

人胎儿喉黏膜上皮细胞的发育分化特点

柯朝阳¹, 吴展元²

(1. 暨南大学附属第二医院//深圳市人民医院耳鼻咽喉科, 广东 深圳 518020;
2. 武汉大学人民医院耳鼻咽喉科, 湖北 武汉 430060)

摘要:【目的】研究中国人胎儿喉黏膜上皮细胞发育分化的特点。【方法】收集 9~40 周胎儿喉标本 33 例。应用连续切片 HE 染色、细胞角蛋白免疫组化染色、扫描电镜和透射电镜观察其黏膜上皮。【结果】9 周胎喉黏膜由 1~2 层低柱状细胞组成, 仅表层细胞表达微弱的角蛋白, 13 周后出现多种类型的上皮细胞, 上皮全层均表达细胞角蛋白; 会厌舌面、声带被覆鳞状上皮, 会厌喉面、室带、喉室及声门下区被覆假复层纤毛柱状上皮, 其基底细胞和中间细胞的胞浆内含有丰富的胞浆泡状系统、张力原纤维和桥粒; 过渡上皮和纤毛上皮中均散在岛状鳞状上皮但出现时间不一致。【结论】人喉黏膜上皮细胞的分化发生于胎儿 9~13 周期间; 纤毛上皮的基底细胞和中间细胞具有双向分化的潜能; 过渡上皮和纤毛上皮中出现岛状鳞状上皮是生理现象, 前者由复层立方上皮分化而来, 后者由纤毛上皮分化而来。

关键词: 胎儿; 喉; 上皮; 细胞分化

中图分类号: R32

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2005)04-0400-04

Characterization of Development and Differentiation of Human Fetal Laryngeal Epithelial Cells

KE Zhao-yang¹, WU Zhan-yuan²

(1. Department of Otolaryngology, Second Affiliated Hospital, Jinan University, Shenzhen 518020, China;
2. Department of Otolaryngology, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the characterization of the development and differentiation of Chinese fetal laryngeal epithelial cells. 【Methods】Thirty-three cases of 9-40 weeks fetal laryngeal specimens were collected. The laryngeal epithelium of these specimens were observed by light microscopy, cytokeratins immunohistochemistry and electron microscopy. 【Results】The laryngeal epithelium of 9 weeks human fetus was composed of monolayer or stratified cuboidal cells, only the surface cells expressed weak cytokeratins. After 13 weeks, three types epithelium appeared and the epithelium expressed strong cytokeratins. The epithelial layer of the true vocal cord and the tongue surface of the epiglottis were composed of squamous epithelium and the other area were covered with pseudostratified ciliated columnar epithelium. Cytoplasmic vacuolar system, tonofilaments and desmosomes were observed in the based and the intermediate cells. Islands of squamous cells were found scattered in the transitional epithelium and the ciliated epithelium but the appeared time was different. 【Conclusion】Cell differentiation of human fetal laryngeal epithelium was accomplished during 9-13 weeks. The based and the intermediate cells of the ciliated epithelium possessed the ability of bipotential differentiation. Islands of squamous cells scattered in the transitional and the ciliated epithelium were physiologic in origin, the former originated from the stratified cube epithelium and the latter from the ciliated epithelium.

Key words: fetus; larynx; epithelium; cell differentiation

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2005,26(4):400-403]

胎喉处在一个与外界相对隔离的环境, 正常情况下, 可有效避免出生后喉部遭受到的一些不

良刺激和损伤, 因此, 研究胎儿期喉黏膜的正常组织分化及结构特点并作为对照, 有助于深入认识

收稿日期: 2004-10-20

基金项目: 广东省医学科研基金资助项目 (A2003694)

作者简介: 柯朝阳 (1969-), 男, 海南海口人, 博士, 副主任医师, 项目负责人. E-mail: kezhaoyang@tom.com

出生后喉部的生理变化及病理情况下疾病的发生演变过程和机制。文献检索显示,我国在这方面的资料尚不完整,仅万光青^[1]对6例胎儿的喉室黏膜进行过扫描电镜观察。为补充这方面的资料,我们采用连续切片HE染色、细胞角蛋白免疫组化染色、扫描电镜和透射电镜对33例不同胎龄的人喉黏膜上皮细胞的发育分化特点进行了动态研究,报道如下。

