

# 内皮素 3 在不同毛色绵羊皮肤中的差异表达

杨姗姗<sup>1#</sup>, 白俊明<sup>1#</sup>, 范瑞文<sup>1</sup>, 耿建军<sup>1</sup>, 焦丁兴<sup>2</sup>, 周英<sup>1</sup>, 董常生<sup>1\*</sup>

(1. 山西农业大学动物科技学院, 太谷 030801; 2. 河北省清河县农业局, 清河 054000)

**摘要:** 本研究旨在探讨内皮素 3 在绵羊皮肤毛色中的作用。采用实时荧光定量 PCR、Western blotting 和免疫组织化学对内皮素 3 在黑色和白色绵羊皮肤中的表达差异进行分析。实时荧光定量 PCR 结果显示, 内皮素 3 在黑色绵羊皮肤中的相对表达量较高, 是其在白色绵羊皮肤中的表达量的 2.89 倍, 且差异极显著 ( $P < 0.01$ ); Western blotting 结果显示, 内皮素 3 在黑色绵羊皮肤总蛋白中的表达量极显著高于其在白色绵羊皮肤总蛋白中的表达量 ( $P < 0.01$ ); 免疫组织化学结果表明, 内皮素 3 在白色绵羊皮肤毛囊的毛乳头上、毛球底部及外根鞘呈阳性表达, 而在黑色绵羊皮肤毛囊的毛球底部和部分外根鞘呈阳性表达。综上所述, 内皮素 3 可能参与绵羊毛色形成。

**关键词:** 内皮素 3; 皮肤; 绵羊

中图分类号: S852.1

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2015)11-2111-06

## The Different Expression of Endothelin 3 in Sheep Skins

YANG Shan-shan<sup>1#</sup>, BAI Jun-ming<sup>1#</sup>, FAN Rui-wen<sup>1</sup>, GENG Jian-jun<sup>1</sup>,

JIAO Ding-xing<sup>2</sup>, ZHOU Ying<sup>1</sup>, DONG Chang-sheng<sup>1\*</sup>

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China; 2. Qinghe County Agricultural Bureau of Hebei Province, Qinghe 054000, China)

**Abstract:** To investigate the function of endothelin 3 (Edn3) in sheep skins and the regulation of hair color formation, the differential expression of Edn3 in skins of black versus white sheep was examined. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR), Western blotting and immunohistochemistry methods were performed. The results showed that the quantity expression of Edn3 mRNA in black sheep was 2.89 times than in white sheep ( $P < 0.01$ ); the average protein expression of Edn3 in black sheep skin was higher than in white sheep skin on the optical density ( $P < 0.01$ ). The results of immunohistochemistry revealed that Edn3 was localized in the hair dermal papilla, lower of hair bulb and outer root sheath in hair follicles of sheep with white hair color, but was localized in lower of hair bulb and outer root sheath in hair follicles of sheep with black hair color. The differential expression and localization of Edn3 in skin of white versus black sheep suggests a potential role in hair color regulation.

**Key words:** endothelin3 (Edn3); skin; sheep

内皮素 (Endothelin, Edn) 是由 21 个氨基酸组成的多肽, 存在于血管内皮和各种组织及细胞中, 参与心血管功能的调节, 在维持基础血管张力与心血

管系统稳态方面有着重要作用。内皮素包含 3 种异构体: Edn1、Edn2 和 Edn3<sup>[1]</sup>。在这 3 种内皮素异构体中, Edn3 对来源于神经脊 (NC) 细胞的黑素细

收稿日期: 2015-01-08

基金项目: 国家“863”计划 (2013AA102506); 公益性行业 (农业) 科研专项 (201303119); 农业部“948”项目 (2011-Z33)

作者简介: 杨姗姗 (1987-), 女, 河北石家庄人, 博士生, 主要从事羊驼毛色研究, E-mail: shanshan0321@163.com; 白俊明 (1984-), 男, 山西忻州人, 硕士, 主要从事羊驼毛色研究, E-mail: baibai84aa@163.com。杨姗姗与白俊明为并列第一作者

