

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202003010

· 论著 ·

# 白细胞介素-8在兔咽喉反流中的作用

曹杰,张立红,王文伦,王宇光,李超凡,赵一馨,刘苑君

(北京大学人民医院耳鼻咽喉科,北京 100044)

**摘要:** **目的** 初步研究白细胞介素-8(IL-8)在兔动物模型中的表达,并探讨其在咽喉反流发病中的作用。**方法** 将20只普通级新西兰兔随机分为实验组和对照组,每组各10只。实验组采用扩张食管上、下括约肌的制作咽喉反流动物模型,对照组为假操作组。建模完成后定期对动物进行24 h pH监测和反流体征量表(RFS)评分,并取上呼吸道不同部位组织进行免疫组化染色检测IL-8的表达水平。**结果** 24 h pH监测结果显示实验组动物出现了明显的咽喉反流,与对照组相比,两组间Ryan指数阳性率差异具有统计学意义( $P < 0.001$ );实验组与对照组的RFS评分阳性率差异具有统计学意义( $P = 0.029$ )。实验组与对照组在声带部位的组间IL-8免疫组化染色评分差异具有统计学意义( $P = 0.015$ ),在咽鼓管、扁桃体、下鼻甲部位差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。**结论** 咽喉反流可导致喉部IL-8的高表达,IL-8可能在咽喉反流的发生发展中起重要作用。

**关键词:** 咽喉反流;白细胞介素-8;炎症因子;动物模型;反流体征量表

中图分类号:R766.5

## A preliminary study on the role of interleukin-8 (IL-8) in laryngopharyngeal reflux of rabbits

CAO Jie, ZHANG Lihong, WANG Wenlun, WANG Yuguang, LI Chaofan, ZHAO Yixin, LIU Yuanjun  
(Department of Otorhinolaryngology, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the expression of interleukin-8 (IL-8) in rabbit models of laryngopharyngeal reflux and explore its role in the pathogenesis of this disease. **Methods** Twenty ordinary grade New Zealand rabbits were randomly divided into experimental group and control group, with 10 in each group. In the experimental group, the upper and lower esophageal sphincters were dilated, and the control group was a sham operation group. The animals were regularly subjected to 24-hour laryngeal pH monitoring and Reflux Finding Score (RFS) evaluating, and tissues of different parts of the upper respiratory tract were taken for immunohistochemical staining to detect the expression level of IL-8. **Results** The 24-hour pH monitoring results showed that there was significant laryngopharyngeal reflux in the experimental group. The positive rate of Ryan score was significantly different between the two groups ( $P < 0.001$ ). There was a significant difference in the positive rate of RFS score between the two groups ( $P = 0.029$ ). The difference of IL-8 immunohistochemical staining scores between the experimental group and the control group was significant in the vocal cord specimens ( $P = 0.015$ ), but insignificant in the specimens of Eustachian tube, tonsil, and inferior turbinate (all  $P > 0.05$ ). **Conclusion** Laryngopharyngeal reflux can lead to high expression of IL-8, and IL-8 may play an important role in the development of laryngopharyngeal reflux.

**Keywords:** Laryngopharyngeal reflux; Interleukin-8; Inflammatory factor; Animal model; Reflux finding score

咽喉反流性疾病(laryngopharyngeal reflux disease, LPRD)是一种多因素、具有广泛临床表现的疾病。咽喉反流在咽喉、头颈、中耳和鼻腔鼻窦疾病的发生发展中起了重要作用<sup>[1]</sup>。食管上、下括约肌的

收缩功能,食管的蠕动清除功能和黏膜的屏障功能在防止咽喉反流的发生中起了主要作用<sup>[2]</sup>。

咽喉反流导致的损伤会引起包括白细胞介素-6(IL-6)、碳酸酐酶同工酶3(CA III)、E-钙黏蛋白

基金项目:北京市自然科学基金(7172228)。

第一作者简介:曹杰,男,在读博士研究生,医师。

通信作者:张立红,Email:lihongzhang@vip.sina.com

(E-cadherin)和多种黏蛋白(mucin)等一系列生物标记物表达水平的改变<sup>[3]</sup>。IL-8是一种中性粒细胞趋化因子,在炎症反应的启动和促进中发挥着重要作用。Oh等<sup>[4]</sup>研究表明其在食管中的表达水平与胃食管反流的严重程度相关,Tan等<sup>[5]</sup>研究发现胃蛋白酶可以通过IL-8相关信号通路在体外诱导喉癌细胞的上皮-间质转化,但目前尚未有其在LPRD中表达水平的体内研究。

