

生物标志物在咽喉反流性疾病中的研究进展

张杉, 陈秋, 周方伟, 马亦飞

贵州医科大学附属医院 耳鼻咽喉头颈外科, 贵州 贵阳 550004

摘要: 咽喉反流性疾病 (laryngopharyngeal reflux disease, LPRD) 是耳鼻咽喉科一种常见的疾病, 目前 LPRD 的诊断标准尚不统一, 以临床表现结合多种辅助检查为主要诊断方法。在 LPRD 患者中, 存在某些含量与正常人群有差异的物质, 可以通过各种机制导致咽喉部黏膜损伤。与 LPRD 发病相关的生物标志物众多, 除最常见的反流物质胃酸外, 近年越来越多的物质受到了关注。如胃蛋白酶、胰蛋白酶、神经源性炎症因子、胆汁酸、紧密连接蛋白、碳酸酐酶、黏蛋白、基质金属蛋白酶-7 以及细胞钙黏蛋白等。生物标志物具有较高的特异性、敏感性及高效性, 可以减少喉镜、pH 阻抗监测等诊断仪器设备的使用。因此建立 LPRD 生物标志物诊断体系, 可以帮助 LPRD 诊断更加便捷、准确。现总结 LPRD 相关生物标志物, 回顾其在 LPRD 诊疗过程的研究进展。

关键词: 咽喉反流; 生物标志物; 反流物质; 神经源性因子; 上皮结构相关蛋白

中图分类号: R766.5; Q26 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-3770(2024)06-0046-09

引用格式: 张杉, 陈秋, 周方伟, 等. 生物标志物在咽喉反流性疾病中的研究进展[J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2024, 38(6):46-54. ZHANG Shan, CHEN Qiu, ZHOU Fangwei, et al. Research progress of biomarkers in laryngopharyngeal reflux disease[J]. Journal of Otolaryngology and Ophthalmology of Shandong University, 2024, 38(6):46-54.

Research progress of biomarkers in laryngopharyngeal reflux disease

ZHANG Shan, CHEN Qiu, ZHOU Fangwei, MA Yifei

Department of Otorhinolaryngology & Head and Neck Surgery, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China

Abstract: Laryngopharyngeal reflux disease (LPRD) is a common disease in otolaryngology. Currently, the diagnostic criteria for LPRD are not uniform, and clinical manifestations combined with various auxiliary examinations are the main diagnostic methods. Patients with LPRD have different levels of certain substances compared to the normal population, which can cause damage to the pharyngeal mucosa through different mechanisms. There are many biomarkers associated with the onset of LPRD, and in addition to the most common reflux substance, gastric acid, more and more substances have received attention in recent years. These include pepsin, trypsin, neurogenic inflammatory factors, bile acids, tight junction proteins, carbonic anhydrase, mucin, MMP-7 and cell cadherin. Biomarkers have high specificity sensitivity and efficiency, which can reduce the use of diagnostic equipment such as laryngoscopy and pH impedance monitoring. Therefore, the establishment of an LPRD biomarker diagnostic system can help make LPRD diagnosis more convenient and accurate. Here is a summary of LPRD-related biomarkers and a review of their research progress in the diagnosis and treatment of LPRD.

Key words: Laryngopharyngeal Reflux; Biomarkers; Reflux substances; Neurogenic factors; Epithelial structure related proteins

咽喉反流性疾病 (laryngopharyngeal reflux disease, LPRD), 是指胃十二指肠内容物反流至食管上括约肌以上的部位 (咽喉部), 作用于上呼吸道黏膜组织而引起的一种高反应性炎性疾病^[1-2]。约 4%~10% 的耳鼻咽喉头颈外科门诊患者伴有 LPRD 相关症状, 其主要表现为声音嘶哑、咽喉部异物感、

持续性的清嗓行为、反酸烧心等一系列症候群, 部分患者还可以出现鼻部、耳部以及牙齿的问题^[1-6]。解剖学神经功能异常、黏膜保护机制的异常、损伤性因素以及局部炎症反应, 在 LPRD 的发病机制中发挥了重要作用^[7]。年龄、性别、吸烟饮酒史、不良生活习惯以及体质量指数 (body mass index,

收稿日期: 2024-03-09

基金课题: 贵州医科大学附属医院临床研究项目 (2021-GMHCT-013); 贵州医科大学 2022 年博士科研启动基金 (gyfybsky-2022-17); 贵州省科技厅 2022 年度基础研究计划 (自然科学基金) (黔科合基础-ZK[2022]一般 434); 2021 贵州省卫生健康委科学技术基金项目 (gzgwkj2021-328); 贵州医科大学附属医院国自然培育项目 (gyfynsfc-2021-45); 国家自然科学基金 (82260541)

通信作者: 马亦飞. E-mail: 84309348@qq.com

BMI) 是 LPRD 发病的危险因素,且 LPRD 与胃疾病史如胃溃疡、慢性胃炎等存在一定关联^[8-9]。下咽部食管多通道腔内阻抗监测 (HEMII-pH) 被认为是 LPRD 的诊断“金标准”,但因检查过程复杂、大部分医院仪器设备受限、成本高且有侵入性等一系列问题, LPRD 精准便捷的诊断受到了限制^[10]。LPRD 的机制和诊断仍存在许多不明确的地方,综合多种诊断方法虽然是一个合理正确的选择,但过程复杂,缺乏一个简单方便且相对统一的诊断方法。目前在

LPRD 患者及各种 LPRD 生物模型的唾液分泌物或黏膜组织中检测到了一些含量与正常人群有差异性的生物标志物,例如:胃蛋白酶、胰蛋白酶、胆汁酸等反流物质、神经源性因子以及上皮结构相关蛋白,且已有研究证明这些生物标志物对 LPRD 诊治有一定意义,本文深入总结 LPRD 相关生物标志物,从而辅助 LPRD 确诊率。咽喉反流性疾病生物标志物相关作用机制,见图 1。

