

水貂被毛黑色素含量及皮肤成熟黑色素细胞组织学分析

宋兴超, 徐超, 刘琳玲, 刘宗岳, 杨童奥, 丛波, 岳志刚, 杨福合*

(中国农业科学院特产研究所, 吉林省特种经济动物分子生物学省部共建国家重点实验室, 长春 130112)

摘要: 旨在分析水貂被毛黑色素含量差异及观察皮肤成熟黑色素细胞的分布特征, 为水貂毛色形成调控机理研究提供理论依据。以乌贼黑为标准品, 利用酶标仪测定并比较金州黑水貂、银蓝水貂和吉林白水貂被毛总黑色素 (Total melanin, TM)、真黑色素 (Eumelanin, EM) 及褐黑色素 (Pheomelanin, PM) 含量; 通过甲苯胺蓝、多巴及多巴联合甲苯胺蓝分别对不同毛色水貂皮肤组织进行染色。结果表明, 金州黑水貂毛皮成熟期被毛 TM 和 PM 含量分别是换毛期的 1.17 和 1.20 倍 ($P < 0.01$), EM 含量显著高于换毛期 ($P < 0.05$); 银蓝水貂换毛期与毛皮成熟期被毛 3 种黑色素含量差异不显著 ($P > 0.05$); 吉林白水貂毛皮成熟期被毛 TM 和 PM 含量分别是换毛期的 1.27 和 1.22 倍 ($P < 0.05$)。组织学染色显示, 金州黑和银蓝水貂皮肤中均存在成熟黑色素细胞, 主要分布于金州黑水貂的表皮和毛囊顶端, 毛囊外根鞘和毛纤维髓质层有少量多巴阳性着色带; 银蓝水貂皮肤的表皮和毛囊顶端多巴阳性着色带较少, 毛囊外根鞘阳性着色较浅; 吉林白水貂皮肤组织未见明显多巴阳性着色区域。综上所述, PM 含量可能与水貂灰色和白色被毛表型相关, 毛囊顶端的成熟黑色素细胞可能是水貂被毛色素沉积的主要细胞。

关键词: 水貂; 被毛; 黑色素含量; 成熟黑色素细胞; 多巴染色

中图分类号: S865.2⁺2.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2017)01-0083-08

Study on Hair Melanin Content and Distribution of Skin Mature Melanocytes in Mink (*Neovison vison*)

SONG Xing-chao, XU Chao, LIU Lin-ling, LIU Zong-yue, YANG Tong-ao,
CONG Bo, YUE Zhi-gang, YANG Fu-he*

(State Key Laboratory of Special Economic Animal Molecular Biology, Institute of Special Animal and Plant Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130112, China)

Abstract: The melanin content of hair and distribution characteristics of mature melanocytes in skin of mink with different coat colors were analyzed and observed, which will provide theoretical basis for further study on regulatory mechanism of mink coat color. The content of total melanin (TM), eumelanin (EM) and pheomelanin (PM) in hair, which were collected from Jinzhou black, Silver Blue and Jilin White mink in molting and pelting periods, respectively, were determined by microplate assay with sepia as standard sample. Toluidine blue, dopa and dopa with toluidine blue staining were conducted to observe the distribution of skin mature melanocytes. The results showed that the content of TM and PM from black hair in pelting period were 1.17 and 1.20 times ($P < 0.01$) than that of molting period, and the value of EM was higher than that of molting period ($P < 0.05$). There were not different for the content of TM, EM and PM in

收稿日期: 2016-04-18

基金项目: 国家重点基础研究发展计划-973 项目(2012CB722907); 水貂优良种质资源及选育技术引进-948 项目(2014-Z8); 中国农业科学院科技创新工程-特种动物育种科技创新团队(CAAS-ASTIP-2015-ISAPS02)

作者简介: 宋兴超(1982-), 男, 河北保定人, 博士, 助理研究员, 主要从事特种经济动物遗传育种研究, E-mail: songxingchao@caas.cn

* 通信作者: 杨福合, 研究员, 博士生导师, 主要从事特种经济动物种质资源收集、评价及遗传育种研究, E-mail: yangfh@126.com

gray hair ($P > 0.05$) between the two periods. The content of TM and PM from white hair in pelting period were 1.27 and 1.22 times ($P < 0.05$) than that of molting period. Histological staining revealed that the mature melanocytes were distributed both in skin with black and gray hair. In the skin of black hair, a large number of pigment granules were distributed at epidemis and the top of hair follicle and a few positive staining band was in the outer root sheath and medulla. There was less dopa-positive band at epidemis and the top of hair follicle in mink skin with gray hair. Moreover, the positive staining of the outer root sheath in skin with gray hair was weaker than that of black. However, there was not obvious dopa-positive staining area in mink skin with white hair. Results of the present study indicated that the formation of gray and white hair were related with the content of PM. The mature melanocytes at the top of hair follicle might be the main cytological basis of hair pigmentation in mink.

