

# TGF- $\beta$ 3 对体外培养的羊驼黑色素细胞的影响

刘 彧, 石占全, 姬凯元, 杨姗姗, 范瑞文\*

(山西农业大学动物科技学院, 太谷 030801)

**摘要:** 为了研究转化生长因子  $\beta$ 3 (Transforming growth factor beta3, TGF- $\beta$ 3) 对体外培养的羊驼皮肤黑色素细胞表型的影响。本研究在体外培养的羊驼皮肤黑色素细胞中添加不同浓度 TGF- $\beta$ 3 (6.25、12.5、25、50 ng  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>), 通过实时监测和检测细胞增殖、毛色相关基因小眼畸形相关转录因子 (Microphthalmia-associated transcription factor, MITF)、酪氨酸酶 (Tyrosinase, TYR) 和酪氨酸酶相关蛋白 2 (Tyrosinase related protein 2, TYRP2) 表达以及黑色素产量的变化。结果表明: (1) 在羊驼皮肤黑色素细胞中添加 50 ng  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 浓度的 TGF- $\beta$ 3 后, 在前 30 h 内对细胞增殖有抑制效果, 30 h 后对细胞增殖有明显的长时程维持细胞数量作用, 但对 TGF- $\beta$ 3 添加的剂量没有依赖性; (2) 添加 TGF- $\beta$ 3 后, 黑色素细胞内 MITF、TYR 和 TYRP2 的表达量均被下调, 而且黑色素细胞产生黑色素的数量也被下调, 主要以添加 50 ng  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 时下调最为显著。结果揭示, TGF- $\beta$ 3 通过对羊驼黑色素细胞内 MITF、TYR 和 TYRP2 的表达的影响, 并调控黑色素的产生, 对黑色素细胞的生物学功能具有重要的影响。

**关键词:** 转化生长因子  $\beta$ 3; 黑色素; 黑色素细胞; 羊驼

中图分类号: S852.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2015)05-0746-06

## The Effect of TGF- $\beta$ 3 on the Melanocyte Cultured *in vitro* of Alpaca

LIU Yu, SHI Zhan-quan, JI Kai-yuan, YANG Shan-shan, FAN Rui-wen\*

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

**Abstract:** The aim of this study was to investigate the effect of TGF- $\beta$ 3 on the phenotype of alpaca melanocyte cultured *in vitro*. The melanocyte proliferation, gene expression of MITF, TYR and TYRP2 at the transcript and translation level were detected and melanin production was analyzed after the addition of TGF- $\beta$ 3 with different concentrations of 6.25, 12.5, 25, 50 ng  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> in melanocyte medium. The results showed that: Compared to the normal melanocyte, the proliferation of melanocytes was inhibited within 30 h by the addition of 50 ng  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> TGF- $\beta$ 3 and then the amount of cells could be maintained without dependence on the concentration of TGF- $\beta$ 3 after 30 h; MITF, TYR and TYRP2 expression were down-regulated and melanin production also reduced after the addition of TGF- $\beta$ 3. The dose of 50 ng  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> TGF- $\beta$ 3 caused more significant effects. The results suggested that TGF- $\beta$ 3 had the important effects on the biology of alpaca melanocyte by regulating the expression of MITF, TYR, TYRP2 and melanin production.

**Key words:** TGF- $\beta$ 3; melanin; melanocyte; alpaca

转化生长因子  $\beta$  (Transforming growth factor beta, TGF- $\beta$ ) 有 3 个不同的家族成员, 分别为 TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2 和 TGF- $\beta$ 3<sup>[1-3]</sup>。TGF $\beta$  是一种多功能细

胞因子, 对细胞凋亡、细胞生长停滞以及其他生理和病理反应起着重要的诱导作用<sup>[4-8]</sup>。TGF $\beta$  及其受体还是黑色素细胞成熟分化时有效的抑制因子, 主要通过有效的抑制 MITF 的表达, 从而抑制黑色素

收稿日期: 2014-06-25

基金项目: 国家自然科学基金(31201868); 山西省科技攻关项目(20120311024-2)

作者简介: 刘 彧(1989-), 女, 山东安丘人, 硕士生, 主要从事羊驼毛色研究, Tel: 0354-6288980, E-mail: 18404966089@163.com

