基础研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001133

NF-κB 信号通路的激活在胃食管反流破坏食管黏膜上皮屏障功能机制中的作用

房　渝,黄　春,温剑虎,秦治明,李　军,刘　恒
(重庆医科大学附属第一医院胸外科、心脏大血管外科,重庆　400016)

【摘　要】**目的**:本研究旨在探讨肿瘤坏死因子 κB(nuclear factor κB,NF-κB)在反流破坏食管黏膜屏障发病机制中的作用,为寻求有效的干预措施提供理论依据。**方法**:建立单纯十二指肠和混合反流小鼠模型,检测食管黏膜跨上皮电阻抗以及细胞间间隙,使用基因芯片和生物信息学的方法筛选出反流食管黏膜差异表达的基因。运用免疫组化检测食管黏膜 NF-κB 亚基 p50、p65 和紧密连接蛋白 Cldn1、Cldn4 的表达,运用 qRT-PCR 和 Western blot 检测食管黏膜上皮 Cldn1、Cldn4 的表达,运用 ELISA 检测食管黏膜 NF-κB 靶基因白细胞介素(interleukin,IL)-1β、IL-6 和 IL-8 的表达,通过特殊细胞染色检测并计数食管黏膜中性粒细胞、肥大细胞以及嗜酸性粒细胞。反流小鼠模型予以腹腔注射 NFκB 抑制剂 Bay11-7085[20 mg/(kg·d)10 d,观察用药组以及未用药组小鼠食管黏膜跨上皮电阻抗以及 IL-1β、IL-6 和 IL-8 的表达差异。**结果**:反流食管黏膜跨上皮电阻抗下降,细胞间间隙增宽;基因富集分析和显著性分析指出反流食管黏膜 NF-κB 及其下游靶基因表达被激活;基因表达实验指出反流食管黏膜内 NF-κB 亚基 p50 和 p65 以及 NF-κB 下游靶基因 IL-1β、IL-6 和 IL-8 表达上调,紧密连接 Cldn1 和 Cldn4 的表达和分布发生失调;反流食管黏膜中性粒细胞、肥大细胞以及嗜酸性粒细胞计数均明显增加;NF-κB 抑制实验指出给药组反流黏膜的跨上皮电阻抗值较未给药组显著上调,而炎症因子的表达水平则显著下调。**结论**:胃食管反流激活小鼠食管黏膜 NF-κB 信号通路,导致上皮屏障功能的损伤。抑制 NF-κB 通路具有潜在增强食管黏膜抗反流的能力。

【关键词】小鼠模型;胃食管反流;肿瘤坏死因子 κB;屏障功能;紧密连接
【中图法分类号】R329.3　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2015-12-24

Role of NF-κB pathway activation in attenuation of esophageal barrier function via gastroesophageal reflux in mice

Fang Yu, Huang Chun, Wen Jianhu, Qin Zhiming, Li Jun, Liu Heng
(*Department of Thoracic & Cardiovascular Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To investigate the role of nuclear factor κB(NF-κB) in impairment of esophageal barrier function viagastroesophageal reflux(GER) and to provide theoretical guidance for treatment. ***Methods***: Surgical models of duodenal and mixed reflux were developed in mice. Trans-epithelial electrical resistance(TEER) and intercellular space of esophageal mucosa were detected by mini-Ussing chamber and Toluidine Blue stain.Mouse esophageal epithelium was analyzed by gene micro-array. The expressions of NF-κB subunits(p50 and p65) and tight junction proteins(Cldn1 and Cldn4) were detected by immunohistochemistry. Cldn1 and Cldn4 were also quantified by qRT-PCR and Western blot. NF-κB target genes(IL-1β, IL-6 and IL-8) were detected by ELISA. Neutrophils, mast cells and eosinophils within mucosa were quantified. The duodenal and mixed reflux models were treated with an NF-κB inhibitor, Bay11-7085[20 mg/(kg·d) i.p.] for 10 days. The TEER and cytokines(IL-1β, IL-6, IL-8) were measured. ***Results***: Decrease of TEER and dilated intercellular space were observed in mucosa via reflux.Activation of NF-κB pathway was confirmed by gene set enrichment analysis and significance analysis of micro-arrays. Cldn1 and Cldn4 were down-regulated and mislocalized by qRT-PCR, Western blot and immunohistochemistry.Increase of neutrophils, mast cells and eosinophils within refluxed mucosa were observed. Treatment with Bay11-7085 counteracted the effect of reflux on TEER and cytokines. ***Conclusion***: GER activates NF-κB pathway and attenuates esophageal barrier function in mice. Targeting NF-κB pathway is a potential way to strengthen esophageal barrier function.

