

家兔鼻腔病理标本制备及组织结构解析

张 頔[#], 林 志[#], 吕建军, 杨艳伟, 高苏涛, 霍桂桃, 屈 哲^{*}

中国食品药品检定研究院 国家药物安全评价监测中心, 北京 100176

摘要:目的 研究家兔鼻腔的解剖学和组织学结构, 为吸入性毒性研究提供有效的病理学评价方法。方法 采集正常成年家兔的鼻腔, 经10%中性福尔马林溶液固定, 三氯甲烷脱脂, 甲酸溶液脱钙后, 从鼻腔顶端开始连续切片, HE染色, 对其中具有标志性的解剖学和组织学结构部位的4个切面的主要上皮类型和组织结构进行评价。结果 切面I在紧靠门齿后修取, 主要排列有鳞状上皮带有少量密集的变移上皮, 该部位仅适用于灌注给药试验的毒性病理学评价。第一个腭脊处修取切面II, 主要排列有变移上皮和呼吸上皮。紧靠第一个上前白齿前修取切面III, 紧靠第一个上白齿前修取切面IV, 切面III和切面IV排列有呼吸上皮和嗅上皮, 通常还分布有鼻相关性淋巴组织。与大鼠、小鼠、狗、猴相比, 家兔鼻腔的相对体积与人类类似。结论 通过家兔明显的颅骨解剖标志物确定鼻腔的4个组织切面, 可完整涵盖所有鼻腔内的组织结构特征, 这为临床前药物安全性评价中鼻腔的科学性评估提供支持和帮助。

关键词: 家兔; 鼻腔; 标本制备; 病理学评价

中图分类号: R965.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2020) 10-1951-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.10.005

Pathology specimen preparation and histologic structure analysis of rabbit nasal cavity

ZHANG Di, LIN Zhi, LÜ Jianjun, YANG Yanwei, GAO Suta, HUO Guitao, QU Zhe

National Institutes for Food and Drug Control, National Center for Safety Evaluation of Drug, Beijing 100176, China

Abstract: Objective To research the anatomy and histology of rabbit nasal cavity in order to provide an effective pathological evaluation method for inhalation toxicity study. **Methods** The nasal cavities of normal adult rabbits were collected and fixed in 10% neutral formalin solution, skimmed by chloroform, decalcified by formic acid solution, then continuously sectioned from the tops of the nasal cavities, finally, the nasal cavity tissue sections were HE stained. The major epithelial types and histological structures were evaluated in these four levels of the nasal cavity with anatomical and histological features. **Results** Level I was sectioned immediately posterior to the incisors and lined predominantly by squamous epithelium with small amounts of dense transitional epithelium. This level is only suitable for the evaluation of the toxic pathology of perfusion administration study. Level II was sectioned at the first palatal ridge and lined primarily with transitional and respiratory epithelium. Level III was sectioned immediately anterior to the first upper premolar teeth, and Level IV was sectioned immediately anterior to the first upper molar. Levels III and IV were lined with respiratory and olfactory epithelium and often contained nasal-associated lymphoid tissue. The relative volume of the rabbit nasal cavity is also similar to that of humans in comparison with those of other common laboratory species rat, mouse, dog, and cynomolgus monkey. **Conclusion** The four sections of the nasal cavity determined by the obvious skull anatomical markers of the rabbit can completely cover all the structural characteristics of the nasal cavity, which will provide support and help for the scientific evaluation of the nasal cavity in the preclinical drug safety evaluation.

Key words: rabbit; nasal cavity; specimen preparation, pathological evaluation

鼻腔作为呼吸道的入口是吸入性物质如微生物或外源性化学物引起损伤的主要部位。虽然在传统的经口或ig毒性研究中通常不对鼻腔进行详

细的检查,但是当药物或生物制品为吸入剂或者鼻腔为潜在毒性作用靶器官时,需要对鼻腔进行仔细的组织学检查^[1]。此外,近年的研究发现某些药物

收稿日期: 2019-12-25

基金项目:“十三五”重大新药创制专项课题“创新药物非临床安全性评价研究关键技术”(编号 2018ZX09201017)

#共同第一作者: 张 頔,女,学士,主管技师,研究方向为毒性病理学技术。Tel: (010) 67872233 E-mail: skystar.night@163.com