因此,本研究以兔为研究对象,采用较为成熟的扩张食管上、下括约肌的方法破坏抗反流的屏障功能<sup>[6]</sup>,造成实验动物的咽喉反流,通过观察IL-8的表达水平的差异,初步探讨咽喉反流的损伤机制,为LPRD的诊治提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 建立咽喉反流动物模型

选取健康普通级雄性5月龄新西兰兔20只,体重2.5~3.0 kg,均购自北京大学人民医院实验动物中心。按照随机数字法分为扩张食管上、下括约肌的实验组和假操作的对照组,每组各10只。实验动物的饲养和处置严格遵守国家实验动物指南,由北京大学人民医院伦理委员会批准。

操作前动物需禁食24 h,禁水6 h。采用舒泰50(16 mg/kg)肌注麻醉。实验组采用压力泵和球囊导管扩张食管下括约肌,球囊长5 cm,直径10 mm,扩张时加压至10 Psi(1Psi=6.895kPa),维持5 min,间隔3 min后重复1次,共2次。然后在内镜直视下将定制的镍钛合金支架(南京微创,长5 cm,直径8 mm,记忆温度36.0℃)置入食管上段扩张食管上括约肌,24 h后取出内支架。对照组动物采用与实验组安全相同的方法放置球囊导管和食管导丝,但不进行球囊扩张及支架放置。其余各项处理均与实验组相同。

### 1.2 24 h pH 监测

操作后第2周使用DX-pH监测系统对实验动物进行24 h pH监测,监测结果使用配套软件进行分析。由于新西兰兔大多数时间为伏地姿态,因此我们采用直立位pH<5.5为界值<sup>[7]</sup>,通过统计反流的次数、最长反流时间和反流时间百分比,得出Ryan指数。以Ryan指数>9.41分作为反流阳性的判断标准<sup>[7]</sup>。

**1.3 反流体征评分(reflux finding score, RFS)量表**所有实验动物于操作后第4周进行喉镜检查,

根据喉镜所见,由两名医师独立进行RFS量表评分(表1),以RFS>7分为反流阳性的判断标准<sup>[8]</sup>,比较两组动物RFS量表评分的差异。

表1 RFS量表评分

体征	评分	体征	评分
声门下水肿(声带假沟)	0 = 无 2 = 存在	弥漫性喉水肿	0 = 无 1 = 轻度 2 = 中度 3 = 重度 4 = 阻塞
喉室消失	0 = 无 2 = 部分 4 = 完全	后联合增生	0 = 无 1 = 轻度 2 = 中度 3 = 重度 4 = 阻塞
红斑/充血	0 = 无 2 = 局限于杓状软骨 4 = 弥漫	肉芽组织	0 = 无 2 = 存在
声带水肿	0 = 无 1 = 轻度 2 = 中度 3 = 重度 4 = 息肉	喉内黏稠黏液附着	0 = 无 2 = 存在

### 1.4 IL-8 免疫组化染色及评价标准

8周后3%氟烷吸入法处死动物,分别取两组的声带、扁桃体、咽鼓管、下鼻甲组织标本固定于4%多聚甲醛中,石蜡包埋后切片待用。免疫组化检测IL-8的表达:脱蜡、修复后,阻断内源性过氧化物酶,血清封闭,然后滴加一抗(anti-IL-8 antibody, abcam, AB34 100, 1:200稀释)孵育。洗脱后滴加二抗(HRP山羊抗小鼠二抗, servicebio, GB23 301, 1:200稀释)孵育,最后DAB显色观察。免疫组化染色结果评分参考Formwitz方法<sup>[9]</sup>,由两名病理科医师独立完成,根据染色强度和染色面积进行评分。染色强度评分为:0分(阴性),1分(弱阳性),2分(阳性),3分(强阳性);染色面积评分为:1分(<25%),2分(25%~50%),3分(51%~75%),4分(>75%)。两者的乘积为每个标本的积分,0分为阴性(-),1~4分为弱阳性(+),5~8分为阳性(++),9~12分为强阳性(+++)。