【Key words】mouse model; gastroesophageal reflux; nuclear factor κB; barrier function; tight junction

作者介绍:房　渝,Email:fangyucs@sina.com,
研究方向:Barrett 食管和食管腺癌发生机制的研究;胃食管反流破坏食管黏膜屏障功能机制的研究。

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金资助项目(编号:81400590);
重庆医科大学附属第一医院博士生启动基金。
优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20170103.1611.018.html
(2017-01-03)

胃食管反流（gastroesophageal reflux，GER）导致食管黏膜上皮屏障功能的损伤，显著影响患者的生活质量，可产生一系列远期并发症（如 Barrett 食管和食管腺癌）。临床上对 GER 的干预措施主要包括生活方式的改变、抑酸治疗以及抗反流手术治疗，但均未获得十分满意的效果。

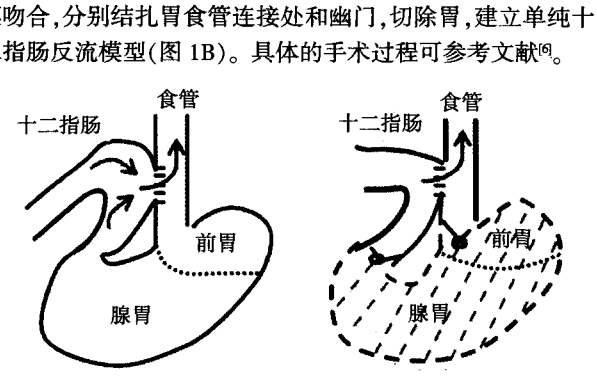
临床上人 GER 食管黏膜的病理生理主要表现为上皮间间隙增宽（dilated intercellular space，DIS）以及黏膜对氢离子的通透性增强[1]。体外实验以及动物实验也表明酸和（或）胆盐处理的食管黏膜的跨上皮电阻抗（trans-epithelial electrical resistance，TEER）明显下调，同时对氢离子的通透性增强[2-3]。传统观点认为反流物直接破坏食管黏膜细胞连接，促使氢离子通过上皮底侧膜进入细胞质，最终导致黏膜损伤以及炎症反应[4]。但 Souza 等[5]通过大鼠 GER 模型，观察到黏膜炎症要显著早于黏膜损伤，提示炎症可能是导致食管黏膜屏障功能损伤的重要因素之一。

为寻求一种行之有效的 GER 干预策略，需要更加深入理解 GER 损伤食管黏膜上皮屏障功能的机制。本研究通过建立 GER 小鼠模型，进一步研究炎症在反流破坏食管黏膜屏障机制中的作用。

1 材料与方法

1.1 GER 小鼠模型的建立

本研究已获重庆医科大学动物伦理委员会批准。8 周龄雄性野生型 C57BL/6J 小鼠予以标准实验室条件饲养。术前小鼠予以氯胺酮/咪达唑仑混合液腹腔注射麻醉（氯胺酮 80 mg/kg，咪达唑仑 12 mg/kg）。上腹正中切口，将小鼠食管下 1/3 段和近端十二指肠对系膜缘分别做两个全层切口，进行黏膜-黏膜对端吻合，建立混合反流小鼠模型（图 1A）；将小鼠食管下 1/3 段和近端十二指肠对系膜缘的全层切口进行黏膜-黏膜吻合，分别结扎胃食管连接处和幽门，切除胃，建立单纯十二指肠反流模型（图 1B）。具体的手术过程可参考文献[6]。



A. 混合反流小鼠模型　B. 单纯十二指肠反流小鼠模型

图 1 手术建立 GER 小鼠模型

Fig.1 Surgical models of gastroesophageal reflux in mice

从小鼠食管黏膜中抽提总 RNA，用于基因芯片和 qRT-PCR 检测；从小鼠食管黏膜中抽提总蛋白，用于 Western blot 以及 ELISA 检测；获取完整的小鼠食管样本用于组织学评价；获取小鼠食管黏膜用于 Toluidine Blue 染色；获取小鼠食管黏膜用于 TEER 检测。分别给予两种反流小鼠腹腔注射 NF-κB 抑制剂 Bay11-7085[20 mg/(kg·d)]10 d，获取小鼠食管黏膜，分别行 TEER 以及细胞因子定量检测。

1.2 食管黏膜 TEER 检测

按照 Jovov 等[7]人实验步骤分别测量出小鼠食管黏膜的电势差（potential difference，PD）以及回路电流（loop current，LC）。按照欧姆定律，通过计算 PD/LC 来计算 TEER。

1.3 黏膜总 RNA 的抽提

使用 RNeasy Fibrous Tissue Mini 试剂盒（Qiagen，Valencia，CA）对食管黏膜总 RNA 进行抽提。采用凝胶电泳技术对 RNA 的质量进行评价，应用分光光度测定法对 RNA 浓度进行测量。

1.4 基因芯片和数据分析

采用 Bioanalyzer 对总 RNA 样本进行质量检测（要求 RNA 完整数>7），采用 Agilent 4×44000 小鼠基因芯片与总 RNA 进行杂交，采集图像，并对图像进行量化。运用基因富集分析（gene set enrichment analysis，GSEA）从三个方面对原始数据进行分析：经典信号通路（canonical pathway，CP，含有 880 个基因集）、基因本体分析（gene ontology，GO，含有 1454 个基因集）以及转录因子分析（transcription factor，TF，含有 615 个基因集）。运用基因显著性分析（significance analysis of microarray，SAM）筛选出表达上调和下调的基因。

1.5 qRT-PCR 检测黏膜上皮 Claudin-1（Cldn1）/Claudin-4（Cldn4）mRNA 的表达水平

按照 Advantage RT-for-PCR 试剂盒（Clontech，Mountain View，CA）的标准步骤对总 RNA 进行反转录。在标准 PCR 条件下，对 Cldn1 和 Cldn4 反应体系进行 qRT-PCR 检测，18 s rRNA 作为内参，使用 $2^{-\Delta\Delta Q}$ 法计算基因的相对表达量。

