法医病理学 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003668

人脑血管周围色素的性质探究及其与年龄和性别及脑区的相关性

朱颖琳，陈泽宇，陈懿璇，肖旭东，吕俊耀，于晓军
（汕头大学医学院法医教研室，汕头 515041）

【摘 要】**目的**：鉴别不同个体的脑血管周围色素（cerebral vascular pigment，CVP）的性质，并探索其与年龄、性别、脑区的相关性。**方法**：选取146例法医尸检案例的脑组织，采用苏木精-伊红染色法（hematoxylin-eosin stain，HE）、普鲁士蓝染色法、改良Fouchet胆色素染色法、苯酚酒精（alkylphenol ethoxylate，APE）去除福尔马林颗粒染色法、高锰酸钾/草酸（potassium permanganate/oxalic acid，PPO）去除黑色素染色法、硫酸亚铁染色法、Schmorl染色法以及酪氨酸酶相关蛋白1（tyrosinase related protein 1，TRP-1）免疫组化染色法对CVP进行性质分析。采用SPSS 26.0软件进行统计分析，利用卡方检验分析不同性别、年龄和脑区之间的CVP检出情况。**结果**：CVP在HE染色法、普鲁士蓝染色法、改良Fouchet胆色素染色法、APE去除福尔马林颗粒染色法中均呈棕黄色，在PPO去除黑色素染色法中成功被去除，在硫酸亚铁染色法和Schmorl染色法中呈墨绿色、黑色改变，在TRP-1免疫组化染色法中呈红色阳性结果。不同年龄组之间，CVP检出率差异有统计学意义（$P<0.001$），呈增龄性加重改变；在不同部位脑组织之间，CVP检出率差异有统计学意义（$P<0.001$），顶叶的检出率远高于额叶、颞叶、枕叶；而不同性别之间的CVP检出率差异无统计学意义（$P>0.050$）。**结论**：CVP为黑色素，我们希望通过探讨它潜在的来源和功能，为神经系统的相关科学研究提供参考依据，促进神经科学尤其是神经病理学的发展。

【关键词】特殊染色；组织学染色；脑血管；色素沉着；黑色素；神经病理学；病理学
【中图分类号】R361⁺.2；R89 【文献标志码】A 【收稿日期】2024-02-28

Nature of human cerebral vascular pigment and its association with age，sex，and brain regions

Zhu Yinglin，Chen Zeyu，Chen Yixuan，Xiao Xudong，Lü Junyao，Yu Xiaojun
（*Department of Forensic Medicine，Shantou University Medical College*）

【**Abstract**】***Objective***：To investigate the nature of cerebral vascular pigment（CVP）in different individuals and its association with age，sex，and brain regions. ***Methods***：Brain tissue samples were collected from 146 forensic autopsy cases，and the nature of CVP was analyzed by HE staining，Prussian blue staining，modified Fouchet bile pigment staining，the alkylphenol ethoxylate（APE）method for removing formalin pigment，the potassium permanganate/oxalic acid（PPO）method for removing melanin，ferrous sulfate staining，Schmorl staining，and immunohistochemical staining of tyrosinase-related protein 1（TRP-1）. SPSS 26.0 software was used for statistical analysis，and the chi-square test was used to analyze the detection of CVP across different sexes，ages，and brain regions. ***Results***：CVP appeared to be brown-yellow in HE staining，Prussian blue staining，modified Fouchet bile pigment staining，and APE staining，and it was successfully removed by PPO staining for removing melanin. CVP exhibited greenish-black changes in ferrous sulfate staining and Schmorl staining and showed red-positive results in TRP-1 immunohistochemical staining. There was a significant difference in the detection rate of CVP across different age groups（$P<0.001$），which aggravated with the increase in age；there was a significant difference in the detection rate of CVP between different brain regions（$P<0.001$），and the detection rate of CVP in the parietal lobe was significantly higher than that in the frontal lobe，the temporal lobe，and the occipital lobe；however，there was no significant difference in the detection rate of CVP between different sexes（$P>0.050$）. ***Conclusion***：CVP is melanin pigment，and exploration of its potential sources and functions can provide a basis for nervous system-related disciplines and promote the development of neuroscience，especially neuropathology.

【**Key words**】specific staining；histological staining；cerebral blood vessels；pigmentation；melanin；neuropathology；pathology

作者介绍：朱颖琳，Email：21ylzhu@stu.edu.cn，研究方向：法医病理学。
通信作者：于晓军，Email：xjyu@stu.edu.cn。
优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20241226.1540.004（2024-12-27）

在常规的组织病理学检查中，确定人体组织沉着的色素性质很重要，因为不同的色素有不同的意义。例如，含铁血黄素可为损伤时间和死亡时间提供参考[1]，胆色素可为胆管肾病或胆道胆管炎等疾病诊断提供依据[2-4]，黑色素可帮助诊断黑色素瘤[5]。

鉴定人体组织中的沉积色素通常需要根据其化学结构特征使用特殊的染色方法。例如，为了识别黑色素，可以利用高锰酸钾溶液的强氧化性，破坏黑色素结构中的酸性环并达到去除目的[6-7]；也可以利用黑色素吸收亚铁离子形成黑色素-亚铁络合物，与铁氰化钾结合生成亚铁氰化物，呈现深蓝绿色[8]；还可以利用黑色素将铁离子还原为亚铁离子去与铁氰化钾反应，生成亚铁氰化物并着色[9]。当然，免疫组织化学染色也是一种鉴别手段，酪氨酸酶相关蛋白1（tyrosinase related protein 1，TRP-1）是黑色素生成过程中的重要酶[10]，可作为黑色素特异性抗原进行物质的性质鉴定。

