人扁桃体隐窝上皮细胞的分离、原代培养与鉴定

邢 娇[1],黄 群[2],李 琦[2],金 玉[1*]

[1]南京医科大学附属儿童医院消化科,[2]耳鼻喉科,江苏 南京 210008

[摘 要] **目的:**建立高效、稳定的人扁桃体隐窝上皮细胞原代培养方法。**方法:**收集80例3~5岁儿童手术切除的扁桃体组织,分别采用组织块贴壁法和Ⅱ型中性蛋白酶联合0.25%胰蛋白酶-EDTA消化法提取扁桃体隐窝上皮细胞并比较两种方法的提取效果;应用无血清角化细胞培养基进行细胞纯化及原代培养;用相差显微镜观察细胞形态和生长特点、免疫细胞化学染色及免疫荧光技术鉴定细胞来源。**结果:**Ⅱ型中性蛋白酶联合消化法在分离扁桃体隐窝上皮细胞成功率、细胞密度以及细胞融合时间方面均高于组织块贴壁法($P < 0.05$),细胞接种后第2天开始贴壁,外观呈现多边形,岛状生长,培养12 d左右,细胞连成单层,呈现铺路石样生长。免疫细胞化学染色显示广谱角蛋白表达阳性,波形蛋白阴性;免疫荧光鉴定角蛋白8/18染色阳性。**结论:**应用Ⅱ型中性蛋白酶联合0.25%胰蛋白酶-EDTA消化法以及无血清角化细胞培养基可建立高效稳定的人扁桃体隐窝上皮细胞原代分离方法和体外培养体系。

[关键词] 人扁桃体隐窝上皮细胞;原代培养;Ⅱ型中性蛋白酶;无血清角化细胞培养基

[中图分类号] Q813.1+1 [文献标志码] A [文章编号] 1007-4368(2018)03-294-05

doi:10.7655/NYDXBNS20180303

Isolation, primary culture and identification of human palatine tonsil crypt epithelial cells

Xing Jiao[1], Huang Qun[2], Li Qi[2], Jin Yu[1*]

[1]Department of Gastroenterology, [2]Department of Otolaryngology, the Affiliated Children's Hospital of NMU, Nanjing 210008, China

[**Abstract**] **Objective**: To establish stable and efficient method for primary culture of human palatine tonsil crypt epithelial cells. **Methods**: Eighty palatine tonsil tissues were derived from children aged from 3 to 5 undergoing surgical removal of tonsil. Tissue piece method and combined type Ⅱ dispase and 0.25% trypsin-EDTA digestion method were used to separate primary palatine tonsil crypt epithelial cells, and the effectiveness of two isolation methods were compared. Serum-free Keratinocyte medium were applied to purification and primary cultivation. Growth feature and morphology of primary cells were observed under an inverted microscope. Immunofluorescence and immunocytochemistry technique were used to identify the specification of primary cell. **Results**: The success rate, density and primary cell fusion time of the dispase digestion group were all higher than those of the tissue piece group ($P < 0.05$). The primary tonsil crypt epithelial cell began adherent growth after 2 days isolation from the tonsil tissues. The shape of cell was polygon under microscope, and cells connected like islands. Primary cells formed confluent monolayers after 12 days' cultivation, it seemed like paving stone. Pancytokeratin positive staining was determined by immunocytochemistry. The specific cytokeratin 8/18 staining was positive after immunofluorescence identification. **Conclusion**: It is an efficient and repeatable method for primary isolation and cultivation of human palatine tonsil crypt epithelial cells by using combined type Ⅱ dispase and 0.25% trypsin-EDTA digestion method with serum-free keratinocyte medium.

