

# 乌骨山羊皮肤黑色素细胞的分布及特征

谢光跃<sup>1</sup> 刘桂琼<sup>1</sup> 姜勋平<sup>1</sup> 胡薛英<sup>2</sup> 王建国<sup>3</sup>

1. 华中农业大学动物科技学院, 武汉 430070; 2. 华中农业大学动物医学院, 武汉 430070;  
3. 通山乌骨山羊育种有限公司, 通山 437600

**摘要** 试验采用免疫组织化学染色对乌骨山羊不同被毛颜色皮肤中的黑色素细胞进行定位,再用多巴组织化学染色法对皮肤中有黑色素分泌的黑色素细胞进行定位,以HE染色法对黑色素细胞的形态进行观察。免疫组织化学染色结果显示,乌骨山羊皮肤中的黑色素细胞主要分布在表皮基底层和毛囊中;多巴组织化学染色结果显示,表皮中没有阳性反应,黑色被毛毛球部及外根鞘均有阳性反应,白色被毛毛球部及外根鞘则没有阳性反应,说明黑色被毛毛球部及外根鞘有成熟的黑色素细胞存在并能合成黑色素。HE染色结果显示,黑色被毛毛囊外毛根鞘中的黑色素细胞和周围细胞区分明显,呈空泡状和活化状态,周围有大量黑色素颗粒分布,白色被毛毛囊外根鞘黑色素细胞呈椭圆状,没有黑色素产生,和周围细胞难以区分。因此,乌骨山羊黑色被毛毛囊外根鞘中黑色素细胞的活化可能参与了乌骨山羊毛色和乌质性状的形成。

**关键词** 乌骨山羊; 黑色素细胞; 化学染色; 毛囊外根鞘

**中图分类号** S 852.16<sup>+</sup>5 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2014)02-0083-06

乌骨山羊是我国湖北特有的珍稀地方山羊品种,主要分布于湖北通山山区,近年来也被相继引种至云南、重庆和宁夏等地。它的主要特征是皮肤、肌肉、骨膜、内脏器官等处含有大量黑色素颗粒而呈乌黑色,具有“乌骨乌肉”的特点。

黑色素颗粒主要是由黑色素细胞生产和存储的,黑色素细胞根据特征不同分为三个群体:第一类分布在表皮,它们只有少量黑色素沉积;第二类分布于毛囊外根鞘中,它们的形态较小,没有黑色素分泌,但是能够增生分化;第三类分布于毛球部,形态较大并且有大量黑色素分泌,但是却不能增生分化<sup>[1-2]</sup>。研究显示,表皮黑色素细胞较不规则,它们一般有形成空泡的趋势,胞核较大,成熟的黑色素细胞还有明显的树突,有时数个细胞相互接触,形成黑色素细胞簇,有的具有非典型的胞核或者整个细胞呈现出多形性,部分细胞还存在于真皮和表皮连接处的上方<sup>[3]</sup>。毛囊外根鞘部位是黑色素细胞干细胞存在的部位,是表皮黑色素细胞和毛球部黑色素细胞的储库<sup>[4]</sup>,此处的黑色素细胞胞体趋圆,树突不明显,周边未见黑色素颗粒存在,处于未活化的状态<sup>[5]</sup>。毛球部的黑色素细胞较为成熟,它们体积大,

树突长,含有较多的高尔基体和粗面内质网,合成的黑色素主要参与毛发颜色的形成<sup>[1-2]</sup>。

黑色素颗粒主要是由黑色素细胞合成,因此研究乌骨山羊黑色素细胞的分布与形态特点对于探索乌骨山羊乌质性状的成因具有重要意义。本试验通过组织化学染色法对乌骨山羊皮肤中黑色素细胞进行定位和特征分析,比较黑色和白色被毛皮肤中黑色素细胞的分布规律与形态特征,旨在为进一步研究乌骨山羊黑色素沉积的细胞学基础提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物