1.6 Western blot 检测食管黏膜 Cldn1/Cldn4 蛋白表达水平

将食管黏膜与蛋白裂解液混合匀浆，离心 5 min（5 000 r/min），收集上清液，对总蛋白进行定量。煮沸法将总蛋白变性固定，PAGE 电泳，半干法转膜，5% BSA 封闭。分别加入抗小鼠 Cldn1 单克隆抗体（3 μg/mL，374900，Invitrogen，Camarrilo，CA），抗兔 Cldn4 多克隆抗体（3 μg/mL，364800，Invitrogen，Camarrilo，CA），抗兔 GAPDH 单克隆抗体（1∶2 000，2118，Cell Signaling Technology，Boston，MA）。4 ℃过夜，复温，TBST 洗膜，使用抗鼠或抗兔二抗孵育 2 h。加入显影底物，暗室曝光。使用灰度成像法对蛋白条带进行量化。

1.7 ELISA 法检测食管黏膜 IL-1β/IL-6/IL-8 的表达水平

对小鼠食管黏膜的总蛋白进行抽提定量。按照 mouse cytokine/chemokine magnetic bead panel Kit 试剂盒（EMD Millipore，Billerica，MA）的标准步骤对 IL-1β 和 IL-6 进行定量；按照 mouse IL-8 试剂盒（MyBiosource，San Diego，CA）对

IL-8 进行定量。

1.8 免疫组化法检测食管黏膜 NF-κB 以及 Cldn1/Cldn4 的表达水平

将制备好的石蜡切片分别与抗兔 NF-κB p50 多克隆抗体(1:100,ab7971,Abcam),抗兔 NF-κB p65 多克隆抗体(1:500,ab7970,Abcam),抗兔 Cldn1 多克隆抗体(1:200,B6327,LSBio,Seattle,WA)和抗兔 Cldn4 多克隆抗体(1:25,B2370,LSBio,Seattle,WA)4 ℃孵育过夜。复温,PBS 洗片,抗鼠或抗兔二抗室温下孵育。使用 Streptavidin-peroxidase reaction 试剂盒以及 3,3-diaminobenzidine 对目标蛋白进行显色。

1.9 食管黏膜 Toluidine Blue 染色

新鲜食管黏膜依次固定于 4%戊二醛溶液、1%锇酸溶液以及 50%乙酸铀酰溶液中。将固定组织包被于 Poly/Bed 812 树脂中,制备 0.5 μm 切片,并将切片置于 1%toluidine blue 染色液中染色观察。

1.10 食管黏膜中性粒细胞、肥大细胞以及嗜酸性粒细胞染色和计数

制备标准石蜡切片,按照中性粒细胞染色试剂盒的标准步骤对中性粒细胞进行染色,显深红色的细胞为中性粒细胞;将切片置于 0.03%的甲基蓝溶液中,显紫红色的细胞为肥大细胞;将切片依次置于 Harris 苏木素溶液以及伊红溶液中,细胞质呈鲜红色颗粒状的细胞为嗜酸性粒细胞。使用 BX51 Olympus 光学显微镜获取图像,Image J 图像处理软件计数每平方毫米食管黏膜区域中肥大细胞、嗜酸性粒细胞以及中性粒细胞的数量。

1.11 统计学分析

采用 SPSS 19.0 进行统计学分析,数据以平均值 ± 标准差表示。每个实验重复 3 次,多组间数据比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-t 法。检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 GER 破坏小鼠食管黏膜上皮屏障功能

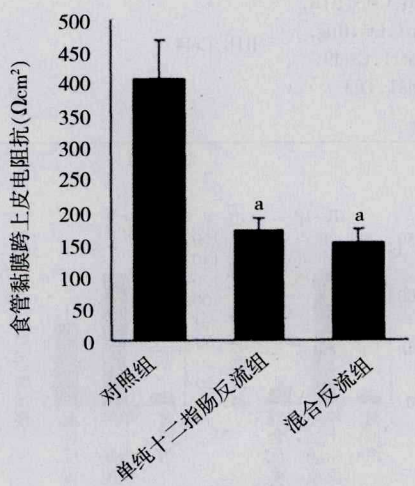
研究表明,术后 4 周混合反流和单纯十二指肠反流食管黏膜 TEER 均明显下调(与对照组比较,P 均小于 0.01)(图 2A)。Toluidine blue 染色显示 2 种反流食管黏膜上皮间间隙明显增宽,其增宽区域主要位于基底层和旁基底层(图 2B)。

2.2 GER 激活小鼠食管黏膜上皮 NF-κB 信号通路

GSEA-CP 提示单纯十二指肠反流黏膜有 9 个炎症通路被激活,混合反流黏膜有 11 个炎症通路被激活;GSEA-GO 提示单纯十二指肠反流黏膜有 12 个炎症功能基因簇被激活,混合反流黏膜有 14 个炎症功能基因簇被激活;GSEA-TF 提示炎症相关转录因子 NF-κB 在 2 种反流食管黏膜中均被激活(表 1)。