### 1.5 统计学分析

采用SPSS 20.0软件进行数据统计。采用 $\bar{x} \pm s$ 描述正态分布的计量资料,采用中位数[25分位数;75分位数](M[P<sub>25</sub>;P<sub>75</sub>])描述非正态分布的计量资料。符合正态分布的两组间均数比较采用t检验,分类变量采用Fisher确切概率法检验,P<0.05为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 一般情况

实验组动物有1只死于继发感染,对照组有1只死于麻醉意外。建模后最初2 d,实验组动物出现食欲减退,紧张易激惹等情况,多于1周内恢复。建模后2周,实验组新西兰兔的平均体重( $3.10 \pm 0.13$ )kg,与对照组( $3.23 \pm 0.12$ )kg相比,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

### 2.2 pH 监测结果

操作后第2周实验组9只动物 Ryan 指数均为阳性( $66.21 [32.71; 153.15]$ ),阳性率为100% (9/9),对照组 Ryan 指数仅有1例为阳性( $0 [0; 5.63]$ ),阳性率为11% (1/9)。以 Ryan 指数  $> 9.41$  分作为反流阳性的判断标准,采用 Fisher 确切概率法进行检验,第2周咽喉反流阳性率在两组间具有显著性差异( $P < 0.001$ ),提示实验组动物出现了较明显的咽喉反流。

### 2.3 RFS 评分结果

操作后第4周实验组 RFS 评分为( $8.11 \pm 2.37$ )分,对照组为( $2.44 \pm 0.88$ )分,采用两独立样本  $t$  检验,两组间差异具有统计学意义( $t = 6.726$ ,  $P < 0.001$ )。以 RFS  $> 7$  分为反流阳性的判断标准,实验组阳性率为55.6% (5/9),对照组阳性率为0%,采用 Fisher 确切概率法进行检验,两组间差异具有统计学意义( $P = 0.029$ )。较典型的喉镜图像见图1所示。

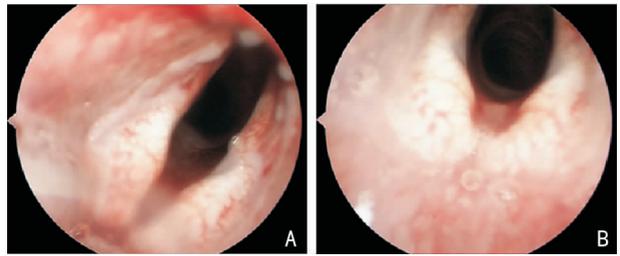


图1 操作后第4周新西兰兔喉镜图 A:实验组示声带充血、水肿,喉内分泌物黏稠、黏液附着;B:对照组示双侧声带光滑

### 2.4 IL-8 免疫组化检测结果

IL-8 的表达以胞质表达为主,在鳞状上皮近基底层、上皮下基质内和淋巴细胞内表达较为明显(图2)。不同部位组织中 IL-8 染色的强度及数量统计见表2。实验组声带 IL-8 免疫组化染色弱阳性率为88.9% (8/9),阴性率为11.1% (1/9);对照组声带 IL-8 免疫组化染色弱阳性率为22.2% (2/9),阴性率为77.8% (7/9)。实验组扁桃体 IL-8 免疫组化染色弱阳性率为55.6% (5/9),阴性率为44.4% (4/9);对照组扁桃体 IL-8 免疫组化染色弱阳性率为44.4% (4/9),阴性率为55.6% (5/9)。实验组咽鼓管 IL-8 免疫组化染色弱阳性率66.7% (6/9),阴性率为33.3% (3/9);对照组咽鼓管 IL-8 免疫组化染色弱阳性率为33.3% (3/9),阴性率为66.7% (6/9)。实验组下鼻甲黏膜下组织 IL-8 免疫组化染色弱阳性率88.9% (8/9),阴性率为11.1% (1/9);