[**Key words**] human palatine tonsil crypt epithelial cells; primary culture; type Ⅱ dispase; serum-free keratinocyte medium

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(03): 294-298, 342]

扁桃体位于消化道和呼吸道的交汇处,是一种黏膜相关淋巴组织,具有复杂而特殊的隐窝管道系统,是产生免疫应答的重要场所[1-2],其中扁桃体隐

[基金项目] 国家自然科学基金(81672020)

*通信作者(Corresponding auther),E-mail:jinyuldyy@163.com

窝上皮细胞是该器官最先接触抗原,潴留抗原,并产生免疫应答的部位,是扁桃体行使免疫功能的重要组织屏障,在扁桃体发育和扁桃体功能调节中具有重要作用[3-5]。因此,从扁桃体中提取高纯度高产量的隐窝上皮细胞并成功建立体外培养体系,能够为研究隐窝上皮细胞功能及与扁桃体相关疾病建立合适的细胞模型。目前国内关于人扁桃体隐窝上皮细胞的原代培养报道较少,有国外学者应用Ⅱ型中性蛋白酶联合胰蛋白酶成功分离出人扁桃体隐窝上皮细胞[6-7]。本研究尝试采用组织块贴壁法(组织块法)和Ⅱ型中性蛋白酶联合0.25%胰蛋白酶-EDTA消化法(酶消化法)分别提取人扁桃体隐窝上皮细胞,比较不同方法的提取效果,探讨分离提取人扁桃体隐窝上皮细胞的最佳方法及原代培养的最适条件。

1　材料和方法

1.1　材料

收集南京医科大学附属儿童医院耳鼻喉科确诊单纯性扁桃体肥大儿童手术切除的扁桃体组织80例,患儿年龄3~5岁,取材前经伦理委员会同意。扁桃体离体后于无菌条件下立即切取游离面组织,置于提前预冷含青链霉素的1×PBS缓冲液中,30 min内4 ℃转运至实验室进行操作。

Ⅱ型中性蛋白酶(dispaseⅡ)、0.25%胰蛋白酶-EDTA、无血清角化细胞培养基(serum-free keratinocyte medium,K-SFM)、胎牛血清(fetal bovine serum,FBS,Gibco公司,美国);鼠抗人广谱细胞角蛋白抗体(pancytokeratin)、鼠抗人角蛋白8/18抗体(cytokeratin 8/18,CK8/18,Abcam公司,美国);兔抗人波形蛋白(vimentin)抗体、HRP标记的山羊抗兔鼠通用二抗(谷歌生物公司);异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate,FITC)标记的山羊抗小鼠IgG、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole,DAPI,杭州碧云天公司);无菌细胞爬片(Thermo fisher公司,美国)。

1.2　方法

1.2.1　扁桃体隐窝上皮细胞的分离与原代培养

用提前预冷含双抗的1×PBS缓冲液将扁桃体组织标本清洗数次,修剪掉肉眼可见的血管及结缔组织,根据重量将每块扁桃体组织标本均分为两等份,两部分除质量相等外,形状、血管分布、组织活性等均无明显差异,并随机采用两种不同的原代提取方法进行处理。

组织块法:将扁桃体组织移入无菌青霉素小瓶,用眼科剪剪碎成肉末状并用牙科探针将组织碎块平铺到25 cm^2培养瓶,每块间距5 mm,倒置放入CO_2培养箱,37 ℃培养3~6 h后加入1 mL K-SFM培养基,完全浸润组织块即可,前4 d每天更换培养基,以后每2~3 d换液。

酶消化法:将扁桃体组织剪成3 cm×3 cm组织块,置于用1×PBS缓冲液配制的50 mL混合消化液(含2 mg/mLⅡ型中性蛋白酶)中,4 ℃摇床震荡消化16~18 h,将消化后组织块的上皮与上皮下组织分离,并剪成碎片,置于0.25%胰酶中,37 ℃消化5 min,用含10% FBS的K-SFM培养基中止消化,1 000 r/min离心5 min,弃上清,用K-SFM培养基充分吹打重悬,接种于25 cm^2培养瓶,置于细胞培养箱进行原代培养,48 h后首次更换培养基,以后每2~3 d换液。培养期间用倒置相差显微镜观察细胞的生长特点及细胞密度达80%~90%时所需生长天数。

