

· 论 著 ·

相关炎症因子在声带黏膜损伤中的作用

王华涛¹, 张 勇², 王志颐², 江满杰², 吴明海², 潘 晗², 程 友², 陈 伟²

[摘要] 目的 通过观察相关炎症因子在不同程度炎症声带黏膜表达的差异,探讨其对声带黏膜屏障损伤的作用。

方法 将 26 例确诊伴有咽喉反流(LPR)的声带白斑且拟行手术治疗的患者随机分为质子泵抑制剂(PPI)组(口服艾司奥美拉唑镁肠溶片)和对照组(口服胃黏膜保护剂),每组 13 例,分别采集手术中及术后 8 周的声带黏膜标本。用 HE 染色对声带炎症的病理改变进行评分比较;ELISA 法测定炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 在不同程度炎症黏膜的表达水平。所有患者每月定期复查,随访时间至少为 12 个月。结果 术后 12 个月随访,对照组和 PPI 组累计复发率分别为 84.6%和 38.5%,累计复发率差异有统计学意义($P<0.05$)。PPI 组术后 8 周声带黏膜炎症病理评分均值较术中黏膜评分明显降低($P<0.01$);对照组术中声带黏膜炎症病理评分均值与术后 8 周评分均值相比,差异无统计学意义($P>0.05$)。ELISA 检测显示,PPI 组术后 8 周声带黏膜 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 表达与术中比较显著下调($P<0.01$);而对照组术中及术后 8 周声带黏膜 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 表达差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 咽喉反流物刺激声带黏膜的炎症反应可能是声带黏膜损伤的重要机制。

[关键词] 声带白斑;咽喉反流;炎症;炎症因子

[中图分类号] R764 [文献标志码] A [文章编号] 1672-271X(2017)05-0453-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1672-271X.2017.05.002

The role of related inflammatory factors in vocal mucosa damage

WANG Hua-tao¹, ZHANG Yong², WANG Zhi-yi², JIANG Man-jie², WU Ming-hai², PAN Han², CHENG You², CHEN Wei²

(1. Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Huaian Hospital, Huaian 223200, Jiangsu, China; 2. Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Region, PLA, Nanjing 210002, Jiangsu, China)

[Abstract] Objective To study the roles of related inflammatory factors in vocal cord mucosal barrier damage via probing the differential expression of these factors in vocal cord mucosa with inflammation of different degrees. Methods Twenty-six patients suffering from vocal leukoplakia accompanied with laryngopharyngeal reflux (LPR) were randomly divided into groups with or without oral administration of proton pump inhibitor (PPI), 13 cases in each group. Mucosal specimens of vocal cord were collected from all the patients during operation and at 8 weeks after operation. HE staining was used to score the pathological changes of the mucosa. ELISA was utilized to detect the levels of inflammatory factors including TNF- α , IL-1 and IL-6. Results The accumulated recurrence rates at 12 months after operation of PPI-treated group and the control group were 38.5% and 84.6% respectively, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). In the the control group, the average inflammation score evaluated by HE staining in specimens obtained 8 weeks after operation was significantly lower than those obtained during operation, and the difference was statistically significant ($P<0.01$). In the control group, the difference was statistically insignificant ($P>0.05$). As for IL-1 β , TNF- α and IL-6, their expression in the specimens of 8 weeks after operation in the PPI-treated group were down-regulated when compared with those in the specimens obtained during operation (all

$P<0.05$), while their differences in the control group were statistically insignificant (all $P>0.05$). Conclusion The possible mechanism of vocal mucosal barrier damage in vocal leukoplakia accompanied with LPR maybe the vocal mucosal inflammation induced by refluxed materials.

[Key words] Vocal leukoplakia; Laryngopharyngeal reflux; Inflammation; Inflammatory factor

基金项目: 江苏省自然科学基金(BK20161388)

作者单位: 1. 223200 淮安, 淮安市淮安医院耳鼻咽喉头颈外科; 2. 210002 南京, 南京军区南京总医院耳鼻咽喉头颈外科

通信作者: 陈 伟, E-mail: jhcw001@163.com

引用格式: 王华涛, 张 勇, 王志颐, 等. 相关炎症因子在声带黏膜损伤中的作用[J]. 东南国防医药, 2017, 19(5): 453-456.

