

丙戊酸通过*Mitf*通路促进企鹅珍珠贝黑色素合成

于非非 吴金贤 钟智明 梁绮雯 刘永

VALPROIC ACID ENHANCES MELANIN SYNTHESIS BY *Mitf* PATHWAY IN *PTERIA PENGUIN*

YU Fei-Fei, WU Jin-Xian, ZHONG Zhi-Ming, LIANG Qi-Wen, LIU Yong

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2020.128>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

氧化鱼油对黄颡鱼黑色素合成酶及内分泌激素的影响

EFFECTS OF DIETARY INCLUSION OF OXIDIZED FISH OIL ON MELANIN, MELANIN SYNTHETIC ENZYMES AND HORMONES OF *PELTEOBAGRUS FULVIDRACO*

水生生物学报. 2017, 41(5): 1020–1026 <https://doi.org/10.7541/2017.127>

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

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

水生生物学报. 2018, 42(1): 57–67 <https://doi.org/10.7541/2018.008>

在患CyHV-2病的异育银鲫肠道黏膜中胆固醇、胆汁酸代谢通路基因的差异表达

GENE DIFFERENCE EXPRESSION OF CHOLESTEROL AND BILE ACID METABOLISM PATHWAY IN INTESTINAL MUCOSA WITH THE CYHV-2 DISEASE *CARASSIUS AURATUS GIBELIO*

水生生物学报. 2017, 41(5): 956–962 <https://doi.org/10.7541/2017.119>

异亮氨酸对鳊mTOR信号通路及氮代谢影响

EFFECT OF ISOLEUCINE ON mTOR SIGNALING PATHWAY AND NITROGEN METABOLISM OF CHINESE PERCH (*SINIPERCA CHUATSI*)

水生生物学报. 2018, 42(5): 879–886 <https://doi.org/10.7541/2018.108>

氨氮对鱼类毒性的影响因子及气呼吸型鱼类耐氨策略

IMPACT FACTORS OF AMMONIA TOXICITY AND STRATEGIES FOR AMMONIA TOLERANCE IN AIR-BREATHING FISH: A REVIEW

水生生物学报. 2017, 41(5): 1157–1168 <https://doi.org/10.7541/2017.144>

银鲫转录调控因子*lbh-b* cDNA克隆与表达分析

CLONE AND EXPRESSION ANALYSIS OF TRANSCRIPTION COFACTOR *LBH-B* in GIBEL CARP

水生生物学报. 2018, 42(4): 673–680 <https://doi.org/10.7541/2018.083>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2020.128

丙戊酸通过*Mitf*通路促进企鹅珍珠贝黑色素合成

于非非 吴金贤 钟智明 梁绮雯 刘永

(广东海洋大学水产学院, 湛江 524088)

摘要: 研究利用HPLC-MS/MS检测、酪氨酸酶活性分析和荧光定量PCR技术, 探索丙戊酸(Valproic acid, VPA)作为企鹅珍珠贝[*Pteria penguin* (Röding, 1798)]黑色素增强剂的生物毒性、有效性和作用途径。生物毒性分析显示, 高浓度(100 mmol/L)丙戊酸作用24h即可显著降低存活率至83.3% ($P < 0.05$), 并存在明显的时间依赖效应, 10 mmol/L丙戊酸作用72h是最大的安全使用浓度和作用时间。丙戊酸的作用分析发现, 10和100 mmol/L丙戊酸作用72h可以显著提高企鹅珍珠贝黑色素含量43.7% ($P < 0.05$)和47.1% ($P < 0.05$), 并显著提高酪氨酸酶(黑色素合成标志酶)活性59.7% ($P < 0.05$)和136.1% ($P < 0.01$), 说明丙戊酸可以有效地促进企鹅珍珠贝的黑色素合成。对丙戊酸的作用途径分析发现, 丙戊酸可以显著增加小眼相关转录因子(Melanogenesis associated transcription factor, *Mitf*)、酪氨酸酶(Tyrosinase, *Tyr*)、*Cdk2* (Cyclin-dependent kinase 2) 和 *Bcl2* (B-cell lymphoma 2)等黑色素合成相关基因的表达, 但对环磷腺苷效应元件结合蛋白(cAMP response element binding protein, *Creb2*)的表达无显著影响, 说明丙戊酸是通过*Mitf*-*Tyr*-melanin途径参与企鹅珍珠贝黑色素合成的。研究为在生产上建立珍珠贝的色泽优化技术提供了重要数据。