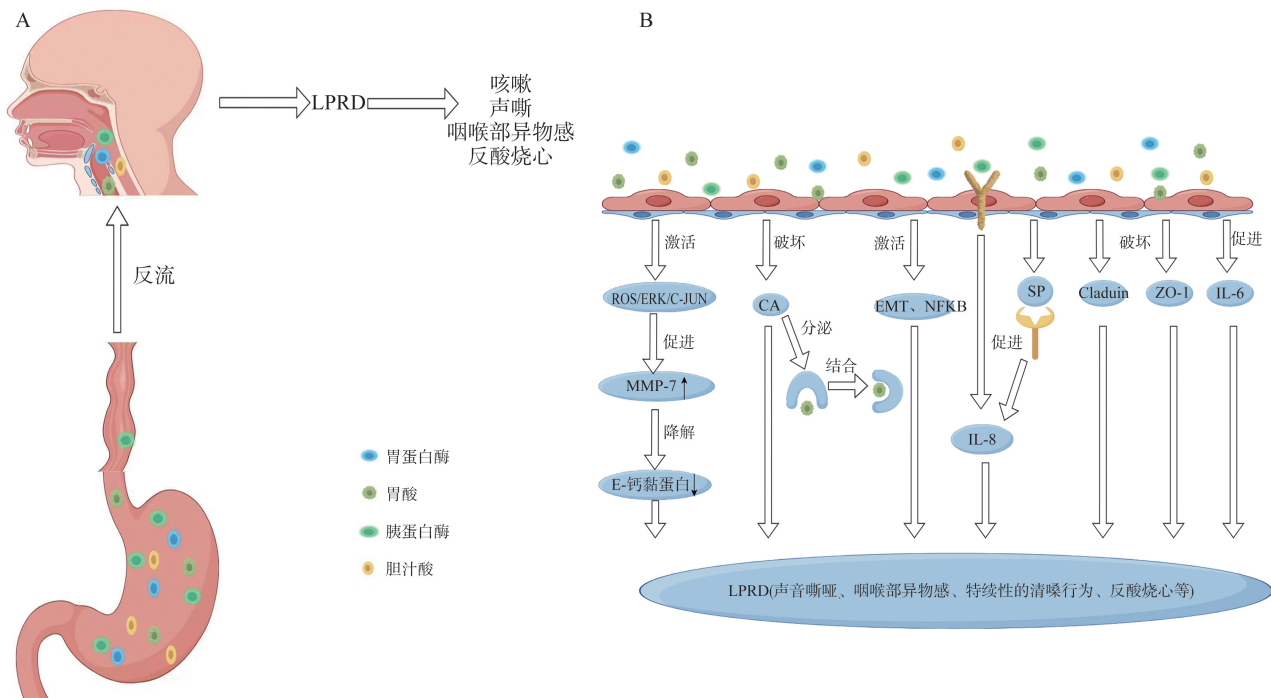


图 1 咽喉反流性疾病生物标志物相关作用机制
Figure 1 Mechanisms of action related to biomarkers in laryngopharyngeal reflux disease

1 反流物质与 LPRD

1.1 胃酸与 LPRD

在各种反流物质当中,胃酸对咽喉部黏膜刺激最强烈,且 LPRD 的严重程度与胃酸的暴露程度呈正相关^[3]。胃酸主要由表达于胃壁细胞的质子泵($H^+/K^+-ATPase$)产生,这是一种由 α 和 β 亚基(ATP4A 和 ATP4B)组成的膜结合酶,通过交换氢和钾离子将盐酸分泌到胃腔中。胃酸通常被隔离在胃内,但当它逃逸到远端食管时,会溢出到咽部和喉部,导致声音嘶哑和一连串其他症状,被认为是导致 LPRD 的原因之一^[11-12]。此外在没有相应的胃反流事件的情况下,喉部和下咽也发生酸事件,这表明喉部也表达胃 $H^+/K^+-ATPase$ 酶。喉部 $H^+/K^+-ATPase$ 的存在也会诱导胃酸产生和黏膜损伤,且其持续产酸可引起持续的局部炎症,类似于反流时观察到的炎症,但其对 LPRD 体征、症

状和相关疾病(如喉癌)的作用尚不清楚^[13-14]。在 LPRD 患者中,胃酸作用于碳酸酐酶 III (carbonic anhydrase III, CA III)、E-钙黏蛋白,引起黏膜损伤。喉部质子泵的局部酸分泌还可能激活反流事件中沉积的胃蛋白酶,从而造成进一步的损害^[15-16]。针对胃酸的抑酸治疗是目前 LPRD 首选内科治疗策略,也取得了一定的治疗效果^[17],但高达 40% 的 LPRD 患者的 PPI 治疗无法缓解症状,且系统性 PPI 治疗已被确定为多种健康状况的独立危险因素,所以研究不同反流物质对 LPRD 的影响从而形成针对性诊疗非常重要。

1.2 胃蛋白酶与 LPRD

LPRD 反流成分包括酸性反流和非酸反流,而胃蛋白酶是胃主细胞产生的胃蛋白酶原转化而来的非酸反流中造成咽喉损伤的反流物质之一,是引起蛋白水解和细胞损伤的主要因素。胃蛋白酶可通过破坏上皮细胞间连接、减少碳酸酐酶、钙黏

蛋白和热休克蛋白 70 的表达、内吞作用等损害上皮组织的屏障功能,引起咽喉部的慢性炎症。正常情况下在健康人的咽喉黏膜中无法检测到胃蛋白酶^[18],但喉黏膜良性和恶性变化受试者胃蛋白酶浓度升高,而 LPRD 又是喉良恶性病变形成的重要辅助因子,因此胃蛋白酶的异常分泌和活化对 LPRD 以及喉良恶性病变发病机制至关重要^[19]。已有文献报道过胃蛋白酶是 LPRD 具有敏感性和特异性的生物标志物,将胃蛋白酶测定作为 LPRD 的诊断指标是较为可靠的,敏感度为 90.00%,特异度为 80.00%,可用于辅助诊断 LPRD^[20]。且无论处于酸性或非酸性反流中,胃蛋白酶都会对咽喉部黏膜造成损伤,水解紧密连接蛋白、破坏 E 钙黏蛋白、上调炎症因子及通过内吞至细胞被激活引起炎症反应^[21-26]。此外有研究表明盐酸可以使胃蛋白酶原裂解形成活性更高的胃蛋白酶,且 pH 为 2 时胃蛋白酶活性最大,而 PPI 反应强度与其唾液中胃蛋白酶含量呈正比,因此唾液样本中胃蛋白酶的强阳性结果可能是一种有用的、无创的,可预测疑似反流诱导的慢性咽喉症状患者是否有更好 PPI 反应的方法^[16,27],特别是对于 PPI 出现顽固症状的患者,它被认为是一种新的治疗靶点^[19]。此外 2024 年有文献报道,针对抑酸效果不强的患者,阻挡细胞的内吞作用可间接阻挡胃蛋白酶的激活,有望成为研究新靶点^[16]。

