

## 声带白斑组织中胃蛋白酶的表达分析

牛燕燕, 顾伟, 金晓峰, 霍红, 杨大海, 崔婷婷, 王剑

中国医学科学院北京协和医学院北京协和医院 耳鼻喉科, 北京 100730

**摘要:**目的 研究胃蛋白酶在不同病理类型的声带白斑组织中的表达,探讨声带白斑与咽喉反流的相关性。方法 回顾性分析 71 例声带白斑患者的临床资料。采用免疫组织化学染色的方法,分析胃蛋白酶在不同病理类型声带白斑中的表达。采用多因素分析明确咽喉反流与声带白斑的关系。结果 71 例患者中,男 63 例、女 8 例;40~75 岁,平均(58.6±8.6)岁。声带白斑低级别异型增生组和高级别异型增生组中,胃蛋白酶染色阳性的比例分别为 23.4%(11/47)和 75%(18/24),具有统计学意义。在调整了患者年龄、性别、吸烟及饮酒高危因素后,胃蛋白酶阳性亦增加了高级别异型增生的风险,其 OR 值为 9.64(95% CI 为 2.96-31.38)。结论 作为咽喉反流标志物的胃蛋白酶是声带白斑高级别异型增生的独立危险因素。咽喉反流可能是声带白斑高级别异型增生的潜在危险因素之一。

**关键词:**咽喉反流;声带白斑;低级别异型增生;高级别异型增生;胃蛋白酶

**中图分类号:**R766.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1673-3770(2024)06-0066-05

**引用格式:**牛燕燕,顾伟,金晓峰,等.声带白斑组织中胃蛋白酶的表达分析[J].山东大学耳鼻喉眼学报,2024,38(6):66-70.  
NIU Yanyan, GU Wei, JIN Xiaofeng, et al. Expression analysis of pepsin in vocal cord leukoplakia tissues[J]. Journal of Otolaryngology and Ophthalmology of Shandong University, 2024, 38(6):66-70.

### Expression analysis of pepsin in vocal cord leukoplakia tissues

NIU Yanyan, GU Wei, JIN Xiaofeng, HUO Hong, YANG Dahai, CUI Tingting, WANG Jian

Department of Otolaryngology, Peking Union Medical College Hospital, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China

**Abstract: Objective** To investigate the expression of pepsin in different pathological types of vocal cord leukoplakia tissues and to explore the relationship between vocal cord leukoplakia and laryngopharyngeal reflux (LPR), providing evidence for the prevention and treatment of vocal cord leukoplakia. **Methods** Clinical data of 71 patients with vocal cord leukoplakia were retrospectively analyzed. Immunohistochemical staining was used to analyze the expression of pepsin in vocal cord leukoplakia tissues. Multivariate analysis was performed to clarify the relationship between laryngopharyngeal reflux and vocal cord leukoplakia. **Results** Among the 71 patients, there were 63 males and 8 females. The age ranged from 40 to 75 years with a mean age of 58.6±8.6 years. The proportions of positive pepsin staining in the low-grade dysplasia group and the high-grade dysplasia group of vocal cord leukoplakia were 23.4% (11/47) and 75% (18/24), respectively, with statistical significance. After adjustment for possible risk factors such as age, gender, smoking and alcohol consumption, positive pepsin expression also increased the risk of high-grade dysplasia with an odds ratio of 9.64 (95% CI: 2.96-31.38). **Conclusion** Pepsin, as a biomarker of LPR, is an independent risk factor for high-grade dysplasia of vocal cord leukoplakia. LPR may be one of the potential risk factors for high-grade dysplasia of vocal cord leukoplakia.

