

胃蛋白酶与咽喉反流性疾病:从致病机制到咽喉鳞状细胞癌的潜在风险因素

周诗侗^{1,2}, 杨艳艳¹, 杨玉成², 方红雁¹

1. 重庆市人民医院 耳鼻咽喉头颈外科, 重庆 401147

2. 重庆医科大学附属第一医院 耳鼻咽喉头颈外科, 重庆 400016

摘要: 咽喉反流性疾病(laryngopharyngeal reflux disease, LPRD)是由胃十二指肠内容物反流的直接或间接作用引起的上呼吸道组织的一种炎症疾病,胃蛋白酶是其主要致病因子。近年来,越来越多研究发现咽喉反流与咽喉鳞状细胞癌关系密切,但咽喉反流是否咽喉鳞状细胞癌的危险因素尚存争议。胃蛋白酶作为 LPRD 的主要致病因子,可能在咽喉鳞状细胞癌的发生发展中有重要作用,其机制包含咽喉黏膜上皮损伤、上皮防御屏障的破坏、诱导炎症、诱导基因及 miRNA 改变等。论文针对胃蛋白酶与 LPRD,从致病机制及咽喉鳞状细胞癌的潜在风险因素方面进行综述,旨在为探寻咽喉鳞状细胞癌新的致病机制和治疗手段提供新的研究思路。

关键词: 咽喉反流;胃蛋白酶;鳞状细胞癌;黏膜损伤;致病机制

中图分类号:R767.6 **文献标志码:**A **文章编号:**1673-3770(2024)06-0055-06

引用格式:周诗侗,杨艳艳,杨玉成,等. 胃蛋白酶与咽喉反流性疾病:从致病机制到咽喉鳞状细胞癌的潜在风险因素[J]. 山东大学耳鼻喉眼学报,2024, 38(6):55-60. ZHOU Shitong, YANG Yanyan, YANG Yucheng, et al. Pepsin and laryngopharyngeal reflux disease: from pathogenic mechanisms to potential risk factors for pharyngeal and laryngeal squamous cell carcinoma[J]. Journal of Otolaryngology and Ophthalmology of Shandong University, 2024, 38(6):55-60.

Pepsin and laryngopharyngeal reflux disease: from pathogenic mechanisms to potential risk factors for pharyngeal and laryngeal squamous cell carcinoma

ZHOU Shitong^{1,2}, YANG Yanyan¹, YANG Yucheng², FANG Hongyan¹

1. Department of Otorhinolaryngology & Head and Neck Surgery, Chongqing General Hospital, Chongqing 401147, China

2. Department of Otorhinolaryngology & Head and Neck Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: Laryngopharyngeal reflux disease (LPRD) is an inflammatory disease of the tissues of the upper aerodigestive tract caused by the direct or indirect action of reflux of gastroduodenal contents, with pepsin as the main causative agent. Numerous studies have shown a strong association between laryngeal reflux and squamous cell carcinoma of the pharynx and larynx. Nonetheless, the ongoing debate as to whether laryngeal reflux is a risk factor for laryngeal squamous cell carcinoma remains inconclusive. Pepsin, the main pathogenic factor of LPRD, has been shown to play a crucial role in the oncogenesis of squamous cell carcinoma of the pharynx and larynx. Possible mechanisms include damage to the epithelium of the pharyngeal and laryngeal mucosa, disruption of the epithelial defense barrier, induction of inflammation, and alterations in genes and miRNA. This article provides a comprehensive review of the role and mechanism of LPRD, with a special focus on pepsin, in terms of pathogenic mechanisms and potential risk factors for pharyngeal and laryngeal squamous cell carcinoma, with the aim of facilitating the explanation of oncogenesis and inspiring innovative therapeutic approaches in this disease.