2013年1月从湖北省咸宁市通山县富有村的乌骨山羊养殖基地选取成年雌性黑白花乌骨山羊3只,每个个体在屠宰后于背侧黑白花部位取白色被毛皮肤和黑色被毛皮肤样本各1块(0.5 cm×1.5 cm),生理盐水冲洗干净后分别在4%多聚甲醛中进行固定。

### 1.2 主要试剂

鼠抗MITF单克隆抗体购于美国Abcam公司,羊抗小鼠IgG、SABC试剂盒、DAB显色试剂盒

收稿日期: 2013-08-23

基金项目: 国家肉羊产业技术体系项目(CARS-39-03A)

谢光跃, 硕士研究生, 研究方向: 动物生殖生理遗传育种与生物技术繁殖, E-mail: xieguangyue123@qq.com

通信作者: 姜勋平, 博士, 教授, 研究方向: 生殖生物学、生物信息学和动物繁育新技术, E-mail: xunping@gmail.com

均购于武汉博士德生物工程有限公司, *L*-左旋多巴染料、核固红染料购于上海源叶生物科技有限公司、苏木素染液、伊红染液购于武汉谷歌生物科技有限公司。

### 1.3 免疫组织化学染色

将固定好的组织用流水冲洗 20 min, 先后用 70%、80%、90%、95% 乙醇及无水乙醇进行脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋。切片厚 6  $\mu\text{m}$ , 用二甲苯脱蜡, 再用无水乙醇及 95%、90%、80%、70% 乙醇脱水, 流水冲 5 min, 3% 过氧化氢室温 30 min 除去过氧化物酶, PBST 洗 3 次 (每次 5 min), 滴加 5% BSA 封闭液, 室温 30 min, 放于湿盒中滴加 1:2 000 鼠抗 MITF 单克隆抗体, 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱过夜。PBST 洗 3 次 (每次 5 min), 滴加羊抗小鼠 IgG, 室温孵育 30 min, PBST 洗 3 次 (每次 5 min), 滴加 SABC, 室温 30 min, PBST 洗 3 次 (每次 5 min), DAB 显色 1~2 min, PBS 洗 3 次 (每次 5 min), 苏木素染色 2 min, 流水冲 2 min, 脱水、透明、中性树胶封片, 然后在显微镜下观察拍照。用 PBS 代替一抗作为阴性对照。

### 1.4 多巴组织化学染色

在 4% 多聚甲醛中进行固定, 组织浸于孵育液中 1 h, 更换孵育液继续孵育 24 h, 流水冲 2~6 h; Bouin 液重新固定 24 h; 先后用 70%、80%、90%、95% 乙醇及无水乙醇进行脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋; 切片厚 6  $\mu\text{m}$ ; 二甲苯脱蜡, 再用无水乙醇及 95%、90%、80%、70% 乙醇脱水, 0.1% 核固红染液

浸泡 10 min, 流水冲 15 min; 先后用 70%、80%、90%、95% 乙醇及无水乙醇进行脱水、二甲苯透明、中性树胶封片。

### 1.5 HE 染色

将固定好的组织用流水冲洗 20 min, 先后用 70%、80%、90%、95% 乙醇及无水乙醇进行脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋。切片 6  $\mu\text{m}$ , 二甲苯脱蜡, 用无水乙醇及 95%、90%、80%、70% 乙醇脱水, 苏木素 5 min; 自来水冲 15 min, 盐酸分化 10 s, 自来水冲洗 15 min, 先后置于 70% 乙醇、80% 乙醇、伊红溶液、95% 乙醇和无水乙醇中进行脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。

