

# 闭锁小带蛋白1和闭锁蛋白与儿童原发性胆汁反流性胃炎关系的研究

司晓红, 王振红, 陈云庆, 孙彩虹, 于敬红, 曲政海, 王彩霞\*

青岛大学, 山东 青岛

收稿日期: 2022年2月28日; 录用日期: 2022年3月21日; 发布日期: 2022年3月29日

## 摘要

目的: 探讨闭锁小带蛋白1 (zonula occludens-1, ZO-1)和闭锁蛋白(occludin)与儿童原发性胆汁反流性胃炎(Primary bile reflux gastritis, PBRG)的关系。方法: 选取2016年1月至2019年1月因“腹痛、恶心、呕吐”就诊于青岛大学附属医院儿科的62名患儿作为研究对象, 根据胃镜检查结果将该62例患儿分为PBRG组32例和胃黏膜未见明显异常的对照组30例, 再根据胆汁反流程度将32例PBRG患儿分为I级10例, II级22例。取胃窦黏膜病变组织, 采用SP免疫组织化学半定量法检测胃粘膜组织ZO-1和occludin的含量。结果: 儿童PBRG组ZO-1蛋白染色结果阳性率为50% (16/32), 其水平明显低于对照组的83.3% (25/30), 差异有统计学意义( $P < 0.01$ ), 而occludin在两组中的表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与此同时在32例儿童PBRG中, ZO-1在胆汁反流程度分级中所占的比例分别为I级90.0% (9/10), II级31.8% (7/22), 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); PBRG组和对照组中occludin的阳性表达率分别为78.1% (25/32), 86.7% (26/30), 差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论: ZO-1蛋白在儿童PBRG组中的表达较对照组明显减弱, 且ZO-1蛋白的表达量与胆汁反流程度呈负相关; occludin的表达量与胆汁反流的严重程度无关。

## 关键词

闭锁小带蛋白1, 闭锁蛋白, 原发性胆汁反流性胃炎, 儿童

## Study on the Relationship between Zonula Occludens-1 and Primary Bile Reflux Gastritis in Children

Xiaohong Si, Zhenhong Wang, Yunqing Chen, Caihong Sun, Jinghong Yu, Zhenghai Qu, Caixia Wang\*

Qingdao University, Qingdao Shandong

Received: Feb. 28<sup>th</sup>, 2022; accepted: Mar. 21<sup>st</sup>, 2022; published: Mar. 29<sup>th</sup>, 2022

\*通讯作者。

文章引用: 司晓红, 王振红, 陈云庆, 孙彩虹, 于敬红, 曲政海, 王彩霞. 闭锁小带蛋白 1 和闭锁蛋白与儿童原发性胆汁反流性胃炎关系的研究[J]. 临床医学进展, 2022, 12(3): 2360-2365. DOI: 10.12677/acm.2022.123340

## Abstract

**Objective:** This paper discusses the relationship between zonula occludens-1 (zo-1), occludin and primary bile reflux gastritis (PBRG). **Methods:** A total of 62 children who were admitted to the Department of Pediatrics, the Affiliated Hospital of Qingdao University from January 2016 to January 2019 due to “abdominal pain, nausea and vomiting” were selected as the subjects. According to the results of gastroscopy, the 62 children were divided into PBRG group (n = 32) and control group (n = 30) with no obvious abnormalities in gastric mucosa. According to the degree of bile reflux, the 32 children with PBRG were divided into grade I (n = 10) and Grade II (n = 22). The contents of ZO-1 and occludin in gastric mucosa were detected by SP immunohistochemical semi-quantitative method. **Results:** The positive rate of ZO-1 protein staining in the children PBRG group was 50% (16/32), which was significantly lower than that in the control group (83.3% (25/30), and the difference was statistically significant ( $P < 0.01$ ). There was no significant difference in occludin expression between the two groups ( $P > 0.05$ ). Meanwhile, in 32 children with PBRG, the proportion of ZO-1 in the degree of bile reflux was 90.0% (9/10) in grade I and 31.8% (7/22) in grade II, respectively, with statistical significance ( $P < 0.05$ ). The positive expression rate of occludin in PBRG group and control group was 78.1% (25/32) and 86.7% (26/30), respectively, with no statistical significance ( $P > 0.05$ ). **Conclusion:** Compared with non-bile reflux gastritis, the expression of ZO-1 in children’s PBRG was significantly decreased, and the expression level of ZO-1 was negatively correlated with the pathological damage degree of gastric mucosa. The expression of occludin was not related to the severity of bile reflux.

