

黑色素生成信号通路研究进展

赵美娟^{1,2}, 卢晶晶^{1,2}, 倪辉^{1,2}, 姜泽东^{1,2}, 王力^{1,2}

1 集美大学 食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021

2 福建省食品微生物与酶工程重点实验室, 福建 厦门 361021

赵美娟, 卢晶晶, 倪辉, 等. 黑色素生成信号通路研究进展. 生物工程学报, 2019, 35(9): 1633-1642.

Zhao MJ, Hu JJ, Ni H, et al. Research progress in melanogenesis signaling pathway. Chin J Biotech, 2019, 35(9): 1633-1642.

摘要: 黑色素生成是一种在黑色素细胞中产生黑色素的生物合成途径, 涉及一系列复杂的酶催化和化学催化反应。主要有 5 条信号通路参与调控, 其中小眼相关转录因子 (Microphthalmia-associated transcription factor, MITF) 是各个通路的重要靶标。此外, 许多细胞因子也参与调控黑色素生成, 在黑色素细胞的发育、增殖、分化、迁移过程中发挥重要作用。结合课题组研究成果, 发现多金属氧酸盐可作为一种潜在的黑色素抑制剂用于切断黑色素生成途径。因此, 文中对黑色素生成信号通路作用机制进行综述, 并简单介绍已报道的相关通路调控因子, 以期有助于多金属氧酸盐在黑色素生成途径中的应用研究。

关键词: 黑色素生成, 信号通路, 小眼相关转录因子

Research progress in melanogenesis signaling pathway

Meijuan Zhao^{1,2}, Jingjing Hu^{1,2}, Hui Ni^{1,2}, Zedong Jiang^{1,2}, and Li Wang^{1,2}

1 College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, Fujian, China

2 Fujian Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering, Xiamen 361021, Fujian, China

Abstract: Melanogenesis is a biosynthetic pathway to produce melanin pigment in melanocyte, involving a series of intricate enzymatic and chemical catalyzed reactions. Melanogenesis involves five signaling pathways that converge on microphthalmia-associated transcription factor. In addition, many cytokines, involved in the regulation of melanogenesis, play an important role in the development, proliferation, differentiation and migration of melanocytes. Polyoxometalate can be used as a potential inhibitor of melanin production. Hence, this paper reviews the signaling pathways of melanogenesis and their regulatory mechanism, to apply polyoxometalates in the melanin production pathway, and briefly introduces the regulatory factors of related pathways.

Keywords: melanogenesis, signal pathway, microphthalmia-associated transcription factor

Received: March 4, 2019; **Accepted:** June 24, 2019

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 21871110), Fujian Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering (No. B19097-12).

Corresponding author: Li Wang. Tel: +86-592-6181774; E-mail: wanglimerry@jmu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 21871110), 福建省食品微生物与酶工程重点实验室项目 (No. B19097-12) 资助。

网络出版时间: 2019-07-19

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20190718.1619.002.html>

类胡萝卜素、血红蛋白、氧合血红蛋白、黑色素, 人体内这 4 种发色团可决定皮肤颜色, 其中黑色素是最主要的成分^[1]。黑素体是黑色素生成的场所, 位于表皮基层黑色素细胞内, 黑色素生成后从黑色素细胞的树突尖传递至角质形成细胞, 该过程为黑色素生成过程^[2]。人的头发、眼睛、皮肤的颜色不仅依赖于黑色素的产生, 黑色素的含量、分布以及类型也对其有影响, 此外, 黑色素细胞的数量、树突程度、相关酶的活性和黑素体的转移均会影响色素沉着^[3]。黑色素可以保护皮肤免受紫外辐射、氧化压力等环境污染因素带来的有害影响, 但是黑色素的过量累积会导致许多皮肤病的出现, 例如雀斑、老年斑、黑皮病等。为了有效控制色素沉着, 目前已经发现许多黑色素抑制剂并应用于化妆品以及皮肤病学治疗药物, 本课题组长期致力于研究多金属氧酸盐对酪氨酸酶的抑制作用, 但是具体的抑制机理尚不明确。本文综述了黑色素生成的相关信号通路的研究进展, 并结合课题组的研究, 以期对多金属氧酸盐调控黑色素生成机制的进一步研究提供理论基础。

1 黑色素的合成

黑素体是黑色素合成的特定场所, 位于黑色素细胞内, 黑色素细胞位于人体表皮基层, 细胞表面有许多称为 dendrites 树突的突起。当黑色素细胞被紫外辐射等刺激时, 黑色素细胞就在黑素体内合成黑色素, 并通过树突传递至角质形成细胞。黑色素包括真黑素和褐黑素, 前者是一种棕黑色或深色不溶性聚合物, 后者是一种红黄色可溶性聚合物^[4-5]。黑色素合成过程极其复杂, 主要涉及酪氨酸酶基因家族中的 3 种酶, 即酪氨酸酶 (Tyrosinase, TYR)、酪氨酸酶相关蛋白 1 (Tyrosinase-related protein-1, TRP-1)、酪氨酸酶相关蛋白 2 (Tyrosinase-related protein-2, TRP-2), 这 3 种酶都是与膜结合的糖蛋白, 其中酪氨酸酶

是该反应的关键酶^[4]。TYR 参与了 2 种黑色素生成过程, 而 TRP-1、TRP-2 在真黑素合成过程中发挥重要作用, TRP-1 具有 5,6-二羟基吲哚-2-羧酸(DHICA)氧化酶活性, TRP-2 可以快速地将多巴色素转化为 DHICA^[6]。