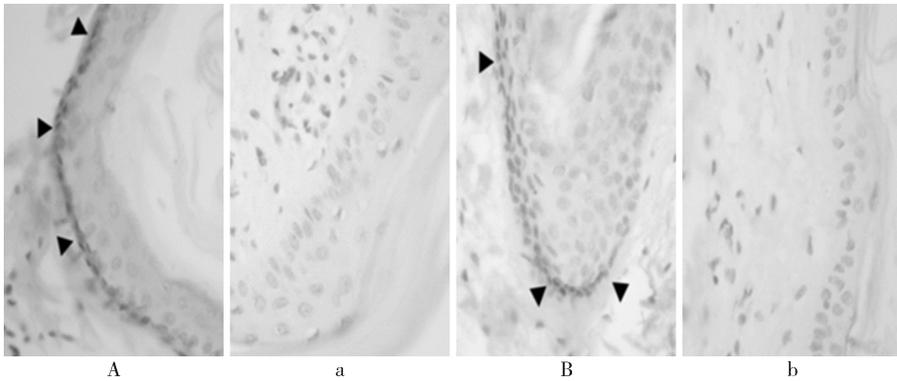
### 1.6 结果判定

分别观察黑色被毛和白色被毛皮肤的表皮、毛球部和毛囊外根鞘 3 个部位的免疫组织化学染色和多巴组织化学染色情况。有着色判定为阳性 (+), 无着色判定为阴性 (-)。

## 2 结果与分析

### 2.1 免疫组织化学染色结果

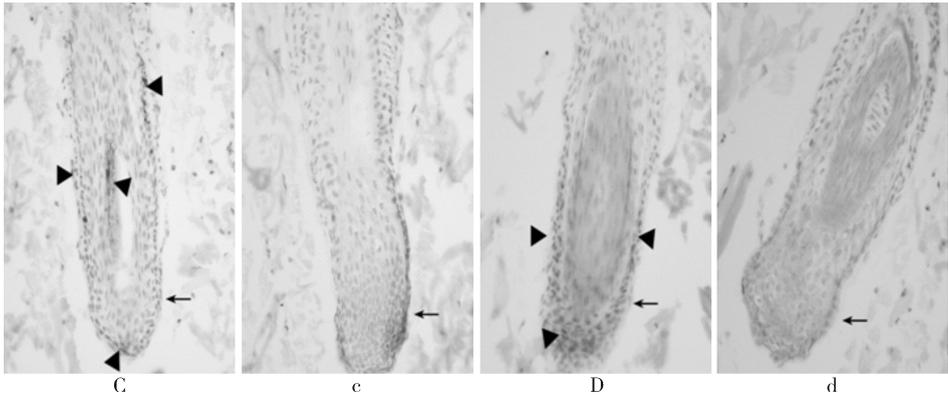
MITF 免疫组织化学染色结果显示, 阳性着色区分布于表皮和毛囊中。在表皮中, 黑色素细胞主要分布在基底层, 但黑色被毛表皮基底层比白色被毛表皮基底层阳性着色深 (图 1); 毛囊中主要分布在毛球部和外根鞘部位, 黑色被毛毛囊外根鞘与毛球部和白色被毛毛囊外根鞘与毛球部相比, 阳性着色也较深 (图 2)。



▲指示的为 MITF 阳性着色区, A 为黑色被毛皮肤表皮, a 为阴性对照。B 为白色被毛皮肤表皮, b 为阴性对照。▲ indicate positive staining of MITF, A is immunohistochemical section of black coat color skin of black-boned goat, a is negative control. B is immunohistochemical section of white coat color skin of black-boned goat, b is negative control.

图 1 表皮黑色素细胞免疫组织化学染色图 (400 $\times$ )

Fig. 1 Melanocytes distributed in epidermal showed by immunohistochemical method (Magnification: 400 $\times$ )



▲指示的为 MITF 阳性着色区,→指示的为毛囊毛球部。C 为黑色被毛皮肤毛囊,c 为阴性对照。D 为白色被毛皮肤毛囊,d 为阴性对照。▲ indicate positive staining of MITF, →indicate hair bulb. C is immunohistochemical section of black coat color skin of black-boned goat,c is negative control. D is immunohistochemical section of white coat color skin of black-boned goat,d is negative control.