**Key words:** Laryngopharyngeal reflux; Vocal cord leukoplakia; Low-grade dysplasia; High-grade dysplasia; Pepsin

咽喉反流(laryngopharyngeal reflux, LPR)是指胃十二指肠内容物反流至食管上括约肌以上的上呼吸道,可引起上呼吸道的形态学改变及一系列症状和体征,如咽干、咽痛、咽异物感、声音嘶哑、频繁清嗓、咳嗽、阵发性喉痉挛等<sup>[1,2]</sup>。近年来,LPR与喉部多种良、恶性病变之间的联系逐渐受到关注,包括声带小结、声带息肉、任克水肿、复发性呼吸道乳头状瘤病、声带白斑及喉癌<sup>[3-7]</sup>。声带白斑

作为一种潜在的癌前病变,其发病机制复杂多样,但越来越多的证据表明 LPR 可能是其重要的致病因素之一<sup>[5,7]</sup>。然而,关于声带白斑与 LPR 之间的确切关联,目前尚存在争议。

本研究选取胃蛋白酶(pepsin)作为 LPR 的生物标志物,在声带白斑病变组织中进行免疫组织化学染色,以代表声带黏膜暴露于胃内容物的反流事件。探索胃蛋白酶在不同病理类型的声带白斑组织

中的表达情况,旨在深化对声带白斑与 LPR 关系的理解,为声带白斑的预防及治疗提供理论基础。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

检索并选取 2000 年 1 月至 2018 年 6 月间在北京协和医院耳鼻喉科住院并接受手术治疗的资料完整的声带白斑病例 71 例。根据患者术后病理诊断(依据 2017 年 WHO 对声带白斑病理的简化分型<sup>[8]</sup>)分为 2 组,分别为低级别异型增生(low-grade dysplasia, LGD)组(47 例),包括鳞状上皮单纯增生和轻度异型增生;高级别异型增生(high-grade dysplasia, HGD)组(24 例),包括中度异型增生、重度异型增生和原位癌。排除标准包括发病前 2 周内有过剧烈咳嗽及呕吐病史者、既往有喉部手术或放疗者、近 3 个月使用过质子泵抑制剂(proton pump inhibitors, PPI)治疗者。该研究得到了北京协和医院伦理委员会的批准,所有病例均为参与本研究提供了书面知情同意书。

### 1.2 研究方法

将入选的 71 例声带白斑患者的手术组织标本切片,采用免疫组织化学染色方法,检测声带白斑组织标本中胃蛋白酶的表达水平。两名受过培训的病理学家在未被告知组织标本临床信息的前提下,独立评估所有样本,并复审了不一致的病例,以得到最

终结果。

#### 1.2.1 胃蛋白酶免疫组织化学染色

参照 Jiang 等<sup>[9]</sup>的方法,取石蜡组织 4  $\mu\text{m}$  切片,常规脱蜡、高压修复、山羊血清封闭后,滴加胃蛋白酶一抗(Polyclonal Antibody to Pepsin, USCNlife, PAA632Hu01, 1:400 稀释),4  $^{\circ}\text{C}$  孵育 16 h 后洗脱,滴加生物素标记的山羊抗鼠/兔多克隆二抗,DAB(加强型 DAB 显色试剂盒,福州迈新,DAB-2031)显色,复染封片后显微镜下观察。

#### 1.2.2 胃蛋白酶染色的评估

以磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)作为阴性对照,以胃黏膜主细胞作为阳性对照。参照 Formwitz 评分方法<sup>[10-11]</sup>,评估胃蛋白酶显色强度及显色细胞的百分率。按鳞状上皮细胞的细胞质显色评分,无染色为阴性记 0 分,浅褐色为弱阳性记 1 分,棕褐色为阳性记 2 分,颗粒状深棕褐色为强阳性记 3 分。按显色组织的比例评分,显色 <25% 记 1 分,显色 26%~50% 记 2 分,显色 51%~75% 记 3 分,显色 >75% 记 4 分。将上述两项评分相乘得到最终的结果,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(图 1)。既往研究显示,当以阳性作为切点诊断 LPR 时,喉上皮中胃蛋白酶的免疫组织化学染色显示出了较高的敏感性和特异性<sup>[9]</sup>。因此,本研究中,我们将阴性和弱阳性归为阴性,阳性和强阳性归为阳性。