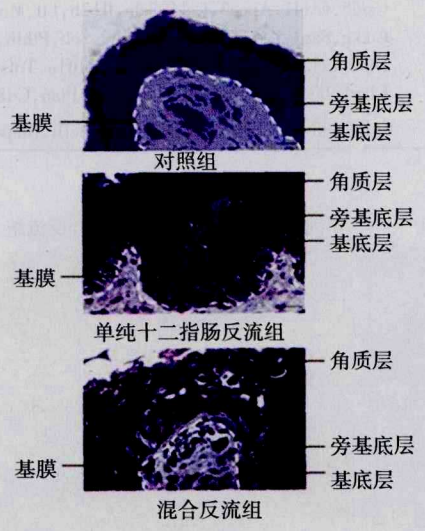
SAM 筛选出 2 种反流食管黏膜内所有差异表达的基因。结合 SAM 和已知 NF-κB 下游靶基因,分析出单纯十二指肠反流黏膜有 45 个 NF-κB 靶基因上调,混合反流黏膜有 2 个 NF-κB 靶基因上调。这些基因包括趋化因子(如 Cxcll、Cxcl5、Cxcl9、Ccl4 和 Ccl20),炎症因子(如 IL-1β、IL-6、IL-11、IL-12α/β、IL-23α 和 TNF-α),以及基质金属蛋白酶(MMP3 和 MMP9),见表 1。

免疫组化和 ELISA 检测结果表明,NF-κB 亚基 p50 和 p65 在两种反流食管黏膜的细胞核和细胞质中均有高表达,而在正常小鼠中则不表达(图 3A)。2 种反流食管黏膜内 IL-6 和 IL-8 的表达均上调(IL-6:与对照组比较,单纯十二指肠反流组 P<0.01,混合反流组 P<0.05;IL-8:与对照组比较,单纯十二指肠反流组 P<0.01,混合反流组 P<0.05),同时 IL-1β 在



a:与对照组比较,P < 0.01

A. 术后 4 周反流食管黏膜 TEER



B. 术后 4 周反流食管黏膜细胞间间隙

图 2 胃食管反流破坏食管黏膜上皮屏障功能

Fig.2 Gastroesophageal reflux attenuatesesophageal barrier function

单纯十二指肠反流黏膜中的表达也上调(IL-1β:与对照组比较,单纯十二指肠反流组 $P<0.05$),如图 3B 所示。

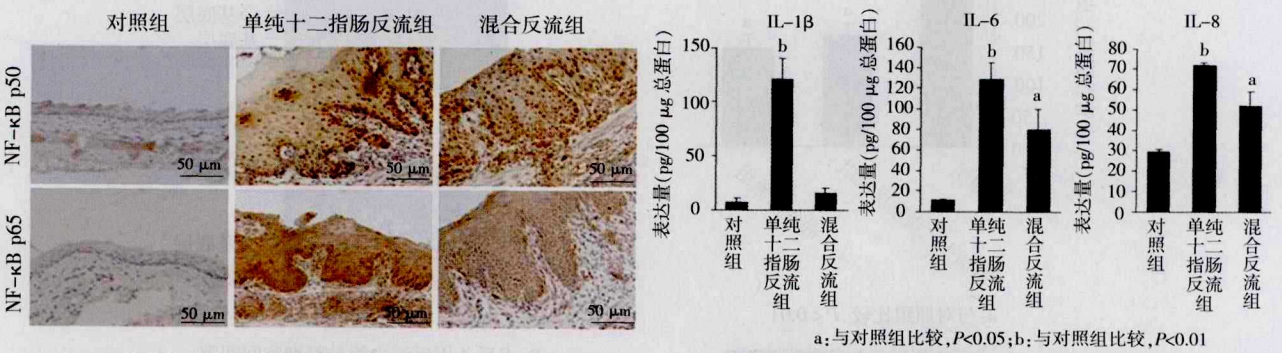
2.3 GER 诱导食管黏膜上皮炎症细胞的募集

GER 募集中性粒细胞、肥大细胞和嗜酸性粒细胞到食管黏膜区域(图 4A)。研究表明,2 种反流食管黏膜中性粒细胞、肥大细胞以及嗜酸性粒细胞计数均明显高于对照组(中性粒细胞:与对照组比较,2 种反流模型 P 值均小于 0.01;肥大细胞:与对照组比较,2 种反流模型 P 值均小于 0.01;嗜酸性粒细胞:与对照组比较,2 种反流模型 P 值均小于 0.01),如图 4B 所示。

表 1 单纯十二指肠反流和混合反流食管黏膜激活的经典通路、转录因子、功能基因簇以及表达失调的 NF-kB 靶基因

Tab.1 Activation of canonical pathways, transcription factors, gene ontologies and dys-regulated NF-kB target genes in mice esophageal mucosa against reflux

