

DOI:10. 11798/j. issn. 1007-1520. 201706009

· 论 著 ·

紧密连接蛋白在声带白斑伴咽喉反流患者声带黏膜中的表达

吴昆旻¹, 李泽卿¹, 朱春晖¹, 马 莉¹, 安静娟¹, 陈 伟²

(1. 江苏省第二中医院 南京中医药大学第二附属医院 耳鼻咽喉科, 江苏 南京 210017; 2. 解放军南京总医院 耳鼻咽喉头颈外科, 江苏 南京 210002)

摘 要: **目的** 通过观察紧密连接(tight junction, TJ)蛋白在声带白斑伴咽喉反流(laryngopharyngeal reflux, LPR)患者声带黏膜表达的差异,探讨其与声带黏膜屏障损伤的相关性。**方法** 将因声带白斑行手术治疗且资料完整的26例患者按24h双通道测酸结果分LPR组和非LPR组,两组各13例。术中分别采集声带黏膜标本。HE染色观察声带组织病理学的变化、透射电镜检测声带黏膜紧密连接的形态学、Western blot检测紧密连接蛋白Claudin 1与ZO-1的表达。**结果** HE染色发现LPR组声带黏膜炎症细胞浸润较多,上皮结构完整性较差;电镜下观察到LPR组紧密连接附近的电子致密物质明显较少,紧密连接形态学明显改变。Western blot示LPR组Claudin-1和ZO-1两种蛋白表达减少($P<0.05$)。利用免疫荧光检测发现,LPR组的紧密连接蛋白Claudin-1和ZO-1在细胞浆内表达明显减少($P<0.05$)。**结论** 咽喉反流物可以导致紧密连接结构破坏,相关蛋白功能表达异常,细胞间连接结构遭到破坏,细胞间隙扩大,声带黏膜上皮的通透性增高,可能是声带白斑黏膜损伤的重要机制。

关 键 词: 声带白斑; 咽喉反流; 紧密连接蛋白
中图分类号: R767.4 文献标识码: A [中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2017, 23(6): 541–545]

Expressions of tight junction proteins in vocal mucosa of patients suffering from vocal leukoplakia accompanied with laryngopharyngeal reflux

WU Kun-min¹, LI Ze-qing¹, ZHU Chun-hui¹, MA Li¹, AN Jing-juan¹, CHEN Wei²

(1. Department of Otolaryngology, the Second Jiangsu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, the Second Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210017, China; 2. Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, PLA Nanjing General Hospital, Nanjing 210002, China)

Abstract: **Objective** To study the roles of tight junction proteins (TJPs) in vocal mucosal barrier damage via probing their differential expressions in vocal mucosa of patients suffering from vocal leukoplakia accompanied with laryngopharyngeal reflux (LPR). **Methods** 26 patients suffering from vocal leukoplakia were divided into two groups (i. e., groups with and without LPR) (13 cases in each group) according to the results of 24-h esophageal pH monitoring. Mucosal specimens of vocal cord were collected from all the patients during operation. HE staining was used to score the pathological changes of the mucosa. Transmission electron microscope (TEM) was utilized to observe the morphology of mucosal tight junction, and Western blot to detect the expressions of Claudin-1 and ZO-1. **Results** Compared with the group without LPR, marked inflammatory cell infiltration and poor structural integrity of the epithelium were observed via HE staining, TEM demonstrated significant decrease of electron dense materials around the tight junction and obvious morphological changes of the tight junction, and Western blot showed decreased expressions of Claudin-1 and ZO-1 in the specimens from the group with LPR. Furthermore, immunofluorescence assay confirmed that expressions of Claudin-1 and ZO-1 were decreased within cytoplasm in those from the group with LPR. **Conclusion** Refluxed materials may cause structural damage of tight junction and abnormal expressions of TJPs, thus leading to structural damage of intercellular

基金项目:江苏省自然科学基金(BK20161388)。
作者简介:吴昆旻,男,博士,副主任医师;李泽卿,男,博士,主任医师。吴昆旻和李泽卿对本文有同等贡献,为并列第一作者。
通信作者:陈 伟,Email: jhew001@163.com

junction, intercellular spaces dilatation and enhancement of epithelial permeability, which may be an important mechanism of vocal mucosal barrier damage in vocal leukoplakia accompanied with LPR.