## Keywords

Zonula Occludens-1, Occluding, Primary Bile Reflux Gastritis, Children

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

随着电子纤维内镜技术的广泛开展，儿童胆汁反流性胃炎的检出率和诊断率越来越高，据近年来国内文献报道，我国胃镜下儿童胆汁反流性胃炎检出率为 12.3% [1]。胆汁反流性胃炎分为 PBRG 与继发性胆汁反流性胃炎两种，继发性主要见于胃肠道手术后，而 PBRG 主要见于儿童，常见原因有胃动力不足、十二指肠运动异常活跃以及胃窦和十二指肠协调运动破坏等，本文章主要研究 ZO-1 和 occludin 与儿童 PBRG 的关系，为研究儿童 PBRG 的发病机制提供参考依据。各种原因导致的胆汁反流入胃内，引起胃黏膜的损伤，幽门括约肌功能失调，进一步加重胆汁反流。胃粘膜上皮细胞、内皮细胞间存在各种连接，是组成胃粘膜屏障的结构基础。细胞间的连接方式主要有紧密连接、缝隙连接、黏附连接和桥粒连接[2]，它们共同维持着胃黏膜上皮的完整性和正常功能，紧密连接在其中发挥着关键的作用。紧密连接是由多种蛋白组成的结构复合体，包括外周膜蛋白、细胞骨架蛋白和跨膜蛋白等[3]，occludin 是跨膜蛋白的主要成分之一，起着调节紧密连接的通透性和细胞的极性作用，而 ZO-1 蛋白属于外周膜蛋白[4]，是第一个被发现并研究得最为透彻的紧密连接相关蛋白[5]，它通过形成细胞桥接蛋白成分，维持紧密连接的完整性，提高细胞间连接的紧密程度。众多的研究结果显示，ZO-1 的表达与胃肠道的炎症、肿瘤等有关，随着炎症程度的增加而其表达减弱。目前关于 ZO-1 和 occludin 与儿童胃肠道疾病的关系尚未研究透彻，

本文旨在探讨 ZO-1、occludin 在儿童 PBRG 中的作用，以便于指导临床诊断与治疗。

## 2. 对象与方法

### 2.1. 对象

选取 2016 年 1 月至 2019 年 1 月因“腹痛、恶心、呕吐”就诊于青岛大学附属医院儿科并接受胃镜检查留取胃黏膜标本的 62 名患儿作为研究对象，纳入标准：① 症状：反复腹痛，以脐周或脐上痛为主，常伴有恶心、呕吐、饱胀、食欲不振，常因刺激性食物或发烧、感冒使症状加重；② 体征：脐周和(或)剑突下可有压痛，舌苔厚腻；③ 除外其他系统疾病。PBRG 内镜诊断标准[6]：检查中患者合作，无明显恶心、呕吐，胃黏膜尤其是胃窦部黏膜有水肿、出血或脆性增加；胃黏液湖有黄色或绿色胆汁染色和/或胃黏膜有胆汁染色。

### 2.2. 分组

儿童 PBRG 患儿 32 例(男 16 例，女 16 例)为试验组，最小年龄 9 岁，最大年龄 14 岁，平均年龄 11.0 岁；同期选取对照组患儿 30 例(男 20 例，女 10 例)，最小年龄 7 岁，最大年龄 15 岁，平均年龄 11.8 岁，病程 1 个月~3 年不等。其中儿童 PBRG 组再根据胆汁反流程度将 32 例再分为 I 级 10 例，男性 6 例、女性 4 例，平均年龄为 11.5 岁；II 级 22 例，男性 10 例、女性 12 例，平均年龄为 10.3 岁。儿童 PBRG 组与对照组、不同胆汁反流程度组之间的性别、年龄、病程、种族、基础疾病、用药情况之间差异无统计学意义( $P$  值  $> 0.05$ )。纳入标准：① 症状：反复腹痛，以脐周或脐上痛为主，常伴有恶心、呕吐、饱胀、食欲不振，常因刺激性食物或发烧、感冒使症状加重；② 体征：上腹部可有压痛，舌苔厚腻；③ 除外其他系统疾病；④ 无剧烈干呕动作，进镜时见胃底黏液湖呈淡黄色，黏膜黄染或附着多量黄绿色胆汁。试验前患儿家属已签署知情同意书，试验符合医学伦理学。

