

doi: 10.7541/2018.008

## 灌喂氧化鱼油后黄颡鱼胃肠道黏膜黑色素细胞分化和黑色素合成途径基因的差异表达

叶元土<sup>1</sup> 吴萍<sup>1</sup> 蔡春芳<sup>1</sup> 吴代武<sup>1</sup> 罗琪刚<sup>1</sup> 何杰<sup>1</sup> 高敏敏<sup>1</sup> 周露阳<sup>1</sup>  
王梦影<sup>1</sup> 汪冰<sup>1</sup> 张宝彤<sup>2</sup> 萧培珍<sup>2</sup>

(1. 苏州大学基础医学与生物科学学院, 江苏省水产动物营养重点实验室, 苏州 215123;

2. 北京营养源研究所水产动物系统营养研究开放实验室, 北京 100000)

**摘要:** 以黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)为实验对象, 灌喂氧化鱼油、鱼油7d后, 提取胃肠道黏膜总RNA, 采用RNA-seq测序并做转录组分析, 分析了黑色素生物合成途径关键酶(酪氨酸酶)及其相关蛋白基因、黑素体运动的3个蛋白基因、 $\alpha$ 黑素细胞刺激激素途径和WNT/ $\beta$ -catenin、EDN3和EDNRB、KIT及其配体KITL3个信号通路的主要蛋白基因的差异表达活性。结果显示, 黄颡鱼胃肠道黏膜中存在黑色素细胞分化和发育过程、黑色素合成及其调控途径的代谢网络, 通过绘制代谢网络得到了关键性酶或蛋白质的基因信息。在灌喂氧化鱼油后, 控制黑色素合成途径主要基因的表达活性显著下调, 可能导致黑色素合成量的不足;  $\alpha$ -MSH激素途径主要基因差异表达上调, 具备促进黑色素细胞分化和发育的调控基础; 而调控黑色素细胞分化和发育的3个信号通路主要基因也有差异表达。因此, 黄颡鱼受灌喂氧化鱼油的影响, 黑色素细胞分化和发育过程受到较大影响, 会影响到鱼体成熟的黑色素细胞的数量, 同时, 黑色素的生物合成量不足将导致引起黄颡鱼体色的变化。

**关键词:** 黑色素; 黑素体; 黑色素细胞; 胃肠道黏膜; 黄颡鱼

**中图分类号:** Q344<sup>+</sup>.1      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-3207(2018)01-0057-11

鱼类的色素细胞、色素细胞中的色素是其体色形成的基础。黑色素细胞的增殖不是源于成熟的黑色素细胞有丝分裂, 而是源于神经嵴(Neural crest)细胞的分化和发育, 来源于神经嵴的干细胞需要迁移到皮肤、眼睛、腹膜等位置分化、发育, 经历了神经嵴干细胞、前黑色素细胞、幼小黑色素细胞、成熟黑色素细胞等基本的分化和发育过程<sup>[1, 2]</sup>。鱼类成熟的黑色素细胞主要分布在眼睛、皮肤、鳞片、腹膜等处, 成熟的黑色素细胞显微镜下为树突状结构, 细胞中的黑素体是由黑色素聚集形成的颗粒状结构。鳞片、皮肤黏膜下层中成熟黑色素细胞密度、黑色素细胞中黑素体分布位置等决定了鱼体黑色体色。

养殖鱼类的体色也影响其市场价格, 正常体色也是鱼体生理健康的反映<sup>[1]</sup>。黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)是主要养殖鱼类之一, 其体色容易受到

自身生理状态、疾病、水质条件、饲料质量等的影响, 尤其是饲料油脂氧化产物成为饲料途径影响养殖鱼类体色变化的主要因素<sup>[1]</sup>。由神经嵴细胞分化、发育为成熟的黑色素细胞, 以及黑色素的合成等受到鱼体自身内分泌调节、神经调节和外界环境的控制和影响, 其代谢过程也是受到严格的、系统的基因表达活性所控制和调节<sup>[2]</sup>。研究鱼类色素细胞的分化、发育和色素合成代谢途径的基因表达活性, 既是鱼类基础生物学的需要, 也是养殖鱼类正常体色维护与调控的需要。对部分养殖鱼类色素细胞、黑色素合成过程中主要酶和蛋白质的基因已经有过不同的研究<sup>[3, 4]</sup>, 但尚未有系统化的基因信息、基因差异表达等研究。鱼体胃肠道黏膜是代谢活跃的器官组织, 也是黑色素合成代谢的主要器官组织之一。本文以灌喂氧化鱼油、正常鱼油的黄颡鱼为试验对象, 利用其胃肠道黏膜组织

收稿日期: 2016-09-13; 修订日期: 2017-01-14

作者简介: 叶元土(1964—), 男, 四川广安人; 教授, 硕士生导师; 主要从事水产动物营养与饲料研究。E-mail: yeyt@suda.edu.cn

通信作者: 吴萍, 副教授, 硕士生导师; E-mail: suzhou\_wuping@163.com

为材料, 提取总RNA, 采用RNA-Seq方法得到转录组信息; 以转录组基因信息为基础, 分析了黄颡鱼黑色素生物合成途径、黑色素细胞分化发育、黑色素颗粒运动等代谢过程中的蛋白质、酶的基因信息, 以及灌喂氧化鱼油、正常鱼油后相关基因的差异表达信息, 旨在为同类研究、为黄颡鱼色素细胞、黑色素代谢的研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验鱼

黄颡鱼来自于浙江一星集团海盐试验基地, 平均体重( $78\pm1.3$ ) g/尾, 共42尾, 其中, 雌性、雄性个体各50%。试验鱼分别饲养于单体容积 $0.3\text{ m}^3$ 的6个室内循环水养殖桶中, 每个养殖桶饲养7尾(雌雄混养)。分别设置鱼油组、氧化鱼油组, 每组各3个平行、共6个养殖桶。用常规饲料养殖15d后开始灌喂氧化鱼油、正常鱼油。灌喂期间的水温( $24\pm1.0$ )℃、溶解氧7.3 mg/L、pH 7.8。

### 1.2 氧化鱼油

鱼油为“高美牌”精炼鱼油, 氧化鱼油按照实验室建立的方法制备, 鱼油、氧化鱼油于-20℃保存备用。鱼油、氧化鱼油和鱼浆的氧化程度评价指标见表1。

由表1可知, 鱼油经过氧化后, 过氧化值增加了21.40倍、酸价增加了3.73倍、丙二醛增加了13.85倍。采用气相色谱仪, 按照归一法测定、计算得到鱼油、氧化鱼油的EPA+DHA含量分别为25.35%和7.62%, 经氧化后, EPA+DHA含量下降了70%。

鱼浆按照吴代武等<sup>[5]</sup>方法制备, 鱼浆含水分76.08%、蛋白质17.71%、脂肪3.31%、灰分2.86%。采用液相色谱仪测定鱼浆含生物胺含量, 结果为组氨44.6 mg/100 g、尸胺230.3 mg/100 g、腐胺71.3 mg/100 g、精胺60.0 mg/100 g和亚精胺110.8 mg/100 g。

