

DOI:10.16781/j.0258-879x.2020.02.0161

· 论 著 ·

小分子化合物 I942 对黑素细胞黑素合成的促进作用

陈雅楠, 吴建华*

海军军医大学(第二军医大学)长海医院皮肤科, 上海 200433

[摘要] **目的** 研究小分子化合物 I942 对黑素细胞黑素合成的作用及相关机制。**方法** 采用多巴染色法对正常人永生黑素细胞系 PIG1 进行鉴定, 用不同浓度的小分子化合物 I942 处理黑素细胞 PIG1。用 CCK-8 法检测小分子化合物 I942 对细胞活力的影响, 用氢氧化钠裂解法检测细胞中黑素含量, 用多巴氧化反应法检测细胞中酪氨酸酶活性, 用 qRT-PCR 检测细胞中黑素合成相关蛋白小眼畸形相关转录因子 (*MITF*)、酪氨酸酶 (*TYR*)、酪氨酸酶相关蛋白 1 (*TRP1*)、酪氨酸酶相关蛋白 2 (*TRP2*) mRNA 的表达量, 用蛋白质印迹法检测 *TYR*、*TRP2* 的蛋白表达情况。**结果** 在 0~50 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度范围内, 小分子化合物 I942 对黑素细胞 PIG1 细胞活力的影响差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。小分子化合物 I942 可增加黑素细胞 PIG1 中黑素含量 ($P < 0.01$), 升高细胞内酪氨酸酶活性 ($P < 0.01$)。使用小分子化合物 I942 处理后, 黑素细胞 PIG1 中 *MITF*、*TYR*、*TRP1*、*TRP2* mRNA 表达均上升 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), *TYR*、*TRP2* 蛋白表达无明显变化。**结论** 小分子化合物 I942 在对细胞活力无明显抑制作用的基础上, 可通过升高酪氨酸酶活性增加黑素细胞 PIG1 中黑素含量, 同时黑素合成相关蛋白 *MITF*、*TYR*、*TRP1*、*TRP2* 的 mRNA 表达也升高。

[关键词] 白癜风; 黑素细胞; 黑素合成; cAMP 激活的交换蛋白

[中图分类号] R 758.41

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2020)02-0161-06

Promoting effect of small molecule compound I942 on melanogenesis in melanocytes

CHEN Ya-nan, WU Jian-hua*

Department of Dermatology, Changhai Hospital, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To explore the effect of small molecule compound I942 on melanogenesis in melanocytes and the possible mechanism. **Methods** Dopa staining was used to identify the PIG1 normal human immortal melanocyte cell line. PIG1 melanocytes were treated with different concentrations of small molecule compound I942. The effect of small molecule compound I942 on the cell viability of PIG1 melanocytes was detected by CCK-8 assay. The content of melanin was determined by sodium hydroxide solubilization. The activity of tyrosinase was detected by dopa oxidation. The mRNA expression of melanin synthesis-related proteins (microphthalmia-associated transcription factor [*MITF*], tyrosinase [*TYR*], tyrosinase-related protein 1 [*TRP1*] and tyrosinase-related protein 2 [*TRP2*]) were detected by qRT-PCR. The protein expression of *TYR* and *TRP2* was detected by Western blotting. **Results** There were no significant differences in the effect of small molecule compound I942 on the cell viability of PIG1 melanocytes at the concentration ranging from 0 $\mu\text{mol/L}$ to 50 $\mu\text{mol/L}$. Small molecule compound I942 was found to increase both melanin content and tyrosinase activity in PIG1 melanocytes (both $P < 0.01$). The mRNA levels of *MITF*, *TYR*, *TRP1* and *TRP2* were also increased after being treated with small molecule compound I942 ($P < 0.01$, $P < 0.05$). There were no significant changes in the expression of *TYR* or *TRP2* protein. **Conclusion** Small molecule compound I942 can increase the melanin content of PIG1 melanocytes by increasing the tyrosinase activity with no obvious inhibition of cell viability. The mRNA expression of melanin synthesis-related proteins (*MITF*, *TYR*, *TRP1* and *TRP2*) are also increased.