林 志,女,博士,研究方向为药物临床前安全性评价。Tel: (010) 67872233 E-mail: huoguitao@nifdc.org.cn

*通信作者: 屈 哲,女,博士,研究方向为药物临床前安全性评价。Tel: (010) 67872233 E-mail: quzhe82q7@163.com

的鼻腔给药可提高药物的生物利用率,越来越多的药物转向了鼻腔给药系统^[2]。鼻腔给药无胃肠道降解作用,无肝脏首关效应,药物吸收迅速,给药后起效时间快。药物吸收后直接进入体循环,达到全身治疗的目的。鼻腔给药毒性研究的快速发展极大地推动了实验动物如大鼠^[2-6]、小鼠^[7]、猴^[8-9]的鼻腔解剖学特点、组织学特点以及分子水平相关知识的深入研究。任何一种属动物鼻腔的毒性病理学评价都依靠病理学家对这些种属动物正常鼻腔解剖和组织学特征的全面了解。家兔也是吸入性毒性研究或鼻腔给药常用的实验动物^[10]。然而,国内尚未有关于家兔鼻腔系统取材方法和毒性病理学评价方法的相关研究。本研究的目的是建立家兔鼻腔病理标本的标准制备方法以及通过研究家兔正常鼻腔显微结构特征建立毒性病理学评价的一般方法。

1 材料

1.1 实验动物

12只正常雌性新西兰大白兔,6月龄,体质量3~4 kg,由北京科宇动物养殖中心提供,实验动物生产许可证号SCXK(京)2012-0004。

1.2 试剂和仪器

10%中性福尔马林溶液由甲醛溶液、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠配制;脱脂液由三氯甲烷、无水乙醇按1:1比例配制;脱钙液由10%中性福尔马林和98%甲酸按6:4比例配制;苏木素、伊红染液均购于日本武藤化学公司。全自动脱水机、樱花TCE5 EMJ-2型自动包埋机、切片机、樱花DRS-2000自动染色机,购于日本樱花公司。

2 方法

实验动物经戊巴比妥钠麻醉,腹主动脉放血处死,经寰枕关节处断头,摘除无关组织包括下颌骨、脑组织、眼球、皮肤和肌肉。将剥离好的鼻腔充分浸泡在10%中性福尔马林溶液中,修块前固定7 d。将固定后的鼻腔置于脱脂液12 h后,用无水乙醇每半小时浸泡1次,共2次。流水冲洗0.5 h以上。将待取材组织浸入到脱钙液中10 d,在此过程中至少更换1次脱钙液。脱钙液采用JYBL-III50%甲酸脱钙液。脱钙后,鼻腔经流水冲洗过夜。将4个横切面(约5 mm厚度)放入28 mm×35 mm×6 mm包埋盒中,头盖面向下。修块标准如见图1所示:上切牙、腭嵴、第一上前白齿和第一上白齿。上切牙后切牙乳头处修取切面I,第一腭嵴处修取切面II,第一上前白齿前修取切面III,第一上白齿前修取切面IV。最后,组织经脱水后进行传统石蜡包埋切片。

从每个切面前端平面按5 mm厚度切取组织包埋成石蜡块,将切片置于75 mm×25 mm×1 mm的玻璃载玻片上,HE染色,显微镜检查。

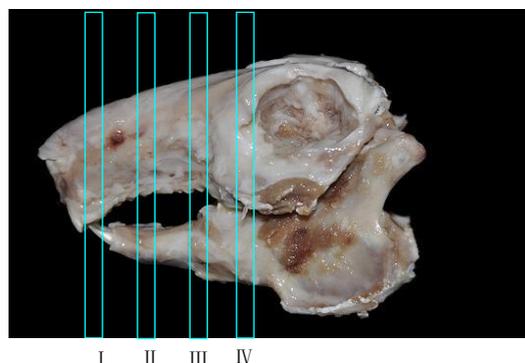


图1 家兔鼻腔解剖组织样本图(侧面)

Fig. 1 Anatomical tissue of rabbit nasal cavity (side view)

