测值从0.20增加至0.47（ $P<0.01$ ），具有显著的诱导效应。因此，后续实验选择0.1 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度来对细胞进行诱导。

表2 α -MSH在B16F1细胞上的作用。

A	α -MSH浓度 ($\mu\text{g/mL}$)				
	0	0.01	0.1	1	10
酪氨酸酶活性	0.36	0.43	0.45	0.41	0.40
黑色素生成	0.20	0.37	0.47	0.51	0.52

诱导状态下，通过检测B16F1细胞培养基内的黑色素含量发现，与对照组相比，0.1 $\mu\text{g/mL}$ 的 α -MSH可使细胞的黑色素含量检测值从0.18升高至0.53，上升了188%（ $P<0.01$ ），显著诱导黑色素生成（结果未显示）。以 α -MSH为对照组，计算mH的抑制率，结果如图4所示，mH对于 α -MSH诱导的黑色素生成也有显著的抑制作用，随着浓度的升高，抑制率增强，在mH浓度为1.5%时抑制率达到最大，为92.1%（ $P<0.01$ ）。0.4%的mH对诱导状态下的细胞黑色素含量的抑制作用为54.1%，略强于300 $\mu\text{g/mL}$ 的熊果苷对于 α -MSH诱导的黑色素生成的抑制作用（49.3%， $P<0.05$ ）。

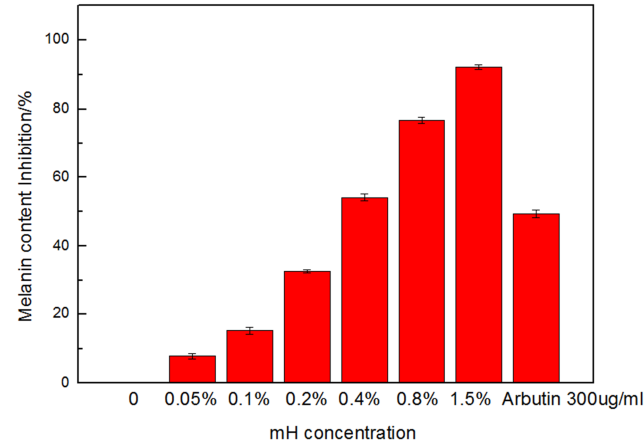


图4 mH对 α -MSH诱导的B16F1细胞黑色素含量的影响。

综上所述显示，0.3%的 mH 在自然状态下对B16F1 细胞的黑色素含量有 54.9%的抑制作用，0.4%的 mH 对 α -MSH 诱导的黑色素含量也有 54.1%的抑制作用，其效果相当于 300 $\mu\text{g/mL}$ 的熊果苷，说明 mH 具有良好的、剂量依赖性的抑制黑色素生成的作用。

2.3.4. mH的人体美白功效评价

采用人体测试综合仪器分析法对mH的美白效果进行验证[25]。皮肤MI值的测试结果（见图5）表明，与基质对照（Blank）相比，在测试7周内，受试者使用含mH及熊果苷的美白霜后，MI值呈现时间依赖性的降低趋势。mH组在使用第5和7周时，MI值与对照组相比有显著差异（ $P<0.05$ ），熊果苷组在使用第7周时MI值出现较为明显的下降，但与对照组相比无显著差异。同时比较第7周时的效果发现，mH组的MI值与对照组相比减少了12.3%（ $P<0.05$ ），而熊果苷仅减少了7.1%（ $P>0.05$ ），说明mH可以降低皮肤中的黑色素含量，且在市售价格相等的情况下，mH的美白效果要优于熊果苷。