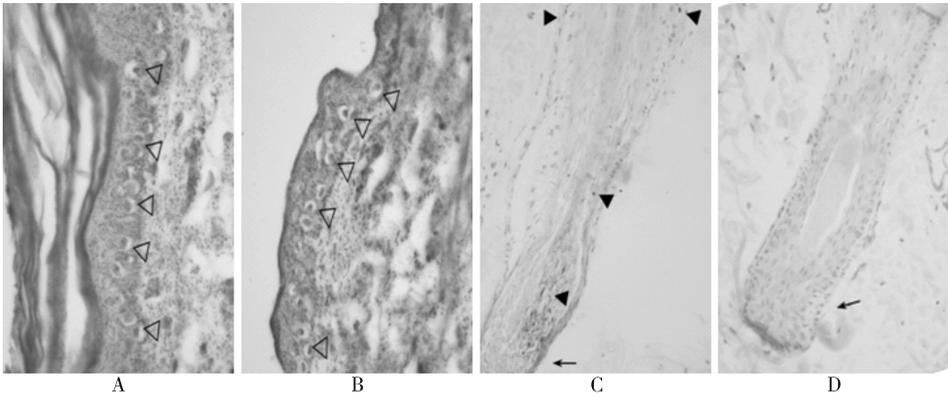
图 2 毛囊黑色素细胞免疫组织化学染色图(200×)

Fig.2 Melanocytes distributed in hair follicle showed by immunohistochemical method (Magnification: 200×)

2.2 多巴组织化学染色结果

多巴组织化学染色显示,表皮中无阳性反应区域,阳性反应主要分布在黑色被毛毛囊中。在表皮中,乌骨山羊白色被毛皮肤和黑素被毛皮肤中的黑色素细胞形态大小都相似,胞核较大,呈空泡状,排列

在表皮的基底层部位。在黑色被毛皮肤的毛囊中,多巴阳性着色分布在毛球部和毛囊外根鞘一周,说明这些部位有成熟的黑色素细胞存在并能够分泌黑色素颗粒;而白色被毛皮肤毛囊则未见多巴阳性着色,说明这些部位的黑色素细胞不分泌黑色素颗粒(图 3)。



△指示为黑色素细胞,▲指示的为多巴阳性着色区,→指示的为毛囊毛球部。A 为黑色被毛皮肤表皮,B 为白色被毛皮肤表皮,放大倍数 400×。C 为黑色被毛皮肤毛囊,D 为白色被毛皮肤毛囊,放大倍数 200×。△ indicate melanocyte,▲ indicate positive staining of Dopa, → indicate hair bulb. A is dopa staining section of black coat color of epidermis,B is dopa staining sections of white coat color of epidermis (Magnification: 400×). C is dopa staining section of black coat color of hair follicles, D is dopa staining section of white coat color of hair follicles (Magnification: 200×).

图 3 皮肤黑色素细胞多巴组织化学染色图

Fig.3 Melanocytes distributed in skin showed by Dopa staining

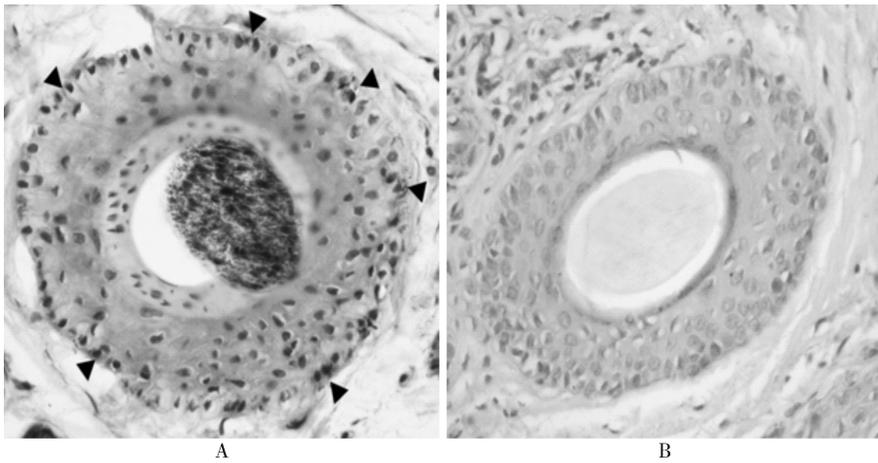
2.3 HE 染色结果

利用 HE 染色对乌骨山羊白色和黑色被毛毛囊外根鞘部位的黑色素细胞形态进行观察,发现黑色被毛毛囊外根鞘一周的黑色素细胞呈高度空泡状,周围分布着大量黑色素颗粒,和周围细胞区分明显;而白色被毛毛囊外根鞘部位的黑色素细胞树突不明显,与周围细胞很难以肉眼辨认,周围没有明显的黑