### 1.3 鱼油、氧化鱼油的灌喂方法

在预试验中, 将鱼油、氧化鱼油与大豆磷脂(食用级)分别按照将1:1比例混合、乳化后灌喂, 发

表1 鱼油、氧化鱼油和鱼浆的氧化程度评价指标

Tab. 1 Oxidative indexes of fish oil, oxidative fish oil and dissolved fish pulp

原料 Raw material	过氧化值POV (meq/kg)	酸价AV (g/kg)	丙二醛MDA (mg/kg)
鱼油 Fish oil	3.33	0.56	3.64
氧化鱼油 Oxidized fish oil	74.59	2.65	54.04
鱼浆 dissolved pulp	4.14	3.46	15.83

现黄颡鱼出现呕吐(吐料)情况, 而用实验室制备的鱼浆灌喂则未出现呕吐(吐料), 经过预试验按照下述方法制备灌喂用的氧化鱼油、鱼油。

鱼油、氧化鱼油分别与大豆磷脂(食品级)以质量比1:1比例混合, 搅拌混匀、乳化, 再将经乳化后的油脂与鱼浆按照1:4的质量比例混合作为灌喂用的灌喂鱼油、灌喂氧化鱼油(分别含鱼油、氧化鱼油20%), 于4℃冰箱中保存。每次按照3d的用量进行制备, 以保证灌喂用油脂的新鲜度。

按照实验室建立的方法<sup>[6, 7]</sup>, 于每天上午9:00对试验鱼定量灌喂, 连续灌喂7d。灌喂期间投喂黄颡鱼商品饲料。

### 1.4 RNA样本采集及总RNA提取

按照叶元土等<sup>[6, 7]</sup>方法, 连续灌喂7d、最后一次灌喂后24h, 每个养殖桶随机各取3尾、每组共9尾(4尾雌性、5尾雄性个体)用于总RNA提取。

鱼体表经75%酒精消毒, 常规解剖, 快速用解剖刀刮取胃和肠道黏膜, 将每尾鱼的胃和肠道黏膜混合后, 液氮速冻, 于-80℃保存备用。采样所用解剖工具均经灭酶、灭菌处理。

鱼油、氧化鱼油组胃肠道黏膜各9个样本, 分别用试剂盒(EASYspin Plus)独立用于提取总RNA, 电泳检测RNA质量。鱼油组、氧化鱼油组分别选取电泳条带亮度高、清晰、无拖尾的高质量RNA进行等量混合为鱼油组、氧化鱼油组各1个样本(每个样本至少有5尾试验鱼的总RNA样本组成), RNA质量约4 μg。同样方法再混合一个RNA样本, 其余的RNA舍弃。鱼油组、氧化鱼油组分别得到2个平行样本用于RNA-seq。

### 1.5 转录组分析方法

**RNA-Seq** 样品总RNA用DNase I消化DNA后, 用Oligo d (T)磁珠纯化总RNA中的mRNA, 向得到的mRNA中加入适量打断试剂, 在高温条件下使其片断化, 再以片断后的RNA为模板, 合成cDNA, 经过磁珠纯化、末端修复、3'末端加碱基A、加测序接头后, 进行PCR扩增, 构建文库。构建好的文库用Agilent 2100 Bioanalyzer和ABI StepOnePlus-Real-Time PCR System质检和测序, 滤除含N比例大于10%、低质量(质量值中位数Q≤25的碱基位点)读段, 得到过滤后的读段(clean reads)。读段长度125 bp。

**无参转录组的转录本拼接** 经过质控(QC)、过滤后得到的读段(Clean reads), 用Trinity (版本:v2012-10-05, min\_kmer\_cov为2)软件进行无参考基因组的转录本拼接<sup>[11]</sup>。拼接得到266011个转录本。

## 基因功能注释与分类 对拼接好的转录本

利用不同的数据库进行unigene基因注释。各数据库及功能注释所用到的软件及方法：①与Swiss-Prot、KOG、KEGG GENES序列数据库的比对采用NCBI blast 2.2.27+。②PFAM蛋白结构域预测采用HMMER 3.0 package, hmmscan。③GO功能注释为基于Swissprot和Pfam两部分的蛋白注释结果，软件为Blast2GO v2.5。④KEGG相关注释为KO-BAS。经过Swiss-Prot、KO、GO、KOG、PFAM数据库进行基因功能注释，得到190231个注释功能的基因。将注释得到的单一基因序列，利用NCBI/Blast进行相对于不同物种相同基因的同源性分析。

## 1.6 基因差异表达分析

以Trinity拼接得到的转录组作为参考序列, 采用RSEM软件(Mismatch 2), 将每个样品的clean reads对参考序列做比对, 进行基因表达定量。将灌喂氧化鱼油的黄颡鱼胃肠道黏膜转录本表达量与灌喂鱼油得到的对应基因表达量对比, 进行差异表达分析。差异表达分析用edgeR软件包进行分析。对于所有基因, 当其表达量在2个不同样品间具有差异且统计分析中调整P值(假阳性率) $<0.05$ 时, 认为其在2个不同样品中具有显著差异表达。

$\log_2(\text{OFH/FH})$  为灌喂氧化鱼油的黄颡鱼胃肠道黏膜某一个基因表达量与灌喂正常鱼油胃肠道黏膜相同基因表达量比值以 2 为底的对数值，数值为正值表达差异表达上调、负值则为差异表达下调，数值绝对值越大表示差异越大，当  $\geq 2$  或  $\leq -2$  时，视为差异表达显著。

2 结果

## 2.1 黑色素生物合成途径和黑素体运动蛋白基因的差异表达

黑色素是在黑色素细胞内以酪氨酸为底物, 经历了L-多巴、多巴醌、多巴素等中间产物, 最后合成黑色素、真黑色素、退黑色素(图1)。黑色素在黑色素细胞内聚集, 形成黑素体, 黑素体是黑色素在黑色素细胞内的存在形式。将转录组中涉及黑色素合成途径和黑素体运动的酶、蛋白的基因信息统计在表2中。

在表2中,涉及黑色素合成有4个基因,涉及黑色素体运动的有3个基因。黑色素合成的酪氨酸酶基因与华支睾吸虫(*Clonorchis sinensis*)酪氨酸酶基因的同源性为49%,而其他基因与鲑、鲤、斑马鱼、斑点叉尾鮰种类的相同基因的同源性为74%—97%,具有较高的同源性。

在本试验的转录组结果中, 经过单一基因注释和灌喂氧化鱼油、正常鱼油基因表达差异分析, 涉及黑色素生物合成的酶注释得到了酪氨酸酶(TYR)、酪氨酸酶相关蛋白1(TRP-1)、酪氨酸酶相关蛋白2(TRP-2)、D-多巴色素互变酶-A (DDT- $\alpha$ )共4个酶蛋白的基因, 且经过基因表达差异分析, 这4个酶蛋白的 $\log_2(\text{OFH}/\text{FH})$ 值分别为-6.00、-5.70、8.46和-2.00, 均达到差异表达显著性水平, 显示灌喂氧化鱼油后, 导致黑色素细胞内黑色素合成受到显著性的影响。