黑色素合成主要经历两个阶段, 第一阶段是酪氨酸在酪氨酸酶的催化作用下生成 L-二羟基苯丙氨酸多巴 (L-dihydroxyphenylalanine, L-DOPA), 并在酪氨酸酶作用下进一步生成多巴醌 (Dopaquinone, DQ), 或者是酪氨酸酶催化酪氨酸直接氧化生成多巴醌。该阶段的反应是黑色素合成的关键步骤。多巴醌作为黑色素合成底物进入第二阶段反应。第二阶段又分为 3 个部分, 当半胱氨酸或谷胱甘肽存在时, 多巴醌与其反应生成半胱氨酰多巴或谷胱甘肽多巴, 之后进一步氧化聚合生成褐黑素; 当二者不存在时, 多巴醌自身环化形成多巴色素, 若多巴色素自发脱羧, 形成 5,6-二羟基吲哚 (DHI), 在酪氨酸酶作用下进一步氧化聚合生成黑色素 (DHI 黑色素); 若多巴色素在 TRP-2 作用下发生互变异构现象转化成 DHICA, 则在 TRP-1 作用下生成黑色素 (DHICA 黑色素)^[7]。

2 黑色素形成的信号通路的调控

MITF (Microphthalmia-associated transcription factor) 是一种碱性螺旋-环-螺旋亮氨酸拉链转录因子, 可以同启动子区域的 M-box 基序(TYR、TRP-1、TRP-2 在启动子区域共享的一个高度保守序列, 即 5'-AGTCATGTGCT-3') 结合之后调节 TYR、TRP-1、TRP-2 的表达, 从而调控黑色素的生成^[3]。MITF 是多种信号传导路径的最终靶向目标, 是黑色素生成的主要调节因子。黑色素生成涉及五大主要信号通路, 除此之外还有一些比较罕见的信号通路和其他途径, 以下将对其进行概述。文中将 5 条主要的信号通路汇总为一个整体, 绘制的黑色素合成途径如图 1 所示。

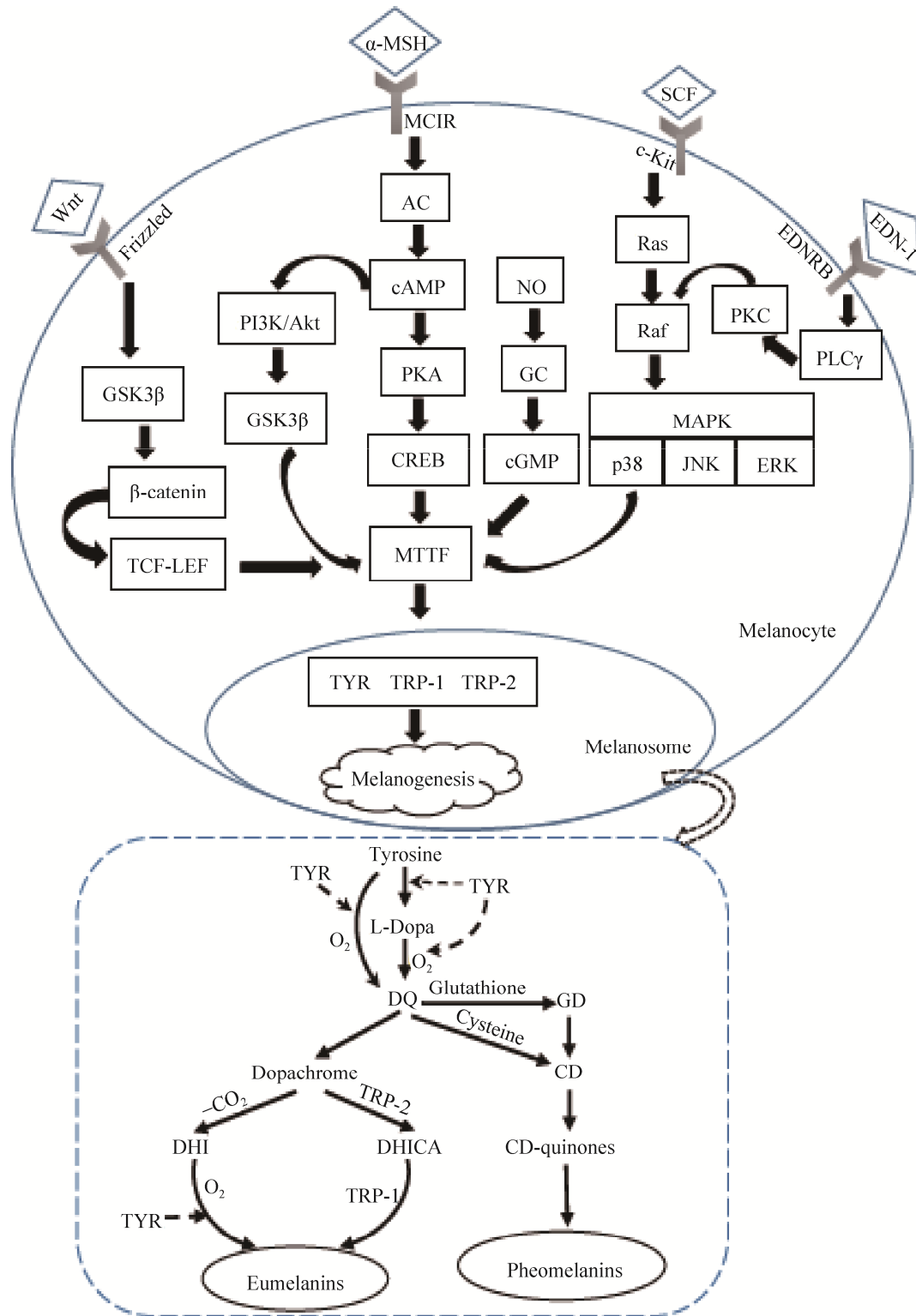


图1 黑色素合成途径

Fig. 1 The pathway of melanin synthesis. TYR: tyrosinase; TRP-1: tyrosinase-related protein-1; TRP-2: tyrosinase-related protein-2; L-Dopa: L-3,4-dihydroxyphenylalanine; DQ: dopaquinone; DHICA: 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid; DHI: 5,6-dihydroxyindole; GD: glutathionyl dopa; CD: Cysteinyl dopa.

