

环磷酸腺苷促进泰和乌骨鸡皮肤 黑色素细胞黑色素合成

熊渺[#] 许兰娇[#] 瞿明仁 黎观红^{*}

(江西农业大学, 江西省动物营养重点实验室/江西省营养饲料开发工程研究中心, 南昌 330045)

摘要 该实验旨在研究环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)作为 α -黑色素细胞刺激素(α -melanocyte stimulating hormone, α -MSH)-黑色素皮质素受体1(melanocortin 1 receptor, MC1R)通路的下游信号分子对泰和乌骨鸡皮肤黑色素细胞黑色素合成的影响。利用体外培养的泰和乌骨鸡皮肤黑色素细胞, 观察不同浓度cAMP(0、 1×10^{-5} 、 1×10^{-4} 、 1×10^{-3} mol/L)及其抑制剂、腺苷酸环化酶(adenylate cyclase, AC)抑制剂对乌骨鸡皮肤黑色素细胞酪氨酸酶(tyrosinase, TYR)活性和黑色素含量的影响。结果表明, 与不添加cAMP的对照组相比, 不同浓度的cAMP均极显著提高泰和乌骨鸡皮肤黑色素细胞TYR活性($P < 0.01$), 10^{-4} mol/L组提高的幅度最大。不同浓度的cAMP可不同程度地促进黑色素细胞黑色素的合成, 1×10^{-5} mol/L和 1×10^{-4} mol/L组黑色素含量分别显著($P < 0.05$)和极显著($P < 0.01$)高于不添加cAMP的对照组。cAMP抑制剂Rp-cAMPS预处理黑色素细胞显著抑制cAMP(1×10^{-4} mol/L)作用下酪氨酸酶活性($P < 0.01$)和黑色素含量的升高($P < 0.05$)。Rp-cAMPS和AC抑制剂NKY80预处理黑色素细胞均显著抑制 α -MSH(2.5 μ g/mL)引起的TYR活性、cAMP含量和黑色素含量的升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。cAMP作为 α -MSH-MC1R信号通路中的第二信使或下游信号分子在泰和乌骨鸡皮肤黑色素细胞黑色素的合成中发挥重要作用, 其浓度的升高可提高泰和乌骨鸡皮肤黑色素细胞酪氨酸酶活性以及黑色素的合成。

关键词 泰和乌骨鸡; 环磷酸腺苷; 黑色素细胞; 酪氨酸酶; 黑色素

Cyclic Adenosine Monophosphate Stimulates Melanogenesis in *In Vitro* Melanocytes from Skins of Taihe Silky Fowls

Xiong Miao[#], Xu Lanjiao[#], Qu Mingren, Li Guanhong^{*}

(Jiangxi Province Key Laboratory of Animal Nutrition/Engineering Research Center of Feed Development, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract This study was conducted to investigate the effect of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) on melanin synthesis in skin melanocytes of Taihe silky fowls. The skin melanocytes of Taihe silky fowls were cultured *in vitro* with cAMP at a concentration of 0, 1×10^{-5} , 1×10^{-4} , 1×10^{-3} mol/L or pretreated with cAMP inhibitor (Rp-cAMPS) or adenylate cyclase (AC) inhibitor NKY80 prior to the addition of cAMP, and then the tyrosinase activity and melanin contents were determined. cAMP at various concentrations tested in the present study significantly increased TYR activity

收稿日期: 2018-03-29

接受日期: 2018-05-10

国家自然科学基金(批准号: 31060330)和江西省教育厅科技项目(批准号: GJJ12221)资助的课题

[#]共同第一作者

^{*}通讯作者。Tel: +86-13979165229, E-mail: liguanh@163.com

Received: March 29, 2018 Accepted: May 10, 2018

This work was supported by National Natural Science Foundation of China (Grant No.31060330) and the Education Department of Jiangxi Province (Grant No.GJJ12221)