目前临床上测量胃蛋白酶的方法多种多样,例如胃蛋白酶试纸、胃蛋白酶免疫组织化学、酶联免疫吸附测定法、point-of-care (POC) 等^[28-29]。其中胃蛋白酶检测试剂盒与胃蛋白酶免疫组织化学有较好的一致性,前者作为非侵入性诊断技术,可以联合胃蛋白酶免疫组织化学、反流症状评分 (reflux symptom index, RSI)、反流体征评分 (reflux finding score, RFS) 量表广泛应用于 LPRD 的诊断^[30]。此外还有胃蛋白酶的快速测流测试——PeptestTM,具有特异性和敏感性,是用于反流患者确认反流存在的一线诊断程序^[31-32]。由于诊断胃蛋白酶方法途径较多,而诊断标准影响了诊断价值,因此规范采样时机、检测方法以及制定可参考的诊断标准量极其重要。当 LPRD 患者处于清醒状态时的平均水平最高,胃蛋白酶水平显著高于健康人群,且有新证据表明以 50 ng/mL 作为唾液胃蛋白酶临界值时诊断 LPRD 更为准确,是评估 LPRD 的有效工具^[33-34]。但由于测量胃蛋白酶方法较多,不同测量方法及患者在不同状态下的测量结果存在差异性,临床诊疗上仍然没有确切的定量定性标准,因此探索更为精

准的用于诊断 LPRD 的唾液胃蛋白酶测试值对制定诊断标准是十分重要的^[35]。

1.3 胰蛋白酶与 LPRD

胰蛋白酶是由胰腺细胞以酶原的形式分泌的一种物质,也是胃十二指肠回流液的组成成分,并且胰蛋白酶在胃十二指肠回流液中具有一定的破坏潜力。如果胰蛋白酶在通过胃后仍保持活性,在反流过程中,可能会对食管、咽部、喉部造成炎症性损害,并且损害能力随着胃液 pH 的增加而增强^[36-37]。构建猪 LPRD 模型得出胰蛋白酶主要是通过诱导单相或双相反应对猪食管体环形平滑肌 (circular smooth muscle, CSM) 和纵向平滑肌 (longitudinal smooth muscle, LSM) 产生影响,包括短暂的收缩和短暂的松弛^[38]。在咽喉部鳞状上皮的基底层中,胰蛋白酶可以通过激活蛋白酶激活的受体-2 (PAR-2),诱导 IL-8 和 TRPV 的分泌。后者通过参与肠道炎症以及神经源性上皮反应,导致上皮屏障功能障碍及损害上皮黏膜,从而加重烧心和咽喉部疼痛症状,所以在使用胰蛋白酶抑制剂后可以改善某些患者的部分反流症状^[39-42]。

1.4 胆汁酸与 LPRD

胆汁酸是人体肝脏合成的胆汁的主要成分之一,几乎在所有 LPRD 患者的唾液中都能检测到胆汁酸,它们是胆汁反流到上气道的可靠生物标志物^[43-45]。2015 年 Sereg-BaharM 实验指出唾液中胆汁酸含量测定可以作为诊断 LPRD 的工具,尤其是针对有食管外喉部症状的患者^[46]。2021 年先后有两篇报道提出,胆汁酸诊断 LPRD 敏感性为 86%,阳性预测值为 80.7%,有可能是诊断 LPRD 的最佳生物指标。此外唾液中胆汁酸含量与 LPRD 患者症状和体征呈正相关,唾液胆汁酸 > 1 μmol/L 是评估 LPRD 严重程度的可靠指标^[47]。在对 LPRD 人群进行 pH 测定时,可以根据胆汁酸的结果分为酸性、混合性和碱性反流,其中混合性反流和碱性反流中胆汁酸的浓度比在酸性反流中高。胆汁酸造成咽喉部黏膜损伤的途径有两种,一种是胆汁酸单独发挥作用,另一种是其可能与胃蛋白酶、盐酸以协同的方式导致咽喉黏膜损伤。Laird 等^[48]的实验评估了胆汁酸影响胃蛋白酶活性的能力,得出在反流事件中无论 pH 如何,胃蛋白酶都不会被胆汁酸抑制^[49],但胆汁酸与胃蛋白酶的相互作用机制尚不完全明确。

研究表明胆汁酸和喉癌、下咽癌也密切相关,胆汁酸是后者的一个独立危险因素,而咽喉部恶性肿瘤患者 LPRD 的患病率高达 67%。且 LPRD 患者的胆

汁酸水平与症状严重程度和喉癌风险呈正相关,其主要作用于 EMT 和 NF- κ B 通道,诱导咽喉部黏膜炎症反应以及肿瘤因子的异常表达,因此胆汁酸对 LPRD 及咽喉部恶性肿瘤患者的诊治有重要的临床价值^[50-54]。

2 神经源性炎症因子与 LPRD

长期有害刺激会引起组织损伤,并产生自发疼痛,伤害性刺激导致与刺激强度不成比例的疼痛使得组织痛觉过敏,同时炎症部位释放的物质通过激活或募集致敏神经纤维使得痛觉信息被放大,这种现象被称为神经源性炎症^[54]。LPRD 人群的咽喉部长期接受胃、十二指肠内容物的有害刺激而产生不适,同时神经源性炎症的作用使得这种不适放大,形成咽喉部高敏感性。在这个过程中,介导该炎症反应的物质称作神经源性炎症因子,包括白介素(IL)、P 物质(substance P, SP)、干扰素、生长因子、细胞刺激因子等^[55]。经过研究发现,LPRD 患者咽喉部黏膜唾液中白介素、神经源性炎症因子(如 P 物质等)表达水平会出现不同程度的改变。