\* 通信作者: 范瑞文, 教授, 主要从事动物解剖学与组织胚胎学教学与科研工作, E-mail: ruiwenfan@163.com

细胞的成熟<sup>[9]</sup>。

黑色素细胞形状不规则大多数呈梭形或多边形,细胞核呈卵圆形,黑色素细胞内散在分布电子密度高,质地均匀,大小不等,形态规则,一般呈圆形或卵圆形的合成黑色素的细胞器-黑素体。黑色素细胞中散在分布黑素体,当黑素体成熟时,内含电子密度高的黑色素可从胞质内释放进入黑色素细胞外的结缔组织中,在其周围的胶原纤维束中含有大小不等,体积一般较黑素体小,没有规则形状的电子致密的黑色素颗粒,黑色素细胞内的黑素体与释放出的黑色素颗粒大小和形状完全不同<sup>[10]</sup>。

黑色素细胞分泌大量的 TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2 和 TGF- $\beta$ 3,并且所有的亚型都在高发性黑色素瘤细胞中表达<sup>[11-13]</sup>。尽管已有研究报道 TGF- $\beta$  在黑色素细胞、黑色素瘤细胞发育和成熟过程中至关重要,但在黑色素细胞内 TGF- $\beta$ 3 作为外源的影响因子,调控其产生黑色素的机制还知之甚少,本课题组对 TGF- $\beta$ 1 在羊驼皮肤和黑色素细胞中的作用做了系列研究,为了揭示 TGF- $\beta$ 3 与羊驼皮肤黑色素合成中一些基因和蛋白的关系,拟将 TGF- $\beta$ 3 作用于体外培养的羊驼皮肤黑色素细胞,分析黑色素细胞的形态、毛色基因(*MITF*、*TYR* 和 *TYRP2*)表达以及色素产量的变化,旨在为研究 TGF- $\beta$ 3 对羊驼皮肤毛色黑色素生成的调控提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 正常羊驼皮肤黑色素细胞的培养

无菌切取 1~3 岁羊驼的背部皮肤组织,用含双抗预冷的 PBS 溶液反复冲洗,去除皮下的结缔组织,切成宽约 0.2 mm 的小条,0.25% Dispase II 酶 4 °C 过夜,即冷消化 16~18 h,真皮与表皮分离,用 1.5 g · L<sup>-1</sup> 胰酶消化液将表皮于 37 °C 消化 5~8 min,吸管反复吹打,200 目不锈钢筛网过滤,4 °C 1 000 r · min<sup>-1</sup> 离心,用黑色素细胞培养液(MGM)重悬细胞,计数后以 5 × 10<sup>5</sup> 个 · mL<sup>-1</sup> 的密度接种于 6 孔培养板中。MGM 的组成:DMEM/F12 基础培养基、庆大霉素 200 U · L<sup>-1</sup>、CT 0.25 mg · L<sup>-1</sup>、胰岛素 150 U · L<sup>-1</sup>、氢化可的松 3 mg · L<sup>-1</sup>、bFGF 1 ng · mL<sup>-1</sup>。将细胞接种于 6 孔培养板中,其密度为 2 × 10<sup>4</sup> ~ 4 × 10<sup>4</sup> 个 · mL<sup>-1</sup>,于 37 °C 培养箱中 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 24 h,换液去除组织碎片与未贴壁的细胞,此后每 3 d 更换 1 次培养液。培养 8~10 d,经传代所得到的羊驼皮肤黑色素细胞纯度为

99%以上。本研究所用的羊驼皮肤黑色素细胞为第 4 代。黑色素细胞形状不规则,大多数呈梭形或多边形,细胞核呈卵圆形,黑色素细胞内散在分布黑素体。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞内添加 TGF- $\beta$ 3 TGF- $\beta$ 3 用去离子水溶解,制成储备液。制备不同浓度的 TGF- $\beta$ 3(6.25、12.5、25、50 ng · mL<sup>-1</sup>)用于添加到黑色素细胞培养基中,对照组添加去离子水,每组 9 个重复孔。

