

人体鼻中隔超微结构观察

贾慧¹ 孙楷² 刘晓雯¹ 李勇¹ 刘增平¹ 郭玉芬^{1,3}

[摘要] 目的:探讨鼻中隔超微结构差异在组织工程、3D 打印技术和鼻整形手术中的意义。方法:取鼻中隔偏曲及慢性鼻窦炎患者鼻内镜术中切除的鼻中隔标本 32 份(犁骨、筛骨垂直板、上颌骨鼻嵴、鼻中隔软骨各 8 份)进行扫描电镜观察。结果:不同年龄患者的鼻中隔在扫描电镜下表现相似,鼻中隔不同部位的骨质在扫描电镜下表现有所异同。结论:通过观察鼻中隔的扫描电子显微镜照片,分析其表面超微结构,可为组织工程的发展提供重要信息,辅助 3D 打印技术精细化建模,为临床手术提供更理想的整复材料。

[关键词] 鼻中隔;扫描电子显微镜;组织工程;3D 打印技术

DOI:10.13201/j.issn.2096-7993.2022.05.002

[中图分类号] R765 **[文献标志码]** A

Scanning electron microscope of the human nasal septum

JIA Hui¹ SUN Kai² LIU Xiaowen¹ LI Yong¹ LIU Zengping¹ GUO Yufen^{1,3}

(¹Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou, 730000, China; ²School of Materials and Energy, Lanzhou University; ³HealthCommission of Gansu Province)

Corresponding author: GUO Yufen, E-mail: gyflhmm@163.com

Abstract Objective: Explore the significance of ultrastructural differences in tissue engineering, 3D printing, and rhinoplasty. **Methods:** 32 specimens (8 vomers, 8 perpendicular plates of ethmoid bone, 8 maxillary nasal crests, and 8 septal cartilage) of the nasal septum from patients with a nasal deviated septum and chronic sinusitis undergoing septoplasty were selected and examined using scanning electron microscopy. **Results:** The nasal septum of patients of different ages behaves similarly under the scanning electron microscope, and the bones of different parts of the nasal septum have similarities and differences. **Conclusion:** By observing the scanning electron micrograph of the nasal septum and analyzing the surface ultrastructure, it provides important information for the development of tissue engineering, assists in the refined modeling of 3D printing technology, and provides more ideal restoration materials for clinical operations.

Key words nasal septum; scanning electron microscope; tissue engineering; 3D printing technology

由于软骨细胞的自我修复能力有限,因先天畸形、外伤或外科手术造成的头颈部软骨损伤修复一直是亟待解决的医学难题。目前临床最常用的修复软骨是肋骨、耳廓或鼻中隔的自体软骨,但在实际应用中存在一定的局限性,如供体部位发生并发症、手术时间相应延长,而且自体软骨可能与需要重建的软骨性质并不相同^[1]。组织工程是一个快速发展的研究领域,其目标是在体外环境中将种子细胞、支架和生物活性分子结合起来,产生新的具有临床功能的组织,以期取代有缺陷的组织或器官^[2]。先前的研究表明在实验室条件下能够成功

生成软骨,但其结构不稳定以及生物相容性差,软骨组织工程难以在临床中得到广泛的应用^[3-4]。3D 生物打印技术是 3D 打印技术研究中最前沿的领域,通过计算机的控制,将细胞、生物材料和活性生物分子精准地在空间上进行排列,创造立体的结构,获得所需的具有生物活性的人工器官和组织^[5]。生物打印用于组织工程和再生医学领域已经有十多年的历史,尽管生物打印能够实现细胞宏观结构的均匀分布,但它缺乏对组织微小结构的控制^[6]。因此,组织工程技术和 3D 打印技术在鼻整形和重建外科手术中具有广泛的应用需求和巨大的发展潜力,值得进一步研究^[7]。本研究通过观察患者术中废弃鼻中隔的超微结构,为软骨组织工程的发展提供重要信息,辅助 3D 打印技术对鼻中隔进行精细化建模,为临床上手术精细化要求提供理

¹兰州大学第二医院耳鼻咽喉头颈外科(兰州,730000)

²兰州大学材料与能源学院

³甘肃省卫生健康委员会

通信作者:郭玉芬,E-mail:gyflhmm@163.com

论基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2020 年 8 月于我院耳鼻咽喉头颈外科就诊的 8 例患者作为研究对象。2 例以鼻中隔偏曲收住入院,6 例以慢性鼻窦炎(伴鼻息肉型 2 例,不伴鼻息肉型 4 例)收住入院。8 例患者中,男女各 4 例,年龄 12~60 岁,平均(33.37±19.24)岁。手术均在全身麻醉下进行,通过鼻内镜手术获取偏曲的鼻中隔组织 32 份(犁骨、筛骨垂直板、上颌骨鼻嵴和鼻中隔软骨各 8 份)。所有受试者均在术前签署手术知情同意书。

