

儿童分泌性中耳炎中耳腔胃蛋白酶和胃蛋白酶原的表达及临床意义*

罗花南¹ 高滢¹ 马思敬¹ 杨启梅² 邵娜¹ 张阿玲¹ 许珉¹

[摘要] 目的:分析胃蛋白酶、胃蛋白酶原在儿童分泌性中耳炎(OME)中的作用及意义。方法:将 2012-05—2012-12 期间需行鼓膜穿刺(置管术)的 38 例(48 耳)OME 患儿作为实验组,同期不伴有中耳炎、需行人工耳蜗植入的 10 例(10 耳)患儿作为对照组。收集 2 组患儿中耳灌洗液和血浆样本,运用酶联免疫方法检测样本的胃蛋白酶、胃蛋白酶原浓度。结果:实验组中耳灌洗液中胃蛋白酶和胃蛋白酶原的浓度分别为 (48.80 ± 415.99) 、 (676.32 ± 336.71) ng/ml,显著高于对照组 $[(8.20 \pm 4.59)$ 、 (77.27 ± 50.33) ng/ml],2 组差异有统计学意义(均 $P < 0.01$)。实验组中耳灌洗液胃蛋白酶原 I 浓度高于血浆浓度,差异有统计学意义($P < 0.01$)。OME 患儿干耳组其中耳灌洗液胃蛋白酶浓度显著低于浆液组、黏液组($P < 0.01$),而浆液组和黏液组间胃蛋白酶浓度差异无统计学意义($P > 0.05$)。干耳组、浆液组、黏液组中耳灌洗液胃蛋白酶原 I 浓度差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论:OME 患儿中耳腔的胃蛋白酶、胃蛋白酶原可能来源于咽喉反流,咽喉反流与儿童 OME 的发病有关。

[关键词] 分泌性中耳炎;咽喉反流;胃蛋白酶;胃蛋白酶原

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2015.14.005

[中图分类号] R764.21 **[文献标志码]** A

The expression and clinical significance of pepsin and pepsinogen in patients with otitis media with effusion

LUO Huanan¹ GAO Yin¹ MA Sijing¹ YANG Qimei²
SHAO Na¹ ZHANG Aling¹ XU Min¹

(¹Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, the Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, 710004, China; ²Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Shan'xi Provincial Peoples Hospital)

Corresponding author: LUO Huanan, E-mail: luohuanan@126.com

Abstract Objective: To analyze the role and significance of pepsin and pepsinogen in the pathogenesis of OME in children. **Method:** Pediatric patients with otitis media aged 2-8 years who enrolled in our department of the

* 基金项目:西安交通大学第二附属医院青年基金资助项目[No:YJ(QN)201124]

¹ 西安交通大学第二附属医院耳鼻咽喉头颈外科病院(西安,710004)

² 陕西省人民医院耳鼻咽喉头颈外科

通信作者:罗花南, E-mail: luohuanan@126.com

- [13] HAIN T C, SQUIRE T M, STONE H A. Clinical implications of a mathematical model of benign paroxysmal position vertigo[J]. Ann N Y Acad Sci, 2005, 1039:384-394.
- [14] RASHAD U M. Long-term follow up after Epley's manoeuvre in patients with benign paroxysmal positional vertigo[J]. J Laryngol Otol, 2009, 123:69-74.
- [15] UNERI A. Migraine and benign paroxysmal positional vertigo: an outcome study of 476 patients[J]. Ear Nose Throat J, 2004, 83: 814-815.
- [16] VIBERT D, KOMPIS M, HAUSLER R. Benign paroxysmal positional vertigo in older women may be related to osteoporosis and osteopenia[J]. Ann Otol Rhinol Laryngol, 2003, 112: 885-889.
- [17] RAMBOLD H, HEIDE W, HELMCHEN C. Horizontal canal benign paroxysmal positioning vertigo with ipsilateral hearing loss[J]. Eur J Neurol, 2004, 11:31-35.
- [18] HONG S M, BYUN J Y, PARK C H, et al. Saccular damage in patients with idiopathic sudden sensorineural hearing loss without vertigo[J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2008, 139:541-545.
- [19] KAO C L, CHENG Y Y, LEU H B, et al. Increased risk of ischemic stroke in patients with benign paroxysmal positional vertigo: a 9-year follow-up nationwide population study in taiwan[J]. Front Aging Neurosci, 2014, 6:108-108.
- [20] DE RIDDER M, VERELLEN D, VEROVSKI V, et al. Hypoxic tumor cell radiosensitization through nitric Oxide[J]. Nitric Oxide, 2008, 19:164-169.