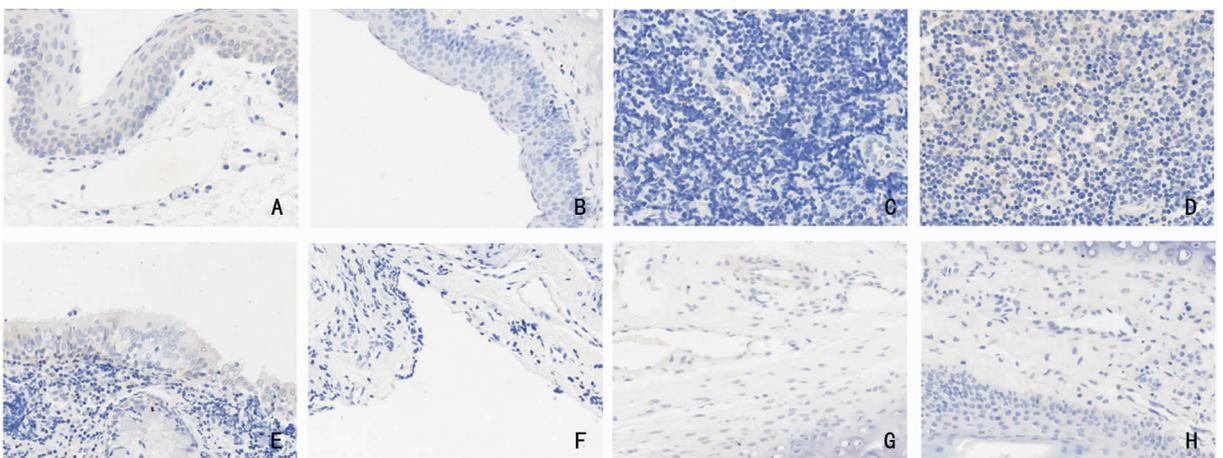


图2 两组新西兰兔 IL-8 免疫组化染色结果 ( $\times 400$ ) A:实验组声带黏膜鳞状上皮 IL-8 染色呈弱阳性,近基底层染色程度加深;B:对照组声带黏膜组织内 IL-8 染色阴性;C:实验组扁桃体组织内 IL-8 染色阴性;D:对照组扁桃体组织内 IL-8 染色呈弱阳性;E:实验组咽鼓管黏膜及黏膜下层 IL-8 染色呈弱阳性;F:对照组咽鼓管组织 IL-8 染色阴性;G:实验组下鼻甲黏膜下组织 IL-8 染色呈弱阳性;H:对照组下鼻甲黏膜下组织 IL-8 染色呈弱阳性

表2 不同部位 IL-8 免疫组化染色结果 (例)

部位	例数	IL-8				P
		(-)	(+)	(++)	(+++)	
声带						
实验组	9	1	8	0	0	0.015
对照组	9	7	2	0	0	
扁桃体						
实验组	9	4	5	0	0	1.000
对照组	9	5	4	0	0	
咽鼓管						
实验组	9	3	6	0	0	0.347
对照组	9	6	3	0	0	
下鼻甲						
实验组	9	1	8	0	0	1.000
对照组	9	2	7	0	0	

注:  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

对照组下鼻甲黏膜下组织 IL-8 免疫组化染色弱阳性率为 77.8% (7/9), 阴性率为 22.2% (2/9)。采用 Fisher 确切概率法进行检验, 实验组和对照组声带之间 IL-8 免疫组化染色结果差异具有统计学意义 ( $P = 0.015$ ), 而在其他部位的免疫组化染色结果差异无统计学意义 ( $P$  均  $> 0.05$ )。