2.1 MC1R/ α -MSH 信号通路

这个信号通路也称为 cAMP 依赖性信号通路,主要是通过环磷酸腺苷 (cAMP)/蛋白激酶 A (PKA) 因子进行调控。黑皮质素 1 受体 (MC1R) 是一种七跨膜受体,可与 Gas 蛋白偶联刺激腺苷酸环化酶 (AC),随后产生 cAMP^[8]。PKA 是 cAMP 的关键受体之一, cAMP 是细胞内信号激活 PKA 的重要介质。在 cAMP 不存在的情况下, PKA 全酶处于无活性状态,其两个催化亚基与两个调节亚基结合, PKA 的调节亚基有 4 种同种型 (即 RI α 、RI β 、RII α 、RII β),催化亚基有 3 种同种型 (即 C α 、C β 、C γ)。cAMP 结合 PKA 的调节亚基并诱导催化亚基与全酶复合物的解离,并且释放的催化亚基被激活,最终易位至细胞核并在 Ser133 处磷酸化激活 cAMP 反应元件结合蛋白 (CREB)从而调节黑色素的合成,据报道, Ser133 和 Ser129 被认定为 CREB 活化的主要磷酸位点^[9]。

太阳光的紫外波长分为 3 组: UVA (320–400 nm)、UVB (280–320 nm)、UVC (200–280 nm),其中 UVC 被大气中的臭氧层吸收, UVB 辐射通过角质形成细胞和黑色素细胞的相互作用诱导黑色素的生成^[10]。在哺乳动物中, UVB 辐射刺激 α -黑色素细胞刺激素 (α -MSH) 产生,随后 α -MSH 与黑色素细胞表面的 MC1R 结合激活 AC,从而加速细胞内 cAMP 浓度增加, cAMP 作为第二信使进一步激活 PKA。PKA 转移至细胞核,在 Ser133 处刺激 CREB 磷酸化并结合 CREB 结合蛋白 (CBP),增加 MITF 的表达,促进黑色素生成相关酶 TYR、TRP-1、TRP-2 的表达进而调节黑色素的形成^[11-12]。

Lee 等报道, 4-羟基-3-甲氧基肉桂醛 (4H3MC) 可以作用于 cAMP 与 PKA 的结合位点,直接抑制 cAMP 诱导的 PKA 全酶的解离和活化进而抑制黑色素生成^[5]。G 蛋白偶联雌激素受体 (GPER) 是

调节生理和紫外线诱导的黑色素生成的重要因子,通过 cAMP-PKA 通路上调 TYR 和 MITF 的表达,促进黑色素生成^[13]。此外,甘露醇、白藜芦醇、dehydroglyasperin C^[2]、曲酸衍生物 KAD2^[14]、查尔酮-21^[15]等都可通过调控该通路来调节黑色素生成。

2.2 PI3K/Akt 信号通路

PKA 是主要的 cAMP 细胞内靶标,但是 cAMP 也可以通过 PKA 非依赖性机制调节黑色素生成。磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K) 是一种磷脂酰肌醇激酶,在肌醇环第 3 位羟基发生磷酸化作用,拥有磷脂酰肌醇激酶活性及丝氨酸/苏氨酸激酶活性。PI3K 的关键效应物之一是蛋白激酶 B (Akt),在外界信号及细胞内 cAMP 的刺激下, PI3K 被激活产生 3,4-二磷酸磷脂酰肌醇 (PI-3,4-P2) 和 3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇 (PI-3,4,5-P3) 这两种类脂产物,该产物与 Akt 结合并在 Akt 的 Thr308 和 Ser473 位点磷酸化进而激活 Akt^[16],其中 Ser473 位点的磷酸化作为 Akt 蛋白完全被激活的标志^[17]。活化的 Akt 在 Ser9 处磷酸化糖原合酶激酶 3 β (GSK3 β) 并促进其丧失活性, GSK3 β 活性的降低增强 MITF 与 M-box 的结合力。GSK3 β 既不调节 MITF 启动子的活性,也不调节 MITF 的内在转录活性,但是会与 MITF 协同刺激酪氨酸酶启动子, GSK3 β 使 MITF 的 Ser298 位点发生磷酸化作用,增强其与酪氨酸酶启动子的结合进而调控黑色素生成^[18]。

Ko 等报道称 Eupafolin 可抑制 Akt, 激活磷酸化 ERK 或 p38 MAPK 信号通路来抑制黑色素生成,它以浓度依赖性方式抑制细胞内 TYR、TRP-1、TRP-2 的合成,且研究表明, Akt 抑制剂与 Eupafolin 共同作用的抑制效果更好^[19]。白介素 10 (IL-10) 可激活 PI3K/Akt 途径和 JAK/Stat3 途径,前者激活经典 NF- κ B 途径并灭活 GSK-3 β ,进一步上调黑色素生成^[20]。没食子酸、橙皮苷、植物

鞘氨醇等通过该通路调控黑色素生成过程也有相关报道。

2.3 MAPK 信号通路

在表皮中,角质形成细胞响应包括衰老在内的各种刺激分泌大量细胞因子,称为干细胞因子(SCF),其在调节人黑色素细胞的生命周期以及其他因素中起关键作用。MAPK 信号途径中的激酶 MEK 和 ERK 涉及黑色素细胞受体的激活,配体通过与受体细胞外结构域结合激活复杂机制(Ras-Raf-MEK-ERK),从而导致 MITF 上调^[21]。当信号配体 SCF 与细胞表面上的 c-Kit 受体结合时,信号开始,其中 Ras 激活 B-raf 激酶,然后激活丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)级联。MAPK 家族蛋白,包括细胞外信号调节激酶 1/2(ERK1/2), c-Jun 氨基末端激酶(JNK)和 p38。ERK 或 JNK 活化(即磷酸化)触发 MITF 的表达,导致其降解并随后下调黑色素生成。与该通路相反,ERK 的激活可导致 CREB 的磷酸化,磷酸化的 CREB 与 MITF 启动子区域的 CRE 共有基序结合以上调表达 MITF 基因。p38 的磷酸化激活 MITF 表达,反过来上调黑色素生成相关蛋白,进而影响黑色素合成^[11]。细胞内的 cAMP 含量升高也会激活 ERK,导致 MITF 中 Ser73 位点直接磷酸化,或者通过激活核糖体 S6 激酶(RSK)间接磷酸化 MITF 中 Ser409 位点,导致磷酸化 MITF 被蛋白酶体降解^[9]。