\* 通信作者: 董常生, 教授, 主要从事生物工程研究, E-mail: cs-dong@sxau.edu.cn

胞的发育有着主要作用<sup>[1]</sup>。在胚胎发生过程中, Edn3 不仅控制起源神经嵴黑素细胞转化的开始并可以维持其表型;在体外 Edn3 可以促进培养的正常的人体黑色素细胞、痣细胞和黑色素瘤细胞的生长和迁移<sup>[2]</sup>。越来越多的研究表明:Edn3 在促进黑色素细胞增殖的同时对黑色素的合成也有重要的调节作用。另有研究证明内皮素信号在黑色素细胞的发育和存活的过程中有着至关重要的作用<sup>[3]</sup>。目前,人们对 Edn3 在黑色素细胞中黑色素生成和皮肤色素沉积的研究仅仅局限在体外对人、鼠<sup>[4-6]</sup>、鹌鹑<sup>[7]</sup>等少数动物,而对毛用动物体内的研究甚少。

绵羊是一种经济价值较高的毛用动物,毛色是绵羊的重要性状之一,化学染色是羊毛实现色彩多样性的主要手段,对人类健康以及环境保护产生不良影响。因此,从分子水平改变绵羊毛色将具有重要的意义,而发掘毛色基因及其功能将为此提供理论依据。动物毛色由黑色素的含量与分布决定,由多个基因调控<sup>[8]</sup>。关于 Edn3 在绵羊不同毛色形成过程中的作用未见报道,因此,本试验以白色和黑色绵羊为研究对象,对 Edn3 在皮肤中的表达进行研究。

表 1 目的基因引物序列和退火温度

Table 1 Primer sequences and annealing temperature of PCR amplification of target genes

目的基因 Target gene	引物序列(5'-3') Primer sequence	产物/bp Products
<i>Edn3</i>	F:TTTGCTCTTCTTCCTTA,R:TATTCTCGGTAGTGTCCC	163
<i><math>\beta</math>actin</i>	F:CCTGACCGGAAGAGGAATC,R:AAAACAGGGGTTGAACTC	150

#### 1.4 RNA 提取和 cDNA 合成

用 Trizol 法提取总 RNA。各取白色和黑色绵羊皮肤总 RNA 1  $\mu$ L,快速电泳检测其质量。

按照 TaKaRa 公司反转录试剂盒进行绵羊皮肤 cDNA 合成,反应体系:Oligo dT(50  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>)或 Random 6 mers(50  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>)1  $\mu$ L,dNTP Mixture(10 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> each)1  $\mu$ L,总 RNA  $\leq$ 5  $\mu$ g,用 RNase free 水补足至 10  $\mu$ L。反应条件:65  $^{\circ}$ C 5 min,反应结束,立即置于冰上冷却。在此体系中再加入 5 $\times$ PrimeScript II Buffer 4  $\mu$ L,RNase Inhibitor(40 U  $\cdot$   $\mu$ L<sup>-1</sup>)0.5  $\mu$ L,PrimeScript II RTase(200 U  $\cdot$   $\mu$ L<sup>-1</sup>)1  $\mu$ L,用 RNase free 水补足至 20  $\mu$ L。反应条件:42  $^{\circ}$ C 30~60 min,95  $^{\circ}$ C 5 min。反应结束后,置于冰上冷却,-20  $^{\circ}$ C 保存备用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

选取白色和黑色成年雄性绵羊各 3 只。选取绵羊背侧皮肤,净毛后,用取皮器取绵羊皮肤组织 3 块(0.8 cm<sup>2</sup>)。其中两块置于液氮中,分别用于实时荧光定量 PCR 和 Western blotting;1 块置于 4% 的 Bouin's 固定液中,固定 24 h,石蜡包埋,切成 5  $\mu$ m 的切片,用于免疫组织化学试验。

### 1.2 主要试剂

兔抗内皮素 3 多克隆抗体(博奥森),山羊抗兔二抗(康为世纪),DAB 显色试剂盒(武汉博士德),Trizol Reagent(Invitrogen),2 $\times$ Es Taq MasterMix(康为世纪),DL2000 DNA Marker(TaKaRa),反转录试剂盒(TaKaRa),SYBR<sup>®</sup> PrimeScriptTM RT-PCR Kit(Life)。