Key words: mink; hair; content of melanin; mature melanocyte; dopa staining

水貂 (*Neovison vison*) 作为一种小型珍贵毛皮动物, 其毛皮主要用于制裘皮制品, 因此, 被毛颜色是决定貂皮质量与价值的一种重要经济性状, 深入解析水貂毛色调控机理对新型毛色品种的选育具有重要的理论与实践意义。S. Cirera 等^[1]研究表明, 黑素亲和素 (Melanophilin, *MLPH*) 蛋白缺失肌动蛋白 Va (*MYO5A*) 结合域可导致银蓝水貂稀释色型。R. Anistoroaei 等^[2]报道, 酪氨酸酶 (Tyrosinase, *TYR*) 基因外显子 1 的无义突变 (g. 138T>A) 可能与水貂白化表型相关。S. Cirera 等^[3]将美国米黄色水貂 (*b^{PbP}*) 的棕褐色位点 (Brownish) 定位于酪氨酸相关蛋白 1 (Tyrosinase-related protein 1, *TYRP1*) 基因上, 该基因内含子 2 起始部一段长度约为 8.0 kb 的插入片段可能会导致美洲水貂至少 2 种不同棕褐色表型的形成。研究表明, 黑色素的产生或缺乏是哺乳动物毛色形成的遗传基础, 真黑色素 (Eumelanin, EM) 和褐黑色素 (Pheomelanin, PM) 的含量、比例和分布特征决定了被毛颜色的多样化^[4]。在这两种黑色素中, 真黑色素不含硫原子, 呈黑色或深棕(褐)色, 较难溶解, 褐黑色素含有硫原子, 呈淡黄色或微红棕色, 易溶于碱^[5]。根据这两种色素化学性质的差异, 国内外学者研究了人^[6-7]、小鼠^[8]和鸡^[9]等物种肌肉、皮肤、毛发和羽毛中黑色素含量的变化及其与组织、被毛颜色的相关性。尽管被毛颜色由真黑色素和褐黑色素的含量、比例和分布所决定, 毛囊黑色素细胞却是毛色发生的细胞学基础^[10-12]。

水貂被毛由针毛和绒毛组成, 是一种单色毛纤维, 即整根毛自毛根~毛尖颜色一致, 其不同被毛颜色表型的形成是否与黑色素含量及毛囊中黑色素细

胞的分布特征相关? 特别是对于具有白色被毛的吉林白水貂, 该色型个体皮肤组织中是否存在黑色素细胞? 迄今未见相关报道。本研究以金州黑水貂、银蓝水貂和吉林白水貂为研究对象, 通过检测 3 种色型水貂被毛黑色素含量, 分析皮肤成熟黑色素细胞的形态特征与分布规律, 旨在深入明确被毛黑色素含量变化及皮肤成熟黑色素细胞定位与水貂毛色表型的关系, 为进一步科学鉴定水貂毛色等级及解析其被毛色素沉积的细胞学基础提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 被毛采集及处理

9月初, 水貂皮肤呈青色, 为换毛期, 11月底, 水貂皮肤呈白色, 为毛皮成熟期, 随机选取 2 个时期金州黑、银蓝和吉林白水貂各 3 只(♂), 剪取背中部被毛 30 mg 左右, 清洗干净, 自然晾干后剪碎, 装入自封袋中待测。

1.2 皮肤样本采集及固定

11月底, 选取上述 3 种毛色水貂各 3 只(♂), 剪掉背中部被毛并刮净表皮, 用手术刀分离 1.5 cm×1.5 cm 皮肤组织块, 剔除皮下多余脂肪, 于 4.0% 多聚甲醛中固定 24~48 h。

1.3 主要仪器与试剂

酶标仪 (Nanodrop, 美国伯腾), 黑色素标准品 (Sigma), Soluene[®]-350 (Perkin Elmer), 毛纤维裂解液: Soluene[®]-350 水溶液 (体积比 9:1)。0.1 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液: 71.7 g Na₂HPO₄·12H₂O 定容至 2 000 mL, 标记为 A 液; 27.2 g KH₂PO₄ 定容至 2 000 mL, 标记为 B 液, 9 份 A 液和 1 份 B 液

混匀后调 pH 为 7.4。0.005 6 mol · L⁻¹多巴孵育液:0.550 g 多巴溶于 0.1 mol · L⁻¹磷酸盐缓冲液,定容至 500 mL。0.5%甲苯胺蓝溶液:2.5 g 甲苯胺蓝溶于蒸馏水,定容至 500 mL。

1.4 黑色素标准曲线绘制及被毛黑色素含量测定

2.0 mg 黑色素标准品溶于 1.0 mL 毛纤维裂解液,100 °C 水浴 1.5~2.0 h 助溶。设置 11 个标准品浓度梯度:0、20、40、60、80、100、120、140、160、180 和 200 μg · mL⁻¹,利用酶标仪分别测定不同浓度黑色素标准品 500 nm 处吸光值,通过 Excel 内嵌函数拟合回归方程。参照 I. Shosuke 等^[13]和 K. Wakamatsu 等^[14]方法略加改进,称取 3 种毛色水貂被毛 3.0、6.0 和 12.0 mg,加入 1.2 mL 毛纤维裂解液于 100 °C 水浴助溶。测定被毛溶解液 500、650 nm 处吸光值 A_{500 nm}和 A_{650 nm},据吸光值及黑色素标准曲线回归方程计算被毛 TM、EM 及 PM 含量,TM 含量用 A_{500 nm}表示,A_{650 nm}/A_{500 nm}表示 EM 占 TM 含量的比值,PM=TM-EM。

