

论著 · 临床研究

氧化应激在小儿反流性食管炎黏膜损伤中的作用

刘峰,江米足,舒小莉,章许平

(浙江大学医学院附属儿童医院,浙江 杭州 310003)

[摘要] 目的 胃食管反流引起食管黏膜损伤的机制尚不清楚,该研究主要探讨氧化应激在小儿反流性食管炎(RE)黏膜损伤中的作用。方法 对36例(年龄7个月至16岁)经胃镜检查诊断为RE的患儿,测定其食管黏膜氧化应激指标如丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)和一氧化氮(NO)的含量和总超氧化物歧化酶(T-SOD)活力及蛋白质含量。另20例(年龄3~16岁)胃镜检查时未发现食管黏膜损伤者作为对照组。结果 食管黏膜蛋白质含量在两组间差异无显著性意义($P>0.05$);RE组MDA值为每毫克蛋白 $15.36\pm16.67\text{ nmol}$,高于对照组的 $7.51\pm6.17\text{ nmol}$,差异有显著性意义($P<0.01$);RE组T-SOD活力每毫克蛋白为 $30.43\pm35.09\text{ U}$ 低于对照组的 $56.34\pm51.73\text{ U}$,差异有显著性意义($P<0.05$);而GSH和NO的含量在两组间差异无显著性意义($P>0.05$)。结论 RE时食管黏膜MDA含量升高,SOD活力水平降低,表明氧化应激损伤在小儿食管黏膜损伤中起重要作用。

[中国当代儿科杂志,2009,11(6):425-428]

[关键词] 胃食管反流病;反流性食管炎;氧化应激;儿童
[中图分类号] R57 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2009)06-0425-04

Role of oxidative stress in the pathogenesis of esophageal mucosal injury in children with reflux esophagitis

LIU Feng, JIANG Mi-Zu, SHU Xiao-Li, ZHANG Xu-Ping. Children's Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310003, China (Jiang M-Z, Email: mizu@zju.edu.cn)

Abstract: Objective To investigate the role of oxidative stress in the pathogenesis of esophageal mucosa injury in children with reflux esophagitis (RE). **Methods** Esophageal mucosal samples from 36 children with RE (7 months to 16 years of age) were obtained by gastroscopy. The parameters of oxidative stress, including the contents of malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH) and nitric oxide (NO) and total superoxide dismutase (T-SOD) activity in the esophageal mucosa as well as the protein content of the esophageal mucosa, were measured. Twenty children (3 to 16 years of age) without esophageal mucosal injury by gastroscopy served as controls. **Results** There was no significant difference in the protein content of the esophageal mucosa between the RE and the control groups. The content of MDA in the RE group ($15.36\pm16.67\text{ nmol/mg}$) was significantly higher than that in the control group ($7.51\pm6.17\text{ nmol/mg}$) ($P<0.01$). The activity of T-SOD in the RE group ($30.43\pm35.09\text{ U/mg}$) was statistically lower than that in the control group ($56.34\pm51.73\text{ U/mg}$) ($P<0.05$). No significant differences were observed in GSH and NO contents between the two groups. **Conclusions** The MDA content increases and the SOD content decreases in the esophageal mucosa in children with RE. This suggests that oxidative stress seems to be an important mediator in generation of esophageal mucosal injury.

[Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11 (6):425-428]

Key words: Gastroesophageal reflux disease; Reflux esophagitis; Oxidative stress; Child

胃食管反流(GER)是儿科常见病,可引起食管炎、食管溃疡或狭窄等并发症。既往研究表明,胃内容的反流是引起食管黏膜损伤的主要因素,但反流并不一定都会引起食管黏膜炎症。目前,GER的治疗仍然以质子泵抑制剂抑酸为主,但有相当一部分患者不能获得痊愈。近来,氧化应激(oxidative stress)在食管黏膜损伤中的作用逐渐受到重视^[1~3]。氧化应激是指由于活性氧(reactive oxygen species,ROS)过量生成和/或细胞抗氧化防御系统受损导致氧自由基及其相关代谢产物过量聚集,从而对机体造成损害的病理状态。为进一步了解氧化应激在小儿食管黏膜损伤中的作用,我们测定了食

[收稿日期]2008-10-31;[修回日期]2008-12-18
[基金项目]浙江省自然科学基金(编号Y205074),教育部留学回国人员科研启动基金(教外司留2005.383号)。
[作者简介]刘峰,男,硕士,副主任医师。主攻方向:小儿消化系统疾病。现工作单位:浙江省台州市路桥中医院儿科。
[通讯作者]江米足,男,教授,浙江大学医学院附属儿童医院,邮编:310003。