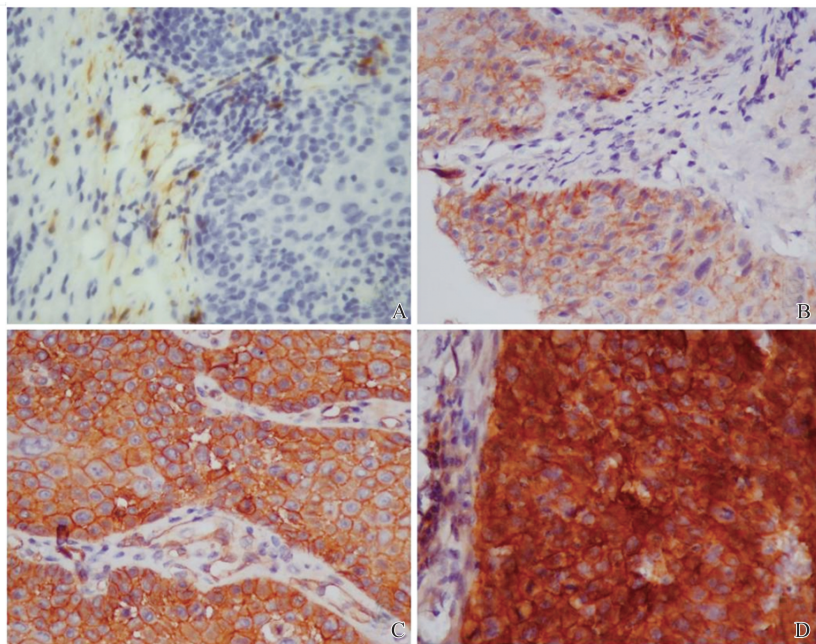


图 1 胃蛋白酶在声带白斑组织中的免疫组织化学染色( $\times 400$ )

A: 阴性,细胞质内无显色;B: 弱阳性,细胞质内散在浅褐色染色;C: 阳性,细胞质内弥漫分布棕褐色染色;D: 强阳性,深棕褐色颗粒弥漫分布于细胞质中

Figure 1 Immunohistochemical staining of pepsin in vocal cord leukoplakia tissues ( $\times 400$ )

A: Negative, no staining in the cytoplasm; B: Weakly positive, light brown staining scattered in the cytoplasm; C: Positive, brown staining diffusely distributed in the cytoplasm; D: Strong positive, dark brown granules diffusely distributed in the cytoplasm

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS 27.0 软件对数据进行统计分析。计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 Bonferroni 调整法; 计数资料采用频数、百分比表示, 组间比较采用  $\chi^2$  检验或 Fisher 精确检验, 两两比较采用 Bonferroni 调整法。采用 Logistic 回归分析胃蛋白酶表达与声带白斑不同病理分型的关系。所有检验均采用双侧检验, 检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 一般资料

71 例患者中, 男 63 例 (88.7%)、女 8 例 (11.3%); 40~75 岁, 平均 58.6 岁 ( $58.6 \pm 8.6$  岁); 吸烟者 61 例 (85.9%)、饮酒者 53 例 (74.6%)。性别、年龄、吸烟及饮酒因素, 在低级别异型增生组和高级别异型增生组间无统计学差异 (表 1)。

### 2.2 声带白斑不同病理组间胃蛋白酶的表达

声带白斑低级别异型增生组和高级别异型增生组中, 胃蛋白酶染色阳性的比例分别为 23.4%

(11/47) 和 75% (18/24)。与低级别异型增生组相比, 胃蛋白酶在高级别异型增生组的阳性表达具有统计学意义 ( $\chi^2 = 17.504, P < 0.001$ )。

### 2.3 胃蛋白酶在声带白斑不同病理组间的多因素分析

在调整了患者年龄、性别、吸烟及饮酒高危因素后, 胃蛋白酶阳性增加了高级别异型增生的风险, OR 值及其 95% 置信区间为 9.64 (2.96-31.38) (表 2)。

