



## 论 文

## 食鱼蝙蝠 Merkel 细胞的分布及超微结构

殷江霞<sup>①②</sup>, 王红梅<sup>①</sup>, Paul Racey<sup>③</sup>, 张树义<sup>④\*</sup>

① 中国科学院动物研究所, 北京 100101;

② 中国科学院研究生院, 北京 100049;

③ School of Biological Sciences, University of Aberdeen, UK, AB24 2TZ;

④ 华东师范大学生命科学学院, 上海 200062

\* 联系人, E-mail: syzhang@bio.ecnu.edu.cn

收稿日期: 2008-07-06; 接受日期: 2009-06-03

教育部 985 工程资助项目

**摘要** 本文通过免疫组织化学与透射电子显微镜技术对食鱼蝙蝠 Merkel 细胞的分布及超微结构进行了详尽的研究. 研究表明, Merkel 细胞广泛存在于食鱼蝙蝠背部、腹部、股间膜、脚掌、翼膜皮肤的凸起、毛囊及表皮的基层. 脚掌 Merkel 细胞的密度显著多于其他部位. 这些结果意味着 Merkel 细胞可能与触觉有关: 凸起物毛发对空气流动敏感, 它可能通过感知身体周围空气的流动来调节飞行过程中的姿势. 超微结构表明, 与其他脊椎动物相比, 食鱼蝙蝠的 Merkel 细胞含有较多的中间纤维及较大的内含物颗粒.

**关键词**

Merkel 细胞

分布

超微结构

食鱼蝙蝠

*(Myotis ricketti)*

1875 年, Merkel<sup>[1]</sup>首先发现了 Merkel 细胞, 并以自己的名字为其命名. Merkel 细胞在脊椎动物无毛皮肤与有毛皮肤中广泛存在, 且与神经纤维紧密相连. 它是大多数脊椎动物表皮、毛囊和黏膜层的神经内分泌细胞<sup>[2,3]</sup>. 关于 Merkel 细胞的功能目前尚存在争议. 被广泛接受的一种观点是 Merkel 细胞是机械性刺激感受器(mechanoreceptors)<sup>[4-6]</sup>. 这是因为在 Merkel 细胞表面伸出许多微绒毛, 并且在细胞质中聚集许多面向神经末梢的具有致密核心的颗粒. 可以通过免疫组织化学方法来识别 Merkel 细胞, 而角蛋白 20(CK20)则被广泛认为可作为哺乳动物 Merkel 细胞的一种特异性标志蛋白<sup>[7,8]</sup>.

Zook<sup>[9]</sup>研究表明, 蝙蝠翼膜上存在一种触觉感受器, 可以帮助蝙蝠维持正常飞行状态以捕捉空中的昆虫. 这些触觉感受器在蝙蝠体表形成许多小的凸起. 随后, Zook 在每个凸起中发现了一种类似

Merkel 细胞的细胞. 进一步研究表明, 在蝙蝠中的这种细胞对流经蝙蝠双翼的空气非常敏感. Zook 推测, 当蝙蝠在其翼的位置不正确或者转向不对的情况下, Merkel 细胞会将这种错误信息传递给蝙蝠, 以防止蝙蝠滞留在半空中<sup>[9]</sup>.

食鱼蝙蝠(*Myotis ricketti*)广泛分布于南亚一些地区<sup>[10,11]</sup>. 2003 年, 在中国北京山区发现了该物种的存在<sup>[12]</sup>, 而且种群数量较大<sup>[13]</sup>. 为了验证 Zook 的假说, 本研究观察了 Merkel 细胞在食鱼蝙蝠皮肤的分布情况, 并对食鱼蝙蝠不同部位皮肤中 Merkel 细胞的分布及数量进行了比较.

## 1 材料与方法

### 1.1 蝙蝠材料的收集

所有与动物有关的操作步骤均根据相关动物保护和条例来实施. 5 个成熟的大足鼠耳蝠个体均

采集于北京房山区四合村的蝙蝠洞中(115°59'N, 39°43'E).

