中国农业大学学报 2016,21(11):64-69
Journal of China Agricultural University
http://xuebao.cau.edu.cn
DOI:10.11841/j.issn.1007-4333.2016.11.09

褪黑激素对内蒙古绒山羊初级毛囊体外培养影响的研究

张铁佳 王岩 王琳 吴静 史振丹 赵艳红*
(内蒙古农业大学 动物科学学院,呼和浩特 010018)

摘 要 为探究褪黑激素(MT)对绒山羊毛囊体外生长及毛囊形态的影响,采用物理切割法结合胶原酶消化分离绒山羊初级毛囊,并通过设置酶的不同体积分数(0.10%、0.20%、0.25%、0.30%、0.35%、0.40%和0.45%)以及相应的消化时间(100、80、70、60、50、45和35 min)确定型胶原酶消化的最佳条件。在初级毛囊体外培养的基础上,添加褪黑激素(300 pg/mL)连续培养5 d,在显微镜下观察毛囊每天的生长情况。结果显示,毛囊分离过程中胶原酶消化的最佳体积分数和时间为0.30%、60 min,褪黑激素对初级毛囊体外生长具有极显著的($P<0.01$)促进作用。

关键词 褪黑激素;初级毛囊;体外培养;绒山羊

中图分类号 S 826.9;S 815.2 **文章编号** 1007-4333(2016)11-0064-06 **文献标志码** A

Effect of melatonin on Inner Mongolia primary follicle growth and development

ZHANG Tie-jia, WANG Yan, WANG Lin, WU Jing, SHI Zhen-dan, ZHAO Yan-hong*
(College of Animal Science, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

Abstract To study the effects of melatonin (MT) on the fiber growth and follicle morphology of primary follicle from Inner Mongolia cashmere goat *in vitro*, microdissection separation method and enzyme digestion method was used to isolate primary follicles. The primary follicle was isolated in different concentrations of collagenase (0.10%, 0.20%, 0.25%, 0.30%, 0.35%, 0.40% and 0.45%) and at different time (100, 80, 70, 60, 50, 45 and 35 min). Melatonin (300 pg/mL) was added to primary follicle culture for 5 days, and then primary follicle was observed with an inverted phase-contrast microscope. The results showed that the most suitable concentration and time was 0.3% and 60 min, and the effect of melatonin on primary hair follicles was significant ($P<0.01$).

Keywords melatonin; primary follicle; in vitro; cashmere goat

阿尔巴斯型绒山羊是我国优良的绒山羊品种,享有“软黄金”、“纤维宝石”的美誉,在国际上占有重要地位。绒山羊毛囊的研究,不仅是研究皮肤毛囊生长调控机理的重要内容,而且对提高绒山羊绒毛产量和品质有重要影响。毛囊作为一个形态结构较为复杂的皮肤附属器官,是毛发的发源地,控制着毛发的生长,具有独特的结构和周期性再生的能力[1]。目前有关绒山羊毛囊生长变化的调控机理尚未明确[2],但已经证实一些细胞因子参与绒毛的生长调控[3],其中褪黑激素(Melatonin,MT)是近些年来大家较为热衷研究的。褪黑激素的分泌呈现明显的周期性变化,绒山羊绒毛的生长周期恰好与褪黑激素的分泌周期一致,而绒山羊外源褪黑激素的植入可通过诱导毛囊的生长从而改变毛纤维的生长模式[4-5]。Ibraheem 等[6]将分离的生长期绒山羊次级毛囊置于0、50、150、300和600 ng/L的褪黑激素中培养,结果显示毛囊在300 ng/L褪黑激素中达最大伸长率。体外试验表明褪黑素可能直接作用于次级毛囊促进毛干的延伸。贾志海等[7]最早对内蒙古绒山羊埋植褪黑激素发现,短光照和褪黑激素处理均

收稿日期:2015-11-19
基金项目:国家自然科学基金资助项目(31460588);内蒙古自然科学基金资助(2013MSO417)
第一作者:张铁佳,硕士研究生,E-mail:15133229032@163.com
通讯作者:赵艳红,教授,主要从事动物遗传育种研究,E-mail:13947196432@163.com