Keywords: Laryngopharyngeal reflux; Pepsin; Squamous cell carcinoma; Mucosal injury; Pathogenesis

咽喉反流(laryngopharyngeal reflux, LPR)是指胃十二指肠内容物反流至鼻咽、口咽、喉咽和喉等部位,引起上呼吸道形态学改变及一系列症状和体征^[1]。LPR 与喉肉芽肿、喉狭窄、喉痉挛、声带

收稿日期:2023-09-07

基金课题:重庆市科卫联合面上项目(2023MSXM120);重庆市技术创新与应用发展专项面上项目(CSTB2022TIAD-GPX0065);重庆市人民医院医学科技创新基金面上项目(Y2020MSXM16)

通信作者:方红雁。E-mail: guosl999@sina.com;杨玉成。E-mail: yychxh@163.com

白斑、喉癌、下咽癌以及儿童吞咽困难、哮喘、睡眠呼吸暂停、鼻窦炎、中耳炎等疾病密切相关^[2-3]。吸烟、饮酒、人乳头状瘤病毒感染等是咽喉鳞状细胞癌的危险因素^[4-5]，近年来研究发现 LPR 与咽喉鳞状细胞癌相关^[6]，且控制吸烟、饮酒后，LPR 仍是其危险因素^[7]。胃蛋白酶是 LPR 的主要致病因子，可能在咽喉鳞状细胞癌发生发展中有重要作用。基于此，论文通过整理、分析、总结 LPR，特别对胃蛋白酶在咽喉鳞状细胞癌的作用及可能机制的相关研究进展进行综述，旨在为咽喉鳞状细胞癌的发病机制研究提供一个新的思路。

1 咽喉反流性疾病 (laryngopharyngeal reflux disease, LPRD) 与胃蛋白酶

1.1 LPRD 概述

LPRD 是由胃十二指肠内容物反流的直接或间接作用引起的上呼吸道组织的一种炎症疾病^[1]，可有咽干、咽痛、咽异物感、声音嘶哑、频繁清嗓、咳嗽、阵发性喉痉挛、吞咽困难等临床表现^[8]。LPRD 患病率为 3.9%~34.4%，中老年人群患病率更高，约 10.15% 的耳鼻咽喉科门诊患者及 65% 的声嘶或发音障碍患者与 LPR 有关^[1,9]。LPRD 的病因主要有咽喉黏膜抗酸能力较弱及抗反流屏障结构功能障碍、迷走神经反射学说、幽门螺杆菌感染、食管异位胃黏膜等^[10-12]，不良生活饮食习惯、高脂饮食、焦虑抑郁、慢性睡眠剥夺以及阻塞性睡眠呼吸暂停也与其有关^[13-15]。

1.2 胃蛋白酶可能是 LPRD 的主要致病因子

胃蛋白酶由胃主细胞以胃蛋白酶原的形式合成，在胃内酸性环境中裂解，通过扭曲和折叠底物多肽链的结构来发挥其蛋白水解活性^[16]。胃蛋白酶在 pH>7.8 时不可逆失活，在 pH 6~8 之间时酶虽失活，但仍可保持结构完整，pH<6 时酶活性再次恢复，达到原有活性的 80%。在 pH 4 的酸性环境中加入胃蛋白酶后胃上皮防御机制被破坏，但这种破坏作用在 pH>7.4 时失效，且可被胃酶抑素抑制^[17]。

质子泵抑制剂 (proton pump inhibitor, PPI) 可降低胃 pH 值，但不能降低胃蛋白酶浓度及减少反流次数，甚至可能导致胃蛋白酶浓度增高，因此高达 20% 的抑酸治疗患者仍有 LPR 相关症状^[18]。胃蛋白酶在喉部经胞吞作用被摄入到咽喉黏膜上皮细胞内，进入高尔基体或溶酶体 (pH 4~5) 后恢复活性发挥作用，这种胃蛋白酶不依赖酸性环境发挥作用的机制正好阐释了 pH 测定和患者主观症状不完全相符、PPI 治疗 LPRD 效果不佳的原因，即酸可很快

被中和，而胃蛋白酶在弱酸性环境中处于“休眠状态”而长期存留。LPRD 患者唾液胃蛋白酶与反流症状指数评分、24 h 食管多通道腔内阻抗-pH 监测结果呈现出良好的相关性^[19]。藻酸盐等胃蛋白酶抑制剂可抑制胃蛋白酶活性，并具有浓度依赖性，临床用于 LPRD 具有较好疗效^[20]。此外，研究证明胃蛋白酶可诱导细胞损伤、炎症和促进肿瘤发生发展，是一系列呼吸系统疾病的重要致病因素或促进因素^[21]，而胃蛋白酶抑制剂可避免胃上皮屏障的破坏和癌症相关变化的影响^[22]。因此，胃蛋白酶可能是 LPR 的主要致病因子^[23]，可用于 LPRD 的诊断^[1]。