关键词: 丙戊酸; 企鹅珍珠贝; 黑色素; 酪氨酸酶; 小眼相关转录因子; 生物毒性

中图分类号: S968.3; Q175

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2020)05-1105-06

企鹅珍珠贝[*Pteria penguin* (Röding, 1798)]具有培育大型优质海水珍珠的多种优势, 被看作我国“振兴南珠”最有潜力的品种。珍珠的色泽是评判珍珠品质的重要指标, 目前企鹅珍珠贝所产珍珠多以墨绿色、蓝黑色等深色系列为主, 这主要取决于黑色素的绝对优势^[1]。筛选珍珠贝有效的黑色素增强剂, 调控增加黑色素的含量, 有望生产出纯黑的大颗粒珍珠, 大幅度提高珍珠品质。

丙戊酸(Valproic acid, VPA)因具有抑制组蛋白脱乙酰基酶的活性, 作为一种广谱的抗癫痫药物^[2]和潜在的抗癌药物^[3, 4]而被开发和应用。近些年, 越来越多研究发现丙戊酸具有促进人类黑色素细胞生成的作用^[5, 6]。我们前期研究发现, 低浓度丙戊酸可以加深企鹅珍珠贝1—7月龄稚贝壳色, 而不降低其存活率^[7], 暗示着丙戊酸可以影响企鹅珍珠贝黑色素合成, 这对于珍珠贝色泽调控提供了新的启示。

哺乳动物黑色素的合成是一个复杂的过程, 至少有3条通路参与了这个过程^[8, 9]。贝类黑色素相关研究较少, 尚无完整信号通路报道。我们前期研究发现, 环磷腺苷效应元件结合蛋白(cAMP response element binding protein, *Creb2*)、小眼相关转录因子(Melanogenesis associated transcription factor, *Mitf*)、酪氨酸酶(Tyrosinase, *Tyr*)、*Cdk2* (Cyclin-dependent kinase 2) 和 *Bcl2* (B-cell lymphoma 2) 等基因可能参与了企鹅珍珠贝的黑色素合成, 一个*Creb2*-*Mitf*-*Tyr*-melanin轴可能存在于企鹅珍珠贝黑色素合成信号通路中^[10, 11]。那么, 丙戊酸是否可调控企鹅珍珠贝成贝黑色素的合成, 又是通过怎样的途径发挥作用, 成为值得探讨的问题。

基于以上目的, 本研究首先通过存活率检测, 分析生产上安全有效的丙戊酸作用浓度和时间; 利用HPLC-MS/MS检测和酪氨酸酶活性分析, 验证丙

收稿日期: 2020-05-07; 修订日期: 2020-07-12

基金项目: 广东海洋大学创新强校专项(230419094); 国家级大学生创新创业训练项目(CXXL2019001); 广东省渔港建设和渔业发展专项(B201601-Z08)资助 [Supported by the Guangdong Innovative and Strong School Project (230419094); National Innovation and Entrepreneurship Program for University Student (CXXL2019001); Guangdong Marine Fishery Development Foundation (B201601-Z08)]

作者简介: 于非非(1980—), 女, 博士; 主要从事水产动物遗传育种和免疫学研究。E-mail: yufei2000@163.com

通信作者: 刘永(1968—), 男, 学士; 主要从事海水珍珠及贝类增殖。E-mail: liu89@126.com

戊酸对企鹅珍珠贝黑色素合成的影响;通过real-time RT-PCR, 分析丙戊酸对*Mitf*和*Tyr*等一系列黑色素相关基因表达的影响, 以阐明丙戊酸调控企鹅珍珠贝黑色素合成的作用途径。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验所用的企鹅珍珠贝取自广西北海涠洲岛, 重400—450 g, 壳长13—15 cm。实验贝在25—26℃的循环海水中暂养1周, 期间主要投喂扁藻(*Isochrysis zhanjiangensis*)和湛江等鞭金藻(*Platymonas subcordiformis*)。

1.2 丙戊酸处理及存活率分析

将企鹅珍珠贝分成4组, 每组30个样品。实验组分别用终浓度为1、10和100 mmol/L的丙戊酸浸泡处理24h、48h和72h, 接着置于新鲜海水中休养; 对照组为不含丙戊酸的海水养殖组。第7天时, 计算每组实验贝的存活率, 取其外套膜用于基因表达分析、酪氨酸酶活性分析和黑色素检测。

1.3 总RNA提取和cDNA合成

使用RNeasy Mini Kit(Qiagen, Gaithersburg MD)提取企鹅珍珠贝的外套膜总RNA。用1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA质量, 用NanoDrop ND1000分光光度计测定RNA含量。利用Superscript II polymerase kit(全式金, 北京, 中国)反转录合成cDNA。