## 1.2 皮肤组织切片与免疫组织化学

利用去毛剂(诗碧, 北京)去掉蝙蝠体表毛发, 乙醚麻醉并处死蝙蝠. 取蝙蝠脚掌、翼膜、背部、腹部与股间膜皮肤. 所有皮肤组织经 4℃, 4% 多聚甲醛(0.06 mol/L, PBS)固定, 常规石蜡包埋, 切片厚度 5 μm. 免疫组织化学操作步骤按照 SP 试剂盒(中杉金桥公司, 北京)操作. 石蜡切片经脱蜡后于 4%多聚甲醛重固定 30 min, 然后将切片浸入 PBS 中. 随后将切片放入盛有枸橼酸的抗原修复盒中, 于微波炉加热至 92~98℃, 15 min. 抗原修复后将其冷却至室温, 将切片取出放入 3%双氧水中 15 min 以去除过氧化物酶. 滴加 10%浓度兔血清, 15 min. 将多余血清倒掉, 加入抗体(利用 1×PBS 稀释, 浓度 1:500), 4℃ 过夜, 孵育时间不少于 16 h. PBS 冲洗, 20 min 3 次. 滴加生物素标记兔抗山羊 IgG 二抗工作液, 15 min. PBS 冲洗, 20 min, 3 次. 加入辣根酶标记链霉卵白素工作液(S-A/HRP), 15 min. PBS 冲洗, 20 min, 3 次. DAB 显色, 且显色环境避光. 自来水冲洗. 利用自配苏木素染液复染 50 s. 光学显微镜观察显色情况, 待阳性区域显色完全后, 迅速放入装有去离子水的染缸终止反应. 光学显微镜(AXIO-OEVT-35M, 德国)观察, 奥林巴斯荧光显微镜(BX51TF, 日本 OLYMPUS 公司)拍照.

## 1.3 Merkel 细胞的数量比较

每张切片中均选取 10 个视野. 利用 SPOT 软件在每个视野中沿着基膜测量出 500 μm 的长度. 数出每个视野 500 μm 长度基膜 Merkel 细胞的数量. 利用单因素方差分析来比较各个部位 Merkel 细胞的数量差异. 为满足数据的方差齐次性要求, 分析前将数据进行对数转换. 所有统计分析均使用 SPSS 13.0 进行.

## 1.4 透射电子显微镜研究

将各个部位皮肤材料于 5%戊二醛固定 2 h, 0.1 mol 磷酸缓冲液(pH 7.4)冲洗 3 次, 锇酸中重固定 1 h, 系列酒精脱水, 丙酮置换, 环氧树脂 812 聚合包埋,

LKB-Nova 型超薄切片机(LKB 公司, 瑞士)切片, 醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染, FEI Tecnai 20(FEI 公司, 荷兰)透射电子显微镜观察并照相.

## 2 结果

### 2.1 Merkel 细胞的分布

在食鱼蝙蝠中, CK20 同样是 Merkel 细胞的特异性标志蛋白. CK20 的表达主要位于: 毛囊、表皮的基底层与皮肤凸起中.

Merkel 细胞在 5 个个体的分布趋势相同. 在翼膜凸起(图 1(D))、毛囊(图 1(B))与表皮基底层(图 1(A~C), (E))有 Merkel 细胞的存在. 在背部(图 1(A))与腹部(图 1(B)), Merkel 细胞主要位于表皮的基底层和毛囊(图 1(B), (C), (E)). 在翼膜, Merkel 细胞主要位于其皮肤凸起中(图 1(D)), 只有少量的 Merkel 细胞位于表皮的