1.2.2　传代培养与冻存

传代培养:当原代细胞密度融合至80%~90%,弃去旧培养基,1×PBS漂洗2次,加入1 mL 0.25%胰酶,37 ℃消化5 min,倒置相差显微镜下观察细胞逐渐变圆、变亮,拍打出现流沙样运动时,立即加入2 mL含10% FBS的K-SFM培养基终止消化,1 000 r/min离心4 min,弃上清,1∶2进行传代培养。细胞冻存:细胞消化离心后加入1.5 mL的细胞冻存液(含60%K-SFM培养基、30%胎牛血清、10%DMSO)重悬沉淀,使每个冻存管的细胞量大于5×10^5个/mL,将冻存管装入梯度冻存盒,-80 ℃冰箱过夜,次日转入液氮中长期保存。

1.2.3　扁桃体隐窝上皮细胞的形态学观察与HE染色

从扁桃体隐窝上皮细胞接种后的第2天开始,用倒置相差显微镜观察细胞生长的不同阶段及变化(贴壁、增殖、融合、成片);将传代后的扁桃体隐窝上皮细胞接种于12孔板细胞爬片中,当细胞密度融合达50%~60%,用4%多聚甲醛室温固定15 min,分别行苏木素及伊红染色,并于光学显微镜下观察细胞形态。

1.2.4　免疫细胞化学技术鉴定广谱细胞角蛋白表达

选取广谱细胞角蛋白抗体为扁桃体隐窝上皮细胞鉴定标志物,成纤维细胞标志物波形蛋白抗体为阴性对照,将扁桃体隐窝上皮细胞接种于12孔板细胞爬片中,当细胞密度融合达50%~60%,用4%多聚甲醛室温固定15 min,0.1% Triton X-100通透化5 min,5% BSA 37 ℃封闭1 h,分别加入广谱细

胞角蛋白抗体和波形蛋白抗体，4 ℃孵育过夜，加入HRP标记的二抗，室温孵育50 min，DAB显色，苏木精复染，中性树胶封片，以胞质呈棕黄色为阳性染色细胞，随机选取5个高倍视野，计数阳性细胞和同一视野下细胞总数，扁桃体隐窝上皮细胞的纯度(%)=阳性细胞数/细胞总数×100%，实验独立重复3次。

1.2.5 免疫荧光技术鉴定角蛋白8/18表达

选取扁桃体隐窝上皮细胞特异性角蛋白8/18抗体进行免疫荧光鉴定，将扁桃体隐窝上皮细胞接种于12孔板细胞爬片中，当细胞密度融合达50%~60%，用4%多聚甲醛固定15 min，0.1% Triton X-100通透化5 min，5% BSA 37 ℃封闭1 h，加入抗人角蛋白8/18抗体，4 ℃孵育过夜，避光加入结合FITC的二抗稀释液，37 ℃孵育1 h，PBS清洗3次，避光加入DAPI，常温孵育5 min，最后加入抗荧光淬灭剂封片，在奥林巴斯激光共聚焦显微镜下观察。

1.3 统计学方法

采用SPSS23.0统计软件进行数据处理分析，所有数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示，两种方法提取的细胞密度、细胞融合时间的比较采用配对样本t检验，成功率的比较采用χ^2检验。检验水准α=0.05。

2 结 果

2.1 组织块法和酶消化法提取扁桃体隐窝上皮细胞效果比较

共收集80例扁桃体组织(19例用2种方法均提取成功，24例单用酶消化法提取成功，37例用2种方法均提取失败)，酶消化法较组织块法提取原代细胞的成功率、所得细胞密度及细胞融合时间均较高，差异有统计学意义(P< 0.05，表1)。

表1 组织块法和酶消化法提取效果的比较

Table 1 Comparison of isolation effects of tissue explant method and enzyme digestion method

(n=19，$\bar{x} \pm s$)