1.5 甲苯胺蓝染色

皮肤组织蜡块进行 6 μm 连续切片,60 °C 烤片 1.5 h;二甲苯透明后,梯度酒精(100%、95%、85%)复水;水洗后于 0.5%甲苯胺蓝溶液染色 20 min;梯度酒精(85%、95%、100%)脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

1.6 多巴染色

固定 24 h 的皮肤经流水冲洗,浸入多巴孵育液中,37 °C 孵育 2~3 h;换为新多巴孵育液,37 °C 孵育 18~20 h;蒸馏水冲洗 3~4 h,Bouin 氏液固定 24

h;重新包埋、切片、脱蜡、透明、复水、脱水、透明,中性树胶封片。

1.7 多巴-甲苯胺蓝复染

按照多巴染色方法制作组织切片,脱蜡至水后,利用甲苯胺蓝染色方法进行染色。

1.8 数据分析及组织切片镜检

应用 SAS 9.0 统计黑色素含量平均值(\bar{X})、标准差(SD),通过 *t* 检验比较各指标差异显著性;10 及 40 倍物镜下观察不同毛色水貂皮肤组织成熟黑色素细胞分布特征。

2 结果

2.1 被毛黑色素含量测定及差异分析

本研究获得的回归方程: $y_{A500} = 0.0042x + 0.0954$ (y_{A500} :500 nm 处吸光值, x :TM 浓度,相关系数 $R^2 = 0.9985$)。由表 1 可知,换毛期,金州黑水貂被毛 TM、EM 和 PM 含量均最高,随着被毛颜色变浅,3 种黑色素含量均呈下降趋势。在同一毛色中,金州黑水貂被毛 PM 含量是 EM 的 1.58 倍($P < 0.01$);银蓝水貂被毛 PM 含量极显著高于 EM 含量($P < 0.01$);吉林白水貂被毛 PM 含量是 EM 的 1.51 倍($P < 0.05$)。3 种色型水貂被毛 PM 含量均高于 EM 含量($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。

由表 2 可知,毛皮成熟期,吉林白水貂被毛 TM、EM 和 PM 含量均最低,随着被毛颜色加深,TM、EM 和 PM 含量均呈上升趋势。*t* 检验分析表明,3 种毛色水貂被毛 PM 含量均极显著高于 EM

表 1 不同毛色水貂换毛期被毛黑色素含量

Table 1 Content of hair melanin of mink with different coat colors in molting period

品种 Breed	被毛颜色 Coat color	吸光值 Absorbance value			黑色素浓度/ (μg · mL ⁻¹) Concentration of TM	黑色素含量/(μg · mg ⁻¹) Content of melanin		
		A _{500 nm}	A _{650 nm}	A _{650 nm} /A _{500 nm}		总黑色素 TM	真黑色素 EM	褐黑色素 PM
金州黑水貂 Jinzhou Black	黑色 Black	0.81 ± 0.03	0.32 ± 0.02	0.39	171.96 ± 7.13	70.35 ± 2.74	27.26 ± 1.08 ^B	43.09 ± 1.91 ^A
银蓝水貂 Silver Blue	灰色 Gray	0.71 ± 0.03	0.29 ± 0.01	0.41	146.62 ± 8.26	28.56 ± 2.23	11.81 ± 0.89 ^B	16.75 ± 1.35 ^A
吉林白水貂 Jilin White	白色 White	0.32 ± 0.03	0.13 ± 0.02	0.42	50.38 ± 3.11	4.81 ± 0.18	1.91 ± 0.02 ^b	2.89 ± 0.16 ^a

真黑色素和褐黑色素含量中,同行肩标不同小写字母表示差异显著(0.01 < P < 0.05),不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$),相同或无字母表示差异不显著($P > 0.05$)。表 2 同

In the same row of EM and PM, values with different small letter superscript mean significant difference (0.01 < P < 0.05), and with different capital letter superscript mean significantly different ($P < 0.01$), while with the same or no letter superscript mean no significant difference ($P > 0.05$). The same as table 2

含量($P < 0.01$)。由表 3 可知,金州黑水貂毛皮成熟期被毛 TM 和 PM 含量分别是换毛期的 1.17 和 1.20 倍($P < 0.01$),EM 含量显著高于换毛期($P < 0.05$);银蓝水貂被毛 TM、EM 和 PM 含量在毛皮

成熟期和换毛期差异不显著($P > 0.05$);吉林白水貂毛皮成熟期被毛 TM 和 PM 含量分别是换毛期的 1.27 和 1.22 倍($P < 0.05$),EM 含量略高于换毛期($P > 0.05$)。

表 2 不同毛色水貂毛皮成熟期被毛黑色素含量

Table 2 Content of hair melanin of mink with different coat colors in pelting period