[#]These authors contributed equally to this work

^{*}Corresponding author. Tel: +86-13979165229, E-mail: liguanh@163.com

网络出版时间: 2018-07-30 10:57:17

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180730.1057.010.html>

in silky fowl skin melanocytes with the highest tyrosinase activity in the 1×10^{-4} mol/L cAMP-treated cells ($P < 0.01$). cAMP supplemented at all concentrations used in the present study stimulated pigmentation in skin melanocytes with different extents. Melanin content in 1×10^{-5} mol/L or 1×10^{-4} mol/L cAMP-treated cells were higher than that in control without cAMP supplementation ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). However, pretreatment with Rp-cAMPS significantly inhibited the stimulatory effects of cAMP (1×10^{-4} mol/L) on tyrosinase activity ($P < 0.01$) and melanin synthesis in skin melanocytes ($P < 0.05$). Moreover, both pretreatments with Rp-cAMPS or AC inhibitor NKY80 significantly inhibited the stimulatory effects of α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH) (2.5 μ g/mL) on tyrosinase activity, cAMP formation and melanin synthesis in skin melanocytes of Taihe silky fowls ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). In conclusion, cAMP, as the second messenger or downstream signal molecule in α -MSH-MC1R (melanocortin 1 receptor) signaling pathway, plays crucial role in melanogenesis, the tyrosinase activity and melanin content in skin melanocytes of Taihe silky fowls increase with the increasement of cAMP concentration at the suitable range.

Keywords Taihe silky fowls; cyclic adenosine monophosphate; melanocytes; tyrosinase; melanin

泰和羽乌骨鸡又名丝羽乌骨鸡、乌骨鸡、泰和鸡,原产于江西省泰和县武山,是我国最具特色的地方珍禽品种之一。与普通鸡相比,其最显著的特点是体内含有丰富的黑色素。国内外不同学者对泰和乌骨鸡黑色素结构、特性、在不同组织器官中的分布和沉积规律及分子机制进行了大量研究^[1-5]。在乌骨鸡黑色素合成和沉积的分子机理研究方面,研究者主要集中于黑色素合成和沉积相关基因的筛选、鉴定和表达调控等方面。环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)作为第二信使,可以促进细胞分化,抑制细胞分裂。正常情况下细胞内cAMP浓度为0.1~1 μ mol/L^[6]。在人和哺乳动物中的研究发现, α -黑色素细胞刺激素(α -melanocyte stimulating hormone, α -MSH)与黑色素细胞表面黑色素皮质激素受体1(melanocortin 1 receptor, MC1R)结合后激活细胞膜上的腺苷酸环化酶(adenylate cyclase, AC)而提高细胞内cAMP水平,并由此激活蛋白激酶A(protein kinase A, PKA)进而上调小眼畸形相关转录因子(microphthalmia-associated transcription factor, MITF)的表达,MITF结合并激活黑色素原生成基因酪氨酸酶(tyrosinase)、酪氨酸酶相关蛋白1(tyrosinase-related proteins 1, TRP1)和TRP2的启动子而增强这些基因的表达,最终促进真黑色素的合成^[7],在这一系列信号转导过程中,cAMP信号通路是调节真黑色素形成的关键通路^[8-10]。然而,在乌骨鸡黑色素细胞内,目前仍不清楚cAMP是否作为 α -MSH-MC1R系统中的第二信使调节黑色素的生成。

我们前期研究证实, α -MSH可促进泰和乌骨鸡

皮肤黑色素细胞增殖,提高MC1R基因表达、cAMP含量以及酪氨酸酶活性并进而促进黑色素合成^[11]。为此,本试验将在前期研究基础上进一步探讨cAMP、cAMP抑制剂和AC抑制剂对泰和乌骨鸡皮肤黑色素细胞黑色素含量、酪氨酸酶活性及细胞cAMP含量的影响,以明确cAMP是否作为 α -MSH促进泰和乌骨鸡皮肤黑色素细胞黑色素合成的第二信使或下游信号分子调节黑色素的合成。

1 材料与方法

1.1 实验动物

泰和乌骨鸡种蛋购自江西省泰和县泰和乌骨鸡原种鸡场。种蛋置于实验室孵化箱中进行孵化,取20日龄的泰和乌骨鸡鸡胚用于皮肤黑色素细胞的分离。

1.2 主要试剂

改良型 α -MEM培养基购自HyClone公司;胎牛血清购自Gibco公司;青-链霉素、含EDTA的胰蛋白酶、不含EDTA的胰蛋白酶、MTT、二甲亚砜(DMSO)、Triton X-100均购自北京Solarbio公司; α -MSH购自Merck公司;cAMP购自美国Aladdin公司;cAMP抑制剂Rp-cAMPS(Rp-Adenosine 3',5'-cyclic monophosphorothioate triethylammonium salt)和腺苷酸环化酶(adenylate cyclase, AC)抑制剂NKY80购自Sigma公司;鸡环磷酸腺苷ELISA检测试剂盒购自上海江莱生物科技有限公司。