1.2.2 TGF- $\beta$ 3 对羊驼皮肤黑色素细胞活力的影响 对添加不同浓度 TGF- $\beta$ 3 的 5 组羊驼黑色素细胞计数,稀释到相同的细胞浓度,用 RTCA 实时无标记细胞功能分析仪做细胞增殖试验:E-plate 每孔中加入 50  $\mu$ L 的培养基,置于仪器检测台上测试基线;将计数稀释的羊驼黑色素细胞加入 E-plate 孔中,每孔 5 000 个细胞;室温放置 30 min 后将实验板放入仪器开始试验,每 5 min 检测 1 次细胞指数,记录细胞贴壁,生长过程至 40 h。

1.2.3 细胞总 RNA 和蛋白质的提取 添加试验结束时,收集 9 孔细胞,3 孔用于提取 RNA,3 孔用于提取总蛋白,3 孔用于提取黑色素,并用 Nano-Drop 1000 和 BSA 法分别检测 RNA 和蛋白质的质量和浓度。

1.2.4 RNA 反转录和实时定量 PCR 10  $\mu$ L 反应体系:5 × Prime Script<sup>TM</sup> Buffer 2  $\mu$ L, Prime Script<sup>TM</sup> RT Enzyme Mix 10.5  $\mu$ L, Oligo dT Primer 25 pmol, 随机引物 50 pmol, Total RNA 1  $\mu$ L, DEPC 水加至 10  $\mu$ L。反应条件:37 °C 15 min, 85 °C 5 s, 反转录后 cDNA 可用于实时定量 PCR。

qRT-PCR 每个样本做 4 个重复,并且设立每个样本的阴性对照(以水代替模板),10  $\mu$ L 反应体系:SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II(2 ×) 5  $\mu$ L, 上下游引物(10  $\mu$ mol · L<sup>-1</sup>) 各 0.2  $\mu$ L(引物序列见表 1), ROX Reference Dye II 0.2  $\mu$ L, Template DNA 1  $\mu$ L, Rnase-free water 3.4  $\mu$ L。扩增条件:95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 55 °C 30 s, 72 °C 10 s, 40 循环。内参基因为  *$\beta$ actin*。基因的相对表达量用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 法计算。

### 1.2.5 总蛋白的提取与 Western blotting 检测

用总蛋白提取试剂盒(碧云天)提取细胞总蛋白。用核酸蛋白仪测定蛋白浓度,每孔上样 200  $\mu$ g 总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,转移至 PVDF 膜,经 5% 脱脂奶粉封闭液,室温封闭 1.5 h。将转印膜放入平皿内,加入兔源目的基因多克隆抗体(封闭液 1 : 300 稀释)。4 °C 摇床过夜孵育, TBST 洗膜,加入二

表 1 *MITF*、*TYR*、*TYRP2*、 $\beta$ -*actin* 的引物序列Table 1 The primer sequences of *MITF*, *TYR*, *TYRP2*,  $\beta$ -*actin*

目的基因 Gene	引物序列(5'-3') Primer sequence	退火温度/°C T <sub>m</sub>
<i>MITF</i>	F:TCCCAAGTCAAATGATCCAG	52
	R:GAGCCTGCATTTCAAGTTCC	
<i>TYR</i>	F:GCTTTAGCAACTTCATGGGA	56
	R:CTTGTTCTTCTCTGGGACAC	
<i>TYRP2</i>	F:TGCTTTGCCCTACTGGAAC	63
	R:ATCAGAGTCGATCGTCTG	
$\beta$ - <i>actin</i>	F:CTAAGGAGAAGGGCCAGTCC	52~56
	R:CTCAAGTTGGGGACAAAAA	

抗(HRP 山羊抗兔 IgG), 37 °C 孵育 1.5 h, 加入 ECL 发光剂, 2~3 min 后甩去工作液, 照相观察。免疫印迹信号用 Image-proplus 6.0 软件进行相对定量分析。