3 结果

3.1 切面I

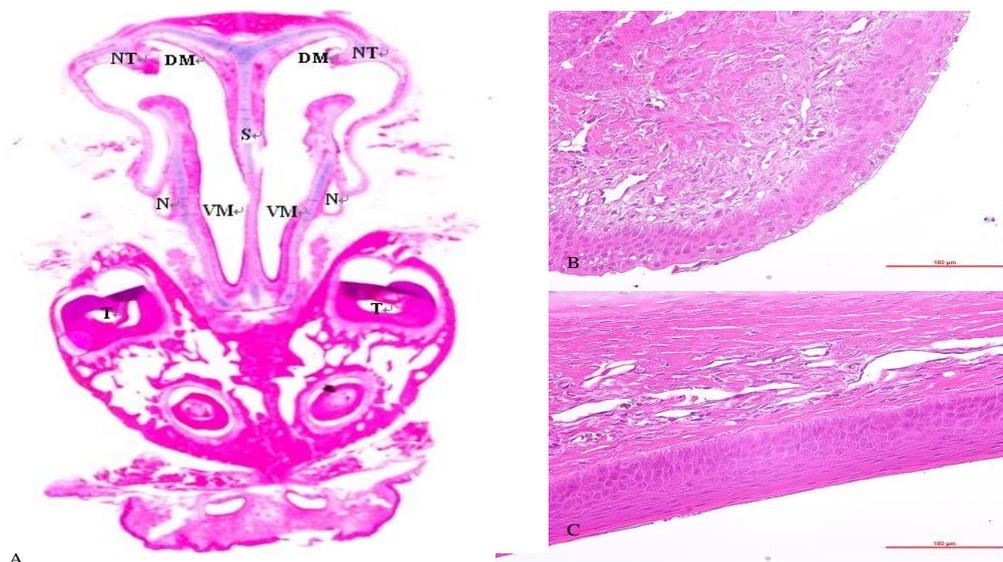
上切牙后切牙乳头处修取切面I(图2-A)。由切面可见,鼻腔由鼻中隔平均分成两半。透明软骨板支撑着鼻中隔,向中间伸展为鼻甲骨的软骨,将鼻腔分为左右两个鼻道。鼻黏膜浆液腺群位于鼻腔的腹侧和切牙骨的背侧。切面I鼻腔被覆鳞状上皮和移行上皮。鳞状上皮覆盖大部分的鼻中隔(见图2-C),此处上皮由4~6层鳞状上皮细胞组成,角质层大约8 mm厚,固有层中偶见胞浆含嗜酸性颗粒的浆液腺。移行上皮覆盖在外侧壁和鼻甲骨的内侧和背侧面,由2层基底细胞和4层多角形和立方细胞组成(见图2-B)。鼻泪管位于腹侧鼻腔的外侧,覆盖假复层柱状上皮。

3.2 切面II

第一腭嵴处修取切面II(见图3-A)。切面II处有3种不同的鼻腔,包括背侧鼻腔、相邻上颌窦的中部鼻腔以及腹侧鼻腔。此切面含有2种不同的鼻甲,即筛骨鼻甲和上颌骨鼻甲。切面II中上切牙根为侧面定位。与切牙相临近的腹中部是鼻泪管,覆盖有单层柱状上皮。在这个切面上,前庭位于鼻腔最腹侧,背侧至软腭,呈囊状延伸到切牙骨下,倒置的C型软骨环支撑前庭的最腹侧部位。前庭覆盖有多层轻微角质化的鳞状上皮细胞,此处由鳞状上皮细胞向呼吸上皮细胞过渡(见图3-D)。鼻相关的淋巴组织(NALT)常出现于前庭黏膜中。成对的梨鼻器位于鼻中隔的腹侧,部分被下降的钩状软骨包围。梨鼻器由嗅上皮细胞和呼吸上皮细胞组成。嗅上皮细胞排列在内侧,神经纤维束延伸到固有层。梨鼻器外侧衬有纤毛,为假

复层呼吸上皮细胞(见图3-C)。呼吸道黏膜的固有层含有腺体,这些腺体能延伸到鼻中隔的固有层。鼻中隔由一块倒置锚形的透明软骨板支撑,终止于鼻甲,覆盖有假复层柱状上皮和纤毛呼吸上皮,最腹侧面常出现杯状细胞。固有层包含多种腺体。呼吸上