[Key words] vitiligo; melanocyte; melanogenesis; exchange protein activated by cAMP

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2020, 41(2): 161-166]

[收稿日期] 2019-09-09 **[接受日期]** 2020-01-07

[基金项目] 海军军医大学三年行动计划- II 类优势重点学科——白癜风临床诊疗中心建设项目. Supported by Type B Advanced and Essential Discipline in Three-Year Action Program of Naval Medical University—Issue of Constructing Clinical Center for Diagnosis and Treatment of Vitiligo.

[作者简介] 陈雅楠, 硕士生. E-mail: 424285846@qq.com

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-31161567, E-mail: wujh_ch@163.com

白癜风是由表皮黑素细胞减少或功能障碍引起的获得性色素脱失性皮肤病,其确切机制尚不清楚,目前研究较成熟的机制有自身免疫、氧化应激等^[1]。白癜风严重影响患者的社会生活及心理健康^[2]。黑素合成是黑素细胞的重要功能,皮肤黑素细胞合成黑素是皮肤光保护及色素性疾病发生的重要环节,促进皮肤黑素合成在白癜风治疗中具有重要意义。目前已知黑素合成主要受cAMP/蛋白激酶A (protein kinase A, PKA)、Wnt及MAPK等信号通路调节^[3-5],其中每条通路又与其他信号通路存在交叉。cAMP激活的交换蛋白(exchange protein activated by cAMP, EPAC)是20世纪90年代发现的与腺体分泌、细胞间黏附、伤口愈合、炎症、纤维化及肿瘤细胞迁移相关的明星蛋白^[6-9],其功能还在持续更新中。近年研究发现,EPAC上游接受cAMP的激活,下游与MAPK家族的多个成员相联系^[10],更有研究者将其比作cAMP通路及MAPK通路之间的桥梁^[11]。我们推测EPAC或许与黑素细胞黑素合成过程有关。小分子化合物I942属于非环状核苷酸类EPAC1激动剂,其结构如图1所示。我们前期研究表明,小分子化合物I942可通过cAMP/EPAC通路对皮肤细胞发挥作用,如促进成纤维细胞碱性成纤维细胞生长因子、表皮生长因子、IL-6及角质细胞角蛋白19的分泌并促进角质细胞迁移等(未发表资料),然而小分子化合物I942能否通过EPAC通路对黑素细胞产生作用尚未见报道。本研究中,我们在得出小分子化合物I942不影响正常人永生化黑素细胞系PIG1细胞活力的基础上,评估了小分子化合物I942对黑素细胞PIG1黑素含量及酪氨酸酶活性的影响,并对相关分子机制及信号通路进行了初步探索。

Compound ID	I942
Amount	150.8 mg
Molecular weight	369.435 0
Formula	C ₂₆ H ₁₉ NO ₃ S
Solubility	Soluble in DMSO
Stability	Recommend compound be stored in -20°C freezer

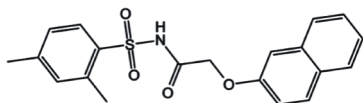


图1 小分子化合物I942化学结构式及化学性质
Fig 1 Chemical structural formula and chemical properties of small molecule compound I942

DMSO: Dimethyl sulfoxide

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器 DMEM培养液(美国Gibco公司), FBS(美国Gibco公司), 0.25%胰酶、多聚多巴(美国Sigma公司), 反转录试剂盒、荧光定量PCR试剂盒、荧光定量PCR仪(日本TaKaRa公司), RIPA裂解液(上海碧云天生物技术有限公司), PCR引物[生工生物工程(上海)股份有限公司], 兔抗人酪氨酸酶(tyrosinase, TYR)抗体、兔抗人酪氨酸酶相关蛋白(tyrosinase-related protein, TRP)2抗体(英国Abcam公司), GAPDH内参蛋白(美国Santa Cruz公司), 倒置显微镜(日本Olympus公司), CO₂培养箱(日本Sanyo公司), SDS-PAGE垂直电泳仪(美国BioRad公司), 人永生化黑素细胞系PIG1(苏州北纳创联生物技术有限公司)。小分子化合物I942由海军军医大学(第二军医大学)长海医院心胸外科陆方林教授友情赠送。