	十二指肠反流	混合反流
经典传导通路	CP89:细胞因子 - 细胞因子受体相互作用途径 CP122:Toll 样受体信号传导通路 CP237:细胞因子通路 CP238:炎症信号传导通路 CP283:IL10 信号传导通路 CP702:免疫相关的信号传导通路 CP872:MMP- 细胞因子连接信号传导通路 CP446:趋化因子受体与趋化因子连接传导通路 CP391:TNFR2 信号传导通路	CP89:细胞因子 - 细胞因子受体相互作用途径 CP122:Toll 样受体信号传导通路 CP129:TCR 信号传导通路 CP237:细胞因子通路 CP238:炎症信号传导通路 CP283:IL10 信号传导通路 CP408:激活的 TLR 信号传导通路 CP838:TNF 信号传导通路 CP872:MMP- 细胞因子连接信号传导通路 CP312:NF-κB 信号传导通路
基因本体分析	GO320:细胞因子分泌的调控 GO513:细胞因子的产生 GO593:炎症反应 GO672:细胞因子产生的调控 GO1233:趋化因子的活动 GO1268:趋化因子受体的结合 GO500:T 细胞激活的调控 GO578:白细胞的激活 GO583:适应性免疫反应 GO714:T 细胞激活的正性调控 GO882:淋巴细胞激活的调控	GO335:免疫加工的正性调控 GO419:细胞因子生物合成的正性调控 GO513:细胞因子的产生 GO578:白细胞的激活 GO584:适应性免疫反应 GO672:细胞因子产生的调控 GO815:T 细胞的激活 GO882:淋巴细胞激活的调控 GO918:内源性免疫反应 GO926:淋巴细胞的激活 GO1034:细胞因子产生的正性调控 GO1147:IL 的结合 GO1422:细胞因子的结合 GO1443:细胞因子的活动
转录因子	TF30: NF-κB	TF30:NF-κB
NF-κB 靶基因		
上调	Cxcl5, Cxcl1, Apoc3, Ccl4, Sele, Il12b, Ltf, Mmp3, Lcn2, Il6, Csf3, Il1b, Cd3g, Saa3, Il11, Gad1, Afp, Ptgs2, Self, Pthlh, Slfn2, Pglyrp1, Lta, Ifng, Dio2, Ccl20, Rdh7, Cd38, Tnfaip3, Hif1a, Tnfsf13b, Btk, Tacr1, Cxcl9, Klra1, Il23a, Tnf, Nfkbi2, Mx1, Bir1, Pian, Cd80, Igfbp1, Saa1, Tff3	Il1b, Ccl4
下调	Bdnf, Igfbp2, Sh3bgrl, Hoxa9, Fgfr, BclII, Bmp4, Ptgis, Gclc	



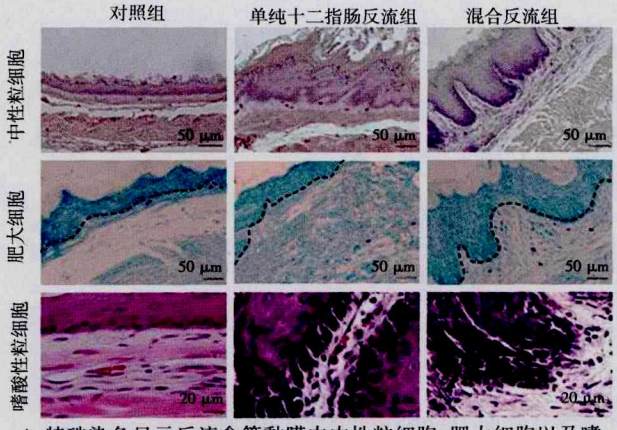
A. 免疫组化染色显示反流食管黏膜 NF-κB 亚基 p50/p65 表达

B. ELISA 检测反流食管黏膜 NF-κB 靶基因 IL-1β, IL-6 和 IL-8 的表达

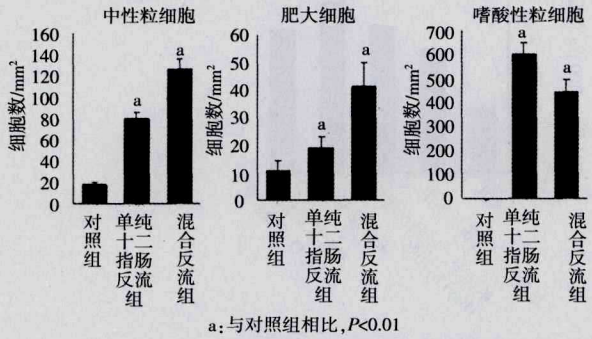
a:与对照组比较,$P<0.05$;b:与对照组比较,$P<0.01$

图 3 小鼠食管黏膜 NF-κB 亚基 p50/p65 以及 NF-κB 靶基因 IL-1β、IL-6 和 IL-8 的表达

Fig.3 Expression of NF-κB subunits p50/p65 and NF-κB target genes IL-1β, IL-6 and IL-8 in mice esophageal mucosa



A. 特殊染色显示反流食管黏膜内中性粒细胞、肥大细胞以及嗜酸性粒细胞的浸润红染细胞表示中性粒细胞，紫染细胞表示肥大细胞，细胞质内红色颗粒表示嗜酸性粒细胞



a：与对照组相比，$P<0.01$

B. 计数比较反流食管黏膜内炎症细胞的数量

图 4　小鼠反流食管黏膜内炎症细胞的浸润

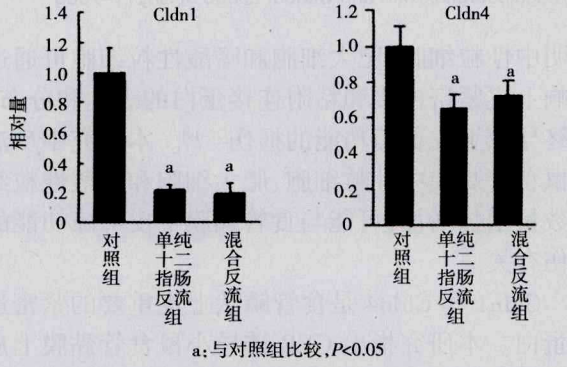
Fig.4　Infiltration of inflammation cells in mice esophageal mucosa