1.4 荧光定量PCR分析

利用SYBF Green qPCR Kit(Thermo scientific, Waltham, MA, USA)和7500/7500 Fast Real-time系统(ABI, Carlsbad, CA, USA)进行qRT-PCR检测。以企鹅珍珠贝18S rRNA作为内参, 每个样品做3个重复, 每组做6个平行样品。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算相关基因的相对表达水平, 所用引物见表1。

1.5 酪氨酸酶活性分析

取0.5 g企鹅珍珠贝外套膜组织加入1 mL 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 6.8), 彻底匀浆; 10000 r/min离心10min, 以获得上清液; 将0.5 mL组织上清液、0.5 mL 5 mmol/L L-DOPA和2.4 mL 0.1 mmol/L PBS混合均匀, 于37℃水中孵育30min, 在分光光度计475 nm处检测吸光值。酪氨酸酶活性用475 nm处孵育30min增加或减少的吸光值来代表, 每组分析6个平行样品。

1.6 黑色素的提取与氧化

取0.5 g外套膜组织, 匀浆彻底后加入15 mL 0.2 mol/L磷酸缓冲液(pH 7.4)和0.3 g(2% m/v)木瓜蛋白酶, 55℃下酶解20h, 离心收集沉淀。依次用2 mL石油醚、无水乙醇和去离子水洗涤, 完全干燥即得黑色

表1 所用引物序列

Tab. 1 Primers used in the study

引物Primer	序列Sequence (5'—3')	用途Application
<i>PpTyr</i> -qPCR-F	GTTTGGAATGGCAGAGGGTC	qRT-PCR
<i>PpTyr</i> -qPCR-R	TCGATAAAGGTATGGTGGAACC	qRT-PCR
<i>PpCreb2</i> -qPCR-F	AACTCCCAGTGAAGCAGACA	qRT-PCR
<i>PpCreb2</i> -qPCR-R	GCTCCCCAACAGTAGCCAACT	qRT-PCR
<i>PpMitf</i> -qPCR-F	TGTTACCTAAATCTGTTGATCCAG	qRT-PCR
<i>PpMitf</i> -qPCR-R	AAATTAGCTGGACAGGAAGAGGAG	qRT-PCR
<i>PpBcl2</i> -qPCR-F	TGAGGCACAGTTCCAGGATCT	qRT-PCR
<i>PpBcl2</i> -qPCR-R	ACTCTCCACACACCGTACAG	qRT-PCR
<i>PpCdk2</i> -qPCR-F	TGGATTTGCTCGGACACTTG	qRT-PCR
<i>PpCdk2</i> -qPCR-R	TCTACTGCCCTGCCATACTT	qRT-PCR
18S rRNA-F	ATGTCTGCCCTATCAACTTTCT	qRT-PCR
18S rRNA-R	TGCTGCCTTCCTTGATGT	qRT-PCR

素粗品。然后将黑色素粗品溶解于8.6 mL 1 mol/L K_2CO_3 和0.8 mL 3% H_2O_2 混合液中, 100℃水浴20min; 取出冷却至常温后加入0.4 mL 10% Na_2SO_3 终止反应, 用6 mol/L HCl调节pH至1.0。离心后取上清, 用70 mL乙醚萃取2次, 干燥获得结晶。用0.5 mL 10%甲醇溶液复溶, 0.45 μ m有机滤膜中过滤, 即得黑色素碱性氧化产物。每组提取氧化并分析6个平行样品。

1.7 LC-MS/MS分析

利用LC-MS/MS检测黑色素碱性氧化产物的含量和成分^[12, 13]。利用高效液相色谱系统(Waters, Milford, Massachusetts, USA)对色谱分离, 其色谱柱为Waters ACQUITY UPLC HSST3 (2.1 $\times$ 50 mmol/L, 1.7 μ m)。流动相A为0.1% (v/v)甲酸水溶液, 流动相B为0.1% (v/v)甲酸甲醇溶液。分析开始时流动相A和B的比例分别为90%A和10%B; 3min后, 使用线性梯度将流动相B的分数增加至100%; 5min后, 使用线性梯度将流动相比率恢复至初始条件, 每个循环7min, 在40℃下以0.3 mL/min的流速进行分析。使用Xevo TQ 三重四极杆质谱的ESI模式进行MS分析。源温度为150℃, 去溶剂化温度为550℃, 锥形气体流量为50 L/h, 去溶剂化气体流量为1100 L/h, 碰撞气体流量为0.14 mL/min(氙气)。使用MRM模式检测, 参数如表2。