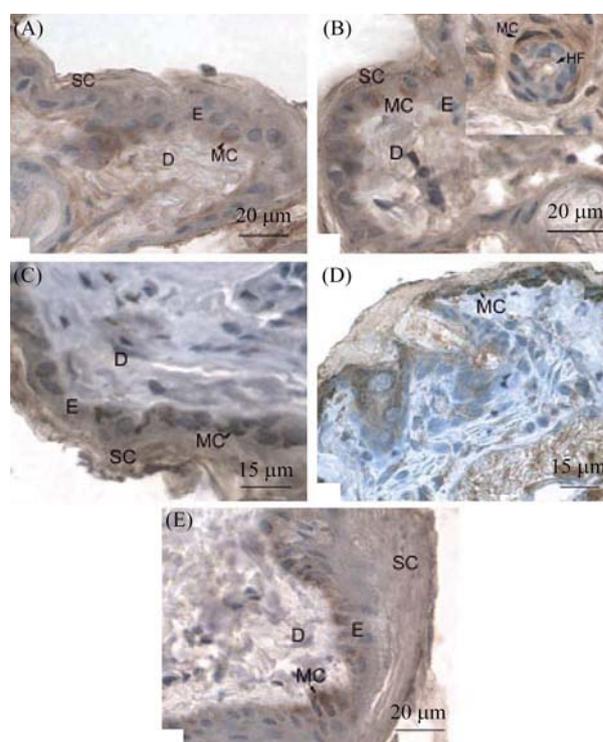


图 1 皮肤 Merkel 细胞的光学显微图片

蝙蝠表皮 Merkel 细胞 CK20 的免疫组织化学染色. (A) 背部的 Merkel 细胞. 细胞质着色为棕黄色. Merkel 细胞主要位于皮肤的表皮; (B) 腹部与毛囊的 Merkel 细胞; (C) 股间膜的 Merkel 细胞; (D) 翼膜的 Merkel 细胞; (E) 脚掌的 Merkel 细胞. MC: Merkel cell; SC: 角质层; SG: 皮脂腺; E: 表皮; D: 真皮

基底层与股间膜(图 1(C)). 由各个皮肤部位的 Merkel 细胞数量比较发现, 脚掌皮肤的 Merkel 细胞数量显著多于其他部位皮肤的 Merkel 数量(图 2).

### 2.2 Merkel 细胞的超微结构

食鱼蝙蝠 Merkel 细胞具有以下特点: 具有致密核心、有膜围绕且直径为 150~350 nm 的颗粒(图 3(A), (D)); 许多中间纤维聚集围绕在细胞核周围(图 3(B), (C)); 细胞核含有许多核仁(图 3(B)).

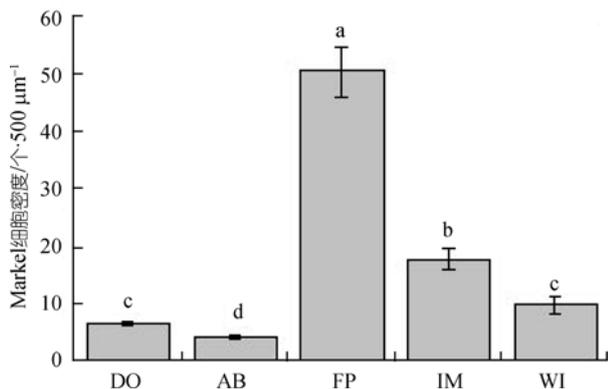


图 2 蝙蝠身体各部位 Merkel 细胞的密度

DO: 背部; AB: 腹部; FP: 脚掌; IM: 股间膜; WI: 翼.  $P < 0.05$ . 个/500 μm, Mean±SE

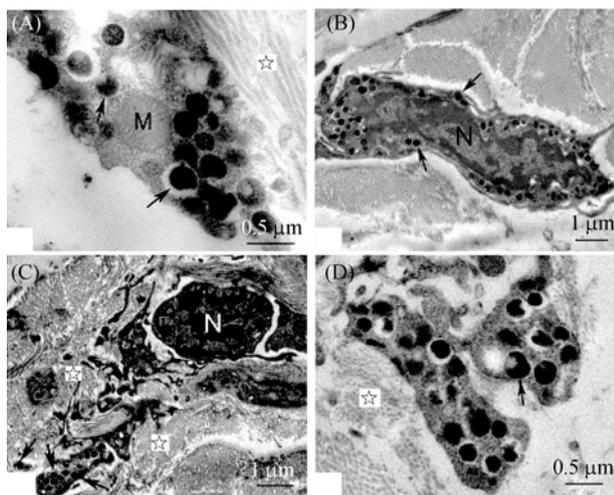


图 3 Merkel 细胞的超微结构

(A) 在细胞质中可以看到致密电子颗粒(☆)和线粒体(M); (B) 退化的 Merkel 细胞. N: 细胞核; (C) Merkel 细胞中含有大量的中间纤维(☆); (D) Merkel 细胞的致密电子颗粒. →= 致密电子颗粒; →= 中间纤维; M: 线粒体