1.3 泰和乌骨鸡鸡胚皮肤黑色素细胞的分离与培养

乌骨鸡皮肤黑色素细胞的分离与体外培养方法参照我们前期建立的方法进行^[12]。当黑色素细胞密度长到90%融合时,用0.25%的胰蛋白酶进行

常规消化, 调整细胞密度并接种于培养板中, 培养1天后更换培养液。设置4个处理组: 对照组添加不含cAMP的培养基, 另外3个处理组分别添加不同浓度的cAMP(1×10^{-5} 、 1×10^{-4} 、 1×10^{-3} mol/L)。在此试验结果的基础上, 另设3个处理组, 分别为: 添加不含cAMP培养基的对照组、添加最佳浓度cAMP的处理组、cAMP抑制剂Rp-cAMPS(0.1 mmol/L)预处理3 h后添加最佳浓度cAMP抑制剂处理组。同时, 再另设4个处理组: 不添加cAMP和 α -MSH的对照组、添加2.5 μ g/mL α -MSH、用cAMP抑制剂(0.1 mmol/L)处理3 h后添加2.5 μ g/mL α -MSH、用AC抑制剂NKY80(100 μ mol/L)处理3 h后添加2.5 μ g/mL α -MSH。每个处理组4个重复, 添加cAMP、 α -MSH或抑制剂处理后继续培养3天。

1.4 黑色素细胞中黑色素含量的测定

参照Ando等^[13]的方法进行测定。在各个处理组中加入0.25%胰蛋白酶, 于室温下消化2~3 min, 加入1~2 mL完全细胞培养液终止细胞消化, 吹打成单细胞悬液。1500 r/min离心10 min, 弃上清, 往离心管中加入1 mL 1 mol/L的NaOH溶液, 置于37 °C水浴箱中水浴1 h, 选择400 nm波长在酶标仪上测定各处理组的吸光度值。黑色素含量采用相对值, 即黑色素含量=处理组 D_{400} /对照组 $D_{400} \times 100\%$ 。

1.5 黑色素细胞酪氨酸酶活性的测定

参照李洪武等^[14]的方法进行测定。在各个处理组中加入0.25%胰蛋白酶, 于室温下消化2~3 min, 加入1 mL细胞培养液终止细胞消化, 吹打成单细胞悬液。1 500 r/min离心10 min, 弃上清, 每孔加入10 mL/L的Triton X-100溶液90 μ L, 振荡5 min后, 每孔加入0.1%的L-Dopa 10 μ L, 于37 °C孵育30 min, 在酶标仪490 nm波长下测吸光度值。酪氨酸酶活性=(处理组 D_{490} -空白组 D_{490})/(对照组 D_{490} -空白组 $D_{490}) \times 100\%$ 。

1.6 黑色素细胞cAMP含量的测定

采用鸡环磷酸腺苷ELISA检测试剂盒进行测定。在各个处理组中加入0.25%胰蛋白酶, 于室温下消化2~3 min, 加入1 mL细胞培养液终止细胞消化, 吹打成单细胞悬液。1500 r/min离心10 min, 弃上清, 用Triton X-100溶液裂解细胞, 离心后取上清液, 根据试剂盒说明书所述方法进行测定。设置标准品孔和样品孔, 各个不同浓度的标准品加50 μ L, 样品孔加10 μ L待测样品, 再加样品稀释液40 μ L, 每孔中加

入辣根过氧化物酶标记的检测抗体100 μ L, 用封板膜封住于37 °C细胞培养箱中温育1 h。弃去液体后用吸水纸拍干, 加满洗涤液, 静置1 min, 弃去洗涤液后吸水纸拍干, 重复5次, 在每孔加入底物A、B液各50 μ L, 于37 °C细胞培养箱中温育15 min, 加入终止液50 μ L, 15 min内在酶标仪上选择450 nm波长处测定吸光度。