Key words: Vocal leukoplakia; Laryngopharyngeal reflux; Tight junction protein

[Chinese Journal of Otorhinolaryngology-Skull Base Surgery, 2017, 23(6): 541-545]

声带白斑(vocal fold leukoplakia)称喉白斑,是声带任何部位黏膜表面存有的白色斑块状隆起或角状突起样病变,是声带黏膜上皮由于生长或成熟异常及过度角化而引起的一种癌前病变,有一定的恶变倾向^[1-2]。咽喉反流(laryngopharyngeal reflux, LPR)会加重声带黏膜的慢性炎症状态,但其对声带白斑发展的作用途径仍不清楚,作用内在机制方面的研究缺乏^[3]。为此,本文将探讨紧密连接(tight junction, TJ)蛋白介导的炎症反应与声带白斑之黏膜损伤的关系,为声带白斑的治疗提供理论依据和新的靶点。

1 材料与方法

1.1 病例资料

所有病例均来自于2015年6月~2016年6月在我科诊断为声带白斑且收入住院接受喉内镜手术治疗的患者。这些患者术前均行24h双通道测酸检查,并依据其结果分为LPR组和非LPR组。留取手术中切除的声带黏膜作为检测标本。共收集资料完整的患者26例,其中男性14例,女性12例,年龄38~55岁,平均 (42.16 ± 7.05) 岁。LPR组和非LPR组病例数均为13例。手术切除的新鲜组织标本,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。

1.2 双通道测酸

采用MMS UPS2020 ORION II型双通道测酸仪24h监测完成,使用MMS Investigation Diagnostic Software计算分析患者的咽喉反流情况。

咽喉反流检查的监测指标界定方法:①咽喉部pH值 <4.0 ;②咽喉部pH值的下降不能早于远端电极pH值的下降,其最低值亦不低于远端的pH值;③咽喉部感受器的pH值下降是快速的;④感受器pH值的下降不是在进食或吞咽时发生。咽喉反流阳性的判断标准:按照Johnson和DeMeester确定的标准^[4-5],24h内咽喉部记录的反流次数不小于6.9次或反流面积指数(reflux area index, RAI)不小于6.3。计算24h DeMeester积分,积分 >14.72 考

虑存在咽喉反流。

1.3 切除声带病变 HE 染色、观察组织病理学的变化

除留取部分行电镜形态学检测外,所有切除的声带病变标本均经石蜡包埋、切片行常规HE染色,光镜下观察比较各标本的病理学变化。

1.4 透射电镜检测声带黏膜紧密连接的形态学

标本取出后即刻置于戊二醛固定液中固定,4℃保存。置于3%的冷戊二醛溶液中固定2h,1%锇酸再固定1h,丙酮梯度脱水,环氧丙烷置换,Epon-812树脂包埋,超薄切片机切片,醋酸铀-柠檬酸铅双重电子染色,JEM-1200透射电镜观察并照像。

1.5 Western blot 检测紧密连接蛋白 Claudin 1、ZO-1 蛋白的表达

将术中所得组织称重、剪碎,加入裂解液中制成匀浆,离心,收集上清液,用裂解缓冲液稀释至相同的浓度,取等量上样缓冲液于试管中,于95~100℃中水浴5min后冰上冷却上样,电泳后转膜,湿电转移,按约 0.1 ml/cm^2 的量加入封闭液和Claudin-1/ZO-1一抗(1:500)。摇床摇荡孵育(4℃,过夜)。PBST漂洗滤膜4次,每次10min。将膜与HRP结合的二抗(辣根过氧化物酶标记抗体,二抗用封闭液稀释)(1:5000)室温下摇荡孵育1h,然后用PBS T充分冲洗滤膜,漂洗4次,每次10min。按 0.1 ml/cm^2 显影液计算用量,将显影液加于PVDF膜上,室温放置1min。在暗室中迅速将膜蛋白贴在X光胶片上曝光,洗片机中显影、洗像。注意调整曝光时间,直至出现最佳条带。