另外一个激活 MAPK 通路传导的途径是内皮素(EDN)与其受体的相互作用。EDN 与其受体 EDNRB(一种 G 蛋白偶联受体)的相互作用是角质形成细胞和黑色素细胞之间关键的旁分泌相互作用之一^[22]。在内皮素肽中,EDN-1(血管收缩肽)被认为是重要成员,首先从血管内皮细胞中分离出来。EDN-1 与其受体结合可介导黑色素细胞增殖、黑色素生成、迁移等过程^[23]。此外,最近的研究结果表明,由 EDN-1 引发的黑色素生成伴随着 MITF 介导的糖蛋白跨膜途径,该蛋白为非转

移性黑色素瘤蛋白 b(GPNMB),这是黑素体形成的关键因素。EDN-1 与 EDNRB 结合并触发多磷酸肌醇的水解,其通过活化的磷脂酶 C γ 的作用产生肌醇三磷酸(IP3)和二酰甘油(DAG),其分别聚集细胞内 Ca²⁺并激活 PKC。活化的 PKC 直接磷酸化 RAF 或 RAF-1,进而导致 MAPK 级联的激活^[5,22]。

EDN-1 和 SCF 之间存在细胞内信号的相互作用,它通过 EDN-1 诱导的 PKC 激活和 SCF 诱导的 c-kit 自身磷酸化(激活)之间的串扰协同刺激 DNA 和黑色素合成^[24]。该过程启动 MAPK 级联以进一步作用于黑色素生成的下游途径。

目前已有许多抑制剂被证实是通过调控该通路来影响黑色素生成的,例如,IBMX 以计量依赖性方式减弱 MEK/ERK 和 PI3K/Akt 信号分子磷酸化,下调 TYR、TRP-1、TRP-2、MITF 及其上游转录因子 CREB^[25]。研究表明,白藜芦醇处理 HT-144 细胞可使其以浓度依赖性抑制其增殖,通过调控 MEK/ERK 通路加强 CREB 的表达^[26]。槲皮素-3-O- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 6)- β -D-吡喃葡萄糖苷(QCGG)通过细胞外信号相关蛋白激酶(ERK)激活,降低酪氨酸和酪氨酸相关蛋白的表达,随后下调 CREB、p38 和 MITF,从而减少黑色素合成^[11]等。

2.4 Wnt/ β -catenin 信号通路

Wnts 是富含半胱氨酸的分泌型糖蛋白,在胚胎发育过程中具有重要功能,特别是神经嵴细胞。Wnt 信号通路影响细胞命运、增殖、分化及迁移^[27]。Wnt 蛋白调节的信号通路包括经典通路(β -catenin 依赖性通路)和非经典通路(β -catenin 非依赖性通路)。Wnt 蛋白与 Frizzled 家族的七跨膜受体及低密度脂蛋白受体相关蛋白 5/6(LRP-5/6)结合,进而激活 Wnt 信号传导途径^[28]。Wnt1/3A/7/8/8B 等配体可激活经典 Wnt 信号传导,Wnt4/5A/5B/11 等配体可激活非经典路径。非经典信号传导具有

多样性,以黑色素瘤细胞为例,Wnt5A和Wnt3A配体竞争性结合Fzd2受体,进而阻止LRP6和 β -catenin的积累^[29]。 Ca^{2+} 、平面细胞极性通路等途径也可介导非经典通路。经典途径依赖于 β -catenin,在Wnt经典途径未激活时, β -catenin被Gsk3 β 在Tyr216磷酸化而使其泛素化降解。Wnt蛋白质与G蛋白偶联受体(Frizzled)结合激活经典途径,导致GSK3 β 失活(在Ser21/9磷酸化),随后 β -catenin在细胞质中积累并易位至细胞核。在细胞核内, β -catenin与淋巴增强因子-T细胞因子(LET-TCF)形成复合物增加MITF基因的表达,核 β -catenin水平升高可增加MITF的表达,从而增加黑色素瘤细胞的存活和增殖,刺激黑色素生成^[27,30]。

P21激活的激酶4(PAK4)是CREB的关键调节因子,作用于MITF上游,激活的PAK4通过两种不同的信号途径促进黑色素生成:CREB/MITF/酪氨酸酶和 β -catenin/MITF信号途径。PAK4可通过双重机制稳定 β -catenin,一是直接增强Ser675位点的 β -catenin磷酸化,抑制其降解;二是在S33/37阻断 β -catenin的磷酸化,这是泛素化依赖性降解的指标^[10]。柚皮素在体外系统中没有直接调节酪氨酸酶活性,但是在B16-F10细胞中可通过激活PI3K/Akt或Wnt/ β -catenin信号通路,刺激其细胞内酪氨酸酶活性^[27]。凡是对该通路中所涉及因子有影响的物质均可能会影响其信号传导,从而起到调节黑色素生成的作用。

2.5 NO信号通路

NO是一种可扩散的自由基,在多种细胞和组织中具有多效的生物调节作用。黑色素细胞和角质形成细胞响应炎性细胞因子产生NO,角质形成细胞中NO的产生是由紫外辐射引起的。通过激活第二信使,NO增加酪氨酸酶活性和黑色素生成,因此是影响黑色素生成的自分泌和旁分

泌分子^[31]。可溶性鸟苷酸环化酶(sGC)是NO的主要受体,一旦由角质形成细胞产生,NO直接与含有血红素的蛋白质sGC结合使其活性增加,进而催化GTP转化为细胞内第二信使环磷酸鸟苷(cGMP),因此导致MITF表达和黑色素生成^[32]。而且细胞内cGMP水平还可影响蛋白激酶G(PKG)的活性,这种酶磷酸化可激活另一种促进酪氨酸酶表达的转录因子——蛋白1,进而调节黑色素的生成^[4]。