1.2.6 黑色素含量的测定 在羊驼黑色素细胞的培养基中添加不同浓度的 TGF- $\beta$ 3, 56 h 后移去培养基, 用 1 mL 预冷的 PBS 冲洗细胞 3 次, 用 0.25% 胰蛋白酶消化 8 min, 加入终止液终止消化, 吹打使其变为单细胞悬液后将细胞移入离心管中, 取出一小部分进行台盼蓝染色计数。然后 4 °C, 1 000 r · min<sup>-1</sup>, 离心 10 min, 弃去终止液再次用 PBS 冲洗细胞, 共冲洗 3 次。弃去 PBS, 每管加入 0.5 mL 0.2 mol · L<sup>-1</sup> 的 NaOH 溶解黑色素细胞。将细胞溶解液移到另一个干净的 1.5 mL 的 EP 管中, 80 °C 加热 5 min。取乌贼墨标准品溶解在 0.2 mol · L<sup>-1</sup> 的 NaOH 中, 进行标准曲线的设置。使用酶标仪在 475 nm 波长处对黑色素标准品级所有样品进行吸光值的测量, 每组重复 3 次, 将同一条件下测得的样品吸光值与黑色素标准品吸光值进行比较即为各样品中的黑色素含量, 最终获得黑色素含量用  $\mu\text{g} \cdot 10^{-6}$  细胞表示。

### 1.3 统计学处理

数据用 Microsoft Excel 进行统计分析, 结果用“平均值 ± 标准差 (Means ± SD)”表示, 采用 SPSS16.0 软件进行单因素方差分析检验。

## 2 结果

### 2.1 TGF- $\beta$ 3 对羊驼皮肤黑色素细胞形态学的影响

在体外培养黑色素细胞中添加不同浓度的 TGF- $\beta$ 3 56 h 后, 倒置显微镜下观察发现, 对照组中黑色素细胞形态呈现正常培养黑色素细胞的梭形或多边形, 而试验组黑色素细胞随着 TGF- $\beta$ 3 浓度增大,

含两极突起的细胞明显增多, 呈现椭圆形(图 1)。

### 2.2 TGF- $\beta$ 3 对羊驼皮肤黑色素细胞增殖的影响

各组细胞在 4 h 内均贴壁, 10 h 后各组的细胞增殖有了明显变化。与正常细胞相比, 添加最高浓度 TGF- $\beta$ 3(50 ng · mL<sup>-1</sup>) 的黑色素细胞增殖在前 30 h 被抑制, 而添加较低浓度的黑色素细胞增殖没有变化; 30 h 后, 添加不同浓度的 TGF- $\beta$ 3 均对黑色素细胞有长时程维持细胞数量的作用, 但没有剂量依赖性(图 2)。

### 2.3 TGF- $\beta$ 3 对羊驼皮肤黑色素细胞 *MITF*、*TYR*、*TYRP2* 基因表达变化量的影响

实时定量 PCR 结果表明, 添加了 TGF- $\beta$ 3 的羊驼黑色素细胞中, *MITF* 基因各试验组较对照组在转录水平分别下降到 0.52、0.53、0.54 和 0.32 倍, 试验组与对照组均差异极显著 ( $P < 0.01$ )。在试验组中, *TYR* 的转录水平分别较对照组下降到 0.49、0.71、0.56、0.58 倍, 并呈显著或极显著差异; *TYRP2* 各试验组的转录水平分别较对照组下降到 0.41、0.40、0.46、0.51 倍, 并呈极显著差异 ( $P < 0.01$ )(图 3)。