品种 Breed	被毛颜色 Coat color	吸光值 Absorbance value			黑色素浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) Concentration of TM	黑色素含量/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) Content of melanin		
		$A_{500 \text{ nm}}$	$A_{650 \text{ nm}}$	$A_{650 \text{ nm}}/A_{500 \text{ nm}}$		总黑色素 TM	真黑色素 EM	褐黑色素 PM
金州黑水貂 Jinzhou Black	黑色 Black	0.99±0.03	0.37±0.01	0.37	214.14±7.99	82.89±3.09	30.79±1.35 ^B	52.10±1.77 ^A
银蓝水貂 Silver Blue	灰色 Gray	0.73±0.04	0.30±0.01	0.41	151.02±7.16	29.41±1.80	12.12±0.72 ^B	17.29±1.29 ^A
吉林白水貂 Jilin White	白色 White	0.36±0.02	0.15±0.01	0.42	61.90±4.73	6.14±0.47	2.60±0.30 ^B	3.54±0.18 ^A

表 3 不同生理时期水貂被毛黑色素含量比较

Table 3 Comparison of hair melanin of mink with different coat colors between different physiological period

时期 Period	黑色素含量/($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$) Content of melanin								
	金州黑水貂 Jinzhou Black			银蓝水貂 Silver Blue			吉林白水貂 Jilin White		
	TM	EM	PM	TM	EM	PM	TM	EM	PM
换毛期 Molting	70.35±2.74 ^B	27.26±1.08 ^b	43.09±1.91 ^B	28.56±2.23	11.81±0.89	16.75±1.35	4.81±0.18 ^b	1.91±0.02	2.89±0.16 ^b
毛皮成熟期 Pelting	82.89±3.09 ^A	30.79±1.35 ^a	52.10±1.77 ^A	29.41±1.80	12.12±0.72	17.29±1.29	6.14±0.47 ^a	2.60±0.30	3.54±0.18 ^a
<i>P</i> 值 <i>P</i> -value	0.006 3	0.020 0	0.003 9	0.635 2	0.668 1	0.640 6	0.034 8	0.053 2	0.025 5

黑色素含量中,同列肩标不同小写字母表示差异显著($0.01 < P < 0.05$),不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$),相同或无字母表示差异不显著($P > 0.05$)

In the same column of melanin, values with different small letter superscript mean significant difference ($0.01 < P < 0.05$), and with different capital letter superscript mean significantly different ($P < 0.01$), while with the same or no letter superscript mean no significant difference ($P > 0.05$)

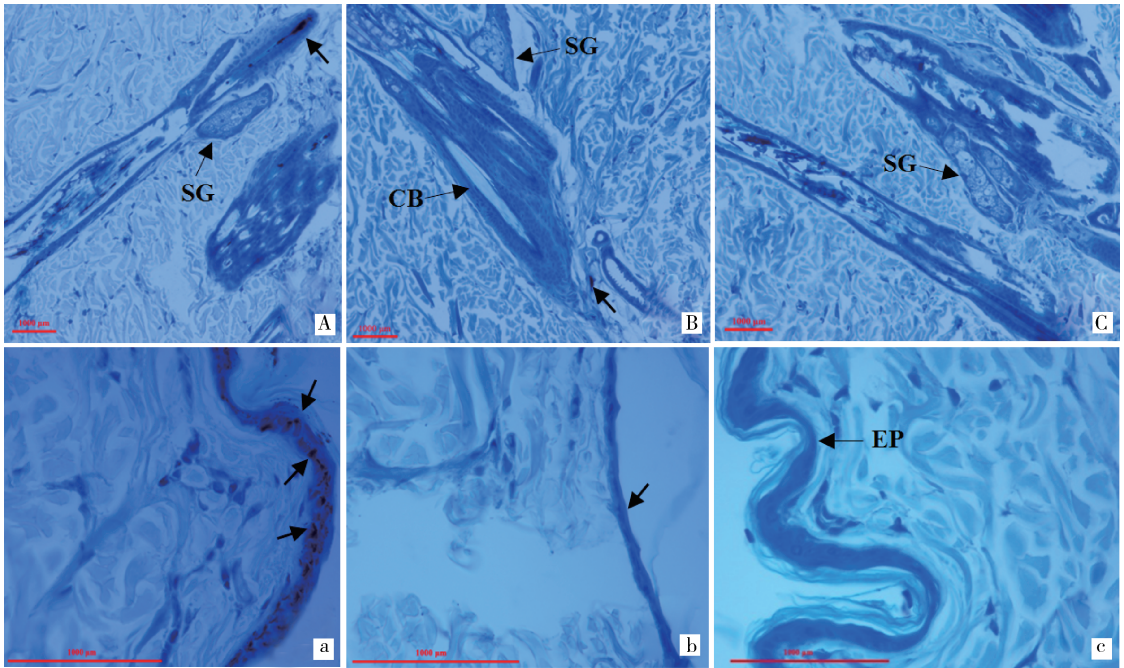
2.2 甲苯胺蓝染色

为充分观察成熟黑色素细胞在皮肤组织中的定位及分布特征,本试验对不同毛色水貂毛皮成熟期的皮肤组织进行纵切,获得相对完整的毛干及毛囊结构。由图 1 可知,甲苯胺蓝染色能够清晰地显示 3 种毛色水貂皮肤、毛囊及其附属器官结构,有核细胞的细胞核被染成蓝色,完整皮肤层包括表皮、真皮和皮下组织,表皮相对真皮较薄。本研究中,水貂毛皮已经成熟,包裹毛根的下端有杵状毛形成,未见明显凹陷的毛乳头,推断水貂毛囊可能处于退行期后期。水貂皮肤及其附属器官的特征性结构经甲苯胺蓝染色后能够显示相对清楚,可以保证后续纵切切