1.8 统计学分析

采用SPSS19.0(IBM, Armonk, State of New York, USA)进行方差分析, 检测不同样本间差异的显著性。显著性差异以*表示($P < 0.05$), 极显著差异

以**表示($P<0.01$)。

2 结果

2.1 丙戊酸的生物毒性检测

为了检测丙戊酸对企鹅珍珠贝的生物毒性, 同时摸索生产上可安全使用的作用浓度和作用时间, 我们检测了1、10、100 mmol/L VPA作用0、24h、48h和72h对企鹅珍珠贝存活率的影响。如图1所示, 1和10 mmol/L VPA作用0—72h, 对企鹅珍珠贝的存活率均无显著影响($P>0.05$)。但100 mmol/L VPA作用24h、48h和72h显著降低存活率至83.3% ($P<0.05$), 76.7% ($P<0.05$)和70.0% ($P<0.01$), 并显示出明显的时间依赖效应。这说明高浓度(100 mmol/L)丙戊酸作用24h以上对企鹅珍珠贝成贝具有一定的生物毒性, 10 mmol/L作用72h是最大的安全使用浓度和作用时间。

2.2 丙戊酸增加企鹅珍珠贝黑色素的含量

为了验证丙戊酸是否可影响企鹅珍珠贝的黑色素合成, 利用LC-MS/MS分析1、10和100 mmol/L

丙戊酸处理72h后, 企鹅珍珠贝外套膜中黑色素含量的变化。因黑色素的主要成分是不溶于酸碱溶液的DHI(5,6-di hydroxyindole)和DHICA(5,6-di hydroxyindole-2-carboxylic acid), 但其碱性氧化产物PDCA(Pyrrole-2, 3-dicarboxylic acid)和PTCA(Pyrrole-2,3,5-tricarboxylic acid)可溶于酸溶液和碱溶液, 因此PDCA和PTCA被广泛用于黑色素的定性和定量分析。由图2所示, 1 mmol/L VPA对企鹅珍珠贝的黑色素含量没有显著影响($P>0.05$)。10 mmol/L VPA可显著提高黑色素的含量(PDCA+PTCA)43.7% ($P<0.05$), 100 mmol/L VPA可显著提高黑色素的含量(PDCA+PTCA)47.1% ($P<0.05$)。以上数据说明, 高浓度的丙戊酸(≥ 10 mmol/L)作用72h可有效促进企鹅珍珠贝的黑色素合成。

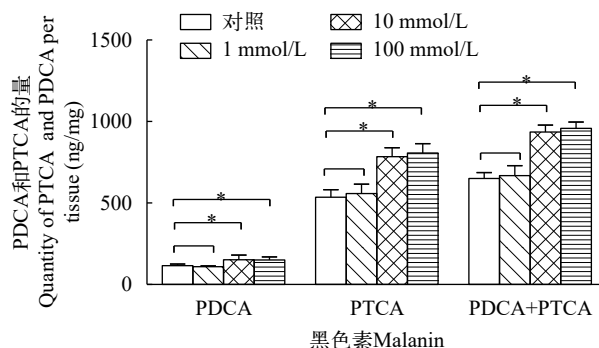


图2 丙戊酸对黑色素含量的影响

Fig. 2 The effects of VPA on melanin content of *P. penguin*

分别用0、1、10、100 mmol/L 丙戊酸浸泡企鹅珍珠贝72h, 检测样品外套膜的黑色素含量, 每组做6个重复; 下同

The melanin content was performed with samples from 0, 1, 10 and 100 mmol/L for 72h groups. Each bar was a mean of 6 pearl oysters. The same applies below

2.3 丙戊酸提高企鹅珍珠贝酪氨酸酶活性

酪氨酸酶是黑色素合成的限速酶, 酪氨酸酶活性升高是黑色素合成的重要标志^[12]。比较丙戊酸处理前后外套膜的酪氨酸酶活性, 以进一步确定丙戊酸对企鹅珍珠贝黑色素合成的影响。以475 nm波长下L-DOPA转化为多巴色素(Dopachrome)的速率代表酪氨酸酶活性。1 mmol/L VPA作用72h, 对酪氨酸酶活性没有显著影响($P>0.05$); 10 mol/L VPA可使酪氨酸酶活性增加59.7% ($P<0.05$), 100 mol/L VPA则可使酪氨酸酶活性显著增加136.1% ($P<0.01$, 图3)。这说明高浓度的丙戊酸(≥ 10 mol/L)可以显著增加企鹅珍珠贝酪氨酸酶活性。