### 2.4 TGF- $\beta$ 3 对羊驼皮肤黑色素细胞 *MITF*、*TYR*、*TYRP2* 蛋白表达变化量的影响

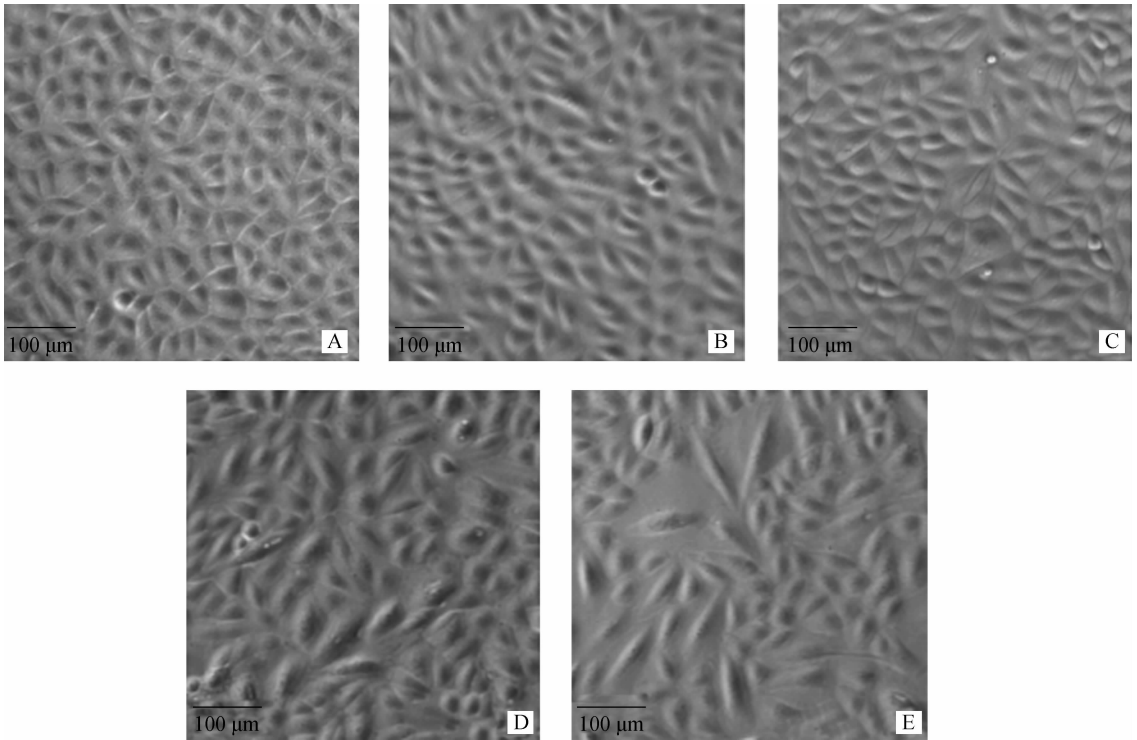
Western blotting 结果显示, 羊驼黑色素细胞总蛋白中存在能与兔抗 *TYR*、*TYRP2*、*MITF* 多克隆抗体发生免疫阳性反应的蛋白条带(图 4A)。对不同试验组羊驼黑色素细胞目的蛋白表达进行定量分析发现, 添加 TGF- $\beta$ 3 的羊驼黑色素细胞中 *MITF*、*TYR* 和 *TYRP2* 均下调, 且添加 50 ng · mL<sup>-1</sup> TGF- $\beta$ 3 下降的最为显著。4 个试验组与对照组相比差异显著或极显著(图 4B)。

### 2.5 TGF- $\beta$ 3 对羊驼皮肤黑色素细胞黑色素产量的影响

用分光光度法对添加不同浓度 TGF- $\beta$ 3 的黑色

素细胞内黑色素产量进行测定,结果显示,添加不同浓度的 TGF- $\beta$ 3 后,试验组黑色素细胞中黑色素产

量比对照组均有不同程度的减少,且添加 50  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  TGF- $\beta$ 3 下降的最为显著(图 5)。



A. 正常的羊驼黑色素细胞;B. 添加 6.25  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  TGF- $\beta$ 3 的羊驼黑色素细胞;C. 添加 12.5  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  TGF- $\beta$ 3 的羊驼黑色素细胞;D. 添加 25  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  TGF- $\beta$ 3 的羊驼黑色素细胞;E. 添加 50  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  TGF- $\beta$ 3 的羊驼黑色素细胞  
A. Normal alpaca skin melanocytes;B. Melanocyte with the addition of 6.25  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  TGF- $\beta$ 3;C. Melanocyte with the addition of 12.5  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  TGF- $\beta$ 3;D. Melanocyte with the addition of 25  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  TGF- $\beta$ 3;E. Melanocyte with the addition of 50  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  TGF- $\beta$ 3

图 1 TGF- $\beta$ 3 处理 56 h 羊驼皮肤黑色素细胞的形态

Fig. 1 The effect of TGF- $\beta$ 3 with different concentrations on the morphology of alpaca melanocytes for 56 h

