

# 不同被毛颜色羊驼皮肤组织中成熟黑色素细胞的组织学分析

姜俊兵, 董常生\*, 贺俊平

(山西农业大学动物科技学院 动物生物技术研究所, 太谷 030801)

**摘要:** 羊驼是已知家养动物中天然被毛颜色最为丰富的动物之一, 本研究旨在组织水平上观察不同被毛颜色羊驼皮肤组织中成熟黑色素细胞的分布与定位, 以揭示羊驼丰富被毛颜色发生的细胞学机制。试验选择白色被毛和有色被毛成年羊驼各 1 头, 盛毛期体侧取样, 制备石蜡切片, 分别采用多巴染色、甲苯胺蓝染色及多巴—甲苯胺蓝复染, 光镜观察、拍照。结果表明, 在不同被毛颜色羊驼皮肤组织中均有成熟黑色素细胞的分布, 但是分布规律不同, 在有色被毛皮肤组织主要分布于毛根成形部, 在毛根永久部及表皮也有分布, 但是数量较少; 白色被毛组织主要分布于表皮, 在毛根成形部分布很少, 而在真皮部及毛根永久部有少量分布。结果提示: 1) 羊驼不同被毛颜色发生取决于毛根成形部成熟黑色素细胞的数量; 2) 从一个侧面佐证了毛囊黑色素细胞与皮肤黑色素细胞在执行功能以及它们所接受的调节信号是不同的。

**关键词:** 羊驼; 被毛颜色发生; 多巴—甲苯胺蓝染色; 成熟黑色素细胞; 毛根成形部

中图分类号: S852.16

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)02-0229-05

## Histochemical Study on the Distribution of Mature Melanocytes in Skin of Alpaca (*Lama pacos*) with Different Coat Colors

JIANG Jun-bing, DONG Chang-sheng\*, HE Jun-ping

(Institute of Animal Bio-technology, College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

**Abstract:** Alpaca (*Lama pacos*) is one of the domestic animals with the most abundant coat colors. This experiment was conducted to observe the distribution of mature melanocytes in skin of alpacas with different coat colors, hope to explain the cytologic basis for coat color genesis of alpaca. Tissue samples were surgically separated from two mature alpacas, one with natural white coat color and one with pigmented coat color, at full-hairing stage. Paraffin sections were prepared conventionally. Dopa staining, toluidine blue staining and dopa-toluidine blue staining were executed to obtain the visible information about hair follicles and mature melanocytes distribution. The results showed that the mature melanocytes distributed both in skin with natural white and pigmented coat color. But the melanocytes distribution showed significantly regional difference. In pigmented coat color skin, the mature melanocytes distributed at the transient portion of hair root, a few in permanent portion of hair root and epidermis. In natural white coat color skin, the mature melanocytes mainly distributed in epidermis, a little in transient portion and a few in permanent portion of hair root. These results indicated that: 1) The coat colors genesis of alpacas is determined by the amounts of mature melanocytes distributed in transient portion of hair root. 2)

收稿日期: 2009-08-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(30571070; 30671512)

作者简介: 姜俊兵(1975-), 男, 山西武乡人, 副教授, 博士, 主要从事动物生物化学与分子生物学的研究, Tel: 0354-6289338, E-mail: sxndjeffrey@126.com

\* 通讯作者: 董常生, E-mail: cs\_dong@sxau.edu.cn

The mature melanocytes distributed in hair follicles or epidermis execute different function and could ascribe different endo-regulation system.

