

关中奶山羊胎儿皮肤发育的组织形态观察

林吉茂¹,成醒民²,罗时双¹,卿素珠¹

(1 西北农林科技大学 动物科技学院,陕西 杨凌 712100;2 陕西省澄城县畜牧中心,陕西 澄城 715200)

[摘要] **【目的】**观察关中奶山羊胎儿皮肤及其衍生物在不同生长阶段的组织发育及生长变化。**【方法】**运用HE和Masson染色法以及透射电镜,对不同发育时期的山羊胎儿皮肤组织切片进行染色和观察。**【结果】**表皮于8~9周龄开始发育;10周龄表皮由3层细胞构成,真皮层出现胶原纤维,表明真皮层开始出现;在11周龄可见有原始毛囊出现,有少量张力原纤维存在,并发现朗格罕斯细胞;12~13周龄表皮细胞出现角质层、透明层及颗粒层的分化,可见汗腺;14~15周龄毛球上皮细胞索开始分化为外根鞘、内根鞘的原基和毛发的前体,在毛囊一旁出现皮脂腺,张力原纤维增多、变粗,并发现典型的桥粒结构;16~17周龄表皮层变薄,毛开始形成,并随着发育逐渐长出体表;18周龄皮肤结构渐趋成熟。**【结论】**山羊胎儿表皮的发生先于真皮发生,皮肤在胎儿期处于剧烈的分化阶段,皮肤衍生物的形成对皮肤的发生有重要作用。

[关键词] 奶山羊;胎儿;皮肤组织;皮肤发育

[中国分类号] S858.272.16

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2008)05-0043-05

Histological observation on the fetus skin development of Guanzhong dairy goats

LIN Ji-mao¹,CHENG Xing-min²,LUO Shi-shuang¹,QING Su-zhu¹

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Animal Husbandry Centre of Chengcheng county of Shaanxi Province, Chengcheng, Shaanxi 715200, China)

Abstract:**【Objective】**The experiment was conducted to observe the histological development of skin and its derivation in different growth periods of the Guanzhong Dairy Goats.**【Method】**HE & Masson and transmission electron microscope (TEM) methods were carried out to dye the simple slices of fetal goatskin tissue.**【Result】**The skin of goat fetus began to develop from 8th to 9th week, skin of the 10th was made up with three layers cells, folliculars appeared at the 11th week, from week 12th to 13th, skin cells began to differentiate into cuticular layers, diaphanotheca and granular layers, sweat glands formed at the same time, skin cells of hair bulb began to differentiate into the fundament of outer root-sheath and internal root sheath, and the antecedent of hairs, sebaceous gland was formed on one side of the folliculars, hair appeared and began to grow outside of the skin as the cuticular layer thinning, from 16th—17th week, the structures of skin began to grow and become mature at the 18th week.**【Conclusion】**The development of goat embryonic epidermis, which differentiates exquisitely during the embryophase, is prior to that of corium. The ramification of skin is significant to the development of goat skin.

Key words: dairy goat; fetus; skin tissue; skin development

* [收稿日期] 2007-05-30

[基金项目] 陕西省自然科学基金资助项目(2004C120)

[作者简介] 林吉茂(1980—),男,吉林通化人,硕士,主要从事动物组织胚胎学和发育生物学研究。E-mail:linjimao2000@163.com

[通讯作者] 卿素珠(1969—),女,湖南永州人,副教授,博士,主要从事动物组织胚胎学和发育生物学的研究。
E-mail:suzhuqing@163.com

皮肤是机体面积最大的器官,由表皮、真皮和皮下组织 3 层组成,在维持机体内环境稳定和预防外来物入侵中起着重要作用,因此对皮肤组织结构生物学的研究,一直受到研究者的重视。Parry 等^[1]研究了澳大利亚绒山羊羔羊出生后皮肤毛囊的发育规律,Moore 等^[2]研究了绵羊毛囊的形成过程,栾维民等^[3]研究了绒山羊皮肤的结构,李长青等^[4]比较了内蒙古绒山羊与辽宁绒山羊的毛囊周期性变化。目前,国内外关于皮肤的研究主要集中在出生后及成年羊的研究上,而对山羊胎儿皮肤发育的研究较少,有关山羊皮肤发育过程中表皮、真皮及皮肤衍生物的组织学变化的详细研究资料更显缺乏。本试验采用组织学染色方法,通过光学显微镜及电镜,对关中奶山羊皮肤的整体发育进行了详细研究,以阐明山羊胎儿皮肤生长发育的规律,从而为定向繁殖、培育地方良种及丰富家畜胚胎学的内容提供形态学依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 试验动物及取材 参考曹贵方^[5]的方法,自西安屠宰场取 6~18 周龄的关中奶山羊胎儿,每周龄 3 只,取背部皮肤组织 1 cm×1 cm×1 mm 作组织学切片备用;取 11 和 15 周龄背部皮肤组织 1 mm×1 mm×1 mm 作电镜制片备用。