皮通常在鼻甲的背侧面。上颌骨鼻甲最背侧部位最为复杂,有多达五十个或更多的分支。上颌骨鼻甲和中部鼻腔外侧壁均被覆有移行上皮(图3-B),外观从立方上皮几乎变为鳞状上皮。上皮为稀疏的纤毛细胞,没有杯状细胞。鼻泪管被覆有鳞状上皮。

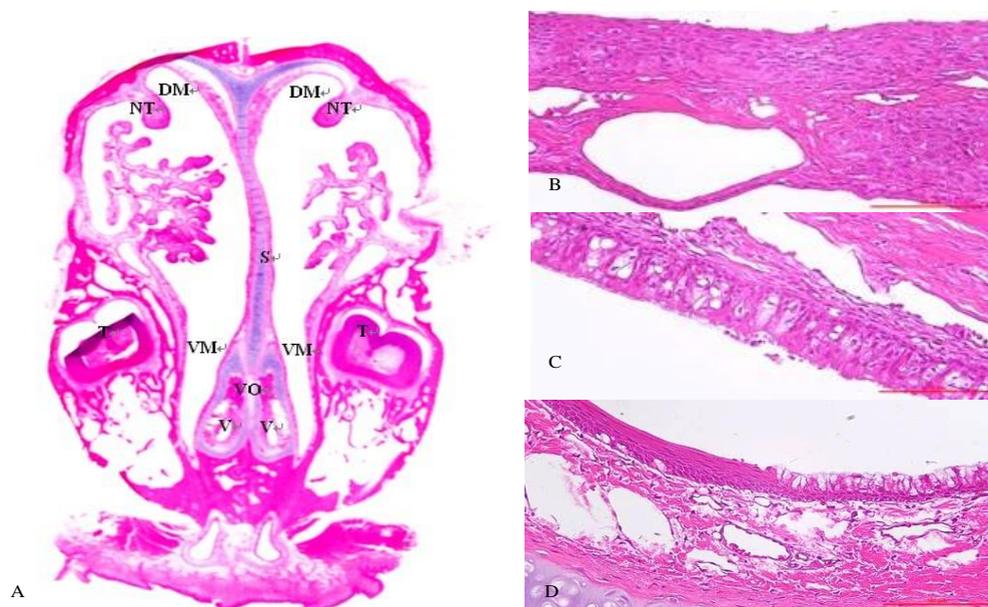


A-兔鼻腔横切面 HE 染色:DM-背侧鼻腔;NT-鼻甲;S-鼻中隔;N-鼻泪管;VM-腹侧鼻腔;T-牙。B、C-黏膜上皮组织:B-移行上皮(鼻甲处);C-鳞状上皮(鼻中隔处)

A-HE staining of rabbit nasal cross section: DM-dorsal nasal cavity; NT-turbinate; S-septum; N-nasolacrimal duct; VM-ventral nasal cavity; T-teeth. B and C-epithelium: B-transitional epithelium (at turbinate); C-squamous epithelium (at septum)

图2 家兔鼻腔切面I

Fig. 2 Nasal section I of rabbits



A-兔鼻腔横切面 HE 染色:DM-背侧鼻腔;NT-鼻甲;S-鼻中隔;VM-腹侧鼻腔;VO-梨鼻区;V-前庭;T-牙。B、C、D-黏膜上皮组织:B-移行上皮(上颌骨鼻甲处);C-呼吸上皮(梨鼻器处);D-鳞状上皮过渡到呼吸上皮(前庭处)

A-HE staining of rabbit nasal cross section: DM-dorsal nasal cavity; NT-turbinate; S-septum; VM-ventral nasal cavity; VO-pear nasal area; V-vestibule; T-teeth. B, C and D-epithelium: B-transitional epithelium (at maxillary turbinate); C-respiratory epithelium (at pear nose organ); D-squamous epithelium transition to respiratory epithelium (vestibule)