有文献明确指出,将白介素 6(IL-6) 视为食管和咽喉黏膜中反流相关炎症的指标是合理的,并且 IL-6 水平随着反流病理分级的增加而增加,在反流疾病治疗后 IL-6 水平降低。即发生反流疾病事件时 IL-6 表达情况增多,并与咽喉反流严重程度呈正相关变化^[56-57]。P 物质是常见的神经源性炎症因子之一,其与神经肽受体 1 结合可扩大炎症反应^[49]。蛋白基因产物 9.5(PGP9.5) 是神经元和神经纤维的特异性标记物。动物模型中发现咽喉反流发生时,SP 刺激单纯表达全长型 NKG1R 受体的 HEK293 细胞后,白细胞介素 8(IL-8) 表达增多及 PGP9.5 呈高表达,证明神经源性炎症参与了 LPRD 的发生。PGP9.5 是神经元和神经纤维的特异性标记物。探讨神经源性炎症与 LPRD 关系的文献先后报道,大鼠 LPRD 模型以及兔 LPRD 模型中 IL-8 表达、PGP9.5 表达量明显升高,说明神经源性炎症有可能参与 LPRD 的发生^[27,58]。虽然神经源性因子在 LPRD 中有一定的作用,但目前研究层面集中在动物模型及实验,没有投入临床研究,其造成损伤的分子通路还有待进一步探究。

3 上皮结构蛋白与 LPRD

3.1 紧密连接蛋白 Claudin 与 LPRD

紧密连接蛋白(Tight junction, TJ)是调节细胞和溶质通过细胞间隙主要屏障的一种细胞间连接复

合物^[59],Claudin 是 TJ 跨膜蛋白家族成员之一,通过维持对小离子的细胞旁选择性在 TJ 屏障中发挥关键作用^[60-61]。Oguro 等^[61]研究数据表明,食管上皮的 Claudin-3 可能是一种特异性和敏感性指标,其适用于监测食管反流的炎症和恢复过程。有实验报道,大鼠 LPRD 模型中食管和喉 Claudin-3 的表达明显低于对照组^[62],这表明 Claudin-3 可能是大鼠反流性喉炎的敏感指标。此外胃食管反流中,Claudin-1、Claudin-4 的蛋白表达均显著降低^[63],且 Claudin-1 可用于监测酸诱导黏膜损伤后 TJ 结构蛋白和上皮屏障恢复^[64]。目前已有的研究虽然存在年限早、样本量小、缺乏临床试验、损伤机制不完全明确等不足,但其已指出 Claudin 蛋白家族与 LPRD 有一定关联,因此 Claudin 有望成为 LPRD 诊疗新靶点。

3.2 紧密连接蛋白(zonula occludens 1, ZO-1)与 LPRD

紧密连接蛋白(ZO-1)是 TJ 重要组成蛋白之一,与参与调节细胞物质转运和维持上皮极性、细胞增殖分化、肿瘤细胞转移、基因转录等过程的信息传递调控有关^[65]。胃食管反流的患者中,食管下端 ZO-1 的表达显著低于食管中段^[66]。近年吴昆旻等^[67-70]先后通过实验验证了紧密连接蛋白在咽喉反流中的表达,表明咽喉反流可以导致紧密连接结构破坏,而 ZO-1 是咽喉反流的靶点之一,即发生 LPRD 时,相关蛋白功能表达异常,Claudin-1 和 ZO-1 两种蛋白表达减少。郝梅等^[71]的研究结果显示睡眠剥夺可能通过影响 ZO-1 表达引起咽喉上皮细胞屏障功能障碍,从而导致 LPRD 发生,也为 LPRD 的发病机制提供参考。此外近年的实验通过检验正常动物喉部黏附分子和紧密连接分子的特征从而提出猪喉模型更为适合用于研究人咽喉反流的分子异常,也进一步证明了 TJ 与 LPRD 密切相关^[72]。

3.3 碳酸酐酶(Carbonic Anhydrase, CA)与 LPRD

碳酸酐酶(CA)是上皮防御机制的一个组成成分之一,其通过分泌物质与酸中和从而减少酸反流对咽喉黏膜的损伤。CA-III 是 CA 家族成员之一,Johnston 等^[73]研究发现 CA-III 可作为 LPRD 诊断标志物,且 CA-III 含量降低是 LPRD 过程中胃蛋白酶暴露使喉黏膜受损导致的结果。当 CA 分泌减少,尤其是 CA-III 分泌减少时会导致 pH 调节失衡从而导致 LPRD 发生,即 LPRD 和 CA-III 之间存在一定相关性^[74]。且 CA-III 在 LPRD 患者咽喉不同部位的表达含量不同:在声带上皮中表达减少,后连合中表达

增加^[75]。

3.4 基质金属蛋白酶-7 (matrix metalloproteinase-7, MMP-7)、E-钙黏蛋白与 LPRD

既往研究表明, LPRD 中鼻黏膜连接通透性的增加可能是由于与细胞间粘附分子(如 E-钙黏蛋白)的蛋白质桥形成被破坏有关。该实验提出鼻黏膜炎症、LPRD、E-钙黏蛋白三者之间存在联系, E-钙黏蛋白可作为 LPRD 的特殊生物标志物^[73-74]。近年有文献先后报道在暴露于酸的咽喉上皮细胞中 MMP-7 表达增加, 黏膜黏附分子 E-钙黏蛋白表达含量减少, 这是反流引起的炎症反应结果^[55, 75-76]。此外研究者也进一步探讨了其中的机制, 结果显示 LPRD 中 MMP-7 增加是通过 ROS/ERK/c-Jun 途径诱导的, 而 MMP-7 具有降解 E-钙黏蛋白的功能, 使其表达量减少^[77]。当 MMP-7 和胃蛋白酶这两种标记物联合使用时, 诊断 LPRD 的灵敏度和特异度都得到了提高。因此可以将 MMP-7、E-钙黏蛋白和黏蛋白视作 LPRD 敏感性指标, 用于 LPRD 的初步诊断以及后期治疗评估指标。