片多巴染色的效果。光学显微镜镜检结果(图 1)初步表明,金州黑水貂表皮可见大量黑色色素颗粒,银蓝水貂表皮中较少,而吉林白水貂表皮中未见该颗粒。

2.3 多巴染色

由图 2 可知,金州黑和银蓝水貂皮肤组织中均可见多巴阳性黑色素颗粒,但着色部位和强度略有差异。金州黑水貂表皮多巴阳性着色较深,且黑色素颗粒呈连续分布,银蓝水貂部分表皮为阳性着色区域,颜色较浅,呈间断分布,而吉林白水貂表皮未见明显多巴阳性着色部位。在毛囊组织中,大量多巴阳性黑色素颗粒呈“团块状”聚集于金州黑水貂皮



A、B 和 C 分别为黑色、灰色、白色被毛水貂皮肤毛囊(100 \times)；a、b 和 c 分别为黑色、灰色、白色被毛水貂皮肤表皮(400 \times)。→. 黑色素颗粒；SG. 皮脂腺；CB. 杵状毛；EP. 表皮。下同

A, B and C are hair follicles of mink with black, gray and white hair(100 \times)；a, b and c are epidermis of mink with black, gray and white hair(400 \times). →. Pigment granule; SG. Sebaceous gland; CB. Club hair; EP. Epidermis. The same as below

图 1 不同毛色水貂皮肤组织甲苯胺蓝染色结果

Fig. 1 Toluidine blue staining of skin in mink with different coat colors

肤毛囊顶端,毛根髓质层和毛囊外根鞘中存在少量着色颗粒,且沿毛干方向颜色逐渐变淡。银蓝水貂皮肤毛囊顶端多巴阳性着色带较少,呈“稀疏颗粒”分布,另外,毛囊外根鞘阳性着色较金州黑水貂弱。然而,吉林白水貂皮肤毛囊顶端、毛根髓质层及毛囊外根鞘均未见明显多巴阳性着色。本研究结果初步表明,有色被毛水貂皮肤组织毛囊顶端的成熟黑色素细胞是其被毛色素沉积的主要细胞学基础。

2.4 多巴-甲苯胺蓝复染

为更加清晰地显示多巴阳性黑色素细胞在不同毛色水貂皮肤组织中的分布特征,本研究将经多巴染色后的切片进行甲苯胺蓝复染,光镜观察复染皮肤组织(图 3)可知,阳性着色部位与多巴染色基本一致,金州黑水貂表皮、毛囊顶端存在大量成熟黑色素细胞,银蓝水貂表皮、毛囊顶端成熟黑色素细胞数量较少,而吉林白水貂皮肤组织在表皮、毛囊、毛囊外根鞘及毛纤维髓质层区域未见明显阳性着色带,推断白色被毛水貂皮肤组织中可能不存在成熟黑色素细胞,或者该部位黑色素细胞中酪氨酸酶活性较弱,利用多巴染色不能清楚显示。

3 讨论

3.1 水貂被毛黑色素含量与毛色的关联性分析

哺乳动物黑色素沉积、毛色发生的调控机理已成为当今毛色遗传学研究领域的重要热点之一^[15]。黑色素含量的多少及比例决定了毛色的多样化,是毛色的一项基础参数,已经成为羊驼毛色等级科学鉴定的一个关键指标^[16]。黑色素种类及含量高低直接决定脊椎动物被毛颜色及羽色,黑色被毛小鼠 EM 含量最多,黄色被毛小鼠以 PM 为主,而白色小鼠被毛中仅有少量的 PM 且不含有 EM,同样,被毛黑色素含量及种类的差异也是形成豚鼠不同毛色表型的直接因素,表明啮齿类动物的被毛颜色深浅与其 EM 和 PM 含量高低有关^[17]。K. Jimbow 等^[18]表明,60% 人的红发中存在高浓度的 PM,其余 40% 的人红发中则为 EM 和 PM 的混合成分。G. Aliev 等^[19]报道,黑色被毛山羊毛纤维 EM 较多,而由于存在混合型黑色素及 PM 含量与比例的差异则会导致山羊棕色、褐色与红色被毛表型的形成,不同毛色马被毛黑色素含量表现规律也与山羊一致^[20]。本