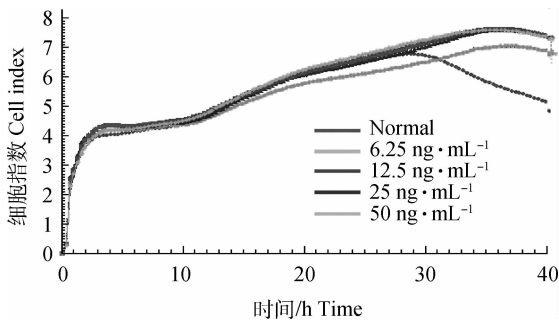
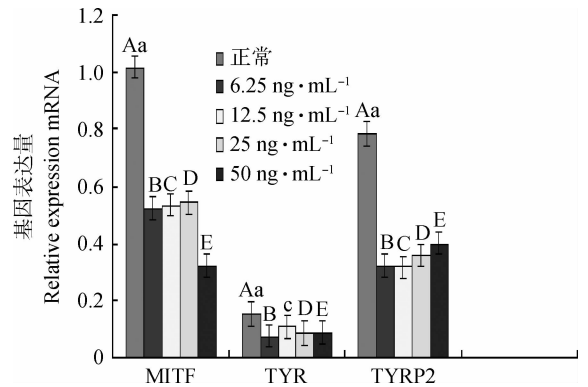


图 2 TGF- $\beta$ 3 添加对羊驼皮肤黑色素细胞增殖的影响

Fig. 2 The effect of TGF- $\beta$ 3 with different concentrations on the proliferation of alpaca melanocytes



不同小写字母表示差异显著;不同大写字母表示差异极显著。图 4、图 5 同

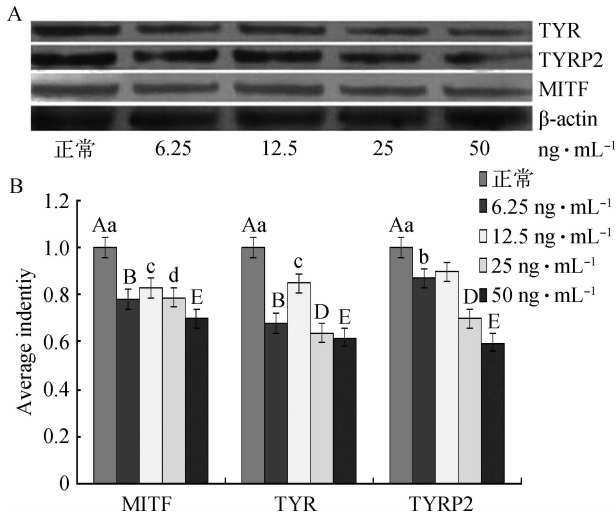
Different lowercase letters,  $P < 0.05$ ; Different uppercase letters,  $P < 0.01$ . The same as Figure 4 and Figure 5

图 3 添加不同浓度 TGF- $\beta$ 3 对毛色相关基因 mRNA 表达的影响

Fig. 3 The effect of TGF- $\beta$ 3 with different concentrations on mRNA expression of hair color genes in alpaca melanocytes

### 3 讨论

哺乳动物被毛的颜色主要由沉着在皮肤的黑色素的含量及其种类决定的,黑色素主要分为两类:真黑色素(Eumelanin)和褐黑色素(Pheomelanin)<sup>[14]</sup>。



A. Western blotting 结果; B. 相对表达量分析  
A. Western blotting; B. Quantitative amount of protein expression

图 4 添加不同浓度 TGF-β3 对毛色基因蛋白表达的影响  
Fig. 4 The effect of TGF-β3 with different concentrations on protein expression in alpaca melanocytes

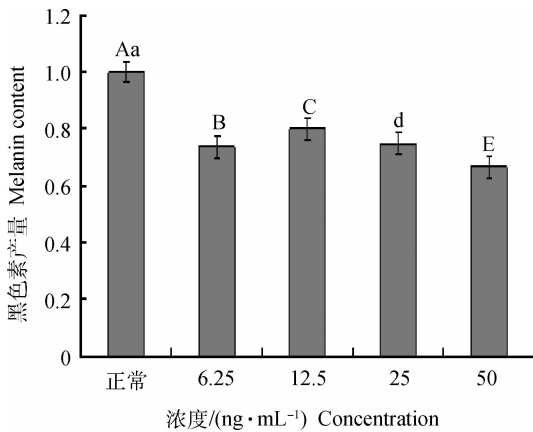


图 5 添加不同浓度 TGF-β3 对黑色素细胞内色素产量的影响

Fig. 5 The effect of TGF-β3 with different concentrations on melanin production in alpaca melanocytes