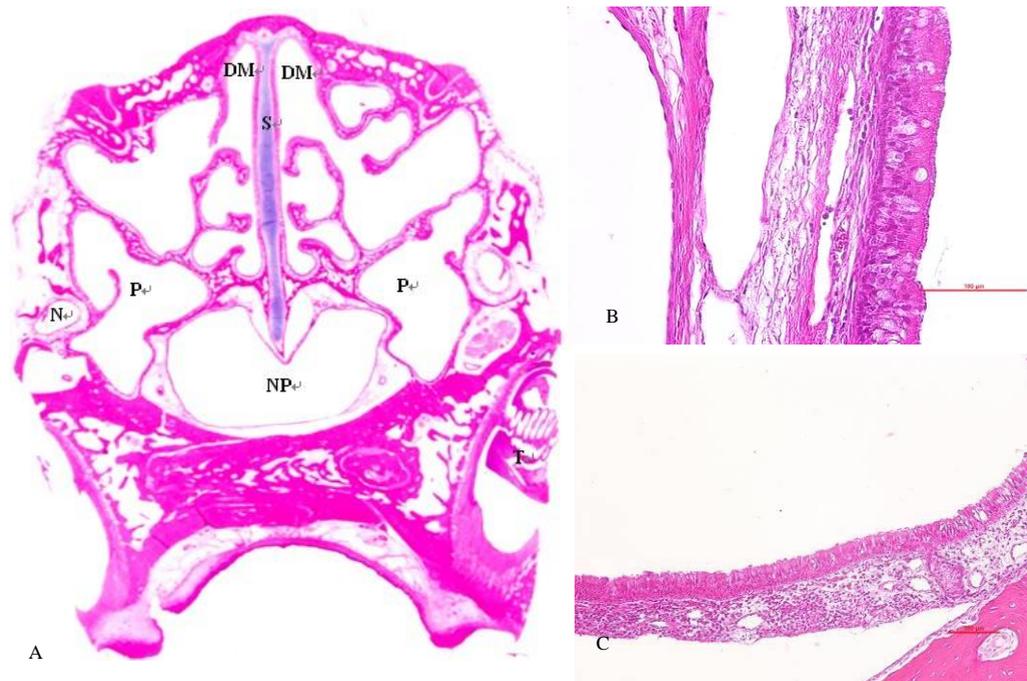
图3 家兔鼻腔切面II

Fig. 3 Nasal section II of rabbits

3.3 切面 III

紧靠第一个前臼齿前修取切面 III (见图 4-A)。鼻腔两边在这个切面上可以相连也可以不相连,取决于取材的位置是否完全形成咽导管。鼻甲覆盖有呼吸上皮和嗅上皮。鼻旁窦覆盖有呼吸上皮,为纤毛假复层柱状上皮细胞,但没有杯状细胞(见图 4-B)。筛骨鼻甲的外侧面和腹侧面以及鼻中隔的腹部覆盖着没有腺体的呼吸上皮。筛骨鼻甲的内

侧面和背侧面以及大部分鼻中隔覆盖有嗅上皮(见图 4-C)。嗅上皮为假复层柱状上皮。嗅上皮的固有层有明显的神经束、腺体和血管。鼻中隔中偶尔可见 NALT, 主要位于呼吸上皮到嗅上皮的转化处以及鼻咽管的黏膜中。鼻咽管内衬纤毛假复层柱状上皮, 含有杯状细胞。鼻泪管横向位于这个切面, 被覆单层柱状上皮, 其固有层有很多血管。鼻泪管的腹侧是第一上前臼齿的根部。



A-兔鼻腔横切面 HE 染色切片:DM-背侧鼻腔;P-鼻旁窦;NP-鼻咽管;N-鼻泪管;S-鼻中隔;T-牙。B、C-黏膜上皮组织:B-呼吸上皮(鼻旁窦处);C-嗅上皮过渡到呼吸上皮(背侧鼻腔处)

A-HE staining sections of rabbit nasal cross section: DM-dorsal nasal cavity; P-paranasal sinus; NP-nasopharynx tube; N-nasolacrimal duct; S-nasal septum; T-teeth. B and C-epithelium: B-respiratory epithelium (paranasal sinus); C-olfactory epithelium to respiratory epithelium (dorsal nasal cavity)