1.2 实验方法

1.2.1 黑素细胞系PIG1的体外培养及鉴定 采用含10% FBS和1%青霉素/链霉素的DMEM培养液在37℃、5% CO₂条件下培养细胞,用多巴染色法进行黑素细胞鉴定。取对数生长期细胞接种于6孔板,在37℃、5% CO₂条件下孵育48 h,用适量PBS洗涤细胞3次,每次10 min。每孔加入2 mL 0.1%多巴溶液,37℃恒温孵育,分别于1、2、3、4 h观察细胞染色情况,拍照并记录。

1.2.2 CCK-8细胞凋亡实验 取对数生长期的黑素细胞PIG1用0.25%胰酶消化约1 min后用含10% FBS的DMEM培养液中止消化,计数后调整细胞密度为1×10⁴/mL,将细胞悬液接种于96孔板,每孔200 μL,每组设3个复孔。过夜后,分别加入浓度为0、3.125、6.25、12.5、25、50 μmol/L的小分子化合物I942于培养液中并在培养箱内培养24、48、72 h。实验结束前4 h向每孔加入19 μL CCK-8试剂,继续培养3~4 h后用酶联免疫检测仪测定各组450 nm波长处的光密度(D)值。

1.2.3 黑素细胞PIG1中黑素含量测定 采用氢氧化钠裂解法检测细胞中黑素合成情况,具体方法参考文献[12]中的方法并加以改良。取对数生长期细胞,用0.25%胰酶消化1 min后用含10% FBS的DMEM培养液终止消化,调整细胞密度为1×10⁵/mL,然后将细胞悬液接种于6孔板,每孔2 mL。在37℃、5% CO₂条件下孵育8 h后,分别

换用含 5 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 小分子化合物 I942 的培养液继续培养 48 h, 吸净培养液并用 0.25% 胰酶消化 1~2 min, 终止消化后将细胞悬液转移至 EP 管中。1 420 \times g 离心 5 min, 小心吸出上清液, 每组加入 500 μL 1 mol/L NaOH 溶液 (含 10% DMSO) 重悬溶解细胞, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h 后用酶联免疫检测仪测定各组 450 nm 波长处的 D 值。黑素相对含量 (%) = (加药组 D 值 - 空白组 D 值) / (对照组 D 值 - 空白组 D 值) \times 100%。

1.2.4 黑素细胞 PIG1 中酪氨酸酶活性测定 采用多巴氧化反应法测定细胞中酪氨酸酶活性, 具体方法参考文献 [13] 中的方法并加以改良。取对数生长期细胞, 用 0.25% 胰酶消化 1 min 后用含 10% FBS 的 DMEM 培养液终止消化, 调整细胞密度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$, 然后将细胞悬液接种于 6 孔板, 每孔 2 mL。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下孵育 8 h 后, 分别换用含 5 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 小分子化合物 I942 的培养液继续培养 48 h, 之后吸净培养液并用 0.25% 胰酶消化 1 min, 终止消化后将细胞悬液转移至 EP 管并离心。1 420 \times g 离心 5 min, 小心吸出上清液, 每组加入 450 μL 1% Triton X-100 溶液重悬后, 快速将细胞放入 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱, 30 min 后取出置于室温下裂解细胞, 加入 50 μL 0.1% 多巴溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 2 h 后用酶联免疫检测仪测定各组 490 nm 波长处的 D 值。酪氨酸酶相对活性 (%) = (加药组 D 值 - 空白组 D 值) / (对照组 D 值 - 空白组 D 值) \times 100%。

1.2.5 qRT-PCR 根据黑素含量与酪氨酸酶活性测定结果, 选取浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 的小分子化合物 I942 处理黑素细胞 PIG1。采用 qRT-PCR 检测细胞中黑素合成相关蛋白 mRNA 的表达, 相关引物序列: β -actin 上游引物 5'-GGA CTT CGA GCA AGA GAT GG-3', 下游引物 5'-AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG-3'; 小眼畸形相关转录因子 (microphthalmia-associated transcription factor, *MITF*) 上游引物 5'-TCC GTC TCT CAC TGG ATT GGT G-3', 下游引物 5'-CGT GAA TGT GTG TTC ATG CCT GG-3'; *TYR* 上游引物: 5'-CGA GCC TGT GCC TCC TCT AA-3', 下游引物: 5'-CCA GGA CTC ACG GTC ATC CA-3'; *TRP1* 上游引物 5'-TCA TCT ATT CCT GAA TGG AAC AGG-3', 下游引物 5'-AAT GAG TGC AAC CAG TAA CAA AGC-3'; *TRP2* 上游引物 5'-TCC GCT AGC CAT GGG CTT GTG GGA TGG GG-3', 下游引物 5'-ACC GTC GAC TGG TAG GCT TCC TCC GTG TAT-3'。以 β -actin 为内参, 用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法分析目的基因的相对表达水平。