黑色素一般分为5种：真黑素、褐黑素、异黑素、神经黑素和脓黑素[11]。这其中，人类的神经系统就含有神经黑色素。此外，黑色素是人体必需的色素，在光防护、视觉信号传递、温度调节、免疫、抗氧化、机械加固、抗摩擦等方面发挥着重要作用[12-14]。

最近，本研究在脑血管周围发现了一种圆形、棕黄色的色素，经过一系列的实验证实是黑色素。此前有报道称，在乌干达人和鼠类动物的血管周围间隙中存在黑色素[15-17]，但这些发现并未通过染色得到证实。另外，他们描述的黑色素形态是梭形或多极形的，更像跟随血管进入大脑实质中的软脑膜黑素细胞，而不是本研究描述的脑血管周围色素（cerebral vascular pigment，CVP）。

据本研究所知，迄今还没有关于脑血管周围圆形黑色素的报道。本研究记录并经多种染色方法确认了脑血管色素的性质，同时讨论了其特征和潜在功能。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集2020年1月至2023年12月在广东省汕头大学司法鉴定中心进行的146例病理解剖案例死者的脑组织。纳入标准：①已知死者具体性别和年龄的；②本中心独立完成系统尸检及其组织病理学检验的；③较新鲜尸体及其完整脑组织结构。将所取的脑组织按个体年龄分为4组：0至20岁为组Ⅰ，21至40岁为组Ⅱ，41至60岁为组Ⅲ，>61岁以上为组Ⅳ。

1.2 组织取材

对大脑进行外部检查没有异常后，在额叶、颞叶、枕叶、顶叶收集脑组织，每个案例总共收集4块大脑组织样本。同时，取生前确诊肝硬化死者的肝组织作为普鲁士蓝染色的阳性对照，取普通死者的胆囊作为胆色素染色的阳性对照，取进行二次尸检死者的肾组织作为苯酚酒精（alkylphenol ethoxylate，APE）法去除福尔马林颗粒染色的阳性对照，取普通死者的皮肤作为高锰酸钾/草酸（potassium permanganate/oxalic acid，PPO）法去除黑色素染色、硫酸亚铁染色、Schmorl染色的阳性对照，所有样本经福尔马林固定、包埋后连续切成8片，分别用于8个不同的染色组。1组采用苏木精-伊红染色法（hematoxylin-eosin stain，HE），其余5组采用特殊染色方法（详见1.3），另取1组进行免疫组织化学染色。在每组特殊染色和免疫组化染色中加入阳性对照切片，以消除假阴性结果的影响。

1.3 特殊染色

1.3.1 普鲁士蓝染色法[18] 配制2%亚铁氰化钾和2%盐酸水溶液，等量混合后染色。切片脱蜡，用蒸馏水彻底清洗。在混合溶液中放置30 min，然后用蒸馏水清洗。1%伊红水溶液反染15 s后，蒸馏水冲洗，常规脱水、透明、封片。

1.3.2 改良Fouchet法胆色素染色法[19] 制备10%氯化铁和25%三氯乙酸的水溶液，并按1∶10混合。切片脱蜡，用蒸馏水彻底清洗，在新鲜混合溶液中浸泡10 min，然后在蒸馏水中洗涤2 min。用Van Gieson染色液反染，冲洗，常规脱水、透明、封片。

1.3.3 APE法脱福尔马林颗粒染色法[20] 将5 mL苯酚、5 mL盐酸和90 mL无水乙醇混合成APE溶液，切片置于溶液中反应5 min，水洗，随后进行HE染色，常规脱水、透明、封固。

1.3.4 PPO法脱黑色素染色法[21] 切片用5%高锰酸钾处理2 min，水洗2 min，再使用5%草酸脱色2 min，随后进行HE染色，常规脱水、透明、封固。

1.3.5 硫酸亚铁染色法 切片置于2.5%硫酸亚铁溶液中反应1 h，用蒸馏水冲洗15 min，再置于1%铁氰化钾乙酸溶液中反应30 min，在1%乙酸溶液中分化数秒。1%伊红水溶液反染15 s，常规脱水，透明、封固。

1.3.6 Schmorl染色法[8] 将配置好的1%三氯化铁、1%铁氰化钾和蒸馏水按30∶4∶6的比例混合。切片放入混合物中反应15 min，冲洗后用1%伊红水溶液反染15 s，常规脱水、透明、封固。

1.4 免疫组织化学染色

切片放在乙二胺四乙酸溶液中高压3 min，然后用磷酸盐缓冲溶液（phosphate buffer solution，PBS）洗涤，在0.3%过氧化氢中孵育30 min。添加山羊血清封闭液，在30 ℃中保温30 min，甩掉血清封闭液后滴加一抗，在4 ℃冰箱中孵育过夜，PBS洗涤，滴加二抗在37 ℃保温箱中孵育30 min。

PBS 冲洗，随后使用 3-氨基-9-乙基咔唑显色液复染。光学显微镜下观察染色，及时终止。切片用苏木精反染，甘油密封。以上抗体均购自 Abcam 公司，全程按照说明书进行。

1.5 组织学观察

由于 CVP 呈簇状排列且相互重叠，定量分析可能不完全准确，因此目前暂时采用半定量方法。光镜下观察染色切片，在脑组织中任一视野中看到 CVP，则记录该样本的 CVP 检出率为（+），否则记录为（-）。