## 3. 方法

1) 胃黏膜标本的采集：在行胃镜检查时于胃窦部(距幽门 3~5 cm)取 2 块胃黏膜组织，分别用于免疫组织化学染色及病理分析。

### 2) 免疫组织化学

a) 标本处理及制备：将标本石蜡切片脱蜡至水，反复洗涤，加入牛奶液体封闭 5 min。滴加适当稀释的 ZO-1 (Abcam 公司，滴度均为 1:1000) 37℃ 孵育 2 小时，PBS 洗 2 分钟  $\times$  3 次，加入荧光标记的二抗(Abcam 公司)，37℃ 孵育 20 分钟，PBS 洗涤，DAB 显色，封片，光学显微镜下观察。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

b) 结果判断：染色结果综合染色强度及阳性细胞数两方面进行半定量分析。在排除非特异性染色及边缘效应的前提下，进行光镜下分析，以黄色、棕黄色、棕褐色为阳性表达。参照孙桂彬等[7]的方法，将染色强度判定为：无着色(0 分)；淡黄色为(1 分)；棕黄色为(2 分)；棕褐色为(3 分)。阳性细胞数判定：按组织切片中阳性细胞比例评分，每例随机观察 5 个视野，每个视野 100 个细胞，计数 500 个细胞中染色阳性细胞数：阳性细胞比例  $< 5\%$  为 0 分， $5\% \sim 25\%$  为 1 分， $25\% \sim 50\%$  为 2 分， $50\% \sim 75\%$  为 3 分， $\geq 76\%$  为 4 分。总分为阳性细胞比例评分与染色强度评分的乘积， $\leq 6$  分为阴性表达， $\geq 7$  分。

3) 内镜下 PBRG 分级：分级标准根据王吉[8]等提出的黏液糊胆汁黄染程度分级 I 级为黏液糊清亮，淡黄色，少量胃液潴留，黏膜无黄染；II 级为黏液糊呈黄色清亮，中等量胃液潴留，黏膜局部或散在黄染；III 级为黏液糊呈淡绿色或深绿色，黏膜广泛黄染，大量胃液潴留。内镜病理：病理检查按照狄克逊(Dixon) [9]评分的病理积分(RFI)标准，将胃小凹增生、固有层水肿、血管扩张、黏膜肌增生按程度分别

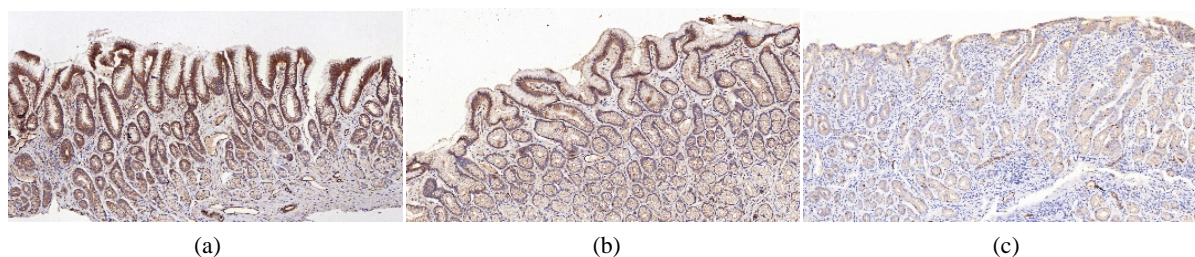
分为正常、轻度、中度、重度分别记为 0、1、2、3 分；炎症程度按炎细胞浸润程度，以轻度炎细胞浸润为 1 分，中度 2 分，重度为 3 分，总分最高 15 分。