### 1.3 引物设计

通过对 GenBank 上的各个物种 Edn3 序列进行 Blast 后,获取保守序列并利用 Primer5.0 引物设计软件,设计荧光定量 PCR 扩增引物,通过 NCBI 初步检测引物的特异性。引物由华大基因公司合成。引物见表 1。

按照 Life 试剂盒进行实时荧光定量 PCR,每个样本设 3 次重复,依次在冰上加样:SYBR<sup>®</sup> Select Master Mix 10  $\mu$ L,上下游引物(10  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>)各 0.4  $\mu$ L,cDNA 1  $\mu$ L,用 RNase free 水补足至 20  $\mu$ L。反应条件:95  $^{\circ}$ C 30 s;95  $^{\circ}$ C 5 s,55  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 10 s,40 个循环,内参基因同样反应条件。反应结束,由溶解曲线判定 PCR 反应的特异性,根据标准曲线以及荧光曲线的 Ct 值计算定量结果。数据用 SPSS16.0 软件,应用方差分析进行生物统计学分析。不同样本的 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup>法<sup>[9]</sup>用单因子方差分析,分析结果用“平均值 $\pm$ 标准误(Means $\pm$ SE)”表示,内皮素 3 mRNA 的表达差别倍数用 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup>表示。

### 1.5 免疫组织化学

固定 24 h 后的绵羊皮肤进行脱水透明后,在石

蜡中进行包埋,然后切片烘干进行免疫组织化学试验。试验步骤:石蜡切片常规脱蜡、脱水,每张切片滴加一滴 3%  $H_2O_2$ ,置于 37 °C 烘箱中,20 min 用于灭活内源性过氧化物酶<sup>[8]</sup>;PBS 清洗 3 次,滴加 5% 牛血清白蛋白,37 °C 烘箱放置 20 min 进行封闭,甩掉封闭液,滴加 1:100 兔抗 Edn3 多克隆抗体,4 °C 过夜;取出后,25 °C 反应 30 min,PBS 清洗 3 次。滤纸吸干 PBS,滴加二抗,37 °C 孵育 30 min,PBS 清洗 3 次。滴加 DAB 显色试剂,显色 5 min,根据显色情况终止显色。脱水、透明后,用中性树胶封片。显微镜下观察结果。用 PBS 取代一抗作为阴性对照,对染色结果的阳性产物进行分析。

### 1.6 总蛋白的提取与 Western blotting 检测

提取液氮内剩余的绵羊皮肤组织的总蛋白。用 BCA 法测定蛋白浓度,每孔总蛋白上样量为 100  $\mu$ g,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,转移至 PVDF 膜,PVDF 膜用 5% 脱脂奶粉封闭,室温封闭 1.5~2.0 h;将 PVDF 膜放入含有稀释好的一抗的平皿中,4 °C 摇床过夜孵育;用 TBST 洗膜,每次 10 min,共 3 次;加入二抗,37 °C 摇床孵育 30 min,BST 洗膜,加入 ECL 发光剂<sup>[9]</sup>,用显影剂和定影粉进行胶片曝光处理。用 Image proplus 6.0 软件(Olympus)对绵羊皮肤组织总蛋白中的 Edn3 和  $\beta$ -actin 免疫印迹结果进行半定量分析:蛋白总量=条带面积 $\times$ 灰度值,Edn3 与内参蛋白  $\beta$ -actin 对比。数据用 SPSS16.0 软件进行生物学分析,不同样本的光密度用单因子方差分析,所得结果用“平均值 $\pm$ 标准误(Means $\pm$ SE)”表示。

## 2 结果

### 2.1 Edn3 基因的 mRNA 表达结果

从扩增动力学曲线上看,本研究结果符合标准的“S”形荧光增长长曲线,目的基因 *Edn3* 和内参基因  $\beta$ -actin 的扩增动力学曲线整体平行性较好,基线无明显上扬趋势(图 1A)。从扩增溶解曲线上看,曲线为单峰,表明在实时荧光定量 PCR 过程中,没有非特异性的扩增产物,荧光强度均来自于特异性的扩增产物,目的基因 *Edn3* 及内参基因  $\beta$ -actin 没有非特异性扩增及引物二聚体产生(图 1B)。结果表明,在 mRNA 水平,*Edn3* 基因在黑色绵羊皮肤中的相对表达量是白色绵羊皮肤的 2.89 倍。且二者表达差异极显著( $P < 0.01$ )(图 2)。