通过cGMP途径增强酪氨酸酶基因表达可能是NO诱导的黑色素生成的主要机制。但它还可能参与酪氨酸酶mRNA的诱导,在氧气存在时NO与黑色素相关的代谢物DHICA反应,导致黑色素样色素的沉积。除此之外,NO还对其他信号通路有影响,有研究表明,NO途径可提高MC1R的表达并刺激 α -MSH的分泌以增强黑色素生成的 α -MSH途径^[33]。

2.6 黑素体转移机制

黑素体形成是黑化过程中的关键步骤,但黑素体必须从黑色素细胞转移到角质形成细胞才能促进黑色素的生成。蛋白酶激活受体(PAR)-2通过增加角质形成细胞对黑素体的吞噬作用诱导黑素体转移,紫外辐射可刺激PAR-2表达,进而诱导黑素体转移^[34]。丝氨酸蛋白酶的抑制已经显示导致角质形成细胞中蛋白酶激活受体2的活化受损,进而导致黑色素细胞内黑素体的积累。这种受体的抑制阻断了这些细胞之间的黑素体转移,因此也阻止了这种细胞的分散。这表明通过抑制角质形成细胞受体-蛋白酶激活受体2是一种调节色素沉着的潜在机制^[35]。

在体外模型中还证明,黑色素细胞和角质形成细胞膜上的糖基化残基对于受体介导的内吞作用是关键的,因此促进黑素体转移。凝集素和新糖蛋白也被证明可以抑制黑素体转移^[36]。

2.7 调节黑色素生成的其他途径

上述的途径是调控黑色素生成的主要信号通路,此外还有其他途径也可参与黑色素生成,例如, MHY884 是一种酪氨酸酶抑制剂,可在 Thr23 位点抑制 Akt 活化及 Akt 介导的 IKK α 磷酸化,减弱 UVB 诱导的氧化应激,导致 NF- κ B 活性降低,进而调控黑色素生成^[37]。Incontinentia pigmenti (IP) 和 Ectodermal dysplasia (ED) 在 NF- κ B 信号传导中表达缺陷而使皮肤色素沉着异常。此外,一些细胞因子在黑色素细胞增殖、分化、黑色素生成中发挥重要作用,比如,转化生长因子 β (TGF- β),一种角质形成细胞衍生因子,在没有紫外线照射时,通过诱导 Smad 信号而抑制 Pax3 (The paired box 3, 配对盒 3) 的褪黑细胞分化;紫外线照射激活 Jun N-末端激酶激活蛋白 1 通路而抑制 TGF- β 在角质形成细胞内的产量,最终导致黑色素的生成。骨形态遗传细胞 (BMP) 是 TGF- β 家族的重要成员,其中, BMP2、BMP6

可通过调节酪氨酸酶而增加黑色素生成, BMP4 则抑制黑色素生成。基本成纤维细胞生长因子 (bFGF)、肝细胞生长因子 (HGF)、白血病抑制因子 (LIF) 等细胞因子也会参与调控黑色素生成^[38]。Pax3、Sox10 可通过激活 MITF 的表达而调节黑色素生成。Omeprazole 通过抑制 ATP7A 蛋白的金属化来增加其降解,从而抑制新合成的 TYR 活性。咖啡酸苯乙酯 (CAPEE) 可抑制 MITF 与 M-box 的结合而降低相关蛋白 TYR、TRP-1、TRP-2 的表达,但不会影响 MITF 的表达^[11]。

3 多金属氧酸盐对酪氨酸酶的抑制

集美大学王力教授所在的多酸课题组致力于多酸在酶学领域的研究,近年来,主要围绕 Keggin 型和 Dawson 型两种结构的多酸,利用酶动力学分析研究其对酪氨酸酶的抑制类型及抑制机理。研究表明,两种结构的多酸对酪氨酸酶均有抑制作用。研究成果如表 1^[39]所示。Xing 等^[42]通过细

表 1 合成化合物对酪氨酸酶的抑制效果^[39]

Table 1 Inhibition effect of synthetic compounds on tyrosinase

Compound	Structure	IC ₅₀ (mmol/L)	Inhibition type	Inhibition mechanism	Inhibition constant		Reference
					K _I (mmol/L)	K _{IS} (mmol/L)	
(HGly) ₃ PW ₁₂ O ₄₀	Keggin	1.55	Uncompetitive	Reversible		0.046	[40]
(HGly) ₄ SiW ₁₂ O ₄₀	Keggin	1.39	Noncompetitive	Reversible	2.17	2.17	[40]
Na ₆ PMo ₁₁ FeO ₄₀	Keggin	0.461	Noncompetitive	Reversible	0.47	0.47	[41]
Na ₇ PMo ₁₁ CuO ₄₀	Keggin	0.48	Competitive	Reversible	0.073 6		[42]
H ₃ PW ₁₂ O ₄₀	Keggin	1.57	Hybrid	Reversible	0.34	0.43	[43]
H ₄ SiW ₁₂ O ₄₀	Keggin	2.31	Competitive	Reversible	0.59		[43]
α -Na ₈ SiW ₁₁ CoO ₄₀	Keggin	0.239	Competitive	Irreversible	0.164		[44]
Na ₄ PMo ₁₁ VO ₄₀	Keggin	0.522	Competitive	Reversible	2.629		[45]
(HGly) ₄ PMo ₁₁ VO ₄₀	Keggin	0.447	Competitive	Irreversible	0.503		[45]
α -1,2,3-K ₆ H[SiW ₉ V ₃ O ₄₀]	Keggin	0.684 1	Hybrid	Reversible	4.22	2.39	[46]
H ₈ [P ₂ Mo ₁₇ Co(OH ₂)O ₆₁]	Dawson	0.434	Competitive	Reversible	0.216 7		[47]
H ₈ [P ₂ Mo ₁₇ Ni(OH ₂)O ₆₁]	Dawson	0.466 5	Competitive	Reversible	0.220 4		[47]
H ₇ [P ₂ Mo ₁₇ VO ₆₂]	Dawson	0.409	Competitive	Reversible	0.234		[48]
H ₈ [P ₂ Mo ₁₆ V ₂ O ₆₂]	Dawson	0.386	Competitive	Reversible	0.391		[48]
H ₉ [P ₂ Mo ₁₅ V ₃ O ₆₂]	Dawson	0.386	Competitive	Reversible	0.249		[48]
H ₈ [P ₂ Mo ₁₇ Zn(OH ₂)O ₆₁]	Dawson	0.346 2	Competitive	Reversible	0.106 8		[49]
H ₈ [P ₂ Mo ₁₇ Cu(OH ₂)O ₆₁]	Dawson	0.361 5	Competitive	Reversible	0.068 2		[49]
H ₇ [P ₂ Mo ₁₇ Fe(OH ₂)O ₆₁]	Dawson	0.383 1	Competitive	Reversible	0.057 2		[49]
H ₆ [P ₂ Mo ₁₈ O ₆₂]	Dawson	0.482	Competitive	Reversible	0.212		[50]
H ₈ [P ₂ Mo ₁₇ Cr(OH ₂)O ₆₁]	Dawson	0.503	Competitive	Reversible	0.249		[50]
α/β -K ₆ P ₂ W ₁₈ O ₆₂ ·10H ₂ O	Dawson	0.64	Noncompetitive	Irreversible			[51]