1.2.6 蛋白质印迹分析 用强效 RIPA 裂解液裂解细胞并提取蛋白质, 用 BCA 法检测并调整蛋白浓度后加入上样缓冲液, 煮沸 10 min 备用。每孔加入 20 μL 蛋白样品, 行 SDS-PAGE 后转至 PVDF 膜, PBST 洗膜 3 次后, 一抗孵育过夜, 洗膜后再与 HRP 标记的兔源或鼠源二抗在室温下孵育 1 h, 使用电化学发光技术检测相应抗体。

1.3 统计学处理 应用 Excel 软件进行统计学分析, 并用 GraphPad Prism 8.0 软件内部统计学功能对结果进行验证。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用独立样本 t 检验, 所有实验至少重复 3 次。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 黑素细胞 PIG1 鉴定结果 正常培养条件下, 细胞呈梭形或多角形贴壁生长, 细胞内可见少量浅色颗粒 (图 2A)。在培养液中加入 0.1% 多巴溶液后, 细胞逐渐呈现棕色至黑色, 并且随着时间的延长细胞色素逐渐加深 (图 2B), 证实培养出的细胞为黑素细胞。

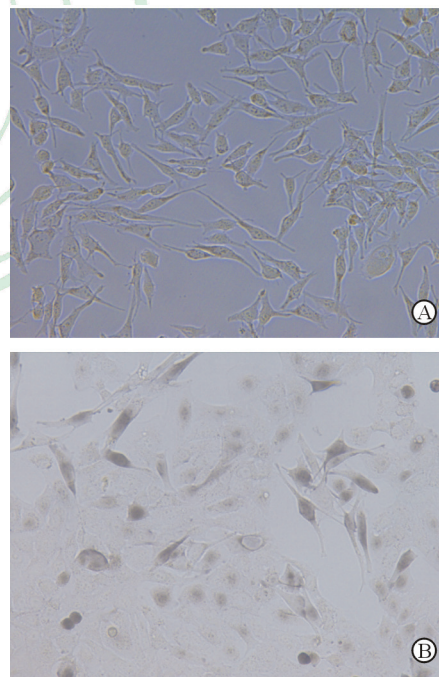


图 2 黑素细胞 PIG1 的鉴定结果

Fig 2 Identification of PIG1 melanocytes

A: PIG1 melanocytes without dopa staining; B: PIG1 melanocytes with dopa staining. Original magnification: $\times 20$

2.2 不同浓度小分子化合物 I942 对黑素细胞 PIG1 活力的影响 CCK-8 细胞凋亡实验结果 (图 3) 显示, 加入不同浓度 (0、3.125、6.25、12.5、25、50 $\mu\text{mol/L}$) 小分子化合物 I942 后黑素细胞 PIG1 的

细胞活力随着培养时间的延长而上升,但不同浓度小分子化合物 I942 对细胞活力的影响差异无统计学意义,说明在 0~50 $\mu\text{mol/L}$ 范围内,小分子化合物 I942 作用于黑素细胞 PIG1 进行后续研究是安全的。

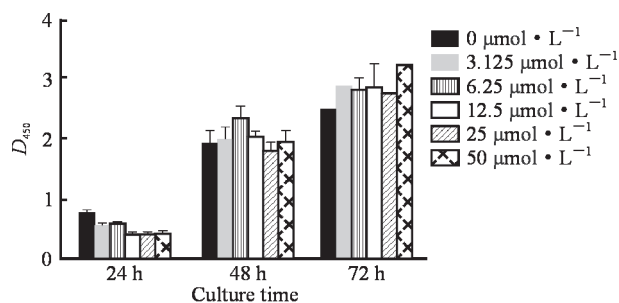


图3 不同浓度小分子化合物 I942 对黑素细胞 PIG1 细胞活力的影响

Fig 3 Effect of small molecule compound I942 at different concentrations on cell viability of PIG1 melanocytes