(收稿日期:2015-01-13)

hospital from May of 2012 to December of 2012 were set as experimental group (38 cases, 48 ears), which should be underwent tympanic membrane puncture/tube insertion. Meanwhile, pediatric patients waiting for cochlear implant without otitis media (10 ears), were set as control group. Middle ear lavage fluid and plasma samples from the two groups were collected and detected using enzyme-linked immune method for pepsin and pepsinogen. **Result:** The concentrations of pepsin and pepsinogen in the middle ear lavage fluid of OME group [(48.8 ± 415.99) ng/ml and (676.32 ± 336.71) ng/ml] were significantly higher than those in the control group [(8.20 ± 4.59) ng/ml and (77.27 ± 50.33) ng/ml] ($P < 0.01$). Meanwhile, the concentration of pepsinogen in the middle ear lavage of OME patients was significantly higher than that of plasma ($P < 0.01$). The concentration of pepsin in the middle ear lavage fluid from the dry ear subgroup was lower than those in the serum ear and mucous ear subgroups ($P < 0.01$), but there was no significant difference about concentrations of pepsinogen among the dry ear, serum ear and mucous ear subgroups ($P > 0.05$). **Conclusion:** Pepsin and pepsinogen in the middle ear cavity of OME patients maybe originated from laryngopharyngeal reflux (LPR), indicating that LPR is associated with the pathogenesis of OME in children.

Key words otitis media with effusion; laryngopharyngeal reflux; pepsin; pepsinogen

分泌性中耳炎 (otitis media with effusion, OME) 以中耳积液和传导性听力下降为特征, 常发生在 2~8 岁的儿童, 中耳渗液反复发作可导致儿童的听力和语言发育迟缓^[1]。慢性 OME 是引起儿童听力下降最主要的原因, 也是儿科最常见的疾病之一, 医疗经济负担和手术介入治疗的费用也十分庞大^[2]。因此, 明确该疾病潜在病理生理学机制是治疗进步的关键。

儿童 OME 的致病因素包括细菌感染、细菌生物膜的形成、儿童咽鼓管解剖特点 (宽、短、直) 和免疫系统的异常等^[3]。最近, 关于咽喉反流 (laryngopharyngeal reflux, LPR) 在儿童 OME 病理学中的潜在作用引起越来越多的关注^[4]。

LPR 是指胃内容物反流到食管上括约肌以上的咽喉部, 由此引起的症状和体征, 是胃食管反流 (gastroesophageal reflux, GER) 的食管外表现^[5]。胃内容物反流在新生儿和婴幼儿较常见, 多项研究已经证实 LPR 可能参与了中耳炎的病理生理^[6-7]。He 等^[8] 和 O'Reilly 等^[9] 研究发现, 14% 患有中耳炎的患儿在中耳腔内检测出胃蛋白酶, 提出胃蛋白酶很可能是 OME 发病的独立危险因素, 为研究 OME 提供了新的思路。

国内关于 LPR 与 OME 发病机制的临床研究尚处于空白状态, 本研究通过检测 OME 和人工耳蜗植入患儿中耳腔内胃蛋白酶、胃蛋白酶原的表达差异及 OME 的临床亚型是否与中耳腔内胃蛋白酶、胃蛋白酶原的浓度相关, 从而探讨胃蛋白酶、胃蛋白酶原在儿童 OME 发病中的可能作用。

1 资料与方法

1.1 临床资料

将 2012-05—2012-12 期间在西安交通大学第二附属医院耳鼻咽喉科住院的 38 例 OME 患儿纳入本研究 (实验组), 男 18 例, 女 20 例; 年龄 2.8~7.3 岁, 平均 (4.7 ± 1.0) 岁; BMI 17.43 ± 2.93 。纳入标准: 临床诊断为 OME (鼓膜照相、声

导抗检查等方法确诊), 拟首次行鼓膜穿刺或鼓膜置管术的患儿。排除标准: 颅面畸形或已知的综合征, 伴有其他慢性病的患儿。

同期因患有感音神经性聋, 需行人工耳蜗植入术的 10 例患儿作为对照组, 男 5 例, 女 5 例; 年龄 2.4~6.7 岁, 平均 (4.2 ± 1.0) 岁, BMI 15.48 ± 2.54 。排除标准: 有颅脑损伤性疾病; 有鼓膜穿孔、慢性化脓性中耳炎等其他中耳疾病病史; 合并有其他慢性病的患儿。所有的患儿均要求在近 1 个月内未服用抑酸药物治疗。两组的年龄、BMI 均差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$), 提示两组之间具有可比性。

