

# 胃食管反流病患者食管上皮Occludin的表达及细胞间隙的改变

徐兆军, 张振玉, 黄文斌, 王劲松, 姜宗丹, 罗新华

徐兆军, 张振玉, 黄文斌, 王劲松, 姜宗丹, 罗新华, 南京医科大学附属南京第一医院消化科 江苏省南京市 210006  
作者贡献分布: 徐兆军与张振玉对此文贡献均等; 此课题由张振玉与徐兆军设计完成, 研究过程由徐兆军、黄文斌、王劲松、姜宗丹及罗新华完成; 研究经费由张振玉提供; 数据分析由徐兆军与张振玉完成; 论文写作由徐兆军与张振玉完成。  
通讯作者: 张振玉, 主任医师, 210006, 江苏省南京市长乐路68号, 南京医科大学附属南京第一医院消化科。  
ahwangzhibing776@163.com  
电话: 025-52271260  
收稿日期: 2009-05-02 修回日期: 2009-09-10  
接受日期: 2009-09-15 在线出版日期: 2009-09-28

## Expression of tight junction protein occludin and changes in intercellular space in the esophageal epithelium in patients with gastroesophageal reflux disease

Zhao-Jun Xu, Zhen-Yu Zhang, Wen-Bin Huang, Jin-Song Wang, Zong-Dan Jiang, Xin-Hua Luo

Zhao-Jun Xu, Zhen-Yu Zhang, Wen-Bin Huang, Jin-Song Wang, Zong-Dan Jiang, Xin-Hua Luo, Department of Gastroenterology, Nanjing First Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China  
Correspondence to: Zhen-Yu Zhang, Department of Gastroenterology, Nanjing First Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 450014, Jiangsu Province, China. ahwangzhibing776@163.com  
Received: 2009-05-02 Revised: 2009-09-10  
Accepted: 2009-09-15 Published online: 2009-09-28

### Abstract

**AIM:** To investigate the distribution and expression of tight junction protein occludin and observe changes in intercellular space in the esophageal epithelium in patients with gastroesophageal reflux disease (GERD).

**METHODS:** Sixty-two GERD patients (30 cases of reflux esophagitis (RE) and 32 cases of non-erosive reflux disease (NERD) and 10 non-GERD patients were included in the study. Immunohistochemistry was used to examine the distribution and expression of occludin in the esophageal epithelium in these patients. The stained

sections were observed and photographed under light microscopy. The intercellular space in the esophageal epithelium was measured by computer-assisted morphometry. One hundred measurements were performed in each case to calculate the mean intercellular space diameter.

**RESULTS:** Occludin was distributed continuously in the cell membrane in normal esophageal epithelium. Of 32 NERD patients, 4 showed normal occludin expression, and 28 showed varying degrees of aberrant occludin expression (e.g., incomplete membrane expression, cytoplasmic expression and expression loss). In contrast, all RE patients showed aberrant occludin expression. The rates of aberrant occludin expression in NERD and RE patients were significantly higher than that in non-GERD patients (both  $P < 0.01$ ). No significant difference was observed in the rate of aberrant occludin expression between RE and NERD patients ( $P > 0.05$ ). The mean intercellular space diameters in NERD and RE patients were significantly higher than that in non-GERD patients ( $1.38 \pm 0.26 \mu\text{m}$  and  $1.51 \pm 0.31 \mu\text{m}$  vs  $0.77 \pm 0.12 \mu\text{m}$ , respectively; both  $P < 0.01$ ). No significant difference was noted in the mean intercellular space diameter between RE and NERD patients ( $P > 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Occludin shows diminished expression and altered distribution in the esophageal epithelium in patients with gastroesophageal reflux disease. Aberrant expression of occludin may result in dilated intercellular space and impair the integrity of mucosal epithelial barrier, which may partly explain the pathogenesis of GERD.