**Key words:** alpaca; coat color genesis; dopa-toluidine blue staining; mature melanocytes; hair root transient portion

黑色素细胞是动物皮肤和被毛颜色发生的细胞学基础。黑色素细胞研究先驱是意大利科学家 Sangiovanni (1775-1849), 他在 1819 年首次描述了黑色素细胞形态结构及与乌贼皮肤色素沉着的关系, 当时, 他将黑色素细胞定义为“色素胞”(chromatophores), 随后, 于 1837 年, 著名的解剖学家、生理学家 Henle 在人类的表皮中证实了黑色素细胞与皮肤色素沉着的关系。但在此后的一个多世纪里, 关于黑色素细胞的研究工作主要集中在不同物种黑色素细胞的鉴定、比较以及黑色素细胞的来源等方面, 直到 1917 年, 由于当时化学学科研究水平和技术手段的更新, 黑色素细胞研究工作取得了突破, Bloch 首次将 3,4-二羟(基)苯丙氨酸(3,4-dihydroxyphenylalanine, DOPA), 即多巴引入黑色素细胞研究, 并证明多巴是黑色素细胞内酶的特异性底物, 并将此(类)酶称为多巴氧化酶, 同年, Bloch 的同事 Lutz 发现紫外线可以促进多巴氧化酶活性增高, 第一次从细胞水平证明了黑色素细胞在缓减紫外线辐射方面的生理作用。Bloch 及其同事所建立的多巴染色方法为研究黑色素细胞发挥了重大的作用, 至今仍然是科学界研究黑色素细胞的一个重要的手段<sup>[1]</sup>。

毛发作为皮肤的衍生物, 其色素沉着机制长期以来一直被视为与皮肤色素沉着机制相似, 但随着人类研究白癜风发病机理及哺乳动物毛发色素沉着方面工作的不断深入, 一些新的理论或见解先后被提出或发现。以人类灰发症研究为例, 证明在人类毛囊中黑色素细胞的绝对数量差异不是导致灰发症的主要原因, 而是由不同毛囊周期中有活性黑色素细胞的差异所造成<sup>[2]</sup>; 在哺乳动物毛囊发生与毛发颜色形成方面, 发现皮肤黑色素细胞与毛囊黑色素细胞间存在明显差异, 皮肤黑色素细胞与毛囊黑色素细胞的发生是一致的, 但是二者的抗原特性和凋亡规律等方面存在明显差异, 也就是说, 哺乳动物毛发颜色形成机制与皮肤色素沉着机制是不同的<sup>[3]</sup>。

本研究, 采用多巴、多巴—甲苯胺蓝联合染色方法, 研究不同被毛颜色羊驼皮肤组织中黑色素细胞的分布情况, 以期揭示羊驼不同被毛颜色发生的细

胞学基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

不同被毛颜色羊驼皮肤组织分别采自“中华羊驼养殖基地”的成年公羊驼, 编号分别为白色被毛 B004 和有色被毛 A002。

参照文献报道方法<sup>[4]</sup>, 选取健康成年羊驼, 从体侧剪毛并刮净表皮, 0.5 h 后分离 1.5 cm×0.5 cm 大小皮肤, 等分为 2 块, 1 块置于多巴孵育液, 1 块置于 Bouin 氏液固定。

### 1.2 仪器设备与试剂

1.2.1 主要仪器设备 YD-6L 智能型生物组织包埋机(益迪, 浙江), YD-335 电脑切片机(益迪, 浙江), ZKD-6090 真空灭菌柜(智城, 上海), 202-1B 型电热恒温干燥箱(泰斯特, 天津), PHS-3C 精密酸度计(厦门), DMLB 型显微镜(LeiCa, 德国)。

1.2.2 主要试剂 0.005 6 mol·L<sup>-1</sup>多巴磷酸盐缓冲液(0.1 mol·L<sup>-1</sup>, pH 7.4), 0.11 g 多巴(Sigma, 德国)溶于 0.1 mol·L<sup>-1</sup>磷酸盐缓冲液, 定容于 100 mL。

0.5% 甲苯胺蓝配制, 取 0.5 g 甲苯胺蓝, 蒸馏水溶解, 定容于 100 mL。

### 1.3 方法

1.3.1 甲苯胺蓝染色 皮肤组织切片二甲苯脱蜡, 梯度酒精脱水; 0.5% 甲苯胺蓝染色 16 min 左右; 蒸馏水洗 3 次, 每次 1 min; 95% 快速脱水(将切片在酒精中蘸洗 10 次左右); 100% 酒精快速脱水(操作同上步); 二甲苯透明(3 次, 每次 5 min); 中性树脂封片。

1.3.2 多巴染色 取新鲜皮肤小块, 固定于 10% 甲醛溶液 3~5 h (4 ℃); 自来水速洗, 再经蒸馏水浸洗; 将组织块移入孵育液 1 h (37 ℃), 液体变为茶色; 换入新孵育液 16 h (37 ℃); 流水冲洗 1 h; 经 Bouin 氏液再固定 24 h; 水洗、脱水、透明、石蜡包埋; 切片、脱蜡、透明、封固(操作同常规动物组织切片制备)。