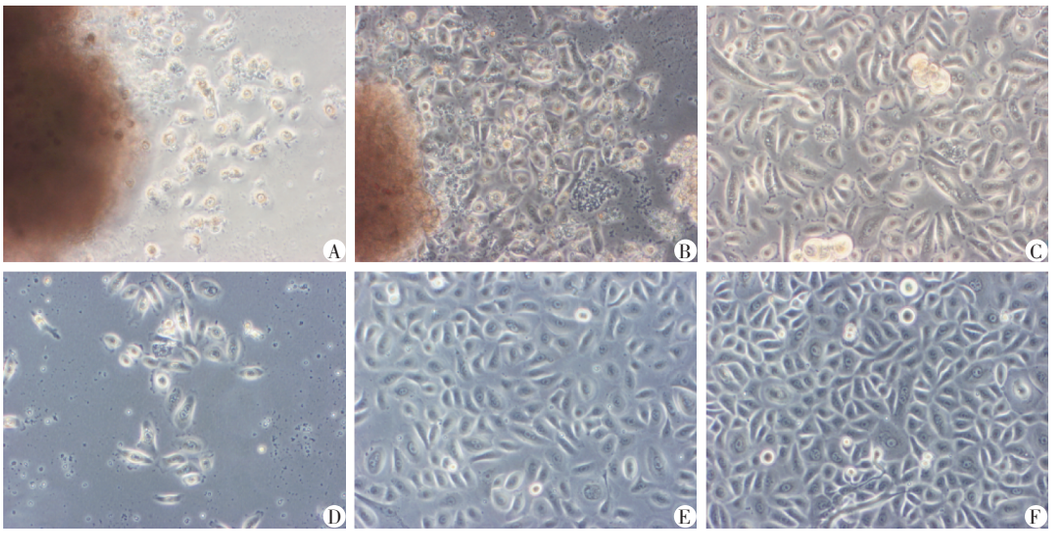
组别	成功例数[n(%)]	细胞密度(×10^5个/mL)	细胞融合时间(h)
组织块法	19(23.75)	1.80 ± 0.38	365 ± 16
酶消化法	43(53.75)	4.52 ± 1.14	280 ± 29
$\chi^2(t)$值	15.168	−9.809	11.719
P值	< 0.001	< 0.001	< 0.001

2.2 扁桃体隐窝上皮细胞的生长特点及形态学观察

2.2.1 倒置相差显微镜观察

组织块法：扁桃体组织块贴壁后4 d左右发现边缘有少量隐窝上皮细胞爬出(图1A)，培养9~10 d组织块周围大量隐窝上皮细胞聚集，细胞多呈椭圆形，轮廓不清，折光性强(图1B)，培养15 d左右细胞接近融合(图1C)。

酶消化法：提取的扁桃体隐窝上皮细胞接种后2 d可贴壁生长，细胞轮廓清晰，胞质均匀透亮，细胞核清晰可见(图1D)，5~7 d细胞开始逐渐变大、数目开始增多，呈不规则多边形(图1E)，10~12 d细胞接近完全融合，铺满皿底(图1F)。



A、B、C分别为组织块法细胞培养第5天、第10天以及第15天；D、E、F分别为酶消化法细胞培养第2天、第5天以及第10天。

图1 组织块法和酶消化法提取人扁桃体隐窝上皮细胞的生长特点(×100)

Figure 1 Growth feature of human tonsillar crypt epithelial cells cultured by enzyme digestion method and tissue explant method(×100)

2.2.2　HE染色

HE染色结果显示,两种方法提取的原代细胞均呈现不规则的鹅卵石状或铺路石状(图2),具有明显的上皮细胞形态学特征。

2.3　扁桃体隐窝上皮细胞的鉴定

2.3.1　免疫细胞化学鉴定

鉴定结果显示胞核蓝染,胞浆呈棕黄色为染色阳性细胞(图3),两种方法提取的扁桃体隐窝上皮细胞95%以上广谱角蛋白染色阳性,成纤维细胞标志蛋白波形蛋白染色阴性,两种方法提取的原代细胞纯度均较高,成纤维细胞去除效果良好。