## 3 讨论

### 3.1 Merkel 细胞的分布

根据其功能可将 Merkel 细胞分为几个亚型: 内分泌功能型、机械性刺激功能型与化学敏感功能型<sup>[14]</sup>. 人们所熟知的 Merkel 细胞-神经结构的功能为慢型机械性刺激感觉器<sup>[4,5,15]</sup>. 本研究发现, 大足鼠耳蝠的脚掌皮肤聚集了大量的 Merkel 细胞, 推测 Merkel 细胞可能与触觉有关. 食鱼蝙蝠具有特殊的食性, 较多的 Merkel 细胞将会使脚掌敏感性更强, 可以帮助蝙蝠更加准确的捕捉食物. 本研究结果支持 Merkel 细胞的机械性刺激感觉器功能<sup>[5,15]</sup>. 同时发现, 在蝙蝠体表每个凸起中均有一根毛发自中心伸出. Merkel 细胞与神经末梢一起组成的结构被认为是哺乳动物四大触觉感受器之一<sup>[5,16]</sup>. Merkel 细胞的触觉功能、在翼膜皮肤凸起中含有 Merkel 细胞、皮肤凸起的结构及本研究结果, 均支持 Zook 提出的假说, 即: 翼膜凸起中含有对流动空气敏感的毛发, 其可以在蝙蝠飞行过程中提供其空气流动的反馈信息, 从而使蝙蝠采取行为上的调整<sup>[9,17]</sup>.

以往关于 Merkel 细胞在动物皮肤中分布状况的研究表明, Merkel 细胞一般沿着真皮表皮连接处分布<sup>[18-23]</sup>. 本研究发现, 大足鼠耳蝠的 Merkel 细胞主要位于表皮的基层、毛囊及翼表面的凸起, 尤其在脚掌有大量分布. Merkel 细胞在翼膜表面凸起中的分布与其在毛囊中的分布是不同的. 在毛囊中, Merkel 细胞主要位于峡部根鞘的最外层, 并且有时会延伸至膨胀区. Merkel 细胞在食鱼蝙蝠皮肤中的分布与其在人类皮肤中的分布有些相似. 在人体中, 大多数 Merkel 细胞不规则地分散排列在表皮的基层, 尤其在指尖数量较多<sup>[24]</sup>. 将 Merkel 细胞在蝙蝠与人类皮肤中分布的相似性归因于两个方面: 一是蝙蝠与人体一样, 五指非常敏感, 且经常使用五指握抓物体<sup>[13]</sup>; 二是蝙蝠和人类具有相对较近的亲缘关系<sup>[25]</sup>.

### 3.2 角蛋白的表达

CK20 是人类肠道与尿道上皮细胞中主要的一类细胞骨架多肽<sup>[26]</sup>, 并且已经被特异的检测为上皮 Merkel 细胞的主要组成成分<sup>[27]</sup>. CK20 在蝙蝠中的表达与人体相似, 但不同于鼠. 在人体中, CK20 的表达

主要位于表皮<sup>[24]</sup>。在鼠中, CK20 的表达不只位于表皮, 也位于胰腺管道细胞中<sup>[28]</sup>。本研究证实, CK20 是食鱼蝙蝠 Merkel 细胞非常好的一种标记蛋白。

### 3.3 Merkel 细胞的超微结构

食鱼蝙蝠 Merkel 细胞的超微结构与其他脊椎动物有许多共同点: 含有致密核心且具有膜围绕的颗粒; 中间纤维聚集在细胞核周围<sup>[29~31]</sup>。食鱼蝙蝠的 Merkel 细胞也有其独特性: (1) 食鱼蝙蝠的 Merkel 细胞较其他脊椎动物含有较多的中间纤维; (2) 食鱼蝙蝠 Merkel 细胞中的颗粒比其他脊椎动物的大, 直径范围在 150~300 nm, 而其他脊椎动物 Merkel 细胞的颗粒直径一般为 80~120 nm<sup>[27]</sup>。