1.3.3 多巴—甲苯胺蓝复染 按照多巴染色步骤制作切片, 脱蜡至水, 0.5% 甲苯胺蓝染色 16 min, 以

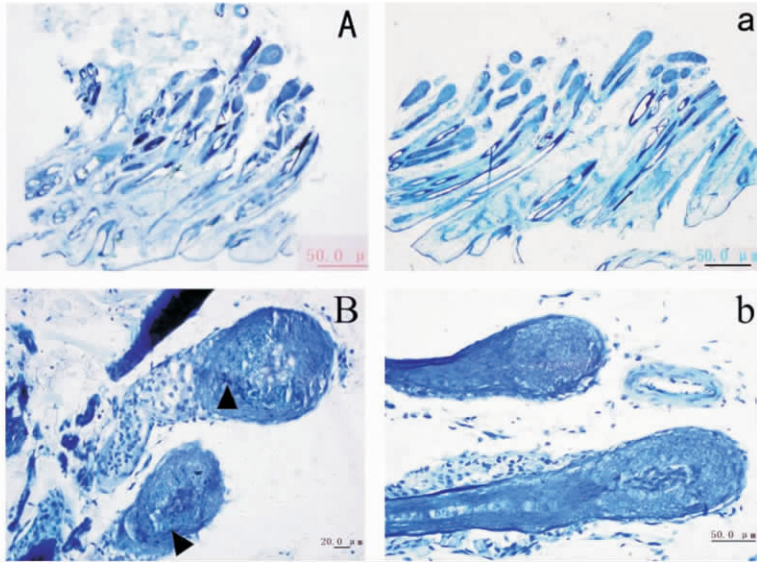
下按照甲苯胺蓝染色步骤操作,切片镜检拍照。

## 2 结果与分析

### 2.1 甲苯胺蓝染色结果

甲苯胺蓝染色结果见图 1,可见两种被毛颜色皮肤组织切片均能较好显示羊驼皮肤的结构特征。特别本研究需要显示羊驼皮肤组织中毛囊结构,获得毛囊纵向切开切片是试验的关键。从染色结果可见,羊驼的表皮较薄,真皮的厚度约是表皮厚度的

15~40 倍。表皮由角质层、颗粒层和棘细胞层构成,角质层较薄,颗粒层明显。皮肤表面有许多纤细的皮沟(skin groove)。真皮深部与皮下组织连接,两者之间没有明显的界限。毛囊分布于真皮部,可见完整的毛球(hair bulb)、真皮乳头(dermis papilla)以及毛根(hair root)的壶腹部(hair bulge),在光镜视野内,可以找到羊驼毛根的成形部(transient portion)和永久部(permanent portion),这就说明切片制作可以满足组织化学及免疫组织化学试验的要求。



A、B 分别为放大 4×,40× 有色被毛皮肤组织;a、b 分别为放大 4×,40× 白色被毛皮肤组织;▲ 指示有色被毛皮肤组织毛囊中的色素颗粒

A, B are skins with pigmented hair coat, and with a magnification of 4× and 40×, respectively;a, b are skins with natural white hair coat, and with a magnification of 4× and 40×, respectively; ▲ indicates the melanin in hair follicle

图 1 不同被毛颜色羊驼皮肤组织甲苯胺蓝染色结果

Fig. 1 Toluidine blue (TB) staining of skins from alpacas with different coat colors

光镜检测发现在有色被毛组织毛囊中,可见棕黑色的色素颗粒,而白色被毛组织中则看不到这种结果。

镜检可见,两种颜色被毛皮肤组织切片在同一放大倍数下,单位视野中白色被毛皮肤组织中的毛囊数量显著高于有色被毛皮肤组织中的数量(未作统计分析),这个结果支持本课题组有关被毛颜色与纤维直径呈相关关系的结论,即有色被毛(纯黑色除外)纤维直径大于白色被毛纤维直径。