1.2 采样方法

1.2.1 OME 患儿中耳灌洗液的采集 在严格的无菌操作下行鼓膜切开术, 抽吸导管放置到鼓膜切开口进入中耳腔, 如有积液, 则将积液抽吸干净后用 0.5 ml 无菌生理盐水灌洗中耳腔, 然后抽吸置入 0.5 ml EP 管, 中耳腔积液黏稠者行鼓膜置管术。若中耳腔无积液, 则用 0.5 ml 无菌生理盐水灌洗浸泡中耳裂隙, 吸出置入无菌 0.5 ml EP 管内, 于 -80°C 低温冰箱中保存备用。所有患者根据中耳积液的大体外观, 分为干耳组、浆液组和黏液组。当患儿双侧中耳病变有差异时, 选择病变较重的一侧纳入研究。

1.2.2 人工耳蜗植入患儿中耳灌洗液的采集 纳入研究的患儿均为重度感音神经性聋, 均需行人工耳蜗植入术, 手术方法均为经乳突-后鼓室径路暴露中耳, 并以生理盐水冲洗术腔。当窦腔打开能见到鼓窦入口, 停止灌洗液灌洗, 保证灌洗液勿流入中耳裂隙。将少量的生理盐水 (0.5 ml) 经血管探针通过鼓窦入口灌入到中耳裂隙, 用相同的注射器吸除浸泡在中耳裂隙的液体, 置于无菌 0.5 ml EP 管, 样本标记后于 -80°C 低温冰箱中保存。

1.2.3 受试者血浆采样 纳入研究的受试者均静脉取血。收集晨起空腹的静脉血 3 ml, 4°C 静置

1 h, 14 000 g 离心 10 min 后取上清血浆, 置于 -80°C 低温冰箱冻存。

1.3 检测方法

样本中胃蛋白酶和胃蛋白酶原的测定采用人胃蛋白酶和胃蛋白酶原 I 的 ELISA 试剂盒(福建蓝图科技有限公司)。先以试剂盒所示的标准品原始浓度绘制标准曲线, 然后在酶标仪(Bio-tek, PowerWave X5)450nm 波长下测定各标本的吸光度值, 与标准曲线相比得到对应浓度。

1.4 统计学处理

采用统计学软件 SPSS 17.0 进行数据处理。以 $\bar{x} \pm s$ 代表均数和标准差, 两独立样本均数之间的比较采用 t 检验, 多个样本均数之间的比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验组与对照组中耳腔胃蛋白酶和胃蛋白酶原的比较

实验组胃蛋白酶、胃蛋白酶原的阳性率分别为 71.05%(27/38)、78.95%(30/38), 对照组分别为 20.00%(2/10)、30.00%(3/10), 2 组阳性率比较均差异有统计学意义(均 $P < 0.01$)。实验组中耳灌洗液胃蛋白酶、胃蛋白酶原 I 的浓度分别为 (48.84 ± 15.99) ($13.16 \sim 88.16$) ng/ml 和 (676.32 ± 336.71) ($100.35 \sim 1603.77$) ng/ml, 显著高于对照组的 (8.20 ± 4.59) ($2.26 \sim 15.52$) ng/ml 和 (77.27 ± 50.33) ($18.58 \sim 191.44$) ng/ml, 差异有统计学意义(均 $P < 0.01$)。实验组中耳灌洗液胃蛋白酶原 I 浓度为 (77.57 ± 20.66) ng/ml, 高于血浆中的浓度 $(39.31 \sim 120.08)$ ng/ml, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 对照组中耳灌洗液胃蛋白酶原 I 浓度为 (72.44 ± 20.94) ng/ml, 和血浆中胃蛋白酶原 I 的浓度相当, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 OME 干耳组、浆液组、黏液组胃蛋白酶和胃蛋白酶原浓度比较

实验组 38 例(48 耳) OME 患儿中, 干耳 6 例(12.5%), 浆液性耳 23 例(47.9%), 黏液性耳 19 例(39.6%)。3 组胃蛋白酶和胃蛋白酶原 I 阳性率及浓度比较见表 1。中耳灌洗液样本干耳组胃蛋白酶和胃蛋白酶原的阳性率显著低于浆液组和黏液组($P < 0.05$), 且干耳组胃蛋白酶的浓度显著低于