$n=3, \bar{x} \pm s$

2.3 不同浓度小分子化合物 I942 对黑素细胞 PIG1 中黑素含量的影响 分别用 0、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 小分子化合物 I942 处理黑素细胞 PIG1, 氢氧化钠裂解法检测结果显示, 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 时相比, 5 $\mu\text{mol/L}$ 小分子化合物 I942 处理的黑素细胞 PIG1 中黑素含量升高了 68.7% (1.68 ± 0.08 vs $1.00 \pm 0.05, P < 0.01$),

而 10 $\mu\text{mol/L}$ 小分子化合物 I942 处理的黑素细胞 PIG1 中黑素含量升高了 22.3% (1.22 ± 0.05 vs $1.00 \pm 0.05, P < 0.01$), 结果表明 5 $\mu\text{mol/L}$ 小分子化合物 I942 的作用效果更明显。

2.4 不同浓度小分子化合物 I942 对黑素细胞 PIG1 中酪氨酸酶活性的影响 分别用 0、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 小分子化合物 I942 处理黑素细胞 PIG1, 多巴氧化反应法检测结果显示, 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 时相比, 5 $\mu\text{mol/L}$ 小分子化合物 I942 处理的黑素细胞 PIG1 中酪氨酸酶活性升高了 53.0% (1.51 ± 0.09 vs $0.99 \pm 0.04, P < 0.01$), 而 10 $\mu\text{mol/L}$ 小分子化合物 I942 处理的黑素细胞 PIG1 中酪氨酸酶活性升高了 36.3% (1.35 ± 0.05 vs $0.99 \pm 0.04, P < 0.01$), 结果表明 5 $\mu\text{mol/L}$ 小分子化合物 I942 的作用效果更明显。

2.5 小分子化合物 I942 对黑素合成相关蛋白 mRNA 表达的影响 qRT-PCR 结果显示, 用 5 $\mu\text{mol/L}$ 小分子化合物 I942 处理黑素细胞 PIG1 后, 细胞中 *MITF* ($P < 0.01$)、*TYR* ($P < 0.05$)、*TRP1* ($P < 0.05$)、*TRP2* ($P < 0.05$) mRNA 表达均升高 (图 4A~4D)。蛋白质印迹分析结果显示, 用 5 $\mu\text{mol/L}$ 小分子化合物 I942 处理黑素细胞 PIG1 后, 细胞中 TYR、TRP2 蛋白表达水平均无明显变化 (图 4E)。