### 2.2 多巴染色结果

多巴是酪氨酸酶的特异性底物,由酪氨酸酶催化生成棕黑色的多巴色素。多巴染色结果见图 2,镜检显示,2 种颜色的皮肤组织中均有多巴的阳性着色,在有色被毛皮肤组织中,多巴阳性着色主要集

中于毛囊,特别是毛球部,形成环形覆盖真皮乳头的“帽子样”着色带,顺着毛干方向,着色逐渐变弱,在有色被毛皮肤表皮部、真皮部结缔组织中也有少量多巴阳性着色;在白色被毛皮肤组织中,多巴阳性着色主要集中于表皮结缔组织中,形成沿表皮走向的阳性着色带,在白色被毛皮肤真皮部及少量毛囊外根鞘(outer sheath)部位,也有多巴阳性着色。

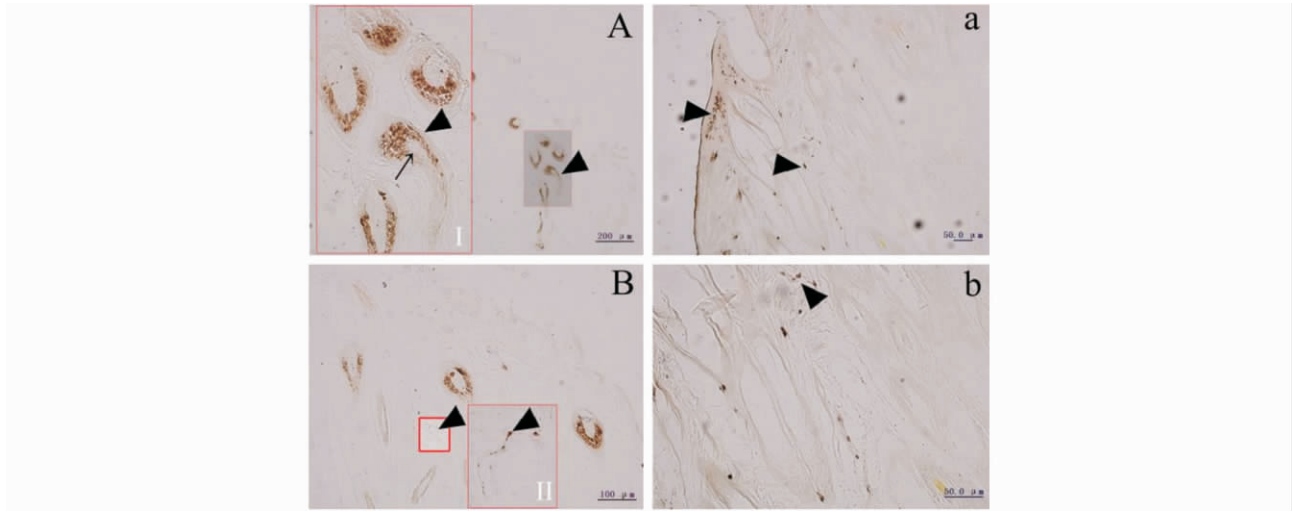
多巴阳性着色所显示的是多巴阳性黑色素细胞(dopa positive melanocyte),说明具有成熟黑色素细胞,在有色和白色被毛皮肤组织中具有分布,但分布部位不同。