表 1 入选对象的一般情况  
Table 1 General characteristics of enrolled patients

因素	低级别 异型增生组 (47 例)	高级别 异型增生组 (24 例)	$\chi^2/t$	P
性别			0.913	0.176
女	7 (14.9%)	1 (4.2%)		
男	40 (85.1%)	23 (95.8%)		
吸烟	39 (83.0%)	22 (91.7%)	0.403	0.526
饮酒	35 (74.5%)	18 (75.0%)	0.002	0.961
年龄/岁	58.3 $\pm$ 8.8	59.2 $\pm$ 8.4	0.438	0.662

表 2 胃蛋白酶与声带白斑低/高级别异型增生的多因素分析

Table 2 Multivariate analysis of pepsin with low/high-grade dysplasia in vocal cord leukoplakia tissues

因素	$\beta$	Wald $\chi^2$	P	OR (95% CI)
性别	0.776	0.366	0.545	2.174 (0.176~26.907)
年龄	0.020	0.336	0.562	1.020 (0.954~1.090)
吸烟	0.681	0.493	0.483	1.975 (0.295~13.210)
饮酒	-0.364	0.260	0.610	0.695 (0.171~2.816)
胃蛋白酶	2.265	14.141	<0.001	9.635 (2.958~31.377)

## 3 讨论

声带白斑男性发病率高<sup>[12]</sup>。吸烟是目前公认的声带白斑的危险因素<sup>[13]</sup>。本研究 71 例患者中, 男占 88.7% (63/71)、女占 11.3% (8/71)。8 例女性患者在低级别异型增生组和高级别异型增生组中分别为 7 例和 1 例, 低级别异型增生组中女性占比明显高于高级别异型增生组。吸烟患者在低级别异型增生组和高级别异型增生组中的占比分别为 83.0% 和 91.7%。性别及吸烟这两个因素在两组间的比较虽无统计学差异, 但是随着声带异型增生程度的增加, 男性患者及吸烟者有较明显的增高趋势, 与以往文献报道的相符。

患者年龄与声带白斑的病理异型程度相关<sup>[14]</sup>, 有学者认为年龄是声带异型增生的危险因素<sup>[15]</sup>。本研究中, 低级别异型增生组和高级别异型增生组的平均年龄分别为 ( $58.3 \pm 8.8$ ) 岁和 ( $59.2 \pm 8.4$ ) 岁, 无显著差异。饮酒者在这两组间的占比分别为

74.5% 和 75%, 亦无明显差异。该结果可能与样本量不够大有关。

到目前为止, 咽喉反流的诊断尚无金标准<sup>[16]</sup>。对于 LPR 的评估主要有反流症状指数量表 (reflux symptom index, RSI)<sup>[17]</sup> 和基于电子喉镜检查的咽喉反流体征评分 (reflux finding score, RFS)<sup>[18]</sup>。但 RSI 和 RFS 仅评估了咽喉反流的一部分非特异性的症状和体征, 且两者均为主观评分, 具有一定局限性。24 h 动态双探针 pH 监测<sup>[19]</sup> 以及 24 h 多通道管腔内阻抗 pH (MII-pH) 监测<sup>[20]</sup> 逐渐被应用于 LPR 的诊断, 但 pH 值监测并不能直接反映喉组织暴露于胃肠反流物的情况, 并且其结果亦存在假阳性和假阴性的可能<sup>[21]</sup>。有研究发现, 胃蛋白酶在喉部组织中的免疫组织化学检测是一种敏感、有效的诊断 LPR 的方法<sup>[22-23]</sup>。

胃蛋白酶是以胃蛋白酶原形式由胃主细胞合成和分泌的, 胃蛋白酶原经过胃液中的盐酸活化后变成胃蛋白酶<sup>[24]</sup>。Johnston 等<sup>[25]</sup> 同时检测了患者喉