1.7 数据处理与分析

利用SPSS 17.0统计软件对数据进行单因素方差分析(One-way ANOVA)和Duncan's多重比较。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 cAMP对乌骨鸡皮肤黑色素细胞酪氨酸酶活性和黑色素含量的影响

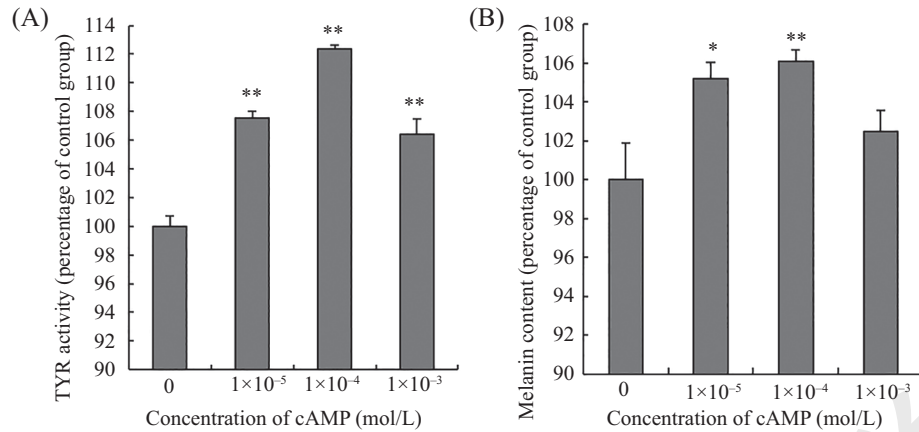
不同浓度的cAMP处理可不同程度地提高乌骨鸡皮肤黑色素细胞酪氨酸酶活性($P < 0.01$)(图1A)。随着cAMP浓度的升高, 黑色素细胞的酪氨酸酶活性呈先升高后下降的趋势。与对照组相比, 1×10^{-5} mol/L的cAMP显著提高黑色素的合成($P < 0.01$), 1×10^{-4} mol/L时达到最大值($P < 0.01$), 1×10^{-3} mol/L的cAMP处理组较 1×10^{-5} mol/L和 1×10^{-4} mol/L处理组有所降低, 但仍显著高于对照组($P < 0.01$)(图1A)。相比于对照组, 1×10^{-5} mol/L和 1×10^{-4} mol/L cAMP显著提高乌骨鸡皮肤黑色素细胞黑色素含量($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 以 1×10^{-4} mol/L时达到最大值($P < 0.01$)(图1B)。

2.2 cAMP抑制剂对乌骨鸡皮肤黑色素细胞酪氨酸酶活性和黑色素含量的影响

为进一步确证cAMP对乌骨鸡黑色素细胞增殖和黑色素合成的调控作用, 先用cAMP抑制剂Rp-cAMPS(0.1 mmol/L)预处理乌骨鸡皮肤黑色素细胞, 而后添加 1×10^{-4} mol/L的cAMP, 观察酪氨酸酶活性及黑色素含量的变化。结果表明, 1×10^{-4} mol/L的cAMP处理显著提高乌骨鸡皮肤黑色素细胞酪氨酸酶活性($P < 0.01$)和黑色素的含量($P < 0.05$), 用cAMP抑制剂Rp-cAMPS预处理黑色素细胞显著抑制cAMP对乌骨鸡皮肤黑色素细胞酪氨酸酶活性和黑色素合成的促进作用($P < 0.01$)(图2A和图2B)。