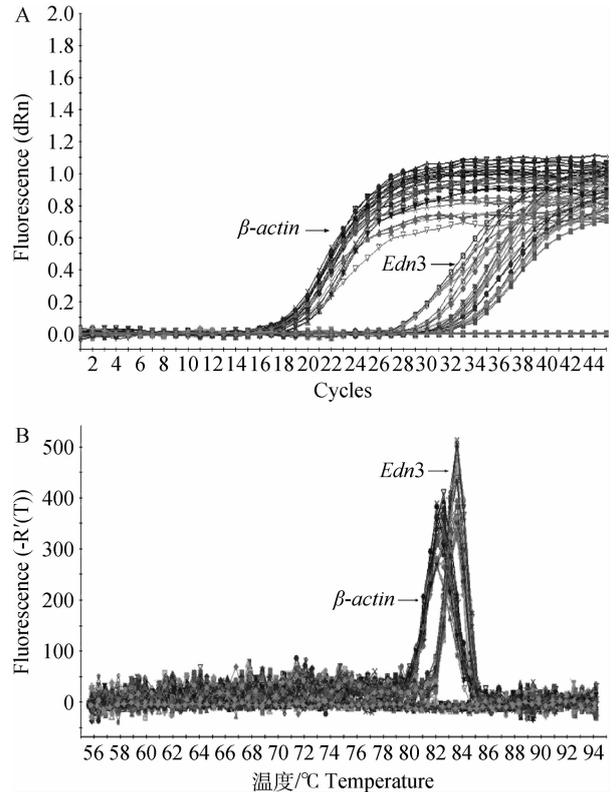
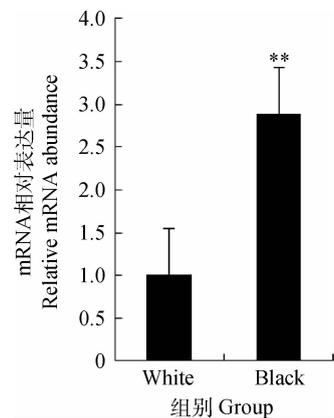


图 1 *Edn3* 基因和内参基因的扩增动力学曲线(A)和溶解曲线(B)

Fig. 1 PCR amplification plot (A) and dissociation curve (B) of *Edn3* and  $\beta$ -actin gene



\*\* .  $P < 0.01$ . 下同

\*\* .  $P < 0.01$ . The same as below

图 2 *Edn3* mRNA 在不同毛色绵羊皮肤中的表达

Fig. 2 *Edn3* mRNA expression in sheep skins with different hair color

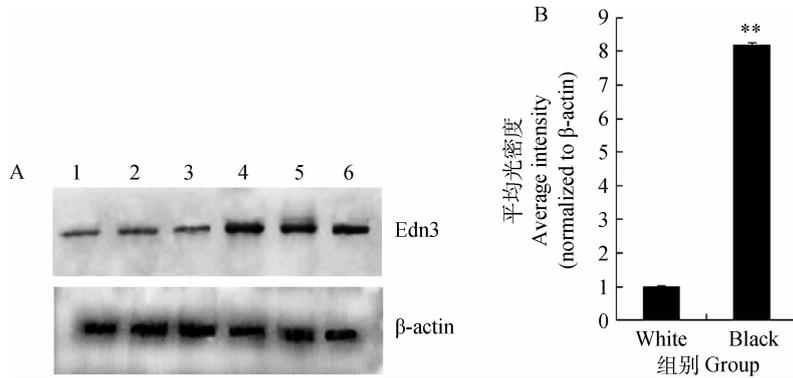
### 2.2 绵羊皮肤中 Edn3 蛋白表达结果

Western blotting 结果显示,绵羊皮肤总蛋白中存在与兔抗 *Edn3* 多克隆抗体发生免疫阳性反应的蛋白条带,且分子量符合实际大小。对不同毛色

的绵羊皮肤内 Edn3 蛋白表达进行定性分析。从图中可以看出在黑色绵羊皮肤中,Edn3 蛋白水平表达较显著,而在白色绵羊皮肤中检测到的信号较弱(图 3A)。应用 Inage proplus 6.0 软件对 Edn3、内参  $\beta$ -actin 的免疫印迹进行半定量分析,结果显示,Edn3 蛋白在白色绵羊皮肤中的平均蛋白含量为  $0.18 \pm 0.074$ ;在黑色绵羊皮肤中的平均蛋白含量为  $1.47 \pm 0.12$ ,两者差异极显著( $P < 0.01$ )(图 3B)。