1.2 标本制备流程及扫描电镜参数

取材及固定:术中取犁骨、筛骨垂直板、上颌骨鼻嵴和鼻中隔软骨组织标本各 5 mm×5 mm,用生理盐水反复冲洗以去除骨组织上连带物。随后立即置于 2.5%戊二醛溶液中,4℃下固定 12 h。磷酸缓冲盐溶液洗脱 5 min×4 次。

脱水及干燥:使用乙醇分级脱水,室温下加入不同浓度梯度(30%、50%、70%、80%、90%、100%)的乙醇静置处理,每次 10 min;随后室温下加入不同浓度梯度(30%、50%、70%、80%、90%、

100%)的叔丁醇置换乙醇,每次 10 min;完成上述操作,将样品放入真空冷冻干燥箱内干燥。干燥结束后,使用离子溅射仪对样品进行喷金处理,电流 30 mA,持续 120 s。

图像采集:使用热场发射扫描电子显微镜(FEI Apero S)进行图像采集。加速电压 30 kV,电流 0.2 nA,工作距离约为 10 mm,采集到的为样品表面激发的二次电子信号。

2 结果

扫描电子显微镜下,不同年龄患者的鼻中隔表现相似,鼻中隔不同部位的骨质表现有所异同。患者的犁骨、筛骨垂直板、上颌骨鼻嵴、鼻中隔软骨标本在放大倍数为×1300 时(图 1),犁骨、筛骨垂直板、上颌骨鼻嵴表面较粗糙,可见细丝状物不规则排列;鼻中隔软骨表面较光滑。在放大倍数为×10 000 时(图 2),犁骨、筛骨垂直板、上颌骨鼻嵴表面细的胶原纤维交织排列,周围可见散在腔隙;鼻中隔软骨表面较细腻,胶原纤维紧密排列,腔隙分布不明显。在放大倍数为×120 000 时(图 3),犁骨、筛骨垂直板、上颌骨鼻嵴、鼻中隔软骨均表现为细的胶原纤维排列疏松,纤维表面可见细小突起,周围可见散在腔隙。