胞实验发现, Keggin 型多酸 $\text{Na}_7\text{PMo}_{11}\text{CuO}_{40}$ 虽然在低浓度下对酪氨酸酶的抑制效果不显著, 但是细胞内黑色素含量却显著降低, 且细胞毒性较低, 说明该化合物可作为一种潜在的黑色素生成抑制剂, 并且可能不是通过直接抑制酪氨酸酶活性而起作用的, 但其中涉及的具体机制尚待研究。随着课题组在多酸作为酶抑制剂用于调控黑色素生成途径的深入研究, 未来在基因调控、信号通路方面研究将成为新的方向。

4 总结与展望

黑色素可对皮肤起到保护作用, 过少防护作用减弱, 过多则引发许多皮肤疾病, 近年来, 调控黑色素逐渐成为研究热点。目前已经发现许多物质可调节黑色素的生成, 但是大部分物质具有细胞毒性, 无法应用于化妆品、药品中, 且作用效果不显著。因此, 研究开发高效、低毒性、副作用小的黑色素调控剂成为未来的研究趋势。结合课题组的研究成果, 发现多金属氧酸盐对酪氨酸酶具有显著的抑制效果, 且根据 Xing 等的细胞实验, 发现多酸可作为一种潜在的黑色素生成抑制剂^[42], 但调控黑色素生成的具体机制尚未研究, 因此, 课题组接下来将会从信号通路、基因调控方面深入研究多金属氧酸盐对黑色素生成的调节机制, 以期研制新型黑色素生成调控剂并可应用于化妆品、药品中, 为皮肤美白、皮肤病学治疗提供新方向。

REFERENCES

- [1] Jung HG, Kim HH, Paul S, et al. Quercetin-3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside suppresses melanin synthesis by augmenting p38 MAPK and CREB signaling pathways and subsequent cAMP down-regulation in murine melanoma cells. *Saudi J Bio Sci*, 2015, 22(6): 706–713.
- [2] Lim JW, Ha JH, Jeong YJ, et al. Anti-melanogenesis effect of dehydroglyasperin C through the downregulation of MITF *via* the reduction of intracellular cAMP and acceleration of ERK activation in B16F1 melanoma cells. *Pharmacol Rep*, 2018, 70(5): 930–935.
- [3] Hwang YS, Kim YJ, Kim MO, et al. Cannabidiol upregulates melanogenesis through CB1 dependent pathway by activating p38 MAPK and p42/44 MAPK. *Chem-Biol Int*, 2017, 273: 107–114.
- [4] Song KK. Effects of inhibitors on tyrosinase and their regulation on melanogenesis[D]. Xiamen: Xiamen University, 2007 (in Chinese).
宋康康. 抑制剂对酪氨酸酶的效应及其对黑色素生成调控的研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2007.
- [5] Pillaiyar T, Manickam M, Jung SH. Recent development of signaling pathways inhibitors of melanogenesis. *Cell Signal*, 2017, 40: 99–115.
- [6] Jang EJ, Shin Y, Park HJ, et al. Anti-melanogenic activity of phytosphingosine *via* the modulation of the microphthalmia-associated transcription factor signaling pathway. *J Dermatol Sci*, 2017, 87(1): 19–28.
- [7] Zhuang JX. Transcriptional regulation of tyrosinase by α -synuclein and inhibitors[D]. Xiamen: Xiamen University, 2009 (in Chinese).
庄江兴. α -synuclein 蛋白及抑制剂对酪氨酸酶的调控机制[D]. 厦门: 厦门大学, 2009.
- [8] Newton RA, Roberts DW, Leonard JH, et al. Human melanocytes expressing MC1R variant alleles show impaired activation of multiple signaling pathways. *Peptides*, 2007, 28(12): 2387–2396.
- [9] Azam MS, Kwon M, Choi J, et al. Sargaquinoic acid ameliorates hyperpigmentation through cAMP and ERK mediated downregulation of MITF in α -MSH-stimulated B16F10 cells. *Biomed Pharm*, 2018, 104: 582–589.
- [10] Yun CY, You ST, Kim JH, et al. p21-Activated Kinase 4 critically regulates melanogenesis *via* activation of the CREB/MITF and β -catenin/MITF pathways. *J Invest Dermatol*, 2015, 135(5): 1385–1394.
- [11] Pillaiyar T, Manickam M, Jung SH. Downregulation of melanogenesis: drug discovery and therapeutic options. *Drug Discov Today*, 2017, 22(2): 282–298.
- [12] Jung E, Kim JH, Kim MO, et al. Afzelin positively regulates melanogenesis through the p38 MAPK pathway. *Chem-Biol Int*, 2016, 254: 167–172.
- [13] Sun M, Xie HF, Tang Y, et al. G protein-coupled estrogen receptor enhances melanogenesis *via*