2.4 丙戊酸调控黑色素合成通路基因的表达

为了阐述丙戊酸发挥作用的信号通路, 我们对丙戊酸处理72h后黑色素合成相关基因的表达进行分析。如图4所示, 1 mol/L VPA对*Creb2*、*Mitf*、*Tyr*、

表2 质谱检测参数

Tab. 2 Details of mass spectrometric detection

标准品 Compound	母离子 Parent-ion (m/z)	子离子 Production (m/z)	总电压 Conc-voltage (V)	碰撞能 Collision energy (eV)	保持时间 Retention time (min)
PDCA	155.98	138.01	30	8	2.97
PTCA	199.99	182.09	30	8	4.15

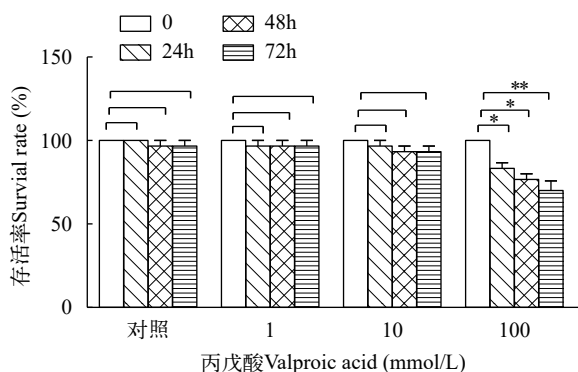


图1 丙戊酸的毒性检测

Fig. 1 The toxicity test of valproic acid on *P. penguin*

分别用0、1、10、100 mmol/L 丙戊酸浸泡企鹅珍珠贝0、24h、48h和72h, 每组做30个重复, 统计存活率。*表示有显著性差异($P<0.05$), **表示极显著性差异($P<0.01$), 没有标记表示无显著性差异($P>0.05$); 下同

The survival rates of *P. penguin* were analyzed after 0, 1, 10, 100 mmol/L VPA treatment for 0, 24h, 48h and 72h. Each bar was a mean of 30 pearl oysters. *meant significant difference ($P<0.05$), **meant highly significant difference ($P<0.01$) and no sign meant no significant difference ($P>0.05$). The same applies below

*Bcl2*和*Cdk2*等基因的表达均无显著影响($P>0.05$)。10 mol/L VPA可以显著提高*Mitf*的表达至1.65倍($P<0.05$), 100 mol/L 可提高至1.93倍($P<0.05$)。相应地, 10 mol/L VPA可使*Tyr*转录本提高至1.38倍($P<0.05$), 100 mol/L 可使*Tyr*转录本提高至2.10倍($P<0.01$)。10 mol/L VPA增加*Bcl2*转录本至1.90倍($P<0.01$), 100 mol/L VPA增加*Bcl2*转录本至2.73倍($P<0.01$)。但是, VPA对*Creb2*的表达没有显著影响($P>0.05$), 即使VPA的浓度高达100 mol/L。另外, 10 mol/L VPA可显著提高*Cdk2*表达水平至1.47倍($P<0.05$), 但100 mol/L VPA对*Cdk2*却未产生明显的影响($P>0.05$)。

3 讨论

3.1 丙戊酸可有效促进企鹅珍珠贝黑色素合成

黑色素参与了有机体多种生物学过程, 包括着色、皮肤保护、癌症和老化等^[13], 黑色素增强剂和抑制剂的开发在临床上具有重要的价值^[14, 15], 对于水产动物则具有重要经济价值^[16]。丙戊酸是一种

短链脂肪酸, 具有抗惊厥和抗癌等多种作用^[17], 也被报道可以促进人类黑色素细胞的生长和黑色素的合成^[4, 6], 但是否在贝类具有相似的作用未见报道。本研究利用不同浓度的丙戊酸处理企鹅珍珠贝成贝, 发现 ≥ 10 mol/L丙戊酸处理72h可以显著增加黑色素含量, 暗示丙戊酸能够影响企鹅珍珠贝黑色素合成。同时, 丙戊酸还可显著提高酪氨酸酶活性, 因为酪氨酸酶是黑色素合成的关键限速酶, 酪氨酸酶活性被作为黑色素合成的重要标志^[12], 因此, 酪氨酸酶活性的升高进一步证实丙戊酸可以有效地促进企鹅珍珠贝的黑色素合成。