可显著提高山羊绒产量，促进绒毛生长而对粗毛生长没有影响。何茂昌等[8]研究皮下埋植褪黑激素对毛囊生长发育的影响发现，褪黑激素对毛囊直径、深度、密度无显著作用，而毛囊活率高于对照组。大量研究表明，褪黑激素能够提高绒毛产量，但是褪黑激素对于内蒙古绒山羊毛囊体外培养的影响还未见报道。本研究利用体外培养技术，分析褪黑激素(MT)对绒山羊初级毛囊生长和形态的影响，旨在为研究褪黑激素(MT)调控内蒙古阿尔巴斯绒山羊初级毛囊生长机制提供理论参考。

1　试验材料与方法

1.1　样品采集

挑选内蒙古鄂尔多斯市阿尔巴斯白绒山羊种羊场的 3 只健康成年公羊，将肩胛部羊毛剃净，用碘酒和 75%酒精消毒，用手术刀切取皮肤约 3～4 cm^2，放入含双抗的 D-Hanks 液中，带回无菌室。将云南白药洒在绒山羊皮肤切口处，按压止血后，敷无菌纱布绑定。

1.2　试验设计

试验设计 2 组，即空白对照组(CK 组)和褪黑激素组(MT 组)。每组设置 3 个重复。对照组添加基础培养基(William' E 培养基，胰岛素-转铁蛋白-亚硒酸钠 10.5、9.5 和 12.5 ng/mL，氢化可的松 0.4 μg/mL，L-谷氨酰胺 2 mmol/L，青霉素 100 μ/mL，链霉素 100 μg/mL)。

褪黑激素组是在基础培养基中添加褪黑激素[6] (300 pg/mL)。

1.3　试验方法

1.3.1　胶原酶浓度的确定

胶原酶Ⅳ的使用浓度是 0.1%～0.5%，在此基础上，选择性的做了胶原酶 IV 浓度和时间的梯度(温度均为 37 ℃)，探讨酶消化的最适浓度和时间用于后续试验(表 1)。

表 1　胶原酶消化体积分数、时间及结果

Table 1　Digestive concentration, time, results of collagenase

ρ(酶)/% Enzyme content	消化时间/min Digestion time	消化结果 Digestion result
0.10	100	组织较疏松，无游离毛囊
0.20	80	组织疏松，无游离毛囊，部分毛根弯曲
0.25	70	组织疏松，有游离毛囊，毛球脱落，毛根弯曲
0.30	60	组织疏松，无游离毛囊，毛根毛球完好
0.35	50	组织疏松，有游离毛囊，毛球部分脱落，毛根完好
0.40	45	组织疏松，有游离毛囊，毛球完好，毛根弯曲
0.45	35	组织疏松，无游离毛囊，毛球脱落，毛根弯曲

胶原酶浓度过高造成毛囊毛根弯曲，毛球脱落。消化时间太长则导致毛囊活性降低，胶原酶的浓度和消化时间直接影响毛囊的分离和在培养过程中的正常生长状态。所以，最终选择酶消化的最适体积分数和时间为 0.30%，60 min。

1.3.2　毛囊的分离培养

参考文献[9]的方法并进行优化，采用物理切割法结合胶原酶消化法分离毛囊。在解剖显微镜下，在含有 D-Hanks 液的无菌培养皿中，将绒山羊皮肤切成尽量薄的皮片，用外科手术刀将脂肪剔除至暴露出毛囊部分毛球。将皮片置于 2 mL 0.30%胶原酶Ⅳ中，放入 37 ℃，5% CO_2 培养箱中消化 60 min，在解剖显微镜下观察出现游离毛囊时把皮肤取出置于含有 D-Hanks 液的无菌培养皿内。利用外科手术刀片顺着毛囊生长方向将毛囊周围疏松的组织切离，借助注射针头得到单个毛囊并且将其周围脂肪剔除干净，挑选毛乳头大、光滑圆润、真皮组织鞘完整且与外皮根鞘无分离的毛囊置于 37 ℃，5% CO_2 培养箱中培养。每 24 h 用倒置显微镜观察毛囊生长状况并进行长度测量，若生长长度未超过 0.02 mm，则判断毛囊不能存活。