涉及黑素体运动的有3个主要蛋白质基因被注

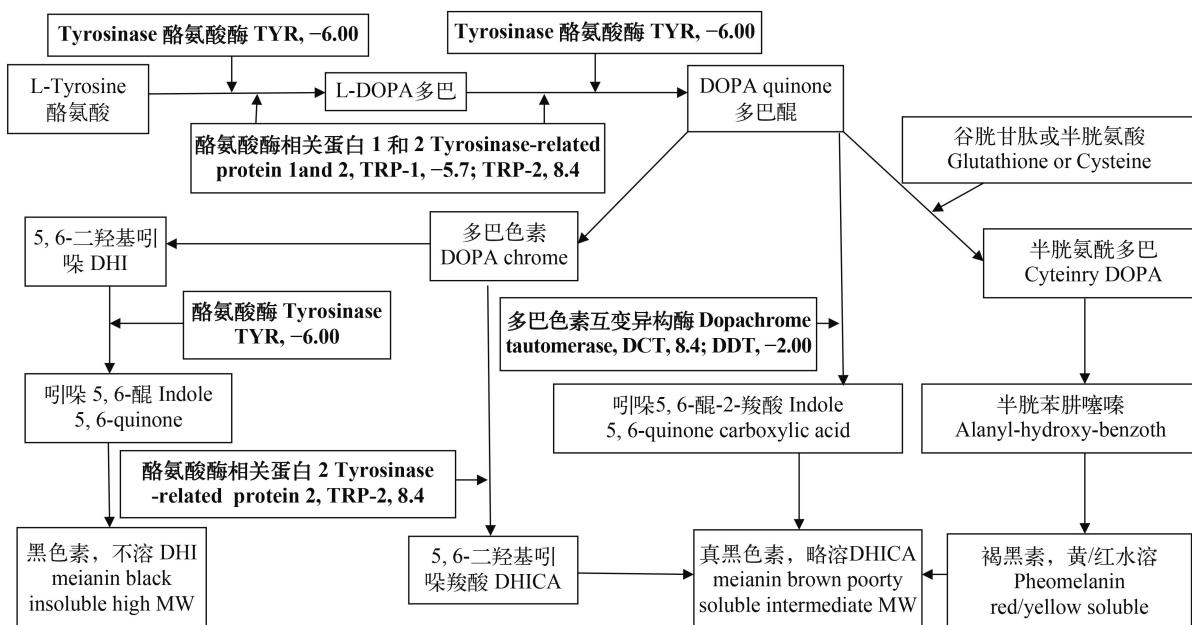


图 1 黑色素合成途径及其催化的酶、蛋白定位框架图

Fig. 1 Melanin synthesis pathway, its enzyme and protein in localization framework map

释, 分别是Ras相关蛋白Rab的27A (Rab27a)、非常规肌球蛋白-Va (Myosin-Va)、肌球蛋白VIIa-和RAB-相互作用蛋白(MYRIP),  $\log_2(\text{OFH/FH})$ 值均未达到差异表达显著性水平, 显示灌喂氧化鱼油对黑色素细胞内的黑素体运动的蛋白基因表达没有显著性的影响。

## 2.2 $\alpha$ -MSH促进黑色素合成、黑色素细胞发育途径基因

$\alpha$ -黑素细胞刺激素(Melanocyte-stimulating hormone- $\alpha$ ,  $\alpha$ -MSH)是一种神经内分泌激素, 通过其受体MC-R等参与对黑色素合成途径、黑色素细胞的发育和黑色素细胞的迁移等生理代谢的调控作用。总结涉及 $\alpha$ -MSH对黑色素细胞发育、黑色素合成的蛋白基因信息见表3, 共10个基因。经过基因的同源性分析, 这些基因与斑点叉尾鮰、鲤、鲫鱼、斑马鱼物种相同基因的同源性为68%—100%, 具有较高的同源性。在表3中, 得到阿黑皮素原(POMC)和阿黑皮素原-2(POMC-2)蛋白基因, 其 $\log_2(\text{OFH/FH})$ 值分别为2.40、-5.58, 差异表达显著。得到黑色素浓缩激素受体1、2、3(MCH-R1、MCH-R2、MC-R3)三种受体, 以及MCH-R1相互作用的锌指蛋白(MCH-R1-i), 它们的 $\log_2(\text{OFH/FH})$ 值

分别为0.00、3.04、5.80和-0.50, 显示只有MCH-R2、MC-R3达到差异表达显著性水平。

在黑色素合成和黑色素细胞分化和发育中, 具有关键性调控作用的小眼相关转录因子(MITF)的 $\log_2(\text{OFH/FH})$ 值为-0.30, 显示灌喂氧化鱼油后MITF基因表达有下调的趋势, 但未达到显著性水平。

在不同的调控控制途径和信号途径中, 配对盒蛋白PAX-3 (PAX3)与配对域转录因子PAX3-A (PAX3-a)、转录因子SOX-10(SOX10)得到注释, 它们的 $\log_2(\text{OFH/FH})$ 值分别为-1.40、5.00和-7.14, 显示灌喂氧化鱼油后, PAX3-a差异表达显著性上调, 而SOX10则差异表达显著性下调, PAX3有下调的趋势, 但未达到显著性水平。

上述结果表明, 黄颡鱼胃肠道黏膜中存在 $\alpha$ -MSH及其受体MCH-R1、MCH-R2、MC-R3基因的表达, 其中, MCH-R2、MC-R3差异表达显著性上调, 而MCH-R1未显示差异表达。在黑色素合成、黑色素细胞分化、发育中具有关键性作用的MITF基因有差异表达下调的趋势。对MITF转录其调控的SOX10、PAX3、PAX3-a的表达也受到影响, 显示差异表达。

表2 黄颡鱼黑色素合成与黑素体在细胞内运动蛋白质的基因信息  
Tab. 2 Genes associated with melanin synthesis and cellular melanosome movement

蛋白Protein	转录本ID GeneID	转录本长度Length (bp)	$\log_2(\text{OFH/FH})$	P-value	Cross-reference (KO/eggNOG)	Blast P_value	Gene homology * (%)
酪氨酸酶Tyrosinase, TYR	TRINITY_DN255_c0_g2	605	-6.00	0.06	K00505/ENOG410IEZU; ENOG410Y42I	5.0E-20	①49
酪氨酸酶相关蛋白1 Tyrosinase-related protein 1, TRP-1	TRINITY_DN179139_c0_g1	320	-5.70	1.00	NA/NA	1.0E-60	②92
L-多巴色素互变异构酶 L-dopachrome tautomerase	TRINITY_DN137449_c2_g1	2107	8.46	4.1E-26	NA/K01827	0.0E+00	③95
DCT; 酪氨酸酶相关蛋白2 Tyrosinase-related protein2, TRP-2	TRINITY_DN141872_c2_g2	1824	-2.00	1.1E-11	K10028/NA	3.0E-44	③97
D-多巴色素互变酶-A D-dopachrome tautomerase-A, DDT-A	TRINITY_DN158127_c2_g1	2164	0.89	9.8E-05	K07885/KOG0081; ENOG410XQ3T	6.0E-142	④94
Ras相关蛋白Rab的-27A Ras-related protein Rab-27A, Rab27a	TRINITY_DN99488_c0_g2	4600	-0.80	0.50	K10357/KOG0160; KOG0161; COG5022	0	⑤88
非常规肌球蛋白-Va Unconventional myosin-Va, MYO5A或Myosin-Va	TRINITY_DN12795_c0_g1	1205	0.10	0.88	NA/ENOG410IHBX; ENOG41126RD	1.0E-36	⑤74
肌球蛋白VIIa-和 RAB-相互作用蛋白 Myosin-VIIa and Rab-interacting protein, Melanophilin, MYRIP							

注: \*进行同源性比对的物种: ①华支睾吸虫; ②鲑; ③鲤; ④斑马鱼; ⑤斑点叉尾鮰

Note: \* For homology comparison of species: ①Clonorchis sinensis; ②Salmon; ③Cyprinus carpio; ④Danio rerio; ⑤Ictalurus punctatus