一些学者曾经对不同动物中 Merkel 细胞的超微结构进行过相关研究<sup>[5,31]</sup>。关于中间纤维的聚集原因, Kuhajda 等人<sup>[32]</sup>和 Kagoura 等人<sup>[33]</sup>认为 Merkel 细胞中间纤维的聚集可能是因其发生了癌变所致。本研究中, 食鱼蝙蝠的中间纤维聚集原因可能在于取材

部位发生了突变。但是, 在所有取材部位的 Merkel 细胞均有大量的中间纤维聚集, 这并不是一种巧合。大量的中间纤维聚集可能是食鱼蝙蝠 Merkel 细胞的特点。总之, 发现如此多的中间纤维是一种非常有趣的现象。该现象可能与 Merkel 细胞一种新的功能有关, 这需要进一步的研究。由于食鱼蝙蝠具有非常独特的食性, 本研究结果可能并不能完全代表所有的蝙蝠物种。Merkel 细胞在不同种类的蝙蝠体内的分布及数量情况尚需进一步研究。

本研究表明, 食鱼蝙蝠脚掌的 Merkel 细胞多于身体的其他部位; 翼膜凸起带具有 Merkel 细胞与毛发, 可能会在蝙蝠飞行过程中给蝙蝠提供空气的流动信息; 食鱼 Merkel 细胞的超微结构的独特性在于其较其他脊椎动物而言含有较多的中间纤维与较大的致密核心颗粒。但仍有一些问题未得到解决, 比如食鱼蝙蝠 Merkel 细胞确切的功能等, 这应成为进一步研究所关注的重点。

**致谢** 感谢海德堡大学 Ingrid Moll 教授对本文提出的建设性意见, 中国科学院动物研究所段恩奎研究员、张俊鹏、张劲硕、朱光剑、李聚学和姚倩等的帮助。

### 参考文献

- 1 Merkel F. Tastzellen und Tastkoerperchen bei den Haustieren und beim Menschen. Arch Mikrosk Anat, 1875, 11: 636—652
- 2 Gu J, Polak J M, Tapia F J, et al. Neuron-specific enolase in the Merkel cells of mammalian skin. The use of specific antibody as a simple and reliable histologic marker. Am J Pathol, 1981, 104: 63—68
- 3 Gauweiler B, Weihe E, Hartschuh W, et al. Presence and coexistence of chromogranin A and multiple neuropeptides in Merkel cells of mammalian oral mucosa. Neurosci Lett, 1988, 89: 121—126
- 4 Ogawa H. The Merkel cell as a possible mechanoreceptor cell. Prog Neurobiol, 1996, 49: 317—334
- 5 Iggo A, Muir A R. The structure and function of a slowly adapting touch corpuscle in hairy skin. J Physiol, 1969, 200: 763—796
- 6 Halata Z, Grim M, Bauman K I. Friedrich Sigmund Merkel and his 'Merkel cell', morphology, development, and physiology: review and new results. Anat Rec, 2003, 271: 225—239
- 7 Moll I, Kuhn C, Moll R. Cytokeratin 20 is a general marker of cutaneous Merkel cells while certain neuronal proteins are absent. J Invest Dermatol, 1995, 104: 910—916
- 8 Moll I, Moll R, Franke W W. Identification of Merkel cells in human skin by specific cytokeratin antibodies: changes of cell density and distribution in fetal and adult plantar epidermis. Differentiation, 1984, 28: 136—154
- 9 Zook J M. The neuroethology of touch in bats: cutaneous receptors of the bat wing. Neurosci Abstr, 2005, 78: 21
- 10 盛和林, 大森司, 纪之, 等. 中国野生哺乳动物. 北京: 中国林业出版社, 1999. 30
- 11 张荣祖. 中国哺乳动物分布. 北京: 中国林业出版社, 1997. 42
- 12 马杰, Jones G, 梁冰, 等. 食鱼蝙蝠——大足鼠耳蝠初报. 动物学杂志, 2003, 38: 93—96
- 13 马杰, 张树义, 沈钧贤. 我国发现食鱼蝙蝠——大足鼠耳蝠. 野生动物, 2003, 6: 35