1.6 统计学方法

使用 SPSS 26.0 软件进行统计分析，计数资料用频数（%）表示，利用卡方检验评估 CVP 检出率与性别、年龄和大脑区域之间的关系。检验水准 α=0.05，以 P<0.05 为差异具有统计学意义。

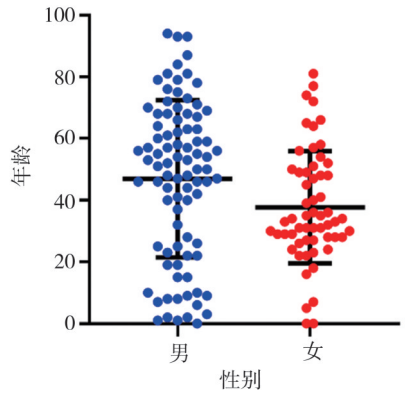
2 结 果

2.1 基本信息

本研究共纳入 146 个案例，年龄 0～94 岁，平均年龄 43.26 岁，中位年龄 46 岁。男性 88 例（60.3%），女性 58 例（39.7%）。男性组年龄 0～94 岁，平均年龄（46.9 ± 2.7）岁；女性组年龄 0～81 岁，平均年龄（37.7 ± 2.3）岁。根本死因以外伤（37.1%）较为多见，其次为呼吸系统疾病（21.9%）。相关基线资料见表 1、图 1。

表 1 146 例尸检样本的基线资料（n，%）

基本情况	分组	样本量
年龄（岁）	~20	24（16.4）
	~40	42（28.8）
	~60	45（30.8）
	>60	35（24.0）
性别	男	88（60.3）
	女	58（39.7）
根本死因	机械性损伤	54（37.1）
	中枢神经系统疾病	9（6.2）
	心血管系统疾病	24（16.4）
	呼吸系统疾病	32（21.9）
	恶性肿瘤	12（15.1）
	其他（过敏性休克、中毒、其他系统疾病等）	15（10.3）



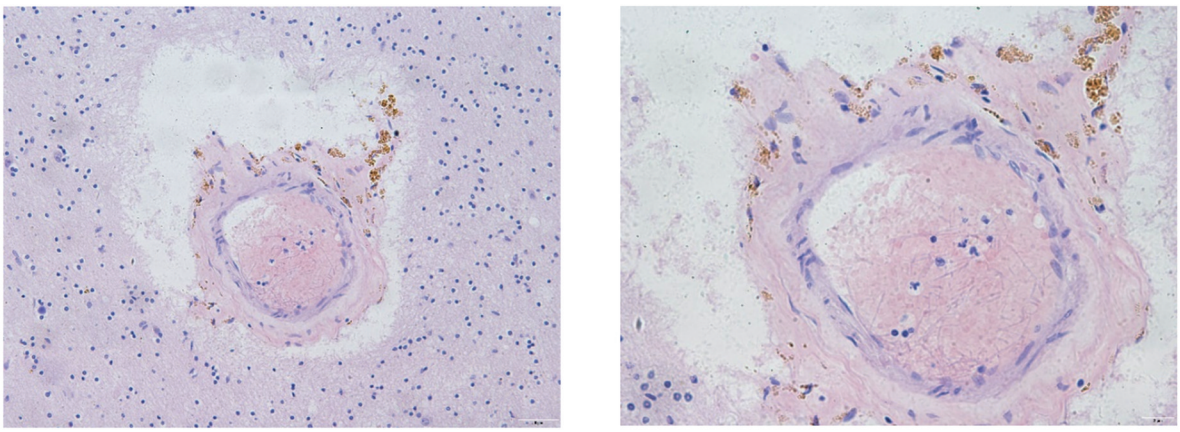
注：蓝色圆形代表男性个体，红色圆形代表女性个体

图 1 样本的一般信息

2.2 染色结果

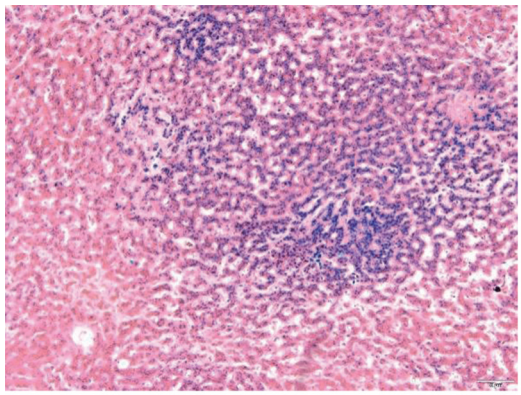
HE 染色中，CVP 呈黄褐色类圆形，无明显细胞结构（图 2）。在普鲁士蓝染色中，肝硬化死者的肝细胞内见蓝染的含铁血黄素颗粒，呈阳性结果（图 3A），而同一反应中的 CVP 未染成蓝色，呈阴性结果（图 3B）。在改良 Fouchet 法胆色素染色中，胆管壁灰绿色浸染，呈阳性结果（图 4A），而同一反应中的 CVP 未染成绿色，呈阴性结果（图 4B）。使用 APE 法去除福尔马林颗粒染色前，在 HE 染色中见重复尸检案例的肾小管上皮大量棕色颗粒沉着（图 5A），使用 APE 法后，同一位置未见色素沉着（图 5B），呈阳性结果；而相同处理后的 CVP 仍然存在，未被清除，呈阴性结果（图 5C）。

使用 PPO 法去除黑色素染色前，经过 HE 染色显示皮肤基底层黑色素为黑褐色（图 6A），经过 PPO 法处理后，相同位置未见黑色素颗粒沉着（图 6B），呈阳性结果；相同处理后未检见 CVP，成功被去除（图 6C），也呈阳性结果。在硫酸亚铁