既往研究发现,咽喉反流(laryngopharyngeal reflux, LPR)加重声带黏膜的慢性炎症状态,抑酸治疗在治疗 LPR 的同时可以明显改善声带白斑的预后,减少声带白斑的复发^[1];但对于抑酸治疗改善声带白斑发展的作用途径仍不清楚,缺少内在机制方面的研究^[2]。为此,本研究通过观察相关炎症因子(TNF- α 、IL-1 β 、IL-6)在不同程度炎症声带黏膜表达的差异,探讨相关炎症因子介导的炎症反应对声带黏膜损伤的机制,为治疗声带白斑提供新的靶点。

1 资料与方法

1.1 病例资料 所有病例均来源于 2013 年 6 月至 2015 年 12 月期间在南京军区南京总医院耳鼻喉科确诊为声带白斑且需要接受喉内镜手术治疗的住院患者。入组标准:①术前经 24 h 双通道测酸检查确认伴有 LPR 的声带白斑患者;②年龄>18 岁,性别不限;③既往无明确喉部手术史、放疗史。排除标准:①有长期吸烟、酗酒史;②孕妇或者哺乳期妇女;③合并有严重的全身性疾病、免疫功能缺陷、肿瘤或者其他可能影响结果判断的患者。共收集符合条件的患者 26 例,均为男性,年龄 38~55 岁,平均(42.16 \pm 7.05)岁。将 26 例患者随机分为质子泵抑制剂(proton pump inhibitor, PPI)组和对照组,每组 13 例。本研究经过医院伦理委员会批准(批准号:2017NZKY-009-02),所有检查和操作均取得患者知情同意并签知情同意书。

1.2 方法 PPI 组给予艾司奥美拉唑镁肠溶片 20 mg 口服(阿斯利康制药有限公司),2 次/d,连续 8 周。对照组给予口服胃黏膜保护剂,连续 8 周。留取手术切除的声带黏膜作为检测标本。术后 8 周复查纤维喉镜,夹取声带手术区黏膜标本。新鲜组织标本经手术分离后部分立即戊二醛固定,部分立即置于 4%多聚甲醛溶液固定,常规石蜡包埋,所有标本行 HE 染色,作病理组织学诊断。所有患者每月定期复查,随访时间至少为 12 个月。

1.3 HE 染色观察声带组织病理学的变化 HE 染色及评分:石蜡包埋、切片行常规染色,光镜下观察比较各标本的病理学变化。病理成像系统观察并拍照;按照病理评分标准对声带黏膜病理切片进行评分及统计,按文献[3]的评分标准:分值范围在 0~4 分,分别对应正常黏膜、轻度慢性炎黏膜、中度

慢性炎黏膜、重度慢性炎黏膜和极重度慢性炎黏膜。

1.4 ELISA 法检测炎症因子水平 用商品化的 ELISA 试剂盒检测 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平。试剂盒购置于 R&D 公司(USA)。具体操作方法及流程见产品说明书。

1.5 统计学分析 数据采用 SPSS23.0 软件进行统计分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,比较采用非配对 t 检验。率的比较使用 χ^2 检验。术后累计复发率应用 Kaplan-Meier 曲线计算,复发率的比较采用 Log-rank 检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 患者随访结果 术后 12 个月随访,对照组 13 例中 11 例复发,PPI 组 13 例中 5 例复发,2 组累计复发率分别为 84.6%和 38.5%,PPI 组复发率明显低于对照组(Logrank $\chi^2 = 6.038$, $P = 0.012$),见图 1。

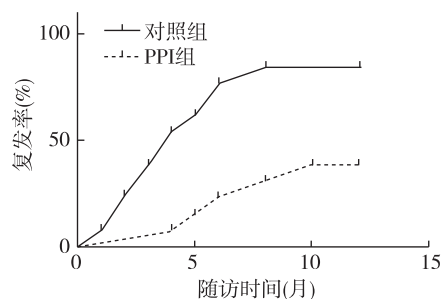


图 1 伴有咽喉反流的声带白斑患者复发曲线

2.2 HE 染色评分 HE 染色、光镜检测结果显示,PPI 组及对照组术中黏膜炎症细胞浸润明显、局部可见上皮结构破坏。PPI 组术后 8 周的黏膜炎症细胞浸润明显减少、上皮结构完整性明显改善。与 PPI 组相比,对照组术后 8 周的黏膜组织中仍有大量炎症细胞浸润、黏膜结构破坏、显著的黏膜增生甚至异型增生。HE 染色检测表明 PPI 治疗后声带黏膜固有层大量浸润的炎症细胞得到清除、黏膜组织修复,但仍存在纤维组织增生等情况。