### 3 讨论

LPRD 是临床常见的难治性慢性疾病, 由于现代人们的饮食习惯及生活方式的改变, 近年来其发病率不断上升。LPRD 与胃食管反流病 (gastroesophageal reflux disease, GERD) 有不同也有交集, 据报道 GERD 合并 LPRD 患者的比例可高达 47.9%<sup>[10]</sup>。由于咽喉反流性疾病的病理机制复杂, 临床疗效尚局限, 相关研究短缺, 与胃食管反流病患者相比, LPRD 患者常常会承受更长的诊疗过程和诊疗花费。因此通过进行 LPRD 的动物实验的基础研究, 探讨相关炎症因子对上呼吸道造成损伤的机制, 可以为 LPRD 的诊断和治疗提供借鉴。

Belafsky 等<sup>[11]</sup>在 2001 年首次设计了 RFS 量表评分, 其评分可以用以诊断咽喉反流和评估咽喉反流的严重程度。RFS 量表亦由我国耳鼻咽喉科专家在中文环境下进行了信度和效度的评估<sup>[8]</sup>。目前共识认为反流症状指数量表 (RSI) 和/或 RFS 评分量表是初步诊断的简单有效手段, 24 h pH 监测 (包括咽喉食管 pH、阻抗-pH 和 DX-pH 监测) 是主要的客观诊断手段<sup>[12]</sup>。在本实验中, 我们通过球囊扩张造成膈肌食管裂孔的松弛甚至食管裂孔疝的形成, 通过网状支架破坏食管上括约肌的收缩功能, 进而

造成实验动物的咽喉反流。在本研究中, 实验组动物内镜下可见声带充血、水肿, 喉内黏稠分泌物附着等表现, 两组动物的 Ryan 指数阳性率和 RFS 评分阳性率均具有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 证实模型动物出现了较为明显的咽喉反流。反流物可以导致声带的炎症已基本成为共识, 但其内在通路目前仍有待进一步研究。

IL-8 又称趋化因子 CXCL8, 是由巨噬细胞、上皮细胞、成纤维细胞、血管内皮细胞等分泌的细胞因子, 在中性粒细胞的趋化、肿瘤增殖和血管生成、以及恶性肿瘤的转移中发挥了重要作用<sup>[13]</sup>。有研究表明, 在接受抗反流手术 (胃底折叠术) 后, GERD 患者的 IL-8 表达水平有显著下降<sup>[4]</sup>, 提示其与反流性疾病有明显相关性。国内也有喉癌与咽喉反流相关性的报道<sup>[14]</sup>。此外, Tan 等<sup>[5]</sup>在体外研究中证实胃蛋白酶可以通过 IL-8 诱导喉癌细胞的上皮-间质转化, 从而在肿瘤的转移中发挥作用; 胃蛋白酶虽然也会导致 IL-6 表达提高, 但提高水平无统计学差异; 而 IL-10、IL-1 $\beta$ 、IL-12 和 TNF 与胃蛋白酶的刺激无明显相关性。在本研究中, 我们观察到 IL-8 要表达在鳞状上皮近基层处、黏膜下层基质内及扁桃体淋巴组织内, 实验组与对照组之间 IL-8 免疫组化染色评分有统计学差异 ( $P < 0.05$ )。由于 IL-8 是一种非特异性的炎症因子, 感染、机械损伤、肿瘤或其他炎症因子的刺激都有可能使其表达增高。扁桃体作为上呼吸道感染的第一道防线, 可因感染炎症刺激导致 IL-8 表达升高。本实验过程中 pH 监测电极经鼻腔置入至咽喉部, 电极导线的机械刺激和鼻窦引流受阻导致的鼻窦炎都有可能引起下鼻甲和鼻咽部 IL-8 表达水平的升高。这可能解释了在本实验中扁桃体、咽鼓管和下鼻甲部位 IL-8 的表达水平没有显著性差异的原因。倪鑫等<sup>[15]</sup>发现 VEGF 在喉癌中的阳性表达率为 78.26%, 阳性表达与肿瘤的淋巴结转移有明显的相关性。因此, 胃蛋白酶是否会导致 IL-8 和 VEGF 的表达升高, 三者间的相互作用的机制和通路如何, 以及它们与炎症和肿瘤之间的关系, 还有待今后进一步探索。