浆液组、黏液组(均 $P < 0.01$), 而浆液组和黏液组间胃蛋白酶浓度差异无统计学意义($P > 0.05$)。3 组间胃蛋白酶原 I 浓度比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

本研究首次调查了国内 OME 患儿其中耳腔内胃蛋白酶、胃蛋白酶原的表达情况, 研究发现 OME 患儿其中耳胃蛋白酶、胃蛋白酶原 I 的浓度显著高于无中耳炎的人工耳蜗植入组, 且 OME 患儿中耳灌洗液胃蛋白酶原 I 浓度高出血浆 2.55~13.36 倍, 进一步验证和支持了 Lieu 等^[7]、He 等^[8]、O'Reilly 等^[9] 和 Al-Saab 等^[10] 的研究结果, 提示中耳腔内的胃蛋白酶和胃蛋白酶原与儿童 OME 相关。

本研究还分析了不同类型的 OME(干耳、浆液性、黏液性)中耳灌洗液中胃蛋白酶、胃蛋白酶原 I 的差别, 结果显示干耳组胃蛋白酶浓度显著低于浆液组和黏液组, 说明 OME 炎症类型越重, 其胃蛋白酶浓度越高^[9]。但 3 组间胃蛋白酶原 I 浓度差异无显著统计学意义, 提示胃蛋白酶(而非胃蛋白酶原)与 OME 的关系更为密切, 但仍需大样本研究进一步验证。

中耳腔出现的胃蛋白酶和胃蛋白酶原是如何来源的? Lieu 等^[7] 通过行反转录聚合酶链反应(RT-PCR)发现单独分离的中耳乳突黏膜层并无胃蛋白酶原 I/A 基因的表达, 说明中耳腔内的胃蛋白酶并不是中耳黏膜内源性产生的。O'Reilly 等^[9] 的蛋白质印迹结果进一步支持了上述观点, 即尚不能证实胃蛋白酶 A(胃蛋白酶的主要部分)可以在胃以外的部位产生。中耳腔内胃蛋白酶和胃蛋白酶原浓度远远高于血清的对应浓度, 更说明胃蛋白酶和胃蛋白酶原并不是自血清扩散聚集到中耳腔的, 而是“外源性”产生的。动物实验显示鼻咽部暴露于假定的反流环境可导致短暂性炎症和咽鼓管功能障碍, 并使胃内容物反流入中耳腔^[11-12], 说明 LPR 可能参与了中耳炎的病理生理过程^[6]。如果胃内容物进入中耳腔, 虽然浓度低于胃内水平, 但导致黏膜损伤的潜在作用却显而易见, 可能与反流后酸性环境中黏膜炎症、结合胆汁酸的毒性、反流物渗透性损害和胃酶的蛋白质分解损伤(尤其是胃蛋白酶)、自身黏膜保护机制过程产生的炎性级联

表 1 OME 患儿中干耳组、浆液组、黏液组胃蛋白酶和胃蛋白酶原 I 浓度比较

$\bar{x} \pm s$

组别	例数	胃蛋白酶		胃蛋白酶原 I	
		阳性率/%	浓度/(ng · ml ⁻¹)	阳性率/%	浓度/(ng · ml ⁻¹)
干耳组	6	14.81(4/27)	17.55 ± 15.46	10.00(3/30)	455.00 ± 227.90
浆液组	23	51.85(14/27)	45.36 ± 11.38	53.33(16/30)	616.38 ± 310.32
黏液组	19	33.33(9/27)	52.60 ± 18.27	36.67(11/30)	675.96 ± 385.96

反应有关^[13-14]。

胃蛋白酶原由胃内主细胞产生,是胃蛋白酶的无活性前体,胃蛋白酶原的活化需要将其一级结构上的 44 位氨基酸剪切后并在酸性环境下转化成有活性的胃蛋白酶^[15]。Yufera 等^[16]运用血清放射性碘方法证明了胃酸液中胃蛋白酶的活度,结果显示胃蛋白酶在 pH6.5 呈失活状态但稳定,当 pH 降低到 2.0 时,约 70% 胃蛋白酶显示活性。之后 Crapko 等^[17]研究发现胃蛋白酶在 pH 低于 8.0 的环境中失活但稳定,胃酸反流导致 pH 降低可再次激活胃蛋白酶。引起急性中耳炎的 2 种最常见的细菌是肺炎链球菌和流感嗜血菌,均以产酸为代谢副产物:链球菌属代谢时可使葡萄糖发酵为乳酸,而嗜血菌属可选择性发酵葡萄糖和蔗糖^[9],发酵的副产物导致 pH 下降。失活的胃蛋白酶可因一次急性细菌感染导致中耳和咽鼓管 pH 降低而再次激活,故胃蛋白酶和细菌(细菌生物膜)可能发挥协同效应,导致 OME 的慢性炎症。