**Key Words:** Gastroesophageal reflux disease; Tight junction protein; Dilated intercellular space; Immunohistochemistry; Light microscopy

Xu ZJ, Zhang ZY, Huang WB, Wang JS, Jiang ZD, Luo XH. Expression of tight junction protein occludin and changes in intercellular space in the esophageal epithelium in patients with gastroesophageal reflux disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(27): 2835-2839

**背景资料**  
胃食管反流病是消化系常见病之一, 目前所知临床发病机制主要是下食管括约肌一过性松弛, 进一步的机制并不是很确切。临床上分为反流性食管炎(RE)、非糜烂性胃食管反流病(NERD)及Barrett's食管。

**同行评议者**  
潘秀珍, 教授, 福建省立医院消化内科

### 相关报道

Calabrese的研究显示,伴有病理性酸反流NERD患者,经质子泵抑制剂(PPI)治疗后随着症状的消失其DIS亦恢复正常。谷仲平 *et al* 研究发现,GERD患者食管黏膜上皮细胞间隙明显增大,而内镜下黏膜正常与黏膜异常的GERD患者细胞间隙无明显差异。

### 摘要

**目的:** 研究胃食管反流病(GERD)患者食管上皮细胞紧密连接蛋白Occludin表达的变化及食管上皮细胞间隙的改变。

**方法:** 采用免疫组织化学法检测62例GERD患者[其中反流性食管炎(RE组)患者30例,非糜烂性反流病(NERD组)患者32例]及10例正常对照食管下段上皮的紧密连接蛋白Occludin表达,并在光镜下观察切片并采集图像,采用图像分析系统对每例切片测量100个细胞间隙,进行统计学分析。

**结果:** 10例正常对照组Occludin呈正常连续的细胞膜表达,NERD组4例正常表达,28例不同程度异常表达,为细胞膜不完整表达、细胞质表达及表达缺失,30例RE均表达异常;RE组和NERD组Occludin阳性率与正常对照组比较,差异均有显著性( $P < 0.01$ ),而RE组与NERD组间比较,无显著差异。RE组和NERD组平均细胞间隙与正常对照组比较,均有显著性差异( $1.51 \pm 0.31 \mu\text{m}$ ,  $1.38 \pm 0.26 \mu\text{m}$  vs  $0.77 \pm 0.12 \mu\text{m}$ , 均 $P < 0.01$ ),而RE组和NERD组间无显著差异。

**结论:** 胃食管反流病患者食管上皮Occludin数量减少、分布异常,导致细胞间隙增宽,影响黏膜上皮屏障的完整性,可能是胃食管反流病的发病机制之一。

**关键词:** 胃食管反流病; 紧密连接蛋白; 细胞间隙增宽; 免疫组织化学; 光镜测量

徐兆军, 张振玉, 黄文斌, 王劲松, 姜宗丹, 罗新华. 胃食管反流病患者食管上皮Occludin的表达及细胞间隙的改变. 世界华人消化杂志 2009; 17(27): 2835-2839  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2835.asp>

### 0 引言

胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)系指胃内容物反流入食管,引起不适症状和(或)并发症的一种疾病<sup>[1]</sup>。诊断标准主要结合: (1)临床典型的烧心、反流症状; (2)胃镜; (3)PPI试验; (4)食管24 h pH及胆汁监测。临床上分为反流性食管炎(reflux esophagitis, RE)、非糜烂性胃食管反流病(nonerosive reflux disease, NERD)及Barrett's食管,其发生与抗反流屏障功能失调有关,包括下食管括约肌松弛、食管内反流物清除障碍、食管黏膜防御能力下降等。食管黏膜防御主要为上皮屏障,结构上由细胞

膜和紧密连接蛋白(tight junction, TJ)组成, TJ由跨膜蛋白(Occludin、Claudin)、胞质附着蛋白(ZO-1)、细胞骨架蛋白相连组成。近年研究表明,  $\text{H}^+$ 进入和破坏食管上皮的主要途径是经由损坏的细胞间连接弥散到细胞间隙,使酸浸润到上皮下层而产生症状或黏膜破损,而紧密连接的破坏,继发细胞间隙的增宽。国外动物实验<sup>[1]</sup>显示食管炎大鼠Claudin-1表达增强, Claudin-3表达减低,而Claudin-4和Occludin由细胞膜表达转换为胞质表达。其在人GERD中的表达尚未见类似报道。本文对紧密连接蛋白的一种-Occludin在GERD患者食管上皮中的表达及细胞间隙变化进行研究。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 选取2007-01/2008-12我院门诊有反流症状患者62例,其中男34例,女28例,年龄26-78(平均 $50.02 \pm 13.65$ )岁,根据最新中国GERD共识意见的GERD诊断标准<sup>[1]</sup>,行电子胃镜检查及食管24 h pH监测,确诊为GERD患者,并区分RE及NERD,分别为30例及32例,其中RE男18例,女12例,NERD男16例,女16例。RE患者在距离食管下端3-5 cm处选择糜烂处取活检,NERD在相同水平位置取活检,再选择无反流症状非GERD的患者(食管上中段病变手术者切缘为下段食管达到相同水平位置)10例做比较,其中男6例,女4例,年龄43-72(平均 $54.7 \pm 9.74$ )岁,均送病理检查。