4) 统计学方法。应用 SPSS19.0 统计学软件，数据以  $\bar{x} \pm s$  表示，计数资料的比较采用  $\chi^2$  检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 4. 结果

### (一) 免疫组织化学法检测胃窦黏膜中 ZO-1 的蛋白表达

ZO-1 定位于正常胃黏膜上皮细胞胞浆中，ZO-1 染色棕黄色，蛋白表达强阳性；ZO-1 定位于 I 级胆汁反流性胃炎胃黏膜上皮细胞胞浆中，ZO-1 染色黄色，蛋白表达阳性；ZO-1 定位于 II 级胆汁反流性胃炎胃黏膜上皮细胞胞浆中，ZO-1 染色浅黄色，蛋白表达弱阳性(见图 1)。



**Figure 1.** Immunohistochemical map of gastric mucosa ZO-1. (a) is a control group ZO-1 protein dyeing, (b) is a level I bile reflux group ZO-1 protein dyeing, (c) is a level II bile reflux group ZO-1 protein dyeing. Yellow and brown pulls represent the dye strength of ZO-1, the more coloring, the greater the expression.

**图 1.** 胃黏膜 ZO-1 的免疫组化图谱。(a)为对照组 ZO-1 蛋白染色，(b)为 I 级胆汁反流组 ZO-1 蛋白染色，(c)为 II 级胆汁反流 ZO-1 蛋白染色。黄色及棕黄色颗粒代表 ZO-1 的染色强度，着色越深，表达量越大

### (二) PBRG 组与对照组 ZO-1 蛋白阳性表达率的变化

PBRG 组 ZO-1 阳性表达率为 50% (16/32)，对照组的阳性表达率为 83.3% (25/30) (见表 1)，差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。

**Table 1.** PBRG group and control group ZO-1 content n (%) comparison

**表 1.** PBRG 组与对照组 ZO-1 含量 n (%)比较

	阳性	阴性	$\chi^2$ 值	P 值
PBRG 组	16 (50.0)	16 (50.0)	7.681	0.006
对照组	25 (83.3)	5 (16.7)		

### (三) PBRG 组与对照组 occludin 蛋白阳性表达率的变化

PBRG 组和对照组中 occludin 的阳性表达率分别为 78.1% (25/32)，86.7% (26/30) (见表 2)，差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

**Table 2.** Comparison of occludin content n (%) in the PBRG group and the control group

**表 2.** PBRG 组与对照组 occludin 含量 n (%)比较

	阳性	阴性	$\chi^2$ 值	P 值
PBRG 组	25 (78.1)	7 (21.9)	0.774	0.379
对照组	26 (86.7)	4 (13.3)		

#### (四) PBRG 组 I 级、II 级 ZO-1 阳性表达率的变化

PBRG 组 I 级、II 级 ZO-1 阳性表达率分别为 90.0% (9/10), 31.8% (7/22) (见表 3), 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

**Table 3.** PBRG group I and II ZO-1 content n (%) comparison

**表 3.** PBRG 组 I 级和 II 级 ZO-1 含量 n (%) 比较

	阳性	阴性	$\chi^2$ 值	P 值
I 级	9 (90.0)	1 (10.0)	5.954	0.015
II 级	7 (31.8)	15 (68.2)		

## 5. 讨论

儿童 PBRG 是一类不明原因导致的胆汁、胰液等十二指肠内容物反流入胃, 溶解胃黏膜的磷脂层和胆固醇, 使胃黏膜发生炎症、糜烂甚至出血, 减弱了胃黏膜的屏障功能, 导致胃黏膜病变的一种疾病。本研究在电子纤维胃镜下发现, 胆汁反流性胃炎患儿胃窦黏膜有不同程度的损伤, 包括黏膜欠光滑、散在出血点、糜烂以及十二指肠球部黏膜充血水肿, 这些均提示胆汁对胃黏膜屏障功能的损伤。胃黏膜屏障由上皮细胞及细胞间连接组成, 可有效防止  $H^+$  的反向弥散, 阻止大分子入侵, 是防止有害微生物从胃侵入机体的第一道防线[10]。胆汁反流入胃, 胃内 PH 值升高, 胃黏膜屏障被打破, 细胞间连接遭破坏, 进而导致细胞连接中具有重要作用的紧密连接相关蛋白 ZO-1 结构破坏。因此 ZO-1 常被作为评估机体内各种组织的紧密连接屏障功能障碍的指标[11]。occludin 属于跨膜蛋白的一种, 维持着紧密连接的通透性, 是 ZO-1 蛋白的作用点, 在紧密连接中的作用更是不可忽视。