4 讨论

LPRD 发病率逐渐上升, 精确诊断 LPRD 是临床医师一直追寻的目标。不同的反流物质对 LPRD 有不同的作用, 会引起咽喉炎症性疾病和肿瘤性疾病, 针对致病因素的治疗方案也应做出相应调整。但该方面的研究仍然存在范围小、研究层次不深的局限性。胃酸作为最常见的反流物质, 介导了咽喉部黏膜的损伤, 但胃壁细胞及咽喉部同时存在着产生胃酸的 H⁺/K⁺-ATPase 酶, 即不论反流发生与否, 咽喉部都存在胃酸, 作为咽喉反流标志物其特异性受到一定限制。此外, 仍没有文献报道过咽喉部痰液中胃酸阈值为何值时, 可作为诊断反流标准, 所以胃酸作为咽喉反流标志物仍需进一步研究。胃蛋白酶是 LPRD 的研究热点, 并且可能是顽固性反流存在的新治疗靶点。但胃蛋白酶的测量仍存在不确定因素, 即采样时间、次数、采样时患者 LPRD 发作与否都可能导致不同的标准诊断值, 所以仍需进一步完善其诊疗标准。胆汁酸、胰蛋白酶在 LPRD 中有着一定的作用, 但其作用机制及对诊断 LPRD 仍有一定局限性。神经源性炎症因子及相关上皮结构蛋白研究层面较浅, 需进一步研究确定损伤机制。不同类型 LPRD 主要致病因素不同, 针对致病因素的治疗方案也可做出相应调整。通过反流物质诊断 LPRD, 同时也可更精准制定治疗方案。

5 问题与展望

LPRD 的最新治疗方案包括 3 个月内的饮食措施改善、质子泵抑制剂的使用、藻酸盐和甲藻酸盐的联合用药, 以及最后的治疗适应^[78], 近些年来 LPRD 研究重点多集中在反流损伤机制以及生物标志物上, 追求特异性的 LPRD 生物标志物不仅可拓宽 LPRD 诊断的思路方向, 也能为不同类型 LPRD 制定更具特异性的治疗方案。因此找到 LPRD 便捷、准确的生物标志物是近年的研究热点。但目前为止的所有研究, 均不能完全涵盖总结出生物标志物的类型, 且尚未发现一个具有高度特异性、能够达到 LPRD 理想诊治效果的生物标志物。该方面的研究仍然存在范围小、研究层次不深的局限性。除此之外, 在 LPRD 人群中反流物质或者异常表达的物质都存在变动性, 它们的检测标准、灵敏度和特异性并不完全相同。因此生物标志物广泛应用于 LPRD 的临床诊断仍然需要一定的过程。LPRD 有关的生物标志物多种多样, 每种物质之间也许存在着一定的潜在联系, 所以在寻找单一、确切性指标时, 或许可以联合多种可靠的指标, 形成确切诊断 LPRD 生物标记物的有效体系, 从而达到有预见性地诊断 LPRD。即在多样性指标中, 考虑指标在作用机制和生物来源中的共同性, 逐步实现临床实践里生物标志物诊断 LPRD 有效体系的思路, 更方便快捷地诊治 LPRD。

参考文献:

- [1] Lechien JR, Schindler A, De Marrez LG, et al. Instruments evaluating the clinical findings of laryngopharyngeal reflux: a systematic review[J]. *Laryngoscope*, 2019, 129(3): 720-736. doi:10.1002/lary.27537
- [2] Sereg-Bahar M, Jerin A, Jansa R, et al. Pepsin and bile acids in saliva in patients with laryngopharyngeal reflux - a prospective comparative study [J]. *Clin Otolaryngol*, 2015, 40(3): 234-239. doi:10.1111/coa.12358
- [3] Lechien JR, Finck C, Khalife M, et al. Change of signs, symptoms and voice quality evaluations throughout a 3- to 6-month empirical treatment for laryngopharyngeal reflux disease[J]. *Clin Otolaryngol*, 2018, 43(5): 1273-1282. doi:10.1111/coa.13140
- [4] 徐志宇, 刘旭, 陈世彩, 等. 咽喉反流性疾病的发病机制及其与耳鼻咽喉疾病相关性研究进展[J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2022, 30(6): 587-590. doi:10.3969/j.issn.1006-7299.2022.06.004
- [5] Lechien JR, Chiesa-Estomba CM, Calvo Henriquez C, et al. Laryngopharyngeal reflux, gastroesophageal reflux and

