



白毛黑眼兔等四种实验兔黑色素 分布的组织学观察与比较

朱 亮,屠 珏,黄 宇,陈 诚

(浙江中医药大学动物实验研究中心/比较医学研究中心,杭州 310053)

【摘要】 目的 分析包括白毛黑眼兔在内的四个品种实验兔的虹膜和皮肤组织中的黑色素分布情况和相互之间的差异。**方法** 通过组织切片和硫酸亚铁染色,对四个品种实验兔的虹膜和皮肤组织中的黑色素含量和分布进行了观察与比较。**结果** 与其背景白化品种相比,白毛黑眼兔不仅在虹膜组织中出现了类型完整的黑色素,而且在其表型为白色的皮肤的毛囊中也出现了低含量的黑色素。**结论** 本结果为白毛黑眼兔突变表型机理研究提供了一定线索。

【关键词】 兔;虹膜;皮肤;黑色素

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 09-0059-03

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.009.013

Observation and comparison of melanin distribution in 4 rabbit breeds

ZHU Liang, TU Jue, HUANG Yu, CHEN Cheng

(Laboratory Animal Research Center, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

【Abstract】 Objective To identify and compare melanin distribution in iris and skin tissues of rabbits from four breeds including WHBE rabbit. **Methods** Ferrous sulphate staining was performed for iris and skin tissue of rabbits from different breeds. **Results** It showed dark green staining in both iris stroma and iris pigment epithelium of WHBE rabbit, while light green staining was observed in its follicles. **Conclusion** The results of histologic evaluations provide some clues to the future research on mechanism of WHBE rabbit phenotype mutation.

【Key words】 Rabbit; Iris; Skin; Melanin

哺乳动物的虹膜和毛色作为其最醒目的可见性状,与相应组织中的黑色素分布有密切的关系。哺乳动物体内的黑色素根据胚胎起源的不同可分为多个类型,且调节各个类型黑色素的机制互有差异。当动物的颜色性状发生突变时,有必要通过组织学的方法弄清突变个体相应组织中的色素细胞类型和数量构成上的变化,从而为后续研究提供线索。我中心从日本大耳白兔种群中发现黑眼突变

个体并保种建立封闭群,经鉴定命名为日本大耳兔黑眼系,简称白毛黑眼兔(white hair black eyes rabbit, WHBE 兔)。现对该封闭群个体的虹膜和皮肤组织进行组织学观察,并与其他品种实验兔进行对比。

1 材料和方法

1.1 实验动物

【基金项目】 浙江省科技计划项目(2013C37010)。

【作者简介】 朱亮(1978-),女,副研究员,博士,研究方向:实验动物分子遗传。Email: tozhuliang@126.com。

本研究选取四个不同品种的实验兔作为实验材料:日本大耳白兔、白毛黑眼兔、獭兔和青紫兰兔。其中,白毛黑眼兔和日本大耳白兔来自于浙江中医药大学动物实验研究中心实验兔繁育中心【SCXK(浙)2009-0042】。獭兔购于新昌县大市聚镇欣健兔场【SCXK(浙)2009-0042】。青紫兰兔购于南京安立默科技有限公司【SCXK(苏)2010-0002】。每个实验兔品种分别选取 2 只,雌雄各半。实验在浙江中医药大学动物实验研究中心的实验设施进行【SYXK(浙)2013-0184】。

日本大耳白兔是我国常见的实验用兔,表型呈现出完全白化,皮肤和被毛雪白(图 1A),虹膜无色素沉积,呈现红色(图 1E)。白毛黑眼兔是来自日本大耳白兔种群的突变个体经十四年保种培育而建立的一个新实验兔封闭群。该品种家兔皮肤和被毛呈现与突变背景品系日本大耳白兔一样的完全雪白,无任何有色花纹或斑点(图 1B),而其虹膜则出现色素沉积,呈现深灰色(图 1F)。獭兔和青紫兰兔是 20 世纪早期培育于法国,20 世纪 50 年代引入我国的品种。由于长期本地饲养,国内现有獭兔和青紫兰兔种群与原有品种发生了遗传分化,并成为我国目前主要的实验和经济动物品种。白化獭兔,全身皮肤和被毛雪白,没有任何斑点或杂色毛(图 1C),虹膜无色素沉积,呈现红色(图 1G)。青紫兰兔大部分被毛呈蓝灰色,耳尖及尾背面黑色,眼圈、尾底及腹部白色,腹毛基部淡灰色(图 1D),虹膜呈现深褐色(图 1H)。

1.2 方法

取四个品种的实验兔实施安乐死后,分别取虹膜组织和背部皮肤组织(2 cm×2 cm),固定于 10% 缓冲中性甲醛。组织按常规脱水包埋,切片脱蜡至水,放入硫酸亚铁液中处理 30min。随后用蒸馏水洗 3 次,每次 5 min。接着用铁氰化钾醋酸液处理 30 min,随即用 1% 醋酸水溶液稍加清洗。作为对比染色,用 Van Gieson 染液复染约 1 min,蒸馏水速洗。最后经 95% 乙醇脱水、无水乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封固等步骤完成制片。光学显微镜观察并拍照。