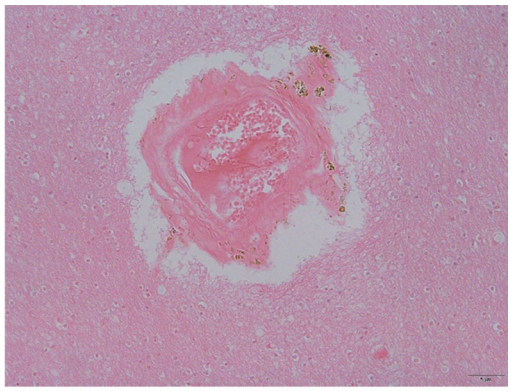
A. CVP呈类圆形、黄褐色（100×） B. 图2A局部放大（400×）

图 2 脑组织 HE 染色



注：阳性结果，肝硬化死者的肝细胞中见蓝染的含铁血黄素

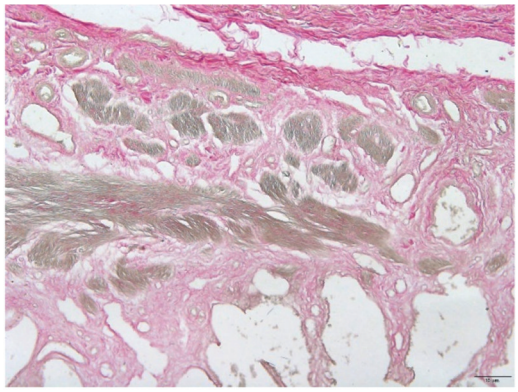
A. 肝脏（100×）



注：阴性结果，CVP呈黄褐色而未蓝染

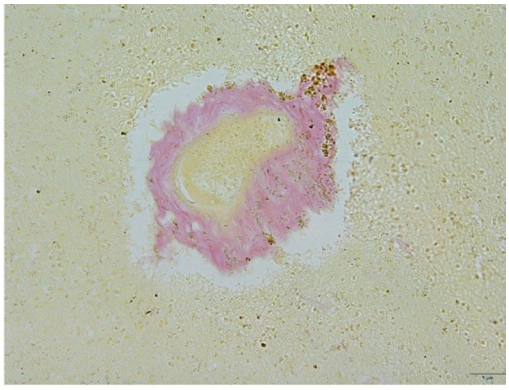
B. 脑组织（200×）

图3 普鲁士蓝染色



注：阳性结果，胆囊的胆管壁呈绿色

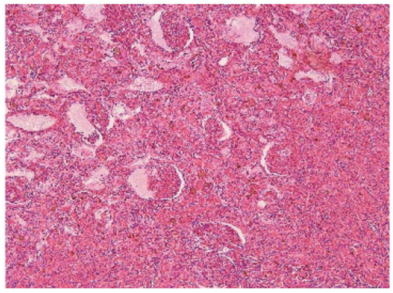
A. 胆囊（100×）



注：阳性结果，CVP呈黑色

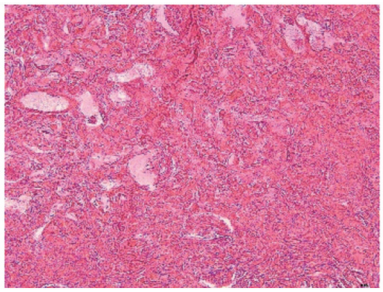
B. 脑组织（200×）

图4 改良 Fouchet 法胆色素染色



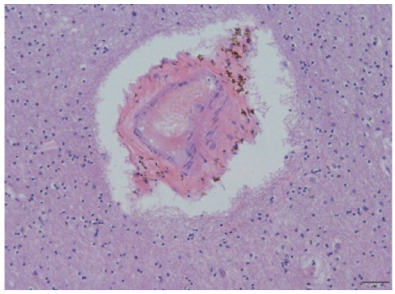
注：反复尸检案例的肾小管上皮见大量棕褐色颗粒沉着

A.肾脏HE染色（100×）



注：阳性结果，图5A相同位置的肾小管上皮未见棕褐色颗粒

B. 肾脏APE法去除福尔马林颗粒染色（100×）



注：阴性结果，脑血管色素颗粒仍存在，未被去除

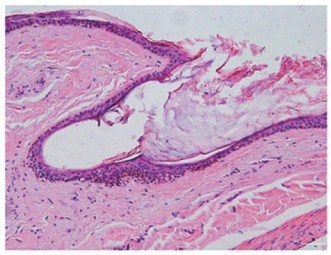
C. 脑组织 APE法去除福尔马林颗粒染色（200×）

图5 APE 法去除福尔马林颗粒染色

染色中，皮肤基底层黑色素呈深墨绿色改变（图7A），同一染色反应中的CVP也被染成墨绿色（图7B、C、D），两者均呈阳性结果。同样，在针对黑色素的Schmorl染色中，皮肤基底层黑色素（图8A）和CVP（图8B）都被染成黑色，均呈阳性结果。在TRP-1免疫组织化学染色中，皮肤基底层黑色素细胞（图9A）和CVP（图9B）都呈红色阳性反应。