1.1.2 主要试剂及仪器 苏木精、伊红等常规组织学制片及染色剂;精密轮转切片机(美国 AO 公司),Motic 数码光学显微镜(厦门 Motic 实业有限公司),Sartorius AA-160 型电子读数分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

1.2 方 法

1.2.1 关中奶山羊胎儿皮肤组织切片的制作 将组织切片用皮肤分为 2 份:1 份经 0.4 g/L 多聚甲醛固定液固定作常规 HE 染色,另 1 份经 Bouin 氏固定液固定作 Masson 染色。2 份固定材料分别经梯度乙醇脱水,常规石蜡包埋,连续切片,片厚 6~8 μm ,切片隔 5 取 1,制备 2 套切片,45 $^{\circ}\text{C}$ 温箱烤片,备染。

HE 染色方法:二甲苯 I、二甲苯 II 各 5 min 脱蜡;依次入梯度乙醇复水,蒸馏水浸泡 2 min;入苏木精染液 10~15 min;1% (体积分数) 盐酸酒精分色,流动自来水蓝化 15 min;伊红染 3~5 min,水冲 1 次;梯度乙醇脱水,二甲苯 I、二甲苯 II 各 5 min,中性树脂封片。

Masson 三色染色方法:切片脱蜡复水至蒸馏水浸泡 2 min;入 0.1 g/L 地衣红染 30 min,染弹性纤维,蒸馏水冲洗;苏木精染细胞核 10~15 min;入丽春红-品红染液染 5~10 min;经 0.5% (体积分数) 醋酸洗 0.5 min,蒸馏水略洗;入 1% (体积分数) 磷钼酸水液分色 3~5 min 至胶原纤维呈淡红色或无色,肌纤维为红色;1% (体积分数) 醋酸洗 30 min;入淡绿染 3~5 min,水洗;常规脱水、透明、封片,光学显微镜下观察。

1.2.2 关中奶山羊胎儿皮肤透射电镜切片的制作

取 11 和 15 周龄山羊胎儿皮肤,用戊二醛-多聚甲醛固定,然后再分别用 10% (体积分数) 锇酸和 0.5% (体积分数) 醋酸铀进行固定和组织浸染,Epon812 包埋和修块定位,作超薄切片和柠檬酸铅复染,透射电镜下观察。

对 2 种切片的观察结果进行统计、分析并照相。

2 结果与分析

2.1 关中奶山羊胎儿皮肤的组织学观察

观察结果(图 1)显示:6~7 周龄,山羊胎儿皮肤表面很平整,开始出现表皮结构,表皮为单层扁平上皮,其与深部的间充质之间未分开,两者细胞混在一起,没有明显的界限而不易区分(图 1A)。

8 周龄,皮肤表面仍较平整,组成表皮的单层扁平细胞变成柱状细胞,与深层的间充质细胞界限仍不清。

9 周龄,皮肤表面平整,表皮细胞开始增生变为 2 层,细胞排列较紧密,表皮外层细胞呈单层扁平状,位于深层的细胞为单层立方状,构成生发层。表皮与间充质之间有一定的分界线(称作基膜),深层间充质细胞排列较稀疏(图 1B)。皮肤内未发现胶原纤维。

10 周龄,皮肤表皮基底层细胞不断增殖出现中间层,即表皮由 3 层排列较紧密的细胞构成,表层细胞呈扁平状,中间层细胞呈梭形,深层细胞均呈立方状。在表皮的有些部位有单独存在的由基底层细胞围成的团状实心细胞群结构,该结构向间充质内移行形成毛芽。此时真皮层开始出现,与表皮分界明显。已有血管的迁入,明显可见到有血管的横断面。真皮层有少量胶原纤维和弹性纤维合成(图 1C)。