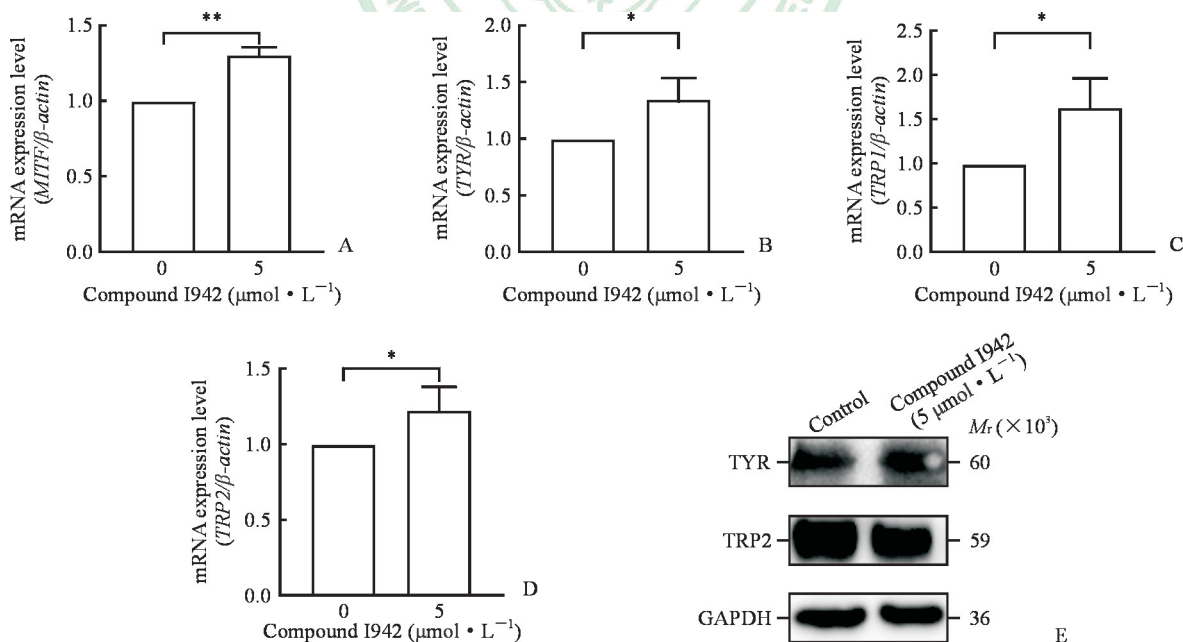


图4 小分子化合物 I942 对黑素细胞中黑素合成相关蛋白表达的影响

Fig 4 Effect of small molecule compound I942 on expression of melanin synthesis-related proteins in PIG1 melanocytes A-D: mRNA expression of *MITF*, *TYR*, *TRP1* and *TRP2* detected by qRT-PCR, respectively ($*P < 0.05, **P < 0.01, n=3, \bar{x} \pm s$); E: Protein expression of TYR and TRP2 detected by Western blotting. *MITF*: Microphthalmia-associated transcription factor; *TYR*: Tyrosinase; *TRP*: Tyrosinase-related protein; qRT-PCR: Quantitative real-time polymerase chain reaction; *GAPDH*: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

3 讨论

黑素合成是黑素细胞特有的生物学功能, 在皮肤的光保护过程中发挥着重要作用, 然而异常的黑素减少或脱失对个体容貌和皮肤健康均会产生不可忽视的影响。促进黑素细胞黑素合成、缓解局部的色素脱失或色素减退对色素减退性皮肤病的治疗及美容医学具有重要意义。在真核生物中, 黑素合成是一个复杂的受多条信号通路调节的过程, MAPK 通路是黑素合成过程中的重要调节通路, 在紫外线暴露后黑素细胞中活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 成分增多, 进而通过 MAPK 信号通路促进黑素合成^[14-15]。EPAC 是 cAMP 下游除了 PKA 之外的另一个效应蛋白, 具有鸟苷酸交换因子活性, 其被 cAMP 激活后进一步通过 Rap1 和 Rap2 发挥作用^[16]。EPAC 在腺体分泌、细胞间黏附、伤口愈合、炎症、纤维化及肿瘤细胞迁移方面发挥作用^[6-9], 近年研究发现 EPAC 还与心肌电生理、炎症性疼痛有关^[17-18]。小分子化合物 I942 能够选择性激动 EPAC1 蛋白, 较目前已上市的相关 EPAC 通路激动剂特异性高。我们先前的研究发现, 小分子化合物 I942 可通过 cAMP/EPAC 通路对多种皮肤细胞发挥作用 (未发表资料), 然而目前尚无小分子化合物 I942 对正常黑素细胞黑素合成功能的研究。

酪氨酸酶是黑素合成相关蛋白中的重要一员, 其催化黑素合成过程中的多个反应, 如 L-酪氨酸的羟化、左旋多巴的脱氢反应等, 是黑素合成的关键酶^[19]。本研究证明, 小分子化合物 I942 可在不影响细胞活力的同时增加黑素细胞 PIG1 中酪氨酸酶活性, 从而进一步增加细胞黑素含量。然而小分子化合物 I942 增强酪氨酸酶活性的机制目前尚不清楚。加入 5 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 小分子化合物 I942 均能使黑素细胞中酪氨酸酶活性升高, 然而前者效能优于后者, 这可能是由于高剂量小分子化合物 I942 对后续小分子化合物 I942 与 EPAC 蛋白的结合产生了负反馈作用, 进而下调了小分子化合物 I942 对酪氨酸酶的激活作用, 高剂量小分子化合物 I942 是否会抑制黑素合成, 还需进一步实验验证。MITF 通过调节 TYR、TRP1、TRP2 等黑素合成相关蛋白的转录, 在黑素合成调控中起着至关重要的作用^[20]。qRT-PCR 结果显示, 加入小分子化合物 I942 后