2.4　GER 诱导小鼠食管黏膜上皮紧密连接基因表达失调

体外研究指出 GER 通过调节紧密连接蛋白的表达和分布导致上皮细胞屏障功能损伤[2,8]。qRT-PCR 显示 2 种反流食管黏膜 Cldn1 和 Cldn4 mRNA 的表达明显下调（Cldn1：与对照组比较，2 种反流模型 P 值均小于 0.05；Cldn4：与对照组比较，单纯十二指肠反流组 $P<0.05$）。Western blot 也显示 Cldn1 和 Cldn4 蛋白表达明显下调（Cldn1：与对照组比较，两种反流模型 P 值均小于 0.01；Cldn4：与对照组比较，混合反流组 $P<0.01$），如图 5A、B、C 所示。免疫组化指出 Cldn1 和 Cldn4 蛋白主要分布于正常小鼠食管黏膜的基底层、旁基底层以及表层，而反流食管黏膜 2 种蛋白的表达在细胞膜下调，细胞质上调，如图 5D 所示。

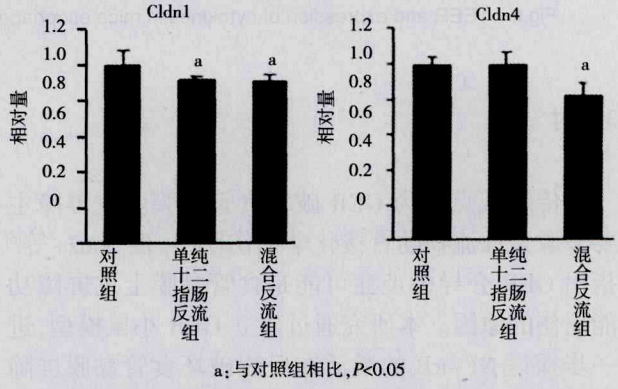
2.5　NF-κB 的抑制可对抗 GER 对食管黏膜屏障功能的损伤作用

分别给予 2 种反流小鼠腹腔注射 NF-κB 抑制剂Bay11-7085，研究发现给药组混合反流小鼠食管黏膜的 TEER 较未给药组明显上调（与未给药组比较，$P<0.01$），但仍低于正常组。十二指肠反流小鼠给药后，其 TEER 值也具有明显上升的趋势，但无统计学意义（图 6A）。同时，NF-κB 抑制剂也可明显降低十二指肠反流和混合反流食管黏膜内 IL-6 的表达水平（与 2 种未给药组比较，2 种给药组模型 P 值均小于 0.05），给药组混合反流食管黏膜内 IL-1β 的表达也有明显下降趋势，但无统计学意义，如图 6B、C、D 所示。