### 2.3 调控神经嵴细胞分化为黑色素细胞的三个信号途径基因

调控神经嵴干细胞分化为前黑色素细胞、黑色素细胞发育的信号途径主要有KIT及其配体KITL信号通路、WNT/ $\beta$ -catenin信号通路、EDN3和EDNRB信号通路, 依据转录组单一基因注释、KEGG通路注释、GO功能注释等结果, 总结涉及上述3个信号通路的相关蛋白基因信息见表4, 共有15个基因。经过基因的同源性分析, 这15个基因与鲤、斑点叉尾鮰、金线鲃、鲫等物质相同基因的同源性为91%—100%, 具有很高的基因同源性。

由表4可知, 在KIT及其配体KITL信号通路中, 注释得到原癌基因Kit配体(KITL)、肥大/干细胞生长因子受体(KITA或SCFR), 其 $\log_2(\text{OFH/FH})$ 值分别为-0.35、0.21, 有差异表达, 但均不显著。对于WNT/ $\beta$ -catenin信号通路, 注释得到 $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -

Catenin)、淋巴增强结合因子1/T细胞特异性转录因子1- $\alpha$ (LEF-1/TCF1- $\alpha$ )、环AMP应答元件结合蛋白1(CREB-1)基因, 它们的 $\log_2(\text{OFH/FH})$ 值分别为-0.10、-0.99和0.10, 有差异表达但未达到显著性水平。关于EDN3和EDNRB信号通路, 注释得到内皮素-1(ET-1)、内皮素-2(ET-2)、内皮素-1受体(ED-NRA)、内皮素B受体(EDNRB)基因, 它们的 $\log_2(\text{OFH/FH})$ 值分别为2.71、4.37、0.83和-0.20, 其中, ET-1和ET-2基因差异表达达到显著性水平。

在涉及的3个信号通路中, 细胞内信号传递的主要蛋白基因注释结果见表4。主要有Rho相关GTP结合蛋白的Rho(RHOU)、RHO GTP酶激活蛋白32 Rho(ARHGAP32)、钙调蛋白激酶II的 $\alpha$ 链(CaMK II)、cAMP依赖性蛋白激酶催化亚单位 $\alpha$ (PRKACA)、cAMP依赖性蛋白激酶催化亚单位 $\beta$ (PRKACB)、cAMP依赖性蛋白激酶II型- $\alpha$ 调节亚

表3  $\alpha$ -MSH对黑色素细胞发育、黑色素合成的蛋白基因

Tab. 3 Effects of  $\alpha$ -MSH pathway genes on the development of the melanocyte and melanin synthesis

蛋白Protein	转录本ID GeneID	转录本长度Length (bp)	$\log_2$ (OFH/FH)	P-value	Cross-reference (KO/eggNOG)	Blast P_value	基因同源性 Gene homology * (%)
阿黑皮素原 Pro-opiomelanocortin, POMC	TRINITY_DN150490_c0_g1	569	2.40	0.28	NA/NA	2.00E-32	①68
阿黑皮素原-2 Pro-opiomelanocortin-2, POMC-2	TRINITY_DN152044_c5_g1	333	-5.58	1.00	NA/NA	3.00E-66	②92
黑色素浓缩激素受体1 Melanin-concentrating hormone receptor1, MCH-R1	TRINITY_DN4519_c0_g1	425	0.00	1.00	K04320/KOG3656; ENOG410XRW9	9.00E-59	③100
MCH-R1相互作用的锌指 蛋白MCH-R1-interacting zinc finger protein, MCH-R1-i	TRINITY_DN78371_c0_g1	2275	-0.50	0.63	NA/ENOG410IF0H; ENOG410YJQA	2.00E-139	①100
黑色素浓缩激素受体2 Melanin-concentrating hormone receptor2, MCH-R2	TRINITY_DN24222_c0_g1	1481	3.04	2.6E-08	NA/NA	1.00E-110	④98
黑皮素受体3 Melanocortin receptor3, MC-R3	TRINITY_DN213433_c0_g1	452	5.80	0.28	K04201/KOG3656; ENOG410XRW9	1.00E-76	①95
小眼相关转录因子 Microphthalmia-associated transcription factor, MITF	TRINITY_DN99498_c2_g4	2565	-0.30	0.877	NA/KOG1318; ENOG4110SME	6.00E-71	①73
配对域转录因子PAX3-A Paired-domain transcription factor Pax3-A, PAX3-a	TRINITY_DN67185_c0_g1	753	5.00	0.25	K09381/NA	4.00E-78	④77
配对盒蛋白PAX-3 Paired box protein Pax-3, PAX3	TRINITY_DN67185_c0_g2	758	-1.40	0.36	K09381/KOG0849; ENOG410XS01	2.00E-74	④75
转录因子SOX-10 Transcription factor Sox-10, SOX10	TRINITY_DN205352_c0_g1	333	-7.14	0.25	K09270/KOG0527; ENOG410XT0K	7.00E-27	②96

注: \*进行同源性比对的物种: ①斑点叉尾鮰; ②鲤; ③鲫; ④斑马鱼

Note: \* For homology comparison of species: ①*Ictalurus punctatus*; ②*Cyprinus carpio*; ③*Carassius auratus*; ④*Danio rerio*

表4 调控黑色素细胞分化和发育的3个信号通路的基因

Tab. 4 Genes in three signaling pathways modulate melanocyte differentiation and development

蛋白Protein	转录本ID GeneID	转录本长度Length (bp)	$\log_2$ (OFH/FH)	P-value	Cross-reference (KO/eggNOG)	Blast P-value	基因同源性Gene homology * (%)
Kit配体Kit ligand (or Mast cell growth factor, KITL (or MGF))	TRINITY_DN161739_c1_g2	3746	-0.35	0.45	K05461/ENOG410IF3Y; ENOG410XYQR	4.0E-17	①91
肥大/干细胞生长因子受体Mast/stem cell growth factor receptor kita, KITA (SCFR)	TRINITY_DN164287_c0_g2	3435	0.21	0.12	K05091/KOG0200; COG0515	3.0E-130	①97
$\beta$ -连环蛋白Catenin beta, $\beta$ -Catenin	TRINITY_DN147360_c0_g1	868	-0.10	0.96	NA/NA	3.0E-147	②100
淋巴增强结合因子1/T 细胞特异性转录因子 1- $\alpha$ Lymphoid enhancer-binding factor 1 (T cell-specific transcription factor 1-alpha), LEF-1/TCF1- $\alpha$	TRINITY_DN152754_c3_g1	2833	-0.99	0.01	K04492/KOG3248; ENOG41109RU	7.0E-117	③93
环AMP应答元件结合蛋白1 Cyclic AMP-responsive element-binding protein1, CREB-1	TRINITY_DN86813_c0_g1	1206	0.10	0.98	K05870/KOG3584; ENOG410ZZJZ	3.0E-105	②97
内皮素-1受体Endothelin-1 receptor, EDNRA	TRINITY_DN165834_c0_g2	3807	0.83	0.00	K04197/KOG3656; ENOG410XRW9	0	④93
内皮素B受体Endothelin B receptor, EDNRB	TRINITY_DN110003_c0_g1	495	-0.20	1.00	K04198/KOG3656; ENOG410XRW9	2.0E-77	②94
内皮素-2 Endothelin-2 (ET-2)	TRINITY_DN131629_c1_g1	1415	4.37	6.58E-18	K16367/ENOG410J1XQ; ENOG410YUMW	2.0E-27	①92
内皮素-1 Endothelin-1, ET-1	TRINITY_DN136854_c0_g1	1588	2.71	3.91E-11	K16366/ENOG410IWVG; ENOG4111WED	9.0E-29	③93
Rho相关GTP结合蛋白的 Rho Rho-related GTP-binding protein RhoU, RHOU	TRINITY_DN156791_c2_g1	422	4.64	1.00	K07865/KOG0393; COG1100	7.0E-36	①95
RHOGTP酶激活蛋白32 Rho GTPase-activating protein 32, ARHGAP32	TRINITY_DN164721_c0_g1	319	-0.80	1.00	NA/KOG1449; ENOG410Y1FN	5.0E-54	②100
钙调蛋白激酶II的 $\alpha$ 链 CaM-kinase II alpha chain, CaMK II	TRINITY_DN68937_c1_g1	1005	-6.50	0.01	K04515/KOG0033; ENOG410XNRX	1.0E-176	⑤95
cAMP依赖性蛋白激酶 催化亚单位 $\alpha$ cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha, PRKACA	TRINITY_DN160609_c1_g1	594	0.58	0.07	K04345/KOG0616; ENOG410XPQQ	8.0E-135	⑥100
cAMP依赖性蛋白激酶 催化亚单位 $\beta$ cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit beta, PRKACB	TRINITY_DN134056_c3_g1	1315	0.39	0.23	K04345/KOG0616; ENOG410XPQQ	8.00E-63	③97
cAMP依赖性蛋白激酶 II型- $\alpha$ 调节亚基cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit, PRKAR2A	TRINITY_DN157710_c0_g1	2709	-0.69	0.02	K04739/KOG1113; COG0664	0.0E+00	①98