管炎患儿食管黏膜丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH)、一氧化氮 (nitric oxide, NO) 含量和总超氧化物歧化酶 (total superoxide dismutase, T-SOD) 活力, 现报道如下。

1 对象和方法

1.1 对象

2006年9月至2007年3月因恶心、呕吐、烧心、呕血、上腹痛等上消化道症状在浙江大学医学院附属儿童医院行胃镜检查的患儿中, 诊断为反流性食管炎(RE) 患儿36例, 男26例, 女10例, 年龄7个月至16岁(平均 9.3 ± 3.9 岁); 经上述胃镜检查未发现食管黏膜异常的患儿中选20例作为对照组, 其中男12例, 女8例, 年龄3~16岁(平均 10.3 ± 3.3 岁)。两组患儿性别、年龄差异无显著性($P > 0.05$)。RE的诊断标准参照文献^[4]。本研究获得浙江大学医学院附属儿童医院医学伦理委员会的批准。

1.2 胃镜检查及食管黏膜处置

1.2.1 胃镜检查及食管黏膜标本采集 两组患儿行电子胃镜(Olympus GIF-160)检查时, 取其下段食管黏膜两块。一块用10%甲醛固定后常规苏木精-伊红染色, 光镜下观察组织病理变化; 另一块迅速置于冰盒中, 经电子天平称湿重后用于黏膜匀浆制作。

1.2.2 食管黏膜匀浆制作 食管黏膜标本加4℃生理盐水500 μL, 用匀浆器在冰浴中制备成0.5%~1.0%组织匀浆, 高速低温离心(4℃, 3 000 r/min)10 min后取上清液, -80℃保存待测。

1.3 主要试剂及配制

考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒(包含0.615 g/L蛋白标准液)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒、GSH测定试剂盒、MDA测定试剂盒、NO测定试剂盒, 均由中国南京建成生物工程研究所生产。配制方法严格按照试剂盒说明书操作完成。99.8%无水乙醇、

99.5%分析纯冰乙酸。

1.4 氧化应激指标及蛋白含量测定

1.4.1 食管黏膜标本蛋白含量测定(考马斯亮蓝测定法) 波长设定为595 nm, 根据标准曲线计算出食管黏膜匀浆的蛋白含量(g/L)。

1.4.2 MDA测定(TBA法) 532 nm波长处测量吸光度, 根据公式计算每毫克蛋白所含MDA的纳摩尔数(nmol/mg)。

1.4.3 T-SOD测定(羟胺法) 波长550 nm处比色, 通过所测吸光度计算出各样品每毫克蛋白所含总SOD活力单位(U/mg)。

1.4.4 GSH测定 412 nm波长处用酶标仪测定各样本吸光度, 根据公式计算出各样品每克蛋白所含GSH的毫克数(mg/g)。

1.4.5 NO测定(硝酸还原酶法) 在550 nm处测定吸光度, 计算每克蛋白所含NO的微摩尔数(μmol/g)。

1.5 统计学处理

计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 用SPSS 11.0软件包统计分析。因数据为非正态分布, 组间比较采用秩和检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 食管黏膜蛋白质含量

对照组和RE组食管黏膜蛋白质含量分别为 0.19 ± 0.11 和 0.21 ± 0.09 g/L, 两组经秩和检验, 差异无显著性意义。

2.2 食管黏膜氧化与抗氧化指标检测结果

RE组食管黏膜MDA值高于对照组, 差异有显著性意义($P < 0.01$); T-SOD活力RE组低于对照组, 差异有显著性意义($P < 0.05$); 而GSH和NO含量在两组间的差异无显著性意义(表1)。

表1 两组食管黏膜氧化应激指标的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	MDA 值(nmol/mg)	T-SOD 活力(U/mg)	GSH 值(mg/g)	NO 含量(μmol/g)
对照组	20	7.51 ± 6.17	56.34 ± 51.73	1345.47 ± 1049.93	649.38 ± 559.45
RE 组	36	15.36 ± 16.67	30.43 ± 35.09	1298.47 ± 770.51	743.89 ± 469.69
Z 值		2.668	2.103	0.718	1.385
P 值		<0.01	<0.05	>0.05	>0.05