1.3.3　毛囊的分组

在显微镜下挑选毛乳头大且结构明显、真皮组

织鞘完整的毛囊48根，置于24孔培养板中分成2组，每组24根，每孔1根。一组作为空白组(CK组)，另一组添加含有褪黑激素(300 pg/mL)的基础培养基。

1.3.4　观测指标

1)毛囊形态观察。在倒置显微镜下每24 h观察各组毛囊毛球部形态变化，记录其变化特点。

2)毛囊生长长度。在37 ℃、5% CO_2培养箱中培养，每隔24 h在倒置显微镜下测量毛囊的生长长度并及时拍照记录。

1.4　统计分析

试验数据统计运用SAS程序中的ANOVA过程和Duncan法对毛囊生长长度进行方差分析和多重比较。

2　试验结果

2.1　毛囊生长形态的变化

在倒置显微镜下观察5 d内毛囊生长的形态状况，新鲜分离的毛囊毛球呈圆形，毛乳头嵌入毛母质细胞中且清晰，毛干与内、外根鞘之间的界限明显。CK组和MT组毛囊形态变化可见图1、图2。2组毛囊在生长过程中毛根和内外根鞘同时伸长，结缔组织鞘无明显变化，各部分结构清晰，MT组毛囊生长长度、幅度明显大于CK组。在毛囊体外培养过程中，毛囊上段或下段会出现不同程度的弯曲，毛乳头从毛球中下部慢慢下移至毛囊底部，MT组较CK组更早的出现弯曲。上中段有损伤的毛囊在培养过程中可以自行修复，并长出类角朊细胞(图3)。