在本研究中, 将儿童 PBRG 组胃黏膜组织与对照组进行比较, 发现无论是染色强度还是阳性细胞数, 实验组均比对照组中显示的 ZO-1 蛋白含量减少, 表明胆汁反流会破坏胃黏膜细胞的结构。胆汁反流入胃促进胃酸及胃蛋白酶分泌, 破坏胃黏膜屏障功能, 导致黏膜损伤[12]。紧密连接的功能受多种信号因子的影响, 比如蛋白激酶 C、钙离子以及酪氨酸激酶系统等[13], 当细胞外钙离子降低时, 肌球蛋白轻链激酶被激活, 导致细胞质或者细胞膜上 ZO-1 与 occludin 蛋白分离, 进而导致相邻细胞的间隙增大[14], 这可能与反流入胃内的胆汁致使胃泌素分泌增加有关。另外, ZO-1 蛋白和 occludin 与细胞膜的位置关系, 导致了当胃黏膜屏障受损时, ZO-1 蛋白含量所受影响要远大于 occludin 的含量, 这就是在试验组和对照组中 occludin 的阳性表达率无统计学差异的原因之一。

在研究儿童胃黏膜受胆汁反流程度对 ZO-1 蛋白和 occludin 含量影响的试验中发现, 随着反流程度的增加, ZO-1 蛋白含量逐渐减少, 这表明 ZO-1 蛋白可作为评估胃黏膜炎症程度的指标。张太坤等[15]研究发现, 胆汁中的主要成分胆汁酸及胆盐破坏胃黏膜屏障, 导致氢离子反向弥散, 进而刺激肥大细胞释放组胺, 使血管扩张, 渗透性增大, 炎性渗出物增多, 黏膜下血管淤血, 血运差, 进一步加重了黏膜的损伤。因此, 胆汁反流越重, 炎症程度越重, 进而致使 ZO-1 蛋白含量也越少, 这与陈俊等[2]的研究结果相符。而 occludin 的含量在不同反流程度中仍未见统计学差异, 进一步证明了儿童胃黏膜屏障功能受损后, 对 occludin 影响不明显, 易不排除标本数量少因素。

## 6. 总结

综上所述, ZO-1 蛋白与儿童 PBRG 关系密切。通过对儿童 PBRG 的研究, 发现胆汁在胃黏膜紧密连接的损伤中起着重要的作用。它通过多种机制在不同的分子水平上阻碍紧密连接的正常功能, 影响了 ZO-1 蛋白与细胞膜上闭锁蛋白的结合[16], 导致 ZO-1 蛋白表达下调, 细胞骨架破坏, 粘膜渗透性增加,

各种刺激性因子进入粘膜,加重粘膜的损伤,儿童 PBRG 就是典型病例。在成人溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)患者的相关研究中发现,UC 组 occludin 的表达较正常对照组明显减少,这与本文章的研究结构不同,而 ZO-1 蛋白的表达变化是一致的[17]。儿童胆汁反流导致的胃黏膜损伤与成人溃疡性结肠炎由炎症导致的肠粘膜的损伤为何对 occludin 表达的影响不同?是 occludin 在两种消化道黏膜中的结构不同,还是儿童与成人有一定的差异,本文对此未进行详细的研究,需进一步对儿童 PBRG 进行相关研究,明确其致病机理,以做出更好的治疗方案。