组织标本中的胃蛋白酶原 mRNA 和胃蛋白酶,发现在胃蛋白酶阳性的喉组织标本中未检测到胃蛋白酶原,提示喉组织自身不会产生胃蛋白酶,因此在喉组织中检测到的胃蛋白酶可以作为咽喉反流的特异性标志物。Knight 等<sup>[26]</sup>通过蛋白印迹及免疫组织化学染色方法研究了喉黏膜中胃蛋白酶的表达,对比 pH 监测结果,发现对于诊断酸反流的 LPR,胃蛋白酶在喉黏膜中表达的敏感性为 88.9%,特异性为 100%。Jiang 等<sup>[9]</sup>研究证实,喉上皮中的胃蛋白酶对于诊断酸性 LPR 的敏感性和特异性均为 85.7%。在本研究中,我们选取胃蛋白酶作为咽喉反流的标志物,来进一步探讨咽喉反流与声带白斑的关系。

我们的研究发现,与声带白斑低级别异型增生组相比,胃蛋白酶在高级别异型增生组的表达明显增高。这与以往文献报道的相符。Gong 等<sup>[27]</sup>检测了胃蛋白酶在声带白斑和正常声带组织中的表达,发现声带白斑患者中 65%胃蛋白酶阳性,而正常声带组织中 20%胃蛋白酶阳性。Chen 等<sup>[28]</sup>进一步的研究发现,胃蛋白酶的表达与声带白斑的病理等级相关,异型程度越高,胃蛋白酶表达越高。但 Lewin 等<sup>[29]</sup>的研究认为喉不典型增生的病理异型程度和反流的严重程度无明显相关性。本研究中,在进一步调整了年龄、性别、吸烟及饮酒高危因素后,胃蛋白酶在声带白斑高级别异型增生组中的表达仍高于低级别异型增生组,且差异有统计学意义( $OR = 9.64$ )。因此,考虑胃蛋白酶增加了声带高级别异型增生的风险,是声带白斑高级别异型增生的独立危险因素。综上所述,胃蛋白酶检测可以作为声带白斑高级别异型增生的生物标志物,帮助识别可能因 LPR 而有较高恶变风险的声带白斑患者。此外,我们的研究结果还提示,咽喉反流可能是声带白斑的潜在危险因素,为声带白斑的预防、早期干预及治疗提供了新的依据。

有关胃蛋白酶对喉黏膜的损伤机制尚不完全明了。有研究报道,胃蛋白酶可以破坏黏膜的防御机制,从而使黏膜上皮损伤<sup>[30]</sup>。胃蛋白酶可能导致上皮细胞间黏附因子的改变,从而影响上皮细胞的功能<sup>[3]</sup>。Johnston 等<sup>[31]</sup>发现胃蛋白酶介导了剂量和时间依赖性的上皮细胞增殖,同时伴有基因及微小 RNA 表达的改变,这些改变与肿瘤的发生一致。Tan 等<sup>[32]</sup>研究认为胃蛋白酶可能通过 IL-8 信号通路介导了上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)从而导致喉癌。胃蛋白酶导致声带白斑的相关病理机制仍需要进一步探索。

本研究也存在一定的局限性。首先,受限于回

顾性的病例研究,未能获得 RSI、RFS 及喉腔 24 h 动态 pH 结果。虽然这些并不是诊断 LPR 的标准,但对于尚无诊断金标准的 LPR,这些评估方法仍具有重要的参考意义。其次,咽喉反流包括胃、肠内容物的反流,胃蛋白酶仅反映了胃内容物反流,对于在 LPR 中同样重要的肠内容物的反流,本研究尚未涉及。另外,本研究未完全排除烟酒混杂因素的影响。为了进一步探讨咽喉反流与声带白斑的关系,还需要更大规模的前瞻性随机对照研究。

## 4 小 结

胃蛋白酶与声带白斑的病理分型相关,声带白斑的异型程度越高,胃蛋白酶表达越高。作为咽喉反流标志物的胃蛋白酶是声带白斑高级别异型增生的独立危险因素。故我们认为咽喉反流可能是声带白斑高级别异型增生的潜在危险因素之一。