3 讨论

氧化应激可引起生物膜脂质过氧化、细胞内蛋白及酶变性、DNA 损害,最后导致细胞凋亡、组织损伤,因而构成了许多疾病的病理学基础^[5]。氧自由基不仅通过脂质过氧化引起细胞损伤,还能通过脂质过氧化物的分解产物引起细胞代谢及功能障碍。MDA 是氧自由基攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸(PUFA)形成的脂质过氧化物,可反映体内脂质过氧化的程度,间接反应机体细胞受自由基攻击的严重性,进而反映细胞损伤的程度。本研究显示,RE 组 MDA 值高于对照组,差异有显著性意义,表明小儿 RE 时食管黏膜氧自由基的产生增多。高艳青等^[6]利用胃十二指肠混合反流性食管炎大鼠模型,发现炎症食管的组织中 MDA 含量明显增高,且与炎症的严重程度呈正相关,提示局部的炎症反应与自由基损伤密不可分。Oh 等^[7, 8]报道 RE 时 MDA 升高,核因子 κ B (NF- κ B) 活性增加, GSH 减少,认为氧自由基是引起 RE 的重要介质,氧化应激是引起 RE 食管黏膜损伤的重要致病因素。

SOD 和 GSH 氧化还原系统在防御氧化应激损伤中起着重要的作用^[5]。SOD 催化超氧阴离子歧化为 H_2O_2 与 O_2 ,能清除 O_2^- ,对机体的氧化与抗氧化平衡起着至关重要的作用,保护细胞免受损伤。SOD 高低反映了机体清除自由基能力的大小,其活性下降与 MDA 含量上升,反映了体内氧自由基的损伤。酶活性越低,说明局部耗竭越多,机体清除自由基能力越弱,炎症则趋于严重。生理情况下,胃肠道黏膜、黏膜下层、肌层和浆膜层所含的内源性酶类抗氧化剂远远低于肝脏组织,而且黏膜组织的酶活性大多存在于上皮细胞内,黏膜固有层仅含有极少数的内源性酶类抗氧化剂,这就使得食管黏膜在受到外源性化合物如反流物刺激时极易发生氧化应激,从而导致黏膜上皮的氧化损伤。本研究显示 RE 组 T-SOD 活力低于对照组,差异有显著性意义,提示小儿 RE 时食管黏膜清除氧自由基的能力下降。有报道 SOD 随着食管炎程度的加重而减少, RE 是由于大量自由基耗尽 SOD 后引起; Barrett 食管(BE)是氧化损伤的严重表现, BE 伴有严重食管炎者 SOD 水平低于 BE 伴轻度食管炎者;高 SOD 水平能防止食管黏膜的氧化损伤,防止食管黏膜的病变^[9]。SOD 可分为铜、锌、锰 SOD 亚型,有报道在胆汁诱发的食管炎中锰 SOD 表达与活性降低,且与食管炎症程度和细胞坏死有关^[10]。另有研究表明,

SOD 可防止胃酸和胃蛋白酶诱发的 RE^[11]。

GSH 是组织中主要的非蛋白质巯基化合物,是 GSH-Px 和谷胱甘肽硫-转移酶 (glutathione S-transferases, GST) 两种酶类的底物,可及时中止自由基链反应,抑制自由基的产生。本研究显示, GSH 的含量在 RE 组与对照组间的差异无显著性意义。但 Rantanen 等^[3]对 20 例 GERD 患者在抗反流手术前和术后 6 个月、48 个月分别测定远端食管黏膜髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 活性、SOD 和 GSH 水平,结果术后症状消失、pH 监测正常; MPO 降低,但仍较正常黏膜高;远端食管黏膜 GSH 水平低于正常对照, SOD 水平则变化不明显。Jimenez 等^[12]报道 RE 和 BE 患者食管黏膜 SOD 下降,而 GSH 和全血氧化氢酶升高。因此,有关 RE 时抗氧化系统的变化尚有待于进一步研究。

NO 是一种小分子量气体性质的生物活性分子,兼有第二信使和神经递质的功能,广泛参与生理功能的调节和病理过程的发生,近年成为胃肠疾病研究中的一个热点。NO 是以左旋精氨酸 (L-arginine, L-arg) 和分子氧为底物,在还原性辅酶 II (NADPH) 等因子辅助下,由 NO 合成酶 (nitric oxide synthase, NOS) 催化生成。NO 生成后很快即被氧化,以 NO_2^- 、 NO_3^- 形式存在于细胞内外液中, NO_2^- 又进一步转化为 NO_3^- 而失去生物活性。另一方面, NO 与 O_2^- 发生快速反应,生成过氧亚硝酸离子 ($ONOO^-$),后者具有更强的氧化活性,高浓度时可对细胞和线粒体造成不可逆性损伤。因此, NO 是一种重要的炎症介质,可引起急慢性炎症。动物实验表明,自由基、NO 在食管黏膜损伤的早期是升高的,而 L-arg 可加剧黏膜的损伤, NOS 抑制剂 L-硝基-精氨酸甲酯 (NG-nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME) 则影响不大^[13]。NOS 食管黏膜活性在食管黏膜损伤早期是升高的,但随着炎症的加重反而降低, NO 供体不能防止酸和胃蛋白酶引起的食管黏膜损伤^[11]。Inamori 等^[14]和 Tomita 等^[15]发现 RE 患者食管黏膜诱导型 NOS (iNOS) mRNA 表达增加, NO 含量明显增高,且与炎症程度成比例,提示 NO 可加剧食管黏膜炎症损伤,认为治疗 RE 时要减少 NO 产生以便阻止食管黏膜的进一步损伤。本研究显示, NO 的含量在 RE 组与对照组间的差异无显著性意义。因此, NO 在小儿 RE 的致病过程中的作用尚有待于进一步研究。