2.3 cAMP抑制剂和AC抑制剂对 α -MSH作用下乌骨鸡皮肤黑色素细胞cAMP含量、酪氨酸酶活性和黑色素含量的影响

为进一步确证cAMP作为 α -MSH——MC1R信

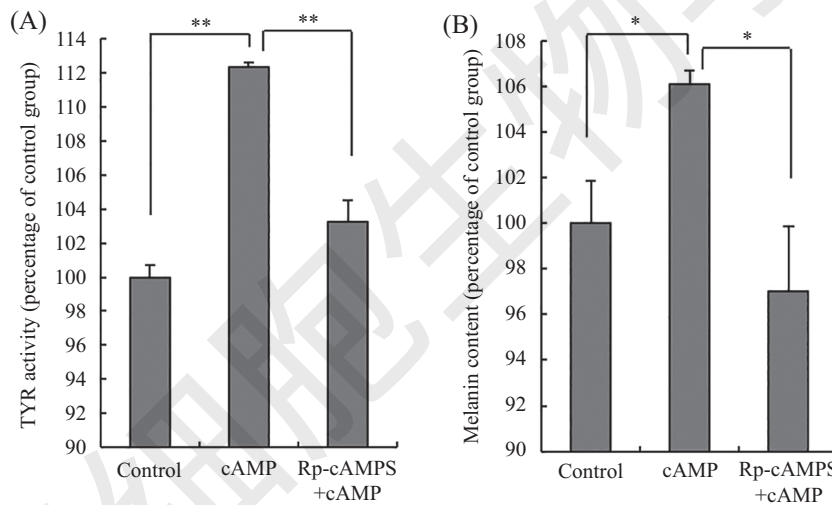


A: cAMP对黑色素细胞酪氨酸酶活性的影响; B: cAMP对黑色素细胞黑色素含量的影响。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与对照组比较。

A: the effect of cAMP on tyrosinase (TYR) activity in melanocytes; B: the effect of cAMP on melanin content in melanocytes. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group.

图1 cAMP对黑色素细胞酪氨酸酶活性和黑色素含量的影响

Fig.1 Effect of cAMP on tyrosinase (TYR) activity and melanin content in melanocytes



A: cAMP抑制剂对黑色素细胞酪氨酸酶活性的影响; B: cAMP抑制剂对黑色素细胞黑色素含量的影响。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

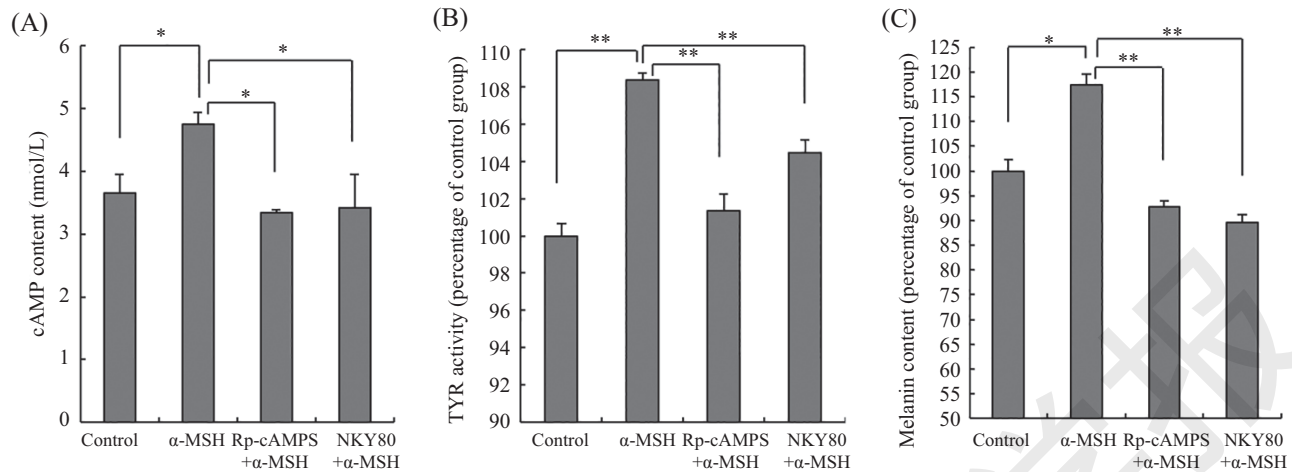
A: the effect of cAMP inhibitor on tyrosinase (TYR) activity in melanocytes; B: the effect of cAMP inhibitor on melanin content in melanocytes. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图2 cAMP抑制剂对黑色素细胞酪氨酸酶活性和黑色素含量的影响

Fig.2 Effect of cAMP inhibitor on tyrosinase (TYR) activity and melanin content in melanocytes