1 材料和方法

1.1 标本的采集

收集2002年6月至2003年4月本院妇产科及计划生育科因故终止妊娠的引产胎儿标本33例,外形无异常,引产后标本置4℃冰箱冷藏,其中胎龄为9周者4例、13周者4例、16周者4例、17周者5例、21周者3例、23周者3例、25周者2例、29周者2例、32周者2例、33周者1例、37周者2例、40周者1例。于引产后2~12 h内游离出喉体,正中裂开喉头,标本分为两组作不同的处理:一部分用40 mL/L甲醛固定、石蜡包埋、切片,作HE染色及细胞角蛋白免疫组化染色观察;另一部分用20 g/L戊二醛固定,分别剥取会厌、声带、室带、喉室及声门下黏膜作扫描、透射电镜观察。

1.2 连续切片HE染色

按喉头冠状位作常规石蜡连续切片,切片厚5 μm,每隔5~10片取一张切片行HE染色,日本Olympus光学显微镜下观察黏膜上皮。

1.3 细胞角蛋白(AE1/AE3)免疫组化染色

染色程序:①取声带前、中、后3处的冠状位石蜡切片各1~2张,脱蜡至水;②滴加新鲜配制的30 mL/L过氧化氢液,室温(20℃)10 min以灭活内源性酶,蒸馏水洗2 min×3次;③滴加复合消化液作用5~10 min,蒸馏水洗3次;④滴加一抗(鼠抗人细胞角蛋白单克隆抗体AE1/AE3,浓度1:50,购自福州迈新公司),37℃孵育120 min,10 nmol/L PBS漂洗2 min×3次;⑤滴加生物素化山羊抗小鼠IgG,37℃孵育20 min,10 nmol/L PBS漂洗2 min×3次;⑥滴加试剂SABC,37℃作用20 min,10 nmol/L PBS漂洗5 min×4次;⑦DAB显色,使用DAB显色试剂盒(博士德生物制品有限公司),取1 mL蒸馏水,加入A、B、C液各1滴,混匀后滴加至切片上,暗盒中室温下显色20 min,蒸馏水终止反应;⑧苏木素轻度复染、脱水、透明、封片,光镜下观察并摄片。胞浆着棕黄色者为阳性,以PBS液代替一抗作阴性对照。

1.4 扫描电镜标本处理

标本经10 g/L 锇酸后固定、酒精梯度脱水、醋酸异戊酯置换、CO₂临界点干燥、定位定向后上台喷金,日立扫描电镜观察。

1.5 透射电镜标本处理

标本经10 g/L 锇酸后固定、酒精和丙酮梯度脱水、Epon812树脂包埋、超薄切片、柠檬酸铀枸橼酸铅双染色,日立透射电镜观察。

2 结果

2.1 连续切片HE染色观察

9周胎喉:黏膜上皮由1~2层幼稚的低柱状细胞组成(图1),会厌舌面、声带黏膜为单层扁平上皮,会厌喉面、室带、喉室、声门下区被覆复层立方上皮,细胞界限不清,无纤毛。13周胎喉:黏膜上皮明显发育分化,上皮种类较多,可见鳞状上皮、纤毛上皮及由鳞状上皮和纤毛上皮混杂形成的过渡上皮3种(图2)。会厌舌面被覆复层鳞状上皮,会厌喉面、室带、喉室及声门下区被覆假复层纤毛柱状上皮,声带被覆单层鳞状上皮,其外侧与喉室交界处急速移行为纤毛上皮,下方经过渡上皮逐渐移行为纤毛上皮。13周后胎喉上皮变化较小,上皮的种类及各型上皮的分布区域无明显变化,但鳞状上皮的细胞层数增加,声带被覆复层鳞状上皮,此外,在2例16周胎喉及17周以后所有胎喉标本的纤毛上皮中均可见面积大小不一、位置不恒定的岛状鳞状上皮区。