11 周龄,皮肤表皮基底层细胞继续增殖使中间层加厚,表皮由多层排列较紧密的细胞构成,表层细胞扁平,深层细胞呈立方状。在表皮的有些部位可见单个由基底层细胞围成的细胞群,形成原始毛囊。

在原始毛囊的生发层附近形成实心的细胞索即为汗腺。真皮层增厚,表皮与真皮发生紧密接触。

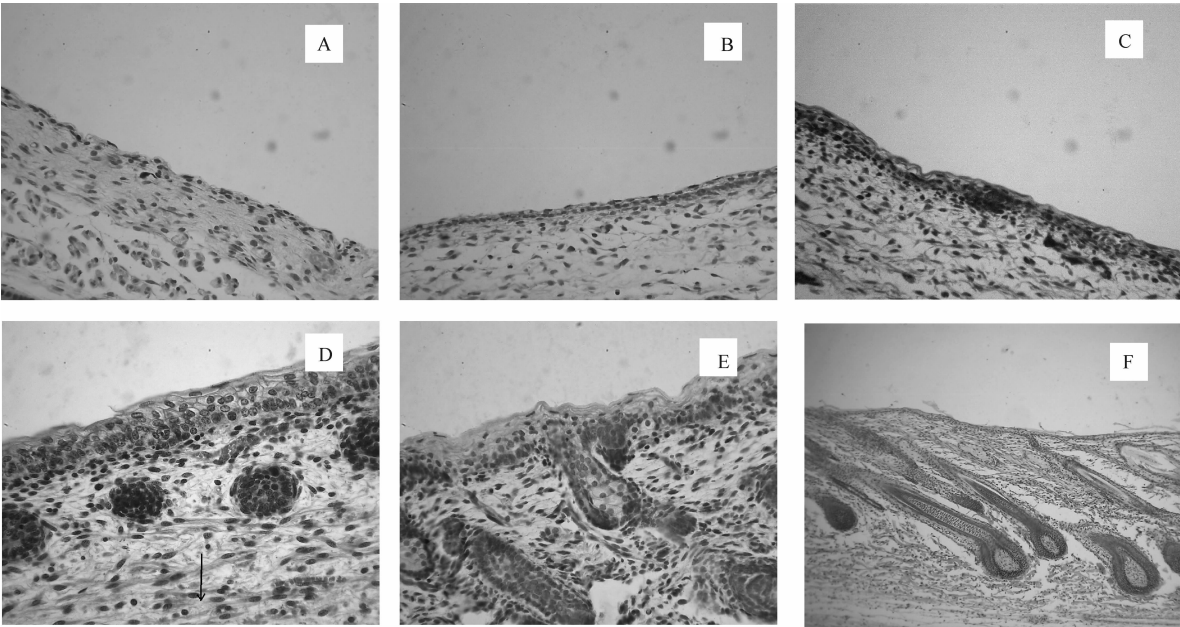


图 1 不同周龄关中奶山羊胎儿皮肤的组织学观察

A. 7 周龄(HE, ×400); B. 9 周龄(HE, ×400); C. 10 周龄(Masson, ×400); D. 12 周龄(Masson, ×400);
E. 14 周龄(HE, ×400); F. 17 周龄(HE, ×200)

Fig. 1 Histological observation on the different weeks fetus skin of Guanzhong dairy goats

A. 7 weeks(HE, ×400); B. 9 weeks(HE, ×400); C. 10 weeks(Masson, ×400); D. 12 weeks(Masson, ×400);
E. 14 weeks(HE, ×400); F. 17 weeks(HE, ×200)

12~13 周龄,皮肤表皮细胞变厚增殖至 4~5 层,原始毛囊伸长,斜向下生长形成柄球状结构,其末端周围有更多的成纤维细胞聚集。表皮细胞出现角化层、透明层及颗粒层的分化,此时表皮的组织结构特征逐渐成形。真皮的疏松结缔组织不断增厚,表皮与真皮之间形成凹凸相间的形态结构而紧密接触,真皮乳头层结构开始形成。在真皮层深部可见有少量汗腺的分泌部。血管的横断面数量增多,真皮层合成的胶原纤维明显增多(图 1D)。