2.3.2　免疫荧光鉴定

免疫荧光结果显示绿色荧光标记为角蛋白8/18,蓝色荧光标记为细胞核,两种方法提取的扁桃体隐窝上皮细胞特异性角蛋白8/18染色阳性比率均>95%(图4),结果进一步证明本试验所提取的原代细胞纯度较好。

3　讨　论

扁桃体位于呼吸道和消化道的共同入口处,是一个重要的黏膜免疫器官,是经口咽感染的病原微生物侵入机体的重要门户,拥有独特而复杂的隐窝结构,其隐窝上皮呈海绵样结构,大量淋巴细胞浸润其中,形成隐窝上皮与淋巴细胞共生的黏膜免疫防御系统,正是这种独特的结构使扁桃体隐窝上皮细胞不仅最先接触和摄取病原微生物,还能够进一步启动机体对病原微生物最早的免疫识别和免疫应答,发挥了协调和指挥后续免疫分子、免疫细胞乃至免疫器官应答的重要作用[1-5]。人们以往只关注病原微生物中细菌对扁桃体组织的作用,却往往忽视了扁桃体在病毒感染过程中发挥的重要作用[8-9],有研究报道在肠道病毒71型(Enterovirus 71,EV71)

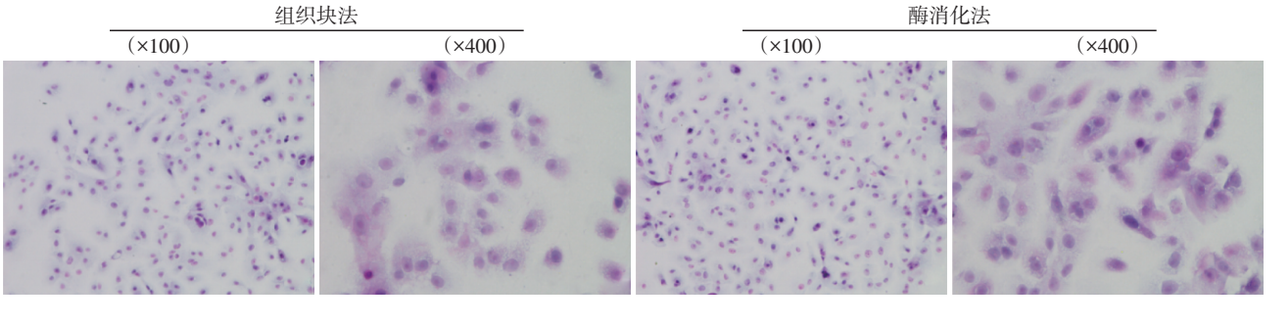


图2　人扁桃体隐窝上皮细胞HE染色

Figure 2　Cellular morphology of human tonsillar crypt epithelial cells by hematoxylin-eosin(HE) staining

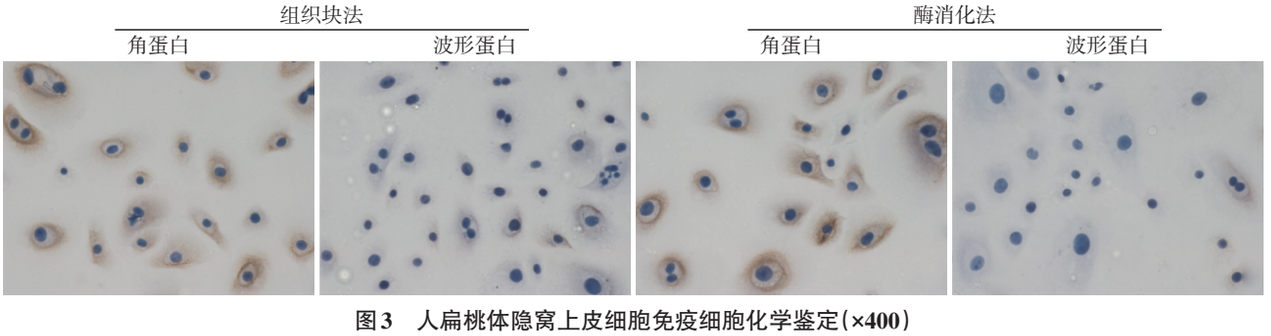


图3　人扁桃体隐窝上皮细胞免疫细胞化学鉴定(×400)