- cAMP-protein kinase (PKA) by upregulating microphthalmia-related transcription factor-tyrosinase in melanoma. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2017, 165: 236–246.
- [14] Chen YM, Su WC, Li C, et al. Anti-melanogenesis of novel kojic acid derivatives in B16F10 cells and zebrafish. *Int J Biol Macromol*, 2019, 123: 723–731.
- [15] Kim BH, Park KC, Park JH, et al. Inhibition of tyrosinase activity and melanin production by the chalcone derivative 1-(2-cyclohexylmethoxy-6-hydroxy-phenyl)-3-(4-hydroxymethyl-phenyl)-propane. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 480(4): 658–664.
- [16] Shi Y, Feng XL, Xie LF, et al. Research progress on PI3K/AKT signal transduction pathway in tumors. *Chem Life*, 2018, 38(3): 421–426 (in Chinese).
施银, 冯晓兰, 谢李芬, 等. PI3K/AKT 信号通路在肿瘤中的研究进展. *生命的化学*, 2018, 38(3): 421–426.
- [17] Huang W. The research on the role of PI3K/Akt signal transduction pathway in adjustment of TGF-beta1 expression and cell vitality induced by endothelin in malignant melanoma *in vitro*[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2008 (in Chinese).
黄巍. 内皮素激活 PI3K/Akt 信号通路对恶性黑色素瘤细胞体外生长活性及 TGF-beta1 表达调节的实验研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2008.
- [18] Khaled M, Larriere L, Bille K, et al. Glycogen synthase kinase 3 β is activated by cAMP and plays an active role in the regulation of melanogenesis. *J Biol Chem*, 2002, 277(37): 33690–33697.
- [19] Ko HH, Chiang YC, Tsai MH, et al. Eupafolin, a skin whitening flavonoid isolated from *Phylanodiflora*, downregulated melanogenesis: Role of MAPK and Akt pathways. *J Ethnopharmacol*, 2014, 151(1): 386–393.
- [20] Zhou J, Ling JJ, Song J, et al. Interleukin 10 protects primary melanocyte by activation of Stat-3 and PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathways. *Cytokine*, 2016, 83: 275–281.
- [21] Wang YJ, Viennet C, Robin S, et al. Precise role of dermal fibroblasts on melanocyte pigmentation. *J Dermatol Sci*, 2017, 88(2): 159–166.
- [22] Tagashira H, Miyamoto A, Kitamura S, et al. UVB stimulates the expression of endothelin B receptor in human melanocytes *via* a sequential activation of the p38/MSK1/CREB/MITF pathway which can be interrupted by a French Maritime Pine Bark Extract through a direct inactivation of MSK1. *PLoS ONE*, 2015, 10(6): e0128678.
- [23] Hyter S, Coleman DJ, Ganguli-Indra G, et al. Endothelin-1 is a transcriptional target of p53 in epidermal keratinocytes and regulates Ultraviolet induced melanocyte homeostasis. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2013, 26(2): 247–258.
- [24] Niwano T, Terazawa S, Sato Y, et al. Glucosamine abrogates the stem cell factor + endothelin-1-induced stimulation of melanogenesis *via* a deficiency in MITF expression due to the proteolytic degradation of CREB in human melanocytes. *Arch Dermatol Res*, 2018, 310(8): 625–637.
- [25] Jin KS, Oh YN, Hyun SK, et al. Betulinic acid isolated from *Vitis amurensis* root inhibits 3-isobutyl-1-methylxanthine induced melanogenesis *via* the regulation of MEK/ERK and PI3K/Akt pathways in B16F10 cells. *Food Chem Toxicol*, 2014, 68: 38–43.
- [26] Lei MJ, Dong Y, Sun CX, et al. Resveratrol inhibits proliferation, promotes differentiation and melanogenesis in HT-144 melanoma cells through inhibition of MEK/ERK kinase pathway. *Microb Pathogenesis*, 2017, 111: 410–413.
- [27] Huang YC, Yang CH, Chiou YL. Citrus flavanone naringenin enhances melanogenesis through the activation of Wnt/ β -catenin signalling in mouse melanoma cells. *Phytomedicine*, 2011, 18(14): 1244–1249.
- [28] Li J, Ji L, Chen JP, et al. Wnt/ β -catenin signaling pathway in skin carcinogenesis and therapy. *BioMed Res Int*, 2015, 2015: 964842.
- [29] Webster MR, Kugel III CH, Weeraratna AT. The wnts of change: how wnts regulate phenotype switching in melanoma. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2015, 1856(2): 244–251.
- [30] Guo HY, Yang K, Deng F, et al. Wnt3a inhibits proliferation but promotes melanogenesis of melanoma cells. *Int J Mol Med*, 2012, 30(3): 636–642.
- [31] Park HY, Kosmadaki M, Yaar M, et al. Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66(9): 1493–1506.
- [32] Wobst J, Schunkert H, Kessler T. Genetic alterations in the NO-cGMP pathway and cardiovascular risk. *Nitric Oxide*, 2018, 76: 105–112.
- [33] Dong YJ, Cao J, Wang HD, et al. Nitric oxide enhances the sensitivity of alpaca melanocytes to respond to α -melanocyte-stimulating hormone by up-regulating melanocortin-1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 396(4): 849–853.