注: \*进行同源性比对的物种: ①鲤; ②斑点叉尾鮰; ③金线鲃; ④鲫; ⑤细粒棘球绦虫; ⑥斑马鱼

Note: \* For homology comparison of species: ① *Cyprinus carpio*; ② *Ictalurus punctatus*; ③ *Sinocyclocheilus anshuiensis*; ④ *Carassius auratus*; ⑤ *Echinococcus granulosus*; ⑥ *Danio rerio*

基(PRKAR2A)得到注释, 它们的 $\log_2$ (OFH/FH)值分别为4.64、-0.80、-6.50、0.58、0.39和-0.69, 其中,

*RHOU*、*CaMK II*差异表达显著, 其余的有差异表达但不显著。

### 3 讨论

鱼类体色的形成与体色变化受到体内因素和环境因素的多重影响,本文主要反映了灌胃氧化鱼油后,涉及黄颡鱼胃肠道黏膜中黑色素细胞分化和发育、黑色素生物合成、黑素体在黑色素细胞内的运动的有关酶和蛋白质的基因的差异表达信息。成熟的黑色素细胞数量和密度、黑色素细胞中黑色素的数量、黑色素细胞中黑素体的运动与分布状态等是鱼体黑色体色的形成、黑色体色变化的生物学基础,而这些生理过程是在严格的生理环境、基因表达调控等作用下进行的<sup>[1,2]</sup>。

#### 3.1 黑色素的生物合成途径

黑色素是在黑色素细胞内,以酪氨酸为原料,在系列酶和蛋白质作用下、经过系列反应过程而合成。总结黑色素合成途径、并将控制代谢反应的酶和蛋白定位于合成途径之中,涉及代谢反应的酶或蛋白质,及其 $\log_2(\text{OFH/FH})$ 值用斜体、加粗标示(图1)。

黑色素细胞内黑色素合成代谢反应链的关键酶是酪氨酸酶(Tyrosinase, TYR),控制了反应链的代谢速度,是限速酶。由图1可知,酪氨酸酶主要参与2个反应过程:催化L-酪氨酸羟基化转变为L-多巴、氧化L-多巴形成多巴醌,多巴醌经一系列反应后形成黑色素;在5,6-二羟基吲哚转化为吲哚5,6-醌(Indole5,6-quinone)的过程中,也是受到酪氨酸酶的催化作用。酪氨酸酶的催化作用还需要2个重要蛋白的参与,即酪氨酸酶相关蛋白1和2(TRP-1、TRP-2),酪氨酸酶相关蛋白2又称为L-多巴色素互变异构酶(L-dopachrome tautomerase, DCT),在多巴醌(DOPA quinone)转化为吲哚5,6-醌-2-羧酸(Indole 5,6-quinone carboxylic acid)、多巴色素(DOPA chrome)转化为5,6-二羟基吲哚羧酸(DHICA)的反应中发挥作用,同时该步反应还有D-多巴色素互变酶-A (D-dopachrome tautomerase-A, DDT-A)的参与。在本试验中,在黄颡鱼胃肠道黏膜转录组中,注释得到了上述酶和蛋白质的基因信息;差异表达分析结果显示,灌喂氧化鱼油后,酪氨酸酶(TYR)、酪氨酸酶相关蛋白1(TRP1)的 $\log_2(\text{OFH/FH})$ 值分别为-6.00、-5.70,均是差异表达显著下调;而酪氨酸酶相关蛋白2(TRP2)的 $\log_2(\text{OFH/FH})$ 值为8.40,则是差异表达显著上调,由于TRP2同时还具有L-多巴色素互变异构酶的作用,因此,在灌喂氧化鱼油后,黄颡鱼胃肠道黏膜黑色素细胞中黑色素的生物合成代谢受到显著性的影响,酪氨酸酶、酪氨酸酶相关蛋白1的基因表达是显著下调的。在多巴色素互

变构型变化调节反应中,L-多巴色素互变异构酶蛋白基因表达是显著上调、而D-多巴色素互变酶-A蛋白基因差异表达是显著下调。

包括黄颡鱼在内的淡水鱼类,酪氨酸酶在皮肤、鳞片、血清中均有分布,且酪氨酸酶活力大小与鱼体体表黑色颜色的深浅直接成正相关关系、在不同部位酪氨酸酶活力大小与鱼体黑色素合成部位有关<sup>[1,8]</sup>。从图1的代谢途径以及相关酶蛋白在代谢链中的定位结果看,可以发现:在灌喂氧化鱼油急性损伤后,黄颡鱼胃肠道黑色素细胞合成黑色素的代谢限速反应阶段是代谢下调的,而由L-多巴醌、多巴色素异构化为真黑色素的反应过程则是上调的、D-多巴醌异构化为真黑色素的反应过程则是上调的[ $\log_2(\text{OFH/FH})$ 值为8.40]。结果表明,在灌喂氧化鱼油的条件下,黄颡鱼胃肠道黏膜中黑色素生物合成代谢关键酶基因差异表达显著下调、黑色素的合成可能受到显著性的抑制作用。同时,即使在黑色素合成反应受到下调影响的情况下,还是可以将L-多巴醌、多巴色素更多地异构化为真黑色素,而D-多巴醌异构化为真黑色素的反应是下调[ $\log_2(\text{OFH/FH})$ 值为-2.00]。这或许也是一种生理适应性反应。

#### 3.2 黑素体运动有关的蛋白基因差异表达

黑色素细胞是一类树突状的细胞,细胞有很多的树突状枝突,黑色素合成后形成黑素体。当黑素体在黑色素细胞中央部分集中、枝突中缺少黑素体时,鱼体的体色变浅;当黑素体从细胞中央运输到枝突中在枝突中的分布密度增大时,鱼体的体色加深、为深黑色体色<sup>[1,2]</sup>。