当然,本研究也有一定的局限性。我们仅检测了中耳腔内胃蛋白酶/胃蛋白酶原的表达,通过“排除法”间接推断 OME 患儿 LPR 的发生。其实 LPR 的诊断手段包括反流症状量表、反流体征量表、24 h 双探头 pH 值监测等,但因患儿年龄较小,依从性差,患儿家属填写的量表不一定能反应患儿的真实状态,故需在后续的研究中不断完善。

总之,本研究证实了以胃蛋白酶和胃蛋白酶原为代表的 LPR 参与了儿童 OME 的发病,在一定程度上有助于进一步理解 OME 的发病机制,但是还需要更多的临床和基础研究去支持 OME 和 LPR 的相关性。

参考文献

- [1] 夏忠芳,孔维佳,王智楠,等. 儿童中耳炎临床特征及治疗进展[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2014,28(7):505-508.
- [2] KHODAVERDI M, JORGENSEN G, LANGE T, et al. Hearing 25 years after surgical treatment of otitis media with effusion in early childhood[J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2013, 77: 241-247.
- [3] SAAFAN M E, IBRAHIM W S, TOMOUM M O. Role of adenoid biofilm in chronic otitis media with effusion in children[J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2013, 270: 2417-2425.
- [4] KOUFMAN J A, AVIV J E, CASIANO R R, et al. Laryngopharyngeal reflux position statement of the committee on speech, voice, and swallowing disorders of the American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery[J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2002, 127: 32-35.

- [5] 李兰,赵宇,马翔宇,等. 儿童咽喉反流的特点及诊治初探[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2014,28(15): 1145-1148.
- [6] TASKER A, DETTMAR P W, PANETTI M, et al. Reflux of gastric juice and glue ear in children[J]. *Lancet*, 2002, 359: 493-493.
- [7] LIEU J E, MUTHAPPAN P G, UPPALURI R. Association of reflux with otitis media in children[J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2005, 133: 357-361.
- [8] HE Z, O'REILLY R C, BOLLING L, et al. Detection of gastric pepsin in the middle ear fluid of children with otitis media[J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2007, 137: 59-64.
- [9] OREILLY R C, HE Z, BLOEDON E, et al. The role of extraesophageal reflux in otitis media in infants and children[J]. *Laryngoscope*, 2008, 118: 1-9.
- [10] AL-SAAB F, MANOUKIAN J J, AI-SABAH B, et al. Linking laryngopharyngeal reflux to otitis media with effusion: pepsinogen study of adenoid tissue and middle ear fluid[J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2008, 37: 565-571.
- [11] HEAVNER S B, HARDY S M, WHITE D R, et al. Transient inflammation and dysfunction of the Eustachian tube secondary to multiple exposures of simulated gastroesophageal refluxant[J]. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2001, 110: 928-934.
- [12] SUDHOFF H, BUCKER R, GROLL C, et al. Tracing of gastric reflux into the middle ear in a Mongolian gerbil model[J]. *Otol Neurotol*, 2007, 28: 124-128.
- [13] JOHNSTON N, DETTMAR P W, LIVELY M O, 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: 47-58.
- [14] ROBERTS N B. Review article: human pepsins-their multiplicity, function and role in reflux[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2006, 24: 2-9.
- [15] MAGLIULO G, PLATEROTI R, PLATEROTI A M. Gastroesophageal reflux disease and the presence of pepsin in the tears[J]. *Med Hypotheses*, 2013, 80: 129-130.
- [16] YUFERA M, MOYANO F J, ASTOLA A, et al. Acidic digestion in a teleost: postprandial and circadian pattern of gastric pH, pepsin activity, and pepsinogen and proton pump mRNAs expression[J]. *PLoS One*, 2012, 7: e33687.
- [17] CRAPKO M, KERSCHNER J E, SYRING M, et al. Role of extra-esophageal reflux in chronic otitis media with effusion[J]. *Laryngoscope*, 2007, 117: 1419-1423.

(收稿日期:2015-01-17)