应用炎症评分标准分析各组标本,结果显示 PPI 组与对照组术中标本病理评分比较差异无统计学意义($P>0.05$)。PPI 组术后 8 周病理评分均值较对照组明显降低($P<0.01$)。PPI 组术后 8 周病理评分均值较术中标本病理评分均值明显降低($P<0.01$)。对照组术中标本病理评分均值与术后 8 周

评分均值比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 1。

表 1 伴有咽喉反流的声带白斑患者术中及术后 8 周标本病理评分比较 ($\bar{x}\pm s$, 分)

标本采集时间	对照组 ($n=13$)	PPI 组 ($n=13$)
术中	2.98±0.98	3.36±1.24
术后 8 周	3.12±0.88	1.46±0.80 ^{*#}

与对照组术后 8 周比较, $*P<0.01$; 与本组术中比较, $^{\#}P<0.01$

2.3 炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平 ELISA 检测显示, PPI 组与对照组术中声带黏膜 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。PPI 组术后 8 周声带黏膜 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平明显低于对照组 ($P<0.01$)。PPI 组术后 8 周标本与术中标本比较, TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 表达显著下调 ($P<0.01$); 对照组术中与术后 8 周标本 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 2。

3 讨 论

炎症特别是慢性炎症反应在诱导疾病发生及促进肿瘤发展的过程中起到极其重要的作用^[4]。微环境中的细胞因子、自由基、酸碱刺激等炎症递质, 可诱导 DNA 甲基化、抑癌基因的点突变和翻译后修饰等变化^[5], 引起细胞信号传导通路的关键分子发生改变, 破坏正常细胞内环境的稳定性, 最终导致病变的发生和进展^[6]。咽喉反流物长期刺激声带黏膜, 可以明显加重声带黏膜的炎症状态。在本研究中 HE 染色检查可见: 伴有 LPR 声带白斑的声带黏膜组织中存在大量的炎性细胞浸润、黏膜结构的破坏、显著的组织增生甚至异型增生。抑酸治疗后浸润声带黏膜固有层的大量炎性细胞得到清除, 黏膜组织修复。病理评分结果也证实抑酸治疗后, 声带黏膜的损伤严重程度明显减轻。同时, PPI 组术后 8 周声带黏膜 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 表达水平也较治疗前明显下降, 进一步印证抑酸治疗可以

明显减轻声带黏膜的炎症程度。咽喉反流物可以加重声带黏膜的炎症已经成为共识, 其内在联系和作用途径目前仍有争议, 这也是进一步研究关注的重点。

研究证实, 在喉部炎症发生过程中存在着多个细胞信号传导通路的激活^[7-8], 其中 NF- κ B 通路是介导机体内炎症反应的一条重要的信号通路^[9]。目前已有研究表明, NF- κ B 参与调节免疫反应及炎症过程, 可促进炎症因子 IL-1、TNF- α 、IL-6 的表达, 而这些细胞因子在声带白斑发生发展中起重要作用^[10-11]。IL-1、TNF- α 等炎症细胞因子释放, NF- κ B 激活其下游调控信号途径可能是反流物加重声带白斑的重要原因, 但是目前 NF- κ B 激活及其下游的信号途径尚未清楚, 有待于进一步研究和探索。

声带白斑的术后复发是临床棘手问题。近年来, 尽管采用了激光、低温等离子等新的手术技术, 但并未降低声带白斑复发率^[11]。因此, 避免和控制引发声带白斑的危险因素对于减少声带白斑复发就显得尤为重要^[12-13], 其中 LPR 就是一个重要因素。本研究收集的伴有 LPR 声带白斑患者, 术后未予抑酸治疗的 13 例中 11 例复发, 而 PPI 组 13 例中 5 例复发, 2 组复发率分别为 84.6% 和 38.5%, PPI 组复发率明显低于对照组, 2 组累计复发率差异有统计学意义。同时, PPI 组中术后 8 周 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 表达也显著下调。因此, 正规的抑酸治疗可以降低伴有 LPR 的声带白斑复发率; 相关的炎症因子可以作为评估声带炎症程度的重要参数。