- dental disorders: a systematic review[J]. PLoS One, 2020, 15(8): e0237581. doi:10.1371/journal.pone.0237581
- [6] Lechien J R, Saussez S, Nacci A, et al. Association between laryngopharyngeal reflux and benign vocal folds lesions: A systematic review [J]. Laryngoscope, 2019, 129(9):E329-E341. doi:10.1002/lary.27932
- [7] 赵博, 杨启梅, 王鑫, 等. 咽喉反流与分泌性中耳炎的相关研究进展[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2018, 26(6): 681-684. doi:10.3969/j.issn.1006-7299.2018.06.028
- [8] Lechien JR. Personalized treatments based on laryngopharyngeal reflux patient profiles: a narrative review [J]. J Pers Med, 2023, 13(11): 1567. doi:10.3390/jpm13111567
- [9] 郎永耀, 杨云, 刘晴, 等. 咽喉反流性疾病的影响因素及治疗效果分析[J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2019, 33(3): 119-123. doi:10.6040/j.issn.1673-3770.0.2018.472
LANG Yongyao, YANG Yun, LIU Qing, et al. Analysis of influencing factors and observation of therapeutic effects in patients with laryngopharyngeal reflux disease [J]. Journal of Otolaryngology and Ophthalmology of Shandong University, 2019, 33(3): 119-123. doi:10.6040/j.issn.1673-3770.0.2018.472
- [10] Lechien Jerome R, Saussez Sven, Karkos Petros D. Laryngopharyngeal reflux disease: clinical presentation, diagnosis and therapeutic challenges in 2018 [J]. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg, 2018, 26: 392-402. doi:10.1097/MOO.0000000000000486.
- [11] Brown J, Shermetaro C. Laryngopharyngeal Reflux [M]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024, Jan. PMID: 30137832.
- [12] McCormick CA, Samuels TL, Battle MA, et al. H+/K+ ATPase expression in the larynx of laryngopharyngeal reflux and laryngeal cancer patients [J]. Laryngoscope, 2021, 131(1): 130-135. doi:10.1002/lary.28643
- [13] Becker V, Bajbouj M, Waller K, et al. Clinical trial: persistent gastro-oesophageal reflux symptoms despite standard therapy with proton pump inhibitors—a follow-up study of intraluminal-impedance guided therapy [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2007, 26(10): 1355-1360. doi:10.1111/j.1365-2036.2007.03529.x
- [14] Becker V, Drabner R, Graf S, et al. New aspects in the pathomechanism and diagnosis of the laryngopharyngeal reflux—clinical impact of laryngeal proton pumps and pharyngeal pH metry in extraesophageal gastroesophageal reflux disease [J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(3): 982-987. doi:10.3748/wjg.v21.i3.982
- [15] Li YD, Xu GF, Zhou BD, et al. Effects of acids, pepsin, bile acids, and trypsin on laryngopharyngeal reflux diseases: physiopathology and therapeutic targets [J]. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2022, 279(6): 2743-2752. doi:10.1007/s00405-021-07201-w
- [16] 郑彦焱, 颜冬惠, 陈十燕, 等. 胃蛋白酶在不同 pH 条件下对咽喉黏膜上皮的作用 [J/OL]. 听力学及言语疾病杂志, 2024; 1-5 (2024-01-15). <https://kns.cnki.net/kcms/detail/42.1391.R.20240111.1707.008.html>.
ZHENG Yanyan, YAN Donghui, CHEN Shiyan, et al. The effects of pepsin on the mucosal epithelium of the laryngopharynx under different pH condition [J/OL]. Journal of Audiology and Speech Pathology, 2024; 1-5 (2024-01-15). <https://kns.cnki.net/kcms/detail/42.1391.R.20240111.1707.008.html>.
- [17] 李进让. 咽喉反流性疾病规范化诊断和治疗 [J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科, 2015, 22(9): 435-437. doi:10.16066/j.1672-7002.2015.09.001
- [18] Formánek M, Jančatová D, Komínek P et al. Laryngopharyngeal reflux and herpes simplex virus type 2 are possible risk factors for adult-onset recurrent respiratory papillomatosis (prospective case-control study) [J]. Clin Otolaryngol, 2017, 42(3): 597-601. doi:10.1111/coa.12779
- [19] Zubčić Ž, Mendeš T, Včeva A, et al. Presence of pepsin in laryngeal tissue and saliva in benign and malignant neoplasms [J]. Biosci Rep, 2020, 40(11): BSR20200216. doi:10.1042/BSR20200216
- [20] 陶艳丽, 苑铁君. 唾液胃蛋白酶检测在反流性咽喉炎诊断中的价值 [J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2018, 32(6): 52-55. doi:10.6040/j.issn.1673-3770.0.2018.219
TAO Yanli, YUAN Tiejun. Diagnostic value of detection of pepsin in the saliva for laryngopharyngeal reflux [J]. Journal of Otolaryngology and Ophthalmology of Shandong University, 2018, 32(6): 52-55. doi:10.6040/j.issn.1673-3770.0.2018.219
- [21] Hurley BP, Jugo RH, Snow RF, et al. Pepsin triggers neutrophil migration across acid damaged lung epithelium [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 13778. doi:10.1038/s41598-019-50360-4
- [22] Gtari W, Bey H, Aschi A, et al. Impact of macromolecular crowding on structure and properties of pepsin and trypsin [J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2017, 72: 98-105. doi:10.1016/j.msec.2016.11.046
- [23] Kowalik K, Krzeski A. The role of pepsin in the laryngopharyngeal reflux [J]. Otolaryngol Pol, 2017, 71(6): 7-13. doi:10.5604/01.3001.0010.7194
- [24] Samuels TL, Zimmermann MT, Zeigham A, et al. RNA sequencing reveals cancer-associated changes in laryngeal cells exposed to non-acid pepsin [J]. Laryngoscope, 2021, 131(1): 121-129. doi:10.1002/lary.28636
- [25] 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(1): 64. doi:10.1186/s12935-019-0772-7