号通路中的第二信使或下游信号分子在泰和乌骨鸡皮肤黑色素细胞黑色素的合成中的作用, 分别用cAMP抑制剂Rp-cAMPS(0.1 mmol/L)和AC抑制剂NKY80(100 μ mol/L)预处理乌骨鸡皮肤黑色素细胞, 而后添加2.5 μ g/mL α -MSH, 观察cAMP含量、酪氨酸酶活性及黑色素含量的变化, 结果如图3所示。2.5 μ g/mL α -MSH处理乌骨鸡皮肤黑色素细胞显著提高细胞cAMP水平($P < 0.05$), cAMP抑制剂Rp-cAMPS和AC抑制剂NKY80分别预处理黑色素细胞

后均显著抑制 α -MSH对黑色素细胞cAMP含量的提高作用($P < 0.05$), 两种抑制剂处理的黑色素细胞其cAMP含量降至对照组水平($P > 0.05$)(图3A)。2.5 μ g/mL α -MSH处理乌骨鸡皮肤黑色素细胞显著提高其酪氨酸酶活性($P < 0.01$), cAMP抑制剂Rp-cAMPS和AC抑制剂NKY80分别预处理黑色素细胞后均显著抑制 α -MSH对黑色素细胞酪氨酸酶活性的提高作用($P < 0.01$), 尤其是Rp-cAMPS预处理组其酪氨酸酶活性降至对照组水平($P > 0.05$)(图3B)。



A: cAMP抑制剂和AC抑制剂对黑色素细胞cAMP含量的影响; B: cAMP抑制剂和AC抑制剂对黑色素细胞酪氨酸酶活性的影响; C: cAMP抑制剂和AC抑制剂对黑色素细胞黑色素含量的影响。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

A: the effect of cAMP and AC inhibitor on cAMP content in melanocytes; B: the effect of cAMP and AC inhibitor on tyrosinase (TYR) activity in melanocytes; C: the effect of cAMP and AC inhibitor on melanin content in melanocytes. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图3 cAMP抑制剂和AC抑制剂对 α -MSH作用下黑色素细胞cAMP含量、酪氨酸酶活性和黑色素含量的影响

Fig.3 Effects of cAMP inhibitor and adenylate cyclase (AC) inhibitor on α -MSH-induced stimulation of cAMP production, tyrosinase (TYR) activity and melanogenesis

2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ α -MSH处理乌骨鸡皮肤黑色素细胞显著提高其黑色素含量($P < 0.05$), cAMP抑制剂Rp-cAMPS和AC抑制剂NKY80分别预处理黑色素细胞后均显著抑制 α -MSH对黑色素细胞黑色素合成的促进作用($P < 0.01$), 两种抑制剂处理的黑色素细胞其黑色素合成水平显著低于对照组($P < 0.05$)(图3C)。

3 讨论

在人和哺乳动物的研究中发现, cAMP是黑色素形成主要的胞内信号分子^[15]。外源信号因子可以通过激活cAMP而激活PKA活性, PKA可以改变酪氨酸酶基因的转录水平^[16]。cAMP信号通路是细胞外的信号分子(如激素)与其相对应受体结合, 引起细胞内cAMP的浓度升降变化而引起细胞反应的一条信号通路。AC是cAMP信号通路的最先效应酶, 它在细胞内的存在可以上调细胞内cAMP的浓度, 然后通过PKA磷酸化和cAMP反应元件结合蛋白(cAMP responsive element binding protein, CREB)家族转录因子的激活来调控黑色素的合成^[17]。本研究发现, 不同剂量的cAMP可不同程度地提高泰和乌骨鸡皮肤黑色素细胞酪氨酸酶活性并促进黑色素合成。Rp-cAMPS是cAMP活化的特异性强效竞争抑制剂, 它的细胞渗透性和对磷酸二酯酶的完全阻断作用使其成为研究cAMP-依赖性信号传导的独特工具。

与cAMP相比, RP-c-AMPS具有显著的亲水亲油能力, 能在许多生物系统中渗透细胞膜, Rp-cAMPS与cAMP的自由蛋白结合使cAMP处于封闭状态而受到抑制^[18]。本研究发现, cAMP抑制剂Rp-c-AMPS预处理黑色素细胞显著抑制cAMP作用下酪氨酸酶活性($P < 0.01$)和黑色素含量的升高($P < 0.05$)。由此表明, cAMP作为第二信使在泰和乌骨鸡皮肤黑色素细胞黑色素的合成中发挥重要作用。