图像分析及数据处理:Western blot结果采用自动凝胶成像系统ChemiImager 5500 V 2.03软件进行扫描和记录,用Fluor C hen 2.0软件进行定量分析测得I DV(Integrated density value)值,用SPSS 23.0统计分析软件对实验数据进行统计和分析,样本均数间的比较用方差分析和Pearson相关分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示; $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

1.6 免疫荧光检测紧密连接蛋白表达的改变

声带标本包埋后,液氮速冻,制作冰冻切片;将已经切好的冰冻切片取出, -20℃丙酮溶液固定10min,室温下晾干15min;进行非特异性抗原的封

闭,按 1:100 稀释的 Claudin-1 或 ZO-1 一抗,滴加 1XPBS 液按 1:200 稀释的 Alexa Fluor 488 - a nti-r at IgG,滴加浓度为 5μg /ml D A P I 工作液染核,盖玻片封片;激光扫描共聚焦显微镜下观察并拍照。

2 结果

2.1 HE 染色结果

HE 染色、光镜检测结果显示,LPR 组及非 LPR 组黏膜都有炎症细胞浸润、局部可见上皮结构破坏。与 LPR 组(图 1)相比,非 LPR 组(图 2)黏膜炎症细胞浸润较轻、上皮结构较完整。

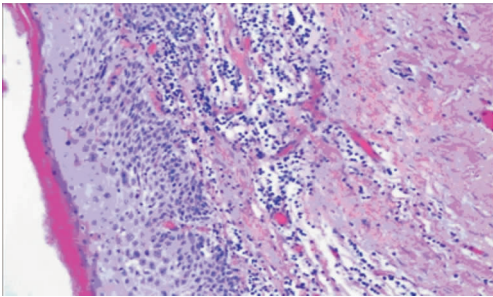


图 1 LPR 组标本显示黏膜固有层及黏膜下层大量炎症细胞浸润,血管扩张、充血,纤维组织增生明显 (HE × 200)

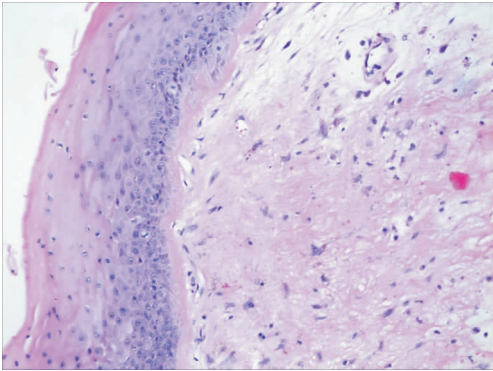


图 2 非 LPR 组黏膜及黏膜下层见少许慢性炎细胞浸润,上皮结构完整,纤维组织轻度增生 (HE ×200)

2.2 透射电镜观察结果

LPR 组声带黏膜透射电镜观察显示细胞核、细胞膜等结构基本完整,但存在细胞间隙水肿、增宽,部分细胞间隙增宽明显,细胞间桥粒减少甚至消失等超微结构改变。声带黏膜的紧密连接形态学改变如图 3 所示,LPR 组声带黏膜紧密连接表现为以电子致密物质减少为特征;与 LPR 组相比,电镜下观察到非 LPR 组紧密连接附近的电子致密物质明显较多。

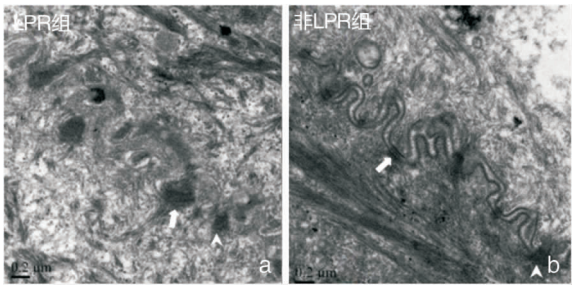


图 3 LPR 组细胞间连接及桥粒电子密度降低,提示细胞连接结构受损 a:LPR 组;b:非 LPR 组(↑为紧密连接结构,△为桥粒结构)