图 4 家兔鼻腔切面 III

Fig. 4 Nasal section III of rabbits

3.4 切面 IV

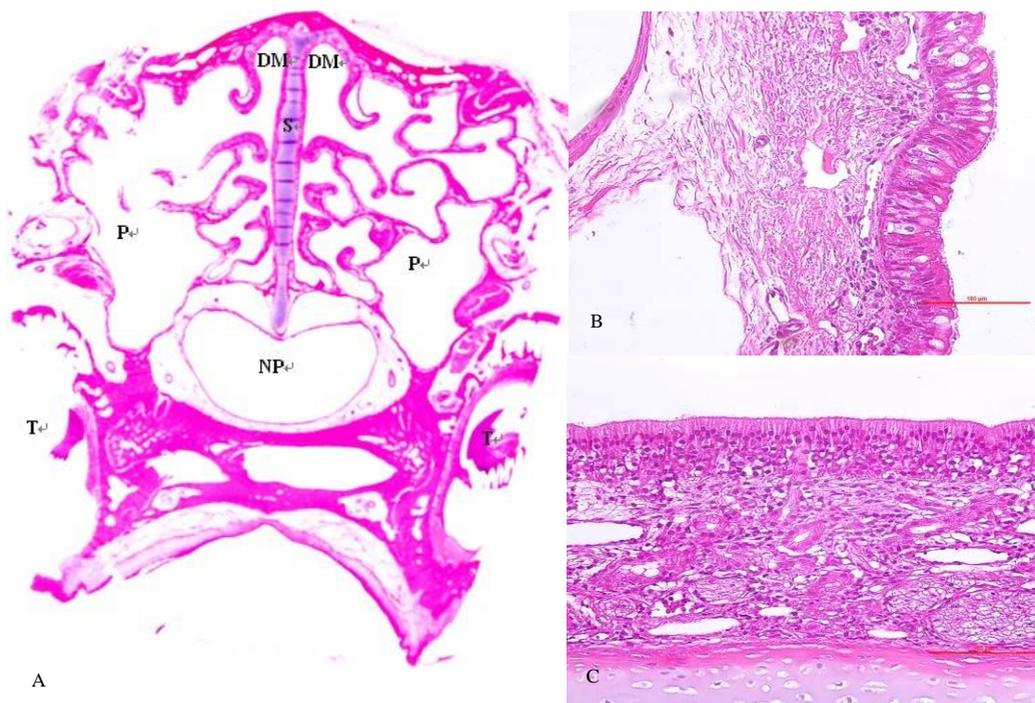
紧靠第一上前臼齿前修取切面 IV (见图 5-A)。第一切牙的根部位于鼻咽管的侧面。腹侧完全由鼻咽管占据,与鼻腔不相通。鼻咽管被覆假复层纤毛呼吸上皮含有杯状细胞(见图 5-B)。鼻旁窦被覆纤毛呼吸上皮但没有杯状细胞,固有层中有许多腺体。鼻中隔和大部分筛骨鼻甲被覆嗅上皮(见图 5-C)。嗅上皮的固有层由许多大的、神经纤维束组成,没有腺体和血管。鼻咽黏膜和呼吸至嗅上皮的过渡区域中存在 NALT。在这个切面的背侧部有时可见大脑的嗅叶。

4 讨论

鼻腔在结构和功能上都非常复杂,它包括嗅觉、加湿、过滤空气等。吸入性毒性研究中鼻

腔是最常见的诱发病变部位^[10]。本研究的目的是摸索家兔鼻腔连续切片方法,用于吸入性毒性研究中的病理学评价^[3,11]。家兔鼻腔组织成分复杂,脱钙时要求非常高,既需要对骨组织彻底脱钙,也需要尽可能地降低对肌肉、脂肪、结缔组织等的破坏。因此,本研究采用甲酸脱钙液,并且浓度为 50% 时脱钙的效果最佳。此外,在更换固定液以及脱钙液时需要注意的是动物鼻腔里可能会有气泡,需要彻底排空,以避免影响鼻腔内部的脱脂和脱钙,可选用注射器直接注入少量固定液或脱钙液。

组织学评估依赖于病理制片的一致性,因此准确地根据鼻腔表面的标志物进行组织切取非常重要。家兔鼻腔切面 I 和切面 II 的取材标准与大鼠相类似,分别位于上切牙乳头处和第一腭嵴处。但组