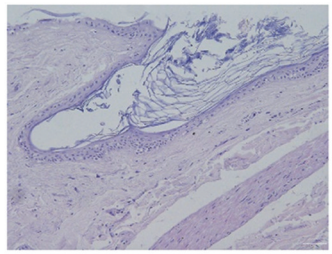
2.3 统计学结果

不同性别之间的CVP检出率差异无统计学意义（$P>0.050$）。不同年龄组之间的CVP检出率差异具有统计学意义（$P<0.001$），检出率随年龄段增高而增加。不同脑区之间的CVP检出率差异具有统计学意义（$P<0.001$），顶叶的检出率远高于额叶、颞叶、枕叶等部位。详见表2和图10。



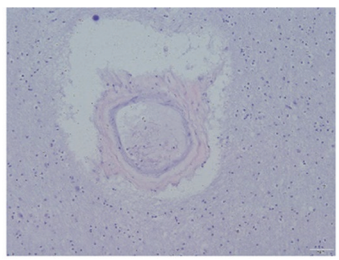
注：皮肤基底层黑色素呈棕黑色

A. 皮肤HE染色（200×）



注：阳性结果，图6A相同位置的皮肤基底层未见黑色素

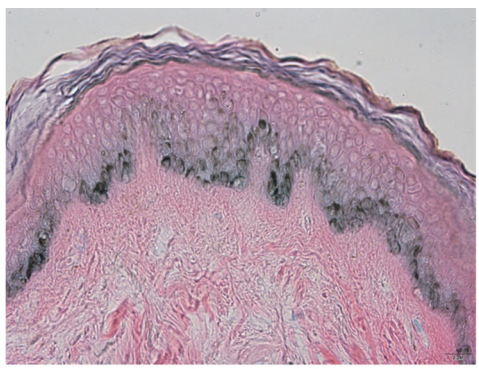
B. 皮肤PPO法去除黑色素染色（200×）



注：阳性结果，脑血管周围未见色素颗粒

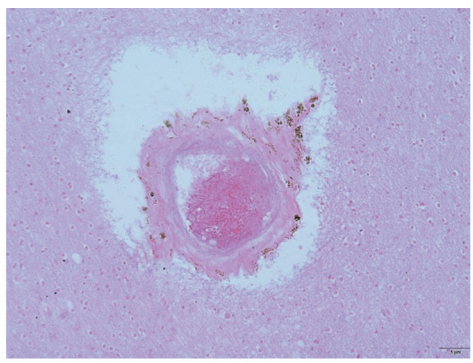
C. 脑组织PPO法去除黑色素染色（200×）

图6　PPO法去除黑色素染色



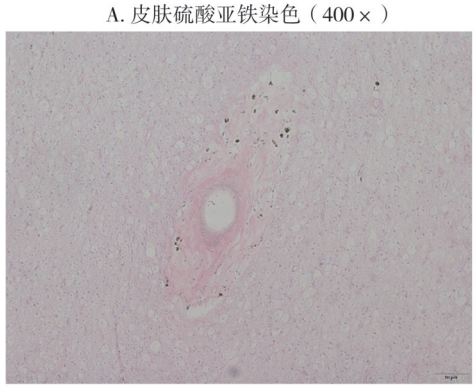
注：阳性结果，皮肤基底层黑色素呈深墨绿色

A. 皮肤硫酸亚铁染色（400×）



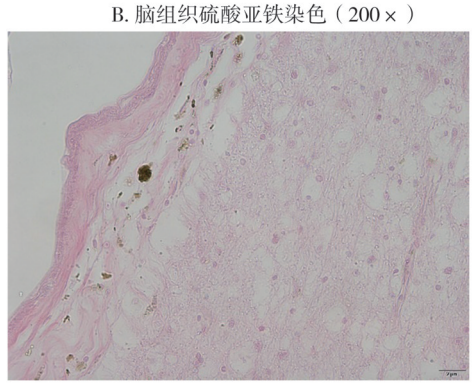
注：阳性结果，CVP呈墨绿色

B. 脑组织硫酸亚铁染色（200×）



注：阳性结果，CVP呈墨绿色

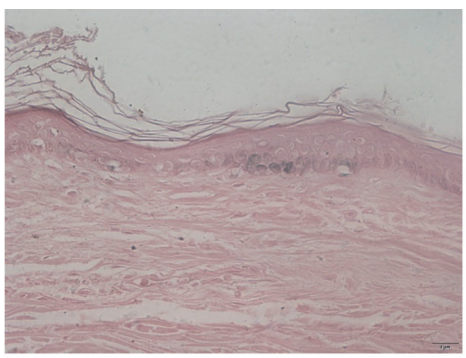
C. 脑组织硫酸亚铁染色（100×）



注：阳性结果，CVP呈墨绿色

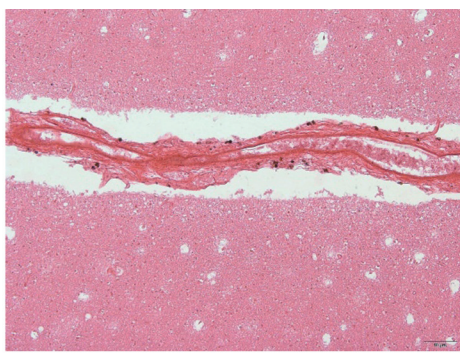
D. 脑组织硫酸亚铁染色（400×）

图7　硫酸亚铁染色



注：阳性结果，皮肤基底层黑色素呈黑色

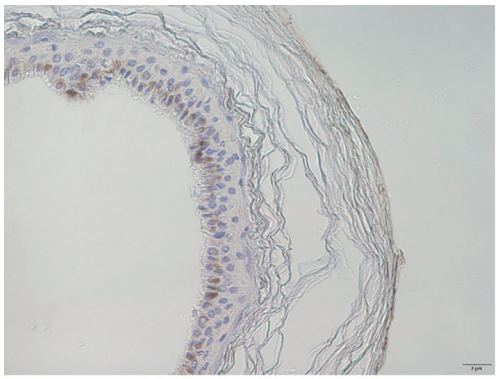
A. 皮肤Schmorl染色（400×）



注：阳性结果，CVP呈黑色

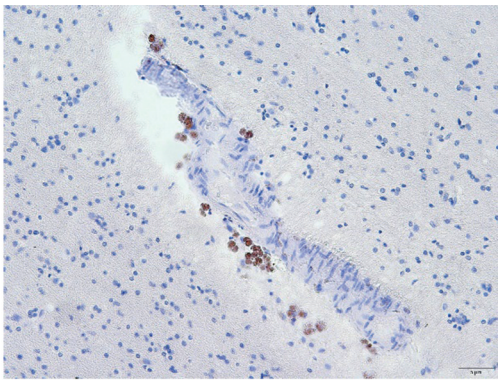
B. 脑组织Schmorl染色（100×）

图8　Schmorl染色



注：阳性结果，皮肤基底层黑色素呈红色

A. 皮肤TRP-1免疫组织化学染色（400×）



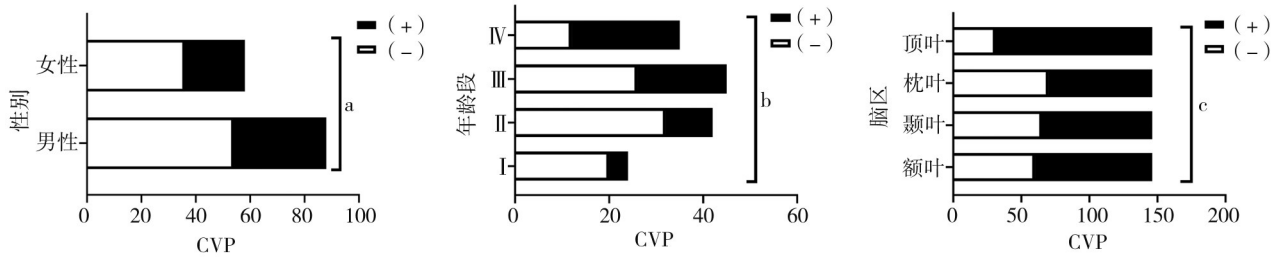
注：阳性结果，CVP呈红色

B. 脑组织TRP-1免疫组织化学染色（200×）

图9　TRP-1免疫组织化学染色

表2　CVP检出率与不同性别、年龄、脑区之间的关系（括号内为列占比）

因素		CVP		χ^2值	P值