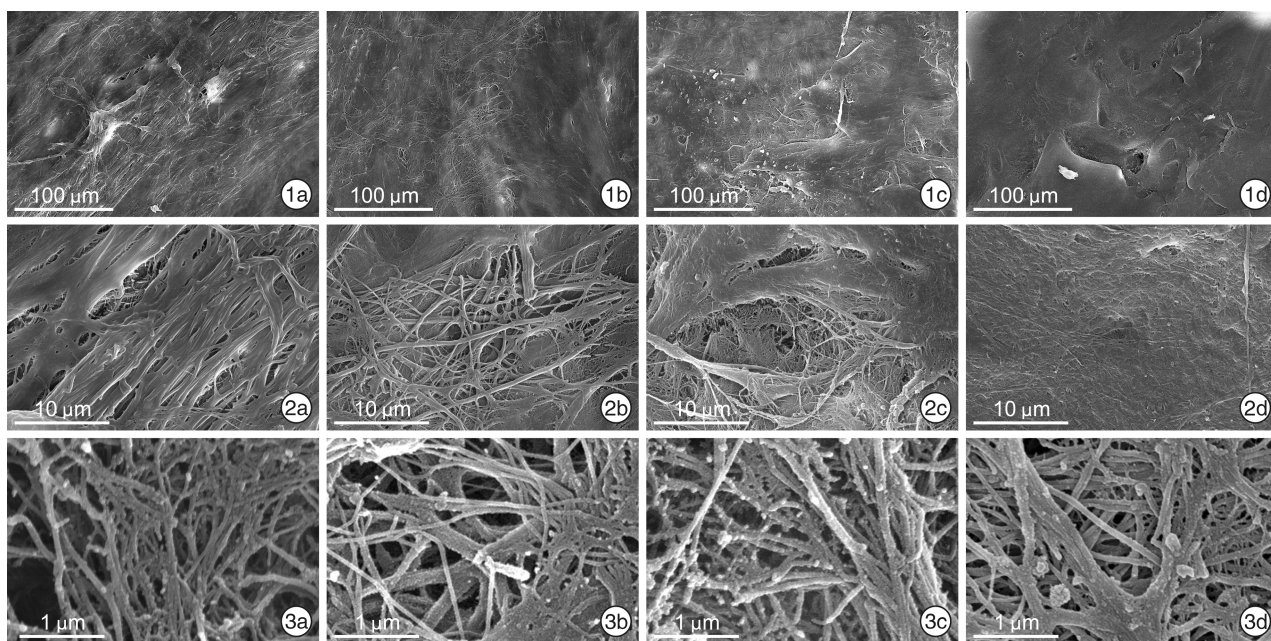


图 1 患者的犁骨(1a)、筛骨垂直板(1b)、上颌骨鼻嵴(1c)、鼻中隔软骨(1d)标本的扫描电子显微镜照片(×1300);
图 2 患者的犁骨(2a)、筛骨垂直板(2b)、上颌骨鼻嵴(2c)、鼻中隔软骨(2d)标本的扫描电子显微镜照片(×10 000);
图 3 患者的犁骨(3a)、筛骨垂直板(3b)、上颌骨鼻嵴(3c)、鼻中隔软骨(3d)标本的扫描电子显微镜照片(×120 000)

3 讨论

目前鼻组织工程技术的发展仍显滞后,其中先天性和后天性缺损的鼻软骨修复以及鼻整形具有广阔的发展前景。已发表的文献针对鼻科疾病的软骨组织工程技术的基础与应用研究还不多,且主要集中于动物实验,距临床应用尚有相当的距

离^[8]。虽然已经对人体软骨进行了大量的扫描电子显微镜测试^[9],部分研究也通过扫描电镜观察了鼻中隔软骨^[1-2],但尚无研究进行超微结构分析来同时比较鼻中隔的四块组成骨,即犁骨、筛骨垂直板、上颌骨鼻嵴和鼻中隔软骨。

软骨组织缺乏自我修复和再生能力,因此,组

织工程软骨替代物将成为治疗软骨疾病的极佳选择^[10]。软骨缺损的修复需要寻找最佳的种子细胞。鼻中隔软骨作为鼻部整形美容的供区材料,已有多年的历史^[11-12],迄今仍是隆鼻手术常用的自体材料。其作为整复材料有以下优点:①同一部位取材,减少医源性二次损伤;②取材方便,切口隐蔽,不影响美观;③自体组织,免疫排斥反应小;④便于成活,长期疗效好。有研究认为鼻中隔软骨具有增殖速度快、分泌基质多等优势,可作为软骨组织工程的理想种子细胞来源^[13]。也有研究使用筛骨垂直板和犁骨作为移植物进行鼻整形手术,辅助鼻中隔软骨构建移植物可以起到良好的物理支撑作用,以弥补鼻中隔软骨量有限或支撑力弱的不足^[14-16]。有学者通过实验研究发现,鼻软骨组织工程构建出的物质在组织学上具有软骨特性,但不论在外形还是力学功能上都与临床手术的要求相距甚远^[17]。Onerci Altunay 等^[18]研究显示,3D 打印技术辅助医用硅胶假体可以显著提高鼻中隔穿孔患者的手术修复率。目前将鼻整形动物模型与组织工程和3D 打印技术结合的研究很少。Kim 等^[19]报道3D 打印技术联合组织工程理念设计的软骨细胞种子,有望作为生物相容性材料用于未来的鼻整形手术中。

精细结构影响物体的生物学及物理学特征,因此有必要先探明鼻中隔超微结构特点,有助于在打印技术帮助下对骨质进行精细化建模,以及构建出外形及力学功能与人体组织更加接近的鼻中隔。现有的研究在观察鼻软骨时放大倍数多为几千到几万^[1-2,20],我们不仅尝试了更大的放大倍数,以观察更细微的结构特征,而且还克服了生物样本制备过程复杂、扫描电镜照片无从借鉴的困难,同时比较了犁骨、筛骨垂直板、上颌骨鼻嵴和鼻中隔软骨四种骨质形态。关于取材者的年龄问题,程友等^[21]研究发现人鼻中隔软骨细胞的特性不依赖于年龄(15~60岁),年龄相异的情况下,体外培养的细胞生长状态无明显差别,证明自体软骨细胞的取材在年龄方面范围较广。本研究发现不同年龄患者的鼻中隔在扫描电镜下表现相似,鼻中隔不同组成骨在扫描电镜下有所异同,比如犁骨、筛骨垂直板、上颌骨鼻嵴和鼻中隔软骨在放大倍数为1300和10 000倍时,鼻中隔软骨的表现与其他三种骨有所差异,鼻中隔软骨表面更加细腻、光滑,而犁骨、筛骨垂直板、上颌骨鼻嵴表面较粗糙,可见细丝爬行,纤维交织排列,纤维周围腔隙分布。在放大倍数为120 000倍时,犁骨、筛骨垂直板、上颌骨鼻嵴及鼻中隔软骨表面在扫描电镜下均表现为细的胶原纤维纵横交错,排列疏松,纤维表面可见细小突起,周围分布散在腔隙。既然鼻中隔软骨细胞可以作为组织工程理想的种子细胞,那么与之超微结