14~15 周龄,皮肤表皮基底层为一层排列紧密呈立方状的细胞。棘细胞层为 2~3 层,细胞呈不规则形或多边形,比基底层细胞大,核呈圆形,较大,染色较浅。颗粒层细胞由 1~2 层梭形细胞组成。透明层细胞界限不清楚,胞质被染成呈均质状的一层红色。角化层由脱落的扁平状细胞构成。真皮层可观察到许多棒状毛囊,其根部膨大形成毛球,毛球出现内凹,周围的成纤维细胞和结缔组织向内迁入形成乳头。毛球上皮细胞索开始分化为外根鞘、内根鞘原基和毛发前体,未见毛干出现。在毛囊一旁出现皮脂腺,皮脂腺细胞着色浅,呈多边形,细胞界限清晰,核圆形或椭圆形,体积小,染色深,胞质内因

含大量的类脂颗粒呈空泡状。在毛囊的另一侧可见有竖毛肌,在真皮层深部可见许多汗腺分泌部,其管腔增大。血管断面较多(图 1E),真皮层胶原纤维继续增多。

16~17 周龄,皮肤表皮层的厚度变薄,角质层更加明显。在毛囊里有毛生成,但没有伸出体外,毛囊根部毛乳头结构更加完善。其他附属结构与 15 周龄皮肤相近,真皮层的厚度增加,有大量胶原纤维和弹性纤维,结构逐渐成熟(图 1F)。

18 周龄,皮肤表皮层变得更薄,但角质层增殖变厚,毛囊的内、外根鞘分层明显,毛从毛囊通过并伸出体表外。皮脂腺及汗腺逐渐发达,血管更加丰富。真皮层深层布满胶原纤维。此时皮肤的组织结构已接近羔羊。

2.2 关中奶山羊胎儿皮肤组织的超微结构观察

11 周龄,表皮的棘细胞层细胞质内可见有少量张力原纤维(图 2A),并发现朗格汉斯细胞的典型特征(网球拍状的伯贝克颗粒 Biebeck granule),还可见有糖原颗粒;基底层和中间层细胞间隙增大,内容物成电子透明状,有指状突起伸入,在相邻细胞间出现桥粒结构。15 周龄,张力原纤维增多、变粗,糖