- 14 Lucarz A, Brand G. Current considerations about Merkel cells. *Eur J Cell Biol*, 2007; 243—251
- 15 Iggo A, Findlater G S. A Review of Merkel Cell Mechanisms. In: Hamann W, Iggo A, eds. *Sensory Receptor Mechanisms*. Singapore: World Scientific Publications, 1984. 117—131
- 16 Johnson K O. The roles and functions of cutaneous mechanoreceptors. *Curr Opin Neurobiol*, 2001, 11: 455—461
- 17 Zook J M. Somatosensory Adaptations of Flying Mammals. In: Kaas J H, ed. *Evolution of Nervous Systems*. Oxford: Academic Press, 2006. 215—226
- 18 Narisawa Y, Hashimoto K, Nakamura Y, et al. A high concentration of Merkel cells in the bulge prior to the attachment of the arrector pili muscle and the formation of the perifollicular nerve plexus in human fetal skin. *Arch Dermatol Res*, 1993, 285: 261—268
- 19 Narisawa Y, Hashimoto K, Bayless T J, et al. Cytokeratin polypeptide profile of merkel cells in human fetal and adult skin-difference of expression of cytokeratins in epidermal and dermal merkel cells. *J Invest Dermatol*, 1992, 98: 171—180
- 20 Moll I, Roessler M, Brandner J M, et al. Human Merkel cells-aspects of cell biology, distribution and functions. *Eur J Cell Biol*, 2005, 84: 259—271
- 21 Moll I. Merkel cell distribution in human hair-follicles of the fetal and adult scalp. *Cell Tissue Res*, 1994, 277: 131—138
- 22 Fradette J, Godbout M J, Michel M, et al. Localization of Merkel cells at hairless and hairy human skin sites using keratin 18. *Biochem Cell Biol*, 1995, 73: 635—639
- 23 Nakafusa J, Narisawa Y, Shinogi K, et al. Changes in the number of Merkel cells with the hair cycle in hair discs on rat dorsum skin. *Brit J Dermatol*, 2006, 155: 883—889
- 24 Lacour J P, Dubois D, Pisani A, et al. Anatomical mapping of Merkel cells in normal human adult epidermis. *Brit J Dermatol*, 1991, 125: 535—542
- 25 Murphy W J, Pevzner P A, O'Brien S J, et al. Mammalian phylogenomics comes of age. *Trends Genet*, 2004, 12: 631—639
- 26 Moll R, Schiller D L, Franke W W. Identification of protein IT of the intestinal cytoskeleton as a novel type I cytokeratin with unusual properties and expression patterns. *J Cell Biol*, 1990, 111: 567—580
- 27 Moll I, Moll R. Early development of human Merkel cell. *Exp Dermatol*, 1992, 1: 180—184
- 28 Bouwens L, Braet F, Heimberg H. Identification of rat pancreatic duct cells by their expression of cytokeratins 7, 19 and 20 *in vivo* and after isolation and culture. *J Histochem Cytochem*, 1995, 43: 245—253
- 29 Winkelmann R K, Breathnach A S. The Merkel cell. *J Invest Dermatol*, 1973: 2—15
- 30 Holbrook K A, Smith L. Morphology of Connective Tissue: Structure of the Skin and Tendon. In: Royce P M, Steinmann B, eds. *Connective Tissue and Heritable Disorders*. New York: Wiley-Liss, 1993. 51—71
- 31 Watanabe I S. Ultrastructures of mechanoreceptors in the oral mucosa. *Anat Sci Int*, 2004, 79: 55—61
- 32 Kuhajda F P, Olson J L, Mann R B. Merkel cell(small cell) carcinoma of the skin: immunohistochemical and ultrastructural demonstration of distinctive perinuclear cytokeratin aggregates and a possible association with B cell neoplasms. *J Histochem*, 1986, 18: 239—244
- 33 Kagoura M, Sakita S, Toyomoto T, et al. An electron microscopic and immunohistochemical study of Merkel cell carcinoma. *Med Electron Microsc*, 1997, 30: 209—215