### 1.2 方法

**1.2.1 组织学和免疫组织化学染色:** 采用SABC法,光镜下观察Occludin表达。组织用10%甲醛固定24 h后,取材,经脱水透明浸蜡包埋制成蜡块,蜡块切片后进行脱蜡,梯度酒精至水,用PBS(pH7.4)冲洗3次,每次3 min,对切片用胃酶消化处理37℃ 20-30 min, PBS冲洗3次,每次3 min,除去PBS液,每张切片加1滴Occludin抗体(美国Zymed公司),冰箱4℃过夜, PBS冲洗3次,每次3 min,除去PBS液,每张切片加1滴DAKO抗兔二抗,温箱37℃孵育40 min, PBS冲洗3次,每次3 min,除去PBS液,每张切片加2滴新鲜配制的DAB溶液,显微镜下观察1-3 min。自来水冲洗,苏木素复染1 min,自来水冲洗返蓝。则切片经过梯度酒精脱水干燥,二甲苯透明,中性树胶封固。采用显微镜下观察其表达部位及类型。结果判断: Occludin正常表达于上皮细胞,呈完整的胞膜表达;当细胞膜表达不完整、胞质表达或不表达时均视为Occludin表达异常。

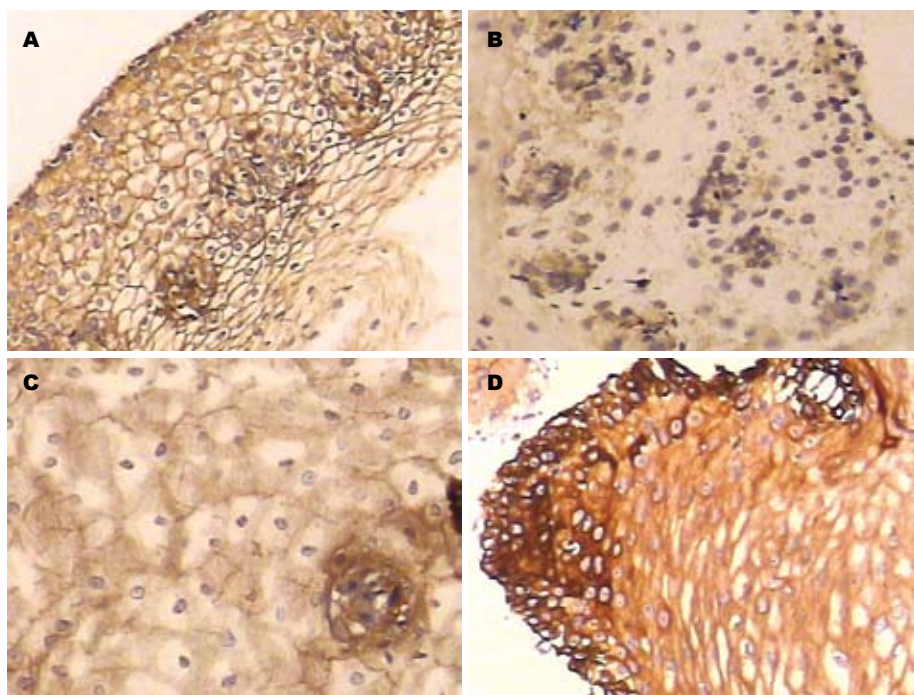


图1 不同组别Occludin表达的光镜下图谱. A: 正常对照组正常表达( $\times 20$ ); B: RE组失表达( $\times 20$ ); C: NERD组细胞膜表达不完整( $\times 40$ ); D: RE组细胞质表达( $\times 20$ ).