2 LPR 可能是咽喉鳞状细胞癌的危险因素

目前已证实咽喉鳞状细胞癌的危险因素有吸烟、饮酒、人乳头状瘤病毒感染、化学或放射性职业暴露等^[4]，LPR 是否咽喉鳞状细胞癌的危险因素备受关注。在与 LPRD 密切相关的胃食管反流性疾病 (gastroesophageal reflux disease, GERD) 研究中，有大样本队列研究发现 GERD 患者继发食管腺癌 (esophageal adenocarcinoma, EAC) 的风险增加 5~8 倍^[24]，其机制是 GERD 引起食管黏膜上皮炎性因子释放，形成炎性微环境，食管下段反复的创伤-愈合过程导致腺上皮化生引起巴雷特食管 (Barrett's esophagus, BE)，细胞代谢改变引发不典型增生，进而癌变。有研究基于反流性食管炎-BE-EAC 的进展演变，提出了“黏膜炎症-不典型增生-癌变”的分子生物学机制，并逐步阐释其内在关系^[25]。沿着这一研究思路，有研究报道在无烟酒嗜好的喉癌患者中，LPR 发生频次较正常人明显增加，喉癌前病变中 LPR 的发生率高达 85%^[26]。LPR 可促进声带白斑等癌前病变的发生，且予以抗反流抑酸治疗后，声带黏膜的结构功能和病理表现都可完全恢复正常，从而抑制病变的演变，减少相关喉恶性肿瘤的发生和发展^[27]。因此，LPR 可能是咽喉鳞状细胞癌的危险因素。即使在排除吸烟、饮酒及年龄等因素的影响后，也有研究证实了 LPR 在咽喉鳞状细胞癌的发生发展中有重要作用^[28]。

3 胃蛋白酶在咽喉鳞状细胞癌中的作用及机制

3.1 胃蛋白酶可能促进咽喉鳞状细胞癌的发生发展

胃内容物成分复杂，包括酸、胃蛋白酶原/胃蛋白酶、胆汁酸、胰酶等。既往研究表明胃蛋白酶或胆汁酸等与咽喉肿瘤密切相关^[29]。Lagergren 等^[30]随访了近 20 000 例的胃大部切除患者，发现咽喉鳞状

细胞癌的发病风险比普通人群明显增高。谭嘉杰等^[31]发现,胃蛋白酶在喉癌组织、癌前病变(声带白斑)的表达明显高于正常人群。Niu 等^[32]也发现胃蛋白酶在下咽鳞状细胞癌中的表达高于癌旁组织中的表达,差异有统计学意义,其表达阳性比率明显高于喉癌和喉癌前病变。此研究还发现,胃蛋白酶阳性与患者的肿瘤原发部位、吸烟、饮酒、T 分级、分化程度无明显相关性,而与肿瘤 N 分级相关,提示胃蛋白酶使下咽癌细胞更具有侵袭性和促转移的特征,胃蛋白酶可能在咽喉鳞状细胞癌的发生发展中有重要作用。

3.2 胃蛋白酶在咽喉鳞状细胞癌中的可能作用机制

3.2.1 胃蛋白酶破坏咽喉黏膜的防御屏障

正常情况下,覆盖咽喉的鳞状上皮通过紧密连接形成“防水层”,同时咽喉黏膜散在分布的黏液腺也能抵御有害物质对上皮的损伤。正常喉黏膜存在鳞状上皮应激蛋白(squamous epithelial stress protein, SEP)70、SEP53 和碳酸酐酶同工酶Ⅲ(carbonic anhydrase, CAⅢ)^[33],但不含胃蛋白酶。CAⅢ是一种重要的细胞内抗反流蛋白,而 E 钙素、黏蛋白(mucin, MUC)3、MUC4、MUC5AC 在上皮保护机制中也发挥着重要作用。然而在 LPRD 患者喉黏膜组织中,上皮细胞间隙增宽,黏液素表达降低^[34],导致咽喉黏膜的抗反流屏障减弱。胃蛋白酶通过抑制 CAⅢ和 SEP70 的产生、消耗水解,降低细胞间桥接蛋白 E 钙素的产生,改变黏液素的构成,从而削弱细胞间的黏附功能、降低局部黏膜的防御能力、改变应激蛋白的表达及引起应激反应等^[35]。因此,胃蛋白酶的长时间接触可引起以上相关因子的消耗,破坏咽喉黏膜的防御屏障,最终导致黏膜上皮的损伤^[36]。