Figure 3　Immunocytochemical staining of human tonsillar crypt epithelial cells(×400)

感染致死的儿童尸检标本中,扁桃体隐窝上皮细胞可能是EV71感染进入人体且支持EV71复制的敏感细胞[10-11],我们推测人扁桃体隐窝上皮细胞很可能是多种经口咽感染的病毒复制的初始靶细胞,病毒经口咽侵入人体后,首先在扁桃体隐窝上皮细胞完成复制建立稳定感染并扩散到身体其他部位从而引起临床症状[12-13]。因此,建立高效、稳定的人扁桃体隐窝上皮细胞的原代培养体系,不仅为我们进一步研究经口咽感染的病原体与扁桃体的相互作用及可能的发病机制提供了十分有效的原代细胞模型,还能够更好保留细胞的遗传特征和生物学特性,避免了体内研究所受诸多因素的干扰,使研究结果更加可靠。

本研究分别采用组织块法和酶消化法进行人扁桃体隐窝上皮细胞的提取,并比较了两种方法的提取效果。组织块法理论上简单易行、操作方便[14],但该

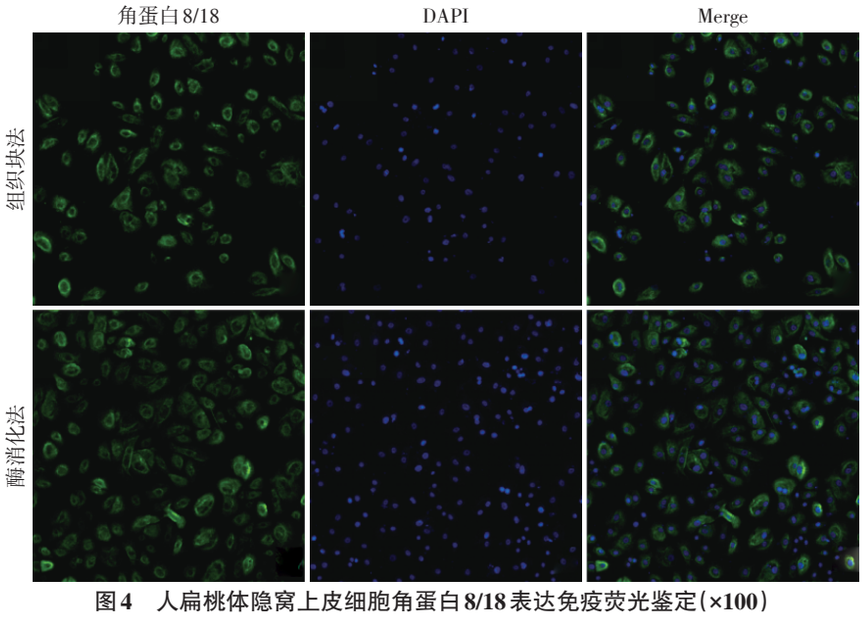


图4 人扁桃体隐窝上皮细胞角蛋白8/18表达免疫荧光鉴定(×100)

Figure 4 Analysis of evaluation of cytokeratin 8/18 expression in human tonsillar crypt epithelial cells(×100)