综上所述, LPR 存在的胃蛋白酶等化学刺激增加了炎症因子 TNF- α 、IL-1、IL-6 表达, 这些因子的释放, 使声带组织渗透性提高, 加重声带的病变甚至使其产生恶变。抑酸治疗通过减轻或消除刺激达到抑制炎症的作用, 促进声带黏膜结构和功能的恢复。但有关炎症诱导病变发生发展的分子机制及其关键分子对整个网络调控的规律尚无明确阐述^[14], 有待进一步研究和探索。

表 2 伴有咽喉反流的声带白斑患者手术中及术后 8 周炎症因子水平比较 ($\bar{x}\pm s$, pg/mg)

采集标本时间	对照组 ($n=13$)			PPI 组 ($n=13$)		
	TNF- α	IL-1 β	IL-6	TNF- α	IL-1 β	IL-6
手术中	73.30±15.50	16.13±7.51	37.66±6.94	76.39±16.39	15.49±6.31	36.43±6.93
术后 8 周	74.1±14.86	15.87±6.98	36.86±7.12	32.19±8.56 ^{*#}	6.33±2.12 ^{*#}	16.39±3.98 ^{*#}

与对照组比较, $*P<0.01$; 与本组手术中比较, $^{\#}P<0.01$

【参考文献】

- [1] 陈伟, 季寒, 吴明海, 等. 抑酸治疗对声带白斑术后相关症状的影响[J]. 医学研究生学报, 2017, 30(1): 66-69.
- [2] Hayden MS, Ghosh S. NF-kappa B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions[J]. *Genes Dev*, 2012, 26(3): 203-234.
- [3] 李湘平, 黄柞峰, 吴婷, 等. 咽喉反流在声带白斑及早期声带癌发病中的初步观察[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2014, 49(5): 362-367.
- [4] Liu W, Konermann A, Guo T, *et al.* Canonical Wnt signaling differently modulates osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and from periodontal ligament under inflammatory conditions[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1840(3): 1125-1134.
- [5] Oberg F, Haseeb A, Ahnfelt M, *et al.* Herbal melanin activates TLR4/NF-kB signaling pathway[J]. *Phytomedicine*, 2009, 16(5): 477-484.
- [6] Basak S, Shih VF, Hoffmann A. Generation and activation of multiple dimeric transcription factors within the NF-kappa B signaling system[J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(10): 3139-3150.
- [7] Ramakrishna G, Rastogi A, Trehanpati N, *et al.* From cirrhosis to hepatocellular carcinoma: new molecular insights on inflammation and cellular senescence[J]. *Liver Cancer*, 2013, 2(3-4): 367-383.
- [8] Nikolaou K, Sarris M, Talianidis I. Molecular pathways: the complex roles of inflammation pathways in the development and treatment of liver cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(11): 2810-2816.
- [9] Umar A, Steele VE, Menter DG, *et al.* Mechanisms of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in cancer prevention[J]. *Semin Oncol*, 2016, 43(1): 65-77.
- [10] Fan Y, Mao R, Yang J. NF-kB and STAT3 signaling pathways collaboratively link inflammation to cancer[J]. *Protein Cell*, 2013, 4(3): 176-85.
- [11] Tai DI, Tsai SL, Chang YH, *et al.* Constitutive activation of nuclear factor kappa B in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer*, 2000, 89(11): 2274-2281.
- [12] Isenberg JS, Crozier DL, Dailey SH. Institutional and comprehensive review of laryngeal leukoplakia[J]. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2008, 117(1): 74-79.
- [13] Uray IP, Dmitrovsky E, Brown PH. Retinoids and rexinoids in cancer prevention: from laboratory to clinic[J]. *Semin Oncol*, 2016, 43(1): 49-64.
- [14] 庄佩耘, 周莉, 郝玲, 等. 反流性喉炎与声带白斑关系的初步探讨[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2010, 18(5): 448-452.

(收稿日期: 2017-03-03; 修回日期: 2017-06-30)

(本文编辑: 叶华珍; 英文编辑: 王健东)