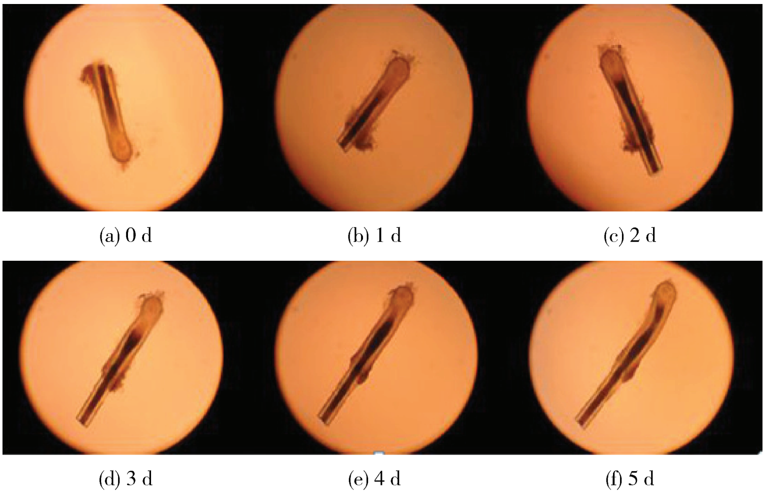

图1　K组毛囊生长变化

Fig. 1　Growth changes of primary hair follicle in control group

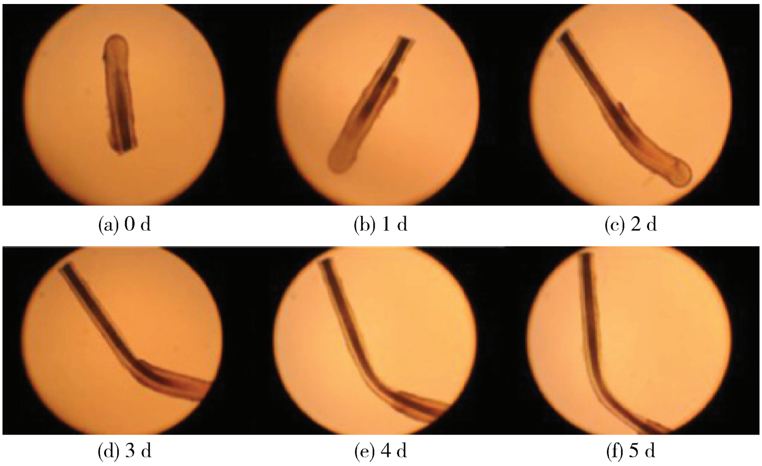

图2　MT组毛囊生长变化

Fig. 2　Growth changes of primary hair follicle in melatonin group

图 3　毛囊中段长出细胞

Fig. 3　Growth of keratinocytes from the middle part of primary hair follicle

2.2　毛囊生长长度的测定

利用倒置显微镜对 2 组毛囊进行拍照并记录毛囊最初长度作为毛囊 0 d 的长度。挑第 1 天有明显生长的毛囊进行拍照，连续进行培养 5 d 并观测。培养期间，CK 组和 MT 组毛囊长度均呈现递增趋势且前 3 d 生长较快，平均生长速度分别为 47.02 和 73.76 μm/d，随后 2 d 生长速度降慢。MT 组毛囊的生长长度和平均速度均明显高于 CK 组，毛囊总长度变化见表 2。

表 2　MT 组和 CK 组初级毛囊总长度

Table 2　Length of primary hair follicle in melatonin and control group

生长时间/d Growth time	毛囊总长度/μm Total length of hair follicles	
	CK	MT
0	378.90±30.49 Aa	374.76±36.12 Aa
1	411.97±44.92 Ba	421.88±59.32 Bb
2	466.06±60.58 Ca	513.43±82.23 Cb
3	519.95±85.29 Da	596.03±100.60 Db
4	561.36±106.25 Ea	669.67±116.47 Eb
5	589.31±123.39 Fa	713.88±127.10 Fb

注：处理内不同大写字母表示差异极显著（$P<0.01$），处理间不同小写字母表示差异极显著（$P<0.01$）。

Note: Means with different letters within row were significant difference ($P<0.01$), means with uniform letters within columns were significant difference ($P<0.01$).

2.3　褪黑激素对体外培养毛囊生长的影响

由图 4 可看出，褪黑激素影响毛囊的生长，对毛囊具有明显的促进作用，随着毛囊的生长促进作用逐步减弱。MT 组在第 2 天生长速度达到最大，随着培养时间的延长，毛囊生长速度逐渐下降。5 天内 MT 组的平均生长长度明显高于 CK 组。CK 组毛囊在第 2 天和第 3 天生长速度较快，第 4 天生长速度降低，第 5 天生长速度降到最低。MT 组毛囊在第 2 天生长速度最快，随后生长速度降低，第 5 天生长速度最慢。2 组毛囊每天总长度差异极显著（$P<0.01$），MT 组毛囊每天生长速度均高于 CK 组，差异极显著（$P<0.01$）。

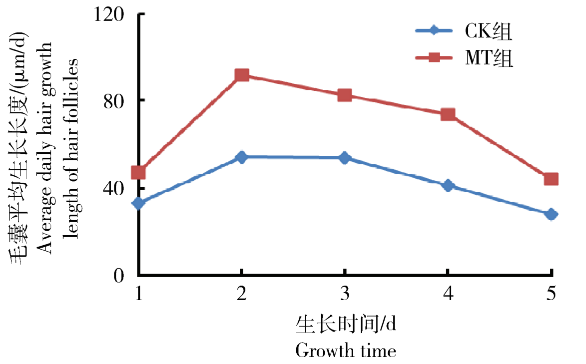

图 4　褪黑激素(MT)对毛囊生长速度的影响

Fig. 4　Effect of melatonin on the growth rate of hair follicles

3　讨　论

3.1　毛囊的分离

国内外分离毛囊的方法大致可分为机械法和酶消化法。1990 年，Philpott 等[10]利用机械法，建立了 Merino rams 游离毛囊培养的模型，采用悬浮培养法在体外培养出完整的游离单个毛囊器。李衡[11]通过显微解剖法和切割法的结合分离毛囊，试

验显示应选用外毛根鞘完整、毛乳头形态圆润光滑的生长期毛囊进行培养。为了便于观察和测量毛囊的生长，分离后的毛囊长度约为 2～3 mm 时最适合毛囊的生长观察。机械法分离毛囊不仅对实验人员操作的熟练程度有较高要求，还过于耗费体力。将此方法应用在有致密结缔组织的山羊皮肤中比较费时费力，对毛囊的损伤太大，分离出来的毛囊周围含有较多脂肪，既不利于培养过程中毛囊的生长，而且影响毛囊长度测量的准确性。此外，试验对象的个体差异使酶消化法中消化时间和浓度不同，在前人研究的基础上[12-13]，探索了胶原酶Ⅳ在消化内蒙古绒山羊皮肤过程中的浓度和时间，发现酶消化的最适浓度和时间为 0.30％、60 min。将胶原酶消化和切割法结合进行发现，先将表皮去除，留下含有完整毛囊的部分真皮，选择 0.30％胶原酶Ⅳ，37 ℃消化 60 min。不仅有利于分离出干净、完好的毛囊，还在有效减少操作时间、提高工作效率的同时降低了毛囊的损伤。值得注意的是，皮肤在酶消化前必须进行彻底消毒灭菌，以防后续培养过程中出现污染情况。