原颗粒增多(图 2B);随着中间层细胞的增殖变厚,棘细胞层出现典型的桥粒结构(图 2C)。

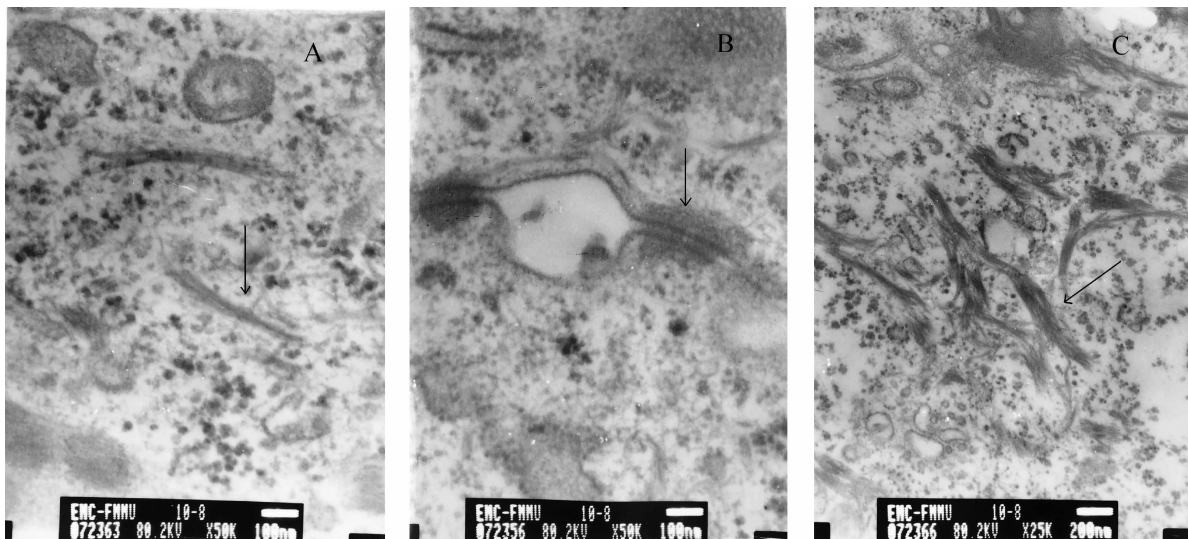


图 2 不同周龄关中奶山羊胎儿皮肤的超微结构观察

A. 11 周龄张力原纤维(↑),透射电镜(×50 000);B. 15 周龄桥粒(↑),透射电镜(×50 000);
C. 15 周龄张力原纤维(↑),透射电镜(×25 000)

Fig. 2 The ultrastructural observation on the different weeds' fetus skin of Guanzhong dairy goats
A. The tenofibril(↑) at 11th week,TEM(×50 000);B. The Bridge Corpuscle (↑) at 15th week,
TEM(×50 000);C. The tenofibril (↑)at 15th week,TEM(×25 000)

3 讨 论

山羊皮肤由表皮、真皮和皮下结缔组织组成,在胎儿时期分化剧烈。表皮属于复层上皮,由角质层、透明层、颗粒层、棘细胞层和基底层组成^[3]。真皮层是皮肤最厚、最重要的一层,分乳头层和网状层,其中血管、胶原纤维和弹性纤维十分丰富,且纤维相互交织,对毛囊生长发育的营养供给非常重要。毛囊、汗腺、皮脂腺、竖毛肌及淋巴管均在该层。

本研究结果表明,在 8 周龄左右,山羊胎儿皮肤表皮开始发育,由单层扁平上皮细胞不断增殖分化形成复层上皮,到 13 周龄时表皮厚度达到最大,随后表皮的厚度不增加反而变薄,这与洪琼花等^[6]报道的云南半细毛羊皮肤表皮的变化相符。随着生长发育,部分基底层细胞聚集成团,向真皮内移行,形成毛囊原基,在 13 周龄左右毛囊原基发育成毛球,进而形成毛乳头,16 周龄后随着内、外根鞘的分化,使毛球上皮细胞分裂增生形成毛。真皮的出现较表皮晚,主要由成纤维细胞和结缔组织组成,真皮层出现的同时,Masson 染色显示此时成纤维细胞开始合成胶原纤维。有报道表明,绒山羊胎儿皮肤发育时,皮脂腺较汗腺出现早^[7],但本试验结果显示,汗腺比皮脂腺出现早。伴随着血管的不断迁入,真皮的结构逐渐发育成熟。本试验结果还表明,山羊胎儿在

11~15 周龄是皮肤发育的重要时期,此时表皮、真皮、毛囊前体细胞的生长和发育都达到了一个鼎盛时期;各层细胞的结构变化也已从胎儿早期的形态逐渐向成熟发育,说明对于皮肤而言,是经过定向分化的次级上皮细胞通过相邻细胞间及细胞与基底膜间的紧密连接而组成功能性表皮组织的^[8]。

观察表明,山羊胎儿表皮的发生比真皮早,真皮的发生和发育与血管的迁入诱导有关,真皮的发育可能与循环系统的关系极为密切,真皮中的成纤维细胞由于其中的血管提供营养,不断产生纤维和基质,使得皮肤的厚度逐渐增加,真皮渐渐成熟。随着皮脂腺和汗腺的发生、发育、成熟,其开始对皮肤的发育及胎儿的生长发挥重要作用^[9-10]。羊膜动物的胎儿生活在羊水这一特殊环境中,皮肤是分隔胎儿与羊水的一道重要屏障。真皮中的纤维逐渐增殖,胶原纤维的韧性和弹性纤维的弹性以及表皮角化的出现、角质层的增厚,使得皮肤的屏障功能日益完善^[11]。皮脂腺形成后,其分泌物与角化的上皮表面形成一层胎脂膜,对胎儿有一定的保护作用^[12]。汗腺及皮下组织的发生和发育,也为山羊胎儿适应以后的生活奠定了基础。

[参考文献]

[1] Parry A L, Norton B W, Kestall B J. Skin foliiele development

in the Australian goat [J]. Agri Res,1992,43(4):857-870.

[2] Moore G P M,Jackson N,Isaacs K. Pattern and morphogenesis in skin [J]. Theor Biol,1998,191:87-94.

[3] 栾维民,王 莘,李永军,等. 辽宁绒山羊皮肤显微结构的研究 [J]. 吉林农业大学学报,1996,18(3):74-78.