- [26] Johnston N, Yan JC, Hoekzema CR, et al. Pepsin promotes proliferation of laryngeal and pharyngeal epithelial cells[J]. *Laryngoscope*, 2012, 122(6): 1317-1325. doi:10.1002/lary.23307
- [27] Wang CP, Wang CC, Lien HC, et al. Saliva pepsin detection and proton pump inhibitor response in suspected laryngopharyngeal reflux[J]. *Laryngoscope*, 2019, 129(3): 709-714. doi:10.1002/lary.27502
- [28] 万苒辰, 闫燕, 马芙蓉. 咽喉反流的机制及诊断方法[J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2013, 21(2): 200-204. doi:10.3969/j.issn.1006-7299.2013.02.032
- [29] Landry V, Coburn P, Kost K, et al. Diagnostic accuracy of liquid biomarkers in airway diseases: toward point-of-care applications[J]. *Front Med*, 2022, 9: 855250. doi:10.3389/fmed.2022.855250
- [30] 高竞逾, 罗仁婧, 阮标, 等. 胃蛋白酶免疫组织化学与胃蛋白酶检测试剂盒在咽喉反流诊断中的一致性分析[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2023, 37(2): 97-102, 106. doi:10.13201/j.issn.2096-7993.2023.02.004
 GAO Jingyu, LUO Renjing, RUAN Biao, et al. Consistency analysis of pepsin immunohistochemistry and pepsin test box in the diagnosis of laryngopharyngeal reflux[J]. *Journal of Clinical Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery*, 2023, 37(2): 97-102, 106. doi:10.13201/j.issn.2096-7993.2023.02.004
- [31] Saritas Yuksel E, Hong SK, Strugala V, et al. Rapid salivary pepsin test: blinded assessment of test performance in gastroesophageal reflux disease[J]. *Laryngoscope*, 2012, 122(6): 1312-1316. doi:10.1002/lary.23252
- [32] Bor S, Capanoglu D, Vardar R, et al. Validation of pepsinTM in patients with gastro-esophageal reflux disease and laryngopharyngeal reflux undergoing impedance testing[J]. *J Gastrointest Liver Dis*, 2019, 28(4): 383-387. doi:10.15403/jgld-335
- [33] Na SY, Kwon OE, Lee YC, et al. Optimal timing of saliva collection to detect pepsin in patients with laryngopharyngeal reflux[J]. *Laryngoscope*, 2016, 126(12): 2770-2773. doi:10.1002/lary.26018
- [34] Klimara MJ, Johnston N, Samuels TL, et al. Correlation of salivary and nasal lavage pepsin with MII-pH testing[J]. *Laryngoscope*, 2020, 130(4): 961-966. doi:10.1002/lary.28182
- [35] Jing WY, Luo WL, Lou L. Diagnostic utility of salivary pepsin in laryngopharyngeal reflux: a systematic review and meta-analysis[J]. *Braz J Otorhinolaryngol*, 2023, 89(2): 339-347. doi:10.1016/j.bjorl.2022.10.050
- [36] Pearson JP, Parikh S, Orlando RC, et al. Review article: reflux and its consequences: the laryngeal, pulmonary and oesophageal manifestations. Conference held in conjunction with the 9th International Symposium on Human Pepsin (ISHP) Kingston-upon-Hull, UK, 21-23 April 2010[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2011, 33(1): 1-71. doi:10.1111/j.1365-2036.2011.04581.x
- [37] Naito Y, Uchiyama K, Kuroda M, et al. Role of pancreatic trypsin in chronic esophagitis induced by gastroesophageal reflux in rats[J]. *J Gastroenterol*, 2006, 41(3): 198-208. doi:10.1007/s00535-005-1742-5
- [38] Tanaka Y, Ihara E, Hirano K, et al. Trypsin-induced biphasic regulation of tone in the porcine lower esophageal sphincter[J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 752: 97-105. doi:10.1016/j.ejphar.2015.02.008
- [39] Bai XP, Tanaka Y, Ihara E, et al. Trypsin induces biphasic muscle contraction and relaxation via transient receptor potential vanilloid 1 and neurokinin receptors 1/2 in porcine esophageal body[J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 797: 65-74. doi:10.1016/j.ejphar.2017.01.004
- [40] Cao J, Zhang LH, Liu YJ, et al. Properties of a novel animal model of LPRD[J]. *J Voice*, 2021, 35(5): P805.e17-805.e26. doi:10.1016/j.jvoice.2020.01.021
- [41] Silva RO, Bingana RD, Sales TMAL, et al. Role of TRPV1 receptor in inflammation and impairment of esophageal mucosal integrity in a murine model of nonerosive reflux disease[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2018; e13340. doi:10.1111/nmo.13340
- [42] Suzuki N, Mihara H, Nishizono H, et al. Protease-activated receptor-2 up-regulates transient receptor potential vanilloid 4 function in mouse esophageal keratinocyte[J]. *Dig Dis Sci*, 2015, 60(12): 3570-3578. doi:10.1007/s10620-015-3822-6
- [43] De Corso E, Baroni S, Agostino S, et al. Bile acids and total bilirubin detection in saliva of patients submitted to gastric surgery and in particular to subtotal Billroth II resection[J]. *Ann Surg*, 2007, 245(6): 880-885. doi:10.1097/01.sla.0000255574.22821.a1
- [44] Wang L, Liu X, Liu YL, et al. Correlation of pepsin-measured laryngopharyngeal reflux disease with symptoms and signs[J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2010, 143(6): 765-771. doi:10.1016/j.otohns.2010.08.018
- [45] Fiorucci S, Distrutti E, di Matteo F, et al. Circadian variations in gastric acid and pepsin secretion and intragastric bile acid in patients with reflux esophagitis and in healthy controls[J]. *Am J Gastroenterol*, 1995, 90(2): 270-276
- [46] Sereg-Bahar M, Jerin A, Jansa R, et al. Pepsin and bile acids in saliva in patients with laryngopharyngeal reflux - a prospective comparative study[J]. *Clin Otolaryngol*, 2015, 40(3): 234-239. doi:10.1111/coa.12358
- [47] De Corso E, Baroni S, Salonna G, et al. Impact of bile acids on the severity of laryngo-pharyngeal reflux[J].

- Clin Otolaryngol, 2021, 46(1): 189-195. doi:10.1111/coa.13643
- [48] Laird JM, Olivar T, Roza C, et al. Deficits in visceral pain and hyperalgesia of mice with a disruption of the tachykinin NK1 receptor gene[J]. Neuroscience, 2000, 98(2): 345-352. doi:10.1016/s0306-4522(00)00148-2
- [49] Ali MS, Parikh S, Chater P, et al. Bile acids in laryngopharyngeal refluxate: will they enhance or attenuate the action of pepsin? [J]. Laryngoscope, 2013, 123(2): 434-439. doi:10.1002/lary.23619
- [50] Sereg-Bahar M, Jerin A, Hocevar-Boltezar I. Higher levels of total pepsin and bile acids in the saliva as a possible risk factor for early laryngeal cancer[J]. Radiol Oncol, 2015, 49(1): 59-64. doi:10.2478/raon-2014-0020
- [51] Vageli DP, Doukas SG, Doukas PG, et al. Bile reflux and hypopharyngeal cancer (Review)[J]. Oncol Rep, 2021, 46(5): 244. doi:10.3892/or.2021.8195
- [52] Galli J, Calò L, Agostino S, et al. Bile reflux as possible risk factor in laryngopharyngeal inflammatory and neoplastic lesions[J]. Acta Otorhinolaryngol Ital, 2003, 23(5): 377-382
- [53] De Corso E, Baroni S, Agostino S, et al. Bile acids and total bilirubin detection in saliva of patients submitted to gastric surgery and in particular to subtotal Billroth II resection[J]. Ann Surg, 2007, 245(6): 880-885. doi:10.1097/01.sla.0000255574.22821.a1
- [54] 王刚,林春兰,刘蔓林,等.咽喉反流性疾病中 SP、NK-1R、IL-8、PGP9.5 的表达及意义[J].听力学及言语疾病杂志,2022, 30(6): 582-586. doi:10.3969/i.issn.1006-7299.2022.06.003
- WANG Gang, LIN Chunlan, LIU Manlin, et al. Expression and Significance of SP, NK-1R, IL-8, PGP9.5 in Laryngopharyngeal Reflux Disease[J]. Journal of Audiology and Speech Pathology, 2022, 30(6): 582-586. doi:10.3969/i.issn.1006-7299.2022.06.003
- [55] 孙建梅,刘彤彤,唐宗湘.神经源性炎症痛的分子机制及研究进展[J].中国疼痛医学杂志,2022, 28(7): 486-493. doi:10.3969/j.issn.1006-9852.2022.07.003
- SUN Jianmei, LIU Tongtong, TANG Zongxiang. Molecular mechanism and research progress of neurogenic inflammatory pain[J]. Chinese Journal of Pain Medicine, 2022, 28(7): 486-493. doi:10.3969/j.issn.1006-9852.2022.07.003
- [56] Wood JM, Hussey DJ, Woods CM, et al. Biomarkers and laryngopharyngeal reflux[J]. J Laryngol Otol, 2011, 125(12): 1218-1224. doi:10.1017/S0022215111002234
- [57] Chen W, Zhang Y, Cheng Y, et al. The role of NF- κ B signaling pathway in laryngeal leukoplakia recurrent with laryngeal reflux[J]. Chin J Otorhinolaryngol Head Neck Surg, 2018, 53(8): 597-603. doi:10.3760/cma.j.issn.1673-0860.2018.08.008
- [58] 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
- 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]. Chinese Journal of Otorhinolaryngology-Skull Base Surgery, 2020, 26(3): 278-282. doi:10.11798/j.issn.1007-1520.202003010
- [59] 李明航,刘海林,刁俊玲,等.紧密连接蛋白 Claudin-3 的研究进展[J].现代医药卫生,2022, 38(11): 1896-1899. doi:10.3969/j.issn.1009-5519.2022.11.022
- [60] Zeissig S, Bürgel N, Günzel D, et al. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease[J]. Gut, 2007, 56(1): 61-72. doi:10.1136/gut.2006.094375
- [61] Oguro M, Koike M, Ueno T, et al. Dissociation and dispersion of claudin-3 from the tight junction could be one of the most sensitive indicators of reflux esophagitis in a rat model of the disease[J]. J Gastroenterol, 2011, 46(5): 629-638. doi:10.1007/s00535-011-0390-1
- [62] Björkman EVC, Edebo A, Oltean M, et al. Esophageal barrier function and tight junction expression in healthy subjects and patients with gastroesophageal reflux disease: functionality of esophageal mucosa exposed to bile salt and trypsin in vitro [J]. Scand J Gastroenterol, 2013, 48(10): 1118-1126. doi:10.3109/00365521.2013.828772
- [63] Xu XB, Hu Y, Wang Y, et al. Expression of claudin-3 in the esophagus and larynx of rat reflux model[J]. Auris Nasus Larynx, 2014, 41(6): 539-542. doi:10.1016/j.anl.2014.05.011
- [64] Meloni M, Buratti P, Carriero F, et al. In vitro modeling of barrier impairment associated with gastro-oesophageal reflux disease (GERD) [J]. Clin Exp Gastroenterol, 2021, 14: 361-373. doi:10.2147/CEG.S325346
- [65] Okimoto K, Arai M, Ishigami H, et al. A prospective study of eosinophilic esophagitis and the expression of tight junction proteins in patients with gastroesophageal reflux disease symptoms[J]. Gut Liver, 2018, 12(1): 30-37. doi:10.5009/gnl16600
- [66] 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. doi:10.3969/j.issn.1007-3213.2007.06.024
- [67] Neumann H, Mönkemüller K, Fry LC, et al. Intercellular space volume is mainly increased in the basal layer of