色素颗粒。这也从侧面反映了黑色被毛毛囊外根鞘部位的黑色素细胞处于活化状态(图 4)。

2.4 黑色被毛和白色被毛皮肤染色结果对比

黑色被毛和白色被毛皮肤免疫组织化学染色和多巴组织化学染色结果见表 1。免疫组织化学染色结果显示,在白色被毛和黑色被毛皮肤的表皮、毛球、毛囊外根鞘部位均有阳性反应,说明这些部位均



▲指示的为毛囊外根鞘黑色素细胞,A为黑色被毛毛囊,B为白色被毛毛囊。▲ indicate melanocyte in outer root sheath of hair follicle,A is HE staining section of black coat color of hair follicles, B is HE staining section of white coat color of hair follicles.

图 4 毛囊外根鞘黑色素细胞 HE 染色图(400×)

Fig. 4 Melanocytes distributed in outer root sheath of hair follicle showed by HE staining (Magnification: 400×)

表 1 黑色素细胞在黑色被毛和白色被毛皮肤部位的表达

Table 1 Melanocytes distributed in black and white coat color skin

染色方法 Staining method	黑色被毛皮肤( $n=3$ ) Black coat color of skin ( $n=3$ )			白色被毛皮肤( $n=3$ ) White coat color of skin ( $n=3$ )		
	表皮 Epidermis	毛球 Hair bulb	毛囊外根鞘 Outer root sheath of hair follicle	表皮 Epidermis	毛球 Hair bulb	毛囊外根鞘 Outer root sheath of hair follicle
免疫组织化学染色 Immunohistochemical staining	+	+	+	+	+	+
多巴组织化学染色 Dopa staining	-	+	+	-	-	-

有黑色素细胞的存在。多巴组织化学染色结果显示,只有黑色被毛毛球部和毛囊外根鞘部位有阳性反应,而白色被毛皮肤各部位与黑色被毛皮肤的表皮均没有阳性反应区域。说明黑色被毛毛球部和毛囊外根鞘部位有成熟的黑色素细胞分布。

### 3 讨论

#### 3.1 乌骨山羊黑色素细胞染色特点

HE 染色法主要根据黑色素细胞的位置和形态来进行大致的判断,并不能对黑色素细胞进行准确的定位。多巴染色方法主要依赖于黑色素细胞内酪氨酸酶和黑色素颗粒是否存在,只对表皮、毛球和外根鞘部位中能分泌黑色素颗粒的黑色素细胞进行着色,而对处于静息状态下的黑色素细胞并不能进行标记,只有这些黑色素细胞被激活并分泌黑色素颗粒之后才可以辨认<sup>[1]</sup>。

MITF 是黑色素细胞的核蛋白,对于黑色素细胞在胚胎期间的发育、存活以及色素的调节都有重要调节作用。MITF 免疫组织化学染色方法可以对皮肤的表皮、毛球和外根鞘部位存在的所有的黑色素细胞进行着色。MITF 阳性定位于胞核,可避免其他定位于胞质的黑色素细胞标记物因阳性标记与胞质色素不易区分而造成的困难,是一种比较可信的方法<sup>[6-7]</sup>。

从试验结果看,免疫组织化学染色能对黑色被毛和白色被毛皮肤的表皮、毛球和外根鞘部位的所有黑色素细胞进行定位;多巴组织化学染色只能对黑色被毛皮肤的毛球部和外根鞘有黑色素分泌的黑色素细胞进行辨认,对于表皮黑色素细胞则无法较明显的辨认;HE 染色清晰地显示了黑色被毛和白色被毛毛囊外根鞘部位黑色素细胞的区别。