3.2.2 胃蛋白酶损伤咽喉黏膜上皮细胞

胃蛋白酶引起的氧化应激反应和活性氧增多对咽喉黏膜上皮细胞有明显的损伤作用。Johnston 等^[35]发现在 pH 7.4 条件下胃蛋白酶和下咽黏膜上皮细胞(Fadu)共培养后 12 h 即可在电镜下观察到线粒体和高尔基体肿胀、褶皱消失,同时伴有以 Hsp70 为主的热休克蛋白显著升高,而随着观察时间延长 18 项氧化应激相关标志物会发生变化。胃蛋白酶通过内吞作用进入细胞内,在溶酶体内活化,然后转运至线粒体和高尔基体,引起细胞能量代谢障碍,线粒体损伤,当活性氧过度释放超出机体的平衡机制时,长时间的氧化应激状态可损伤细胞,引发上皮坏死和黏膜溃疡的发展^[37]。Samuels 等^[38]发现低浓度的胃蛋白酶通过上调炎性细胞因子白细胞介素(interleukin, IL)-8、IL-1F10、IL-1A 和 IL-5 以

及趋化因子 CXCL14 与其受体 CCR6、配体 CCL20 和 CCL26 的表达导致下咽黏膜损伤,而这些炎性因子在反流性食管炎发展为 BE 中起了重要作用。Sandner 等^[39]研究发现,LPR 的刺激作用可引起黏膜表面上皮细胞 DNA 链断裂,从而改变相关的多种喉黏膜保护蛋白的表达,进而引起咽喉部正常细胞癌变风险的增加。

3.2.3 胃蛋白酶激活 NF- κ B 信号通路介导炎症反应

Sasaki 等^[40]研究显示,胃蛋白酶可激活 NF- κ B 信号通路,NF- κ B 转录因子家族调控细胞的生存、生长和凋亡,参与炎症、免疫性疾病及肿瘤等的发生与发展。NF- κ B 被认为是炎症和致癌过程之间被较多研究证明的关键因子,诱发促炎因子(如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8 等)的释放,促进炎症反应的发生,导致黏膜的损伤^[41],长期的炎性环境可改变上皮的微环境,适于肿瘤细胞生长。NF- κ B 通路通过刺激细胞增殖、抗细胞凋亡、促进转移和血管生成等机制延长了肿瘤细胞的生存期,在 EAC 的发展过程中,胃蛋白酶能激活食管上皮细胞 NF- κ B 通路,还可激活其下游基因调节细胞周期,在“上皮化生—不典型增生—癌变”过程中发挥重要作用^[42]。NF- κ B 在炎症反应中表达上调,有研究表明其在喉恶性肿瘤中的表达也上调,并促进下游抗凋亡因子的上调,例如 TNF- α 、STAT3、IL-6、IL-1 β 等^[43]。在头颈部鳞状细胞癌的疾病进程中,NF- κ B 作为炎性因子介导慢性炎症向癌症的转化,还可通过干扰细胞分裂周期发挥细胞凋亡抑制作用,促进正常组织向肿瘤组织的转变,但也有研究应用不同浓度的胃蛋白酶刺激下咽细胞,并未发现 NF- κ B 及其下游通路有差异性改变^[44]。

3.2.4 胃蛋白酶促进咽喉鳞状细胞癌细胞增殖、转移

二甲基苯蒽(7,12-Dimethylbenza, DMBA)是一种化学致癌物,常用于制备动物肿瘤模型。研究发现,DMBA 联合酸化的胃蛋白酶较单独应用 DMBA 诱发的肿瘤体积和质量更大,分化程度更低,但单独应用胃蛋白酶诱导癌肿困难^[40]。Johnston 等^[45]通过喉癌组织免疫组化发现喉癌中胃蛋白酶阳性与 E-钙素表达呈负相关,与 Vimentin、 β -catenin 表达呈正相关,提示胃蛋白酶可能通过上皮-间质转化在喉癌的增殖、转移生物学行为中发挥作用,然而这种作用是否通过炎性微环境还是直接激活或抑制部分基因从而影响细胞分化尚需阐明。Niu 等^[32]研究发现,胃蛋白酶可诱导促进 DNA 合成、细胞周期从 G1 期向 S 期分化及 Fadu 细胞的体外增殖,而灭活的胃蛋白酶不能诱导下咽癌细胞增殖,这与 NF- κ B、