**应用要点**  
本研究提示, GERD患者由于食管上皮层紧密连接结构和功能异常, 细胞间隙增宽, 黏膜通透性升高,  $H^+$ 、胃蛋白酶、胆汁酸等透过上皮层, 作用于黏膜下的神经末梢, 引起烧心、反酸、胸痛等临床症状. 而NERD与RE的Occludin表达无明显差异亦可解释两者的临床症状差别不大, 具体机制有待进一步实验研究证实.

**1.2.2 HE染色标本制作及光镜下细胞间隙测量:** 另取切片后行HE染色. 光镜( $\times 400$ )观察并采集图像, 采用RAS9000病理图像分析系统(无锡朗伽公司)测量细胞间隙宽度. 光镜测量时, 选取基底上层或棘层的细胞核居中、核仁明显的细胞, 采用盲法对每例切片随机选择10个不同位置取10张照片, 每张测量10个细胞间隙, 计算测量得到的100个细胞间隙平均值, 然后计算平均值.

**统计学处理** 使用SPSS15.0软件进行分析, 正态分布的计量资料以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 采用 $t$ 检验, 计数资料采用 $\chi^2$ 检验,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 免疫组织化学法测定Occludin的表达** Occludin主要分布在细胞膜和细胞质中, 经DAB显色后, Occludin免疫反应沉淀物在细胞膜、细胞质呈棕色或黄色颗粒, 正常食管黏膜处Occludin主要在黏膜层下方均匀的连续分布, 似一道屏障, 而RE及NERD患者黏膜层Occludin数量减少, 且分布间断、不均匀, 密度和数量上均低于正常食管黏膜上皮, 细胞膜上Occludin明显减少, 部分细胞出现胞质内Occludin的表达. 正常对照组食管组织中Occludin的表达: 10例正常食管组织中Occludin在食管基底旁细胞和棘细胞层呈连续的细胞膜阳性, 染色强度为淡黄色, 基底细胞Occludin的表达为连续的深棕黄色的胞膜阳性, 上皮间质未见Occludin表达; NERD组中Oc-

cludin的表达: 32例NERD患者, Occludin有4例正常表达, 另外28例均有不同程度的表达异常者, 表达异常主要位于棘细胞和基底旁细胞层, 而基底细胞表达模式与正常食管黏膜相似, 28例Occludin表达异常者中, 细胞膜表达不完整者5例, 细胞质表达者11例, 失表达者12例; RE组中Occludin的表达: 30例RE患者中, Occludin均有不同程度的表达异常, 表达异常部位主要位于棘细胞层和基底旁细胞层, 而基底细胞表达模式与正常食管黏膜相似, 30例RE患者中, 细胞膜表达不完整者7例, 细胞质表达者15例, 表达阴性者8例(图1, 表1).

**2.2 细胞间隙** 各组细胞间隙见图2, 表2.

## 3 讨论

TJ是细胞间连接的一个重要形式, 他是构成黏膜机械屏障最重要的结构, 由Claudin蛋白、Occludin蛋白、JAM、ZOs等结构蛋白及各类连接蛋白分子共同组成<sup>[3-5]</sup>, Occludin是最先分离出来的TJ跨膜蛋白<sup>[6]</sup>, 相对分子质量为65 kDa, 形成2个细胞外环和1个短的细胞内环. 免疫电镜显示Occludin定位在TJ上<sup>[7-9]</sup>, Occludin蛋白是TJ中最重要的结构蛋白, 他不仅能通过外环以拉链式结合进而产生严密的细胞旁封闭, 还能与不同的分子结合, 参与TJ形成的信号调节<sup>[10-11]</sup>, Occludin与ZO-1形成紧密连接蛋白的基本结构, Occludin功能广泛, 涉及细胞间黏附、移动、调节细胞通透性及细胞表型的改变<sup>[12]</sup>. 在低氧、炎