黑色素产生后,被运输到周围角质化细胞中,产生皮肤和被毛颜色。

目前发现,在哺乳动物黑色素细胞中,合成黑色素有两条信号路径,即受体酪氨酸激酶(KIT)和 G 蛋白偶联内皮素受体 B(EDNRB)途径,其中任意一条路径上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,最终导致毛色的改变<sup>[15]</sup>。在 EDNRB 路径中,促黑色素激素(α-MSH)与黑色素细胞膜上的黑皮激素受体(MC1R)结合后可激活 Gs 蛋白,Gs 蛋白激活膜内侧的腺苷酸环化酶

(AC),AC 的活化使细胞内 cAMP 水平升高,后者能活化蛋白激酶 A(PKA)导致 CREB(cAMP-responsive element-binding)的磷酸化<sup>[16]</sup>。磷酸化的 CREB 可激活小眼畸形相关转录因子(MITF),MITF 是毛色通路上一个重要的转录调控因子,通过调控形成黑色素的重要基因的表达而影响黑色素细胞的发育,如酪氨酸酶(TYR)及其相关蛋白 1 和 2(TYRP1 和 TYRP2),而 TYR 是黑色素生成的关键酶,催化 3 步不同的反应;酪氨酸酶相关蛋白 1(TYRP1)、酪氨酸酶相关蛋白 2(TYRP2)在黑色素合成过程中各自催化特异的反应<sup>[16-17]</sup>。尽管有研究表明,TGF-β3 是小鼠神经源色素细胞发育所必须的,但 TGF-β3 是否对黑色素细胞的生物学性质有影响尚不清楚。本试验通过在体外培养的黑色素细胞中添加不同浓度的 TGF-β3,检测到黑色素细胞中 MITF、TYR、TYRP2 在 mRNA 和蛋白水平均有不同程度的下调。MITF 是 TYR、TYRP2 的转录因子,因此,TYR 和 TYRP2 的表达水平的变化是由 MITF 引起的。TYRP2 在酪氨酸酶发挥作用过程中起重要的作用<sup>[18-21]</sup>,是细胞增殖率和细胞内黑色素含量的指标<sup>[22]</sup>。在该试验中也检测到不同浓度的 TGF-β3 引起细胞表型的变化,导致了黑色素细胞内黑色素合成量的下调,这证实了 TYRP2 表达水平与黑色素含量之间的关系。综上所述,TGF-β3 通过 G 蛋白偶联内皮素受体 B 路径调控黑色素细胞产生黑色素,而 TGF-β3 如何作用于 MITF 的机理有待于进一步研究。

黑色素细胞的突起或突起延伸对黑色素运输至周围的角质化细胞至关重要,影响皮肤和被毛颜色的形成。此外,还关系到黑色素细胞的其他功能,如张晖等<sup>[10]</sup>发现,多泡脂肪细胞靠近黑色素细胞,黑色素细胞合成的黑色素可以通过运输释放到多泡脂肪细胞,引起脂肪吸附。本试验中,高浓度 TGF-β3 可以促进黑色素细胞突起形成,引起黑色素细胞形态学的变化,因此,TGF-β3 在黑色素转运至角质化细胞和多泡脂肪细胞过程中起重要作用,从而将对哺乳动物毛色形成和脂肪吸附有重要意义。

## 4 结论

在黑色素细胞 G 蛋白偶联内皮素受体 B 路径中,TGF-β3 通过调控 MITF、TYR 和 TYRP2 的表达,从而引起黑色素含量的变化;适当浓度的外源性 TGF-β3 可促进黑色素突起形成,以确保黑色素的