法原代细胞培养周期较长,细胞需要4~5 d才能从扁桃体组织块周围萌出,且并非每块扁桃体组织都能萌出细胞,组织块的存在导致细胞极易污染,最终获取原代细胞数量较少,培养成功率比较低;Ⅱ型中性蛋白酶联合0.25%胰蛋白酶的分步消化法,首先利用中性蛋白酶能够选择性地分离上皮和上皮下组织,获得黏连松散的单一上皮细胞层,且该作用温和、有效,充分保存了扁桃体隐窝上皮细胞活力以及细胞连接,再利用胰蛋白酶破坏细胞间桥粒和半桥粒,即可获取单个隐窝上皮细胞,且获取的细胞数量较多、生长较快,24 h后开始贴壁,10 d左右即可传代,培养周期明显短于组织块法,培养成功率较高。

传统的细胞培养方法一般使用含10%~20%胎牛血清的培养基,能够提供细胞增殖所需的营养成分,但现有研究发现血清成分复杂,除含有促进细胞生长的因子外,还含有一些细胞毒性物和抑制物,容易使原代上皮细胞迅速分化、衰老,很难传代[15-17]。此外,在扁桃体隐窝上皮细胞分离过程中,会残留一些成纤维细胞,这些成纤维细胞在含有血清的培养基中具有生长优势,可能抑制上皮细胞生长,因此本研究采用上皮细胞专用无血清培养基K-SFM,其除了含有细胞生长所需的常规营养物质,还添加了表皮生长因子、牛脑垂体提取物等适合上皮来源细胞的生长因子[18-19],可有效降低成纤维细胞的污染率,特异性地促进上皮细胞的贴壁与生长,降低了纯化难度,使培养过程更为简单,从而获得大量纯度较高的扁桃体隐窝上皮细胞,并可成功连续传代培养。

在本实验条件下,组织块贴壁法和Ⅱ型中性蛋白酶联合0.25%胰蛋白酶-EDTA消化法均可成功分离出人原代扁桃体隐窝上皮细胞,其中,Ⅱ型中性蛋白酶联合0.25%胰蛋白酶-EDTA消化法能够分离出高产量、高活性的人原代扁桃体隐窝上皮细胞,为后续研究经口咽感染的病原体与扁桃体的作用机制奠定了基础。

[参考文献]

[1] Jović M, Avramović V, Vlahović P, et al. Ultrastructure of the human palatine tonsil and its functional significance [J]. Rom J Morphol Embryol, 2015, 56(2): 371-377

[2] Nave H, Gebert A, Pabst R. Morphology and immunology of the human palatine tonsil [J]. Anat Embryol (Berl), 2001, 204(5): 367-373

[3] Go M, Kojima T, Takano K, et al. Expression and function of tight junctions in the crypt epithelium of human palatine tonsils [J]. J Histochem Cytochem, 2004, 52(12): 1627-1638

[4] Koshiba S, Ichimiya S, Nagashima T, et al. Tonsillar crypt epithelium of palmoplantar pustulosis secretes interleukin-6 to support B-cell development via p63/p73 transcription factors [J]. J Pathol, 2008, 214(1): 75-84

[5] Clark MA, Wilson C, Sama A, et al. Differential cytokeratin and glycoconjugate expression by the surface and crypt epithelia of human palatine tonsils [J]. Histochem

(下转第342页)

of atherosclerosis and treatments[J]. Int J Cardiol,2013,168(1):132-138

[13] Rubinstein A, Izkhakov E. Lipoprotein associated phospholipase A2[J]. Harefuah,2011,150(2):136-140

[14] Jabor B, Choi H, Ruel I, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A(2)(Lp-PLA(2))in acute coronary syndrome:relationship with low-density lipoprotein cholesterol[J]. Can J Cardiol,2013,29(12):1679-1686

[15] Morrison M, Van Der Heijden R, Heeringa P, et al. Epicatechin attenuates atherosclerosis and exerts anti-inflammatory effects on diet-induced human-CRP and NFκB *in vivo*[J]. Atherosclerosis,2014,233(1):149-156

[16] Nazerian P, Morello F, Vanni S, et al. Combined use of aortic dissection detection risk score and D-dimer in the diagnostic workup of suspected acute aortic dissection [J]. Int J Cardiol,2014,175(1):78-82