		(-)	(+)		
性别	男性	54(60.0)	34(60.7)	0.007	0.932
	女性	36(40.0)	22(39.3)		
年龄分组	Ⅰ	20(22.2)	4(7.1)	19.898	<0.001
	Ⅱ	32(35.6)	10(17.9)		
	Ⅲ	26(28.9)	19(33.9)		
	Ⅳ	12(13.3)	23(41.1)		
脑区	额叶	60(26.5)	86(24.0)	26.476	<0.001
	颞叶	65(28.8)	81(22.6)		
	枕叶	70(31.0)	76(21.2)		
	顶叶	31(13.7)	115(32.1)		



A. 性别与CVP检出率之间的关系　　B. 年龄与CVP检出率的关系　　C. 脑区位置与CVP检出率的关系

注：a，不同性别之间CVP检出率比较，P>0.05；b，不同年龄组之间CVP检出率比较，P<0.001；c，不同脑区之间CVP检出率比较，P<0.001

图10　卡方检验结果

3　讨　论

本研究使用的染色方法是揭示人体内源性色素性质的经典方法。例如，用普鲁士蓝染色显示含铁血黄素[22-23]，用改良Fouchet法胆色素染色显示胆红素[24]，用APE法去除福尔马林颗粒[25]，用PPO法去除黑色素[26]，用硫酸亚铁染色和Schmorl染色显示黑色素[27,9]。

额叶、颞叶、枕叶和顶叶是共识最易发生脑外伤的部位[28]，特别是轻微脑伤的多发部位[29]。因此法医在尸检时常选择这些区域进行大脑组织采样。根据本研究的长期观察，CVP经常出现在不同年龄和性别的尸检案例中，并且可以在不同的大脑区域看到。由于其围绕血管的特性，它很可能与出血相关的陈旧病变有直接关系，但很少有研究证实它是

否真的是一种血源性色素。本研究首先根据血红蛋白的两种主要代谢途径进行验证，但普鲁士蓝染色和改良 Fouchet 法胆色素染色表明 CVP 性质并非含铁血黄素和胆色素。因此，CVP 并不是源自血红蛋白代谢。

由于案例均为尸体，不得不考虑 CVP 是否与尸体分解和组织固定有关。有报道称，腐败肾组织受到福尔马林色素沉着的影响显著[30]，因此选择作为消除福尔马林颗粒染色阳性对照的是来自于一个在死后 3 个月进行第二次尸检的个体的肾组织。本研究采用的 APE 法去除福尔马林颗粒染色被认为是目前消除该色素颗粒最有效的方法[25]。在此方法中，肾组织的色素沉着被清除，但 CVP 不能被清除，因此否定了 CVP 是福尔马林色素的假设。令人惊讶的是，CVP 通过 PPO 法去除黑色素染色被成功清除，这表明 CVP 可能是黑色素。随后，使用硫酸亚铁染色、Schmorl 染色以及对黑色素生物合成过程至关重要的 TRP-1 抗体免疫组织化学染色共同证实 CVP 为黑色素。