## 参考文献:

- [1] Lechien J R, Akst L M, Hamdan A L, et al. Evaluation and management of laryngopharyngeal reflux disease: state of the art review[J]. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 2019, 160 (5): 762-782. doi: 10.1177/0194599819827488
- [2] Lechien JR, Bobin F, Muls V, et al. Validity and reliability of the reflux symptom score [J]. *Laryngoscope*, 2020, 130(3): E98-E107. doi:10.1002/lary.28017
- [3] Lechien JR, 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
- [4] Parsel SM, Wu EL, Riley CA, et al. Gastroesophageal and laryngopharyngeal reflux associated with laryngeal malignancy: a systematic review and meta-analysis [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2019, 17(7): 1253-1264. e5. doi:10.1016/j.cgh.2018.10.028
- [5] Han H, Lyu Q, Zhao J. Laryngopharyngeal reflux in hypertrophic laryngeal diseases [J]. *Ear Nose Throat J*, 2022, 101 (4): NP158-NP163. doi: 10.1177/0145561320953232
- [6] 赵佳宁,崔元馨,王丹,等. 咽喉反流与复发性乳头状瘤病的关系及其机制探讨[J]. *山东大学耳鼻喉眼学报*, 2024, 38(6):39-45. doi: 10.6040/j.issn.1673-3770.0.2023.010  
ZHAO Jianing, CUI Yuanxin, WANG Dan, et al. Exploration of the relationship between laryngopharyngeal reflux and recurrent respiratory papilloma and its mechanism [J]. *Journal of Otolaryngology and Ophthalmology of Shandong University*, 2024, 38 (6): 39-45. doi: 10.6040/j.issn.1673-3770.0.2023.010