运输。

### 参考文献(References):

- [1] GRENSSNER A M, WEISKIRCHE N R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF- $\beta$  as major players and therapeutic targets[J]. *J Cell Mol Med*, 2006, 10: 76-99.
- [2] WAHL S M, WEN J, MOUTSOPOULOS N. TGF- $\beta$ : a mobile purveyor of immune privilege[J]. *Immunol Rev*, 2006, 213: 213-227.
- [3] LIM O, WANY Y, SANJABI S, et al. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses [J]. *Annu Rev Immunol*, 2006, 24: 99-146.
- [4] 曾 东, 余文林, 杨传红, 等. TGF- $\beta$  各亚型与其受体在猪皮肤及毛囊中的表达[J]. *中国美容医学*, 2009, 18(5): 641-643.  
ZENG D, YU W L, YANG C H, et al. Expression of TGF- $\beta$  isoforms and their receptors in the pig skin and hair follicle [J]. *Chinese Journal of Aesthetic Medicine*, 2009, 18(5): 641-643. (in Chinese)
- [5] FOITZIK K, PAUS R, DOETSCHMAN T, et al. The TGF- $\beta$ 2 isoform is both a required and sufficient 275 inducer of murine hair follicle morphogenesis[J]. *Dev Biol*, 1999, 212(2): 278-289.
- [6] BARTRA M U, SPEER C P. The role of transforming growth factor beta in lung development and disease[J]. *Chest*, 2004, 125(2): 754-765.
- [7] PARK S H. Fine tuning and cross-talking of TGF-beta signal by inhibitory smads[J]. *Biochem Mol Biol*, 2005, 38(1): 9-16.
- [8] WILLERT K, NUSSE R.  $\beta$ -catenin: a key mediator of Wnt signaling[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 1998, 8(1): 95-102.
- [9] KUMASAKA M, GODING C R.  $\beta$ -catenin in the melanocyte lineage[J]. *Pigment Cell Res*, 2003, 16(3): 312-317.
- [10] 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 studies Taihe Silky skin melanin and multivesicular fat cells[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2014, 45(5): 815-820. (in Chinese)
- [11] HIBINO T, NISHIYAMA T. Role of TGF-beta2 in the human hair cycle[J]. *J Dermatol Sci*, 2004, 35(1): 9-18, 285.
- [12] BURTD W, LAWA S. Evolution of the transforming growth factor-beta superfamily [J]. *Prog Growth Factor Res*, 1994, 5(1): 99-107.
- [13] LIMO-SANJABI S, FLAVELL R A. Transforming growth factor- $\beta$  controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and-independent mechanisms [J]. *Immunity*, 2006, 25(3): 455-471.
- [14] SIMON J D, PELES D N. The red and the black[J]. *Accounts Chem Res*, 2010, 43(11): 1452-1460.
- [15] AOKI H, MOTOHASHI T, YOSHIMURA N, et al. Cooperative and indispensable roles of Endothelin 3 and KIT signalings in melanocyte[J]. *Dev Dynamics*, 2005, 233: 407-417.
- [16] LIN J Y, FISHER D E. Melanocyte biology and skin pigmentation[J]. *Nature*, 2007, 445(22): 843-849.
- [17] OTREBA M, ROK J, BUSZMAN E, et al. Regulation of melanogenesis: the role Of cAMP and MITF[J]. *Postepy Hig Med Dosw*, 2012, 66: 33-40.
- [18] AB-MALEK Z, SWOPE V B, SUZUKI I, et al. Mitogenic and melanogenic stimulation of normal human melanocytes by melanotopic peptides [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(51): 1789-1793.
- [19] HEARING V J. Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization[J]. *J Invest Dermatol*, 1999, 4(1): 24-28.
- [20] DEL MARMOL V, ITO S, JACKSON I, et al. TRP-1 expression correlates with eumelanogenesis in human pigment cells in culture[J]. *Febs Letters*, 1993, 327(3): 307-310.
- [21] 高 莉, 赵英虎, 刘朝亮, 等. 酪氨酸酶相关蛋白 1 调控黑色素形成的研究进展[J]. *畜牧与饲料科学*, 2010, 31(10): 114-116.  
GAO L, ZHAO Y H, LIU C L, et al. Progress tyrosinase-related protein 1 regulated the formation of melanin[J]. *Animal Husbandry and Feed Science*, 2010, 31(10): 114-116. (in Chinese)
- [22] VANCE K W, GODING C R. The transcription network regulating melanocyte development and melanoma[J]. *Pigment Cell Res*, 2004, 17(4): 318-325.

(编辑 郭云雁)