TRAIL 和 Notch 信号相关基因的表达有关。Tan 等^[46]研究发现,胃蛋白酶在促进喉癌细胞增殖和转移中具有潜在作用,可能是通过 IL-8 信号通路诱导喉癌细胞上皮-间充质转化。还有一些细胞因子如 IL-1 β 和 IL-6 也被认为在炎症介导的咽喉部相关癌变过程中发挥关键作用^[47-48]。

3.2.5 胃蛋白酶诱导咽喉部的基因及微小 RNA (microRNA, miRNA) 表达改变

反复胃蛋白酶暴露可刺激咽喉黏膜中的许多生物标志物如 E-钙素、MUC2、MUC5B、鳞状/柱状上皮标记 KRT14 以及炎症标志物 CD1d、CRNN 和转化生长因子-1 等的改变,从而引起复杂的黏膜柱状上皮向鳞状上皮化生^[49]。Johnston 等^[45]研究了胃蛋白酶暴露对人类下咽鳞状细胞癌 FaDu 细胞中 84 个致癌基因表达的影响,发现 3 个致癌基因的表达量增加了 1.5 倍以上,24 个抑癌基因的表达量减少了 1.5 倍,反复非酸环境的胃蛋白酶暴露还可引起喉上皮细胞某些 miRNA 表达的显著改变,如 miR-130a、miR-141、miR-15a、miR-185、miR-222、miR-29b、miR-32、miR-423-3p 和 miR-423-5p 的上调,以及 let-7a、let-7b、let-7c、let-7e 和 miR-128 的下调,let miRNA 家族成员在喉上皮细胞中的显著失调引起靶癌蛋白 Ras 的表达增加,而研究已发现喉癌中存在 Ras 表达失调,Ras 表达的增加与细胞增殖有关^[50]。

4 小 结

综上所述,LPR 与咽喉鳞状细胞癌关系密切,胃蛋白酶作为 LPR 的主要致病因子,可促进咽喉鳞状细胞癌的发生和发展,其可能的机制包含损伤咽喉黏膜上皮、影响细胞功能、消耗和破坏上皮防御屏障、诱导炎症、诱导基因及 miRNA 改变等。但由于缺乏大规模的流行病学依据和统一的研究结果,胃蛋白酶在咽喉鳞状细胞癌中的作用机制还有待进一步研究证实及阐明,且胃十二指肠内容物成分复杂,其他反流物的作用研究报道较少,也有待进一步研究及探索。

参 考 文 献:

[1] 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,中华医学会耳鼻咽喉头颈外科学分会嗓音学组. 咽喉反流性疾病诊断与治疗专家共识(2022年,修订版)[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2022, 57(10): 1149-1172. doi: 10.3760/cma.j.cn115330-20220711-00428

Subspecialty Group of Laryngopharyngology, Editorial Board of Chinese Journal of Otorhinolaryngology Head

and Neck Surgery; Subspecialty Group of Laryngopharyngology, Society of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Chinese Medical Association; Subspecialty Group of Voice, Society of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Chinese Medical Association. Experts consensus on diagnosis and treatment of laryngopharyngeal reflux disease(2022,revision)[J]. Chinese Journal of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, 2022, 57(10): 1149-1172. doi: 10.3760/cma.j.cn115330-20220711-00428

[2] Lechien JR, Akst LM, Hamdan AL, et al. Evaluation and management of laryngopharyngeal reflux disease: state of the art review[J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2019, 160(5): 762-782. doi:10.1177/0194599819827488

[3] 曾宪廷,王广科,孙占伟,等. 伴咽喉反流的难治性鼻窦炎术后应用质子泵抑制剂的疗效观察[J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2022, 36(3): 189-194. doi: 10.6040/j.issn.1673-3770.0.2021.512

ZENG Xianting, WANG Guangke, SUN Zhanwei, et al. Postoperative efficacy of proton pump inhibitor in the treatment of difficult-to-treat rhinosinusitis with laryngopharyngeal reflux[J]. Journal of Otolaryngology and Ophthalmology of Shandong University, 2022, 36(3): 189-194. doi:10.6040/j.issn.1673-3770.0.2021.512

[4] Barsouk A, Aluru JS, Rawla P, et al. Epidemiology, risk factors, and prevention of head and neck squamous cell carcinoma[J]. Med Sci (Basel), 2023, 11(2): 42. doi: 10.3390/medsci11020042