## 同行评价

本文立意依据充分, 设计合理, 病例诊断明确, 有一定的技术难度, 结果可靠, 为胃食管反流病的发病机制提供理论依据, 对临床诊治有参考意义。

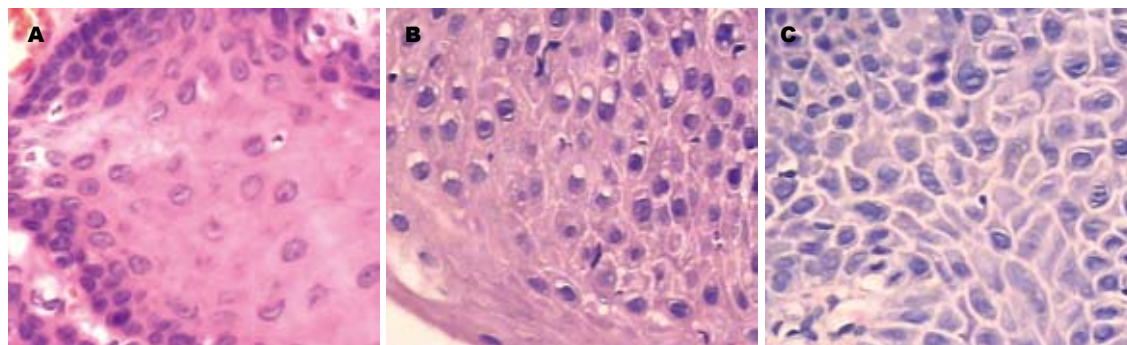


图 2 光镜下各组细胞间隙(HE × 400). A: 正常对照组; B: NERD组; C: RE组.

表 1 Occludin在NERD、RE和正常对照食管组织中的表达

分组	n	正常表达	异常表达			异常表达阳性率(%)
			细胞膜表达不完整	细胞质表达	失表达	
正常对照组	10	10	0	0	0	0
NERD组	32	4	5	11	12	87.5 <sup>b</sup>
RE组	30	0	7	15	8	100.0 <sup>b</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 正常对照组.

表 2 NERD、RE和正常对照食管上皮平均细胞间隙

分组	n	平均细胞间隙(μm)
正常对照组	10	0.77 ± 0.12
NERD组	32	1.38 ± 0.26 <sup>b</sup>
RE组	30	1.51 ± 0.31 <sup>b</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 正常对照组.

性因子刺激等病理情况下可引起Occludin等分布异常、表达减少甚至融解, 导致TJ结构和功能的异常, 细胞间隙增宽, 进而使内皮层通透性升高<sup>[12-13]</sup>. 国内外研究显示, 在RE和内镜阴性的NERD组中, 食管黏膜细胞间隙皆存在增宽<sup>[14-15]</sup>, 其通透性增大<sup>[16]</sup>. 有研究显示上皮细胞间隙增宽是NERD的客观结构指标<sup>[17]</sup>. Calabrese的研究显示, 伴有病理性酸反流NERD患者, 经质子泵抑制剂(PPI)治疗后随着症状的消失, 其上皮细胞间隙亦恢复正常<sup>[18]</sup>. 国内谷仲平 *et al* 研究发现, GERD患者食管黏膜上皮细胞间隙明显增大, 而内镜下黏膜正常与黏膜异常的GERD患者细胞间隙无明显差异<sup>[19]</sup>. 本文主要研究了GERD患者中食管上皮中Occludin表达变化及细胞间隙的改变. 研究发现, 在GERD患者中, NERD及RE病例Occludin表达均有异常, 为蛋白量下降、或转为胞质表达、或失表达, 这与国外动物实验报

道结果相符, NERD组与正常对照组比较、RE与正常对照组比较, 均有明显表达异常, 差异有显著性(均 $P < 0.01$ ); 而RE组与NERD组比较, 差异无显著性, 而细胞间隙比较GERD患者与对照组有显著差异, RE组与NERD组无明显差异. 这从某种意义上可以考虑GERD患者发病机制分子学基础可能与TJ的表达异常, 特别是Occludin的表达异常有关. 从本研究来看, GERD患者由于食管上皮层紧密连接结构和功能异常, 细胞间隙增宽, 黏膜通透性升高,  $H^+$ 、胃蛋白酶、胆汁酸等透过上皮层, 作用于黏膜下的神经末梢, 引起烧心、反酸、胸痛等临床症状. 而NERD与RE的Occludin表达无明显差异亦可解释两者的临床症状差别不大, 具体有待进一步实验研究证实.