Luan W M,Wang S,Li Y J,et al. Study on the skin microstructure of Liaoning cashmere goat [J]. Journal of Jilin Agricultural University,1996,18(3):74-78. (in Chinese)

[4] 李长青,尹 俊,张燕军,等. 内蒙古绒山羊与辽宁绒山羊皮肤毛囊周期性变化的比较研究 [J]. 畜牧兽医学报,2005,36(7):674-679.

Li C Q,Yin J,Zhang Y J,et al. Comparative study on skin and hair follicles cycling between Inner Monggolia and Liaoning cashmere goats [J]. Acta Veterinaria Et Zootechnica Sinica, 2005,36(7):674-679. (in Chinese)

[5] 曹贵方. 山羊体形和卵巢发生及卵泡组织化学的研究 [D]. 陕西杨凌:西北农业大学,1998.

Cao G F. Study on body configuration and ovary development of goats and histochemistry of ovarian follicle [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest Agricultural University, 1998. (in Chinese)

[6] 洪琼花,兰 蓉,邵庆勇,等. 云南半细毛羊不同发育阶段皮肤毛囊性状的发育规律研究 [J]. 中国畜牧杂志,2001,37(2):19-21.

Hong Q H,Lan R,Shao Q Y,et al. A study on the development of skin follicle traits in Yunnan Semi-fine wool sheep of different age [J]. Chinese Journal of Animal Science,2001,37(2):19-21. (in Chinese)

[7] 张燕军,尹 俊,李长青,等. 内蒙古阿尔巴斯绒山羊胎儿期皮肤毛囊发生发育规律研究 [J]. 畜牧兽医学报,2006,37(8):761-768.

Zhang Y J,Yin J,Li C Q,et al. Study on development of skin and hairfollicle from fetal Inner Mongolian Arbas cashmere goats [J]. Acta Veterinaria Et Zootechnica Sinica,2006,37(8):761-768. (in Chinese)

[8] Toma J G, Akhavan M,Fernandes K J L,et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin [J]. Nat Cell Biol, 2001,3:778-784.

[9] Cotsarelis G,Kaur P,Dhouailly D,et al. Epithelial stem cells in the skin: definition,makers,localization and functions [J]. Exp Dermatol,1999,8:80-88.

[10] Nessmann C,Edwin A D. Le development de La fetus humans [J]. J Gyn Obst Biol Repr,1972,1:527.

[11] Steen K S. Development of skin in weiss & greep: Histology [M]. Fifth edition. New York:Mc Graw Hill Inc,1983:583-589.

[12] 汪 琳,罗善云,孟运莲,等. 胎儿真皮发育组织学及组织化学动态研究 [J]. 湖北医科大学学报,1999,20(3):184-186.

Wang L,Luo S Y,Meng Y L,et al. The histology and histochemistry change in the fetal dermis [J]. Acta Academiae Medicinae Hubei,1999,20(3):184-186. (in Chinese)

(上接第 42 页)

[8] Ruano J M,Glidle A,Cleary A,et al. Design and fabrication of a silica on silicon integrated optical biochip as a fluorescence microarrayplatform [J]. Biosens Bioelectron, 2003, 18: 175-184.

[9] Barsky V,Perov A,Tokalov S,et al. Fluorescence data analysis on gel-based biochips [J]. J Biomol Screen,2002,7:247-257.

[10] Chan K,Baker S,Kim C C. Genomic comparison of *Salmonella enterica serovars* and *Salmonella bongori* by use of an *Senterica serovar typhimurium* DNA microarray [J]. J Bacteriol, 2003,185:553-563.

[11] 袁 菊,郭 江,成 军,等. HCV p7 蛋白反式调节基因 p7TP2 的克隆化及生物信息学分析 [J]. 世界华人消化杂志, 2006,14(6):581-587.

Yuan J,Guo J,Cheng J,et al. Cloning and bioinformatics analysis of p7TP2 protein [J]. World Chin J Digestol, 2006, 14(6):581-587. (in Chinese)

[12] Liora Z S,Richard S L,Patrick O O,et al. A genome-wide screen for normally methylated human CpG islands that can identify novel imprinted genes [J]. Genome Research,2002,12(4):543-554.

[13] Kam-Wing J,Kurtis E B,Hiromu S,et al. De novo CpG island methylation in human cancer cells [J]. Cancer Research, 2006,66(2):682-692.