[5] Du E, Mazul AL, Farquhar D, et al. Long-term survival in head and neck cancer: impact of site, stage, smoking, and human papillomavirus status [J]. Laryngoscope, 2019, 129(11): 2506-2513. doi:10.1002/lary.27807

[6] Wang SM, Freedman ND, Katki HA, et al. Gastroesophageal reflux disease: a risk factor for laryngeal squamous cell carcinoma and esophageal squamous cell carcinoma in the NIH-AARP diet and health study cohort[J]. Cancer, 2021, 127(11): 1871-1879. doi: 10.1002/ncr.33427

[7] Parsel Sean M, Iarocci Andrew L, Gasta? aduy Mariella et al. Reflux Disease and Laryngeal Neoplasia in Nonsmokers and Nondrinkers. [J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2020, 163: 560-562. doi:10.1177/0194599820917669

[8] 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

[9] Mishra P, Agrawal D, Chauhan K, et al. Prevalence of laryngopharyngeal reflux disease in Indian population[J]. Indian J Otolaryngol Head Neck Surg, 2022, 74(2): 1877-1881. doi:10.1007/s12070-020-01882-1

[10] Salihefendic N, Zildzic M, Cabric E. Laryngopharyngeal reflux disease-LPRD [J]. Med Arch, 2017, 71(3): 215-218. doi:10.5455/medarh.2017.71:215-218