构类似的犁骨、筛骨垂直板、上颌骨鼻嵴能否作为种子细胞,甚至是否具有更好的生物学及物理学性能,有待进一步探索。鉴于对鼻中隔超微结构的分析,后期制备的支架材料或许与种子细胞贴合度更高,支架形态更符合临床需求。此外,超微结构的分析也有助于计算机系统对鼻中隔进行更加精细的建模,从而生成更精确、更符合生理功能、更具备美学特点的移植物。

总之,组织工程与3D打印技术在医学中的应用愈加广泛,但现阶段还面临诸多问题,如打印材料匮乏且单一、打印精度差、新型支架材料研发困难、细胞活性及生理功能欠佳、生物相容性差,无法真正实现人体组织器官的原位修复。本研究旨在通过观察鼻中隔的扫描电子显微镜照片,分析犁骨、筛骨垂直板、上颌骨鼻嵴及鼻中隔软骨表面的超微结构,为组织工程的发展提供微米甚至纳米级别的信息,有助于3D打印技术对骨质进行精细化建模,为临床手术提供更理想的整复材料。相信随着计算机技术、3D打印技术、组织工程以及材料学领域研究的不断深入,组织器官的原位修复及替代将会有更加光明的前景。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Graham ME, Gratzner PF, Bezuhyly M, et al. Development and characterization of decellularized human nasoseptal cartilage matrix for use in tissue engineering [J]. *Laryngoscope*, 2016, 126(10): 2226-2231.
- [2] Holden PK, Liaw LH, Wong BJ. Human nasal cartilage ultrastructure: characteristics and comparison using scanning electron microscopy [J]. *Laryngoscope*, 2008, 118(7): 1153-1156.
- [3] Shieh SJ, Terada S, Vacanti JP. Tissue engineering auricular reconstruction: in vitro and in vivo studies [J]. *Biomaterials*, 2004, 25(9): 1545-1557.
- [4] Sterodimas A, de Faria J, Correa WE, et al. Tissue engineering and auricular reconstruction: a review [J]. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2009, 62(4): 447-452.
- [5] Ozbolat IT, Peng W, Ozbolat V. Application areas of 3D bioprinting [J]. *Drug Discov Today*, 2016, 21(8): 1257-1271.
- [6] Dey M, Ozbolat IT. 3D bioprinting of cells, tissues and organs [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 14023.
- [7] Paternoster JL, Vranckx JJ. State of the Art of Clinical Applications of Tissue Engineering in 2021 [J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2021.
- [8] 李雪盛, 孙建军. 再生医学之鼻软骨组织工程研究进展 [J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2019, 33(12): 1217-1220.
- [9] Love JC. Sharp force trauma analysis in bone and cartilage: A literature review [J]. *Forensic Sci Int*, 2019, 299: 119-127.