A-兔鼻腔横切面HE染色切片:DM-背侧鼻腔;P-鼻旁窦;NP-鼻咽管;S-鼻中隔;T-牙。B、C-黏膜上皮组织:B-呼吸上皮(鼻咽管处);C-嗅上皮(鼻中隔处)

A-HE staining sections of rabbit nasal cross section: DM-dorsal nasal cavity; P-paranasal sinus; NP-nasopharynx tube; S-nasal septum; T-teeth. B and C-epithelium: B-respiratory epithelium (at nasopharynx duct); C-olfactory epithelium (nasal septum)

图5 家兔鼻腔切面IV

Fig. 5 Nasal section IV of rabbits

织形态与大鼠不同,家兔鼻腔切面I主要被覆鳞状上皮和极少的移行上皮,与切牙前大鼠鼻子的颅侧面相似。大鼠吸入性毒性实验中通常不对此部位进行评价^[5,11]。家兔鼻子腹侧的黏膜与覆盖鼻孔外表的黏膜相连,内衬高度角化的鳞状上皮。与其他实验动物不同,家兔的这种黏膜含有毛囊,人的鼻腔也含有毛囊^[4]。家兔鼻腔切面I有明显的第二种鳞状上皮(较薄的4到6层鳞状上皮细胞),这与家兔和其他实验动物前庭被覆的鳞状上皮相类似。推荐切面I用于评价耐药性鳞状上皮,或仅用于评价供试品直接滴入鼻孔的刺激性研究。家兔鼻腔切面I中的移行上皮相对较薄,更接近猴子鼻腔而非啮齿类动物。但两者移行上皮的位置不同,家兔的移行上皮局限于鼻腔侧壁,而猴子的移行上皮出现在前鼻腔的侧壁和隔中隔^[12]。

家兔鼻腔切面II则显示了独特的组织学特征,前庭下方和梨鼻器周围有明显的透明软骨盘和环。另外家兔特有的组织学特征是具有复杂的多分枝的上颌骨鼻甲。其他小型实验动物也有复杂的上颌骨鼻甲,但分支较少^[4]。家兔和啮齿类动物的上颌骨鼻甲可通过良好的过滤、吸收和清

除空气中传播的颗粒和气体来保护底部的呼吸道,比人类的鼻腔简单^[4]。位于家兔鼻中隔和鼻咽的黏膜中的含有杯状细胞的呼吸上皮贯穿于切面II至IV^[7]。

家兔鼻腔切面III和IV中的嗅上皮在细胞形态上与其他种属动物的相类似^[3,6-7]。嗅觉敏锐动物如犬和大小鼠等具有更高水平的嗅觉功能,因此鼻甲结构复杂,并且嗅觉区域非常大。家兔与犬和大小鼠类似,其嗅上皮占据鼻腔的大部分^[4]。

梨鼻骨组织是成对的管状憩室,位于大多哺乳动物(如狗、猫、啮齿类动物和家兔)鼻中隔的腹侧^[12],但是灵长类动物中其发育不好,成年人中则没有^[13]。大鼠梨鼻骨组织见于切面I,而家兔的仅见于切面II^[2,5-6]。与大鼠相似,呼吸和嗅上皮构成了家兔的梨鼻骨组织^[5]。在其他种属动物,正常鼻腔中未见嗜性/中性粒细胞,或其他迁移到梨鼻骨黏膜的炎性细胞,或者形成微脓肿的炎性细胞。虽然家兔梨鼻骨黏膜中嗜性活动和脓肿形成的原因还不清楚,但佐剂经鼻灌注可能是一个原因。

机体内黏膜相关淋巴组织为弥漫性分布在黏膜下聚集的无被膜淋巴组织,这些淋巴组织参与

局部的免疫应答。呼吸性毒性研究中支气管相关淋巴组织(Bronchus associated lymphoid tissue, BALT)和NALT是关注的重点^[14-15]。大多数实验动物种属中,NALT位于鼻咽管的入口。大鼠NALT局限于鼻咽管开口处的外侧壁的腹侧面^[16]。猴子的NALT比大鼠的多,位于近鼻咽的外侧壁和鼻中隔^[12]。BALT也出现在家兔的鼻中,大多位于前庭、鼻咽管黏膜和呼吸至嗅上皮的过渡区中。