在哺乳动物以及人类中已被证实, α -MSH是黑色素合成的重要调节因子, MC1R是调节黑色素形成的关键基因, 而cAMP信号通路是调节真黑色素形成的关键通路^[9-10,19]。 α -MSH与特异表达于黑色素细胞的MC1R结合并激活MC1R, 经由G蛋白耦联cAMP信号通路, 调节黑色素细胞内的一系列级联反应, 从而促进酪氨酸酶、TRP1和TRP2基因表达, 最终导致真黑色素的合成。Bowers等^[20]的研究发现, cAMP的抑制剂Rp-cAMPS完全抑制了 α -MSH对黑色素细胞的刺激作用。本研究发现, 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ α -MSH处理乌骨鸡皮肤黑色素细胞显著提高其酪氨酸酶活性, 而cAMP抑制剂Rp-cAMPS和AC抑制剂NKY80分别预处理黑色素细胞后均显著抑制 α -MSH对黑色素细胞cAMP含量、酪氨酸酶活性以及黑色素合成的提高作用。NKY80作为腺苷酸环化酶的抑制剂, 可以阻断ATP转换成cAMP的过程, 使cAMP的生成受到

抑制。综合我们前期^[11]和本实验结果,我们可以推断, α -MSH与泰和乌骨鸡皮肤黑色素细胞MC1R结合而提高MC1R基因表达,由此激活腺苷酸环化酶提高细胞内cAMP水平并由cAMP信号通路介导而提高酪氨酸酶表达和活性,进而促进泰和乌骨鸡皮肤黑色素细胞黑色素的合成。cAMP作为 α -MSH——MC1R信号通路的下游信号分子在介导 α -MSH促进泰和乌骨鸡皮肤黑色素细胞黑色素合成中发挥关键作用。与哺乳动物类似, α -MSH-MC1R-cAMP-TRP通路在泰和乌骨鸡黑色素细胞黑色素合成中亦可能发挥着重要的调控作用。

参考文献 (References)