2.2 细胞角蛋白免疫组化染色

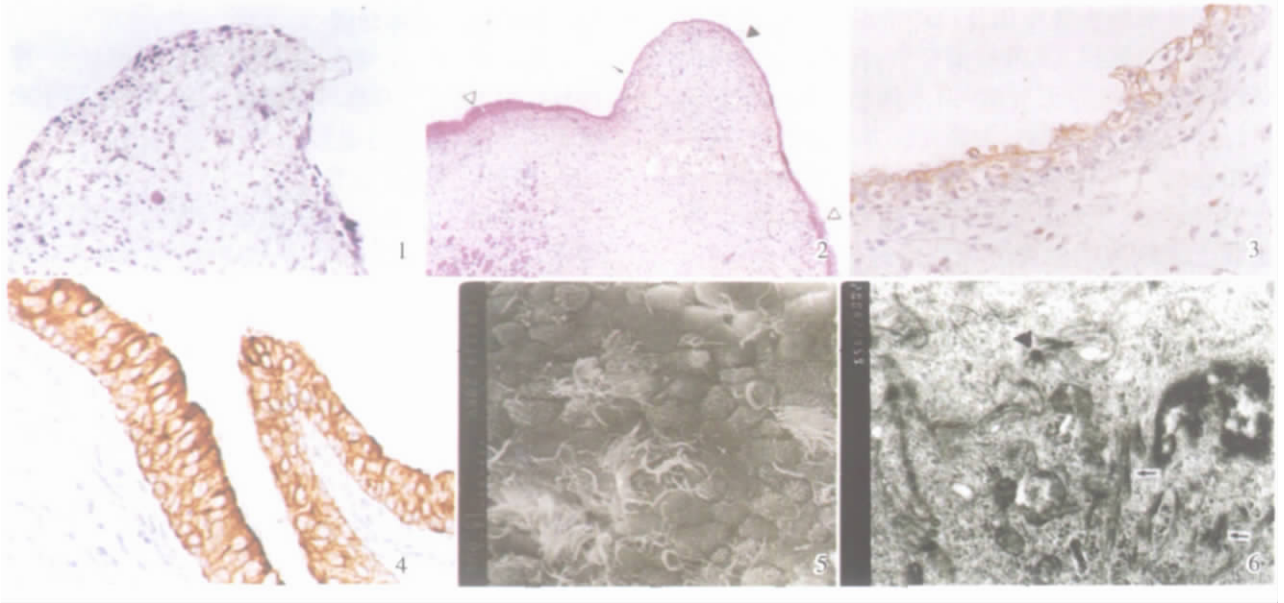
9周胎喉上皮仅见表层细胞呈弱阳性表达,基底细胞不表达(图3),13周后上皮全层均呈强阳性表达(图4)。

2.3 扫描电镜观察

9周胎喉成分单一,细胞呈多边形或梭形,表面无纤毛。13周~40周胎喉可见三种上皮:①大量为带纤毛者,纤毛细胞呈簇状排列,该型上皮主要分布于会厌喉面、室带、喉室及声门下区;②无纤毛上皮,细胞呈多边形,表面光滑无纤毛,细胞之间镶嵌紧密,界限清楚,该型上皮主要分布于会厌舌面及声带,也呈岛状分布于过渡上皮及2例16周和17周后所有胎喉的纤毛上皮中(图5);③过渡上皮由无纤毛细胞和纤毛细胞混杂组成,在向声门下区的移行过程中,无纤毛细胞数量逐渐减少,纤毛细胞数量逐渐增多,且纤毛的长度及密度逐渐增大。