GERD是消化系统常见病之一, 目前所知临床发病机制主要是下食管括约肌一过性松弛, 进一步的机制并不是很确切, 从本研究来看, 可能与紧密连接蛋白, 特别是Occludin的表达异常, 导致细胞间隙增大有关.

#### 4 参考文献

- 林三仁, 许国铭, 胡品津, 周丽雅, 陈旻湖, 柯美云, 袁耀宗, 房殿春, 萧树东. 中国胃食管反流病共识意见. 中华内科杂志 2007; 46: 170
- Asaoka D, Miwa H, Hirai S, Ohkawa A, Kurosawa A, Kawabe M, Hojo M, Nagahara A, Minoo T,

- Ohkura R, Ohkusa T, Sato N. Altered localization and expression of tight-junction proteins in a rat model with chronic acid reflux esophagitis. *J Gastroenterol* 2005; 40: 781-790
- 3 宋红丽, 吕飒, 马力, 李颖, 刘沛. TNF- $\alpha$ 影响肠黏膜上皮细胞间紧密连接蛋白的表达. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1303-1306
- 4 Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 1998; 141: 1539-1550
- 5 Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* 1998; 142: 117-127
- 6 Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 1993; 123: 1777-1788
- 7 Hirase T, Staddon JM, Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Itoh M, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S, Rubin LL. Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. *J Cell Sci* 1997; 110 (Pt 14): 1603-1613
- 8 Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Itoh M, Furuse M, Inazawa J, Fujimoto K, Tsukita S. Mammalian occludin in epithelial cells: its expression and subcellular distribution. *Eur J Cell Biol* 1997; 73: 222-231
- 9 Fujimoto K. Freeze-fracture replica electron microscopy combined with SDS digestion for cytochemical labeling of integral membrane proteins. Application to the immunogold labeling of intercellular junctional complexes. *J Cell Sci* 1995; 108 (Pt 11): 3443-3449
- 10 Chen YH, Lu Q, Goodenough DA, Jeanson B. Nonreceptor tyrosine kinase c-Yes interacts with occludin during tight junction formation in canine kidney epithelial cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13: 1227-1237
- 11 Nusrat A, Chen JA, Foley CS, Liang TW, Tom J, Cromwell M, Quan C, Mrsny RJ. The coiled-coil domain of occludin can act to organize structural and functional elements of the epithelial tight junction. *J Biol Chem* 2000; 275: 29816-29822
- 12 刘理. 紧密连接的分子基础及其调控. *国外医学·生理病理科学与临床分册* 1999; 19: 75-78
- 13 Berkes J, Viswanathan VK, Savkovic SD, Hecht G. Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. *Gut* 2003; 52: 439-451
- 14 Calabrese C, Fabbri A, Bortolotti M, Cenacchi G, Areni A, Scialpi C, Miglioli M, Di Febo G. Dilated intercellular spaces as a marker of oesophageal damage: comparative results in gastro-oesophageal reflux disease with or without bile reflux. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18: 525-532
- 15 薛艳, 周丽雅, 林三仁, 黄永辉. 胃食管反流病患者食管下段鳞状上皮细胞间隙的改变. *中华消化杂志* 2006; 26: 797-800
- 16 Tobey NA, Hosseini SS, Argote CM, Dobrucali AM, Awayda MS, Orlando RC. Dilated intercellular spaces and shunt permeability in nonerosive acid-damaged esophageal epithelium. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 13-22
- 17 Kahrilas PJ. Dilated intercellular spaces: extending the reach of the endoscope. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 549-550
- 18 Calabrese C, Bortolotti M, Fabbri A, Areni A, Cenacchi G, Scialpi C, Miglioli M, Di Febo G. Reversibility of GERD ultrastructural alterations and relief of symptoms after omeprazole treatment. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 537-542
- 19 谷仲平, 刘锴, 王云杰, 罗金燕, 程庆书, 张军. 人食管上皮酸反流损伤的早期超微结构改变. *世界华人消化杂志* 2000; 8: 256-258

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》标点符号用法

本刊讯 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体. (科学编辑: 李军亮 2009-09-28)