### 3.2 乌骨山羊黑色被毛毛囊外根鞘的黑色素细胞呈活化状态

本试验发现乌骨山羊皮肤黑色素细胞分布在表皮底部、毛球部和毛囊外根鞘部位,这与文献报道结果一致<sup>[1-2]</sup>,但是试验结果显示,乌骨山羊黑色被毛毛囊外根鞘的黑色素细胞呈活化状态,树突明显,能够产生大量的黑色素颗粒,这与文献的报道又有所不同。Tobin等<sup>[2]</sup>发现,存在于毛囊外根鞘的黑色素细胞形态较小,无黑色素分泌,也没有树突状结构,但是这群黑色素细胞能够增殖。Nishimura等<sup>[4]</sup>和卢涛等<sup>[8]</sup>认为,存在于外根鞘部位的黑色素细胞是皮肤黑色素细胞的储库,分布于毛囊的中下段,多巴染色呈阴性,是一种未成熟的黑色素细胞,这些黑色素细胞被认定为毛囊和表皮黑色素细胞的干细胞。谭城等<sup>[5]</sup>研究发现,外毛根鞘与毛球和表皮处的黑色素细胞相比,数目很少,一般成群分布,黑色素细胞胞体趋圆,树突不明显,周边未见黑色素颗粒存在,这表明此群黑色素细胞呈未活化的状态。Commo等<sup>[9]</sup>发现在黑色被毛毛囊和白色被毛毛囊外根鞘中均含有未活化的黑色素细胞,但是和黑色被毛毛囊外根鞘中的黑色素细胞相比,白色被毛毛囊外根鞘中的黑色素细胞较少。

张汝芝等<sup>[10]</sup>认为,毛囊外根鞘的黑色素细胞中的黑素小体发育未成熟,通常不表达与黑色素合成相关的酶分子,只有在自由基被调控或者其他因素的作用下,黑色素细胞才被激活并具有合成黑色素颗粒的能力。Nishimura等<sup>[7]</sup>通过体外研究发现,黑色素细胞处于未成熟的状态主要是由于TGF- $\beta$ 通过下调MITF的表达所致。MITF突变则会导致黑色素细胞干细胞的过早分化,出现黑色素细胞干细胞的选择性凋亡,黑色素细胞数量会由此减少<sup>[4]</sup>。MITF作为黑色素细胞生长、分化和存活的主要调控者,在色素细胞的不同生理过程中激活其下游基因从而对这些生理过程进行调控。例如,通过调节*Bcl2*、*MET*、*HIF1 $\alpha$* 等控制着黑色素细胞的存活;调节*CDK2*、*TBX2*等控制黑色素细胞的分化;调节*MC1R*、*EDNRB*、*PMEL17*和酪氨酸酶家族等控制黑色素的合成<sup>[11]</sup>。MITF还可以调控*TYR*、*TYRP1*、*TYRP2*这些黑色素合成必需酶的表达<sup>[12-13]</sup>。因此,进一步研究MITF对黑色素细胞的调控机制对于理解黑色被毛毛囊外根鞘黑色素细胞活化的原因具有重要意义。

本研究发现乌骨山羊毛囊外根鞘部位的黑色素

细胞呈活化状态,这是世界上首次报道外根鞘部位的黑色素细胞活化并大量合成黑色素颗粒。推测乌骨山羊毛囊外根鞘黑色素细胞可能参与了毛色和乌质性状的形成,但是乌骨山羊黑素毛囊外根鞘部位的黑色素细胞活化的原因及黑色素颗粒的转运机制还有待进一步研究。