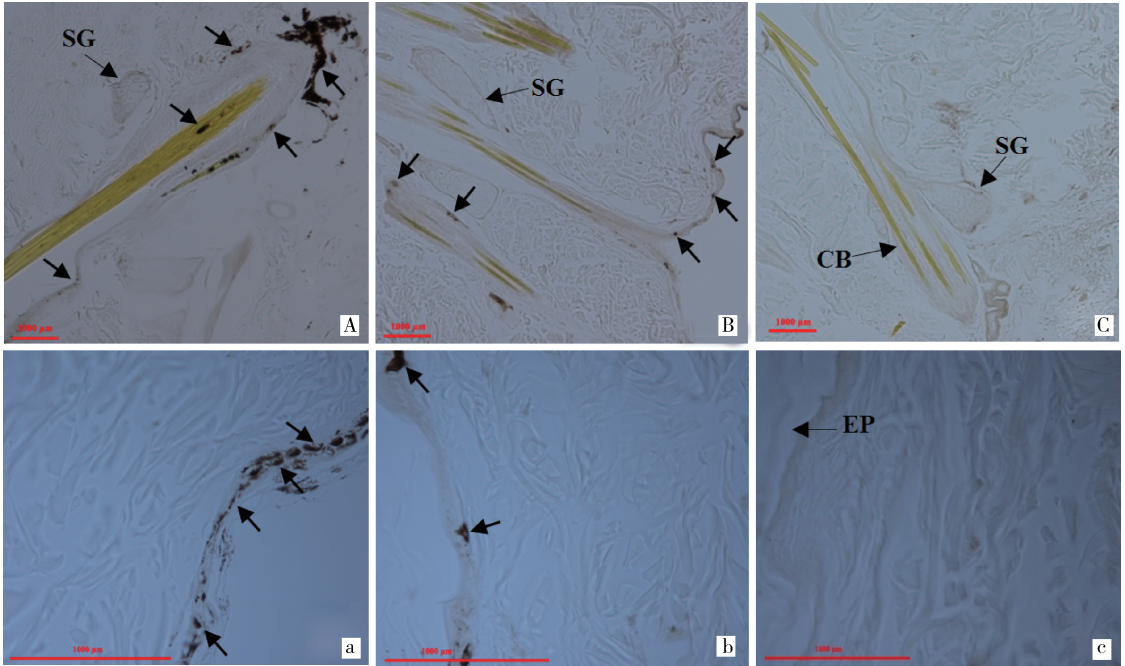


图 2 不同毛色水貂皮肤组织多巴染色结果
 Fig. 2 Dopa staining of skin in mink with different coat colors

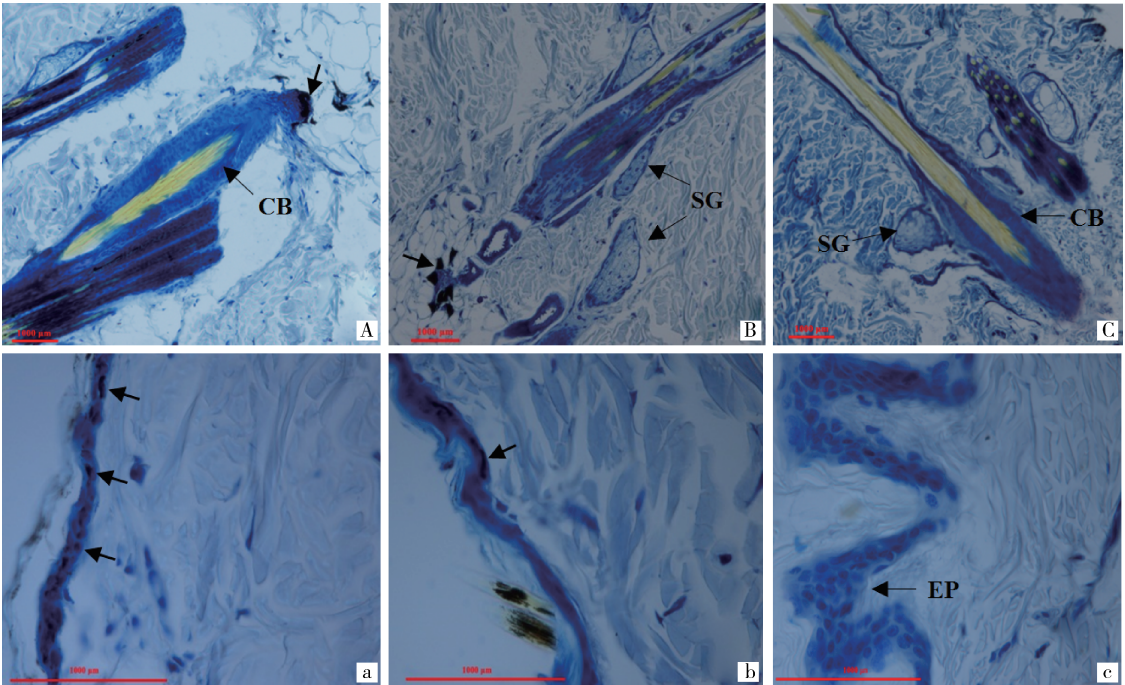


图 3 不同毛色水貂皮肤组织多巴-甲苯胺蓝复染结果
 Fig. 3 Dopa-toluidine blue staining of skin in mink with different coat colors

研究中,换毛期和毛皮成熟期水貂被毛黑色素含量与毛色表型的关系均呈现与其他物种大致相似的规律,即金州黑水貂毛纤维 EM 含量最高,其次为呈灰色的银蓝水貂,吉林白水貂被毛中也含有少量 EM,推断吉林白水貂白色被毛的形成可能不是因

为缺少 EM 的缘故,与人的白化^[21]及猪的白色被毛^[22]研究结果不一致。同时,本研究发现,换毛期与毛皮成熟期金州黑水貂、银蓝水貂和吉林白水貂被毛 PM 含量均高于 EM,水貂被毛由针毛和绒毛组成,银蓝水貂和吉林白水貂针毛、绒毛颜色一致,