### 2.3 绵羊 Edn3 蛋白在皮肤组织中的分布

免疫组织化学染色结果显示,Edn3 在白色绵羊皮肤和黑色绵羊皮肤的毛囊中均有免疫阳性反应,但不同毛色的绵羊皮肤毛囊其表达部位不同(图 4)。在白色绵羊中(图 4A、B),Edn3 免疫阳性反应细胞分布在皮肤毛囊的毛乳头上方,毛球底部和外根鞘;在黑色绵羊中(图 4C、D),Edn3 免疫阳性细胞主要分布在皮肤毛囊的毛球底部和部分外根鞘。

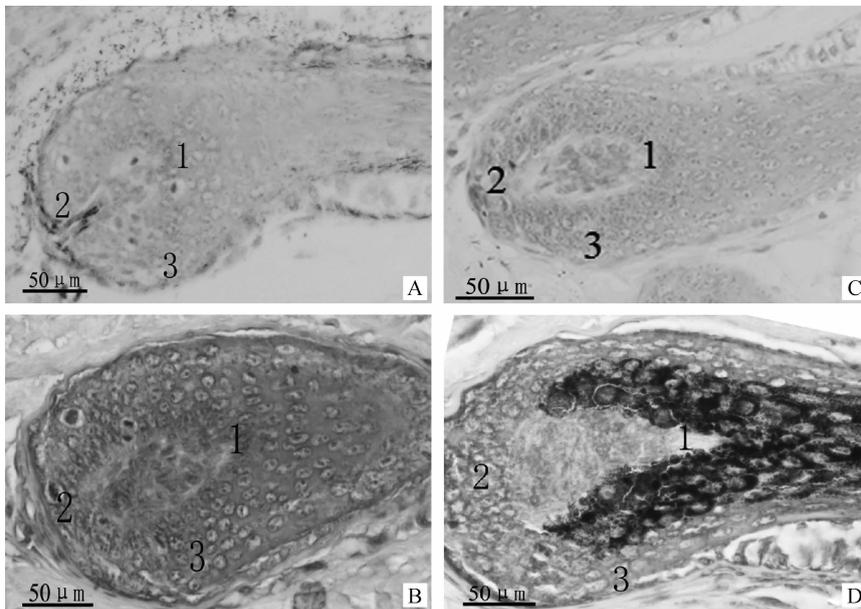


A. 1~3、4~6. 白色和黑色绵羊皮肤总蛋白中的阳性印迹信号;B. 印迹条带的平均光密度分析。内参为  $\beta$ -actin, 数据用“平均值 $\pm$ 标准误”表示

A. The bands were the positively blotting signal with the rabbit Edn3 polyclonal antibody and goat anti-rabbit IgG conjugated HRP as the second antibody. 1-3 from sheep skins with white hair color and 4-6 from sheep skins with black hair color; B. The average intensity of blotting band was analyzed. The level of protein was normalized relative to  $\beta$ -actin. Bars in each panel represent the mean  $\pm$  standard error

图 3 Edn3 蛋白在绵羊皮肤中的表达

Fig. 3 Edn3 protein expression in sheep skin



A 和 B. Edn3 在白色绵羊皮肤中的定位;C 和 D. Edn3 在黑色绵羊皮肤中的定位;A 和 C. 阴性对照;B 和 D. 试验组。1. 毛乳头上方;2. 毛球;3. 外根鞘

A, B. Edn3 localization in sheep skin with white hair color; C, D. Edn3 localization in sheep skin with black hair color. A, C. Negative control; B, D. Experiment groups; 1. Upper hair dermal papilla; 2. Hair bulb; 3. Outer root sheath