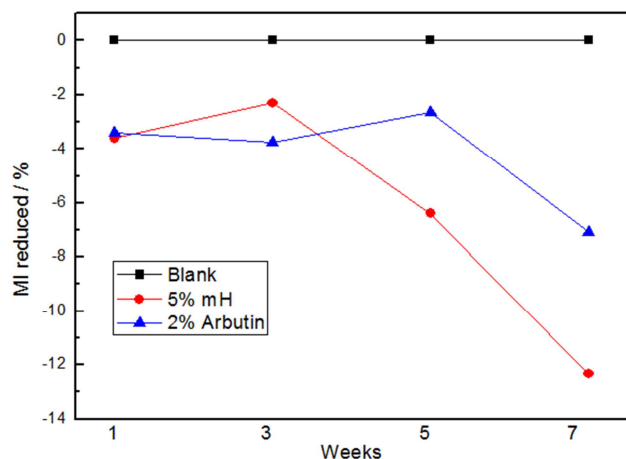


图5 mH和熊果苷对皮肤黑色素的影响。

3. 结论

皮肤的复杂生理特点决定了美白产品的复杂多样性。黑色素合成、黑色素转运、黑色素代谢、黑色素细胞的调控、防晒、抗炎、抗氧化等均可成为美白产品的开发针对点。

我们将具有抑制酪氨酸酶活性、抗氧化、促进皮肤更新等功效的苦参、桂竹叶、火棘果和枸杞的乙醇提取液进行过滤浓缩，纯化后洗脱，复配制备成一种新型的植物复合提取物mH。首先针对黑色素合成过程中的最关键限速酶——酪氨酸酶活性来评价mH的美白效果。研究发现，mH剂量依赖性地抑制蘑菇酪氨酸酶和B16F1细胞内的酪氨酸酶活性，最大抑制率分别达到51.5%和76.2%。再于B16F1细胞对黑色素含量进行检测，结果表明，mH对细胞自然产生的黑色素及 α -MSH诱导产生的黑色素均有显著的抑制作用，0.3%浓度的抑制效果与300 μ g/mL的熊果苷类似，表现出优异的体外美白功效。采用人体试验和仪器测量相结合的方法进行人体美白功效评价，发现使用含5% mH的美白霜5-7周后，受试者受试部位的MI值明显降低，其效果强于同等市售价格下的熊果苷。