所纳入的案例，尽管不同根本死因，但机体都伴发不同程度的其他伤病或医疗损害情况，难以完全拆分作统计分析，因此暂只考虑探究 CVP 和性别、年龄、脑区位置之间的关系。统计学发现 CVP 的检出率随年龄增长而增加，顶叶检出率高于大脑的额叶、颞叶、枕叶等部位。本研究推测这种年龄特征和位置差异可能与脑外伤或其病理过程有关：无论男女，顶叶都可能因内板较薄而更容易在日常生活中受累积性轻微脑损伤的影响[31]，特别是血管和周围脑组织等不同组织学结构之间容易发生不同步运动及其剪切力损伤[29]；而黑色素似乎就具有通过调节炎症和增加血流量来加快代谢修复的能力[32-33]。

CVP 在常规 HE 中不呈常见的深黑色，可能是脑血管特殊的微环境限制了黑色素发育到完全成熟阶段。黑素体的发育分为 4 个阶段[13]，在不同发育阶段会受 pH 和铜、锌等金属离子浓度的影响而呈现不同的颜色[34-35]。

在其他脑外器官中未发现与 CVP 形态相同的色素，这可能归因于黑色素的组织特异性。通过对脊椎动物化石的研究发现，不同组织中黑色素的几何形状和金属离子组成是不同的[36-38]。人的神经系统和心血管系统、消化系统等系统有着不同的内环境。黑色素在这些不同的内环境中表现出不同的形态，发挥不同的功能，这是生物体进化过程中的一种选择。

本研究存在一定的局限性：本实验室近年来只饲养了 SD 大鼠，前期实验在不同年龄 SD 大鼠的脑组织中均没有发现类似的颗粒，因此缺乏通过动物实验作进一步电镜观察以及其他的机制研究。然而，这并不影响目前已经证明的 CVP 性质结果。本研究希望抛砖引玉，呼吁有能力的学者在现有研究成果的基础上对 CVP 进行更深入的探索。无论 CVP 是生理的还是病理的，进一步的研究将有助于本研究更好地了解神经系统，从而为临床实践提供更好的基础。

参 考 文 献

[1] Takahashi S, Takada A, Saito K, et al. Diagnostic significance of the histopathology of bone marrow macrophages in forensic autopsies[J]. Leg Med, 2022, 58: 102079.

[2] Torrealba J, Sweed NT, Burguete D, et al. Bile cast nephropathy: a pathologic finding with manifold causes displayed in an adult with alcoholic steatohepatitis and in a child with Wilson's disease[J]. Case Rep Nephrol Dial, 2018, 8(3): 207-215.

[3] Nayak SL, Kumar M, Bihari C, et al. Bile cast nephropathy in patients with acute kidney injury due to hepatorenal syndrome: a postmortem kidney biopsy study[J]. J Clin Transl Hepatol, 2017, 5(2): 92-100.

[4] Kakar S. Primary biliary cirrhosis[M]//Practical Hepatic Pathology: A Diagnostic Approach. Amsterdam: Elsevier, 2011: 369-381.

[5] Conrado FO, Iapoce N, Batista-Linhares M, et al. Circulating melanin-containing cells and neutrophils with phagocytized melanin granules in a horse with disseminated melanoma[J]. Vet Clin Pathol, 2020, 49(4): 624-631.

[6] Sukswai N, Khoury JD. Immunohistochemistry innovations for diagnosis and tissue-based biomarker detection[J]. Curr Hematol Malig Rep, 2019, 14(5): 368-375.

[7] Siref AB, Huynh CAT, Balzer BL, et al. Diagnostic utility of dual 5-hydroxymethylcytosine/Melan-a immunohistochemistry in differentiating nodal nevus from metastatic melanoma: an effective first-line test for the workup of sentinel lymph node specimen[J]. J Cutan Pathol, 2019, 46(4): 261-266.

[8] 董妙珠，肖 萍，洪新宇，等. 不同染色法检测豚鼠皮肤黑色素的比较研究[J]. 环境与职业医学，2006，23(5)：423-425.
Dong MZ, Xiao P, Hong XY, et al. Comparative study on different stain methods for melanin in guinea pig skin[J]. J Environ Occup Med, 2006, 23(5): 423-425.

[9] Shataer M, Shataer S, Liao LB, et al. Histological Comparison of two Special Methods of Staining Melanin in Human Skin[J]. Int J Mor-

phol，2020，38(6)：1535-1538.

[10] Slominski A，Tobin DJ，Shibahara S，et al. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation[J]. Physiol Rev，2004，84(4)：1155-1228.

[11] Cao W，Zhou XH，McCallum NC，et al. Unraveling the structure and function of melanin through synthesis[J]. J Am Chem Soc，2021，143(7)：2622-2637.

[12] Hong L，Simon JD. Current understanding of the binding sites，capacity，affinity，and biological significance of metals in melanin[J]. J Phys Chem B，2007，111(28)：7938-7947.

[13] D'Alba L，Shawkey MD. Melanosomes：biogenesis，properties，and evolution of an ancient organelle[J]. Physiol Rev，2019，99(1)：1-19.

[14] Wood JM，Jimbow K，Boissy RE，et al. What's the use of generating melanin?[J]. Exp Dermatol，1999，8(2)：153-164.

[15] Lewis MG. Melanoma and pigmentation of the leptomeninges in Ugandan africans[J]. J Clin Pathol，1969，22(2)：183-186.