图 4 Edn3 蛋白在绵羊皮肤中的定位 40 $\times$

Fig. 4 Localization of Edn3 protein in sheep skin 40 $\times$

### 3 讨 论

哺乳动物被毛的颜色主要是由沉着在皮肤内黑色素的量及其种类决定的,黑色素主要包括真黑色素(Eumelanin)和褐黑色素(Pheomelanin)两类,真黑色素和褐黑色素的相对数量决定了动物皮肤与被毛颜色<sup>[10]</sup>。黑色素细胞是哺乳动物毛色形成的基础,在胚胎发育过程中黑色素细胞由神经嵴细胞分化并定向迁移到全身各个组织,其定向分化、迁移与 MITF、FGF-2、内皮素以及诸多因子有关<sup>[11]</sup>。

内皮素是参与黑色素细胞生物学过程的主要旁分泌因子之一,在其早期发育过程中起着重要作用<sup>[12]</sup>。本研究发现,在白色绵羊皮肤毛囊的毛乳头上方、毛球底部及外根鞘和黑色绵羊皮肤毛囊的毛球底部及外根鞘均存在 Edn3 阳性免疫反应物。而毛球是向毛干提供黑色素的部位,其含有大量黑色素细胞,胞质中含有黑色素颗粒<sup>[13]</sup>。在哺乳动物黑色素细胞中,G 蛋白偶联内皮素受体 B(Ednrb) 途径功能的丢失或突变都会导致胚胎中黑色素细胞前体的数量减少,从而引起毛色的改变<sup>[14]</sup>。Edn3 是 Ednrb 的配体<sup>[15]</sup>。说明长期的 Edn3 通过激活 Ednrb2 可以促进黑色素细胞的分化。另有资料报道,Ednrb 与 MITF 具有一定的机制关联性<sup>[16]</sup>,MITF 可结合到与黑色素合成有主要关系的 TYRP2 启动子区域来控制它们的转录,TYRP2 可以直接参与黑色素生成调控过程,调节黑色素细胞的发育、生存和功能。证明 Edn3 结合 Wnt3a 和 Kit-配体(Kitl、SLF 和 SCF)诱导人胚胎干细胞表达生黑素标记物,Mitf 和 Sox10,产生黑色素小体,从而产生黑色素<sup>[17]</sup>。因此,笔者认为 Edn3 的表达差异使 Ednrb 和 KIT 差异性调控 MITF 的表达,进而调控黑色素合成路径上 TYRP2 和 TYR 的表达,导致黑色绵羊皮肤中色素含量升高。本试验结果也发现黑色绵羊皮肤中 Edn3 基因的表达水平显著高于白色绵羊,可能支持 Edn3 与毛色相关的结论。

在体内,缺失 Ednrb 或 Kit 信号肽都会引起部分黑色素细胞的丢失,Edn3 与 Kit1 共同作用可以促进黑色素细胞的增殖、分化和存活。只有在 Edn3 和 Kit1 同时存在的条件下,才会引起成黑素细胞数量的显著增加和产生具有功能完全的黑色素细胞<sup>[12]</sup>。KIT 的激活作用可以快速引起 MAPK 介导的 MITF 磷酸化,与激活因子家族相互作用进而调控 MITF 的转录活性,从而调控黑色素沉着。但

Edn3 蛋白是否在毛囊的黑色素细胞中通过上调 KIT 和 Ednrb 表达,促使 KIT 和 Ednrb 与 MITF 作用,上调毛囊黑色素细胞中 MITF 蛋白的表达,参与绵羊毛色的形成,有待于进一步研究。