2.3 声带黏膜紧密连接蛋白表达情况的评估结果

免疫荧光检测发现:与 LPR 组相比,随声带黏膜上皮细胞数量的增加,非 LPR 组的紧密连接蛋白 Claudin-1 和 ZO-1 在声带黏膜上皮细胞浆内表达明显增多(图 4)。

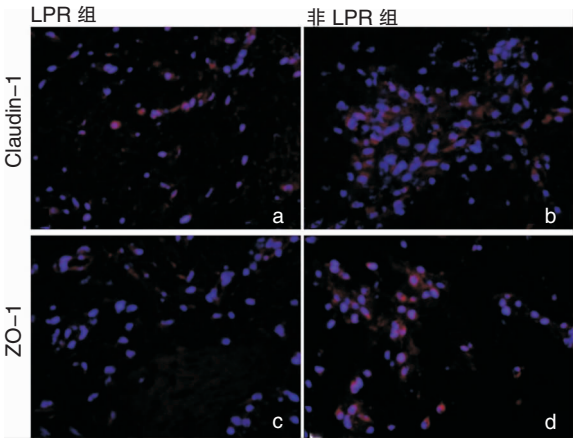


图 4 声带紧密连接蛋白表达检测比较(免疫荧光 ×400) a:LPR 组 Claudin-1 表达;b:非 LPR 组 Claudin-1 表达;c:LPR 组 ZO-1 表达;d:非 LPR 组 ZO-1 表达(蓝色为细胞核,红色为紧密连接蛋白)

2.4 声带黏膜紧密连接蛋白的表达

Western blot 观察两组间声带黏膜紧密连接蛋白(Claudin-1 和 ZO-1)的差异,结果如图 5 所示。非 LPR 组 Claudin-1 和 ZO-1 两种蛋白的表达明显高于 LPR 组($P<0.05$)(图 6)。

3 讨论

声带白斑(喉白斑)是声带黏膜上皮由于生长异常或成熟异常及过度角化引起的喉炎症改变,与刺激因素长期持续作用于声带上皮有关,这些刺激

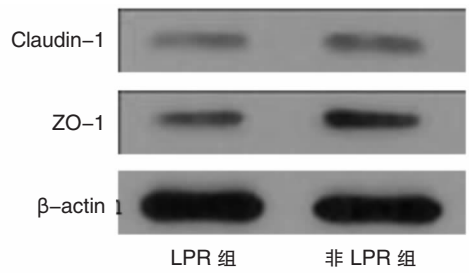


图 5 紧密连接蛋白 Western blot 检测

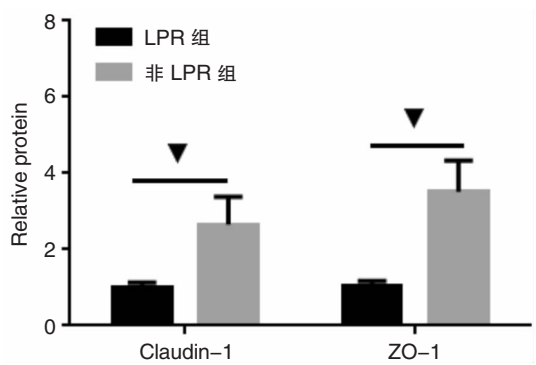


图 6 紧密连接蛋白表达差异

因素包括吸烟、饮酒、病毒感染、吸入刺激性物质、声损伤及胃酸反流等^[6-9]。自由基、细胞因子等微环境中的炎症介质在上述刺激因素长期作用下,可诱导 DNA 甲基化、抑癌基因的点突变和翻译后修饰等变化^[10],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^[11]。有研究表明咽喉反流可能是导致声带白斑的一种重要协同因素^[12]。