MITF mRNA 水平与 TYR、TRP1、TRP2 的 mRNA 水平均升高, 且 MITF 变化与其余三者相平行, 初步说明小分子化合物 I942 除直接增强酪氨酸酶活性外, 还可通过调节 MITF 水平进一步调控其下游 TYR、TRP1、TRP2 等的表达来增加细胞内黑素含量。本研究证明, 小分子化合物 I942 可在黑素细胞 PIG1 中发挥作用, 说明 EPAC1 在黑素细胞中也有表达, 这扩充了 EPAC1 的表达范围。然而, EPAC1 是通过何种途径调控 MITF 的表达, 并对黑素合成产生影响? 如前所述, MAPK 是调节黑素合成信号通路的重要组成部分, 且已有研究证明 cAMP 可通过 EPAC 激活 p38 MAPK^[21], 而 p38 MAPK 磷酸化后可促进 MITF 基因的表达, 进而通过 TYR、TRP1 等的表达促进黑素合成^[22], 这是上述现象发生的可能机制之一。与 qRT-PCR 结果不同, 蛋白质印迹分析结果显示加入小分子化合物 I942 后 TYR、TRP2 蛋白水平未有明显上升, 说明小分子化合物 I942 对黑素合成的调节方式并非通过增加相关蛋白的表达量实现, 而可能与某些转录后翻译前的作用因素有关, 如减轻酪氨酸酶调节亚基相关氨基酸残基的磷酸化程度、抑制酪氨酸酶的降解^[23]及加速黑素小体成熟^[24]等方式升高细胞内黑素含量, 具体机制需进一步实验验证。

综上所述, 本研究证明小分子化合物 I942 可在不影响黑素细胞 PIG1 活力的情况下, 增加细胞内酪氨酸酶活性, 进而增加细胞黑素含量, 进一步确定了小分子化合物 I942 促进黑素合成的最适浓度。本研究还初步阐明了可能的机制——通过 MITF 影响 TYR 等黑素合成相关蛋白调节黑素合成过程, 在对 EPAC1 蛋白的表达范围进行扩充的同时, 也为白癜风等色素脱失性疾病的治疗提供了一定的理论支持。然而, EPAC 蛋白与黑素合成之间的联系及 p38 MAPK 是否参与了小分子化合物 I942 的调节过程还需要深入研究。

[参考文献]

- [1] PICARDO M, DELL' ANNA M L, EZZEDINE K, HAMZAVI I, HARRIS J E, PARSAD D, et al. Vitiligo [J/OL]. Nat Rev Dis Primers, 2015, 1: 15011. doi: 10.1038/nrdp.2015.11.
- [2] CUPERTINO F, NIEMEYER-CORBELLINI J P, RAMOS-E-SLIVA M. Psychosomatic aspects of vitiligo [J]. Clin Dermatol, 2017, 35: 292-297.