## 参考文献

- [1] 蒋丰智,黎小秀,廖琼,张勇. 合并幽门螺杆菌感染对儿童原发性胆汁反流性胃炎病情的影响[J]. 实用临床医药杂志, 2018, 22(15): 113-115. <https://doi.org/10.7619/jcmp.201815032>
- [2] 陈俊,张慧,张琼慧,李俊红,徐桂涛,徐卫红. 闭锁蛋白和闭锁小带蛋白在慢性胃炎组织中的表达和意义[J]. 胃肠病学, 2018, 23(10): 619-621.
- [3] 王伟,蒋伟燕,陶礼韵,等. 血清 CLDN5、OCLN 和 ZO1 与颅脑损伤急性期患者损伤程度及预后的关系[J]. 浙江医学, 2016, 38(2): 93-95.
- [4] 谭悦,郑长清. 紧密连接蛋白 occludin, ZO-1 在溃疡性结肠炎中的表达及其临床意义[J]. 现代药物与临床, 2018, 33(7): 1803-1808.
- [5] Funke, L., Dakoji, S., Bredt, D.S., et al. (2005) Membrane-Associated Guanylate Kinases Regulate Adhesion and Plasticity at Cell Junctions. *Annual Review of Biochemistry*, **74**, 219-245. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133339>
- [6] Madura, J.A. (2003) Primary Bile Reflux Gastritis: Diagnosis and Surgical Treatment. *The American Journal of Surgery*, **186**, 269-273. [https://doi.org/10.1016/S0002-9610\(03\)00213-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9610(03)00213-7)
- [7] 孙桂彬,杨景国,李永华,陈哲,汪威,韩樱松. PTEN, p16 和 CyclinD1 在胃癌及癌前病变中表达的研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2012, 21(15): 1614-1616. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1008-8849.2012.15.007>
- [8] 王吉,顾玮,葛心怡,胡梅洁,刘进进,马瑾,胡晓莹. 胆汁反流性胃炎胃液总胆汁酸浓度与病理及内镜分级的相关性分析[J]. 中华消化杂志, 2012, 32(7): 473-475. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0254-1432.2012.07.011>
- [9] Dixon, M.F., O'Connor, H.J., Axon, A.T., et al. (1986) Reflux Gastritis: Distinct Histopathologic Entity. *Journal of Clinical Pathology*, **39**, 524-530. <https://doi.org/10.1136/jcp.39.5.524>
- [10] 周银斌,陈东风. 胆汁反流性胃炎研究现状[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2019, 28(6): 689-692.
- [11] 李炜,舒小莉,顾伟忠,等. 幽门螺杆菌感染患儿胃黏膜紧密连接蛋白表达的变化及其意义[J]. 中华儿科杂志, 2015, 53(7): 510-515.
- [12] 苏静,李光,来文辉,等. 胆汁反流对胃泌素,前列腺素 E 及表皮生长因子的影响[J]. 河北医药, 2012, 34(6): 894-895.
- [13] 于惠玲,姜慧卿. 紧密连接蛋白与消化系统疾病[J]. 河北医科大学学报, 2009, 30(10): 1109-1112.
- [14] Ma, T.Y., et al. (2000) Mechanism of Extracellular Calcium Regulation of Intestinal Epithelial Tight Junction Permeability: Role of Cytoskeletal Involvement. *Microscopy Research and Technique*, **51**, 156-168. [https://doi.org/10.1002/1097-0029\(20001015\)51:2<156::AID-JEMT7>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/1097-0029(20001015)51:2<156::AID-JEMT7>3.0.CO;2-J)
- [15] 张太坤,张光奇. 血浆胃动素和血清胃泌素在原发性胆汁反流性胃炎发病中的作用[J]. 实用医学杂志, 2008, 24(16): 2805-2806.
- [16] 甘元涛,赵少勇. 肠黏膜屏障损伤与紧密连接蛋白 ZO-1 的关系研究进展[J]. 现代医药卫生, 2016, 32(7): 1027-1029. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1009-5519.2016.07.023>
- [17] 张续乾,来培培,董魁,方维丽,李海东,刘文天. 溃疡性结肠炎患者结肠黏膜干扰素- $\gamma$ , occludin 和闭锁小带蛋白-1 表达及其相关性研究[J]. 胃肠病学, 2014, 19(10): 588-592.