2 结果

经 HE 硫酸亚铁法染色后,黑色素呈现绿色,含量越高则绿色越深,用 Van Gieson 染液复染的胶原纤维呈红色,肌纤维呈黄色,染色均匀清晰。图 2 显

示组织中黑色素染色效果清晰,黑色素染色与间质组织的背景对比鲜明。

从染色结果可见,虹膜的前表面无上皮,由成纤维细胞和色素细胞组成不连续的前缘层(↑)。虹膜基质为疏松结缔组织(*)。白毛黑眼兔和青紫兰兔的虹膜基质中,靠近虹膜前表面的区域分布着许多被染成墨绿色的黑色素(图 2A、图 2D)。虹膜后表面的虹膜上皮由两层细胞组成(↑↑),前层特化为肌上皮细胞,后层由体积较大的色素细胞组成。白毛黑眼兔和青紫兰兔的虹膜上皮紧密排列着黑色素,形成黑色素层(图 2A、图 2D)。与之相反,日本大耳白兔和白化獭兔的虹膜基质(图 2B、图 2C)和虹膜上皮(图 2B、图 2C)相应部位观察不到黑色素分布。

家兔身体表皮的角质层很薄。真皮内可见较多毛囊。青紫兰兔的毛囊内可见被染成墨绿色的黑色素分布(图 2H)。在白毛黑眼兔的真皮层的毛囊中也有黑色素分布,但染色较浅,呈浅绿色(图 2E)。而日本大耳白兔和白化獭兔的表皮真皮层中未观察到黑色素分布(图 2F、图 2G)。

3 讨论

黑色素是产生于特定种类细胞中的一种生物色素,是由酪氨酸经过一系列化学反应所形成的。黑色素生成、转移和附着的过程称为色素沉积。不同个体间色素沉积的差异使哺乳动物的体表颜色深浅不一、多种多样。

哺乳动物的虹膜颜色和皮毛颜色倾向于趋于一致,皮毛颜色深则虹膜颜色也深,反之亦然。但有皮毛和虹膜颜色深浅差异较大的动物品系存在^[1]。比如 beige 小鼠的皮毛呈现较浅的米黄色而虹膜颜色很深。与之类似的是本研究使用的白毛黑眼兔,其虹膜颜色黑而皮毛白,色差极大。

造成这一现象的黑色素体内分布,可以追溯到胚胎发生阶段。胚胎学研究的结果显示,影响皮毛颜色的黑素细胞全部起源于胚胎神经嵴,且仅有这一个来源。而对虹膜来说,其色素细胞有三种不同类型的来源:1)来自于胚胎神经嵴的细胞最终构成了虹膜基质色素细胞;2)位于虹膜色素上皮中的色素细胞则来自于胚胎神经上皮;3)另外,位于虹膜基质中的、来自于骨髓的抗原递呈细胞也会在吞噬作用的次级影响下成为色素细胞^[2]。也就是说与胚胎神经嵴源黑素细胞相关的基因可以同时影响

虹膜和皮毛的颜色,而与另两个黑素细胞胚胎起源相关的基因则只影响虹膜颜色。假设由于基因突变等原因导致胚胎神经嵴起源的黑素细胞缺失,而其他来源黑素细胞正常,可能出现虹膜有色而皮毛无色的情况。本研究通过对不同品种实验兔组织切片染色结果的观察,发现白毛黑眼兔的虹膜色素上皮和虹膜基质中都有黑色素分布,跟青紫兰兔的分布一致。也就是说,白毛黑眼兔表现出的虹膜与皮毛颜色表型的明显反差并非是由胚胎神经嵴起源的色素细胞缺失造成的。

除此之外,皮毛和虹膜这两种组织中黑色素补偿机制的差异提示我们,参与黑素体转运的某些蛋白也可以单独影响皮毛颜色从而出现虹膜有色皮毛无色的表型。哺乳动物皮毛颜色的维持需要黑色素持续地生成并被不断转运到生长状态的毛干里,而虹膜内的黑色素只需生成不需要转运^[3]。对四种实验兔皮肤组织的镜检发现,在白毛黑眼兔的真皮层毛囊中确有黑色素分布,但呈现的染色结果较青紫兰兔浅得多,显示黑色素含量较低。而且白毛黑眼兔终生被毛雪白,说明其毛干中不含有黑色素。一般认为,黑色素的转运机制可以用细胞吞噬理论、释放理论和融合理论来解释^[4]。目前已有的研究表明,该转运过程涉及的若干关键蛋白与体表色素有直接关系^[5-6]。例如,当在黑素颗粒跨膜转运中起关键作用的 Rab27 蛋白缺乏时,个体会出现

以皮肤和毛发色素减退为临床表现之一的 Griscelli 综合征^[6]。因此,对黑色素转运相关蛋白及基因的进一步研究,将对认识白毛黑眼兔突变表型的机制有所帮助。

参考文献:

- [1] Anderson MG1, Hawes NL, Trantow CM, *et al.* Iris phenotypes and pigment dispersion caused by genes influencing pigmentation [J]. *Pigment Cell Melanoma Res.* ,2008,21(5):565 - 578.
- [2] Eagle RC Jr, Font RL, Yanoff M, *et al.* Proliferative endotheliopathy with iris abnormalities. The iridocorneal endothelial syndrome [J]. *Arch Ophthalmol*, 1979, 97(11): 2104 - 11.
- [3] Slominski A, Wortsman J, Tobin DJ. The cutaneous serotonergic/melatoninergic system: securing a place under the sun [J]. *FASEB J* 2005, 19:176 - 94.
- [4] Chen K, Minwalla L, Ni L, *et al.* Correction of defective early tyrosinase processing by bafilomycin A1 and monensin in pink-eyed dilution melanocytes [J]. *Pigment Cell Res*, 2004, 17: 36 - 42.
- [5] Deacon SW, Nascimento A, Serpinskaya AS, *et al.* Regulation of bidirectional melanosome transport by organelle bound MAP kinase [J]. *Curr Biol*, 2005, 15: 459 - 463.
- [6] Li XD, Ikebe R, Ikebe M. Activation of myosin Va function by melanophilin, a specific docking partner of myosin Va [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280: 17815 - 22.

[修回日期]2014-08-26