- [11] Kanemitsu Y, Kurokawa R, Takeda N, et al. Clinical impact of gastroesophageal reflux disease in patients with subacute/chronic cough[J]. *Allergol Int*, 2019, 68(4): 478-485. doi:10.1016/j.alit.2019.04.011
- [12] 邵娜, 张青青, 刘小红, 等. 幽门螺旋杆菌感染对症状性咽喉反流患者唾液胃蛋白酶浓度的影响[J]. *山东大学耳鼻喉眼学报*, 2022, 36(6): 89-95. doi:10.6040/j.issn.1673-3770.0.2022.350
- SHAO Na, ZHANG Qingqing, LIU Xiaohong, et al. Effects of *Helicobacter pylori* infection on salivary pepsin concentration in patients with symptomatic laryngopharyngeal reflux[J]. *Journal of Otolaryngology and Ophthalmology of Shandong University*, 2022, 36(6): 89-95. doi:10.6040/j.issn.1673-3770.0.2022.350
- [13] 李超凡, 张立红, 王文伦, 等. 耳鼻咽喉科门诊患者咽喉反流性疾病、焦虑抑郁患病率及二者关系[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2020, 55(3): 241-248. doi:10.3760/cma.j.issn.1673-0860.2020.03.010
- LI Chaofan, ZHANG Lihong, WANG Wenlun, et al. The prevalence and relationship between laryngopharyngeal reflux disease, anxiety and depression in otolaryngology outpatients[J]. *Chinese Journal of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery*, 2020, 55(3): 241-248. doi:10.3760/cma.j.issn.1673-0860.2020.03.010
- [14] 崔小媛, 张延平, 阎小妍, 等. 耳鼻咽喉科门诊成年患者的睡眠状况与咽喉反流性疾病的相关性[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2019, 54(10): 754-759. doi:10.3760/cma.j.issn.1673-0860.2019.10.009
- CUI Xiaohuan, ZHANG Yanping, YAN Xiaoyan, et al. Relationship between sleep status and laryngopharyngeal reflux disease in adult patients in otolaryngology clinic [J]. *Chinese Journal of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery*, 2019, 54(10): 754-759. doi:10.3760/cma.j.issn.1673-0860.2019.10.009
- [15] 张晨彬, 李木, 张延平, 等. 慢性睡眠剥夺和高脂饮食与咽喉反流性疾病相关性的实验研究[J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2018, 26(1): 68-72. doi:10.3969/j.issn.1006-7299.2018.01.018
- ZHANG Chenbin, LI Mu, ZHANG Yanping, et al. Upper gastrointestinal tract pH monitoring in rats with chronic sleep deprivation and high fat diet[J]. *Journal of Audiology and Speech Pathology*, 2018, 26(1): 68-72. doi:10.3969/j.issn.1006-7299.2018.01.018
- [16] 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
- [17] Bardhan KD, Strugala V, Dettmar PW. Reflux revisited: advancing the role of pepsin[J]. *Int J Otolaryngol*, 2012; 646901. doi: 10.1155/2012/646901
- [18] Tamhankar AP, Peters JH, Portale G, et al. Omeprazole does not reduce gastroesophageal reflux: new insights using multichannel intraluminal impedance technology [J]. *J Gastrointest Surg*, 2004, 8(7): 890-898. doi:10.1016/j.gassur.2004.08.001
- [19] 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
- [20] Pizzorni N, Ambrogi F, Eplite A, et al. Magnesium alginate versus proton pump inhibitors for the treatment of laryngopharyngeal reflux: a non-inferiority randomized controlled trial [J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2022, 279(5): 2533-2542. doi:10.1007/s00405-021-07219-0
- [21] Eells AC, MacKintosh C, Marks L, et al. Gastroesophageal reflux disease and head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis [J]. *Am J Otolaryngol*, 2020, 41(6): 102653. doi: 10.1016/j.amjoto.2020.102653
- [22] Blaine-Sauer S, Samuels TL, Yan K, et al. The protease inhibitor amprenavir protects against pepsin-induced esophageal epithelial barrier disruption and cancer-associated changes[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(7): 6765. doi: 10.3390/ijms24076765
- [23] Calvo-Henrriquez C, Ruano-Ravina A, Vaamonde P, et al. Is pepsin a reliable marker of laryngopharyngeal reflux? A systematic review[J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2017, 157(3): 385-391. doi:10.1177/0194599817709430
- [24] Katzka DA, Kahrilas PJ. Advances in the diagnosis and management of gastroesophageal reflux disease [J]. *BMJ*, 2020, 371: m3786. doi:10.1136/bmj.m3786
- [25] Bevilacqua LA, Obeid NR, Yang J, et al. Incidence of GERD, esophagitis, Barrett's esophagus, and esophageal adenocarcinoma after bariatric surgery [J]. *Surg Obes Relat Dis*, 2020, 16(11): 1828-1836. doi:10.1016/j.soard.2020.06.016
- [26] Gong X, Wang XY, Yang L, et al. Detecting laryngopharyngeal 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
- [27] Sezen Goktas S, Dogan R, Yenigun A, et al. A new approach to vocal cord leukoplakia and evaluation of proton pump inhibitor treatment[J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2019, 276(2): 467-471. doi:10.1007/s00405-018-05273-9
- [28] Parsel SM, Wu EL, Riley CA, et al. Gastroesophageal and laryngopharyngeal reflux AssociatedWith laryngeal malignancy: a systematic reviewand meta-analysis [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2019, 17(7): 1253-1264. doi:10.1016/j.cgh.2018.10.028
- [29] Yin CY, Zhang SS, Zhong JT, et al. Pepsin and laryngeal and hypopharyngeal carcinomas [J]. *Clin Exp Otorhinolaryngol*, 2021, 14(2): 159-168. doi:10.21053/ceo.2020.00465