### 2.3 多巴—甲苯胺蓝复染结果

多巴—甲苯胺蓝复染可以充分显示多巴阳性黑

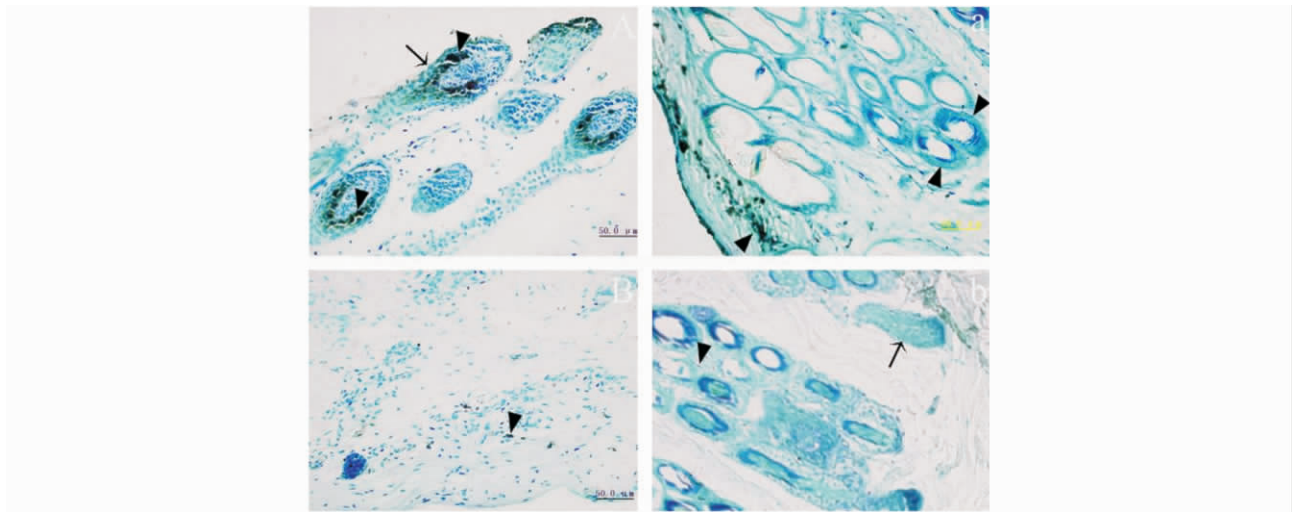
色素细胞在皮肤组织中的分布,从复染结果可见(图3),有色被毛组织中多巴阳性黑色素细胞主要分布于毛根成形部,大量集中于毛球部位;在白色被毛组

织,毛囊周围有多巴阳性黑色素细胞的分布,但是主要分布于毛根永久部,在毛球部位,即毛根成形部阳性着色不明显。



A、B分别为放大40×、20×有色被毛皮肤组织；a、b分别为放大40×、20×白色被毛皮肤组织；▲指示皮肤组织中的多巴阳性反应区；→指示毛球部及部分毛根成形部；I为A中复选框的40×放大；II为B中复选框的40×放大  
 A, B are skins with pigmented hair coat, and with a magnification of 40×, 20×, respectively; a, b are skins with natural white hair coat, and with a magnification of 40×, 20×, respectively; ▲ indicates the dopa-positive region in alpaca's skin; → indicates the hair bulb and partial transient portion of hair; I is the region of check box magnified 40× in A section; II is the region of check box magnified 40× in B section

图2 不同被毛颜色羊驼皮肤组织多巴染色结果  
 Fig. 2 Dopa staining of skins from alpacas with different coat colors



A、B放大40×有色被毛皮肤组织；a、b放大40×白色被毛皮肤组织；▲指示皮肤组织中的多巴阳性反应区；→指示毛球部及部分毛根成形部  
 A, B are skins with pigmented hair coat, and with a magnification of 40×; a, b are skins with natural white hair coat, and with a magnification of 40×; ▲ indicates the dopa-positive region in alpaca's skin; → indicates the hair bulb and partial transient portion of hair

图3 不同被毛颜色羊驼皮肤组织多巴-甲苯胺蓝复染结果  
 Fig. 3 Dopa-TB staining of skins from alpacas with different coat colors

## 3 讨 论

### 3.1 羊驼皮肤组织学结构特征

皮肤组织中存在大量的角化细胞及角蛋白,采用常规染色,如 HE 染色,往往着色效果不好,本试验选用甲苯胺蓝研究羊驼皮肤组织及毛囊的形态结构。

甲苯胺蓝染色结果显示,羊驼皮肤组织学结构与常见哺乳动物皮肤结构大体相似,羊驼表皮较其他毛用动物的表皮角质层较薄,颗粒层较厚,毛囊群中毛囊的数量较多。甲苯胺蓝染色结果一方面显示了羊驼皮肤组织及毛囊的结构特征,另一方面说明试验制备的组织切片完整性较好,适于后续有关研究工作的开展。