- Muroya S, Tanabe RI, Nakajima I, Chikuni K. Molecular characteristics and site specific distribution of the pigment of the silky fow. *J Vet Med Sci* 2000; 62(4): 391-5.
- 杨永升, 邓学梅, 李宁, 傅衍, 朱睦元, 吴常信. MC1R是控制鸡黑色素形成的候选主效基因. *生物化学与生物物理进展* (Yang Yongsheng, Deng Xuemei, Li Ning, Fu Yan, Zhu Muyuan, Wu Changxin. MC1R is the candidate gene regulating melanin synthesis in chicken. *Progress in Biochemistry and Biophysics*) 2004; 31(6): 500-5.
- Tu YG, Sun YZ, Tian YG, Xie MY, Chen J. Physicochemical characterization and antioxidant activity of melanin from the muscles of Taihe black-bone silky fowl (*Gallus gallus domesticus* Brisson). *Food Chem* 2009; 114(4): 1345-50.
- Dorshorst B, Molin AM, Rubin CJ, Johansson AM, Strömstedt L, Pham MH, *et al.* A complex genomic rearrangement involving the endothelin 3 locus causes dermal hypermentation in the chicken. *PLoS Genetics* 2011; 7(12): e1002412.
- 郑嫩珠, 李丽, 辛清武, 缪中纬, 朱志明, 陈黎, 等. 酪氨酸酶(TYR)、小眼畸形相关转录因子(MITF)和刺鼠信号蛋白(ASIP)基因对白绒乌骨鸡黑色素沉积的遗传效应. *农业生物技术学报* [Zheng Nengzhu, Li Li, Xin Qungwu, Miao Zhongwei, Zhu Zhiming, Chen Li, *et al.* Genetic effect of tyrosinase (TYR), microphthalmia-associated transcription factor (MITF) and agouti signaling protein (ASIP) genes on melanin deposition of white silky fowl (*Gallus gallus domesticus* Brisson). *Journal of Agricultural Biotechnology*] 2015; 23(8): 1076-83.
- 汪善锋, 陈安国. 环腺苷酸的生理功能及在动物生产中的应用. *中国饲料* (Wang Shanfeng, Chen Anguo. Physiological function of cyclic adenosine monophosphate and its application in animal production. *China Feed*) 2003; 10: 3-5
- Suzuki I, Cone RD, Im S, Nordlund J, Abdel-Malek ZA. Binding of melanotropic hormones to the melanocortin receptor MC1R on human melanocytes stimulates proliferation and melanogenesis. *Endocrinology* 1996; 137(5): 1627-33.
- Pape EL, Wakamatsu K, Ito S, Hearing VJ. Regulation of eumelanin/pheomelanin synthesis and visible pigmentation in melanocytes by ligand of the melanocortin 1 receptor. *Pigment Cell Melanoma Res* 2008; 21(4): 477-86.
- Busca R, Ballotti R. Cyclic AMP: a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Res* 2000; 13(2): 60-9.
- 姬凯元, 石占全, 刘彧, 杨姗姗, 胡帅鹏, 张俊珍, 等. lpa-miR-nov-66通过调控cAMP路径抑制 α -MSH介导的羊驼黑色素生成. *中国生物化学与分子生物学报* (Ji Kaiyuan, Shi Zhanquan, Liu Yu, Yang Shanshan, Hu ShuaiPeng, Zhang Junzhen, *et al.* lpa-miR-nov-66 inhibiting the function of α -MSH on melanogenesis of alpaca by regulating cAMP pathway. *Chinese Journal of Biochemical and Molecular Biology*) 2015; 31(11): 1206-12.
- 熊渺, 熊小文, 许兰娇, 黄娟, 彭富强, 艾红英, 等. α -黑素细胞刺激素对泰和乌骨鸡皮肤黑色素细胞增殖及黑色素合成的影响. *中国兽医学报* (Xiong Miao, Xiong Xiaowen, Xu Lanjiao, Huang Juan, Peng Fuqiang, Ai Hongying, *et al.* Effect of α -melanocyte stimulating hormone on cell proliferation and melanin synthesis in melanocytes from Taihe silky fowl skin. *Chinese Journal of Veterinary Science*) 2016; 36(3): 496-503.
- 熊渺, 黄娟, 许兰娇, 彭富强, 艾红英, 瞿明仁, 等. 泰和乌骨鸡鸡胚皮肤黑色素细胞的分离与培养. *中国兽医学报* (Xiong Miao, Huang Juan, Xu Lanjiao, Peng Fuqiang, Ai Hongying, Qu Mingren, *et al.* Isolation and cultivation of melanocytes from Taihe silky fowl embryo skin. *Chinese Journal of Veterinary Science*) 2015; 35(12): 1984-90.
- Ando H, Iton A, Mishima Y, Ichihashi M. Correlation between the number of melanosomes, tyrosinase mRNA levels and tyrosinase to various melanogenesis regulatory agents. *Cell Physiol* 1995; 163(3): 608-14.
- 李洪武, 朱文元. 治疗白癜风复方中药体外对蘑菇酪氨酸酶活性的作用. *临床皮肤科杂志* (Li Hongwu, Zhu Wenyuan. Effects of traditional Chinese medicine compounds for treating vitiligo on mushroom tyrosinase activity *in vitro*. *Journal of Clinical Dermatology*) 2000; 29(3): 133-5.
- Searparo AC, Visconti MA, Castrucci AMDL. Signaling pathways evoked by alpha1-adrenoceptors in human melanoma cells. *Cell Biochemical Funct* 2006; 24(2): 119-29.
- Solano F, Briganti S, Pieardo M, Ghanem G Hypopigmenting agents: an updated review on biological, chemical and clinical aspects. *Pigment Cell Res* 2006; 19(6): 550-71.
- Rodríguez CI, Setaluri V. Cyclic AMP (cAMP) signaling in melanocytes and melanoma. *Arch Biochem Biophys* 2014; 563(1): 22-7.
- Dostmann WR. (Rp)-cAMPS inhibits the cAMP-dependent protein kinase by blocking the cAMP-induced conformational transition. *FEBS Lett* 1995; 375(3): 231-4.
- Lee AY, Noh M. The regulation of epidermal melanogenesis via cAMP and/or PKC signaling pathways: insights for the development of hypopigmenting agents. *Arch Pharm Res* 2013; 36(7): 792-801.
- Bowers RR, Biboso A, Chavez O. The role of alpha-MSH, its agonists and c-AMP in *in vitro* avian melanocytes. *Pigment Cell Res* 1997; 10(1/2): 41-5.