- [34] Enomoto A, Yoshihisa Y, Yamakoshi T, et al. UV-B radiation induces macrophage migration inhibitory factor-mediated melanogenesis through activation of protease-activated receptor-2 and stem cell factor in keratinocytes. *Am J Pathol*, 2011, 178(2): 679–687.
- [35] Seiberg M, Paine C, Sharlow E, et al. Inhibition of melanosome transfer results in skin lightening. *J Invest Dermatol*, 2000, 115(2): 162–167.
- [36] Park KC, Huh SY, Choi HR, et al. Biology of melanogenesis and the search for hypopigmenting agents. *Dermatol Sin*. 2010, 28(2): 53–58.
- [37] Choi YJ, Uehara Y, Park JY, et al. MHY884, a newly synthesized tyrosinase inhibitor, suppresses UVB-induced activation of NF- κ B signaling pathway through the downregulation of oxidative stress. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, 24(5): 1344–1348.
- [38] Yuan XH, Jin ZH. Paracrine regulation of melanogenesis. *British J Dermatol*, 2018, 178(3): 632–639.
- [39] Chi GX, Wang L. Research progress in the enzymology of polyoxometalates. *Food Ind*, 2019, 40(1): 277–282 (in Chinese).
迟国祥, 王力. 多金属氧酸盐的酶学研究进展. *食品工业*, 2019, 40(1): 277–282.
- [40] Xing R, Wang F, Zheng AP, et al. Biological evaluation of two Keggin-type polyoxometalates containing glycine as mushroom tyrosinase inhibitors. *Biotechnol Appl Biochem*, 2016, 63(5): 746–750.
- [41] Xing R, Zheng AP, Wang F, et al. Functionality study of $\text{Na}_6\text{PMo}_{11}\text{FeO}_{40}$ as a mushroom tyrosinase inhibitor. *Food Chem*, 2015, 175: 292–299.
- [42] Xing R, Wang F, Dong L, et al. Inhibitory effects of $\text{Na}_7\text{PMo}_{11}\text{CuO}_{40}$ on mushroom tyrosinase and melanin formation and its antimicrobial activities. *Food Chem*, 2016, 197: 205–211.
- [43] Zheng AP, Wang F, Xing R, et al. Functionality research of kegggin-type polyoxotungstate as potent mushroom tyrosinase inhibitors. *Chem J Chin Univ*, 2014, 35(3): 476–481 (in Chinese).
郑阿萍, 王芳, 邢蕊, 等. 两种多酸型酪氨酸酶抑制剂的性质研究. *高等学校化学学报*, 2014, 35(3): 476–481.
- [44] Chen BN, Xing R, Wang F, et al. Inhibitory effects of $\alpha\text{-Na}_8\text{SiW}_{11}\text{CoO}_{40}$ on tyrosinase and its application in controlling browning of fresh-cut apples. *Food Chem*, 2015, 188: 177–183.
- [45] Xing R, Zheng AP, Wang F, et al. The inhibitory mechanism research of vanadate-substituted polyoxometalates on tyrosinase. *J Mol Sci*, 2015, 31(5): 436–440 (in Chinese).
邢蕊, 郑阿萍, 王芳, 等. 钒取代的多酸盐对酪氨酸酶抑制机理的研究. *分子科学学报*, 2015, 31(5): 436–440.
- [46] Zheng AP, Chen BN, Chen FH, et al. Inhibition effect of vanadate-replaced polyoxometalates on mushroom tyrosinase. *Chin J Appl Chem*, 2013, 30(2): 165–170 (in Chinese).
郑阿萍, 陈丙年, 陈发河, 等. 钒取代硅钨氧酸盐对酪氨酸酶的抑制作用. *应用化学*, 2013, 30(2): 165–170.
- [47] Xie LF, Li LL, Chen BN, et al. Research of the inhibition activities of $\text{H}_8[\text{P}_2\text{Mo}_{17}\text{Co}(\text{OH}_2)\text{O}_{61}]$ and $\text{H}_8[\text{P}_2\text{Mo}_{17}\text{Ni}(\text{OH}_2)\text{O}_{61}]$ on enzyme. *J Mol Sci*, 2017, 33(5): 380–384 (in Chinese).
谢乐芳, 李莉莉, 陈丙年, 等. $\text{H}_8[\text{P}_2\text{Mo}_{17}\text{Co}(\text{OH}_2)\text{O}_{61}]$ 和 $\text{H}_8[\text{P}_2\text{Mo}_{17}\text{Ni}(\text{OH}_2)\text{O}_{61}]$ 的抑酶活性研究. *分子科学学报*, 2017, 33(5): 380–384.
- [48] Li LL, Deng YY, Xie LF, et al. Inhibitory effect of vanadium-substituted Dawson type phosphomolybdic acid on tyrosinase. *Chin J Appl Chem*, 2018, 35(4): 436–441 (in Chinese).
李莉莉, 邓阳阳, 谢乐芳, 等. 钒取代的 Dawson 型磷钼酸对酪氨酸酶的抑制作用. *应用化学*, 2018, 35(4): 436–441.
- [49] Xie LF, Li LL, Chen BN, et al. The inhibition of three kinds of Dawson-type heteropoly acids on tyrosinase. *Food Res Dev*, 2017, 38(19): 175–179 (in Chinese).
谢乐芳, 李莉莉, 陈丙年, 等. 3 种 Dawson 型杂多酸对酪氨酸酶的抑制作用. *食品研究与开发*, 2017, 38(19): 175–179.
- [50] Li LL, Chen BN, Deng YY, et al. Inhibitory effects of Dawson type polyoxometalates on tyrosinase. *Chin J Appl Chem*, 2017, 34(1): 83–89 (in Chinese).
李莉莉, 陈丙年, 邓阳阳, 等. Dawson 结构的多金属氧酸盐对酪氨酸酶的抑制作用. *应用化学*, 2017, 34(1): 83–89.
- [51] Hu XY, Chen BN, Wang L, et al. Inhibition of $\alpha/\beta\text{-K}_6\text{P}_2\text{W}_{18}\text{O}_{62}\cdot 10\text{H}_2\text{O}$ on the activity of mushroom tyrosinase and its antimicrobial effects. *Chem Res Chin Univ*, 2012, 28(5): 862–865.

(本文责编 郝丽芳)