[17] Lowe GD, Rumley A, Mcmahon AD, et al. Interleukin-6, fibrin D-dimer, and coagulation factors Ⅶ and Ⅻa in prediction of coronary heart disease[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2004,24(8):1529-1534

[18] 李 明. 血清Lp-PLA2,hs-hs-CRP和D-二聚体在冠心病患者冠脉病变程度中的评估价值[J]. 重庆医学,2015(9):1215-1217

[19] Ge PC, Chen ZH, Pan RY, et al. Synergistic effect of lipoprotein-associated phospholipase a2 with classical risk factors on coronary heart disease:a multi-ethnic study in China[J]. Cell Physiol Biochem,2016,40(5):953-968

[20] 赵娜娜,洪 梅,鲁 翔,等. 脂蛋白磷脂酶A2基因I198T和R92H多态性与中国汉族人群冠心病的相关性[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2013,33(1):73-77

[21] 张梦遥,洪 梅,鲁 翔. 脂蛋白相关磷脂酶A2基因I198T和V279F多态性与冠状动脉粥样硬化病变程度的相关性[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2015,35(3):380-384

[收稿日期] 2017-03-22

(上接第298页)

Cell Biol,2000,114(4):311-321

[6] Spanos WC, Geiger J, Anderson ME, et al. Deletion of the PDZ motif of HPV16 E6 preventing immortalization and anchorage-independent growth in human tonsil epithelial cells[J]. Head Neck,2008,30(2):139-147

[7] Vacharaksa A, Asrani AC, Gebhard KH, et al. Oral keratinocytes support non-replicative infection and transfer of harbored HIV-1 to permissive cells[J]. Retrovirology,2008,5(1):66

[8] Newman CM, Dudley DM, Aliota MT, et al. Oropharyngeal mucosal transmission of Zika virus in rhesus macaques[J]. Nat Commun,2017,8(1):169

[9] Assadian F, Sandström K, Bondeson K, et al. Distribution and molecular characterization of human adenovirus and Epstein-Barr virus infections in tonsillar lymphocytes isolated from patients diagnosed with tonsillar diseases[J]. PLoS One,2016,11(5):e0154814

[10] He Y, Ong KC, Gao Z, et al. Tonsillar crypt epithelium is an important extra-central nervous system site for viral replication in EV71 encephalomyelitis[J]. Am J Pathol,2014,184(3):714-720

[11] Xie GC, Guo NJ, Grénman R, et al. Susceptibility of human tonsillar epithelial cells to enterovirus 71 with normal cytokine response[J]. Virology,2016,494(4):108-118

[12] 鄢慧民. 黏膜上皮细胞:病毒侵染与机体免疫的初始交汇处[J]. 生命科学,2016(2):248-257

[13] Jartti T, Palomares O, Waris M, et al. Distinct regulation of tonsillar immune response in virus infection[J]. Allergy,2014,69(5):658-667

[14] 王林林,杜 为,张 健,等. 优化贴壁法人皮肤成纤维细胞的原代培养[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2014,34(1):124-126

[15] Fan T, Li X, Li Y, et al. An improved method for primary culture of normal cervical epithelial cells and establishment of cell model *in vitro* with HPV-16 E6 gene by lentivirus[J]. J Cell Physiol,2017,4:1-8

[16] Schlaermann P, Toelle B, Berger H, et al. A novel human gastric primary cell culture system for modelling *Helicobacter pylori* infection *in vitro*[J]. Gut,2016,65(2):202

[17] Kaiser A, Willer T, Steinberg P, et al. Establishment of an *in vitro* intestinal epithelial cell culture model of avian origin[J]. Avian Dis,2017,61(2):229-236

[18] Gottipamula S, Saraswat SK, Sridhar KN. Comparative study of isolation, expansion and characterization of epithelial cells[J]. Cytotherapy,2017,19(2):263-271

[19] 胡秀娟,刘海兵,贺广湘. 人鼻黏膜上皮细胞的原代培养及传代[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2017(1):28-32

[收稿日期] 2017-09-01