3.2 褪黑激素对毛囊生长的影响

在 Ibraheem 等[6]的研究中，褪黑激素能促进体外培养绒山羊次级毛囊的伸长，使毛囊的存活率降低。绒山羊初级毛囊的结构与次级毛囊相似，次级毛囊是初级毛囊的分支[14]，由此推测褪黑激素对体外培养初级毛囊同样具有促进作用。本试验结果证实褪黑激素能够显著促进体外培养初级毛囊的生长。随着培养时间的延长，MT 组初级毛囊生长速度逐渐降低，但没有引起毛囊死亡，直至培养的第 5 天毛囊仍处于生长状态，与 Ibraheem 等[6]研究的次级毛囊状况不符，可能是因为初级毛囊个体形态较大，较次级毛囊对褪黑激素的刺激有更强耐受性。

McCloghry 等[15]对绵羊进行褪黑激素处理，尽管血液中褪黑激素浓度增加，却抑制了催乳素的分泌。但不论是短期褪黑激素处理还是长期处理，净毛率、羊毛细度和体重都不受褪黑激素处理影响，说明羊毛生长机制不同于山羊绒。Mitchell 等[16]和丽春[17]的研究认为，短光周期和褪黑素处理显著提高山羊绒产量，而粗毛不受光照和褪黑激素的影响。由于毛囊结构和发育时间的差异，毛囊存在初\次级之分，初级毛囊发育成有髓毛，即发毛，次级毛囊发育成无髓毛，即绒毛[18]，由此推测初级毛囊也同样不受褪黑激素的影响。但由本试验可知，在无其他激素作用条件下的毛囊体外培养试验中，褪黑激素对初级毛囊内外根鞘的伸长确实存在着显著的促进作用，但是具体的作用机制还有待深入研究，需要利用转录组测序研究褪黑激素处理后的毛囊的基因变化，检测褪黑激素对绒毛生长相关基因表达的影响。

4 结 论

在内蒙古阿尔巴斯绒山羊初级毛囊体外培养的过程中，添加褪黑激素对初级毛囊的生长具有极显著的促进作用。为进一步揭示褪黑激素调控初级毛囊生长机制奠定可靠的理论基础。而褪黑激素能刺激初级毛囊生长和不能促进粗毛生长有无直接联系以及褪黑激素处理前后的初级毛囊基因是否发生变化，这将是下一步所要解决的问题

参 考 文 献

[1] Roh C，Tao Q，Lyle S，Photopoulos C，Guo Z，Poche M. Dermal papilla-induced hair differentiation of adult epithelial stem cells from human skin[J]. *Physiol Genomics*，2004，19(2)：207-217

[2] Betteridge K，Welch R A S，Pomroy W E，Devantier B P. Out of season cashmere growth in feral goats[C]. In：Proceedings of the Second International Cashmere Conference. New Zealand：Lincoln College：1987：137-142

[3] 赵艳红，王琳，张铁佳，李金泉. 褪黑激素促进绒山羊绒毛生长及其作用机制的研究进展[J]. 中国畜牧兽医，2014，41(4)：215-218

Zhao Y H，Wang L，Zhang T J，Li J Q. Research progress on promotion and mechanisms of melatonin on the cashmere growth in cashmere goats[J]. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*，2014，41(4)：215-218 (in Chinese)

[4] 宿婧. 花鼠皮肤毛囊的研究[D]. 呼和浩特：内蒙古农业大学，2012

Bao J. Studies on skin and hair follicles of the chipmunks[D]. Hohhot：Inner Mongolia Agricultural University，2014 (in Chinese)