致谢:非常感谢华中农业大学动物病理学实验室提供的实验条件以及杨军、陈晨等同学的帮助。

### 参 考 文 献

- [1] NA G Y, PAEK S H, PARK B C, et al. Isolation and characterization of outer root sheath melanocytes of human hair follicles [J]. *Br J Dermatol*, 2006, 155(5):902-909.
- [2] TOBIN D J, BYSTRYN J C. Different populations of melanocytes are present in hair follicles and epidermis [J]. *Pigment Cell Res*, 1996, 9(6):304-310.
- [3] BARLOW J O, MAIZE J, LANG P G. The density and distribution of melanocytes adjacent to melanoma and nonmelanoma skin cancers [J]. *Dermatol Surg*, 2007, 33(2):199-207.
- [4] NISHIMURA E K, GRANTER S R, FISHER D E. Mechanisms of hair graying: incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche [J]. *Science*, 2005, 307(5710):720-724.
- [5] 谭城, 朱文元, 鲁严. 外毛根鞘无色素性黑素细胞的免疫组化研究 [J]. *中国皮肤性病学杂志*, 2006, 20(2):65-67.
- [6] KOCH M B, SHIG I M, WEISS S W, et al. Microphthalmia transcription factor and melanoma cell adhesion molecule expression distinguish desmoplastic/spindle cell melanoma from morphologic mimics [J]. *Am J Surg Pathol*, 2001, 25(1):58-64.
- [7] NISHIMURA E K, SUZUKI M, IGRAS V, et al. Key roles for transforming growth factor  $\beta$  in melanocyte stem cell maintenance [J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 6(2):130-140.
- [8] 卢涛, 金岩, 刘源, 等. 从人外毛根鞘细胞分离获取黑素母细胞 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(37):7361-7364.
- [9] COMMO S, GAILLARD O, BERNARD B A. Human hair greying is linked to a specific depletion of hair follicle melanocytes affecting both the bulb and the outer root sheath [J]. *British Journal of Dermatology*, 2004, 150:435-443.
- [10] 张汝芝, 朱文元, 马慧军, 等. 毛囊外根鞘 NK1/beteb 和 HMB-45 免疫组化及胰酶消化后细胞的电镜观察 [J]. *临床皮肤科杂志*, 2003, 32(10):570-572.
- [11] VACHTENHEIM J, BOROVANSKY J. 'Transcription physiology' of pigment formation in melanocytes: central role of MITF [J]. *Exp Dermatol*, 2010, 19(7):617-627.
- [12] GAGGIOLI C, BUSCA R, ABBE P. Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) is required but is not sufficient to induce the expression of melanogenic genes [J]. *Pigment Cell Res*, 2003, 16:374-382.

- [13] DONG F, YOSHIKI T, VIJAYASARADHI S. Selective down-regulation of tyrosinase family gene TYRP1 by inhibition of the activity of melanocyte transcription factor, MITF [J]. *Nucl Acids Res*, 2002, 30(14): 3096-3106.

## Location and characteristics of melanocytes of black-boned goat skin

XIE Guang-yue<sup>1</sup> LIU Gui-qiong<sup>1</sup> JIANG Xun-ping<sup>1</sup> HU Xue-ying<sup>2</sup> WANG Jian-guo<sup>3</sup>

1. *College of Animal Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;*

2. *College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;*

3. *Tongshan Black-boned Goat Breeding Co., Ltd, Tongshan 437600, China*

**Abstract** This paper focused on location and characteristics of melanocyte in skin of black-boned goat, providing clues for melanin deposition research. By immunohistochemistry staining, the localization of melanocytes in the black-boned goat skin with different coat colors (black and white) was examined. The mature melanocytes were determined by DOPA staining. The morphology of melanocytes was analyzed using hematoxylin-eosin (HE) staining. The immunohistochemistry results showed that melanocytes were mainly located in basal layer of epidermis and hair follicles; The DOPA staining revealed that melanocytes were not identifiable in basal layer of the two coat colors epidermis and white hair follicles but existed in the bulb of black hair follicles and outer root sheath. It turned out that there were mature melanocytes existing in the bulb of black hair follicles and outer root sheath, which could synthesize melanin. The hematoxylin-eosin (HE) staining results suggested that melanocytes in the outer root sheath of black hair follicles had intense pigmentation and a tendency for vacuolization while melanocytes in white hair follicles were elliptical shape and produced no melanin. What's more we can't distinguish the melanocytes from the other surrounding cells. Therefore, the activation of the melanocytes in the outer root sheath of black hair follicles might be the main reason for the melanin trait of black-boned goat.

**Key words** black-boned goat; melanocyte; chemical staining; outer root sheath

(责任编辑:边书京)