黑素体在黑色素细胞内的运输主要是沿着微管且以微管形成或解体作为动力。有两类微管蛋白:驱动蛋白(Kinesin)和细胞质动力蛋白(Cyto-plasmic-dynein)参与黑素体的运输。有资料表明<sup>[2,9]</sup>,黑素体依赖Rab27a (Ras相关蛋白Rab-27)、非常规肌球蛋白-VA (Myosin-Va)、肌球蛋白VIIa-和RAB-相互作用蛋白(Melanophilin)结合于微管蛋白上、并依赖驱动蛋白和动力蛋白的活动实现黑素体在黑色素细胞内的运动,且这种运动是双向的:由细胞核周围向树突状分枝运输、由树突状分枝向细胞核周围运输。Rab27a是一种组织特异性蛋白,活性形式GTP-Rab27a连接到黑素小体膜上,通过与Myosin-Va相互作用将黑素体连接到肌球蛋白-Va上。因此,Rab27a、Myosin-Va、Melanophilin是黑素体与微管结合并在微管上运输的关键性蛋白。在灌喂氧化鱼油后,它们的 $\log_2(\text{OFH/FH})$ 值分别为0.89、-0.80和0.10三种蛋白基因有差异表

达,但不显著,表明在灌喂氧化鱼油造成急性损伤后,虽然黄颡鱼黑色素细胞内黑色素的生物合成有显著性的变化,但细胞内黑素体运动相关蛋白表达活性没有显著性的变化。

### 3.3 $\alpha$ -MSH和3个细胞信号通路对黑色素细胞分化、发育的调控作用

黑色素细胞数量的增加不是细胞有丝分裂增殖,而是由神经嵴细胞分化发育而来<sup>[2, 3]</sup>。神经嵴是脊椎动物胚胎早期发育过程中出现的暂时性结构,神经嵴干细胞就是由神经板边缘区域的细胞发育来的。由神经嵴细胞分化为黑色素细胞,大致经历了神经嵴细胞、成黑色素细胞和黑色素细胞3个阶段,在黑色素细胞分化、发育过程中,同时进行着黑色素的合成、黑素体的运动。

神经嵴细胞具有多向分化的潜能性和迁移性,是一类具有多种分化潜能的干细胞,从神经嵴细胞发育为成熟的黑色素细胞是其分化潜能之一。由神经嵴细胞分化发育为黑色素细胞要经历复杂的细胞迁移、细胞分化、细胞定向增殖和发育等过程,其发育过程是受到细胞外部环境和严格的基因表达编排共同发挥作用、且相互影响的复杂结果,同样也受到基因网络调控,这个过程中的信号通路主要包括:黑色素合成激素 $\alpha$ -MSH的调控和3个细胞信号通路WNT/ $\beta$ -catenin信号通路、EDN3和EDNRB信号通路、KIT及其配体KITL信号通路<sup>[2, 10, 11]</sup>。

$\alpha$ 黑素细胞刺激激素( $\alpha$ -Melanocyte stimulating hormone,  $\alpha$ -MSH)是4种黑素细胞刺激素(Melanocyte-stimulating hormone, MSH)的一种,属于神经内分泌激素,含有13个氨基酸残基,其前体为阿黑皮素原(Pro-opiomelanocortin, POMC)。POMC可在脑垂体、下丘脑及神经系统其他部位、胃肠道和皮肤中产生<sup>[13]</sup>。POMC水解成ACTH(促肾上腺皮质激素adreno-cortico-tropic-hormone)、 $\beta$ -促脂解素、 $\beta$ -内啡肽和 $\gamma$ -MSH, ACTH在酶的作用下可继续降解为 $\alpha$ -MSH,  $\alpha$ -MSH就是ACTH分子的1—13氨基酸组成。 $\alpha$ -MSH的生理作用是直接激活其受体MC-1R,使黑素细胞内酪氨酸酶的表达增加、活性增强,从而使黑素合成量增加; $\alpha$ -MSH还通过影响黑素细胞的增生、树突形成、对黑素细胞的免疫保护作用等。在本试验中,注释得到阿黑皮素原(Pro-opiomelanocortin, POMC)和阿黑皮素原-2(Pro-opiomelanocortin-2, POMC-2)2种 $\alpha$ -MSH前体,它们的 $\log_2(\text{OFH/FH})$ 值分别为2.40、-5.58,前者差异表达显著上调,而后者差异表达显著下调。 $\alpha$ -MSH的3种受体MCH-R1、MCH-R2、MC-R3得到成功的注释,它们的 $\log_2(\text{OFH/FH})$ 值分别0.00、3.04和

5.80,显示MCH-R2、MC-R3差异表达显著上调。这个结果显示,在黄颡鱼胃肠道黏膜中也存在 $\alpha$ -MSH调控途径,其主要基因的差异表达受到灌喂氧化鱼油的显著影响,体现在 $\alpha$ -MSH前体POMC、POMC-2的表达活性显著性变化, $\alpha$ -MSH的受体MCH-R2、MC-R3差异表达显著上调。

KIT及其配体KITL信号通路。原癌基因KIT是编码肥大/干细胞生长因子的受体。KITL是KIT的配体,KITL被称为肥大细胞生长因子(MGF)或干细胞生长因子(SCF)。KITL与KIT相结合激活了KIT信号通路,从而导致KIT二聚体的形成和特定酪氨酸残基在激酶区域的自磷酸化,并由此活化下游的信号转导分子MAPK、PDK、JAK/STAT和Src家族成员,最后引发细胞内的复杂生理应答。KIT信号通路与MITF的相互关系是①MITF能促进KIT的转录,从而上调KIT的表达。②KIT信号通路能活化MITF的转录。在本试验中,原癌基因Kit配体KITL、肥大/干细胞生长因子受体KITA或SCFR在胃肠道黏膜转录组中得到注释,它们的 $\log_2(\text{OFH/FH})$ 值分别为-0.35、0.21,显示有差异表达,但均不显著。

WNT信号通路在神经嵴干细胞发育的各个阶段都能发挥作用,也包括神经嵴肝细胞分化为黑色素细胞的分化和发育过程。作用途径首先是通过活化其受体Frizzled,随后激活下游的信号转导分子,如 $\beta$ -catenin、PKC、CAMKII、PKA和Rho GTPase等,然后启动细胞内的复杂反应。在本试验中, $\beta$ -Catenin、LEF-1/TCF1- $\alpha$ 、CREB-1在黄颡鱼胃肠道黏膜中被注释,它们的 $\log_2(\text{OFH/FH})$ 值分别为-0.10、-0.99和0.10,有差异表达但未达到显著性水平。

EDN3和EDNRB信号通路。EDN3为内皮素-3endothelin 3, EDNRB为内皮素受体B, EDNRB与EDN3结合,活化下游的信号转导分子PKC、CamK II和MAPK,继而引发细胞内复杂的生理应答,该信号通路对于神经嵴来源的黑色素细胞和肠神经节的发育是非常重要的,对于黑色素细胞发育分化所需的Tyr酶表达起至关重要作用。注释到ED-NRA、EDNRB二种受体,它们的 $\log_2(\text{OFH/FH})$ 值分别为0.83和-0.20;同时,ET-1、ET-2基因也被注释,它们的 $\log_2(\text{OFH/FH})$ 值分别为2.71和4.37,差异表达显著性上调。