- [3] UTO T, OHTA T, YAMASHITA A, FUJII S, SHOYAMA Y. Liquiritin and liquiritigenin induce melanogenesis via enhancement of p38 and PKA signaling pathways [J/OL]. *Medicines*, 2019, 6(2). pii: E68. doi: 10.3390/medicines6020068.
- [4] HU B, LEFORT K, QIU W, NGUYEN B C, RAJARAM R D, CASTILLO E, et al. Control of hair follicle cell fate by underlying mesenchyme through a CSL-Wnt5a-FoxN1 regulatory axis[J]. *Genes Dev*, 2010, 24: 1519-1532.
- [5] WANG J Y, CHEN H, WANG Y Y, WANG X Q, CHEN H Y, ZHANG M, et al. Network pharmacological mechanisms of *Vernonia anthelmintica* (L.) in the treatment of vitiligo: isorhamnetin induction of melanogenesis via up-regulation of melanin-biosynthetic genes[J/OL]. *BMC Syst Biol*, 2017, 11: 103. doi: 10.1186/s12918-017-0486-1.
- [6] O'LEARY A P, FOX J M, PULLAR C E. Beta-adrenoceptor activation reduces both dermal microvascular endothelial cell migration via a cAMP-dependent mechanism and wound angiogenesis[J]. *J Cell Physiol*, 2015, 230: 356-365.
- [7] YOKOYAMA U, PATEL H H, LAI N C, AROONSAKOOL N, ROTH D M, INSEL P A. The cyclic AMP effector Epac integrates pro- and anti-fibrotic signals[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 6386-6391.
- [8] BALJINNYAM E, UMEMURA M, DE LORENZO M S, IWATSUBO M, CHEN S, GOYDOS J S, et al. Epac1 promotes melanoma metastasis via modification of heparan sulfate[J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2011, 24: 680-687.
- [9] CURTISS E, JIANG Y, LIU L, HAWTHORNE C, ZHANG J, STEINLE J J. Epac1 restores normal insulin signaling through a reduction in inflammatory cytokines [J/OL]. *Mediators Inflamm*, 2018, 2018: 3809092. doi: 10.1155/2018/3809092.
- [10] STER J, DE BOCK F, GUÉRINEAU N C, JANOSSY A, BARRÈRE-LEMAIRE S, BOS J L. Exchange protein activated by cAMP (Epac) mediates cAMP activation of p38 MAPK and modulation of Ca²⁺-dependent K⁺ channels in cerebellar neurons[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 2519-2524.
- [11] YE H D M, COSS D. PACAP induces *FSHβ* gene expression via EPAC[J/OL]. *Mol Cell Endocrinol*, 2019, 492: 110438. doi: 10.1016/j.mce.2019.04.018.
- [12] GU W J, MA H J, ZHAO G, YUAN X Y, ZHANG P, LIU W, et al. Additive effect of heat on the UVB-induced tyrosinase activation and melanogenesis via ERK/p38/MITF pathway in human epidermal melanocytes[J]. *Arch Dermatol Res*, 2014, 306: 583-590.
- [13] NAKAJIMA M, SHINODA I, FUKUWATARI Y, HAYASAWA H. Arbutin increases the pigmentation of cultured human melanocytes through mechanisms other than the induction of tyrosinase activity[J]. *Pigment Cell Res*, 1998, 11: 12-17.
- [14] DRIRA R, SAKAMOTO K. Sakuranetin induces melanogenesis in B16BL6 melanoma cells through inhibition of ERK and PI3K/AKT signaling pathways[J]. *Phytother Res*, 2016, 30: 997-1002.
- [15] PENG H Y, LIN C C, WANG H Y, SHIH Y, CHOU S T. The melanogenesis alteration effects of *Achillea millefolium* L. essential oil and linalyl acetate: involvement of oxidative stress and the JNK and ERK signaling pathways in melanoma cells[J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9: e95186. doi: 10.1371/journal.pone.0095186.
- [16] ALMAHARIQ M, MEI F C, CHENG X. Cyclic AMP sensor EPAC proteins and energy homeostasis[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2014, 25: 60-71.
- [17] YANG Z, KIRTON H M, AL-OWAIS M, THIREAU J, RICHARD S, PEERS C, et al. Epac2-Rap1 signaling regulates reactive oxygen species production and susceptibility to cardiac arrhythmias[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2017, 27: 117-132.
- [18] SINGHMAR P, HUO X, EIJKELKAMP N, BERCIANO S R, BAAMEUR F, MEI F C, et al. Critical role for Epac1 in inflammatory pain controlled by GRK2-mediated phosphorylation of Epac1[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: 3036-3041.
- [19] D'ALBA L, SHAWKEY M D. Melanosomes: biogenesis, properties, and evolution of an ancient organelle[J]. *Physiol Rev*, 2019, 99: 1-19.
- [20] MORT R L, JACKSON I J, PATTON E E. The melanocyte lineage in development and disease[J]. *Development*, 2015, 142: 620-632.
- [21] CHEN C, DU J H, FENG W, SONG Y, LU Z Z, XU M, et al. β-adrenergic receptors stimulate interleukin-6 production through Epac-dependent activation of PKCδ/p38 MAPK signalling in neonatal mouse cardiac fibroblasts[J]. *Br J Pharmacol*, 2012, 166: 676-688.
- [22] LIU L, FU M, PEI S, ZHOU L L, SHANG J. R-fluoxetine increases melanin synthesis through a 5-HT1A/2A receptor and p38 MAPK signaling pathways[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 25, 20: 1-9.
- [23] SLOMINSKI A, TOBIN D J, SHIBAHARA S, WORTSMAN J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation[J]. *Physiol Rev*, 2004, 84: 1155-1228.
- [24] JUNG H, CHUNG H, CHANG S E, KANG D H, OH E S. FK506 regulates pigmentation by maturing the melanosome and facilitating their transfer to keratinocytes[J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2016, 29: 199-209.