[16] Gudjohnsen SA，Atacho DA，Gesbert F，et al. Meningeal melanocytes in the mouse：distribution and dependence on mitf[J]. Front Neuroanat，2015，9：149.

[17] Fetissov SO，Barcza MA，Meguid MM，et al. Hypophysial and meningeal melanocytes in the Zucker rat[J]. Pigment Cell Res，1999，12(5)：323-330.

[18] Dey P. Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology[M]. Singapore：Springer Singapore，2018.

[19] Hall MJ. A staining reaction for bilirubin in sections of tissue[J]. Am J Clin Pathol，1960，34(4)：313-316.

[20] Garvey W. Modification of the mayer hematoxylin stain[J]. J Histotechnol，1991，14(3)：163-165.

[21] Huang JP，Wu XJ，Feng CY，et al. Application of the method of melanin bleaching after immunohistochemical staining of melanin-containing tissues[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol，2022，30(7)：526-530.

[22] Dhinakaran S，Mahadevan A，Unchagi A，et al. Is perls Prussian blue stain for hemosiderin a useful adjunct in the diagnosis of vasculitic neuropathies?[J]. Neurol India，2021，69(1)：140-146.

[23] Auger CA，Perosa V，Greenberg SM，et al. Cortical superficial siderosis is associated with reactive astrogliosis in cerebral amyloid angiopathy[J]. J Neuroinflammation，2023，20(1)：195.

[24] 杨如楠. CXCL10/CXCR3轴介导梗阻性黄疸致肾坏死性凋亡的机制研究[D]. 上海：海军军医大学，2023.

Yang RN. Mechanism of CXCL10/CXCR3 Axis Mediated Renal Necrotic Apoptosis Induced by Obstructive Jaundice[D]. Shanghai：Naval Medical University，2023.

[25] Henwood A. What is the best procedure to remove formalin pigment from foraldehyde-acetic acid-alcohol fixed tissues?[J]. J Histotechnol，2010，33(3)：109-111.

[26] 林 娟，晋 龙，吴晶晶，等. 不同脱黑色素方法对HE和免疫组化染色结果的影响[J]. 临床与实验病理学杂志，2021，37(6)：751-753.

Lin J，Jin L，Wu JJ，et al. Effects of different melanin removal methods on HE and immunohistochemical staining results[J]. Chin J Clin Exp Pathol，2021，37(6)：751-753.

[27] 姚 莉，汤显斌，袁玲玲，等. 硫酸亚铁特殊染色与免疫组织化学双重染色在黑色素肿瘤诊断中的应用[J]. 中华病理学杂志，2020，49(5)：482-484.

Yao L，Tang XB，Yuan LL，et al. Application of double staining with ferrous sulfate and diaminobenzidine in immunohistochemistry for diagnosis of melanin tumors[J]. Chin J Pathol，2020，49(5)：482-484.

[28] 江基尧，高国一. 现代颅脑损伤学[M]. 4版. 上海：上海科学技术出版社，2021.

Jiang JY，Gao GY. Modern craniocerebral traumatology[M]. 4th ed. Shanghai：Shanghai Scientific & Technical Publishers，2021.

[29] 于晓军，赵福弟，刘卯阳，等. 大鼠脑震荡模型的建立及病理学研究[J]. 法医学杂志，1992(3)：119-123，145，148-149.

Yu XJ，Zhao FD，Liu MY，et al. Experimental cerebral concussion in rat and its pathological studies[J]. J Forensic Med，1992(3)：119-123，145，148-149.

[30] Chatzopoulos K，Treeck BV，Venable E，et al. Formalin pigment artifact deposition in autopsy tissue：predisposing factors，patterns of distribution and methods for removal[J]. Forensic Sci Med Pathol，2020，16(3)：435-441.

[31] Alexander SL，Rafaels K，Gunnarsson CA，et al. Structural analysis of the frontal and parietal bones of the human skull[J]. J Mech Behav Biomed Mater，2019，90：689-701.

[32] Miniati A，Weng Z，Zhang B，et al. Stimulated human melanocytes express and release interleukin-8，which is inhibited by luteolin：relevance to early vitiligo[J]. Clin Exp Dermatol，2014，39(1)：54-57.

[33] Tsatmali M，Ancans J，Thody AJ. Melanocyte function and its control by melanocortin peptides[J]. J Histochem Cytochem，2002，50(2)：125-133.

[34] Ancans J，Tobin DJ，Hoogduijn MJ，et al. Melanosomal pH controls rate of melanogenesis，eumelanin/phaeomelanin ratio and melanosome maturation in melanocytes and melanoma cells[J]. Exp Cell Res，2001，268(1)：26-35.

[35] Ito S，Wakamatsu K. Diversity of human hair pigmentation as studied by chemical analysis of eumelanin and pheomelanin[J]. J Eur Acad Dermatol Venereol，2011，25(12)：1369-1380.

[36] Rossi V，McNamara ME，Webb SM，et al. Tissue-specific geometry and chemistry of modern and fossilized melanosomes reveal internal anatomy of extinct vertebrates[J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2019，116(36)：17880-17889.

[37] Rossi V，Webb SM，McNamara ME. Hierarchical biota-level and taxonomic controls on the chemistry of fossil melanosomes revealed using synchrotron X-ray fluorescence[J]. Sci Rep，2020，10：8970.

[38] McNamara ME，Rossi V，Slater TS，et al. Decoding the evolution of melanin in vertebrates[J]. Trends Ecol Evol，2021，36(5)：430-443.

（责任编辑：周一青）