[5] 程建波，张子军，章孝荣，王力生，范彩云. 褪黑激素对绒山羊绒毛生长的影响及其作用机制研究进展[J]. 贵州农业科学，2011，39(3)：166

Cheng J B，Zhang Z J，Zhang X R，Wang L S，Fan C Y. Research progress on effects and mechanisms of melatonin on the cashmere growth in cashmere goats [J]. *Guizhou Agricultural Sciences*，2011，39(3)：166 (in Chinese)

[6] Ibraheem M，Galbraith H，Scaife J，Ewen S. Growth of secondary hair follicles of the Cashmere goat *in vitro* and their response to prolactin and melatonin[J]. *Journal of Anatomy*，1994，185：135-142

[7] 贾志海，安民. 山羊绒生长机理研究进展[J]. 草食家畜，1996

(1):2-6
Jia Z H, An M. Advances in goat hair growth mechanism research[J]. *Feeding Livestock*, 1996(1):2-6 (in Chinese)

[8] 何茂昌,何钊,赵成余,方畴鑫,王耀荣,李嘉龙,徐鹏,赵小明.皮下埋植褪黑激素对陇东绒山羊皮肤毛囊生长发育的影响[J].畜牧兽医杂志,2011,30(2):21-26
He M C, He Z, Zhao C Y, Fang C X, Wang Y R, Li J L, Xu P, Zhao X M. Effect of injecting melaton in capsules on growth of skin follicle of Longdong cashmere goats[J]. *Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2011, 30(2): 21-26 (in Chinese)

[9] 朱兵.内蒙古绒山羊皮肤毛囊毛乳头细胞系的建立及其基因表达谱型的研究[D].呼和浩特:内蒙古大学,2014
Zhu B. Establishment and gene expression patterns of the dermal papilla cells derived from the pelage skin of inner Mongolia cashmere goat[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2014 (in Chinese)

[10] Philpott M P, Green M R, Kealey T. Human Hair Growth *in vitro*[J]. *Cell Science*, 1990, 97(3): 463-471

[11] 李蘅.绒山羊毛囊体外培养及雌二醇对毛囊 Bcl-2、Bax 表达的影响[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2007
Li H. The effect of the culture in vitro and estradiol on hair follicles Bcl-2 and Bax expression of cashmere goat[J]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2007 (in Chinese)

[12] 席海燕.绒山羊皮肤干细胞定位、迁移及次级毛囊生长期差异基因文库的构建与筛[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2009
Xi H Y. Localization, migration of skin stem cells and identification of differentially expressed genes of secondary follicle in anagen in Cashmere goat by SSH and cDNA microarray[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2009 (in Chinese)

[13] 崔志峰.济宁青山羊皮肤毛囊细胞系的建立和细胞因子的作用研究[D].泰安:山东农业大学,2010
Cui Z F. Studies on isolation, culture and identification of hair follicle cells from goat and reconstitution of hair follicle *in vitro*[D]. Taian: Shan Dong Agricultural University, 2010 (in Chinese)

[14] 张燕军,尹俊,李金泉.内蒙古阿尔巴斯绒山羊毛囊结构及形态发生过程研究[J].中国农业科学,2007,40(5):1017-1023
Zhang Y J, Yin J, Li J Q, Li C Q. Study on hair follicle structure and morphogenesis of the Inner Mongolian Arbas cashmere goat[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2007, 40: 1017-1023 (in Chinese)

[15] McCloghry E, Foldes A, Hollis D, Rintoul A, Maxwell C, Downing J. Effects of pinealectomy on wool growth and wool follicle density in merino sheep[J]. *Journal of Pineal Research*, 1992, 13: 139-144

[16] Mitchell R J, Betterdge K, Gurnsey M P, Welch R A S. Fibre growth cycles of cashmere-bearing does over a 30-month period[J]. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 1991, 34: 278-294

[17] 丽春.褪黑激素影响山羊绒生长的分子机理[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2012
Li C. The molecular mechanism of melatonin affecting the growth cashmere[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2012 (in Chinese)

[18] 王琳.褪黑激素对内蒙古绒山羊毛囊生长发育相关基因的影响[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2014
Wang L. Effect of melatonin on genes related to Inner Mongolia hair follicle growth and development[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2014 (in Chinese)

责任编辑：苏燕