- [30] Lagergren J, Lindam A. Increased risk of laryngeal and pharyngeal cancer after gastrectomy for ulcer disease in a population-based cohort study [J]. *Br J Cancer*, 2012, 106(7): 1342-1345. doi:10.1038/bjc.2012.72
- [31] 谭嘉杰, 王路, 黄祚峰, 等. 胃蛋白酶在喉癌组织中的表达和意义[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2016, 51(8): 593-599. doi:10.3760/cma.j.issn.1673-0860.2016.08.007
- TAN Jiajie, WANG Lu, HUANG Zuofeng, et al. The expression and significance of pepsin in laryngeal carcinoma[J]. *Chinese Journal of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery*, 2016, 51(8): 593-599. doi:10.3760/cma.j.issn.1673-0860.2016.08.007
- [32] Niu K, Guo CJ, Teng SY, et al. Pepsin promotes laryngopharyngeal neoplasia by modulating signaling pathways to induce cell proliferation[J]. *PLoS One*, 2020, 15(1): e0227408. doi:10.1371/journal.pone.0227408
- [33] Johnston N, Dettmar PW, Lively MO, et al. Effect of pepsin on laryngeal stress protein (Sep70, Sep53, and Hsp70) response: role in laryngopharyngeal reflux disease[J]. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2006, 115(1): 47-58. doi:10.1177/000348940611500108
- [34] Ali MELS, Bulmer DM, Dettmar PW, et al. Mucin gene expression in reflux laryngeal mucosa: histological and in situ hybridization observations[J]. *Int J Otolaryngol*, 2014, 2014: 264075. doi:10.1155/2014/264075
- [35] Johnston N, Wells CW, Samuels TL, et al. Pepsin in nonacidic refluxate can damage hypopharyngeal epithelial cells[J]. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2009, 118(9): 677-685. doi:10.1177/000348940911800913
- [36] Komatsu Y, Kelly LA, Zaidi AH, et al. Hypopharyngeal pepsin and Sep70 as diagnostic markers of laryngopharyngeal reflux: preliminary study[J]. *Surg Endosc*, 2015, 29(5): 1080-1087. doi:10.1007/s00464-014-3789-y
- [37] Chaudhari M, Jayaraj R, Bhaskar AS, et al. Oxidative stress induction by T-2 toxin causes DNA damage and triggers apoptosis via caspase pathway in human cervical cancer cells[J]. *Toxicology*, 2009, 262(2): 153-161. doi:10.1016/j.tox.2009.06.002
- [38] Samuels TL, Johnston N. Pepsin as a causal agent of inflammation during nonacidic reflux [J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2009, 141(5): 559-563. doi:10.1016/j.otohns.2009.08.022
- [39] Sandner A, Illert J, Koitzsch S, et al. Reflux induces DNA strand breaks and expression changes of MMP1+9+14 in a human miniorgan culture model[J]. *Exp Cell Res*, 2013, 319(19): 2905-2915. doi:10.1016/j.yexcr.2013.09.004
- [40] Sasaki CT, Toman J, Vageli D. The in vitro effect of acidic-pepsin on nuclear factor KappaB activation and its related oncogenic effect on normal human hypopharyngeal cells [J]. *PLoS One*, 2016, 11(12): e0168269. doi:10.1371/journal.pone.0168269
- [41] 刘倩, 吕颜露. 咽喉反流通过 NF-κB 信号通路介导炎症反应对声带黏膜的影响[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2019, 48(1): 32-37. doi:10.3870/j.issn.1672-0741.2019.01.006
- LIU Qian, LV Yanlu. Effect of laryngopharyngeal reflux on vocal cord mucosa via inflammatory response mediated by NF-κB signaling pathway[J]. *Acta Medicinæ Universitatis Scientiæ et Technologiæ Huazhong*, 2019, 48(1): 32-37. doi:10.3870/j.issn.1672-0741.2019.01.006
- [42] Kunze B, Wein F, Fang HY, et al. Notch signaling mediates differentiation in barrett's esophagus and promotes progression to adenocarcinoma[J]. *Gastroenterology*, 2020, 159(2): 575-590. doi:10.1053/j.gastro.2020.04.033
- [43] Doukas PG, Vageli DP, Sasaki CT, et al. Pepsin promotes activation of epidermal growth factor receptor and downstream oncogenic pathways, at slightly acidic and neutral pH, in exposed hypopharyngeal cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(8): 4275. doi:10.3390/ijms22084275
- [44] Adams J, Heintz P, Gross N, et al. Acid/pepsin promotion of carcinogenesis in the hamster cheek pouch [J]. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2000, 126(3): 405-409. doi:10.1001/archotol.126.3.405
- [45] 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
- [46] 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. doi:10.1186/s12935-019-0772-7
- [47] Choudhary MM, France TJ, Teknos TN, et al. Interleukin-6 role in head and neck squamous cell carcinoma progression [J]. *World J Otorhinolaryngol Head Neck Surg*, 2016, 2(2): 90-97. doi:10.1016/j.wjorl.2016.05.002
- [48] Rébé C, Ghiringhelli F. Interleukin-1β and cancer [J]. *Cancers*, 2020, 12(7): 1791. doi:10.3390/cancers12071791
- [49] Wood JM, Hussey DJ, Woods CM, et al. Does gene expression in laryngeal subsites differ between patients with laryngopharyngeal reflux and controls? [J]. *Clin Otolaryngol*, 2018, 43(1): 158-163. doi:10.1111/coa.12918
- [50] Zhang F, Cao H. MicroRNA-143-3p suppresses cell growth and invasion in laryngeal squamous cell carcinoma via targeting the k-Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway [J]. *Int J Oncol*, 2019, 54(2): 689-701. doi:10.3892/ijo.2018.4655