- apnoea syndrome really one of the causes of secondary polycythaemia? [J]. *Hematology*, 2015, 20 (2): 108-111.
- [15] Nguyen CD, Holty JC. Does untreated obstructive sleep apnea cause secondary erythrocytosis? [J]. *Respir Med*, 2017, 130:27-34.
- [16] Li N, Li HP, Wang P, et al. Nocturnal Mean Oxygen Saturation Is Associated with Secondary Polycythemia in Young Adults with Obstructive Sleep Apnea, Especially in Men[J]. *Nat Sci Sleep*, 2019, 11:377-386.
- [17] Storz JF. High-Altitude Adaptation: Mechanistic Insights from Integrated Genomics and Physiology[J]. *Mol Biol Evol*, 2021, 38(7):2677-2691.
- [18] Hoshikawa M, Uchida S, Sugo T, et al. Changes in sleep quality of athletes under normobaric hypoxia equivalent to 2,000-m altitude: a polysomnographic study[J]. *J Appl Physiol* (1985), 2007, 103(6):2005-2011.
- [19] Bloch KE, Latshang TD, Ulrich S. Patients with Obstructive Sleep Apnea at Altitude[J]. *High Alt Med Biol*, 2015, 16(2):110-116.
- [20] Latshang TD, Bloch KE. How to treat patients with obstructive sleep apnea syndrome during an altitude sojourn[J]. *High Alt Med Biol*, 2011, 12(4):303-307.
- [21] Solmaz S, Duksal F, Ganidagli S. Is obstructive sleep apnoea syndrome really one of the causes of secondary polycythaemia? [J]. *Hematology*, 2015, 20 (2): 108-111.
- [22] Wimms A, Woehrl H, Ketheeswaran S, et al. Obstructive Sleep Apnea in Women: Specific Issues and Interventions [J]. *Biomed Res Int*, 2016, 2016: 1764837.
- [23] Grau M, Cremer JM, Schmeichel S, et al. Comparisons of Blood Parameters, Red Blood Cell Deformability and Circulating Nitric Oxide Between Males and Females Considering Hormonal Contraception; A Longitudinal Gender Study [J]. *Front Physiol*, 2018, 9: 1835.
- [24] Alvarez-Martins I, Remédio L, Matias I, et al. The impact of chronic intermittent hypoxia on hematopoiesis and the bone marrow microenvironment[J]. *Pflugers Arch*, 2016, 468(5):919-932.
- [25] O'Halloran KD, Lewis P, McDonald F. Sex, stress and sleep apnoea; Decreased susceptibility to upper airway muscle dysfunction following intermittent hypoxia in females[J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2017, 245: 76-82.
- [26] Soliz J, Thomsen JJ, Soulage C, et al. Sex-dependent regulation of hypoxic ventilation in mice and humans is mediated by erythropoietin[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2009, 296(6):R1837-1846.
- [27] Deng L, Zhang C, Yuan K, et al. Prioritizing natural-selection signals from the deep-sequencing genomic data suggests multi-variant adaptation in Tibetan highlanders[J]. *Natl Sci Rev*, 2019, 6(6):1201-1222.
(收稿日期:2022-01-05 修回日期:2022-02-18)

(上接第 337 页)

- [10] Ahmed TA, Hincke MT. Strategies for articular cartilage lesion repair and functional restoration[J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2010, 16(3):305-329.
- [11] Boahene K. The African Rhinoplasty[J]. *Facial Plast Surg*, 2020, 36(1):46-52.
- [12] Koehler J, McLain L. Grafting in cosmetic rhinoplasty [J]. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*, 2012, 24(1):59-66.
- [13] 徐奕昊. 3D 打印技术辅助精细化构建组织工程鼻翼软骨的研究[D]. 北京:北京协和医学院中国医学科学院, 2014.
- [14] Yang X, Li D, Xue H, et al. Anatomical Characteristics of the Perpendicular Plate of the Ethmoid; An Analysis of Paranasal Sinus Computed Tomography via Three-Dimensional Reconstruction [J]. *J Craniofac Surg*, 2019, 30(2):604-606.
- [15] An Y, Yang X, Xue H, et al. Inferior portion of the perpendicular plate of the ethmoid as a suitable grafting material in rhinoplasty and septoplasty procedures [J]. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2018, 71(11): 1664-1678.
- [16] 党婉文, 叶文静, 甄永环, 等. 筛骨垂直板行鼻整形术的短期效果观察[J]. *中国美容整形外科杂志*, 2020, 31(1):9-12, 20.
- [17] Wu W, Chen F, Feng X, et al. Engineering cartilage tissues with the shape of human nasal alar by using chondrocyte macroaggregate—Experiment study in rabbit model[J]. *J Biotechnol*, 2007, 130(1):75-84.
- [18] Onerci Altunay Z, Bly JA, Edwards PK, et al. Three-dimensional printing of large nasal septal perforations for optimal prosthetic closure[J]. *Am J Rhinol Allergy*, 2016, 30(4):287-293.
- [19] Kim YS, Shin YS, Park DY, et al. The Application of Three-Dimensional Printing in Animal Model of Augmentation Rhinoplasty[J]. *Ann Biomed Eng*, 2015, 43(9):2153-2162.
- [20] 杨晓璐. 人鼻中隔软骨细胞与猪脱细胞真皮基质相容性研究[D]. 天津:天津医科大学, 2018.
- [21] 程友, 黄金中, 李景红, 等. 不同年龄人鼻中隔软骨细胞生物学特性观察[J]. *中国耳鼻咽喉头颈外科*, 2005, 12(1):41-43.
(收稿日期:2021-12-23)