上述结果显示,黄颡鱼被灌喂氧化鱼油后,在胃肠道黏膜中,黑色素合成激素 $\alpha$ -MSH前体的基因、 $\alpha$ -MSH受体MCH-R2、MC-R3差异表达显著上调;WNT/ $\beta$ -catenin信号通路、EDN3和EDNRB信号

通路、KIT及其配体KITL信号通路的有关基因受到灌喂氧化鱼油的影响有差异表达,但未达到显著性水平。是否可以认为,黄颡鱼胃肠道黏膜中黑色素细胞分化与发育受 $\alpha$ -MSH通路的影响较大,即受到激素调控的影响更大,而受其他3个信号通路的影响较小?这需要进一步的研究。

### 3.4 黑色素代谢和黑色素细胞发育的几个关键性基因的差异表达分析

从图2可见,不同的信号通路通过对CREB、PAX3和PAX3-a、SOX10等靶基因的调控,调节MITF的表达活性,再对下游的TYR、TRP-1和TRP-2的表达进行调控,从而实现对黑色素生物合成、黑素体在黑色素细胞内的运动、对黑色素细胞的分化和发育的调控作用。

SOX10是转录因子中High-mobility group-domain SOX家族成员,SOX10基因在黑色素细胞形成过程中也发挥着重要作用,它调控MITF基因的表达从而调控黑色素的迁移和分化<sup>[13, 14]</sup>。SOX10基因还可调控黑色素合成途径的L-多巴色素互变异构酶(DCT)又称为酪氨酸酶相关蛋白2(TRP-2)基因的表达。SOX10受到EDN3-EDNRB信号通路的调控,同样也受到WNT/ $\beta$ -catenin信号通路的影响<sup>[15]</sup>。在本试验中,SOX10的 $\log_2(\text{OFH/FH})$ 值为-7.14,为差异表达显著性下调;DCT的 $\log_2(\text{OFH/FH})$ 值为8.40,

为差异表达显著性上调。这表明SOX10的表达受到灌喂氧化鱼油的影响很大,虽然导致对其下游基因如*Mitf*基因的表达受到显著影响,但L-多巴色素的异构化是增强的。

PAX3和SOX10协同作用激活MITF启动子,激活MITF的表达,进而促进黑色素合成关键酶如 $TRP-1$ 、 $TRY$ 、 $DCT$ 等的表达增加<sup>[15]</sup>。在本试验中,PAX3的 $\log_2(\text{OFH/FH})$ 值为-1.40; SOX10的 $\log_2(\text{OFH/FH})$ 值为-7.14,都是差异表达下调,显示对其下游基因的调控作用下降,会影响到黑色素的生物合成,是黑色素生物合成量呈现下降趋势。

MITF作为色素细胞信号转导途径下游的一个信号分子,介导了多种信号级联过程,在色素细胞发育、分化和功能调节中起到关键性作用,因此它可以作为关键性靶位,用于研究其他相关基因<sup>[16]</sup>。*MITF*可调控酪氨酸基团家族的表达,从而参与黑色素细胞中黑色素生成的调控。在本试验中,*MITF*的 $\log_2(\text{OFH/FH})$ 值为-0.30,为差异表达下调。

从上述几个关键基因的差异表达结果看,黄颡鱼在灌喂氧化鱼油后,其胃肠道黏膜组织中,涉及黑色素细胞分化、发育和成熟,以及涉及黑色素生物合成、黑素体在黑色素细胞内运动的主要基因显示差异表达,总体上是差异表达下调的趋势,而涉及L-多巴色素的异构化的反应是增强的。因此,

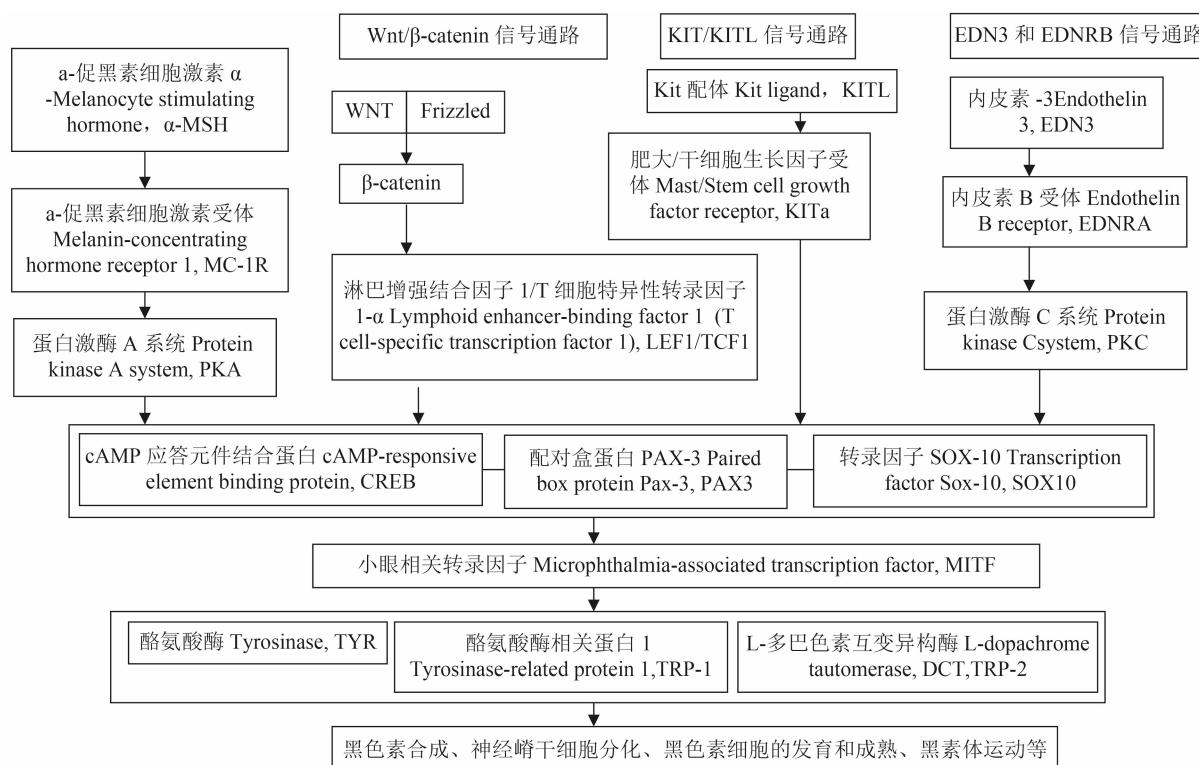


图2 黄颡鱼黑色素细胞分化与发育过程中的激素与信号通路基因网络

Fig. 2 Gene network of hormone and signaling pathways during melanoma cell differentiation and development process

可以认为,灌喂氧化鱼油对黑色素细胞的分化、发育、成熟,以及黑色素的生物合成、黑素体运动等的影响是负面的,可能导致成熟的黑色素细胞数量不足、皮肤中成熟的黑色素细胞密度下降、黑色素数量下降,导致黄颡鱼黑色体色变化,黑色体色不足,而出现体色变浅的情况;同时,由于黄颡鱼能够吸收、并沉积饲料来源的黄色素,在黑色素、黑色体色不足的情况下,鱼体出现黄色体色。