3.2 丙戊酸通过*Mitf*通路影响企鹅珍珠贝黑色素合成

在哺乳动物的黑色素合成通路中, *Mitf*是核心转录因子^[18], 可与*Tyr*启动子的M-box(CATGTG)或E-box(CACGTG)结合, 激活黑色素合成限速酶*Tyr*的表达, 参与黑色素的合成^[19, 20]。*Mitf*还可以通过转录激活*Bcl2*基因, 参与调控黑色素细胞的存活^[21, 22]; 通过转录激活*Cdk2*基因, 参与调控黑色素细胞的增殖^[8]。在本研究中, 丙戊酸显著增加了*Mitf*的表达水平, 同时显著提高了*Tyr*、*Bcl2*和*Cdk2*等基因的表达水平, 暗示丙戊酸可能通过*Mitf*基因影响了细胞的黑色素合成、细胞存活和增殖过程, 也进一步证实企鹅珍珠贝中*Mitf*作为核心转录因子的可能性。需要说明的是, 100 mol/L VPA可使*Mitf*转录本显著提高, 但并未显著提高*Cdk2*的表达。一个可能的原因是高浓度VPA对细胞具有一定毒副作用, 这种毒副作用不利于细胞的生长。虽然VPA诱导表达了大量MITF蛋白, 但MITF更多参与了黑色素的合成和细胞的存活过程, 以帮助细胞提高存活率。

*Creb2*是一种细胞核内转录因子, 具有典型的亮氨酸拉链结构域。在CREB磷酸化后, 可以识别*Mitf*启动子的CRE(cAMP response element)序列, 调控*Mitf*的表达^[23, 24]。值得一提的是, 本研究中VPA可以显著提高*Mitf*及其下游基因的表达, 但不能影响*Creb2*的表达。一种可能的解释是, VPA可能影响了CREB的磷酸化过程, 但对*Creb2*的转录没有影响, VPA仍是通过*Creb-Mitf-Tyr-melanin*发挥作用。Lin等^[25]利用小鼠P12细胞进行体外实验发现, VPA可以增加磷酸化CREB的水平, 提高CREB活性, 激活CREB依赖的cAMP信号通路, 这为我们的推论提供了佐证。VPA不影响*Creb2*的另一可能原因是, VPA并不依赖于*Creb2*发挥作用, 而是通过其他转录因子调控*Mitf-Tyr-melanin*通路, 最终调控企鹅珍珠贝黑色素的合成。

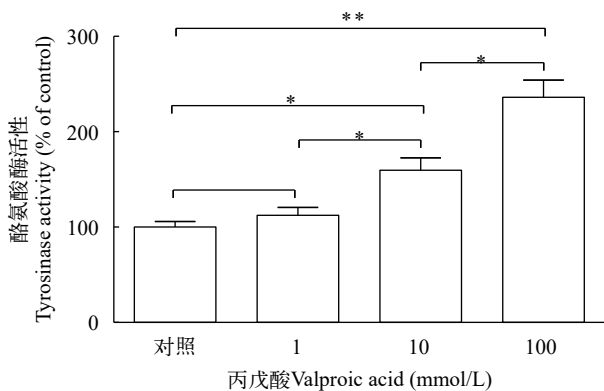


图3 丙戊酸对酪氨酸酶活性的影响

Fig. 3 The effect of VPA on tyrosinase activity of *P. penguin*

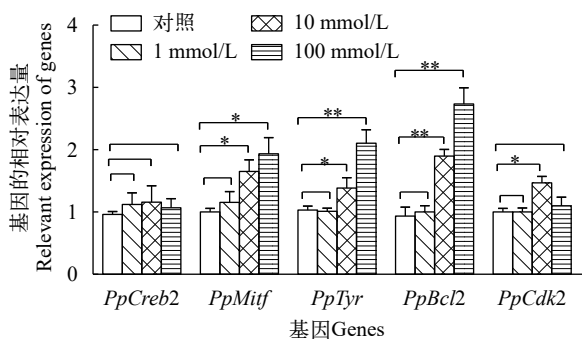


图4 丙戊酸对黑色素合成通路基因表达的影响

Fig. 4 The effect of VPA on expression of *PpCreb2*, *PpMitf*, *PpTyr*, *PpBcl2* and *PpCdk2*