LPR 是胃食管反流使胃内容物逆流至食管上括约肌以上包括咽、喉等部位导致的症候群。咽(鼻咽、口咽和喉咽)及喉部黏膜比较薄弱,缺少胃、食管的多层屏障及黏膜组织的抗酸能力,对反流物中的胃酸、胃蛋白酶、胆汁酸以及胰酶等的化学刺激适应性差,在充满化学刺激的环境中咽喉部黏膜易发生病变,加重声带黏膜的慢性炎症状态,但其对声带白斑发展的作用途径仍不清楚。可能与咽喉反流物长期刺激声带黏膜,加重声带黏膜的炎症状态有关^[13]。在我们的研究中,HE 染色组织病理学检查发现:与不伴 LPR 的声带白斑患者相比,伴有 LPR 患者的声带黏膜组织中炎性细胞数量更多、浸润范围更广,黏膜结构的破坏更加明显、存在显著的组织增生甚至异型增生。咽喉反流物可以加重声带黏膜的炎症已经成为共识,但其内在联系、作用途径及机制目前仍存有争议,成为进一步探讨研究的重点。

声带上皮为复层鳞状上皮,声带黏膜屏障保持完整是维持声带基本形态及功能的基础。细胞间黏附力降低或丧失导致细胞连接的破坏、与炎症的浸润相关已被广泛认同。黏附带、缝隙连接、桥粒和紧密连接(tight junction,TJ)是至今已发现的四种黏附结构连接形式^[14]。紧密连接的主要作用体现为封闭细胞间隙、维持细胞黏附性、极性和通透性及辅助信号传递蛋白调节细胞增殖分化等^[15]。紧密连接是一种重要的细胞间连接形式,是多种跨膜蛋白与外周蛋白相互作用构成的复杂蛋白质体系,其结构和功能受多种信号调控。紧密连接同时也是上皮机械屏障最重要的构成结构,主要由 occludin 蛋白、claudin 蛋白、胞质紧密黏连蛋白(zonula occludens,ZOs)、连接黏附分子(junctional adhesion molecules,JAMs)等结构蛋白和各类连接蛋白共同组成^[16]。紧密连接复合物的解离或缺失与上皮细胞屏障结构破坏、功能损伤有关^[17]。Occludin 是紧密连接的重要结构成分,彼此间相互作用,亦可与 ZOs 发生联系,然后间接与肌动蛋白和 JAMs 相互作用,构成上皮完整的紧密连接^[18]。免疫电镜显示,occludin 定位于紧密连接,不仅通过细胞外结构域在相邻细胞间以“拉链”的方式结合,进而严密封闭细胞旁间隙;还可通过与该区域其他紧密连接蛋白结合,参与紧密连接的信号调节^[19]。Claudin 在相邻细胞间以“拉链”状相互结合产生细胞旁封闭。Claudin 是紧密连接的主要功能蛋白,对维持上皮细胞屏障以及紧密连接的完整性具有重要作用。因此当细菌、病毒、炎症介质、过敏原及基因突变等原因引起 Claudin 及与其结合的蛋白结构改变,使紧密连接破坏,屏障功能受损,组织渗透性提高,可导致多种疾病的发生。本研究应用免疫荧光检测发现与 LPR 组相比,随声带黏膜上皮细胞数量的增加,非 LPR 组的紧密连接蛋白 Claudin-1 和 ZO-1 在声带黏膜上皮细胞内表达明显增加。

声带白斑的术后复发是临床棘手问题,复发率据报道可以达到 46%^[12]。近些年来,射频、低温等离子以及激光等新技术在声带白斑手术中广泛应用,但术后随访结果显示其术后复发率并无明显降低^[9]。为了降低声带白斑术后复发率,减少、避免和控制引发声带白斑的危险因素就显得尤为重要,其中 LPR 作为可能导致声带白斑复发一个重要因素成为研究的热点。既往有学者发现^[20],大部分声带白斑合并反流性喉炎的患者在反流性喉炎治愈后,声带白斑可消失,嗓音有不同程度的改善,且可