### 4 结 论

Edn3 定位于绵羊皮肤毛囊中黑色素细胞分布的部位,且在不同毛色的绵羊皮肤中存在差异性表达,结果说明 Edn3 与绵羊毛色形成过程具有一定的相关性。

### 参考文献(References):

- [1] AMY S, LIDIA K. Roles of endothelin signaling in melanocyte development and melanoma[J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2010, 23(2): 160-170.
- [2] REID K, TURNLEY A M, MAXWELL G D, et al. Multiple roles for endothelin in melanocyte development; regulation of progenitor number and stimulation of differentiation[J]. *Development*, 1996, 122(12): 3911-3919.
- [3] 耿建军, 白俊明, 范瑞文, 等. 内皮素-3 对羊驼黑色素细胞特征及细胞内毛色基因表达的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2013, 44(7): 1070-1077.  
GENG J J, BAI J M, FAN R W, et al. The effects of endothelin-3 on the melanocyte characteristic and expression of hair color genes in melanocytes from alpaca (*Lama pacos*) in vitro[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2013, 44(7): 1070-1077. (in Chinese)
- [4] KADONO S, MANAKA I, KAWASHIMA M, et al. The role of the epidermal endothelin cascade in the hyperpigmentation mechanism of lentigo senilis[J]. *J Invest Dermatol*, 2001, 116(4): 571-577.
- [5] MANAKA L, KADONO S, KAWASHIMA M, et al. The mechanism of hyperpigmentation in seborrheic keratosis involves the high expression of endothelin converting enzyme1 alpha and TNF alpha, which stimulate secretion of endothelin1[J]. *Br Dermatol*, 2001, 145: 895-903.
- [6] OKAZAKI M, YOSHIMURA K, UCHIDA G, et al. Epidermal hyperpigmentation in non-syndromic solitary cafe-au-lait macules may be associated with increased secretion of endothelin-1 by lesional keratinocytes[J]. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*, 2005, 39(4): 213-217.
- [7] LAHAV R, DUPIN E, LECOINE L, et al. Endothe-

- lin-3 selectively promotes survival and proliferation of neural crest-derived glial and melanocytic precursors *in vitro* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 14214-14219.
- [8] 张俊珍, 范瑞文, 杨姗姗, 等. 羊驼皮肤中可溶性鸟苷酸环化酶的表达差异[J]. 畜牧兽医学报, 2013, 44(7): 1057-1062.
- ZHANG J Z, FAN R W, YANG S S, et al. The different expression of soluble guanylate cyclase in alpaca skin [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2013, 44(7): 1057-1062. (in Chinese)
- [9] 张丹丽, 田 雪, 范瑞文, 等. APC 在羊驼皮肤组织中的表达和定位分析[J]. 畜牧兽医学报, 2014, 45(2): 327-332.
- ZHANG D L, TIAN X, FAN R W, et al. Expression and location analysis of APC in alpaca skin [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2014, 45(2): 327-332. (in Chinese)
- [10] SIMON J D, PELES D N. The red and the black [J]. *Acc Chem Res*, 2010, 43(11): 1452-1460.
- [11] 耿建军, 穆晓丽, 孙乐天, 等. 内皮素受体 B 在不同毛色羊驼皮肤中的表达与定位 [J]. 畜牧兽医学报, 2010, 41(11): 1478-1484.
- GENG J J, MU X L, SUN L T, et al. Expression and immunolocalization of endothelin receptor B in alpaca skin of different colors [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2010, 41(11): 1478-1484. (in Chinese)
- [12] SALDANA-CABOVERDE A, KOS L. Roles of endothelin signaling in melanocyte development and melanoma [J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2010, 23(2): 160-170.
- [13] SLOMINSKI A, WORTSMAN J, PLONKA P M, et al. Hair follicle pigmentation [J]. *J Invest Dermatol*, 2005, 124(1): 13-21.
- [14] 张 晖, 戈婷婷, 彭沙沙, 等. 泰和乌骨鸡皮肤黑色素与多泡脂肪细胞的超微结构研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2014, 45(5): 815-820.
- ZHANG H, GE T T, PENG S S, et al. Ultrastructural investigation on melanin and multilocular adipocyte in skin of taihe black-bone fowl [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2014, 45(5): 815-820. (in Chinese)
- [15] LAHAV R. Endothelin receptor B is required for the expansion of melanocyte precursors and malignant melanoma [J]. *Int J Dev Biol*, 2005, 49(2-3): 173-180.
- [16] KAYO S, EMI K N, EIJIRO A, et al. Epistatic connections between microphthalmia-associated transcription factor and endothelin signaling in Waardenburg syndrome and other pigmentary disorders [J]. *FASEB J*, 2008, 22: 1155-1168.
- [17] FANG D, LEISHEARE K, NGUYEN T K, et al. Defining the conditions for the generation of melanocytes from human embryonic stem cells [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(7): 1668-1677.

(编辑 程金华)