以18S rRNA作为内标, 每组做6个重复

The 18S rRNA of *P. penguin* was used as an internal control

3.3 丙戊酸安全作用浓度和作用时间分析

丙戊酸是否存在毒副作用是一个有争议的问题。Lin等^[25]认为丙戊酸可以在临床上广泛用于治疗神经类疾病, 没有任何副作用。Chodurek等^[5]却报道, 1 mol/L丙戊酸作用3d即可显著提高人类A-375细胞的黑色素的含量, 降低细胞的存活率。本研究发现, 1 mol/L丙戊酸对企鹅珍珠贝黑色素的含量、酪氨酸酶活性、相关基因表达水平以及存活率均无显著影响; 10 mol/L丙戊酸处理72h可显著提高黑色素的含量、酪氨酸酶活性和相关基因表达水平, 但对成贝存活率仍无显著影响; 但100 mol/L丙戊酸处理72h在提高黑色素的含量、酪氨酸酶活性和相关基因表达的同时, 也显著降低了成贝存活率。因此, 虽然贝类活体比人类细胞显示出更强的耐受性, 但高浓度(100 mol/L)的丙戊酸对贝类是具有一定毒性的, 10 mol/L丙戊酸处理72 h对于企鹅珍珠贝可能是最大作用浓度和最长作用时间, 这为在生产上建立珍珠贝的色泽优化技术提供了重要数据。

参考文献:

- [1] Yu F F, Tang X Y, Qu B L, *et al.* Kojic acid inhibited melanin synthesis by tyrosinase pathway in *Pteria penguin* [J]. *Aquaculture Research*, 2020, **51**(4): 1584-1591.
- [2] Dai X F, Yin Y H, Qin L Y. Valproic acid exposure decreases the mRNA stability of Bcl-2 via up-regulating miR-34a in the cerebellum of rat [J]. *Neuroscience Letters*, 2017, **657**(14): 159-165.
- [3] Shirsatha N, Rathosa M, Chaudharia U, *et al.* Potentiation of anticancer effect of valproic acid, an antiepileptic agent with histone deacetylase inhibitory activity, by the cyclin-dependent kinase inhibitor P276-00 in human non-small-cell lung cancer cell lines [J]. *Lung Cancer*, 2013, **82**(2): 214-221.
- [4] Makarević J, Rutz J, Juengel E, *et al.* Influence of the HDAC inhibitor valproic acid on the growth and proliferation of temsirolimus-resistant prostate cancer cells in vitro [J]. *Cancers*, 2019, **11**(4): 566.
- [5] Chodurek E, Orchel A, Orchel J, *et al.* Evaluation of melanogenesis in A-375 melanoma cells treated with 5, 7-dimethoxycoumarin and valproic acid [J]. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 2012, **17**(4): 616-632.
- [6] Zdybel M, Chodurek E, Pilawa B. EPR studies of free radicals in A-2058 human melanoma cells treated by valproic acid and 5, 7-dimethoxycoumarin [J]. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 2014, **71**(6): 1066-1072.
- [7] Yu F F, Song N N, Wang M F, *et al.* Arbutin and valproic acid affect the shell color of *Pteria penguin* [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2016, **35**(6): 1409-1414. [于非非, 宋娜娜, 王梅芳, 等. 熊果苷和丙戊酸影响企鹅珍珠贝(*Pteria penguin*)贝壳色泽 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2016, **35**(6): 1409-1414.]
- [8] Cheli Y, Ohanna M, Ballotti R, *et al.* Fifteen-year quest for microphthalmia-associated transcription factor target genes [J]. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 2010, **23**(1): 27-40.
- [9] Maranduca M A, Branisteanu D, Serban D N, *et al.* Synthesis and physiological implications of melanic pigments [J]. *Oncology Letters*, 2019, **17**(5): 4183-4187.
- [10] Yu F F, Pan Z N, Qu B L, *et al.* Identification of a tyrosinase gene and its functional analysis in melaninsynthesis of *Pteria penguin* [J]. *Gene*, 2018(656): 1-8.
- [11] Yu F F, Qu B L, Lin D D, *et al.* Pax3 gene regulated melanin synthesis by Tyrosinase pathway in *Pteria penguin* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, **19**(12): 3700.
- [12] Ito S, Nakanishi Y, Valenzuela R K, *et al.* Usefulness of alkaline hydrogen peroxide oxidation to analyze eumelanin and pheomelanin in various tissue samples: application to chemical analysis of human hair melanins [J]. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 2011, **24**(4): 605-613.
- [13] Ito S, Wakamatsu K, Glass K, *et al.* High-performance liquid chromatography estimation of cross-linking of dihydroxyindole moiety in eumelanin [J]. *Analytical Biochemistry*, 2013, **434**(2): 221-225.
- [14] Kim K I, Jo J W, Lee J H, *et al.* Induction of pigmentation by a small molecule tyrosine kinase inhibitor nilotinib [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, **503**(4): 2271-2276.
- [15] Choi Y K, Rho Y K, Yoo K H, *et al.* Effects of vitamin C vs. multivitamin on melanogenesis: Comparative study in vitro and in vivo [J]. *International Journal of Dermatology*, 2010, **49**(2): 218-226.
- [16] Ye Y T, Wu P, Cai C F, *et al.* The melanin synthesis metabolic pathway in the gastrointestinal mucosa of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) fed oxidized fish oil [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2018, **42**(1): 57-67. [叶元土, 吴萍, 蔡春芳, 等. 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 [J]. *水生生物学报*, 2018, **42**(1): 57-67.]
- [17] Duenas-Gonzalez A, Candelaria M, Perez-Plascencia C, *et al.* Valproic acid as epigenetic cancer drug: preclinical, clinical and transcriptional effects on solid tumors [J]. *Cancer Treatment Reviews*, 2008, **34**(3): 206-222.
- [18] Yun C Y, Roh E, Kim S H, *et al.* stem cell factor-inducible MITF-M expression in therapeutics for acquired skin hyperpigmentation [J]. *Theranostics*, 2020, **10**(1): 340-352.
- [19] Hejna M, Moon W M, Cheng J, *et al.* Local genomic features predict the distinct and overlapping binding patterns of the bHLH-zip family oncoproteins MITF and MYC-MAX [J]. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 2019,