以明显减少白斑的复发。综上所述,LPR 引起的慢性刺激使声带组织渗透性提高,破坏了正常细胞内环境的稳定性加重声带病变。其中紧密连接相关蛋白表达下降致使声带黏膜上皮屏障损伤从而促进声带白斑发生、发展。如何促进声带黏膜结构恢复和功能改善,LPR 相关炎症诱导声带白斑病变发生、发展的分子机制及其关键分子对整个网络调控的规律有待进一步研究和探索。

参考文献:

[1] 王亚琳,陈剑秋. 声带白斑与癌前病变关系探讨及其研究进展[J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2016, 30(6): 90-93.

[2] 张红凯,刘红刚. 喉癌前病变的分类及其临床病理学研究现状[J]. 中华病理学杂志, 2010,39(8): 570-573.

[3] 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.

[4] Kleiman DA, Sporn MJ, Beninato T, et al. Early referral for 24-h esophageal PH monitoring may prevent unnecessary treatment with acid-reducing medications[J]. Surg Endosc, 2013, 27(4): 1302-1309.

[5] [No authors Listed] Abstracts of the 36th annual meeting of the society of general internal medicine. April 24-27, 2013. Denver, Colorado, USA[J]. J Gen Intern Med, 2013, 28(Suppl 1): S1-489. doi:10.1007/s11606-013-2436-1.

[6] 汪安江,陈旻湖. 反流性咽喉炎的发病机制和诊治进展[J]. 国际内科学杂志, 2008, 35(4): 213-217.

[7] Isenberg JS, Crozier DL, Dailey SH. Institutional and comprehensive review of laryngeal leukoplakia[J]. Ann Otol Rhinol Laryngol, 2008,117(1): 74-79.

[8] Lee DH, Yoon TM, Lee JK, et al. Predictive factors of recurrence and malignant transformation in vocal cord leukoplakia[J]. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2015, 272(7): 1719-1724.

[9] Byeon H. Relationships among smoking, organic, and functional voice disorders in Korean general population[J]. J Voice, 2015, 29(3): 312-316.

[10] Bartlett RS, Heckman WW, Isenberg J, et al. Genetic characterization of vocal fold lesions: leukoplakia and carcinoma[J]. Laryngoscope, 2012, 122(2): 336-342.

[11] 潘兆虎,王霞,陈银冰,等. Survivin 和 Caspase-3 在喉白斑中的表达及意义[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2008, 14(3): 185-187.

[12] 李湘平,黄杳峰,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.

[13] Lewin JS, Gillenwater AM, Garrett JD, et al. Characterization of laryngopharyngeal reflux in patients with premalignant or early carcinomas of the larynx[J]. Cancer, 2003,97(4): 1010-1014.

[14] Clarke H, Soler AP, Mullin JM. Protein kinase C activation leads to dephosphorylation of occludin and tight junction permeability increase in LLC-PK1 epithelial cell sheets[J]. J Cell Sci, 2000, 113 (Pt 18): 3187-3196.

[15] Mandel I, Paperna T, Glass-Marmor L, et al. Tight junction proteins expression and modulation in immune cells and multiple sclerosis[J]. J Cell Mol Med, 2012, 16(4): 765-775.

[16] 赵海君,钱易,崔毓桂,等. 紧密连接的结构与功能[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2013,32(5): 384-386.

[17] 李秋霞,罗茂林,李茹柳,等. 紧密连接蛋白 ZO-1 研究概述[J]. 广州中医药大学学报, 2007, 24(6): 523-526.

[18] 邱江锋,张志奇,吴志勇. Claudin 在胃肠道肿瘤发生发展中的作用[J]. 现代肿瘤医学, 2010, 18(3): 591-593.

[19] 邵瑞颖,石莎,李森林. 紧密连接蛋白 Claudins 与胃癌关系的研究进展[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2015,24(10): 1171-1174.

[20] 苏芳,谢景华. 雷贝拉唑治疗声带白斑 21 例临床观察[J]. 广州医药, 2013, 44(6): 46-47.

(收稿日期:2017-09-07)