在本实验中, IL-8 在免疫组化染色中均为弱阳性表达, 其原因可能与 IL-8 的表达水平受取材时机和反流程度的影响有关, 缺乏对相关因素的动态性研究是本实验的局限所在。我们在进一步的研究中也发现间隔一段时间后再次扩张的效果优于单次扩张, 提示这种模型还有进一步优化的空间。

综上所述, 本研究的主要创新点在于利用咽喉

反流动物模型证实了咽喉反流可以导致 IL-8 的表达水平的升高,为后续研究 LPRD 发病机制及诊断治疗的基础和临床工作提供参考。但是咽喉反流造成损伤的分子通路还有待进一步探讨。

#### 参考文献:

- [1] Ali Mel-S. Laryngopharyngeal reflux: diagnosis and treatment of a controversial disease[J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2008, 8(1):28-33.
- [2] Lipan MJ, Reidenberg JS, Laitman JT. Anatomy of reflux: A growing health problem affecting structures of the head and neck [J]. *Anat Rec B New Anat*, 2006, 289(6):261-270.
- [3] Wood JM, Hussey DJ, Woods CM, et al. Biomarkers and laryngopharyngeal reflux[J]. *J Laryngol Otol*, 2011, 125(12):1218-1224.
- [4] Oh DS, DeMeester SR, Vallbohmer D. Reduction of interleukin 8 gene expression in reflux esophagitis and Barrett's esophagus with antireflux surgery[J]. *Arch Surg*, 2007, 142(6):554-560.
- [5] Tan JJ, Wang L, Mo TT, et al. Pepsin promotes IL-8 signaling-induced epithelial-mesenchymal transition in laryngeal carcinoma [J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19:64.
- [6] 曹杰,张立红,王文伦,等. 一种新西兰兔咽喉反流动物模型的建立和研究[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2019, 54(12):912-918.
- [7] Ayazi S, Lipham JC, Hagen JA, et al. A new technique for measurement of pharyngeal pH: normal values and discriminating pH threshold[J]. *J Gastrointest Surg*, 2009, 13(8):1422-1429.
- [8] 彭莉莉,李进让,张立红. 三位不同职称喉科医师对咽喉反流体征评分量表的应用研究[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2013, 48(6):461-464.
- [9] Wang L, Tan JJ, Wu T, et al. Association between laryngeal pepsin levels and the presence of vocal fold polyps[J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2017, 156(1):144-151.
- [10] 冯桂建,赵丽莉,邹宁,等. 基于症状学探讨胃食管反流病和咽喉反流病的关系[J]. *中华医学杂志*, 2011, 91(35):2472-2475.
- [11] Belafsky PC, Postma GN, Koufman JA. The validity and reliability of the reflux finding score (RFS) [J]. *Laryngoscope*, 2001, 111(8):1313-1317.
- [12] 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志编辑委员会咽喉组,中华医学会耳鼻咽喉头颈外科学分会咽喉学组. 咽喉反流性疾病诊断与治疗专家共识(2015年)[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2016, 51(5):324-326.
- [13] Waugh DJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(21):6735-6741.
- [14] 赵一馨,张立红,张春芳,等. 喉癌患者并发咽喉反流的初步观察[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2014, 49(5):356-361.
- [15] 倪鑫,房居高,范尔钟,等. 喉癌及喉咽癌血管内皮生长因子表达[J]. *中国耳鼻咽喉头颈外科*, 2005, 12(8):483-485.

(收稿日期:2019-11-17)

本文引用格式:曹杰,张立红,王文伦,等. 白细胞介素-8在兔咽喉反流中的作用[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2020, 26(3):278-282. DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202003010

Cite this article as: CAO Jie, ZHANG Lihong, WANG Wenlun, et al. A preliminary study on the role of interleukin-8 (IL-8) in laryngopharyngeal reflux of rabbits[J]. *Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg*, 2020, 26(3):278-282. DOI: 10.11798/j.issn.1007-1520.202003010