推断高浓度 PM 与两种浅色被毛表型(灰色和白色)具有一定的相关性。金州黑水貂针毛呈黑色,而绒毛较针毛多且呈棕褐色,因此,可能导致其 PM 含量高于 EM 含量。从不同生理时期被毛黑色素含量比较结果来看,毛皮成熟期金州黑水貂、银蓝水貂和吉林白水貂被毛中 TM、EM 和 PM 含量均高于换毛期,初步表明,水貂在换毛过程中,存在于皮肤黑色素小体中的黑色素可能由毛囊定向转移到毛干,因此,由于真黑色素与褐黑色素的含量和比例差异形成了不同颜色的水貂被毛。

3.2 皮肤成熟黑色素细胞分布与水貂毛色相关性的探讨

人、小鼠等哺乳动物的皮肤组织学、毛囊周期发生形态学及黑色素细胞合成黑色素机制研究已经充分表明,被毛色素沉积的细胞学基础为散在于毛囊附属结构毛球中毛母质的黑色素细胞。而存在于皮肤表皮中的黑色素细胞则是肤色发生变化的细胞学基础。散在于毛母质基底层中的黑色素细胞比表皮中的黑色素细胞大,呈多巴阳性反应,由它们产生的黑色素沿黑色素细胞树突进入毛皮质层和髓质层细胞中,进而使毛呈现色泽^[23]。多巴(Dopa),亦称 L-3,4-二羟基苯丙氨酸,是酪氨酸酶(Tyrosinase)特异性底物,由酪氨酸酶经过催化及一系列生化反应,最终生成黑色素,因此可以使具有活性的黑色素细胞呈黑色。多巴染色在解析哺乳动物成熟黑色素细胞数量及分布特征方面具有重要意义,组织学多巴阳性着色结果能够间接反映该区域酪氨酸酶活性的强弱,可进一步表明该部位成熟黑色素细胞合成黑色素效率的高低。姜俊兵等^[24]推测羊驼被毛着色的细胞学基础为毛根成形部成熟黑色素细胞的数量,而与表皮黑色素细胞的存在没有关系。赵彦斌等^[11]也证实,黑线仓鼠和白化突变系被毛颜色的差异细胞来源是毛囊毛乳头中的成熟黑色素细胞。然而,谢光跃等^[12]推测乌骨山羊毛色的发生与黑色被毛毛囊外根鞘中活化的黑色素细胞有关。上述研究结果显示羊驼、仓鼠及乌骨山羊皮肤组织中成熟黑色素细胞的分布部位及数量是存在差异的,也从侧面反映出黑色素细胞调控不同物种被毛颜色形成的机制可能是不同的。本研究利用多巴染色分析了黑色素细胞在不同毛色水貂成熟期皮肤组织中的分布特征,发现皮肤黑色素细胞主要分布于有色被毛水貂表皮、毛囊顶端、毛囊外根鞘及毛根髓质层中,而白色被毛水貂皮肤未检测到呈多巴阳性的成熟黑色

素细胞,可能是白色被毛水貂皮肤组织黑色素细胞中酪氨酸酶的活性较有色被毛低,多巴染色不能明显地体现黑色素细胞的分布及形态,或者是白色被毛水貂皮肤组织中不存在成熟(活化)的黑色素细胞,即不产生黑色素颗粒,因为吉林白水貂的基因型(bb cc)是由咖啡色(bb)和白化(cc)两对隐性基因型组合而成,存在白化位点基因型,这与鱼^[25]及人^[26]白化皮肤组织中均不存在黑色素颗粒的研究结果一致。在成熟黑色素细胞数量方面,有色被毛间呈现较大的差异,金州黑水貂表皮、毛囊顶端及毛囊外根鞘中多巴阳性着色区域要显著多于银蓝水貂,并且着色强度较高,不同毛色水貂皮肤成熟黑色素细胞数量的差异特性也从侧面反映出黑色被毛水貂皮肤黑色素细胞中酪氨酸酶的活性要远远高于灰色被毛水貂。本研究结果充分表明,有色被毛水貂毛囊顶端成熟黑色素细胞是其被毛色素沉积的主要细胞学基础。

4 结 论

- 4.1 PM 含量可能与水貂灰色和白色被毛表型相关,水貂换毛过程中,黑色素由毛囊定向转移到毛干。
- 4.2 毛囊顶端成熟黑色素细胞可能是水貂被毛色素沉积的主要细胞学基础,该部位成熟黑色素细胞数量及酪氨酸酶活性是决定其毛色差异的直接因素,而表皮中的黑色素细胞可能不参与水貂毛色的形成。

参考文献(References):

- [1] CIRERA S, MARKAKIS M N, CHRISTENSEN K, et al. New insights into the melanophilin (*MLPH*) gene controlling coat color phenotypes in American mink[J]. *Gene*, 2013, 527(1): 48-54.
- [2] ANISTOROAEI R, FREDHOLM M, CHRISTENSEN K, et al. Albinism in the American mink (*Neovison vison*) is associated with a tyrosinase nonsense mutation[J]. *Anim Genet*, 2008, 39(6): 645-648.
- [3] CIRERA S, MARKAKIS M N, KRISTIENSEN T, et al. A large insertion in intron 2 of the *TYRP1* gene associated with American Palomino phenotype in American mink[J]. *Mamm Genome*, 2016, 27(3-4): 135-143.
- [4] WESTERHOF W. The discovery of the human melanocyte[J]. *Pigment Cell Res*, 2006, 19(3): 183-193.
- [5] WAKAMATSU K, ITO S. Advanced chemical methods in melanin determination[J]. *Pigment Cell Res*, 2002, 15(3): 174-183.
- [6] DOOLEY T P, CURTO E V, DAVIS R L, et al. DNA microarrays and likelihood ratio bioinformatic