本研究表明,氧化应激在小儿 RE 食管黏膜损伤中起重要作用,但由于 RE 组病例数较少,未能进一步就食管黏膜病变程度与氧化应激关系进行探

讨。本研究提示在应用抑酸药治疗 RE 的同时要加强抗氧化治疗,补充外源性抗氧化剂以减轻或逆转局部的炎症反应,但确切的疗效尚有待验证。

[参 考 文 献]

[1] Farhadi A, Fields J, Banan A, Keshavarzian A. Reactive oxygen species: are they involved in the pathogenesis of GERD, Barrett's esophagus, and the latter's progression toward esophageal cancer? [J]. *Am J Gastroenterol*, 2002, 97(1):22-26.

[2] Erbil Y, Turkoglu U, Barbaros U, Balik E, Olgac V, Kaya H, et al. Oxidative damage in an experimentally induced gastric and gastroduodenal reflux model [J]. *Surg Innov*, 2005, 12(3):219-225.

[3] Rantanen TK, Räsänen J, Sihvo EI, Ahotupa MO, Färkkilä MA, Salo JA. The impact of antireflux surgery on oxidative stress of esophageal mucosa caused by gastroesophageal reflux disease: 4-yr follow-up study [J]. *Am J Gastroenterol*, 2006, 101(2):222-228.

[4] 《中华儿科杂志》编辑委员会, 中华医学会儿科学分会消化学组. 小儿胃食管反流病诊断治疗方案(试行) [J]. *中华儿科杂志*, 2006, 44(2):97.

[5] Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(1):29-38.

[6] 高艳青, 刘晓霓, 宋小莉, 司银楚, 牛欣. 氧化应激在反流物所致食管黏膜损伤中的作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2004, 20(2):149-153.

[7] Oh TY, Lee JS, Ahn BO, Cho H, Kim WB, Kim YB, et al. Oxidative stress is more important than acid in the pathogenesis of reflux oesophagitis in rats [J]. *Gut*, 2001, 49(3):364-371.

[8] Oh TY, Lee JS, Ahn BO, Cho H, Kim WB, Kim YB, et al. Oxidative damages are critical in pathogenesis of reflux esophagitis: implication of antioxidants in its treatment [J]. *Free Radic Biol Med*, 2001, 30(8):905-915.

[9] Wetscher GJ, Hinder RA, Klingler P, Gadenstatter M, Perdakis G, Hinder PR. Reflux esophagitis in human is a free radical event [J]. *Dis Esophagus*, 1997, 10(1):29-32.

[10] Li Y, Wo JM, Su RR, Ray MB, Martin RC. Loss of manganese superoxide dismutase expression and activity in rat esophagus with external esophageal perfusion [J]. *Surgery*, 2007, 141(3):359-367.

[11] Lanas A, Soteras F, Jimenez P, Fiteni I, Piazuelo E, Royo Y, et al. Superoxide anion and nitric oxide in high-grade esophagitis induced by acid and pepsin in rabbits [J]. *Dig Dis Sci*, 2001, 46(12):2733-43.

[12] Jimenez P, Piazuelo E, Sanchez MT, Ortego J, Soteras F, Lanas A. Free radicals and antioxidant systems in reflux esophagitis and Barrett's esophagus [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(18):2697-2703.

[13] Ozel Sk, Dagli TE, Yuksel M, Kiyan G, Kotiloglu E. The roles of free oxygen radicals, nitric oxide, and endothelin in caustic injury of rat esophagus [J]. *J Pediatr Surg*, 2004, 39(9):1381-1385.

[14] Inamori M, Shimamura T, Nagase H, Abe Y, Umezawa T, Nakajima A, et al. mRNA expression of inducible nitric oxide synthase, endothelial nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in esophageal mucosa biopsy specimens from patients with reflux esophagitis [J]. *Hepatogastroenterology*, 2006, 53(69):361-365.

[15] Tomita R, Tanjoh K, Fujisaki S, Fukuzawa M. Physiological studies on nitric oxide in the lower esophageal sphincter of patients with reflux esophagitis [J]. *Hepatogastroenterology*, 2003, 50(49):110-114.

(本文编辑:吉耕中)