- esophageal squamous epithelium in patients with GERD [J]. *Dig Dis Sci*, 2011, 56(5): 1404-1411. doi:10.1007/s10620-010-1458-0
- [68] Orlando LA, Orlando RC. Dilated intercellular spaces as a marker of GERD [J]. *Curr Gastroenterol Rep*, 2009, 11(3): 190-194. doi:10.1007/s11894-009-0030-6
- [69] 吴昆旻, 李泽卿, 朱春晖, 等. 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 [J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2017, 23(6): 541-545. doi:10.11798/j.issn.1007-1520.201706009
- WU Kunmin, LI Zeqing, ZHU Chunhui, et al. Expressions of tight junction proteins in vocal mucosa of patients suffering from vocal leukoplakia accompanied with laryngopharyngeal reflux [J]. *Chinese Journal of Otorhinolaryngology-Skull Base Surgery*, 2017, 23(6): 541-545. doi:10.11798/j.issn.1007-1520.201706009
- [70] Gill GA, Buda A, Moorghen M, et al. Characterisation of adherens and tight junctional molecules in normal animal larynx; determining a suitable model for studying molecular abnormalities in human laryngopharyngeal reflux [J]. *J Clin Pathol*, 2005, 58(12): 1265-1270. doi:10.1136/jcp.2004.016972
- [71] 郝梅, 蒋兴旺, 陈浩, 等. 睡眠剥夺大鼠喉上皮细胞屏障功能改变在咽喉反流发病机制中的作用 [J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2022, 30(6): 577-581. doi:10.3969/j.issn.1006-7299.2022.06.002
- HAO Mei, JIANG Xingwang, CHEN Hao, et al. The role of barrier function of laryngeal epithelial cells in the pathogenesis of laryngopharyngeal reflux in sleep deprived rats [J]. *Journal of Audiology and Speech Pathology*, 2022, 30(6): 577-581. doi:10.3969/j.issn.1006-7299.2022.06.002
- [72] Campagnolo AM, Priston J, Thoen RH, et al. Laryngopharyngeal reflux: diagnosis, treatment, and latest research [J]. *Int Arch Otorhinolaryngol*, 2014, 18(2): 184-191. doi:10.1055/s-0033-1352504
- [73] Johnston N, Dettmar PW, Bishwokarma B, et al. Activity/stability of human pepsin; implications for reflux attributed laryngeal disease [J]. *Laryngoscope*, 2007, 117(6): 1036-1039. doi:10.1097/MLG.0b013e31804154c3
- [74] Johnston N, Knight J, Dettmar PW, et al. Pepsin and carbonic anhydrase isoenzyme III as diagnostic markers for laryngopharyngeal reflux disease [J]. *Laryngoscope*, 2004, 114(12): 2129-2134. doi:10.1097/01.mlg.0000149445.07146.03
- [75] Johnston N, Bulmer D, Gill GA, et al. Cell biology of laryngeal epithelial defenses in health and disease: further studies [J]. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2003, 112(6): 481-491. doi:10.1177/000348940311200601
- [76] Im NR, Lee DY, Kim B, et al. Role of matrix metalloproteinases 7 in the pathogenesis of laryngopharyngeal reflux: decreased E-cadherin in acid exposed primary human pharyngeal epithelial cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(21): 5276. doi:10.3390/ijms20215276
- [77] Im NR, Kim B, Jung KY, et al. Correction to: matrix metalloproteinase-7 induces E-cadherin cleavage in acid-exposed primary human pharyngeal epithelial cells via the ROS/ERK/c-Jun pathway [J]. *J Mol Med*, 2022, 100(7): 1091. doi:10.1007/s00109-022-02212-4
- [78] Lechien JR, Mouawad F, Bobin F, et al. Review of management of laryngopharyngeal reflux disease [J]. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis*, 2021, 138(4): 257-267. doi:10.1016/j.anorl.2020.11.002

(编辑:李纬)