### 参考文献:

- [1] Ye Y T, Cai C F, Zhang B T. Fish Nutrition and Feed Formulation [M]. Beijing: Chemical Engineering Press. 2013, 72—103 [叶元土, 蔡春芳, 张宝彤. 鱼类营养与饲料配制. 北京: 化学化工出版社. 2013, 72—103]
- [2] Masazumi S. Morphological color changes in fish: regulation of pigment cell density and morphology [J]. *Microscopy Research and Technique*, 2002, **58**(6): 496—503
- [3] Cheng W X, Xu G H, Xiong D, et al. Primary culturing of melanoma cells and cloning analysis of migration-related gene in *Pelteobagrus fulvidraco* [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2014, **9**(6): 1035—1040 [程炜轩, 许国焕, 熊达, 等. 黄颡鱼黑色素细胞原代培养及迁移相关基因克隆分析. 生态毒理学报, 2014, **9**(6): 1035—1040]
- [4] Zhu J, Zhang X M, Gao T Y, et al. The metamorphosis of turbot *Scophthalmus maximus* and morphological observation on melanophores in larval skin [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2002, **26**(3): 193—200 [朱杰, 张秀梅, 高天翔, 等. 大菱鲆早期变态发育和体表黑色素细胞形态学观察. 水产学报, 2002, **26**(3): 193—200]
- [5] Wu D W, Shui D Z, Cai C F, et al. Nutrition changes associated with anchovy enzymolysis process [J]. *Feed Industry*, 2015, **36**(24): 25—30 [吴代武, 税典章, 蔡春芳, 等. 鳀鱼鱼浆的酶解过程与营养成分的变化. 饲料工业, 2015, **36**(24): 25—30]
- [6] Ye Y T, Cai C F, Xu F, et al. Feeding grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) with oxidized fish oil up-regulates the gene expression in the cholesterol and bile acid synthesis pathway in intestinal mucosa [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, **39**(1): 90—100 [叶元土, 蔡春芳, 许凡, 等. 灌喂氧化鱼油使草鱼肠道黏膜胆固醇合成基因通路表达上调. 水生生物学报, 2015, **39**(1): 90—100]
- [7] Ye Y T, Cai C F, Xu F, et al. Effects of oxidized fish oil on oxidative stress pathways of intestinal mucosa of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2016, **40**(4): 758—766 [叶元土, 蔡春芳, 许凡, 等. 氧化鱼油对草鱼肠道黏膜抗氧化应激通路基因表达水平的影响. 水生生物学报, 2016, **40**(4): 758—766]
- [8] Zhu G Y, YE Y T, Gao Y L, et al. The comparison of pigment and tryosinase activity in seven species of freshwater fishes [J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2007, **16**(5): 431—436 [诸葛燕, 叶元土, 高艳玲, 等. 七种淡水鱼类色素含量和酪氨酸酶活力的比较研究. 上海水产大学学报, 2007, **16**(5): 431—436]
- [9] Victoria A, Kdmller, John D, et al. Morphological studies on the mechanisms of pigmentary organelle transport in fish xanthophores and melanophores [J]. *Microscopy Research and Technique*, 2002, **58**(6): 470—480
- [10] Yang C L, Hao T T, Li Q F, et al. Signal regulation for melanoblast cytopoiesis process: a review [J]. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2013, **40**(9): 187—194 [杨春玲, 郝甜甜, 李强飞, 等. 成黑色素细胞生成过程中信号调节的研究进展. 中国畜牧兽医, 2013, **40**(9): 187—194]
- [11] Lan X M, Yang X C. Wnt/β-catenin signaling pathways and hair follicle morphogenesis [J]. *Journal of Practical Dermatology*, 2015, **8**(3): 205—207 [兰雪梅, 杨希川. Wnt/β-catenin信号通路与毛囊的生长. 实用皮肤病学杂志, 2015, **8**(3): 205—207]
- [12] Xue C Y, Li L. The regulation of α-melanocyte-stimulating hormone to melanogenesis of skin [J]. *Journal of Medical Postgraduates*, 2004, **17**(9): 823—828 [薛春雨, 李矗. α黑素细胞刺激素对皮肤黑素合成的调控作用. 医学研究生学报, 2004, **17**(9): 823—828]
- [13] Fabien M, Sabrina G, Friedrich B. The tyrosinase enhancer is activated by Sox10 and Mitf in mouse melanocytes [J]. *Pigment Cell Research*, 2007, **20**(3): 173—184
- [14] Bondurand N, Pingault V, Goerich D E, et al. Interaction among Sox10, Pax3 and Mitf three genes altered in Waardenburg syndrome [J]. *Human Molecular Genetics*, 2000, **9**(13): 1907—1917
- [15] Mascarenhas J B, Littlejohn E L, Wolsky R J, et al. PAX3 and SOX10 activate Mitf receptor expression in melanoma [J]. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 2010, **23**(2): 225—237
- [16] Vachtenheim J, Borovansky J. “Transcription physiology” of pigment formation in melanocytes: central role of MITF [J]. *Experimental Dermatology*, 2010, **19**(7): 617—627

## TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF MELANOCYTE DIFFERENTIATION AND THE MELANIN SYNTHESIS METABOLIC PATHWAY IN THE GASTROINTESTINAL MUCOSA OF YELLOW CATFISH (*PELTEOBAGRUS FULVIDRACO*) FED OXIDIZED FISH OIL

YE Yuan-Tu<sup>1</sup>, WU Ping<sup>1</sup>, CAI Chun-Fang<sup>1</sup>, WU Dai-Wu<sup>1</sup>, LUO Qi-Gang<sup>1</sup>, HE Jie<sup>1</sup>, GAO Min-Min<sup>1</sup>, ZHOU Lu-Yang<sup>1</sup>, WANG Meng-Ying<sup>1</sup>, WANG Bing<sup>1</sup>, ZHANG Bao-Tong<sup>2</sup> and XIAO Pei-Zhen<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Aquatic Animal Nutrition, School of Basic Medicine and Biological Science, Soochow University, Suzhou 215123, China; 2. Open Lab for Aquatic Animal Nutrition, Beijing Research Institute for Nutritional, Beijing 100000, China)

**Abstract:** Transcriptome analysis of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) by RNA-seq method extracting gastrointestinal mucosa Total RNA was studied in this paper. The fish were fed with oxidized fish oil and fish oil respectively for 7d. Differential expression of genes related to melanin synthesis, melanosomes movement, melanocyte stimulating hormone- $\alpha$  pathway and three signal pathways controlling melanocyte differentiation were analyzed. The results showed that there were metabolic networks of melanocyte differentiation and development, melanin synthesis and regulation in the gastrointestinal mucosa. The genetic information of key enzymes and protein of melanin synthesis were introduced with plotting metabolic networks graph. The melanin content was deficient because of the genes expression level were significantly down-regulation related to controlling melanin synthesis after fed with oxidized fish oil. While melanocyte differentiation and development were improved because of the genes expression level were significantly up-regulation related to melanocyte stimulating hormone- $\alpha$  pathway ( $\alpha$ -MSH). In the same time, genes expression level of WNT/ $\beta$ -catenin, EDN3 / EDNRB and KIT/KITL signal pathways were different. In conclusion, feeding oxidized fish oil affected melanocyte differentiation and development and reduced melanocyte number which benefited to maturity in yellow catfish. Insufficient melanin biosynthesis also led to body color variation of yellow catfish.

**Key words:** Melanin; Melanosomes; Melanocytes; Gastrointestinal mucosa; Catfish