2.4 透射电镜观察

9周胎喉黏膜由1~2层低柱状细胞组成,无



- 图 1 9 周胎喉黏膜均为 1~2 层幼稚的低柱状细胞
 图 2 13 周后胎喉声带、喉室及声门下黏膜出现多种类型的上皮
 图 3 9 周胎喉黏膜上皮仅表层细胞表达细胞角蛋白(弱阳性)
 图 4 13 周后胎喉黏膜上皮全层表达细胞角蛋白(强阳性)
 图 5 纤毛上皮中散在岛状鳞状上皮细胞
 图 6 纤毛上皮的基底细胞富含张力原纤维(↑)、线粒体及桥粒连接(▲)

Fig.1 The laryngeal epithelium of 9 weeks human fetus.
 composed of monolayer or stratified cuboidal cells, HE×200

Fig.2 The epithelial layer of the vocal cord, laryngeal ventricle and infraglottic portion of human fetus after 13 weeks.
 ↓ show squamous epithelium, ▲ show transitional epithelium, show pseudostratified ciliated columnar epithelium, HE×100

Fig.3 The laryngeal epithelium of 9 weeks human fetus.
 only the surface cells expressed weak cyokeratins, SABC×400

Fig.4 The laryngeal epithelium of human fetus after 13 weeks.
 epithelium expressed strong cyokeratins, SABC×400

Fig.5 Islands of squamous cells scattered in the ciliated epithelium. ×1 500

Fig.6 Based cells of ciliated columnar epithelium. ×20 000
 ↑ show tonofilaments, ▲ show desmosomes

纤毛,核大,圆形,居中,细胞器稀少、幼稚。13 周~40 周胎喉黏膜:①假复层纤毛柱状上皮,主要由纤毛细胞、杯状细胞、表面未分化细胞、中间细胞及基底细胞组成。其中间细胞胞浆丰富,内含较发达的胞浆泡状系统,有的在核周或细胞膜下见成束的张力原纤维,细胞核圆、位于中央,中间细胞与相邻细胞间可见桥粒及紧密连接,基底细胞胞浆内有丰富的游离核蛋白体、线粒体及内质网,细胞膜下可见成束的张力原纤维,相邻细胞间见桥粒连接(图 6)。②鳞状上皮,细胞扁平,核圆、位于中央,胞浆细胞器不丰富,相邻细胞间可见桥粒、紧密连接。③过渡上皮,呈复层,深层细胞保持假复层纤毛柱状上皮基底细胞的超微结构特点,表层细胞呈立方形,胞浆突向腔面,有的细胞有纤

毛,胞浆泡状系统丰富,并见张力原纤维。

3 讨论

3.1 胎儿喉黏膜上皮细胞的发育分化时间

本文采用光镜和电镜对 9~40 周国人胎喉黏膜上皮细胞的发育分化演变进行了观察,研究发现,9 周胎喉已具备成人喉外形,但黏膜上皮细胞尚未分化形成,表现为喉腔黏膜均为 1~2 层幼稚的低柱状细胞,至 13 周胎喉才开始出现多种类型的细胞,此后尽管胎喉仍在发育,但胎喉上皮变化较小,表现为上皮的种类及各型上皮的分布区域并无明显变化,只是鳞状上皮的细胞层数增加,说明人喉黏膜上皮细胞的分化发生于胎儿 9~13 周

期间。细胞角蛋白是细胞中间丝蛋白的主要组成成分,也是代表上皮细胞分化状态的重要标志^[2],我们将其应用到人胎喉黏膜上皮细胞的分化研究中,发现9周胎儿喉黏膜仅表层细胞表达微弱的角蛋白,而13周后黏膜全层细胞均呈高强度表达,进一步证实了人喉黏膜上皮细胞的分化成熟的确是在9~13周期间。