a：与对照组比较，$P<0.05$

A. qRT-PCR 检测食管黏膜 Cldn1/Cldn4 mRNA 的表达水平

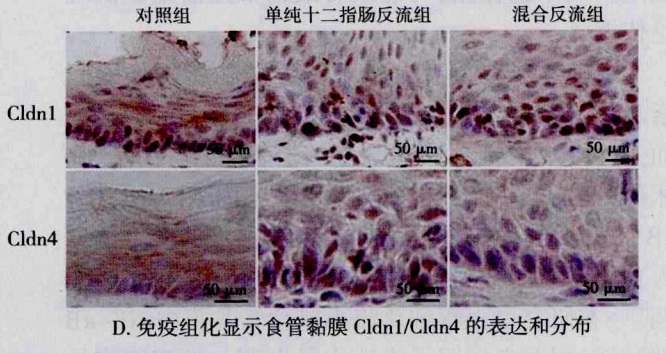


a：与对照组相比，$P<0.05$

B. Western blot 检测食管黏膜 Cldn1/Cldn4 蛋白的表达水平



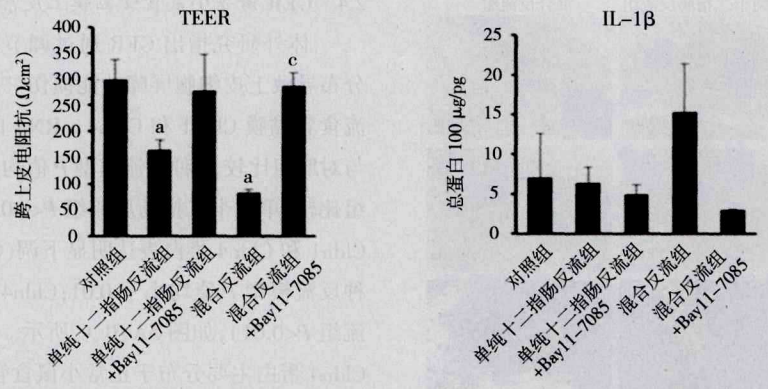
C. 使用灰度成像技术量化食管黏膜 Cldn1/Cldn4 蛋白的表达水平



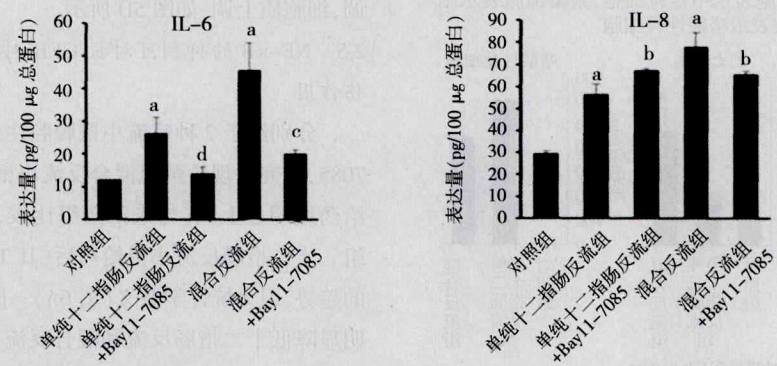
D. 免疫组化显示食管黏膜 Cldn1/Cldn4 的表达和分布

图 5　2 种模型小鼠食管黏膜 Cldns 表达的失调以及分布异常

Fig.5　Expression and distribution of Cldns in mice esophageal mucosa



A. 腹腔注射 Bay11-7085 食管黏膜 TEER 的变化　　B. 腹腔注射 Bay11-7085 食管黏膜 IL-1β 的表达



a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与对照组比较，$P<0.01$；c：与混合反流组比较，$P<0.05$；d：与十二指肠反流组比较，$P<0.05$

C. 腹腔注射 Bay11-7085 食管黏膜 IL-6 的表达　　D. 腹腔注射 Bay11-7085 食管黏膜 IL-8 的表达

图 6　反流小鼠腹腔注射 Bay11-7085 食管黏膜 TEER 以及炎症因子的表达

Fig.6　TEER and expression of cytokines in mice esophageal mucosa against reflux with and without usage of Bay11-7085

3　讨　论

传统观点认为 GER 破坏食管黏膜上皮屏障主要来源于反流物的直接化学损伤作用。但 Souza 等[5]指出 GER 介导的炎症可能是食管黏膜上皮屏障功能损伤的原因。本研究通过建立 GER 小鼠模型，进一步探讨 NF-κB 的激活在反流破坏食管黏膜屏障发生机制中的作用，为寻求有效的干预措施提供理论依据。

炎症因子是导致食管黏膜屏障功能损伤的因素之一，其表达的上调可进一步激活 NF-κB 的表达，而 NF-κB 的激活又促进炎症因子表达的升高[9]。临床研究表明，人 GER 食管黏膜细胞内 NF-κB、IL-1β和 IL-8 的表达上调[10]。体外运用酸或胆酸可诱导人食管鳞状上皮细胞 NF-κB、IL-6 和 IL-8 表达上调[11]。本研究也观察到反流小鼠食管黏膜内 NF-κB 被激活，同时炎症因子表达水平上调。炎症细胞是导致食管黏膜屏障功能损伤的又一因素。大量研究表明中性粒细胞、肥大细胞和嗜酸性粒细胞可通过影响上皮紧密连接和粘附连接蛋白的表达和分布，最终导致上皮屏障功能的损伤[12-14]。本研究中反流小鼠食管黏膜中性粒细胞、肥大细胞和嗜酸性粒细胞数量明显增加，可能与食管黏膜上皮屏障功能的损伤有关。

Cldn1 和 Cldn4 是食管鳞状上皮重要的紧密连接蛋白。本研究指出 GER 诱导小鼠食管黏膜上皮 Cldn1 和 Cldn4 表达下调和分布异常。体外运用酸、胆盐和胃蛋白酶可直接诱导食管黏膜上皮 Cldn1、Cldn4 表达的下调和细胞内分布的异常[2]。GER 的大鼠模型也得到相似的结论[11]。以上研究结果提示 NF-κB 通过诱导紧密连接蛋白表达失调和分布异常从而破坏食管黏膜屏障功能[15]。本研究还观察到 NF-κB 抑制剂明显抑制反流上皮内 NF-κB 的活性以及炎症因子的表达水平，明显缓解了反流对上皮屏障功能的损伤作用。

综上所述，本研究认为 GER 对食管黏膜屏障的损伤是由反流物的直接损伤以及 NF-κB 介导的

炎症共同介导的(图 7)。一方面,反流物直接破坏上皮尖端连接复合物,导致黏膜上皮细胞间隙增快以及对离子通透性增加,进一步导致黏膜上皮水肿和坏死,最终启动炎症级联放大效应;另一方面,GER 激活黏膜上皮 NF-κB,导致大量炎症趋化因子分泌,同时大量炎症细胞募集,进一步启动炎症级联放大效应。炎症因子既可上调黏膜内 NF-κB 的表达,又可诱导紧密连接蛋白表达以及分布的失调,最终导致食管黏膜上皮的损伤。反之,食管黏膜上皮的损伤又可进一步加重黏膜组织的炎症反应,最终导致恶性循环[16-18]。