本研究根据家兔易辨认的解剖标志物上切牙、腭嵴、第一上前臼齿和第一上臼齿确定病理制片的4个切面,完整体现了鼻腔组织形态学的特点,涵盖所有4种类型上皮细胞、鼻泪管、梨鼻器、鼻相关的淋巴组织等结构。不同切面中不同的上皮类型的组成提示了鼻腔不同部位功能的差异,后续将开展4个切面的移行上皮、呼吸上皮以及嗅上皮分布比例的研究,这将为客观准确评估每个切面的上皮损伤程度提供背景性数据。规范性的家兔鼻腔病理制片将为吸入性毒性研究或鼻腔给药研究中鼻腔的病理学评价提供基础,并且深入了解不同物种鼻腔的解剖学及组织学特征的差异,也为药物或生物制品安全性评价中鼻腔的科学性评估提供支持和帮助。

参考文献

- [1] Greaves P, 王和枚, 吕建军, 等. 临床前毒性试验的组织病理学: 药物安全性评价中的解释与相关性 [M]. 北京: 北京科学技术出版社, 2018.
- [2] Alvites R D, Caseiro A R, Pedrosa S S, et al. The nasal cavity of the rat and mouse-source of mesenchymal stem cells for treatment of peripheral nerve injury [J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2018, 301(10): 1678-1689.
- [3] Boorman G A, Morgan K T, Uraih L. et al. *In Pathology of the Fischer Rat* [M]. San Diego, CA Academic Press, 1990.
- [4] Harkema J R, Carey S A, Wagner J G. The nose revisited: A brief review of the comparative structure, function, and toxicology pathology of the nasal epithelium [J]. *Toxicol Pathol*, 2006, 34(3): 252-269.
- [5] Mery S, Gross E A, Joyner D R, et al. Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice [J]. *Toxicol Pathol*, 1994, 22(4): 353-372.
- [6] Uraih L C, Maronpot R R. Normal histology of the nasal cavity and application of special techniques [J]. *Environ Health Perspect*, 1990, 85: 187-220.
- [7] Mery S, Gross E A, Joyner D R, et al. Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice [J]. *Toxicol Pathol*, 1994, 22(4): 353-372.
- [8] Chamanza R, Taylor I, Gregori M, et al. Normal anatomy, histology, and spontaneous pathology of the nasal cavity of the cynomolgus monkey (*macaca fascicularis*) [J]. *Toxicol Pathol*, 2016, 44(5): 636-654.
- [9] Pereira M E, Macri N P, Creasy D M. Evaluation of the rabbit nasal cavity in inhalation studies and a comparison with other common laboratory species and man [J]. *Toxicol Pathol*, 2011, 39(5): 893-900.
- [10] Chamanza R, Wright J A. A review of the comparative anatomy, histology, physiology and pathology of the nasal cavity of rats, mice, dogs and non-human primates. Relevance to inhalation toxicology and human health risk assessment [J]. *J Comp Pathol*, 2015, 153(4): 287-314.
- [11] Xi J, Si X A, Kim J, et al. Anatomical details of the rabbit nasal passages and their implications in breathing, air conditioning, and olfaction [J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2016, 299(7): 853-868.
- [12] Chamanza R, Taylor I, Gregori M, et al. Normal anatomy, histology, and spontaneous pathology of the nasal cavity of the cynomolgus monkey (*macaca fascicularis*) [J]. *Toxicol Pathol*, 2016, 44(5): 636-654.
- [13] Harkema J R. Comparative aspects of the nasal airway anatomy: Relevance to inhalation toxicology [J]. *Toxicol Pathol*, 1991, 19(4 Pt 1): 321-336.
- [14] Elmore S A. Enhanced histopathology of the immune system: a review and update [J]. *Toxicol Pathol*, 2012, 40(2): 148-156.
- [15] Elmore S A. Enhanced histopathology evaluation of lymphoid organs [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1803: 147-168.
- [16] Haley P J. Species differences in the structure and function of the immune system [J]. *Toxicology*, 2003, 188(3): 49-71.