- 32(4): 500-509.
- [20] Alves C P, Yokoyama S, Goedert L, *et al.* MYO5A gene is a target of MITF in melanocytes [J]. *The Journal of Investigative Dermatology*, 2017, **137**(4): 985-989.
- [21] Kalkavan H, Green D R. MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business [J]. *Cell Death and Differentiation*, 2018, **25**(1): 46-55.
- [22] McGill G G, Horstmann M, Widlund H R, *et al.* Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability [J]. *Cell*, 2002, **109**(6): 707-718.
- [23] Kang B, Kim Y, Park T J, *et al.* Dasatinib, a second-generation tyrosine kinase inhibitor, induces melanogenesis via ERK-CREB-MITF-tyrosinase signaling in normal human melanocytes [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2020, **523**(4): 1034-1039.
- [24] Sato K, Ando R, Kobayashi H, *et al.* 2-Ethoxybenzamide stimulates melanin synthesis in B16F1 melanoma cells via the CREB signaling pathway [J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2016, **423**(1-2): 39-52.
- [25] Lin X P, Feng L, Xie C G, *et al.* Valproic acid attenuates the suppression of acetyl histone H3 and CREB activity in an inducible cell model of Machado-Joseph disease [J]. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 2014, **38**(1): 17-22.

VALPROIC ACID ENHANCES MELANIN SYNTHESIS BY *Mitf* PATHWAY IN *PTERIA PENGUIN*

YU Fei-Fei, WU Jin-Xian, ZHONG Zhi-Ming, LIANG Qi-Wen and LIU Yong

(Fishery College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: The winged pearl oyster *Pteria penguin* (Röding, 1798) is an important marine cultured species that can produce high-quality seawater pearl. Melanin is the main pigment in *P. penguin* and largely affects the color and value of the pearl. This study analyzed the toxicity, function and signal pathway of valproic acid (VPA). Toxicity detection showed that 100 mmol/L VPA significantly reduced the survival rate of experimental animals in a time-dependent manner, and 10 mmol/L VPA for 72h was identified as the maximal safe concentration and working time for *P. penguin*. The liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS) analysis showed that the content of PDCA (pyrrole-2, 3-dicarboxylic acid) and PTCA (pyrrole-2, 3, 5-tricarboxylic acid), main alkaline oxidation products of melanin, increased significantly by 43.7% ($P<0.05$) and 47.1% ($P<0.05$) after 10 and 100 mmol/L VPA for 72h. Tyrosinase activity, a marker of melanin synthesis, increased by 59.7% ($P<0.05$) and 136.1% ($P<0.01$), correspondingly. These results indicated that valproic acid can effectively accelerate the melanin synthesis in *P. penguin*. The qRT-PCR (quantitative real-time PCR) showed that valproic acid increased the expression of genes in melanin synthesis pathway, including *Mitf* (microphthalmia-associated transcription factor), *Tyr* (Tyrosinase), *PpBcl2* (B-cell lymphoma 2) and *Cdk2* (cyclin-dependent kinase 2), but had no effect on *PpCreb2* (cyclin-dependent kinase 2). This suggest that valproic acid can enhance melanin synthesis of *P. penguin* via *Mitf*-*Tyr*-melanin pathway.

Key words: Valproic acid; *Pteria penguin*; Melanin; Tyrosinase; *Mitf*; Toxicity