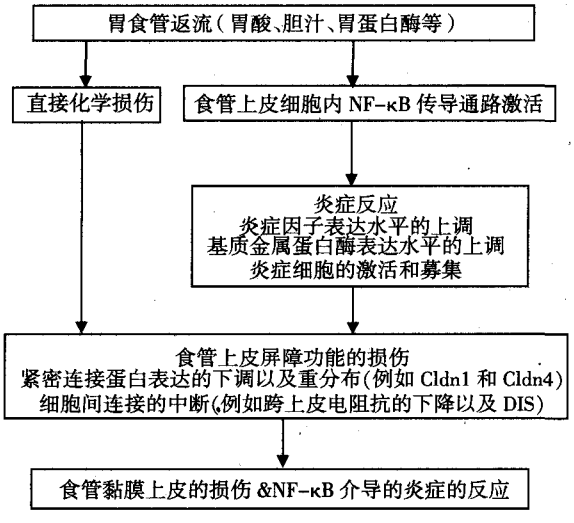


图 7 胃食管反流破坏食管黏膜上皮屏障功能的可能机制

Fig.7 Schematic framework of attenuation of esophageal barrier by gastroesophagael reflux

本研究中单纯胃反流食管黏膜内未见明显炎症反应(数据未显示),而家兔的胃反流模型可出现明显的炎症反应[4]。因小鼠食管腔被覆过度角化的鳞状上皮,对胃反流物的抵抗能力强,但此上皮对十二指肠反流的感受更加敏感。小鼠和人食管黏膜在解剖以及生理上存在显著差异,将基础研究转化为临床应用之前需要谨慎而深入的研究、探讨和确认。本研究提示靶向 NF-κB 的干预措施在未来可能作为一种潜在的治疗手段。本研究的缺陷在于 NF-κB 抑制剂的种类、剂量以及作用时间较为单一,进一步研究需考虑多种类、多剂量以及多时间点的使用。

参 考 文 献

[1] Carlsson R, Fandriks L, Jonsson C, et al. Is the esophageal squamous epithelial barrier function impaired in patients with gastroesophageal reflux disease? [J]. Scand J Gastroenterol, 1999, 34(5): 280-288.

[2] Chen X, Oshima T, Shan J, et al. Bile salts disrupt human esophageal squamous epithelial barrier function by modulating tight junction proteins[J]. Am J PhysiolGastrointest Liver Physiol, 2012, 303(2): G199-G208.

[3] Tobey NA, Hosseini SS, Argote CM, et al. Dilated intercellular spaces and shunt permeability in nonerosive acid-damaged esophageal epithelium[J]. Am J Gastroenterol, 2004, 99(1): 13-22.

[4] Orlando RC. Pathophysiology of gastroesophageal reflux disease [J]. J ClinGastroenterol, 2008, 42(5): 584-588.

[5] Souza RF, Huo X, Mittal V, et al. Gastroesophageal reflux might cause esophagitis through a cytokine-mediated mechanism rather than caustic acid injury[J]. Gastroenterology, 2009, 137(5): 1776-1784.

[6] He J, Fang Y, Chen X. Surgical models of gastroesophageal reflux with mice[J]. J Vis Exp, 2015(102): e53012.

[7] Jovov B, Van Itallie CM, Shaheen NJ, et al. Claudin18: a dominant tight junction protein in Barrett's esophagus and likely contributor to its acid resistance[J]. Am J PhysiolGastrointest Liver Physiol, 2007, 293(6): G1106-G1113.

[8] Oshima T, Koseki J, Chen X, et al. Acid modulates the squamous epithelial barrier function by modulating the localization of claudins in the superficial layers[J]. Lab Invest, 2012, 92(1): 22-31.

[9] Korkaya H, Liu S, Wicha MS. Regulation of cancer stem cells by cytokine networks: attacking cancer's inflammatory roots[J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(19): 6125-6129.

[10] Isomoto H, Nishi Y, Kohno S. CXC receptor is overexpressed in endoscopy-negative gastroesophageal reflux disease[J]. Scand J Gastroenterol, 2005, 40(2): 231-232.

[11] Asaoka D, Miwa H, Hirai S, et al. Altered localization and expression of tight junction proteins in a rat model with chronic acid reflux esophagitis[J]. J Gastroenterol, 2005, 40(8): 781-790.

[12] Katsube T, Tsuji H, Onoda M. Nitric oxide attenuates hydrogen peroxide-induced barrier disruption and protein tyrosine phosphorylation in monolayers of intestinal epithelial cell[J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1773(6): 794-803.

[13] Snoek SA, Dhawan S, van Bree SH, et al. Mast cells trigger epithelial barrier dysfunction, bacterial translocation and postoperative ileus in a mouse model[J]. Neurogastroenterol Motil, 2012, 24(2): 172-184.

[14] Furuta GT, Nieuwenhuis EE, Karhausen J, et al. Eosinophils alter colonic epithelial barrier function: role for major basic protein[J]. Am J PhysiolGastrointest Liver Physiol, 2005, 289(5): 890-897.

[15] Al-sadi R, Ye D, Dokladny K, et al. Mechanism of IL1β-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability[J]. J Immunol, 2008, 180(8): 5653-5661.

[16] Ding L, Lu Z, Foreman O, et al. Inflammation and disruption of the mucosal architecture in claudin-7-deficient mice[J]. Gastroenterology, 2012, 142(2): 305-315.

[17] Perez-Moreno M, Song W, Pasolli HA, et al. Loss of p120 catenin and links to mitotic alterations, inflammation, and skin cancer[J]. Proc-NatlAcadSci USA, 2008, 105(40): 15399-15404.

[18] Saitou M, Furuse M, Sasaki H, et al. Complex phenotype of mice lacking occluding, a component of tight junction strands[J]. MolBiol Cell, 2000, 11(12): 4131-4142.

（责任编辑：张辉洁）