- methods; discovery of human melanocyte biomarkers [J]. *Pigment Cell Res*, 2003, 16(3): 245-253.
- [7] KOJIMA T, YAMADA H, ISOBE M, et al. Compositional changes of human hair melanin resulting from bleach treatment investigated by nanoscale secondary ion mass spectrometry[J]. *Skin Res Technol*, 2014, 20(4): 416-421.
- [8] MICHALCZYK D, POPIK M, SALWINSKI A, et al. Extradermal melanin transfer? Lack of macroscopic spleen melanization in old C57BL/6 mice with de-synchronized hair cycle[J]. *Acta Biochim Pol*, 2009, 56(2): 343-353.
- [9] WANG J, WANG Y, LUO C, et al. Accumulation of melanin in the peritoneum causes black abdomens in broilers[J]. *Poult Sci*, 2014, 93(3): 742-746.
- [10] 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.
- [11] 赵彦斌, 孙兆增, 胡仲明, 等. 黑线仓鼠及其白化突变系毛囊中黑色素细胞的组织学分析[J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(10): 1-2, 85.
ZHAO Y B, SUN Z Z, HU Z M, et al. Histochemical study on the distribution of melanocytes in hair follicle of the *Cricetulus barabensis* and the albino mutant [J]. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2010, 20(10): 1-2, 85. (in Chinese)
- [12] 谢光跃, 刘桂琼, 姜勋平, 等. 乌骨山羊皮肤黑色素细胞的分布及特征[J]. 华中农业大学学报, 2014, 33(2): 83-88.
XIE G Y, LIU G Q, JIANG X P, et al. Location and characteristics of melanocytes of black-boned goat skin[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2014, 33(2): 83-88. (in Chinese)
- [13] SHOSUKE I, KAZUMASA W. Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in humans, mice, and other animals: a comparative review [J]. *Pigment Cell Res*, 2003, 16(5): 523-531.
- [14] WAKAMATSU K, ITO S. Advanced chemical methods in melanin determination[J]. *Pigment Cell Res*, 2002, 15(3): 174-183.
- [15] 杨姗姗, 白俊明, 范瑞文, 等. 内皮素 3 在不同毛色绵羊皮肤中的差异表达[J]. 畜牧兽医学报, 2015, 46(11): 2111-2116.
YANG S S, BAI J M, FAN R W, et al. The different expression of endothelin 3 in sheep skins[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2015, 46(11): 2111-2116. (in Chinese)
- [16] CECCHI T, VALBONESI A, PASSAMONTI P, et al. Quantitative variation of melanins in llama (*Lama glama* L.) [J]. *Small Ruminant Res*, 2007, 71(1): 52-58.
- [17] ITO S, JIMBOW K. Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in hair and melanomas [J]. *J Invest Dermatol*, 1983, 80(4): 268-272.
- [18] JIMBOW K, ISHIDA O, ITO S, et al. Combined chemical and electron microscopic studies of pheomelanosomes in human red hair [J]. *J Invest Dermatol*, 1983, 81(6): 506-511.
- [19] ALIEV G, RACHKOVSKY M, ITO S, et al. Pigment types in selected color genotypes of Asiatic sheep [J]. *Pigment Cell Res*, 1990, 3(4): 177-180.
- [20] SPONENBERG D P, ITO S, WAKAMATSU K, et al. Pigment types in sheep, goats, and llamas [J]. *Pigment Cell Res*, 1988, 1(6): 414-418.
- [21] 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]. *Br J Dermatol*, 2004, 150(3): 435-443.
- [22] 施启顺, 马海明. 猪的毛色遗传研究进展[J]. 国外畜牧科技, 2000, 27(6): 29-33.
SHI Q S, MA H M. The advance of researches on genetics of coat color of pigs [J]. *Animal Science Abord*, 2000, 27(6): 29-33. (in Chinese)
- [23] 张伟, 徐艳春, 华彦, 等. 毛皮学[M]. 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 2011: 27-89.
ZHANG W, XU Y C, HUA Y, et al. Fur science [M]. *Haerbin: Northeast Forestry University Press*, 2011: 27-89. (in Chinese)
- [24] 姜俊兵, 董常生, 贺俊平. 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[J]. 畜牧兽医学报, 2010, 41(2): 229-233.
JIANG J B, DONG C S, HE J P. Histochemical study on the distribution of mature melanocytes in skin of alpaca (*Lama pacos*) with different coat colors [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2010, 41(2): 229-233. (in Chinese)
- [25] KOGA A, WAKAMATSU Y, KUROSAWA J, et al. Oculocutaneous albinism in the i6 mutant of the medaka fish is associated with a deletion in the tyrosinase gene [J]. *Pigment Cell Res*, 1999, 2(4): 252-258.
- [26] YAMAGUCHI Y, HEARING V J. Melanocytes and their diseases [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2014, 4(5). pii: a017046. doi: 10.1101/cshperspect.a017046.