### 3.2 多巴染色结果分析

多巴是最早发现的黑色素细胞内特异性酶促反应底物<sup>[1]</sup>。后续的研究证明,多巴是黑色素细胞由酪氨酸酶特异性催化生成多巴色素的底物,多巴色素呈棕黑色,这个生化反应过程是黑色素细胞多巴染色的生物化学基础。组织化学水平上研究黑色素细胞的数量和分布,主要是通过酪氨酸酶作为分子标记来进行的。组织化学反应的阳性结果间接反映了阳性区域酪氨酸酶活性的高低,而酪氨酸酶活性的高低,可以在一定程度上说明其所在黑色素细胞色素合成速率的高低<sup>[5-7]</sup>。

毛囊解剖学、毛囊形态发生学研究已经证明,哺乳动物毛发着色主要来源于毛球部毛母质细胞间成熟黑色素细胞合成的色素<sup>[8]</sup>,而与毛囊所在皮肤组织中黑色素细胞的数量以及成熟程度无关<sup>[9]</sup>。

多巴染色在研究哺乳动物酪氨酸酶阳性黑色素细胞的分布、数量方面具有重要的价值,本研究选用多巴染色研究不同被毛颜色羊驼皮肤组织中的酪氨酸酶阳性黑色素细胞,结果说明,有色被毛组织毛球部酪氨酸酶阳性黑色素细胞是决定其着色的主要细胞学基础,而在白色被毛组织中,酪氨酸酶阳性黑色素细胞主要分布于表皮部位,与毛色形成关系不大。

### 3.3 多巴—甲苯胺蓝复染结果分析

多巴—甲苯胺蓝复染结果说明,在不同被毛颜色羊驼皮肤组织中均有酪氨酸酶阳性细胞的分布,但是分布规律不同,在有色被毛组织中,酪氨酸酶阳性黑色素细胞主要分布于毛根的毛球部,也就是毛根的成形部,在毛根永久部及表皮也有分布,但是数量较少;白色被毛组织中酪氨酸酶阳性黑色素细胞主要分布于表皮,在毛根成形部分布很少,而在真皮

部及毛根永久部有少量分布。

## 4 结 论

根据本研究的研究结果,初步可以得出以下结论:第一,羊驼毛色形成主要源于毛球部毛母质中的成熟黑色素细胞生成的黑色素颗粒,被转运至毛囊色素单位中的角化细胞,形成了毛干的颜色,即羊驼毛囊成形部多巴阳性率的高低,是导致其毛色差异的细胞学基础;第二,酪氨酸酶阳性的黑色素细胞在不同被毛颜色羊驼皮肤组织中均有分布,但分布部位不同,该研究结果可以从一个侧面说明,毛囊黑色素细胞与皮肤黑色素细胞在执行功能以及它们所接受的调节信号是不同的。

## 参考文献:

- [1] WESTERHOF W. The discovery of the human melanocyte[J]. *Pigment Cell Res*, 2006, 19(3): 183-193.
- [2] VAN NESTE D, TOBIN D J. Hair cycle and hair pigmentation: dynamic interactions and changes associated with aging[J]. *Micron*, 2004, 35(3): 193-200.
- [3] 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.
- [4] 尹俊,扈庭茂,李金泉,等. 内蒙古绒山羊毛囊兴盛期皮肤 cDNA 文库的构建及 KAP6-2 cDNA 的克隆[J]. *动物学研究*, 2004, 25(2): 166-171.
- [5] MANI I, SHARMA V, TAMBOLI I, et al. Interaction of melanin with proteins—the importance of an acidic intramelanosomal pH[J]. *Pigment Cell Res*, 2001, 14(3): 170-179.
- [6] ORLOW S J, BOISSY R E, MORAN D J, et al. Subcellular distribution of tyrosinase and tyrosinase-related protein-1: Implications for melanosomal biogenesis[J]. *J Invest Dermatol*, 1993, 100(1): 55-64.
- [7] MOELLMANN G, SLOMINSKI A, KUKLINSKA E, et al. Regulation of melanogenesis in melanocytes[J]. *Pigment Cell Res Suppl*, 1988, 1(s1): 79-87.
- [8] 高英茂. 组织学与胚胎学[M]. 北京:人民卫生出版社,2001, 165-172.
- [9] SLOMINSKI A, TOBIN D J, SHIBAHARA S, et al. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation[J]. *Physiol Rev*, 2004, 84: 1155-1228.