3.2 胎儿喉黏膜假复层纤毛柱状上皮的发育分化特点

我们采用透射电镜对胎喉假复层纤毛柱状上皮的超微结构进行了研究,发现纤毛细胞和杯状细胞是已分化成熟的细胞,而基底细胞和中间细胞的分化程度较低,且含有两种不同的胞浆成分:有的细胞富含胞浆泡状系统,而有的细胞微丝或/和张力原纤维发达。前者是向纤毛细胞分化的标志蛋白,后者是向鳞状细胞分化的标志蛋白,因此,基底细胞和中间细胞的这一超微结构特点表明,它们在功能上类似于干细胞,同时具有双向分化的潜能,推测其在细胞分化的过程中,可能会因所处状态、条件的不同而向具有某种成分的专一细胞分化,从而形成某一特定类型的上皮,如胞浆泡状系统占优势时向纤毛细胞分化,而微丝或/和张力原纤维占优势时则向鳞状细胞分化。我们曾在人喉上皮细胞的原代培养中发现^[3],原本是胎喉声门下纤毛上皮的组织块,在体外培养条件下生长出典型的鳞状上皮细胞,从另一角度也证明了这一论点。

3.3 胎儿喉黏膜鳞状上皮的发育分化特点

本研究发现,鳞状上皮除被覆在声带外,过渡上皮及纤毛上皮中也可见到散在的岛状鳞状上皮区,这与Stafford等^[4]的观察结果一致。文献中对于这些岛状鳞状上皮的来源有两种绝然对立的解释^[4]:一种解释认为胎儿期出现的这种鳞状上皮是病理现象(病理化生);另一种解释则认为,喉处于两个胚基来源组织(舌和气管)的结合部,上面舌根来的鳞状上皮与下面气管来的纤毛上皮交错,有可能在胎喉的纤毛上皮中散在这种岛状鳞状上皮(生理化生)。从我们的研究结果来看,17周后所有胎喉标本中均一致性地出现这种岛状鳞状上皮,而且光镜、电镜下并未见到黏膜存在炎症等病理改变,因此我们认为,在胎喉黏膜中散在的

岛状鳞状上皮是正常的生理化生现象。

本研究结果还显示,过渡上皮与纤毛上皮中的岛状鳞状上皮在出现时间上不一致,前者在13周胎喉中即与纤毛上皮同时出现,说明它与纤毛上皮一样,都是在9~13周期间由胎喉黏膜的原基型-复层立方上皮分化而来的,后者在16周后的胎喉中才逐渐出现,在出现时间上晚于纤毛上皮,且散在于纤毛上皮中,说明它可能是由纤毛上皮细胞分化而来的。

Tucker(1978年)曾用放射线观察到第4月胎儿出现吞咽运动,并认为相邻黏膜的磨损是促使鳞状上皮细胞化生的重要因素。现代实时B超已将记录到的人类胎儿出现吞咽运动的时间推进到11周前后^[5],而我们观察到的纤毛上皮中鳞状上皮的出现时间是16周后,两者在出现时间的先后顺序上高度吻合,使我们有理由推测,这种岛状鳞状上皮的出现,是纤毛上皮在本身具有双向分化潜能的基础上,又受到吞咽运动所导致的喉部挤压、磨擦的刺激,从而改变其原有分化途径而逐渐分化形成的。

一般认为,除声带外,正常成人的室带、声门下区等应该被覆的是纤毛上皮,只有在炎症等病理情况下才出现鳞状上皮。从我们在胎喉中就观察到这种鳞状上皮的情况来看,此观点值得商榷,恐不能一概而论,因为有可能这种鳞状上皮早在胚胎期就已形成、是与生俱来的。

参考文献:

- [1] 万光青. 胎儿喉室黏膜的扫描电镜观察[J]. 山东医科大学学报. 1999, 13(1): 4-5.
- [2] van der Velden LA, Schaafsma HE, Manni JJ, *et al.* Cytokeratin and vimentin expression in normal epithelium and benign lesions of the vocal cords[J]. *Acta Otolaryngol*, 1996, 116(2): 325-31.
- [3] 柯朝阳, 吴展元, 肖伯奎. 人喉上皮细胞的原代培养[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志. 2001, 7(1): 23-5.
- [4] Stafford ND, Davies SJ. Epithelial distribution in the human fetal larynx[J]. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 1988, 97(3 Pt 1): 302-7.
- [5] 周永昌, 郭万学. 超声医学[M]. 第3版. 北京: 科学技术文献出版社, 2001. 1169.

(编辑 刘清海)