- [7] 王磊,王刚,孙喆喆,等. 咽喉反流与声带良性增生性病  
变、声带白斑、慢性咽喉炎相关性研究[J]. 山东大学耳  
鼻咽喉科眼学报, 2024, 38(6): 71-77. doi:10.6040/j.  
issn.1673-3770.0.2023.028  
WANG Lei, WANG Gang, SUN Zhezhe, et al. Correla-  
tions between vocal cord hyperplastic lesions, vocal cord  
leukoplakia, chronic laryngopharyngitis, and laryngopha-  
ryngeal reflux[J]. *Journal of Otolaryngology and Oph-  
thalmology of Shandong University*, 2024, 38(6): 71-  
77. doi:10.6040/j.issn.1673-3770.0.2023.028
- [8] Gale N, Poljak M, Zidar N. Update from the 4th edition  
of the World Health Organization classification of head  
and neck tumours: what is new in the 2017 WHO blue  
book for tumours of the hypopharynx, larynx, trachea and  
parapharyngeal space [J]. *Head and Neck Pathology*,  
2017, 11(1):23-32. doi: 10.1007/s12105-017-0788-z
- [9] Jiang A, Liang M, Su Z, et al. Immunohistochemical  
detection of pepsin in laryngeal mucosa for diagnosing  
laryngopharyngeal reflux [J]. *Laryngoscope*, 2011, 121  
(7): 1426-1430. doi:10.1002/lary.21809
- [10] 高诚凯. 正常人群生理性咽喉反流及相关参数研究  
[D]. 广州:南方医科大学, 2018  
GAO Kaicheng. *Physiological laryngopharyngeal reflux  
and related parameters in normal population*[D]. Guang-  
zhou: Southern Medical University, 2018
- [11] 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. Consis-  
tency analysis of pepsin immunohistochemistry and pep-  
sin 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
- [12] Zhukhovitskaya A, Battaglia D, Khosla SM, et al. Gen-  
der and age in benign vocal fold lesions [J]. *Laryngo-  
scope*, 2015, 125(1): 191-196. doi:10.1002/lary.24911
- [13] Parker NP. Vocal fold leukoplakia: incidence, manage-  
ment, and prevention [J]. *Curr Opin Otolaryngol Head  
Neck Surg*, 2017, 25(6): 464-468. doi:10.1097/moo.  
0000000000000406
- [14] Isenberg JS, Crozier DL, Dailey SH. Institutional and  
comprehensive review of laryngeal leukoplakia [J]. *Ann  
Otol Rhinol Laryngol*, 2008, 117(1): 74-79. doi:10.  
1177/000348940811700114
- [15] Fang TJ, Lin WN, Lee LY, et al. Classification of vocal  
fold leukoplakia by clinical scoring [J]. *Head Neck*, 2016,  
38(Suppl 1): E1998-E2003. doi:10.1002/hed.24368
- [16] Krause AJ, Walsh EH, Weissbrod PA, et al. An update  
on current treatment strategies for laryngopharyngeal  
reflux symptoms [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2022, 1510  
(1): 5-17. doi:10.1111/nyas.14728
- [17] Belafsky PC, Postma GN, Koufman JA. Validity and re-  
liability of the reflux symptom index (RSI) [J]. *J  
Voice*, 2002, 16(2): 274-277. doi:10.1016/S0892-  
1997(02)00097-8
- [18] Vance D, Alnouri G, Shah P, et al. The validity and  
reliability of the reflux finding score [J]. *J Voice*, 2023,  
37(1): 92-96. doi:10.1016/j.jvoice.2020.11.008
- [19] Golub JS, Johns MM, Lim JH, et al. Comparison of an  
oropharyngeal pH probe and a standard dual pH probe for  
diagnosis of laryngopharyngeal reflux [J]. *Ann Otol Rhi-  
nol Laryngol*, 2009, 118(1): 1-5. doi:10.1177/  
000348940911800101
- [20] Lee JS, Jung AR, Park JM, et al. Comparison of char-  
acteristics according to reflux type in patients with laryn-  
gopharyngeal reflux [J]. *Clin Exp Otorhinolaryngol*,  
2018, 11(2): 141-145. doi:10.21053/ceo.2017.00577
- [21] Becker V, Graf S, Schlag C, et al. First agreement anal-  
ysis and Day-to-Day comparison of pharyngeal pH moni-  
toring with pH/Impedance monitoring in patients with  
suspected laryngopharyngeal reflux [J]. *J Gastrointest  
Surg*, 2012, 16(6): 1096-1101. doi:10.1007/s11605-  
012-1866-x
- [22] Wang L, Tan JJ, Wu T, et al. Association between laryn-  
geal pepsin levels and the presence of vocal fold polyps  
[J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2017, 156(1): 144-  
151. doi:10.1177/0194599816676471
- [23] Wang J, Li J, Li X, et al. Is the pepsin immunohisto-  
chemical staining of laryngeal lesions an available way  
for diagnosing laryngopharyngeal reflux [J]. *Acta Otolar-  
yngol*, 2020, 140(8): 702-705. doi:10.1080/00016489.  
2020.1758774
- [24] Johnston N, Dettmar PW, Bishwokarma B, et al. Activi-  
ty/stability of human pepsin: implications for reflux  
attributed laryngeal disease [J]. *Laryngoscope*, 2007, 117  
(6): 1036-1039. doi:10.1097/mlg.0b013e31804154c3
- [25] Johnston N, Dettmar PW, Strugala V, et al. Laryngo-  
pharyngeal reflux and GERD [J]. *Ann N Y Acad Sci*,  
2013, 1300: 71-79. doi:10.1111/nyas.12237
- [26] Knight J, Lively MO, Johnston N, et al. Sensitive pepsin  
immunoassay for detection of laryngopharyngeal reflux  
[J]. *Laryngoscope*, 2005, 115(8): 1473-1478. doi:10.  
1097/01.mlg.0000172043.51871.d9
- [27] Gong X, Wang XY, Yang L, et al. Detecting laryngo-  
pharyngeal reflux by immunohistochemistry of pepsin in  
the biopsies of vocal fold leukoplakia [J]. *J Voice*, 2018,  
32(3): 352-355. doi:10.1016/j.jvoice.2017.06.010