综合以上结果，说明mH通过抑制酪氨酸酶活性，从源头减少黑色素的生成，来发挥人体美白的功效。

参考文献

- [1] Costin G E, Hearing V J. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress [J]. The FASEB Journal, 2007, 21(4):976-994.
- [2] Schiaffino M V. Signaling pathways in melanosome biogenesis and pathology [J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2010, 42(7): 1094-1104.
- [3] 孙蓓,李潇,卢永波.影响皮肤色素沉着的美白制剂及其作用机制研究进展[J].中国美容医学杂志2015,24(22):82-85.
- [4] 吴晓慧,周洁,王峥,等.美白祛斑化妆品的功效评价与展望[J].香料香精化妆品,2007,2007(3):33-36.
- [5] 杨亚军,林莉,丁家宜,等.天然活性物美白功效的细胞生物学研究[J].日用化学工业,2002,32(3):19-21.
- [6] 崔文颖,杨高云,李妍.植物精华对皮肤美白作用的研究进展[J].首都医科大学学报,2011,32(4):479-483.
- [7] 邓云云,王笑月,李才广,等.珍珠水解液的美白作用机理研究[J].中国现代中药,2017,19(7):992-994.
- [8] Sonthalia S, Daulatabad D, Sarkar R. Glutathione as a skin whitening agent: facts, myths, evidence and controversies [J]. Indian J Dermatol Venereol Leprol,2016,82 (3): 262-272.
- [9] 李潇,卢永波.化妆品美白功效体外评估策略[J].北京日化,2016(3):34-38.
- [10] Lee CS, Nam G, Bae IH, et al. Whitening efficacy of ginsenoside F1 through inhibition of melanin transfer in co-cultured human melanocytes-keratinocytes and three-dimensional human skin equivalent [J]. Journal of Ginseng Research, 2018.
- [11] Gledhill K, Guo Z, Umegakiarao N, et al. Melanin transfer in human 3D skin equivalents generated exclusively from induced pluripotent stem cells [J]. Plos One, 2015, 10 (8): e0136713.
- [12] 解士海,黄壮峰,杨观招,等.氧化苦参碱对细胞共培养体系中酪氨酸酶及黑色素的影响[J].中国热带医学,2008,8(8):1291-1292.
- [13] 张永兵.竹叶提取物对酪氨酸酶和黑色素瘤细胞的影响[J].中国林业科学研究院,2009.
- [14] 张理平,张海燕,李孝栋,等.28味中药酸性成分提取物影响黑色素合成的实验研究[J].中华中医药杂志,2009 (11):1443-144.
- [15] 翁文江,高雪.火棘果不同极性部位提取物体外抗氧化研究[J].食品工业科技,2015,36(1):77-80.
- [16] Zhang L, Tao G, Chen J, et al. Characterization of a New Flavone and Tyrosinase Inhibition Constituents from the Twigs of Morus alba L [J]. Molecules. 2016, 21(9):1130-1138.
- [17] Freitas M M D, Fontes P R, Souza P M, et al. Extracts of Morus nigra L. Leaves Standardized in Chlorogenic Acid, Rutin and Isoquercitrin: Tyrosinase Inhibition and Cytotoxicity [J]. Plos One. 2016, 11(9): e0163130.
- [18] 闻平,何艳,叶庆林.中性红比色法检测细胞增殖活性[J].江苏大学学报(医学版),2000(1) 161-163.
- [19] Zhang L, Tao G, Chen J, et al. Characterization of a New Flavone and Tyrosinase Inhibition Constituents from the Twigs of Morus alba L [J]. Molecules. 2016, 21(9):1130-1138.
- [20] Freitas M M D, Fontes P R, Souza P M, et al. Extracts of Morus nigra L. Leaves Standardized in Chlorogenic Acid, Rutin and Isoquercitrin: Tyrosinase Inhibition and Cytotoxicity [J]. Plos One. 2016, 11(9): e0163130.
- [21] Campos P M, Horinouchi C D, Prudente A S, et al. Effect of a Garcinia gardneriana (Planchon and Triana) Zappi hydroalcoholic extract on melanogenesis in B16F10 melanoma cells [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2013, 148 (1): 199-204.

- [22] Han S M, Min K J, Hong I P, et al. Whitening Effect of Watersoluble Royal Jelly from South Korea [J]. Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 2015, 35 (5): 707-713.
- [23] 康琰琰,张美英,邢少璟,等.几种天然活性物对黑色素细胞毒性及美白功效的比较[J].日用化学工业,2005,35(6):361-363。
- [24] 王楠,吴金昊,李昂,等.松茸化妆品的美白功效评价[J].日用化学工业,2016,46(5):279-283。
- [25] 万禁禁,刘瑞学,冷群英,等.一种美白霜的研制及其美白功效评价[J].日用化学工业,2017,47(9):512-516。
- [26] 何怡,郑志忠.促黑色素细胞激素对人类黑色素细胞的功能调控[J].国际皮肤性病杂志,2002,28(1):35-37。
- [27] Brzoska T, Luger T A, Maase C, et al. α -Melanocyte-Stimulating Hormone and Related Tripeptides: Biochemistry, Anti-inflammatory and Protective Effects in Vitro and in Vivo, and Future Perspectives [J]. Endocrine Reviews, 2008, 29(5): 581-602.
- [28] Graham A, Wakamatsu K, Hunt G, et al. Agouti protein inhibits the production of eumelanin and pheomelanin in the presence and absence of alpha-melanocyte stimulating hormone [J]. Pigment Cell Res, 1997, 10(5): 298-303.
- [29] Hoon-Seok Y, Chang-Gu H, Nam-Ho L, et al. Comparative Depigmentation Effects of Resveratrol and Its Two Methyl Analogues in α -Melanocyte Stimulating Hormone-Triggered B16/F10 Murine Melanoma Cells [J]. Preventive Nutrition & Food Science, 2016, 21(2): 155-159.